



Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux

Département du Centre de Coopération Internationale  
en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)

CONTRAT DE RECHERCHE  
N° TS2A - 0261 - M (CD)

MECANISMES DES REACTIONS DE  
DEFENSE DU PALMIER A HUILE  
VIS-A-VIS DU *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *ELAEIDIS*

*Etudes cytologiques et analyses biochimiques  
Application au renforcement des critères de sélection*

RAPPORT SEMESTRIEL N° 4  
(FEVRIER 1992)

J.L. RENARD

Doc. n° 2415



CONTRAT DE RECHERCHE  
N° TS2A - 0261 - M (CD)

MECANISMES DES REACTIONS DE  
DEFENSE DU PALMIER A HUILE  
VIS-A-VIS DU *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *ELAEIDIS*

*Etudes cytologiques et analyses biochimiques  
Application au renforcement des critères de sélection*

RAPPORT SEMESTRIEL N° 4  
(FEVRIER 1992)

J.L. RENARD

Doc. n° 2415



CONTRAT DE RECHERCHE  
N° TS2A - 0261 - M (CD)

MECANISMES DES REACTIONS DE  
DEFENSE DU PALMIER A HUILE  
VIS-A-VIS DU *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *ELAEIDIS*

*Etudes cytologiques et analyses biochimiques*  
*Application au renforcement des critères de sélection*

RAPPORT SEMESTRIEL N° 4  
(FEVRIER 1992)

INTRODUCTION

Le semestre écoulé a été marqué essentiellement par la rencontre de tous les participants à Montpellier. Ce séminaire a permis aux chercheurs de mieux se connaître et a donné lieu à de nombreux échanges d'idées et à des discussions fructueuses qui devraient renforcer les liens entre les chercheurs au profit des recherches sur la fusariose du palmier à huile. Le compte-rendu de ce séminaire est présenté en annexe 1 avec la plupart des résumés des communications.

I. ACTIVITES CONDUITES AU COURS DE LA PERIODE SEPTEMBRE 1991 -  
FEVRIER 1992

Au cours de cette période, les efforts ont porté sur deux thèmes de recherches :

- les aspects biochimiques de la résistance
- la variabilité du pouvoir pathogène

Nous examinerons successivement ces deux aspects.

## I.1. BIOCHIMIE DE LA RESISTANCE

Selon les partenaires, l'analyse biochimique de la résistance est envisagée sous des angles différents :

### I.1.1. En Côte d'Ivoire et en collaboration avec l'Université Claude Bernard de Lyon

Les recherches sont axées sur le métabolisme phénolique-constitutif et consécutif à l'infection par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*. Les analyses préparatives réalisées par le Pr JAY à Lyon ont permis de tester sur quelques échantillons de bulbe et de racine la méthode d'extraction et d'analyser en HPLC reverse C18 puis de définir la répartition des familles phénoliques structurales à partir des lectures HPLC à différentes longueurs d'onde (de 280 à 350 nm) (Annexe II a). Ces techniques d'analyse mises en oeuvre sur les essais réalisés en Côte d'Ivoire avec des clones connus, tolérants et sensibles conduisent aux résultats suivants (Annexe II b).

- Au niveau de la technique, l'extraction des constituants phénoliques dans l'éthanol à froid est moins performante que dans l'éthanol à ébullition ; la saponification donne un faible rendement. A partir de l'extraction dans l'éthanol à ébullition, les profils chromatographiques obtenus sur colonne de silice simple sont moins détaillés que ceux obtenus sur colonne ultrabase reverse phase C18.

#### COMMENTAIRES

Tous ces résultats doivent être validés sur un plus grand nombre de clones pour envisager d'entrevoir des applications au niveau de la sélection.

- Le pseudobulbe est moins riche en phénols totaux que les racines.
- L'extraction à froid est plus discriminante que l'extraction à ébullition : teneurs constitutives plus faibles en phénols totaux pour les clones sensibles que pour les clones tolérants.

- Une réponse rapide à l'inoculation (24 h) est observée dans le pseudobulbe sur le clone tolérant, alors qu'aucune modification n'intervient sur le clone sensible. De même, une forte modification apparaît au niveau du système racinaire sur le clone tolérant.

### I.1.2. Analyse constitutive des téguments de graines

Les travaux en cours à l'Université Libre de Bruxelles s'attachent à rechercher des critères de sélection au niveau des téguments des semences (Annexe III). Les résultats présentés à partir d'analyses de 2 lots de semences de croisements sensible et tolérant expriment des différences intéressantes qu'il convient de vérifier sur un nombre plus important de croisements.

#### COMMENTAIRES

On peut faire remarquer que l'endocarpe (coque des semences) a une origine maternelle et que les analyses effectuées sur cet endocarpe ne traduisent pas, de ce fait, le comportement du croisement proprement dit mais qu'elles caractérisent le géniteur femelle. Il serait par conséquent intéressant de considérer une gamme étendue de géniteurs (femelle et mâle) connus pour transmettre leur résistance ou leur sensibilité. (Restriction cependant au niveau des Pisifera qui ne produisent en général pas de fruits -ou des fruits avec un endocarpe quasi inexistant-.

### I.1.3. Analyses enzymatiques

Le précédent rapport du Dr OSAGIE a été communiqué individuellement à chaque partenaire (hors du rapport semestriel global). Il faisait état des modifications enzymatiques intervenant au cours de l'infection.

L'analyse de l'activité enzymatique est en cours. Les études sérologiques prévues au programme n'ont toujours pas débuté.

### CONCLUSION sur l'aspect biochimique de la résistance

Les résultats des analyses des constituants phénoliques sont encourageants et les orientations techniques se précisent mais aucune généralisation n'est encore possible.

La différence observée dans les téguments des semences entre croisements sensible et tolérant est intéressante mais le marqueur de résistance observé reste à valider sur un grand nombre de génotypes.

Ces recherches mettent en évidence l'existence de différences entre cultivars tolérants et sensibles qu'il semble encore difficile de bien préciser pour déboucher sur quelque application.

**NB** : Les études en cours à Bath sur les barrières physiques et les phénomènes cytologiques de la résistance sont relatées dans le résumé de la communication présentée au séminaire. Ces études n'ont pas fait l'objet de compte-rendu supplémentaire.

## I.2. VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE

### I.2.1. Stabilité du pouvoir pathogène (Annexe V)

Les résultats des inoculations conduites à Montpellier montrent que, pour un isolat donné et les clones qui en sont issus, le pouvoir pathogène ne varie pas. De plus, on constate que le pouvoir pathogène ne change pas au cours de la conservation du pathogène (soit par stockage prolongé de la souche, soit par repiquages successifs).

### COMMENTAIRES

Ces résultats sont intéressants sur un plan pratique car ils permettent d'éliminer tout facteur de variabilité dû à la souche dans des essais. Nous pensons toutefois que ces conclusions, bien qu'intéressantes, mériteraient d'être validées sur un plus grand nombre de plantules (avec un plus grand nombre de répétitions).

### I.2.2. Etude du pouvoir pathogène d'isolats d'origines géographiques différentes (Annexe VI)

Les inoculations entreprises à Bath avec différents isolats et plusieurs types de matériel végétal prennent en compte différents paramètres :

- Hauteur des plantules : L'effet de l'inoculation avec des souches pathogènes est évidente sur la taille des plants.

#### REMARQUES

L'inoculation entraîne un rabougrissement, bien connu, et se traduit par une réduction de la taille des plants. Les valeurs indiquées représentent une moyenne mais qu'en est-il de la taille des plants non malades ?

L'inoculation des souches du sol ne modifie pas le développement des plants.

Cette mesure est intéressante mais l'interprétation entre géotypes est difficile du fait que la croissance varie en fonction du matériel végétal.

- Wilt index

#### REMARQUE

Cette évaluation semble assez peu discriminante pour évaluer le pouvoir pathogène des isolats, en particulier pour le matériel végétal qui présente une certaine tolérance à la fusariose.

- Vascular necrosis : Ce critère est intéressant car il démontre que des brunissements peuvent intervenir dans du matériel sensible avec des souches isolées du sol, a priori non pathogènes.
- Réisolements : Cette évaluation précise le critère précédent et démontre que le champignon inoculé peut être présent dans le pseudobulbe sans entraîner de brunissement du pseudobulbe ; il y a parasitisme sans manifestation du pouvoir pathogène.

- Comparaison du comportement des différents types de matériel végétal : Des différences d'agressivité sont observées: Y (Yaligimba) est la souche la moins agressive, suivie de R (F.redolens , Yaligimba), puis de F3 (Binga) et de 1379 (Brésil).

L'analyse statistique, par colonne, permet de classer le matériel végétal et de définir 2 groupes de comportement : sensible (S) et résistant (R). Ce type de classement, par rapport au clone de référence au clone 2, sans tenir compte du degré d'agressivité des souches, montre, par exemple, que le croisement WS Cross 1 est classé R avec Y1 et R1, et S avec 1379, et que le croisement WST cross est classé S avec R1 et 1379, et R avec Y1.

La présentation du tableau VII (contenu dans le rapport J.FLOOD), sous la forme suivante, montrerait l'importance de l'agressivité des souches et l'effet progressif de cette agressivité dans le classement du matériel végétal (au contraire d'un classement tout ou rien du type R et S). On s'aperçoit aussi que le croisement témoin résistant WR cross 2 n'est pas aussi tolérant que ne le laisse supposer sa dénomination, et ceci quelle que soit la souche.

|            | Y1 | R1  | 1379 |  |
|------------|----|-----|------|--|
| WS cross 1 | S  | S   | S    | ↑ tolérance<br>décrois-<br>sante du<br>matériel<br>végétal |
| WS clone 1 | S  | S   | S    |  |
| WR cross 2 | S  | S/R | S    |  |
| WST cross  | R  | S   | S    |  |
| WR cross 1 | R  | R   | S    |  |
| WR clone 2 | R  | R   | R    |  |

→  
agressivité croissante  
des souches

#### REMARQUES

Cette expérimentation et les conclusions auxquelles elle peut aboutir sont d'une grande importance dans la pratique. Il est en effet du plus haut intérêt de savoir s'il existe ou non des interactions génotype x souche. C'est pourquoi l'interprétation doit être faite avec la plus grande précision possible. Pour cela, il nous semble que l'expérimentation doit être réalisée sur un plus grand nombre de plants (> 16) et plusieurs répétitions.

Pour tenter d'expliquer les différences de comportement du matériel végétal observées entre la Côte d'Ivoire et le Nigeria, un échange de matériel végétal a eu lieu. L'essai est en cours (Annexe IV).

### I.2.3. Groupes de compatibilité végétative du FOE

L'étude conduite par l'ORSTOM définit 7 groupes de compatibilité végétative. Malgré le faible nombre d'isolats étudiés, on constatera que ces groupes recouvrent l'origine géographique mais que des exceptions existent :

- Le groupe GCV 1, le plus important, recouvre les isolats de Côte d'Ivoire, du Bénin, du Brésil et de l'Equateur.
- Les souches isolées du Ghana se retrouvent dans 2 groupes, GCV 2 et GCV 3.

## II. CONCLUSIONS

Le programme est réellement entré dans une phase dynamique :

- Les analyses biochimiques commencent à fournir des résultats intéressants et encourageants.
- Les inoculations de souches d'origines différentes méritent d'être répétées et étendues car elles devront déboucher sur des résultats d'un grand intérêt pour la sélection.
- De même, l'identification des GCV est d'un intérêt certain, en liaison également avec la sélection du matériel végétal. Ces informations seront complétées dans le cadre d'un autre programme axé sur les techniques de biologie moléculaire (RFLP / sondes moléculaires).

Une des principales recommandations du séminaire d'octobre 1991 péconisait l'échange de matériel végétal et l'échange de souches. Ces échanges ont débuté mais plus que jamais les résultats actuels démontrent la nécessité absolue de tels échanges.

## ANNEXE I

### PROGRAMME DES REUNIONS SUR LE THEME DE LA FUSARIOSE DU PALMIER A HUILE

PROJET CEE N° TS2A-0261-M (CD)

#### PARTICIPANTS

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| C. ABADIE (All. MRT, CIRAD)             | J.P. GEIGER (ORSTOM)        |
| H. VAN AMSTEL (UNILEVER)                | M. JAY (Univ. Lyon I)       |
| L. BAUDOIN (IRHO MPL)                   | V. LE GUEN (IRHO MPL)       |
| R. COOPER (Univ. Bath)                  | R. MEPSTED (Univ. Bath)     |
| J. COREMANS-PELSENNER (Univ. Bruxelles) | I. MOUYNA (All. MRT, CIRAD) |
| C. DOSSA (ORSTOM)                       | J.M. NOIRET (IRHO Paris)    |
| D. FERNANDEZ (ORSTOM)                   | I.J. OSAGIE (NIFOR Nigeria) |
| J. FLOOD (Univ. Bath)                   | A. PANDO-BAHUON (ORSTOM)    |
| H. de FRANQUEVILLE (IRHO CIV)           | P. QUENCEZ (IRHO Paris)     |
|   | J.L. RENARD (IRHO MPL)      |

#### Lundi 30 Septembre 1991

|          |       |  |
|----------|-------|--|
|          | 9:00  | Accueil des participants   |
| III.2.1  | 9:15  | J.L.RENARD, présentation du projet CEE<br>(symptômes - dégâts - moyens de lutte)   |
|          | 10:15 | <i>Pause café</i>  |
|          |       | <b><u>THEME 1</u> : Inoculation du FOE sur plantules de palmier à<br/>huile - Applications</b>                           |
| III.2.2  | 10:30 | H. de FRANQUEVILLE - Test d'inoculation des clones<br>de palmier à huile en préépinière - Premiers<br>résultats au champ |
| III.2.3. | 11:15 | C.DOSSA - Méthode de lutte de la symptomatologie<br>de la fusariose sur plantules de clones en serre                     |
| III.2.4  | 11:45 | R.MEPSTED - The effect of <i>Fusarium</i> wilt on the<br>physiology and development of oil palm                          |
|          | 12:30 | <i>Déjeuner</i>  |
| III.2.5  | 14:15 | C.ABADIE - Comparaison de la réceptivité des sols<br>à la fusariose du palmier à huile                                   |

- III.2.6 15:00 H. de FRANQUEVILLE - Les problèmes posés par les tests de préépinière, sources possibles de variabilité
- 15:45 *Pause-café*
- 16:00 Discussion générale sur le thème 1

Mardi 1er Octobre 1991

THEME 2 : Variabilité du *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*

- III.2.7 8:15 C.DOSSA - Variabilité morphologique chez le *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*
- III.2.8 8:45 A.PANDO-BAHUON et D.FERNANDEZ - Polymorphisme enzymatique de l'ADN génomique chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*
- III.2.9 9:15 I.MOUYNA - Sonde caractérisant les *Fusarium oxysporum* responsables des maladies vasculaires de différentes espèces de palmiers
- III.2.10 9:45 C.DOSSA - Compatibilité végétative chez le *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*
- 10:15 *Pause-café*

THEME 3 : Mécanismes de résistance

- III.2.11 10:45 J.FLOOD - Résistance of oil palm to vascular wilt
- III.2.12 11:30 M.JAY - Approche biochimique des mécanismes de résistance du palmier à huile à l'égard du *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*
- 12:15 *Déjeuner*
- III.2.13 13:45 J.COREMANS-PELSENEER - Chemical resistance of *Elaeis guineensis* seeds to *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*
- III.2.14 14:30 I.J.OSAGIE - Enzymatic activity during infection (à confirmer)
- 15:15 *Pause-café*
- 15:30 Table ronde - Discussion générale sur le projet - Perspectives - Evolution du programme

Mercredi 2 Octobre 1991

COMPTE-RENDU REUNION  
FUSARIOSE DU PALMIER A HUILE  
Lundi 30 Septembre - Mardi 1er Octobre 1991

MECANISMES DES REACTIONS DE DEFENSE  
DU PALMIER A HUILE  
VIS-A-VIS DU *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *ELAEIDIS*

## I. OBJECTIFS

Le programme sur le thème des mécanismes des réactions de défense du palmier à huile vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* a débuté en février 1990. Il nous a paru nécessaire, 18 mois environ après le début des recherches, de faire le point des activités à Montpellier en réunissant les différents partenaires. Nous avons voulu, aussi, que ces rencontres soient l'occasion de discussions plus larges sur tous les problèmes que pose la Fusariose du palmier à huile.

## II. REALISATIONS

- Les réunions ont eu lieu le 30 Septembre et le 1er Octobre 1991 au CIRAD à Montpellier. La liste des participants ainsi que le programme des réunions sont donnés en annexe.
- La journée du 2 octobre a été réservée pour les visites de laboratoires au CIRAD et à l'ORSTOM de Montpellier.
- Les résumés des communications sont joints à ce rapport. Ils sont identifiés par des numéros qui correspondent au plan indiqué ci-après.

Nous résumons succinctement les discussions qui ont suivi les différentes interventions.

## III. DEROULEMENT DES REUNIONS - DISCUSSIONS - COMMENTAIRES

### III.1. Introduction

En introduction, M.RENARD a rappelé les grandes lignes et les objectifs du programme et a insisté sur l'envoi en temps voulu des rapports semestriels d'activités. Il a demandé également que ces rapports soient, pour la plupart, plus étoffés, avec des protocoles expérimentaux, des résultats chiffrés, etc.

Il a par ailleurs été rappelé que le prochain rapport, pour le 15 janvier 1992, soit particulièrement soigné, ce rapport pouvant servir de base pour une relance du programme à partir de février 1993 (fin du contrat actuel).

### III.2. Commentaire sur les différents sujets exposés

On se reportera aux fiches individuelles portant les mêmes numéros pour la teneur des communications.

#### III.2.1. J.L.RENARD

Une présentation générale sur la fusariose du palmier à huile a été faite par M.RENARD. Un des points de la discussion a porté sur l'origine de la fusariose en Amérique latine (Brésil et Equateur) ; aucune réponse n'a pu être apportée, si ce n'est qu'une transmission par les semences peut être toujours possible, selon les résultats obtenus à l'Université de Bath. On a noté toutefois que, malgré d'importants transports d'Afrique vers l'Asie et l'Amérique, la fusariose n'est apparue que dans deux endroits dans le monde en dehors de l'Afrique.

#### III.2.2. H. de FRANQUEVILLE

Des précisions ont été demandées sur la méthode d'inoculation, les souches utilisées et l'interprétation (calcul de l'indice).

Les inoculations sont réalisées avec une souche très agressive et stable depuis plusieurs années (conservation sur terreau stérile). Une recherche sur la lyophilisation ou la conservation des souches dans l'azote liquide est en cours à l'ORSTOM.

L'indice, même pour les clones, est calculé à partir de la moyenne de fusariose du test. Pour avoir la possibilité d'un calcul de l'indice sur des bases fixes, le test comporte des témoins sexués (standard) et des "témoins clones". Ces tests montrent également que le clone se comporte comme un croisement et qu'il existe une certaine variabilité de la résistance individuelle entre individus d'un même clone.

#### III.2.3. C.DOSSA

Dans les conditions d'inoculation de prépépinière, le FOE peu être réisolé 20 jours après l'inoculation, alors que sur les vitroplants de février il est présent dès le 3e jour.

L'inoculation de très jeunes vitroplants rend assez difficile le réisolement. Il est suggéré d'inoculer des souches mutantes (marqueur Bénomyl ou mutants résistants au chlorate) pour un repérage ultérieur des isolats. Il est également confirmé que des *F.moniliforme* et *F.solani* peuvent être isolés du bulbe.

#### III.2.4. R.MEPSTED

- Il est fait remarquer que le Pachlobutrazol produit certainement une réduction générale de taille de la plante, en conservant les proportions, alors que la fusariose induit un rabougrissement des jeunes feuilles.
- Au champ, on a noté qu'il n'y a pas toujours une corrélation étroite entre quantité de brunissement dans le stipe et gravité de symptômes ; certains palmiers meurent sans présenter de brunissement intense du stipe.
- Aucune étude n'a été faite sur l'épaisseur des parois du xylème ; seule la lumière des vaisseaux a été étudiée.

#### III.2.5. C.ABADIE

- Les discussions ont essentiellement porté sur l'échantillonnage des sols étudiés et il a été suggéré d'étudier la variabilité de la réponse des sols à l'intérieur d'un site donné (est-on en face d'une situation en mosaïque ?).
- Pour le palmier-dattier, on sait que la fusariose peut être liée à la présence d'autres cultures et que les souches de *F.o.albedinis* peuvent être compatibles avec celles existant dans la luzerne mais pas avec celles du henné.
- Dans le cas du palmier à huile, l'effet du *Calopogonium* sur la fusariose est net mais on ne connaît pas le rôle éventuel du *Calopogonium* sur les propriétés physico-chimiques du sol.
- Le Potassium a également un rôle dans l'expression de la fusariose mais les mécanismes restent inconnus (rôle du K dans la résistance à la sécheresse ? effet sur le couple argile/matière organique ?).

#### III.2.6. H. de FRANQUEVILLE

- Les problèmes posés par la variabilité de réponse des tests en préépinière militent, entre autres, sur la nécessité d'éviter d'utiliser un mélange de souches dans les inoculations (compétition éventuelle entre souches, compétition pour l'espace, etc.).
- On a constaté que les souches de Malaisie peuvent pénétrer dans les racines sans toutefois induire de symptômes.
- La différence de température entre le sol et l'air peut être importante en Afrique et peut intervenir dans la réussite d'une inoculation ; toutefois, les conditions de serre ou de chambre de culture où le sol et l'air sont à la même température ne devraient pas nuire à l'expression des symptômes.

Dans la discussion générale sur les thèmes développés au cours du premier jour, on a noté les points suivants :

■ L'idée de la quantité d'inoculum revient dans la discussion :

La présence de quelques propagules de FOE sur les semences et le pollen suffit-elle à induire une épidémie ? Dans la pratique, cela ne semble pas se produire et les praticiens pensent qu'il n'y a pas propagation par l'air (air-borne contamination par le pollen) du FOE. Ceci peut se traduire en terme de probabilité. La présence de *F.solani* à tous les niveaux (semences, pollen, sol) jouerait comme antagoniste du FOE.

On peut se demander si la méthode de préparation de la semence n'intervient pas de manière prépondérante sur le développement de la microflore des semences. Il est alors suggéré de réétudier cette question en partant du fruit de palme entier dépulvé dans des conditions stériles.

■ Concernant l'évaluation de l'indice fusariose et la méthode d'inoculation, il est précisé :

- qu'en Côte d'Ivoire, l'indice est toujours évalué à partir du pourcentage moyen de plants fusariés mais que des témoins sexués et des témoins clones sont toujours inclus dans les tests pour une éventuelle redéfinition de l'indice par rapport à des témoins ;
- qu'il paraît souhaitable de situer l'indice (ou le comportement d'un croisement ou d'un clone) par rapport à un isolat donné dans des conditions précisées pour permettre d'appréhender d'éventuelles interactions différentielles hôte origine de l'isolat ;
- que la technique d'inoculation peut avoir une influence sur la réponse du matériel végétal (interactions différentielles génotype x mode d'inoculation).

### III.2.7. C.DOSSA

Aux différentes questions posées, il apparaît que :

- il n'existe pas de relation entre le pouvoir pathogène et l'aspect morphologique.
- il y a une influence des facteurs du milieu sur le type de culture ; à ce propos, il est rappelé que toutes les observations ont été faites sur un seul milieu de culture (on ne maîtrise, pas en particulier, le concept de facteur du milieu).
- la plasticité de la souche est fonction de son passé cultural.

### III.2.8. A. PANDO et P. FERNANDEZ

L'étude enzymatique n'a pas été entreprise sur les différents types morphologiques mais il est probable que chaque type se caractérise par un profil différent (cependant il faut tenir compte du fait que les types morphologiques sont obtenus sur milieu gélosé alors que les extraits pour études enzymatiques sont réalisés à partir de milieu liquide) : il est fait remarquer que l'important dans ces analyses est la répétabilité des résultats.

En Grande Bretagne, des études sont également réalisées en biologie moléculaire ; elles comparent des souches de FOE de souches du sol ou de racines de palmiers (rhizosphère) de Malaisie.

### III.2.9. I. MOUYNA

Par la technique RFLP et sonde moléculaire, on note une ressemblance entre les souches de FOE de Côte d'Ivoire, du Brésil et d'Equateur, alors que les souches du Nigeria et du Zaïre sont différentes. On a remarqué également une différence entre les 2 souches du Brésil.

### III.2.10. C. DOSSA

Par la technique de compatibilité végétative, il est noté la ressemblance entre souches de Côte d'Ivoire, du Brésil, d'Equateur et du Bénin. Les différences entre isolats du même arbre au Ghana ne sont pas expliquées.

### III.2.11. J. FLOOD

- L'acide fusarique n'est pas considéré comme étant une toxine responsable des symptômes de fusariose. Malgré des résultats contradictoires, cette substance de synthèse a été utilisée pour exercer une pression de sélection sur les cals. Elle peut constituer une approche intéressante.
- Les travaux conduits à Bath ne comportent pas de volet sur l'étude des phytoalexines.

### III.2.12. M. JAY

Il est précisé que tous les groupes de toxicité appartenant aux substances phénoliques sont pris en considération par l'étude actuelle. Toutes les analyses sont faites individuellement sur des plants (5 plants par clone sont analysés) ; les analyses sont faites sur des plants non inoculés, des plants inoculés et des plants blessés (réponse à la blessure).

### III.2.13. J.PELSENEER

Les tests de toxicité pourraient se faire sur conidie dans l'eau plutôt que sur le mycélium ; cela permettrait sans doute une meilleure précision.

Les analyses sont faites avant chauffage des semences (non traitées) ; elles n'ont pas été réalisées sur des graines en cours de germination. On note que, malgré l'effet fongicide de la coque, de nombreux *Aspergillus* peuvent persister dans les semences.

### III.2.14. I.J.OSAGIE

Il est suggéré d'utiliser l'électrophorèse pour détecter la présence des enzymes. I.J.OSAGIE peut s'adresser à R.COOPER pour obtenir la documentation nécessaire sur ce sujet.

## CONCLUSIONS GENERALES - RECOMMANDATIONS

Le programme initial a été revu point par point. A l'exception des points 7.2., 7.4. et 7.9. respectivement chalcone synthétase, détection des enzymes par immunofluorescence et rôle des acides gras, tous les sujets sont en cours d'étude. Au niveau des 3 grands thèmes d'études :

- Analyse biochimique : Il existe des substances naturelles fongitoxiques dans différents organes de la plante (racine, bulbe, coque). Dans les racines et le bulbe, la production de ces substances est exacerbée au cours de l'infection. Des différences existent entre génotypes sensible et tolérant, mais des analyses plus fines sont nécessaires pour envisager d'utiliser ces analyses à des fins de sélection.
- Barrière physique de résistance : La longueur des vaisseaux n'est pas un bon marqueur de résistance ; par contre, des résultats prometteurs sont obtenus en examinant les sites pièges des conidies dans les vaisseaux ; dans un clone tolérant, la circulation des conidies est ralentie par un grand nombre de ces "trap sites" alors que, dans un clone sensible, les vaisseaux présentent moins d'obstacles à la circulation des conidies.  
L'induction d'une variation somaclonale sous l'action de l'acide fusarique a été entreprise ; les cals ayant résisté à cette pression sont en cours de régénération.

- Caractérisation des *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*  
Variabilité

Dans ce domaine, les études sont très vastes :

- variabilité morphologique
- compatibilité végétative
- polymorphisme enzymatique
- biologie moléculaire - RFLP - sonde homologue

Toutes ces analyses sont complémentaires et convergent vers des résultats semblables :

- grandes similitudes des isolats de Côte d'Ivoire, du Brésil et d'Equateur
- Différences avec les souches du Ghana (et entre isolats à l'intérieur du Ghana), du Nigeria et du Zaïre.

Pour la suite des travaux et pour que chaque partenaire puisse approfondir les études entreprises : deux recommandations ont été formulées :

- Procéder aux caractérisations des isolats de FOE sur un échantillonnage de souche assez étendu. Dans un premier temps, il est prévu d'étudier au moins 10 souches de différentes localités de chacun des pays suivants : Côte d'Ivoire, Nigeria, Zaïre, les deux premiers pays étant impliqués dans le projet, le troisième étant en liaison étroite avec les chercheurs de Bath et de Bruxelles. Il est donc demandé à chacun des partenaires de préparer 10 isolats et de les mettre à la disposition des autres.
- Favoriser les échanges de matériel végétal pour mettre à la disposition des chercheurs le matériel végétal nécessaire aux analyses. Il a été également proposé que des tests sur le même matériel végétal soient effectués dans 3 pays différents (Côte d'Ivoire, Nigeria, Zaïre) pour évaluer le pouvoir pathogène (agressivité, virulence) des isolats locaux de FOE. Un échange entre Côte d'Ivoire et Nigeria a déjà eu lieu ; de telles dispositions seront à intensifier et à étendre.

Hormis ces conclusions, il a été suggéré d'établir la circulation d'informations (technique et bibliographie) des partenaires européens vers les partenaires africains, dans le cas où la demande est bien formulée.

- Le lendemain des réunions, au cours de la visite à l'ORSTOM, la publication, en commun, des résultats obtenus en compatibilité végétative a paru possible. Les modalités d'une telle publication seront précisées ultérieurement.

- L'idée d'une réunion, sur le terrain, a été émise pour 1992. Le choix pourrait se porter sur la station expérimentale R.Michaux de Dabou en Côte d'Ivoire. Il a été reconnu par les différents participants que le budget actuel ne permettait pas un tel déplacement.

PROGRAMME DE VISITE

Mercredi 2 Octobre 1991

- 8:45 M. J.L.NOTTEGHEM, responsable Mission Défense des  
Cultures du CIRAD  
- Maladies du Riz - Pyriculariose
- 9:30 M. G.BLAHA - Mle E.CONCIBIDO  
- Maladies à *Phytophthora* du Cacaoyer  
- Etudes des *Phytophthora* du Cocotier
- 10:30 C.BOISSON - J.P.GEIGER, ORSTOM
- 12:00 M. J.L.RENARD  
- Maladies du Palmier à huile et du Cocotier
- 14:15 M. DUVAL, Vitroculture du Palmier à huile et du  
Cocotier

\*\*\*\*\*

ANNEXE I (suite)

RESUME DES COMMUNICATIONS PRESENTEES  
PAR LES DIFFERENTS INTERVENANTS

## ANNEXE I (suite)

### Réf. III.2.3

Critères d'estimation du pouvoir pathogène du *Fusarium oxysporum*

f. sp. *elaeidis* sur des vitroplants de palmier à huile

Cyrille DOSSA<sup>(1)</sup>, Anne PANDO-BAHUON<sup>(1)</sup>, Jean Luc RENARD<sup>(2)</sup> et  
Claude BOISSON<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratoire de Phytopathologie Tropicale - Centre ORSTOM de MONTPELLIER  
BP 5045 - 34032 - MONTPELLIER Cédex 1 - FRANCE

<sup>(2)</sup>Division Phytopathologie IRHO/CIRAD  
B.P. 5035 - 34032 - MONTPELLIER Cédex 1 - FRANCE

Le pouvoir pathogène du *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* est estimé après inoculation par trempage racinaire de vitroplants de palmiers à huile. Les symptômes externes (jaunissement des feuilles et rabougrissement) sont suivis en serre pendant 10 à 12 semaines. En fin d'essai, les plants sont sectionnés longitudinalement pour observer la présence éventuelle de symptômes internes (brunissements vasculaires). Le bulbe est prélevé et déposé sur milieu nutritif (Pda) afin de détecter la présence de l'agent pathogène.

Chaque plant est alors affecté d'une note prenant en compte symptômes externes, symptômes internes et isolement positif ou négatif de l'agent pathogène, puis rangé dans l'un des états phytosanitaires sains ou fusariés. Ce rangement ne pose souvent aucun problème, mais il est des cas où le doute est permis, par exemple, pour les palmiers ne présentant pas de symptômes externes ou internes, mais dont le bulbe contient l'agent pathogène. Ces problèmes ont tous été examinés et, pour recevoir une solution, ont parfois nécessité des observations ou des expérimentations complémentaires.

Un phénomène important, observé dans la plupart des essais, est celui de la forte mortalité affectant invariablement les plants témoins ou inoculés et atteignant, dans certains essais, 50 % des plants. De tels plants sont considérés comme fusariés quand ils meurent après avoir manifesté des symptômes externes typiques, comme morts de cause inconnue, dans le cas contraire.

La comparaison statistique des effectifs des plants morts, fusariés et sains par le test du KHI 2 à 5 % permet de déterminer si les plants morts sont morts de fusariose suite à l'inoculation ou morts pour une autre cause, puis de comparer le pourcentage de plants fusariés dans les diverses conditions et de mettre en évidence des niveaux différents d'agressivité des isolats ou clones inoculés. L'analyse de la variance des poids des racines et du végétal entier permet enfin de tester s'il y a une relation entre ces caractéristiques et le pouvoir pathogène.

Octobre 1991

## ANNEXE I (suite)

### III.2.4. R.MEPSTED

#### The effect of Fusarium wilt on the physiology and development of oil palm

Typical symptoms of this disease in young palms are a reduction in the size of new leaves and chlorosis of older leaves. Stunted leaves had the same photosynthetic and transpiration rate, per unit leaf area, as healthy leaves, but had a reduced midday leaf water potential. In contrast the stomata of older chlorotic leaves were always closed and their water potential was permanently reduced.

Similar observations were made on diseased and healthy palms in the field. These plants were characterised by a reduction in leaf size but no reduction in the rates of photosynthesis or transpiration; the reduction in leaf area could be correlated to the degree of fungal colonization in the trunk.

Thus it was considered that symptoms may be caused by varying degrees of water stress, but it was not possible to simulate these symptoms by the application of water stress to uninfected plants. Applications of a gibberellin inhibitor, paclobutrazol, to uninfected plants did induce stunting which, as with diseased palms, was primarily due to a reduction in cell division. However diseased stunted leaves were also characterised by a significant reduction in xylem diameter which was not observed in paclobutrazol treated plants.

Thus in this disease symptom development does not appear to have a single cause and may involve prolonged mild water stress in combination with hormonal imbalances.

## ANNEXE I (suite)

### III.2.5. C. ABADIE

#### COMPARAISON DE LA RECEPTIVITE DES SOLS A LA FUSARIOSE DU PALMIER A HUILE

---

Le but de cette étude est de caractériser le niveau de réceptivité des sols à la fusariose vasculaire du palmier à huile et d'établir des corrélations entre les facteurs biotiques et abiotiques des sols et leur niveau de réceptivité à la maladie.

Dans une première approche, les sols sont comparés selon leur réceptivité à la fusariose du lin, les résultats obtenus pour une fusariose vasculaire donnée étant généralement valides pour une autre fusariose vasculaire. Parmi les 11 sols étudiés, 6 présentent un niveau de résistance élevé, 2 sont sensibles et les 3 autres ont un comportement intermédiaire.

Les densités de populations bactériennes, fongiques et fusariennes ont été déterminées mais il n'a pas été possible d'établir des corrélations directes entre les densités microbiennes et/ou entre les facteurs abiotiques des sols et leur niveau de réceptivité. Cependant, dans un cas, la sensibilité du sol semble être liée à la plante de couverture particulière : le Calopogonium. Ce sol présente également une population fongique de *Nectria* jamais détectée ou très peu dans les autres sols.

Mots clés : *F.oxysporum* f.sp.*lini*, *F.oxysporum* f.sp.*elaeidis*, lin, palmier à huile, populations microbiennes, Calopogonium, *Nectria*, réceptivité des sols

III.2.7 Variabilité intraclonale de la morphologie chez le  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*

Cyrille DOSSA<sup>(1)</sup> et Claude BOISSON<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratoire de Phytopathologie Tropicale - Centre ORSTOM de MONTPELLIER  
BP 5045 - 34032 - MONTPELLIER Cédex 1 - FRANCE

Les variations morphologiques ont été souvent décrites chez les *Fusarium* et notamment chez les *F. oxysporum*. Elles ont été étudiées dans la descendance par voie asexuée de plusieurs cultures d'origine monospore du *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis*.

Les variations morphologiques ont d'abord été observées et décrites dans un ensemble de 16 isolats de *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* d'origines diverses. La stabilité des différents types morphologiques (morphotypes) a ensuite été testée au cours de la multiplication par bouturage ou par microconidies. L'effet de l'âge sur la variabilité morphologique a enfin été évalué à partir de trois clones représentatifs de trois isolats qui sont bouturés de suite après leur isolement ("cultures jumelles" dont on étudie la descendance par microconidies à des âges croissants) ou repiqués dans un tube toutes les semaines (maintien en croissance continue).

Huit morphotypes ont été décrits. Certains portent des organes reproducteurs facilement identifiables, types sporodochial, sclérotial et pionnotal ; d'autres en sont dépourvus (types dits "mycéliens") et sont caractérisés par la présence et l'aspect du mycélium aérien : types cotonneux, duveteux, en mèches, muqueux ras et muqueux sénescents.

D'une manière générale, l'évolution des thalles a lieu du type sporodochial vers les types mycéliens et, dans les types mycéliens, vers les thalles ras muqueux. Les morphotypes ras muqueux et duveteux sont les plus stables alors que le morphotype cotonneux se reproduit moins fréquemment. Mais leur stabilité n'est jamais totale et ils peuvent toujours évoluer vers les autres types, soit par bouturage, soit par clonage à partir de microconidies. L'influence de l'âge des cultures est difficile à cerner précisément. Il semble exister, au cours du vieillissement de cultures appartenant au morphotype duveteux, une période située entre 40 à 85 jours, durant laquelle les descendants par microconidies des cultures jumelles expriment plusieurs variations morphologiques. Dans la descendance d'une culture de morphotype sporodochial, âgée de 60 à 120 jours, le type d'origine est toujours présent dans la descendance par microconidies, ce qui n'est pas le cas lorsque la culture est multipliée par bouturage de mycélium duveteux ou de sclérotés (régénération en majorité de thalles duveteux ou muqueux).

Octobre 1991

ISOENZYME AND DNA POLYMORPHISM IN A *FUSARIUM*  
*OXYSPORUM* f. sp. *ELAEIDIS* POPULATION

A. PANDO-BAHUON, D. FERNANDEZ, C. DOSSA  
and J.P. GEIGER

Dpt of Phytopathology, ORSTOM B.P.5045, 34032 MONTPELLIER, France

First investigations on eighteen isolates of *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* from different countries were made using the vegetative compatibility (VC) technic; it anabled to classify them into 5 VCG (vegetative compatibility groups). The diversity obtained by this way was further cheked on the basis of isoenzyme and DNA polymorphism. Results were compared with the former method.

Ten enzymes were tested for isoenzyme polymorphism, the activity of six of which could be revealed after starch gel electrophoresis : malate dehydrogenase (MDH), esterase (EST), leucine aminopeptidase (LAP), acid phosphatase (ACP), isocitrate dehydrogenase (IDH) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD).

Esterase patterns of the isolates led to the same grouping as by vegetative compatibility while MDH, IDH, LAP and PGD seemed less discriminant and ACP zymmogramm revealed no difference. Those last profiles however remained usefull in the context of our population structure analysis.

Ribosomal DNA polymorphism studies were carried out by RFLP and implied restriction enzymes : EcoRI, Bgl I, Xba I, and Xho I. Ribosomal unit length was found to be 8.0 kb. Except for one isolate (G13) from Ghana, no polymorphism could be evidenced, but preliminary experiments on mitochondrial DNA yet show more polymorphism between the isolates and further investigations are therefore undertaken on this material.

III.2.9      **CARACTERISATION DE PLUSIEURS FUSARIUM  
OXYSPORUM PATHOGENES DE TROIS ESPECES  
DE PALMIERS PAR LA TECHNIQUE RFLP**

I. MOUYNA (ORSAY)

L'analyse RFLP s'est effectuée sur différentes souches de *Fusarium oxysporum* appartenant aux formes spéciales *Canariensis*, *Albedinis*, et *Elaeidis*.

Au moins deux souches de chaque forme spéciale ont été étudiées à l'aide d'une sonde unique et d'une sonde répétée.

La sonde unique met en évidence deux groupes : l'un constitué de toutes les souches de *Fusarium oxysporum elaeidis* et le deuxième de toutes les souches des deux autres formes spéciales.

La sonde répétée nous permet de séparer deux autres groupes :

-le groupe constitué par toutes les souches de la forme spéciale *Canariensis* ayant un profil de restriction d'une seule bande

-et un deuxième groupe constitué par toutes les souches des deux formes spéciales *Albedinis* et *Elaeidis* ayant un profil de bandes multiples.

En outre à l'intérieur de ce dernier groupe le profil de restriction de chaque souche est différent

Sur les souches étudiées, il est donc possible d'une part de distinguer les différentes souches d'*Elaeidis* de toutes les autres souches des deux formes spéciales *Canariensis* et *Albedinis*, et d'autre part de différencier les souches à l'intérieur d'une forme spéciale.

Ces résultats seront confirmés par une étude sur un plus grand nombre de souches.

### III.2.10

#### Compatibilité Végétative chez des isolats du *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* de différentes origines géographiques

Cyrille DOSSA et Claude BOISSON

Laboratoire de Phytopathologie Tropicale - Centre ORSTOM de MONTPELLIER  
BP 5045 - 34032 - MONTPELLIER Cédex 1

L'étude est réalisée à l'aide de mutants incapables d'assimiler les nitrates (mutants nit de type nit 1, nit 3 et nit M) obtenus sur des milieux contenant du chlorate de K, à partir de 40 clones de *Fusarium oxysporum* isolés du stipe ou de la rhizosphère de palmiers à huile fusariés.

Les confrontations sont faites entre les mutants complémentaires nit 1 et nit M du même clone (vérification de l'autocompatibilité) ou de deux clones différents. L'hétérocaryose, donc la capacité des souches d'anastomoser leurs filaments, se traduit par la formation, dans la zone de rencontre des thalles, d'un mycélium aérien blanc dense et épais. Chacune des confrontations est répétée deux à trois fois. Un résultat négatif (pas d'hétérocaryose et de complémentarité) entre des mutants nit 1 d'un clone A et nit M d'un clone B donne lieu systématiquement à une vérification par la confrontation réciproque d'un nit M du clone A et d'un nit 1 du clone B. Dans certains cas, d'autres mutants nit peuvent être sélectionnés et confrontés afin de confirmer les résultats négatifs obtenus dans les croisements précédents.

Les isolats testés dans cette expérimentation par leurs clones respectifs se rangent dans six groupes de compatibilité végétative :

- le groupe 1 regroupe les souches du Brésil, d'Equateur, du Bénin et de la Côte d'Ivoire
- le groupe 2 contient trois souches du Ghana
- le groupe 3 comporte une seule souche du Ghana (isolat G13) issue du même arbre que l'une des souches du groupe 2 (isolat G12)
- les groupes 4 - 5 et 6 comportent respectivement un seul isolat du Zaïre, du Cameroun et du Nigeria.

Parmi les 40 isolats testés, 7 sont originaires de différentes régions de Côte d'Ivoire. L'un provient de la rhizosphère d'un palmier fusarié : il ne complète avec aucun des autres isolats et constituerait à lui seul un septième groupe de compatibilité. Les six autres isolats venant du stipe appartiennent au groupe 1.

L'étude de la compatibilité végétative chez *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* permet de mettre en évidence une importante variabilité génétique dans cette forme spécialisée, mais révèle aussi que la proximité génétique attestée par l'appartenance à un même groupe de compatibilité n'est pas forcément corrélée avec l'origine géographique des isolats.

Octobre 1991

### III.2.11 J.FLOOD

#### Resistance of oil palm to vascular wilt

Breeding for resistance is the only practical means of control for vascular wilt (Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis) affecting a perennial crop such as oil palm.

However, logical breeding programmes and the development of rapid, efficient screening techniques have both been somewhat constrained by the lack of understanding of the underlying mechanisms of resistance.

Screening methods have been developed using seedling and clonal material which have revealed new information concerning resistance and tolerance in oil palm and the relative virulences of isolates from around the world. Tissue cultured material has enabled the testing of in vitro screening methods at the callus stage and the generation of novel disease resistance using fungal toxins as selection agents.

Morphological resistance mechanisms, for example, the rate and degree of tylose and gel formation are likely to be important in this disease and are currently under investigation. Differences in xylem vessel length could also be important in determining resistance and are being studied.

Thus, a wide range of approaches to investigating resistance mechanisms and their expression in oil palm have been attempted and will be discussed.

### III.2.12

## Métabolisme Phénolique et Réaction de Défense

### du Palmier à Huile vis-à-vis de F.oxysporum Elaeidis

Maurice JAY

Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie  
Université Claude Bernard Lyon-1 France

Avec la Collaboration du Laboratoire I.R.H.O. Dabou (CI)

## I - Protocole Actualisé d'Etude des Composés Phénoliques du Palmier (Tableau 1)

### A - Organes étudiés : RACINES et PSEUDOBULBES

Jusqu'à présent, les études étaient conduites sur les racines. Or en prépinères, les observations après test d'inoculation se font sur les pseudobulbes sur lesquels les symptômes apparaissent avec une telle évidence qu'ils permettent de déclarer si la lignée est sensible ou plus ou moins tolérante.

La réaction métabolique de défense a donc autant de chance de se développer dans les racines que dans les pseudobulbes et peut-être plus dans ces derniers si on prend en compte le fait que le pathogène circulant par voie de sève, arrive probablement assez vite dans la gaine foliaire c'est à dire le pseudobulbe.

### B - Choix des Lignées de Palmier à Huile

Nous avons retenu 3 couples de lignées correspondant au numéros et aux indices suivants :

| clones n° | indice | 10       | Tolérant |
|-----------|--------|----------|----------|
| 22        | 29     | "        | "        |
| 77        | 34     | "        | "        |
| 96        | 145    | Sensible |          |
| 165       | 164    | "        |          |
| 74        | 184    | "        |          |

### C - Modalités d'Inoculation par Fusarium oxysporum

L'inoculation consiste à :

- . Déterrer les jeunes plantes de leur terreau
- . Tremper le système racinaire dans une suspension de propagules ( $3.10^6$  prop./ind.)
- . Repiquer les plantes dans leur terreau
- . avec les trois modalités suivantes

|                   | Déterrer | Tremper<br>Eau | Tremper<br>Susp.FOE | Repiquer |
|-------------------|----------|----------------|---------------------|----------|
| IB Pl. inoculées  | +        | -              | +                   | +        |
| NIB Pl. déterrées | +        | +              | -                   | +        |
| NINB Pl. témoins  | -        | -              | -                   | -        |

Il est prévu de suivre et d'analyser 5 individus par point expérimental avec trois modalités de prélèvement : T.zéro T<sub>0</sub>+5j T<sub>0</sub>+8j

### III.2.12

#### D -Exsudats Racinaires

Nous avons décidé de porter intérêt aux exsudats racinaires qui pourraient constituer une première barrière chimique vis-à-vis du Fusarium oxysporum dans le sol.

Le protocole retenu est le suivant :

- . plantules au stade sevrage
  - . repiquage sur sable stérile en Tube de culture ouvert
  - . entretien par Eau de source = (NPK)
  - . culture en chambre semi-stérile avec appoint de lumière
  - . suivi sur 1 mois avec prélèvement de 5 ind./clone/5 jours
- 
- . récupération du sable et lavage à l'eau distillée
  - . extraction des composés exsudés par affrontement L/L avec EtOAc

#### E -Tests de Fongitoxicité

Ils seront réalisés en milieu liquide contenant des spores de Fusarium oxysporum sp. elaeidis : après une nuit d'incubation à 25°C, on évalue au microscope le degré d'inhibition de la germination des spores.

Les extraits de racines ou de pseudobulbes ou d'exsudats

- . totaux natifs ou simplifiés par saponification
- . bruts ou purifiés par CL sur Tamis mol. ou Adsorbant

sont dissous dans le milieu de culture à concentration phénolique connue

- . de  $10^{-9}$  à  $10^{-3}$  molaire

#### F -Protocole d'Analyse Chimique des Phénols

Molécules : 3 modalités

- . Phénols totaux natifs
- . Tannins condensés (Polymères catéchiques)
- . Aglycones Cinnamiques ou Benzoïques

Modalités d'extraction

- . PTn : EtOH-H<sub>2</sub>O (7/3), 3 x 30min sous reflux avec MBS
- . TC : BuOH-HCl (8/2) 2h au BM bouillant
- . Ag. : KOH (16h 4°C) / Neutralisation / EtOAc

Déterminations Quantitatives

- . PTn : Folin-Ciocalteu ou Bleu de Prusse (et Test Vanilline)
- . TC : Spectrophotométrie directe à 540 nm
- . Ag. : Folin-Ciocalteu ou Bleu de Prusse

Analyses Chromatographiques

- . mode HPLC
- . Colonne Reverse Phase C18 de type Nucléosil ou Ultrabase ou Hypersil
- . Solvant : Acétonitrile - Eau - Acide Acétique (gradient linéaire)

### III.2.12

## II - Etude Analytique par HPLC des Extraits Phénoliques de Palmier

Les figures 1 et 2 récapitulent l'information que nous avons obtenue sur des extraits de racines ou de pseudobulbes

- . traités par HPLC selon un système reverse phase C18
- . avec suivi spectral continu de l'élution à l'aide d'un spectro. à barette de diodes.

La figure 1 présente une élution chromatographique d'un extrait de pseudobulbes lue à 3 longueurs d'onde différentes : 280, 320 et 350 nm.

L'information chromatographique est importante : plus de 40 signaux représentant les molécules du métabolisme phénolique avec probablement en moyenne plus d'une molécule par pic chromatographique.

. L'information chromatographique est différente d'une longueur d'onde de lecture à l'autre cela est manifeste pour les lectures à 280nm et à 350 nm par exemple :

- la lecture à 280 nm privilégie la partie gauche du profil c'est à dire les composés les plus hydrophiles alors que la lecture à 350 nm privilégie la partie droite du profil c'est à dire les composés phénoliques les plus lipophiles.

La figure 2 montre quelques tracés spectrophotométriques obtenus au cours de l'élution chromatographique à l'aide de la barette de diodes ; nous avons développé cette technique sur l'ensemble des pics du profil et nous avons conclu que tous ces composés phénoliques pouvaient être décrits par 6 définitions physiques spectrophotométriques que l'on peut traduire en familles chimiques structurales :

- le tracé A correspond à des dérivés cinnamiques probablement glycosylés
  - le tracé B correspond à des flavanones c'est à dire des précurseurs réduits des types D et E
  - le tracé C correspond aux représentants de la famille des esters chlorogéniques
  - les tracés D et E correspondent à des composés flavoniques : flavones et flavonols respectivement.
- Ces hypothèses structurales devront être confirmées par une analytique phytochimique plus formelle.

La figure 1 permet de positionner ces familles phénoliques structurales sur l'ensemble du profil HPLC de l'extrait de pseudobulbes. Ce profil se révèle avec une "bonne" logique physicochimique puisque par ordre d'élution des composés les plus hydrophiles vers les composés les plus lipophiles, nous trouvons :

- la famille structurale "A" des dérivés cinnamiques
- la famille structurale "D" des flavones
- la famille structurale "B" des flavanones
- la famille structurale "E" des flavonols
- les représentants de la famille "C" ont une répartition plus diffuse, leur repérage sur le profil lu à 320nm en témoigne.

## III - Comparaison Analytique HPLC d'organes avec ou sans symptômes

La figure 3 permet de comparer à trois longueurs d'onde différentes des extraits phénoliques (méthode à reflux par EtOH-H<sub>2</sub>O 7-3) de racines et de pseudobulbes de Palmier à huile ; il s'agit de profils HPLC obtenus dans les mêmes conditions que précédemment puis normés et transcrits en profils "batons" à l'aide d'un logiciel graphique. Chaque information chromatographique initiale est exprimée en % de la surface totale des pics du profil considéré.

Le profil des racines est beaucoup plus simple que celui des pseudobulbes, il est en particulier pratiquement privé des composés les plus hydrophiles qui occupent la partie gauche dans chaque cadre.

Cette même figure autorise la comparaison d'organes prélevés sur des individus sains et d'organes prélevés sur des individus montrant des symptômes de fusariose :

. Dans le cas des racines il n'y a aucune différence entre extrait réalisé à partir d'un individu sain et extrait réalisé à partir d'un individu malade, et ceci quelque soit la longueur d'onde de lecture.

. Dans le cas des Pseudobulbes, il existe de significatives différences semi-quantitatives en fonction des spécificités d'absorption c'est à dire en fonction des familles structurales phénoliques.

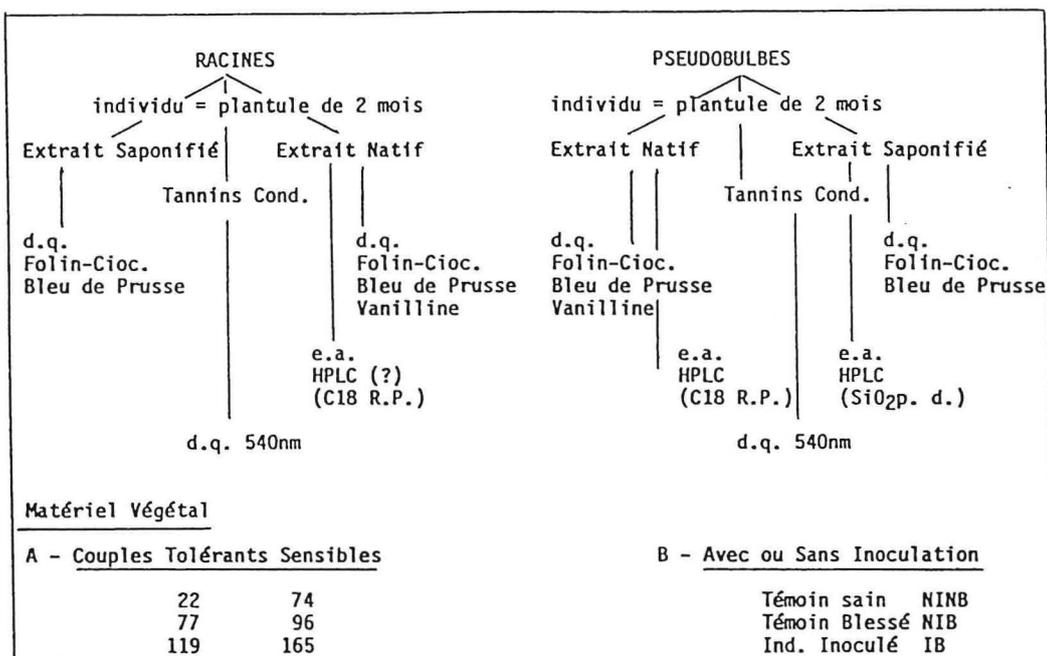


TABLEAU 1

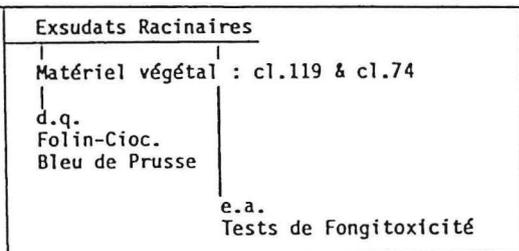
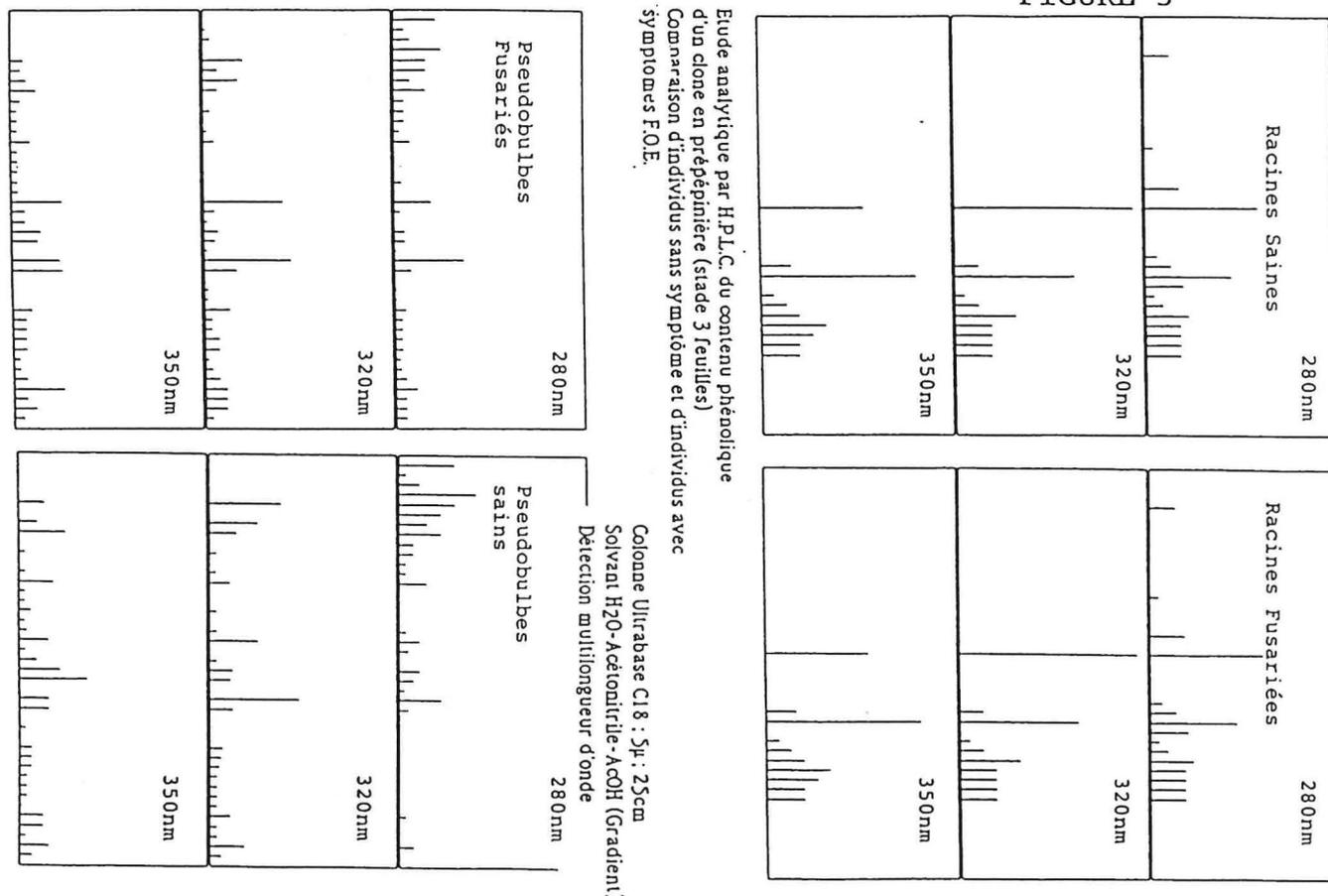
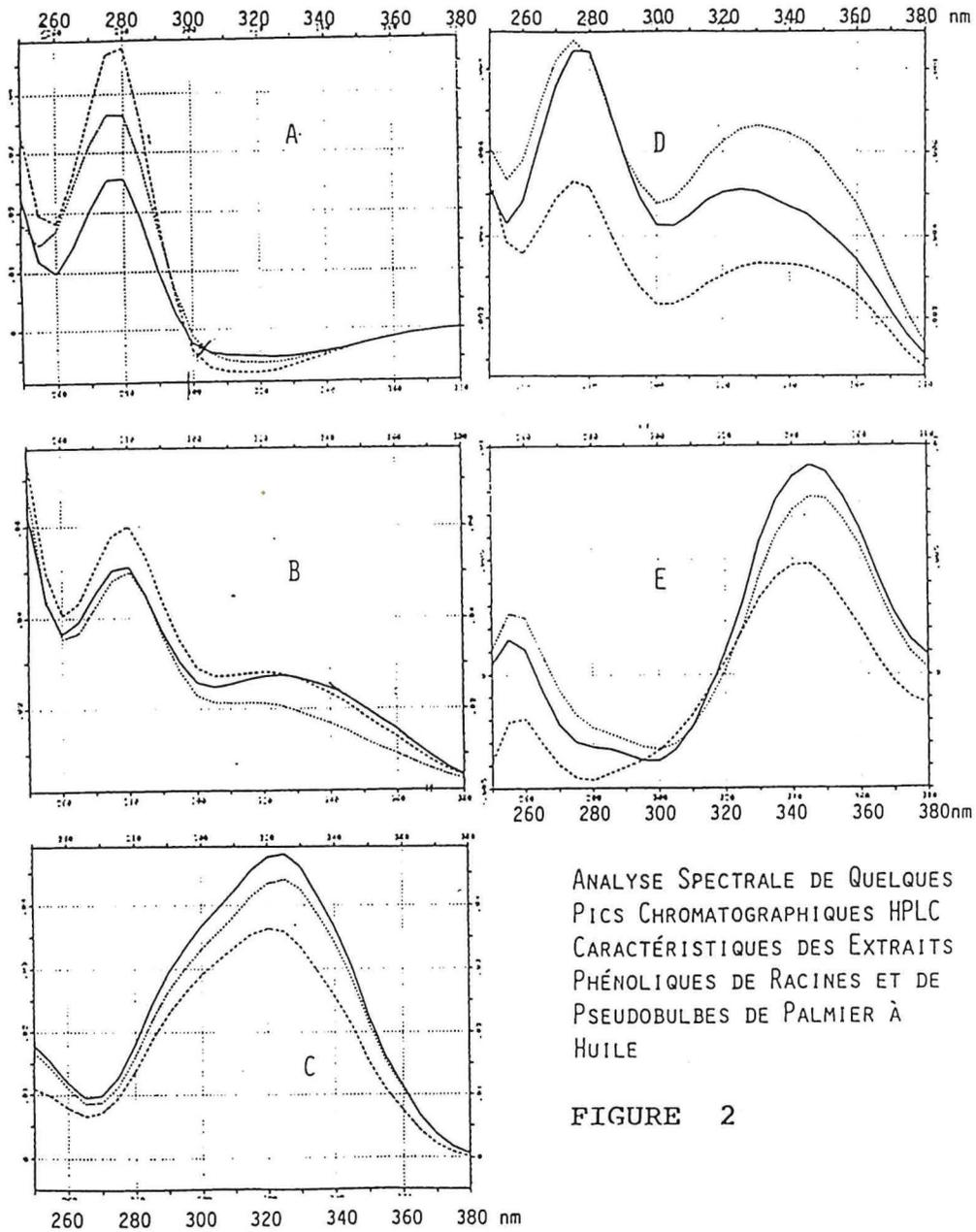


FIGURE 3

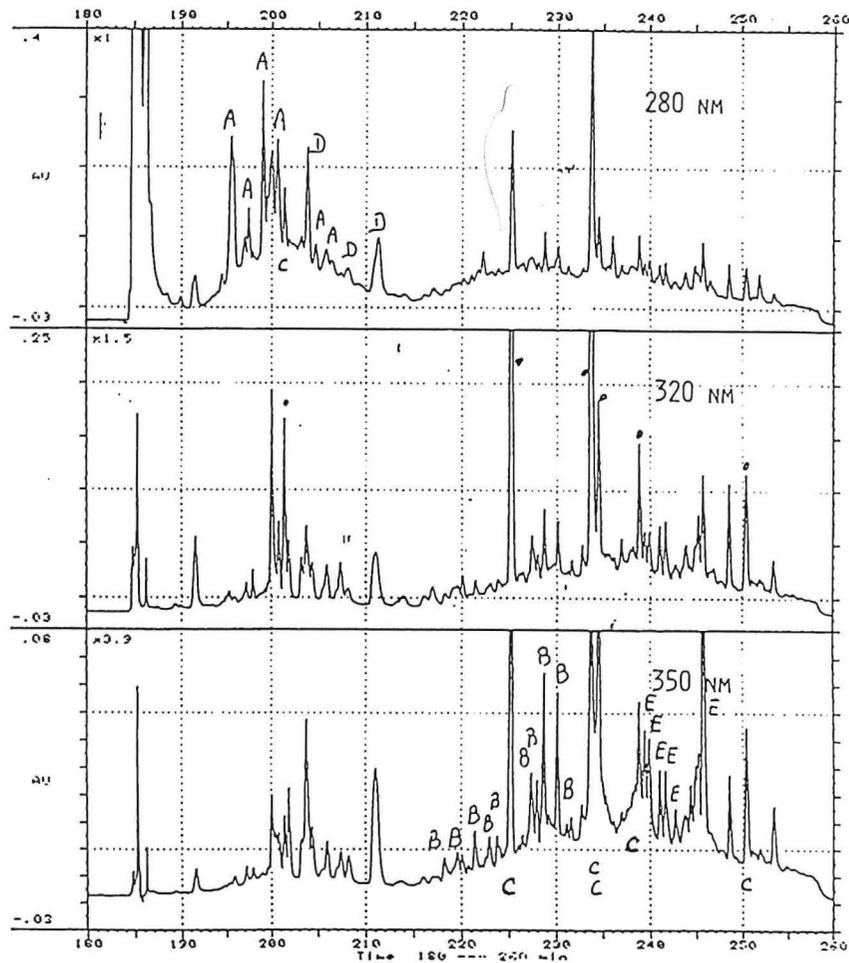




III.2.12

FIGURE 1

PROFIL CHROMATO H.P.L.C. D'EXTRAIT PHÉNOLIQUE  
 DE PSEUDOUBLES DE PALMIER À HUILE  
 COLONNE NUCLÉOSIL C18 5 $\mu$   
 SOLVANT EAU-ACN-ACOH



RÉPARTITION DES TYPES MOLÉCULAIRES PHÉNOLIQUES

III.2.13. C. ABADIE

CHEMICAL RESISTANCE OF *ELAEIS GUINEENSIS* JACQ. SEEDS  
TO *FUSARIUM OXYSPORUM* SCHL. *ELAEIDIS*

J. COREMANS-PELSENEER <sup>1</sup>, M. VANHAELEN <sup>2</sup>, R. VANHAELEN-FASTRE <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Parasitology, CP 400-14  
Université Libre de Bruxelles, Faculté de Médecine, Route de Lennik, 808,  
B-1070 Bruxelles

<sup>2</sup> Laboratory of Pharmacognosy and Bromatology, CP 205-4  
Université Libre de Bruxelles, Institut de Pharmacie, Bd Triomphe, B-1050  
Bruxelles, Belgium

SUMMARY

In the search for a simple test allowing to check oil palm resistance to wilt, at an early stage of plant development, we observed that the shell of the seeds contains different secondary metabolites soluble in chloroform and ethanol which inhibit *F.oxysporum* growth. The antifungal activity of the shell could be utilized for the economic and ecological treatment of soils highly contaminated by *F.oxysporum*.

III.2.14 I.J. OSAGIE SUMMARY

Physiological and biochemical responses to Fusarium wilt disease by seedlings of two oil palm progenies inoculated with F. oxysporum f. sp. elaeidis were investigated.

Growth measurements indicate that the seedlings of wilt-susceptible progeny showed greater degree of stunting than the wilt-tolerant progeny. Examination of the bole tissues revealed occurrence of higher percentage vascular discoloration and reisolation of the pathogen in the wilt-susceptible seedlings than the wilt-tolerant seedlings. Gravimetric measurements of fresh weight of root and bole regions showed that the inoculated seedlings generally exhibited decrease in fresh weight relative to the controls and the relative decreases in fresh weight were more in the susceptible seedlings.

Pectolytic and cellulolytic enzyme activities were detected in the roots and bole tissues of the inoculated as well as control plants. However, greater enzyme activities occurred in the tissues of inoculated susceptible seedlings than the amounts in the control plants. The enzyme activities tended to rise to maximum values during the early stages of incubation before declining.

## ANNEXE II.a

METABOLISME PHENOLIQUE ET REACTION DE DEFENSE  
DU PALMIER A HUILE VIS-A-VIS  
DE *F. OXYSPORUM ELAEIDIS*

MAURICE JAY

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MICROMOLÉCULAIRE ET PHYTOCHIMIE  
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON-1 FRANCE

AVEC LA COLLABORATION DU LABORATOIRE I.R.H.O. DABOU (CI)

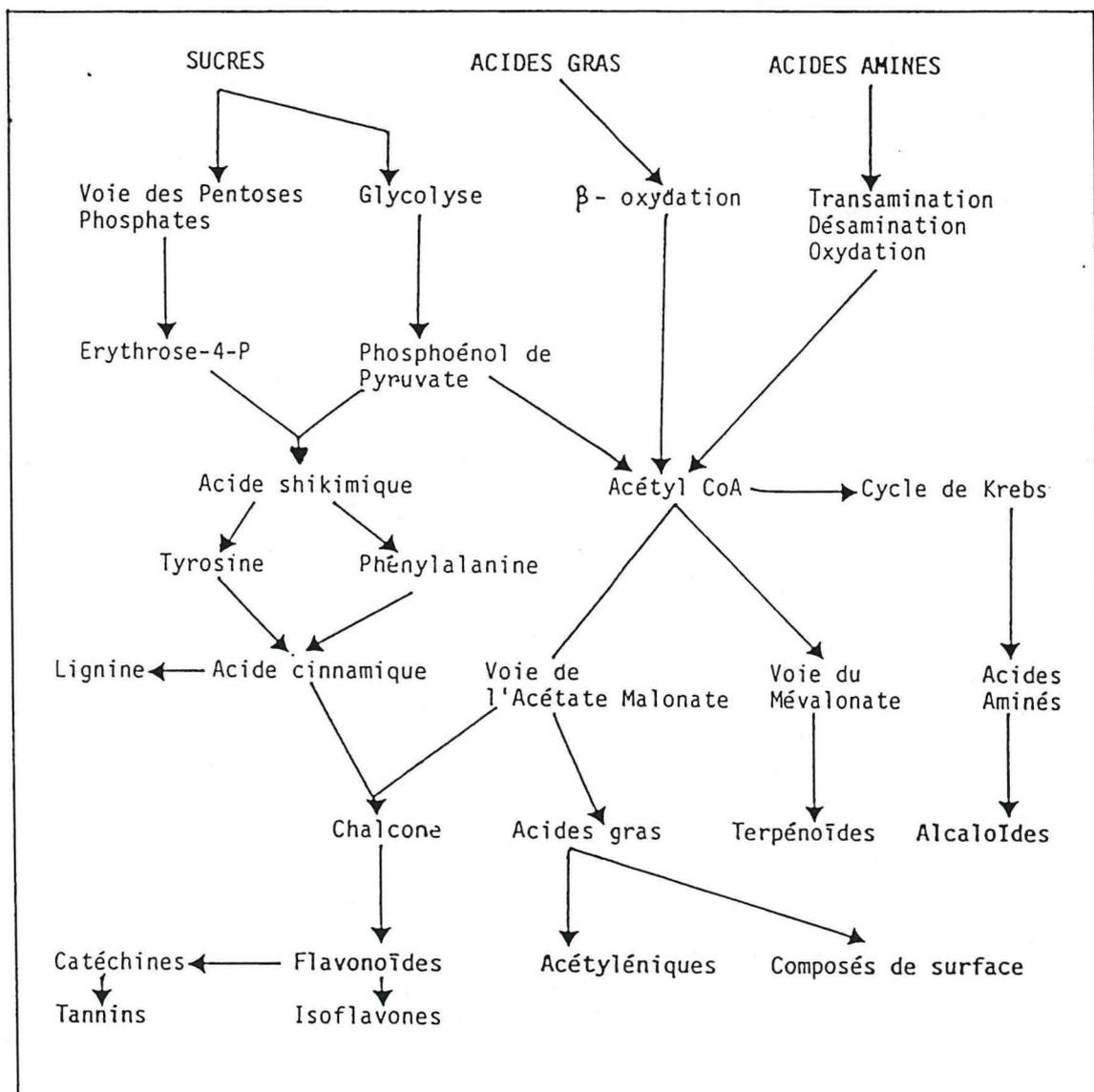
Les plantes et les microorganismes produisent de nombreux composés qui n'appartiennent pas directement au métabolisme primaire central ; il est maintenant reconnu que nombre de ces composés issus du métabolisme secondaire peuvent jouer un rôle important dans les interactions plantes-microorganismes et plus particulièrement dans la relation plantes-pathogènes. Ces observations ne font d'ailleurs qu'accréditer la thèse selon laquelle le métabolisme secondaire représenterait l'essentiel de la vie de relation du végétal et serait de fait sa réponse à la situation d'immobilité dans laquelle la Nature l'a placé. Ces composés secondaires dérivent des grands carrefours biochimiques du métabolisme central : acétyl-CoA, acide shikimique, cycle de Krebs etc. et ils se rangent en classes qui pour les plus importantes relèvent des Phénols, Terpènes, Alcaloïdes, Acétyléniques, Composés Azotés, et Composés de surface (tableau 1)

Certains de ces composés secondaires sont susceptibles de conférer la virulence aux pathogènes qui les produisent, d'autres à l'inverse, synthétisés par la plante verte sont considérés comme des facteurs de résistance ou de tolérance, c'est à dire comme des barrières métaboliques à l'agression. Cette tolérance pourra s'exprimer de trois façons selon que le végétal aura la capacité de prévenir, de restreindre ou de retarder la maladie dont l'expression résultante sera respectivement nulle, modérée ou importante.

Notre approche du problème Palmier-Fusarium s'inscrit dans ce contexte et va questionner le métabolisme phénolique du Palmier en tant que moyen de lutte de la Plante-hôte vis-à-vis d'une infection par Fusarium oxysporum sp. elaeidis.

TABLEAU 1

Relations entre Métabolisme Primaire et Métabolisme  
Secondaire et les Principales Classes Chimique de  
ce dernier



Il est important, pour comprendre ensuite notre démarche expérimentale, de définir ce que peut être un métabolisme de défense d'un double point de vue : chimique et métabolique. D'un point de vue chimique on va distinguer deux familles de composés : les inhibitines et les phytoalexines.

- les inhibitines sont des composés du métabolisme normal de la plante, qui préexistent à l'infection ; on distingue :

. les Prohibitines = métabolites préinfectieux synthétisés par la plante en quantité suffisante pour bloquer le développement du pathogène.

. les Inhibitines = métabolites préinfectieux synthétisés normalement par la plante saine, mais dont la concentration augmente après infection.

. les postinhibitines = métabolites post-infectieux dans la mesure où avant l'infection existent des précurseurs non toxiques que le pathogène va transformer par hydrolyse ou par oxydation en produits toxiques pour lui-même.

- les phytoalexines représentent un autre mode de défense puisqu'il s'agit de substances synthétisées et accumulées de novo par la plante-hôte en réponse à une infection parasitaire ; ce sont donc des métabolites inductibles dont l'accumulation dépendra en outre de la synthèse d'enzymes non prééxistantes.

Par rapport à cette définition du problème, il faut en plus signaler que la rencontre pathogène-produit du métabolisme de défense peut se faire de deux façons :

. dans la rhizosphère où le végétal peut exsuder un certain nombre de composés lipophiles actifs qui vont ralentir ou stopper la croissance du pathogène.

. dans les tissus de la plante-hôte qui tentera alors de mettre en place une barrière sous la forme d'une réaction métabolique très localisée dans les cellules immédiatement au contact des hyphes ou des spores.

Dans ce dernier cas, une autre dimension doit être prise en compte : la vitesse de mise en place de la barrière chimique ; en effet, l'efficacité de la réaction dépendra du niveau de compétition entre d'une part la capacité de croissance du pathogène et d'autre part la capacité d'accumulation du produit de défense dans les cellules de la plante-hôte.

C'est donc en essayant d'intégrer ces divers aspects que nous avons élaboré un protocole d'étude du métabolisme phénolique de Elaeis guinensis placé sous pression de sélection de Fusarium oxysporum sp. elaeidis.

## I - RÉSULTATS BIOCHIMIQUES ANTÉRIEURS SUR LA RELATION PALMIER-FUSARIUM.

Même si le métabolisme phénolique est immédiatement concerné chaque fois que le végétal est soumis à une pression de sélection nouvelle de son environnement, il n'est pas pour autant le témoin systématique et absolu d'une réponse efficace de ce même végétal. Il peut en effet n'être qu'un témoin passif et secondaire dont l'évolution traduira par exemple une diminution des précurseurs disponibles pour sa voie.

Aussi avons-nous recherché dans les travaux antérieurs, des incitations pouvant conforter le bien-fondé de notre démarche et nous avons trouvé trois types de résultats.

### A - Evolution des Teneurs en Phénols des Racines sous inoculation

La figure 1 permet de comparer les résultats d'accumulation phénolique dans un clone tolérant et dans un clone sensible de Palmier à huile, placés depuis 72 heures sous pression de sélection de F. oxysporum sp. elaeidis.

Le clone tolérant réagit fortement entre 24h et 48h, à l'infection alors que le clone sensible ne montre pas de réaction significative (tout au plus une variation aléatoire).

Par ailleurs une démarcation assez nette apparaît autour de 3.0 mg d'équivalent acide chlorogénique/150mg de MF racinaire, entre la capacité d'accumulation phénolique du clone tolérant et celle du clone sensible.

### B - Analyse HPLC d'un extrait phénolique Racinaire de Palmier

La figure 2 montre un profil HPLC sous détection 280 nm qui révèle d'après les auteurs 5 zones caractéristiques :

|        |                             |                      |
|--------|-----------------------------|----------------------|
| zone 1 | pour les temps de rétention | 2.8 à 3.8 min.       |
| 2      | "                           | 4.0 à 6.0            |
| 3      | "                           | 6.6 à 8.6            |
| 4      | "                           | 9.0 à 11.0           |
| 5      | "                           | au delà de 11.0 min. |

Comme il s'agit d'une colonne "directe" les composés les plus lipophiles sont élués en premier et les composés les moins lipophiles en dernier.

Plantes cultivées sur terreau en prépépinière  
traitées au stade 3 feuilles.

5.

FIGURE 1

Plantes saines ou inoculées par trempage dans

une suspension de F.O.E. à  $15 \cdot 10^6$  spores/ml

Composés phénoliques totaux : dosage au

Folin Ciocalteu

$\mu\text{g}$   $\text{eq}$  Ac. chl./150mg MF (moyenne pour 5 analyses)

Suivi d'une accumulation phénolique sur 72 heures

pour 2 lots de plantes T et S

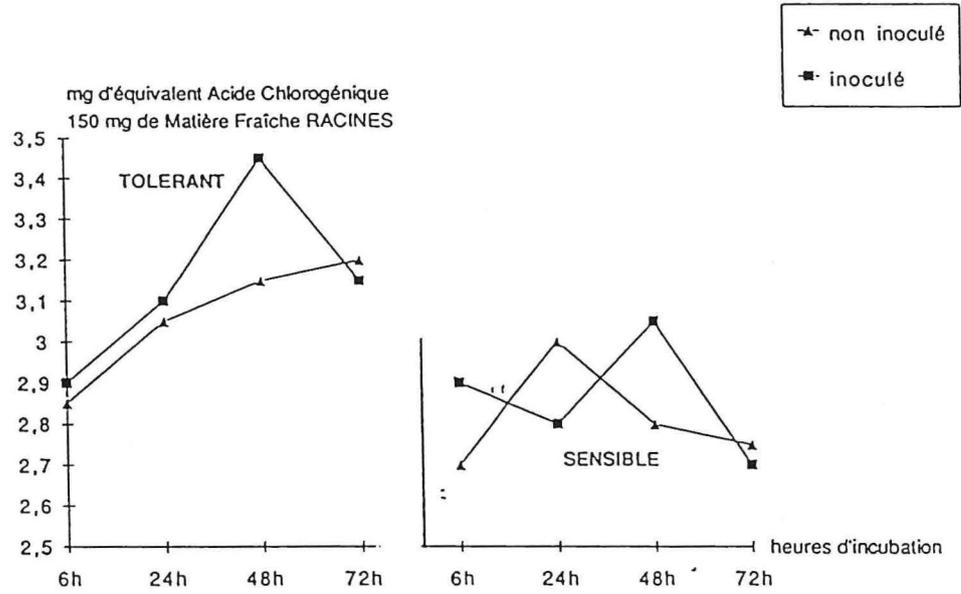


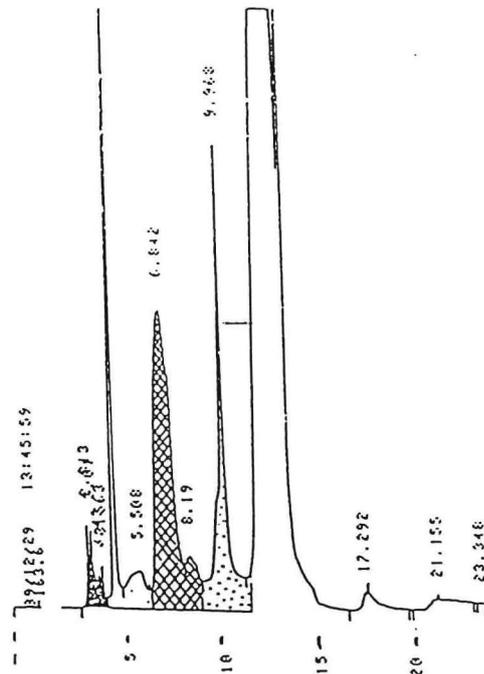
FIGURE 2

Profil chromato H.P.L.C. d'extrait phénolique

de racines de Palmier à huile

Colonne  $\text{SiO}_2$ ,  $5\mu$

Solvant Hexane-EtOAc-MeOH



### C - Recherche d'une corrélation entre Teneurs et Molécules

La figure 3 tente d'établir une relation entre les teneurs en phénols totaux telles qu'elles étaient présentées en fig.1 et les surfaces relatives des 5 zones caractéristiques définies sur le profil HPLC de la fig.2, pour chacun des 80 échantillons de racines étudiés de ce double point de vue quantitatif et qualitatif.

Il en est ressorti une corrélation tout à fait significative ( $r = 0.80 \pm 0.39$ ) entre teneurs en phénols totaux et surface relative de la zone HPLC n° 3. Il semblerait par ailleurs que les composés qui sont abrités sous ce pic appartiennent à la famille structurale des acides cinnamiques.

A partir de ces premiers résultats incitatifs, nous avons tenté d'élaborer un protocole d'étude visant à :

- appréhender sous les divers points de vue précédemment cités le métabolisme phénolique du Palmier à huile,
- utiliser au mieux les potentialités du Laboratoire d'Analyse de la Station Robert Michaux à dabou (CI)

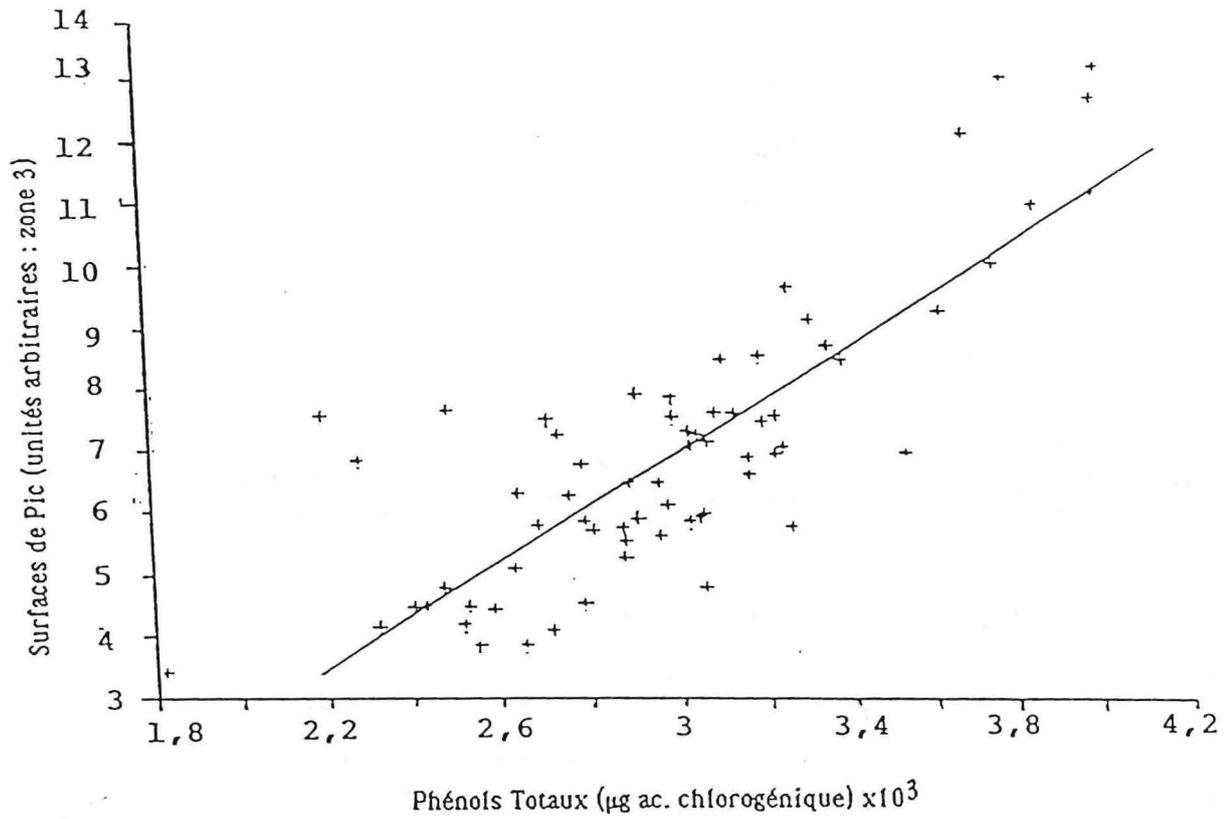


FIGURE 3

Corrélation teneur phénolique/molécules sur la base de 80 données relatives au matériel racinaire de Palmier tolérant ou sensible placé sous pression de sélection F.O.E.

## II PROTOCOLE D'ÉTUDE ACTUELLEMENT DÉVELOPPÉ CONJOINTEMENT ET COMPLÉMENTAIREMENT ENTRE DABOU (CI) ET LYON (FR.)

La formulation de ce protocole a été écrite après 9 mois d'essais préalables techniques réalisés par l'équipe de recherche du Laboratoire de la Station Robert Michaux.

### A - Organes étudiés : RACINES et PSEUDOBULBES

Jusqu'à présent, les études étaient conduites sur les racines. Or en prépinières, les observations après test d'inoculation se font sur les pseudobulbes sur lesquels les symptômes apparaissent avec une telle évidence qu'ils permettent de déclarer si la lignée est sensible ou plus ou moins tolérante.

La réaction métabolique de défense a donc autant de chance de se développer dans les racines que dans les pseudobulbes et peut-être plus dans ces derniers si on prend en compte le fait que le pathogène circulant par voie de sève, arrive probablement assez vite dans la gaine foliaire c'est à dire le pseudobulbe.

### B - Choix des Lignées de Palmier à Huile

Nous avons retenu 3 couples de lignées correspondant au numéros et aux indices de sensibilité suivants :

|               |           |          |
|---------------|-----------|----------|
| clones n° 119 | indice 10 | Tolérant |
| 22            | 29        | "        |
| 77            | 34        | "        |
| 96            | 145       | Sensible |
| 165           | 164       | "        |
| 74            | 184       | "        |

### C - Modalités d'Inoculation par Fusarium oxysporum

L'inoculation consiste à :

- . Déterrer les jeunes plantes de leur terreau
- . Tremper le système racinaire dans une suspension de propagules ( $3 \cdot 10^6$  prop./ind.)
- . Repiquer les plantes dans leur terreau
- . avec les trois modalités suivantes

|                   | Déterrer | Tremper<br>Eau | Tremper<br>Susp.FOE | Repiquer |
|-------------------|----------|----------------|---------------------|----------|
| IB Pl. inoculées  | +        | -              | +                   | +        |
| NIB Pl. déterrées | +        | +              | -                   | +        |
| NINB Pl. témoins  | -        | -              | -                   | -        |

Il est prévu de suivre et d'analyser 5 individus par point expérimental avec trois modalités de prélèvement :

T.zéro      T<sub>0</sub>+5j      T<sub>0</sub>+8j

#### D - Exsudats Racinaires

Nous avons décidé de porter intérêt aux exsudats racinaires qui pourraient constituer une première barrière chimique vis-à-vis du Fusarium oxysporum dans le sol.

Le protocole retenu est le suivant :

- . plantules au stade sevrage
  - . repiquage sur sable stérile en Tube de culture ouvert
  - . entretien par Eau de source = (NPK)
  - . culture en chambre semi-stérile avec appoint de lumière
  - . suivi sur 1 mois avec prélèvement de 5 ind./clone/5 jours
- 
- . récupération du sable
  - . lavage à Eau distillée
  - . extraction des composés exsudés par affrontement L/L avec EtOAC.

#### E - Tests de Fongitoxicité

Ils seront réalisés en milieu liquide contenant des spores de Fusarium oxysporum sp. elaeidis : après une nuit d'incubation à 25°C, on évalue au microscope le degré d'inhibition de la germination des spores.

- Les extraits de racines ou de pseudobulbes ou d'exsudats
- . totaux natifs ou simplifiés par saponification
  - . bruts ou purifiés par CL sur Tamis mol. ou Adsorbant
- sont dissous dans le milieu de culture à concentration phénolique connue
- . de 10<sup>-9</sup> à 10<sup>-3</sup> molaire

#### F - Protocole d'Analyse Chimique des Phénols

- Molécules : 3 modalités
- . Phénols totaux natifs
  - . Tannins condensés (Polymères catéchiques)
  - . Aglycones Cinnamiques ou Benzoïques

## Modalités d'extraction

- . PTn : EtOH-H<sub>2</sub>O (7/3), 3 x 30min sous reflux avec MBS
- . TC : BuOH-HCl (8/2) 2h au BM bouillant
- . Ag. : KOH (16h 4°C) / Neutralisation / EtOAc

## Déterminations Quantitatives

- . PTn : Folin-Ciocalteu ou Bleu de Prusse (et Test Vanilline)
- . TC : Spectrophotométrie directe à 540 nm
- . Ag. : Folin-Ciocalteu ou Bleu de Prusse

## Analyses Chromatographiques

- . mode HPLC
- . Colonne Reverse Phase C18 de type Nucléosil ou Ultrabase ou Hypersil
- . Solvant : Acétonitrile - Eau - Acide Acétique (gradient linéaire)
- . détection : 280 nm, 320 nm, 350 nm selon les cas.

### III PREMIERS RÉSULTATS DU PROGRAMME PALMIER/FUSARIUM

#### A -Comparaison des Composés Phénoliques Totaux de deux Clones soumis à deux modes d'extraction. (Tableau 2)

Il tout à fait clair que le mode EtOH à froid est deux à trois fois moins performant que le mode EtOH/H<sub>2</sub>O sous reflux qui a été retenu pour le protocole actualisé.

Par rapport au concept prohibitines qui peut être seul développé ici puisqu'il n'y a eu aucune inoculation du matériel végétal, on voit qu'au niveau des racines il n'existe aucune différence significative entre matériel tolérant et matériel sensible.

Par contre au niveau des pseudobulbes, si le mode d'extraction le plus exhaustif ne montre pas de différence entre les deux clones, celle-ci devient nette avec le mode d'extraction EtOH à froid. Cela pourrait prouver que dans la partie la plus lipophile du pool phénolique des Pseudobulbes le potentiel prohibitines est plus important chez les clones tolérants que chez les clones sensibles.

On a une bonne confirmation de cela avec l'analyse des profils HPLC selon la technique de Colonne directe de Dabou. La figure 4 compare les surfaces relatives des différents pics HPLC obtenus après extraction EtOH à froid d'une part et EtOH-H<sub>2</sub>O sous reflux d'autre part :

- . au niveau des racines, il y a de faibles différences qualitatives entre les deux méthodes d'extraction

- . au niveau des pseudobulbes, la situation est beaucoup plus contrastée avec une extraction à froid dans laquelle le pic 11 emporte 42% de l'information phénolique et avec une extraction à chaud dans laquelle le pic 14 représente 75% du pool phénolique. En fonction du mode d'extraction il y a donc prépondérance assez sélective soit pour les composés les plus lipophiles qui sortent les premiers soit pour les produits moins lipophiles qui sortent après.

**Tableau 2** Plantes non inoculées en Prépépinière depuis 6 mois  
Composés phénoliques totaux (moyenne pour 5 individus)  
mg équivalent ac. chlorogénique / g MF  
dosage au folin Ciocalteau

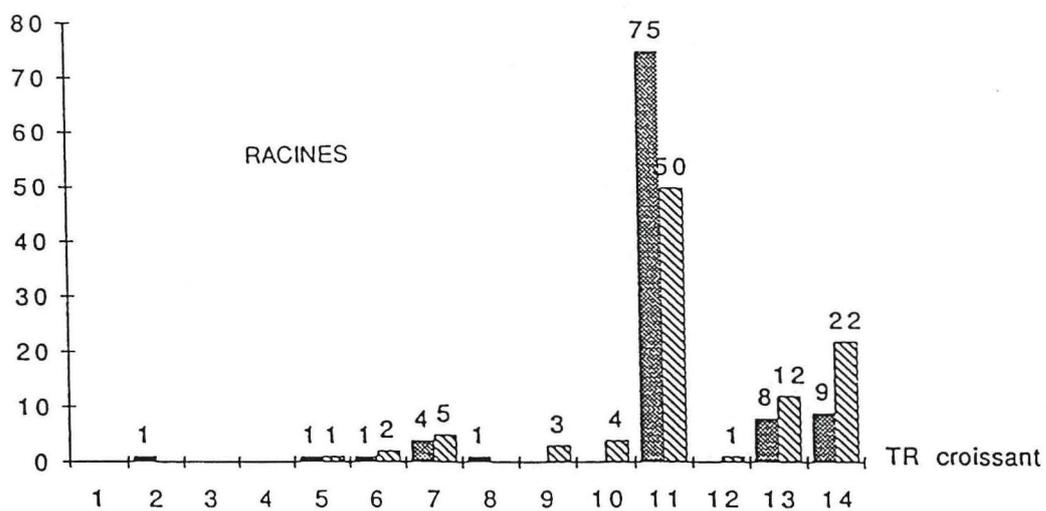
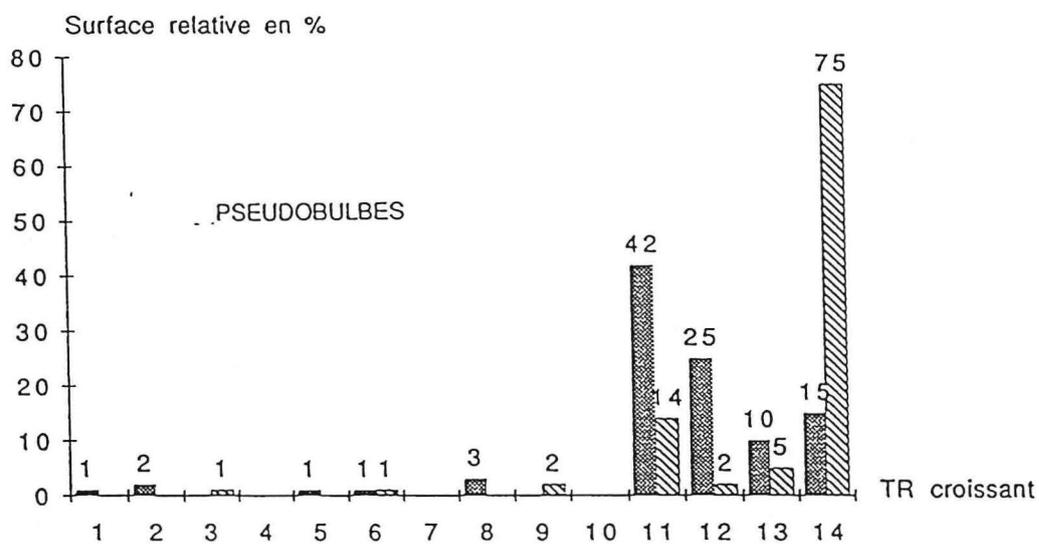
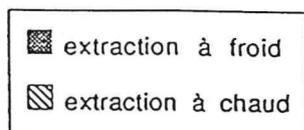
|                           | RACINES | PSEUDOBULBES |
|---------------------------|---------|--------------|
| Extraction à Froid        |         |              |
| EtOH absolu               |         |              |
| Clone tolérant (i=42)     | 3990    | 3130         |
| Clone sensible (i=163)    | 3600    | 1760         |
| variation intraclonale    | 14-16%  | 23-25%       |
| Extraction sous Reflux    |         |              |
| EtOH-H <sub>2</sub> O 7-3 |         |              |
| Clone tolérant (i=42)     | 9970    | 7770         |
| Clone sensible (i=163)    | 9790    | 6690         |
| variation intraclonale    | 4-5%    | 13-14%       |

FIGURE 4

Comparaison profils phénoliques H.P.L.C.

Colonne SiO<sub>2</sub>

Solvant Hexane-EtOAc-MeOH (Gradient)



## B - Résultats de tests de Fongitoxicité sur Extraits Phénoliques

Deux clones respectivement n° 129 clone tolérant et n° 201 clone sensible ont été comparés dans la Figure 5 pour le pouvoir fongitoxique des composés phénoliques extraits de leur racine, selon la méthode précédemment décrite d'observation au microscope de l'inhibition de la germination de spores au bout de 16 heures à 25°C.

Les extraits phénoliques ont été préparés selon trois modes

- . extraction à froid par EtOH absolu
- . extraction sous reflux par EtOH-H<sub>2</sub>O (7-3)
- . extraction suivie de saponification pour séparer les aglycones phénoliques (essentiellement phényl propanoïdes)

Les racines étaient issues de trois lots de plantes :

- . lot témoin
- . lot de plantules blessées (non inoculées)
- . lot de plantules inoculées par une suspension de F.oxysporum

Le suivi du pouvoir fongitoxique était réalisé sur 8 jours après l'inoculation des jeunes plantes.

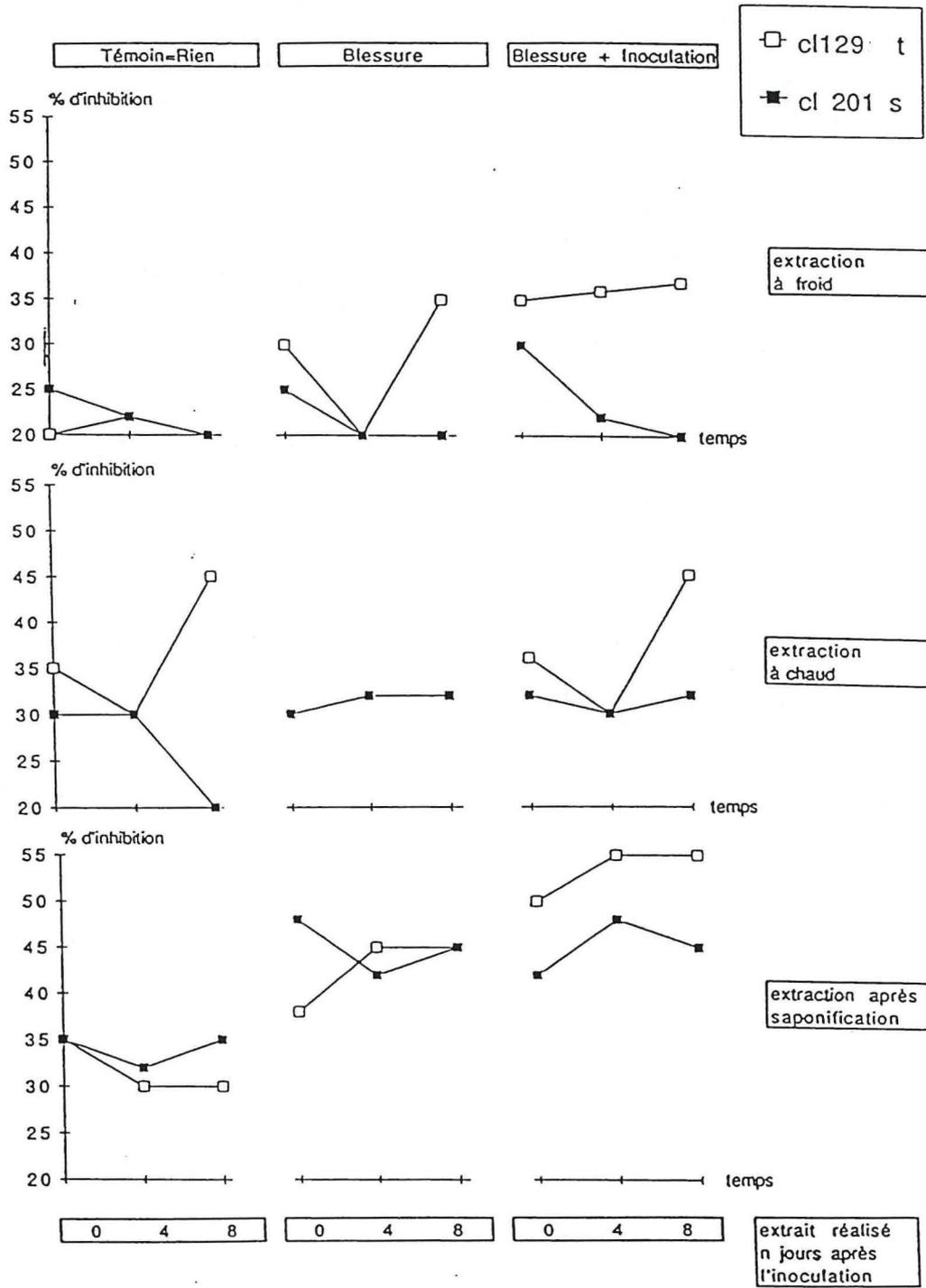
Il est assez clair que les extraits obtenus par extraction à froid ou par saponification

- . développent un pouvoir fongitoxique significativement plus fort pour le clone tolérant que pour le clone sensible,
- . en situation d'inoculation dans les deux cas, et même en situation de simple blessure mécanique pour l'extraction à froid.

Les résultats concernant l'extraction sous reflux sont cohérents avec ce qui précède, sauf pour le témoin dont le comportement est pour l'instant non interprétable.

FIGURE 5

TEST DE FONGITOXICITE  
 % d'inhibition de la Croissance Sporale  
 A partir d'extrait de Racine de Palmier ayant subi :



### C - Etude Analytique par HPLC des Extraits Phénoliques

Les figures 6, 7, 8 et 9 récapitulent l'information que nous avons obtenue sur des extraits de racines ou de pseudobulbes

- . traités par HPLC selon un système reverse phase C18
- . avec suivi spectral continu de l'élution à l'aide d'un spectrophotomètre à barette de diodes.

La figure 6 présente une élution chromatographique d'un extrait de pseudobulbes lue à 3 longueurs d'onde différente : 280, 320 et 350 nm.

. L'information chromatographique est importante : plus de 40<sup>-</sup> signaux représentant les molécules du métabolisme phénolique avec probablement en moyenne plus d'un molécule par pic chromatographique.

. L'information chromatographique est différente d'une longueur d'onde de lecture à l'autre : cela est manifeste pour les lectures à 280nm et à 350 nm par exemple :

- la lecture à 280 nm privilégie la partie gauche du profil c'est à dire les composés les plus hydrophiles alors que la lecture à 350 nm privilégie la partie droite du profil c'est à dire les composés phénoliques les plus lipophiles.

La figure 7 montre quelques tracés spectrophotométriques obtenus au cours de l'élution chromatographique à l'aide de la barette de diodes ; nous avons développé cette technique sur l'ensemble des pics du profil et nous avons conclu que tous ces composés phénoliques pouvaient être décrits par 6 définitions physiques spectrophotométriques présentées dans la figure 7, définitions que l'on peut traduire en familles chimiques structurales telles que proposées dans la figure 8 :

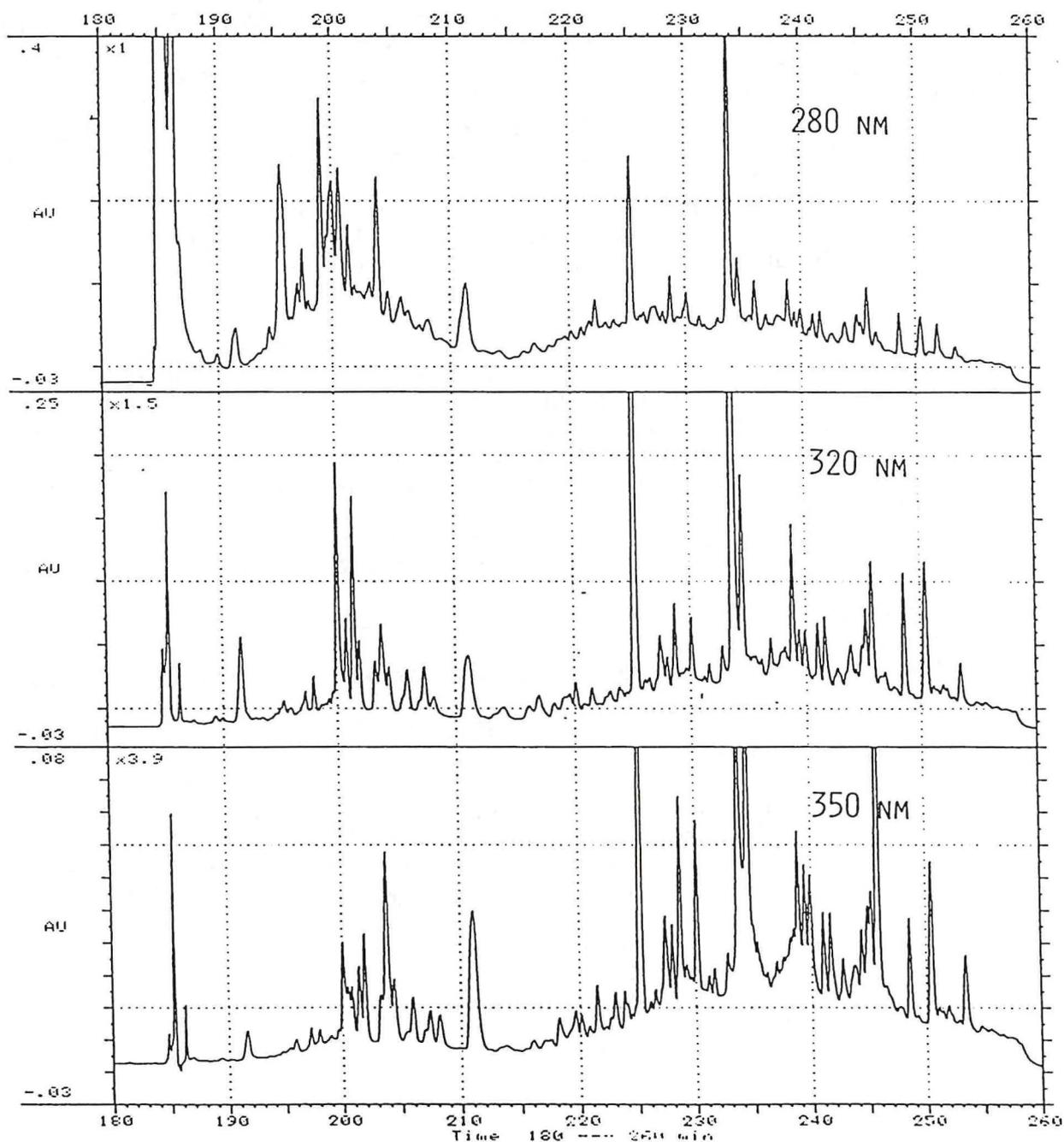
- le tracé A correspond à des dérivés cinnamiques probablement glycosylés
- le tracé B correspond à des flavanones c'est à dire des précurseurs réduits des types D et E
- le tracé C correspond aux représentants de la famille des esters chlorogéniques
- les tracés D et E correspondent à des composés flavoniques : flavones et flavonols respectivement.

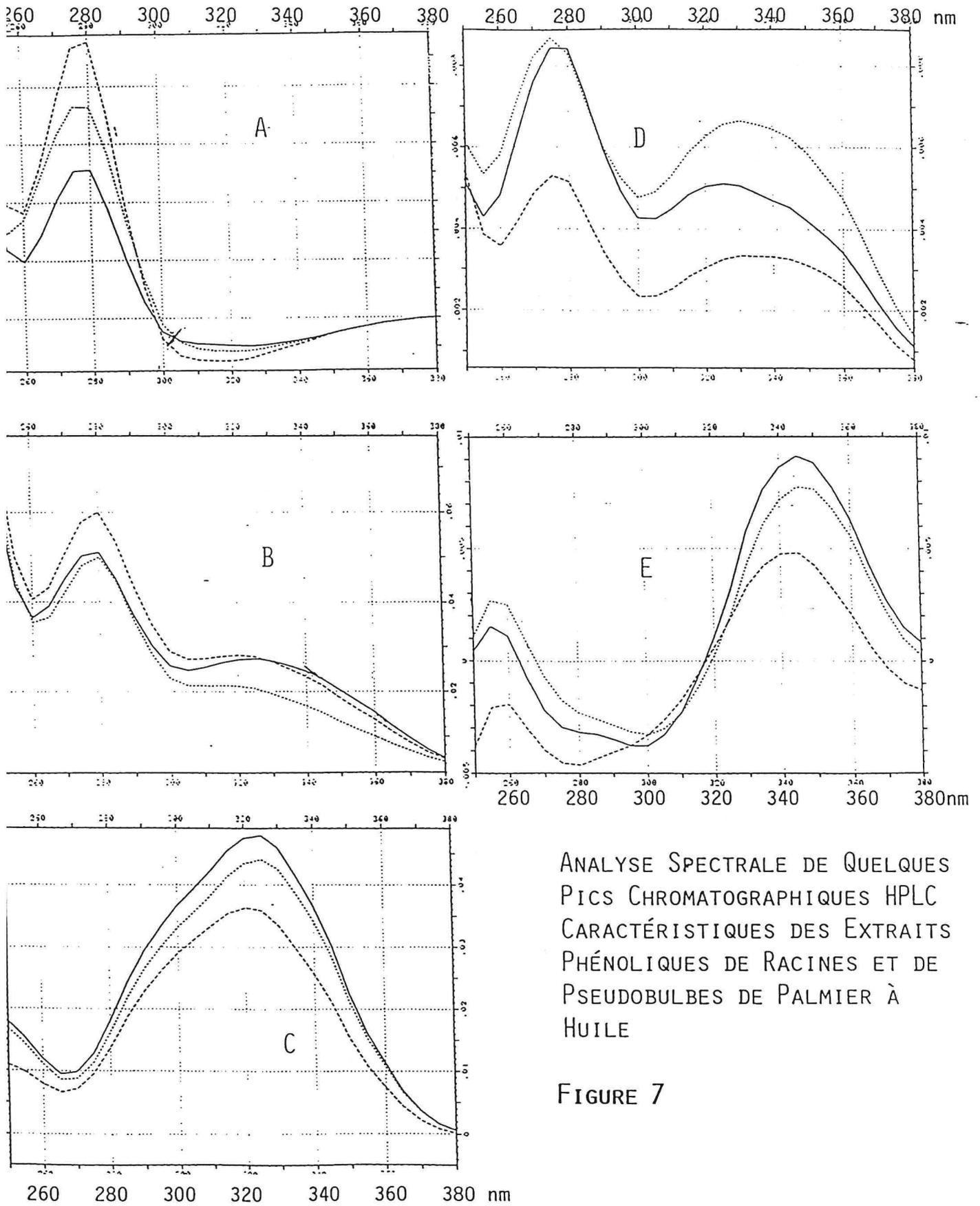
Ces hypothèses structurales devront être confirmées par une analytique phytochimique plus formelle.

La figure 9 enfin permet de positionner ces familles phénoliques structurales sur l'ensemble du profil HPLC de l'extrait de pseudobulbes. Ce profil se révèle avec une "bonne" logique physico-chimique puisque par ordre d'élution des composés les plus hydrophiles vers les composés les plus lipophiles, nous trouvons :

- la famille structurale "A" des dérivés cinnamiques
- la famille structurale "D" des flavones
- la famille structurale "B" des flavanones
- la famille structurale "E" des flavonols
- les représentants de la famille "C" ont une répartition plus diffuse, leur repérage sur le profil lu à 320nm en témoigne.

FIGURE 6  
PROFIL CHROMATO H.P.L.C. D'EXTRAIT PHÉNOLIQUE  
DE PSEUDOBULBES DE PALMIER À HUILE  
COLONNE NUCLÉOSIL C18 5 $\mu$   
SOLVANT EAU-AcN-AcOH

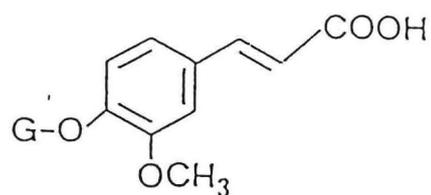




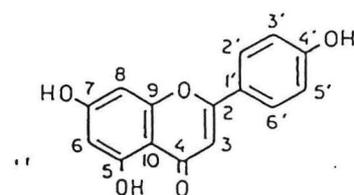
ANALYSE SPECTRALE DE QUELQUES  
 PICS CHROMATOGRAPHIQUES HPLC  
 CARACTÉRISTIQUES DES EXTRAITS  
 PHÉNOLIQUES DE RACINES ET DE  
 PSEUDOBULBES DE PALMIER À  
 HUILE

FIGURE 7

FIGURE 8  
 LES TYPES MOLÉCULAIRES PHÉNOLIQUES  
 RENCONTRÉS DANS LES EXTRAITS HYDRO-ALCOOLIQUES  
 DE RACINES ET DE PSEUDOBULBES DE  
 PALMIER À HUILE

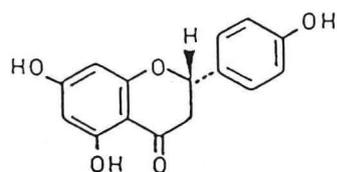


COMPOSÉ DE TYPE A  
 "DÉRIVÉ CINNAMIQUE"

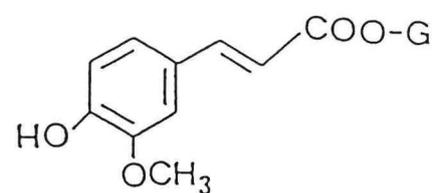
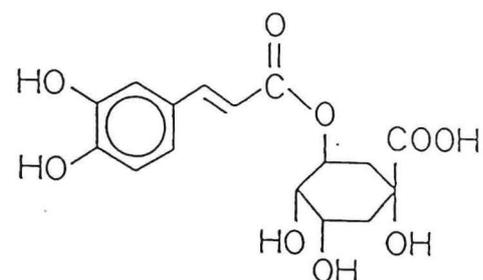


Flavone

COMPOSÉ DE TYPE D OU E

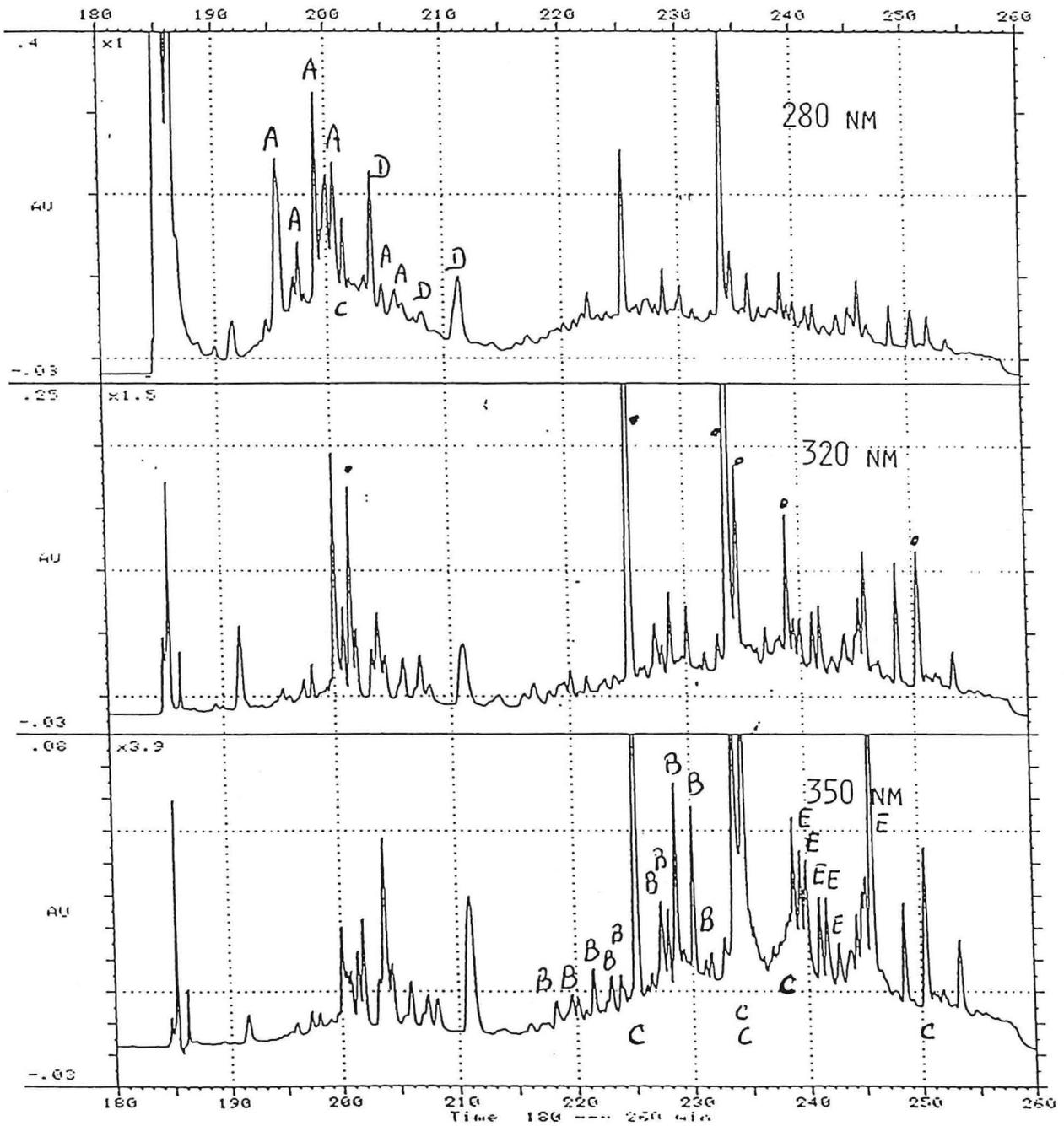


(-)-Flavanone  
 COMPOSÉ DE TYPE B



COMPOSÉS DE TYPE C  
 "DÉRIVÉ CHLOROGÉNIQUE"

FIGURE 9  
 PROFIL CHROMATO H.P.L.C. D'EXTRAIT PHÉNOLIQUE  
 DE PSEUDO BULBES DE PALMIER À HUILE  
 COLONNE NUCLÉOSIL C18 5 $\mu$   
 SOLVANT EAU-AcN-AcOH



RÉPARTITION DES TYPES MOLÉCULAIRES PHÉNOLIQUES

#### D - Comparaison Analytique HPLC d'Organes avec ou sans Symptomes

La figure 10 permet de comparer à trois longueurs d'onde différentes des extraits phénoliques (méthode à reflux par EtOH-H<sub>2</sub>O 7-3) de racines et de pseudobulbes de Palmier à huile ; il s'agit de profils HPLC obtenus dans les mêmes conditions que précédemment puis normés et transcrits en profils "batons" à l'aide d'un logiciel graphique. Chaque information chromatographique initiale est exprimée en % de la surface totale des pics du profil considéré.

Le profil des racines est beaucoup plus simple que celui des pseudobulbes, il est en particulier pratiquement privé des composés les plus hydrophiles - qui occupent la partie gauche dans chaque cadre.

. Les trois profils racinaires lus respectivement à 280, 320 et 350 nm sont assez semblables, le ré-équilibrage des surfaces relatives des pics d'une longueur d'onde à une autre reste faible.

. Par contre pour les pseudobulbes, les modifications de représentation relative en fonction des longueurs d'onde de lecture sont importantes au point transformer l'image globale ou "Fingerprint" de cet extrait.

En conclusion toutes ces observations démontrent que la diversité structurale laissée par le métabolisme phénolique est beaucoup plus importante dans les pseudobulbes que dans les racines.

La figure 11 autorise la comparaison d'organes prélevés sur des individus sains et d'organes prélevés sur des individus montrant des symptômes de fusariose :

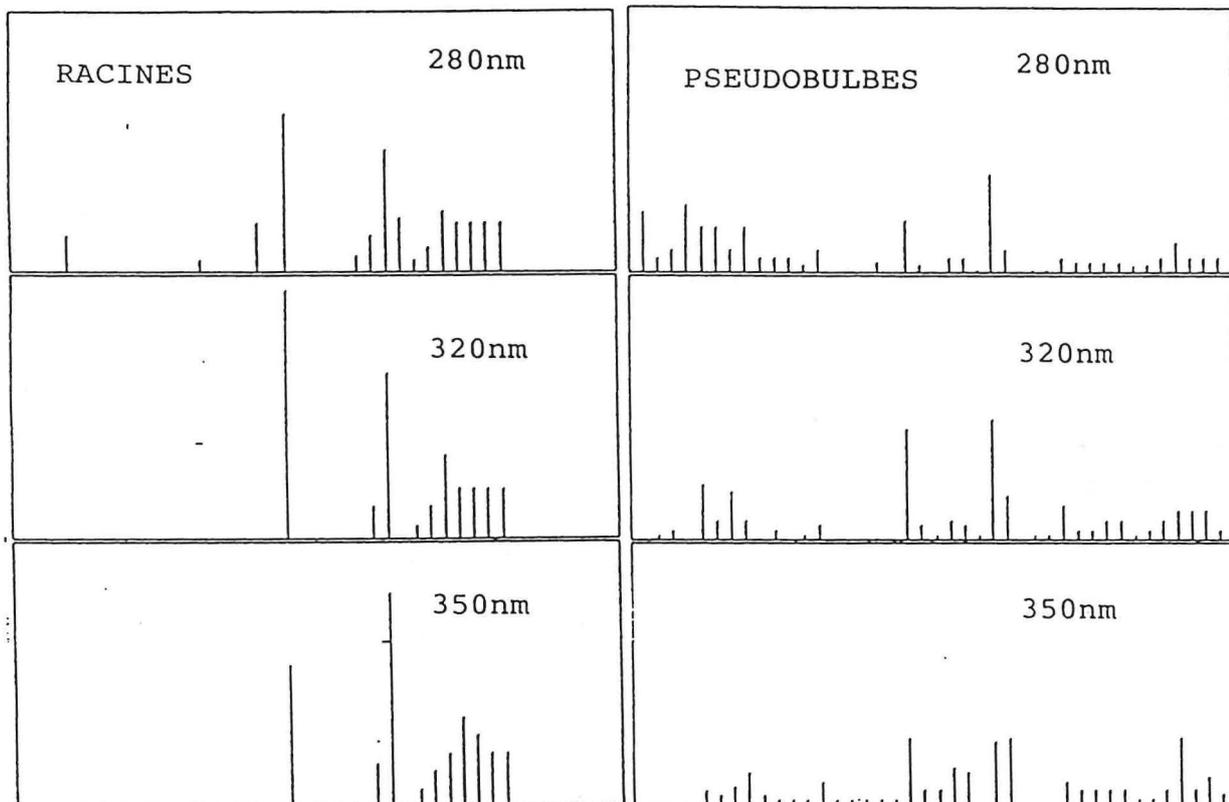
. Dans le cas des racines il n'y a aucune différence entre extrait réalisé à partir d'un individu sain et extrait réalisé à partir d'un individu malade, et ceci quelque soit la longueur d'onde de lecture.

. Dans le cas des Pseudobulbes, il existe de significatives différences semi-quantitatives que nous avons essayé de traduire en fonction des spécificités d'absorption c'est à dire en fonction des familles structurales phénoliques :

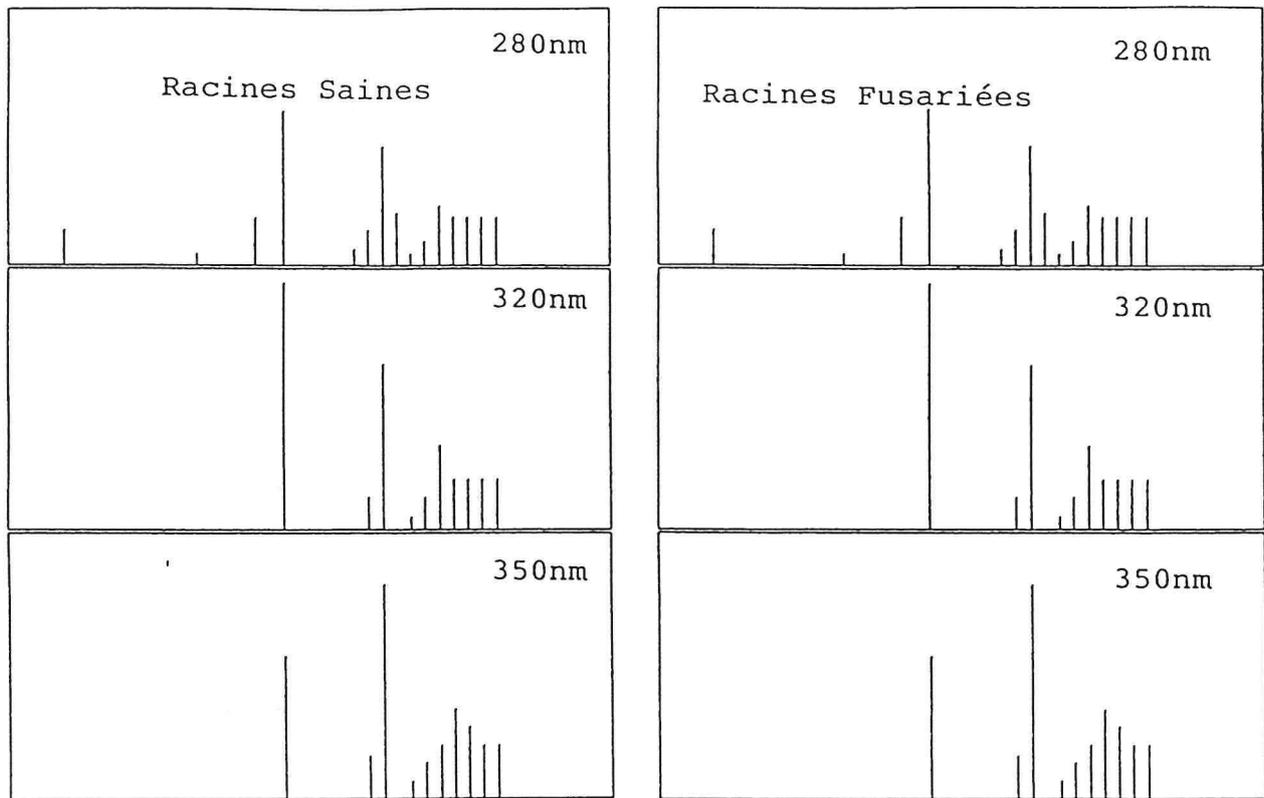
|                         | représentation / pool phénolique total |                  |
|-------------------------|--|------------------|
|                         | Pseudobulbe Infecté                    | Pseudobulbe Sain |
| Classe "A" 280nm        | 42%                                    | 60%              |
| Classe "C" 320nm        | 48%                                    | 41%              |
| Classes "BDE" 340-350nm | 59%                                    | 73%              |

FIGURE 10

Etude analytique par H.P.L.C. du contenu phénolique  
d'un clone en prépépinière (stade 3 feuilles)



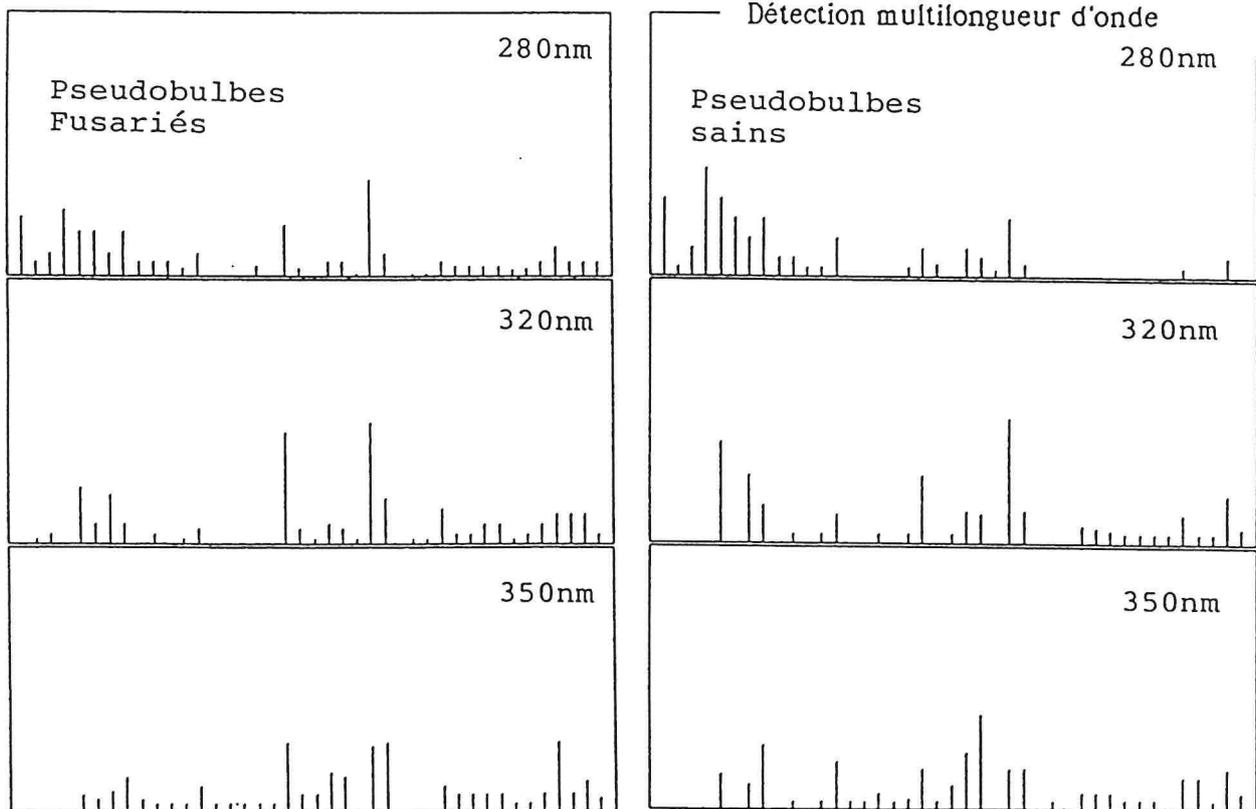
Colonne Ultrabase C18 : 5 $\mu$  ; 25cm  
Solvant H<sub>2</sub>O-Acétonitrile-AcOH (Gradient)  
Détection multilongueur d'onde



Etude analytique par H.P.L.C. du contenu phénolique  
d'un clone en prépépinière (stade 3 feuilles)  
Comparaison d'individus sans symptôme et d'individus avec  
symptômes F.O.E.

FIGURE 11

Colonne Ultrabase C18 ; 5 $\mu$  ; 25cm  
Solvant H<sub>2</sub>O-Acétonitrile-AcOH (Gradient)  
Détection multilongueur d'onde



CONTRAT DE RECHERCHES CCE (STD 2)  
N° TS 2A- 0261 - M (CD)  
Fusariose/Palmier à huile

IDEFOR/DPO  
Plantation expérimentale  
R. Michaux  
Service Phytopathologie  
Dabou - Côte d'Ivoire

ETUDE DES MECANISMES PHYSIOLOGIQUES  
DE LA RESISTANCE DU PALMIER A HUILE  
A LA FUSARIOSE VASCULAIRE

RAPPORT SEMESTRIEL N°4  
Janvier 1992

**INTRODUCTION**

Le rapport semestriel n°3, daté d'Aout 1991, rendait compte de la mise au point d'une technique d'extraction des phénols des plantules du palmier à huile, par ébullition dans l'éthanol 70%. Cette technique s'était révélée plus exhaustive que la méthode utilisée précédemment (macération à température ambiante dans l'éthanol absolu) et permettait en particulier d'extraire des composés hydrophiles dont le rôle dans la résistance à la fusariose n'avait pas encore été étudié. Toutefois les premiers résultats obtenus montraient que les teneurs globales en phénols extraits par l'ancienne technique demeuraient plus discriminantes vis à vis du critère de tolérance que celles obtenues avec la nouvelle technique. Ceci a conduit à améliorer la technique de séparation chromatographique des phénols extraits afin de rechercher les composés dont les teneurs étaient le plus directement liées au phénomène de résistance.

L'objet du présent rapport est de compléter les résultats obtenus précédemment sur les teneurs globales en phénols des plantules non inoculées et d'étudier en détail la réponse phénolique à l'inoculation par analyse en Chromatographie Liquide Haute Pression (C.L.H.P.) sur colonne de silice greffée par des radicaux à 18 atomes de carbone (colonnes "Ultrabase" C18 reverse-phase).



SAPONIFICATION

EXTRACTION CLASSIQUE

NOUVELLE EXTRACTION

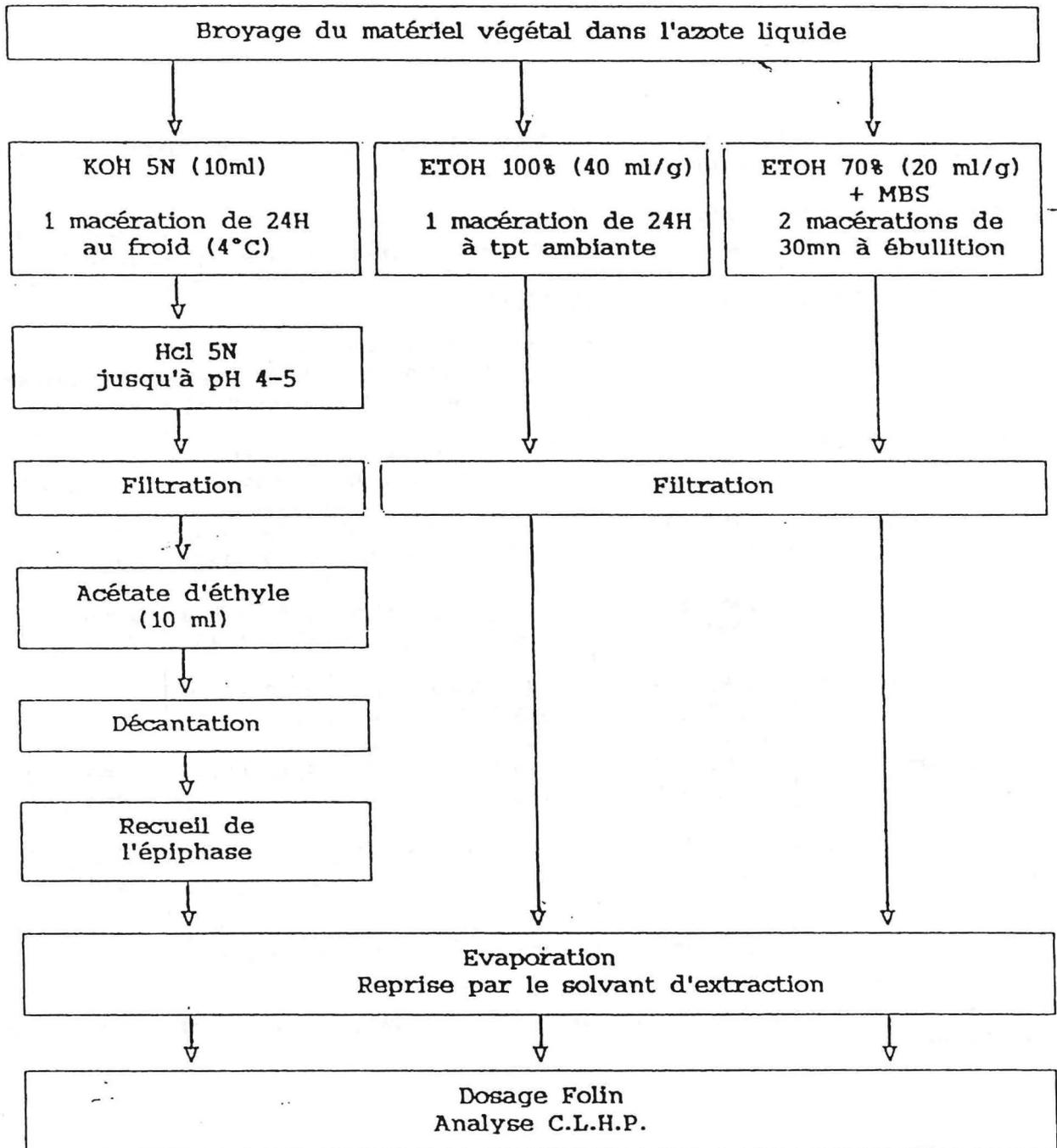


Fig. 1 : Les différentes techniques d'extraction des phénols des plantules du palmier à huile

## IV.- PROTOCOLE EXPERIMENTAL : Voir figure 1

## V.- RESULTATS

Les teneurs globales en phénols extraits par les trois techniques sont regroupées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison, en fonction de la technique d'extraction, des teneurs phénoliques globales des racines et des pseudobulbes de clones tolérants et de clones sensibles non inoculés (moyenne  $\pm$  écart-type mesurés sur cinq individus).

| Organe  | Couple       | Clone   | Im      | Teneurs phénoliques globales<br>( $\mu\text{g}$ d'ac. chlorogén./g.M.F.) |                                   |                                   |                                 |
|---------|--------------|---------|---------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
|         |              |         |         | Extract. classique   | Extract. nouvelle                 | Saponific.                        |                                 |
| Racines | 1            | LMC 022 | 29      | <i>5830 <math>\pm</math> 866</i>   | <i>9378 <math>\pm</math> 1340</i> | <i>794 <math>\pm</math> 408</i>   |                                 |
|         |              | LMC 074 | 184     | <i>4277 <math>\pm</math> 1423</i>  | <i>8977 <math>\pm</math> 1471</i> | <i>548 <math>\pm</math> 232</i>   |                                 |
|         | 2            | LMC 119 | 10      | <i>4012 <math>\pm</math> 1196</i>  | <i>9240 <math>\pm</math> 818</i>  | <i>2059 <math>\pm</math> 548</i>  |                                 |
|         |              | LMC 165 | 164     | <i>3806 <math>\pm</math> 539</i>   | <i>9394 <math>\pm</math> 459</i>  | <i>2233 <math>\pm</math> 209</i>  |                                 |
|         | 3            | LMC 062 | 42      | <i>3997 <math>\pm</math> 777</i>   | <i>9973 <math>\pm</math> 350</i>  | -                                 |                                 |
|         |              | LMC 204 | 163     | <i>3603 <math>\pm</math> 506</i>   | <i>9790 <math>\pm</math> 437</i>  | -                                 |                                 |
|         | Pseudo-bulbe | 1       | LMC 022 | 29   | <i>1389 <math>\pm</math> 724</i>  | <i>5344 <math>\pm</math> 1097</i> | <i>250 <math>\pm</math> 120</i> |
|         |              |         | LMC 074 | 184  | <i>1064 <math>\pm</math> 837</i>  | <i>4185 <math>\pm</math> 1512</i> | <i>183 <math>\pm</math> 106</i> |
|         |              | 2       | LMC 119 | 10   | <i>431 <math>\pm</math> 195</i>   | <i>3106 <math>\pm</math> 634</i>  | <i>512 <math>\pm</math> 149</i> |
| LMC 165 |              |         | 164     | <i>246 <math>\pm</math> 43</i>   | <i>2667 <math>\pm</math> 370</i>  | <i>415 <math>\pm</math> 111</i>   |                                 |
| 3       |              | LMC 062 | 42      | <i>3132 <math>\pm</math> 711</i>   | <i>7774 <math>\pm</math> 1043</i> | -                                 |                                 |
|         |              | LMC 204 | 163     | <i>1758 <math>\pm</math> 464</i>   | <i>6693 <math>\pm</math> 911</i>  | -                                 |                                 |

Les variations significatives au seuil de confiance de 95% sont indiquées en italiques.

Ces résultats confirment la plus grande efficacité de l'extraction à ébullition dans l'éthanol à 70% par rapport à la technique classique de macération à température ambiante dans l'éthanol pur.

En ce qui concerne le facteur organe, il se confirme que les pseudobulbes possèdent moins de phénols que les racines.

Du point de vue de la discrimination entre clones tolérants et clones sensibles, la technique classique se montre la plus efficace puisqu'elle révèle des teneurs phénoliques significativement supérieures pour le clone tolérant dans deux cas : pour les phénols des pseudobulbes du clone LMC 062 par rapport au clone LMC 204 et pour les phénols des racines du clone LMC 022 par rapport au clone LMC 074. Les autres différences, bien que n'étant pas significatives, confirment cependant une tendance à des teneurs en phénols plus faibles pour les clones sensibles que pour les clones tolérants.

**ANALYSE DE LA REPONSE PHENOLIQUE  
DES RACINES ET DES PSEUDOBULBES A L'INFECTION**

**L- OBJECTIFS**

Les séries Phyto 53 et Phyto 58 ont pour objectif d'étudier la réponse des plantules de clones tolérants et de clones sensibles à l'inoculation.

**II.- PLAN D'EXPERIENCE**

**II.1.- Phyto 53**

Facteur tolérance 2 modalités :

- (1) Clone tolérant LMC 022 (Im = 29)
- (2) Clone sensible LMC 074 (Im = 184)

Facteur traitement 3 modalités :

- (1) Plantules non inoculées, non trempées (NN)
- (2) Plantules non inoculées, trempées (NT)
- (3) Plantules inoculées par trempage (IT)

Facteur date de prélèvement 10 modalités :

- (1) T0 : moment de l'inoculation
- (2) T0 + 3 heures
- (3) T0 + 6 heures
- (4) T0 + 10 heures
- (5) T0 + 1 jour
- (6) T0 + 2 jours
- (7) T0 + 3 jours
- (8) T0 + 5 jours
- (9) T0 + 10 jours
- (10) T0 + 15 jours.

Facteur organe 2 modalités :

- (1) Racines
- (2) Pseudobulbes

5 plantules par modalité

## II.2.- Phyto 58

Facteur tolérance : 2 modalités

(1) Clones tolérants

- LMC 022 (Im = 29)
- LMC 077 (Im = 31)
- LMC 119 (Im = 10)

(2) Clones sensibles

- LMC 074 (Im = 184)
- LMC 096 (Im = 145)
- LMC 165 (Im = 164)

Facteur traitement 3 modalités :

- (1) Plantules témoin (NN)
- (2) Plantules non inoculées, grattées (NG)
- (3) Plantules non inoculées, trempées (NT)
- (4) Plantules inoculées par grattage (IG)
- (5) Plantules inoculées par trempage (IT)

Facteur date de prélèvement 5 modalités :

- (1) T0 : moment de l'inoculation
- (2) T0 + 3 jours
- (3) T0 + 5 jours
- (4) T0 + 8 jours
- (5) T0 + 15 jours

Facteur organe 2 modalités :

- (1) Racines
- (2) Pseudobulbes

5 plantules par modalité

## III.- MATERIEL BIOLOGIQUE

- 1) Inoculum : *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*, souche Mono 179, densité de  $3 \cdot 10^6$  propagules par plantule pour l'inoculation par grattage du collet et  $1,7 \cdot 10^5$  propagules/ml pour l'inoculation par trempage des racines.
- 2) Plantules : Elles sont issues de clonage *in vitro* et sont installées en prépépinière depuis 2 mois.

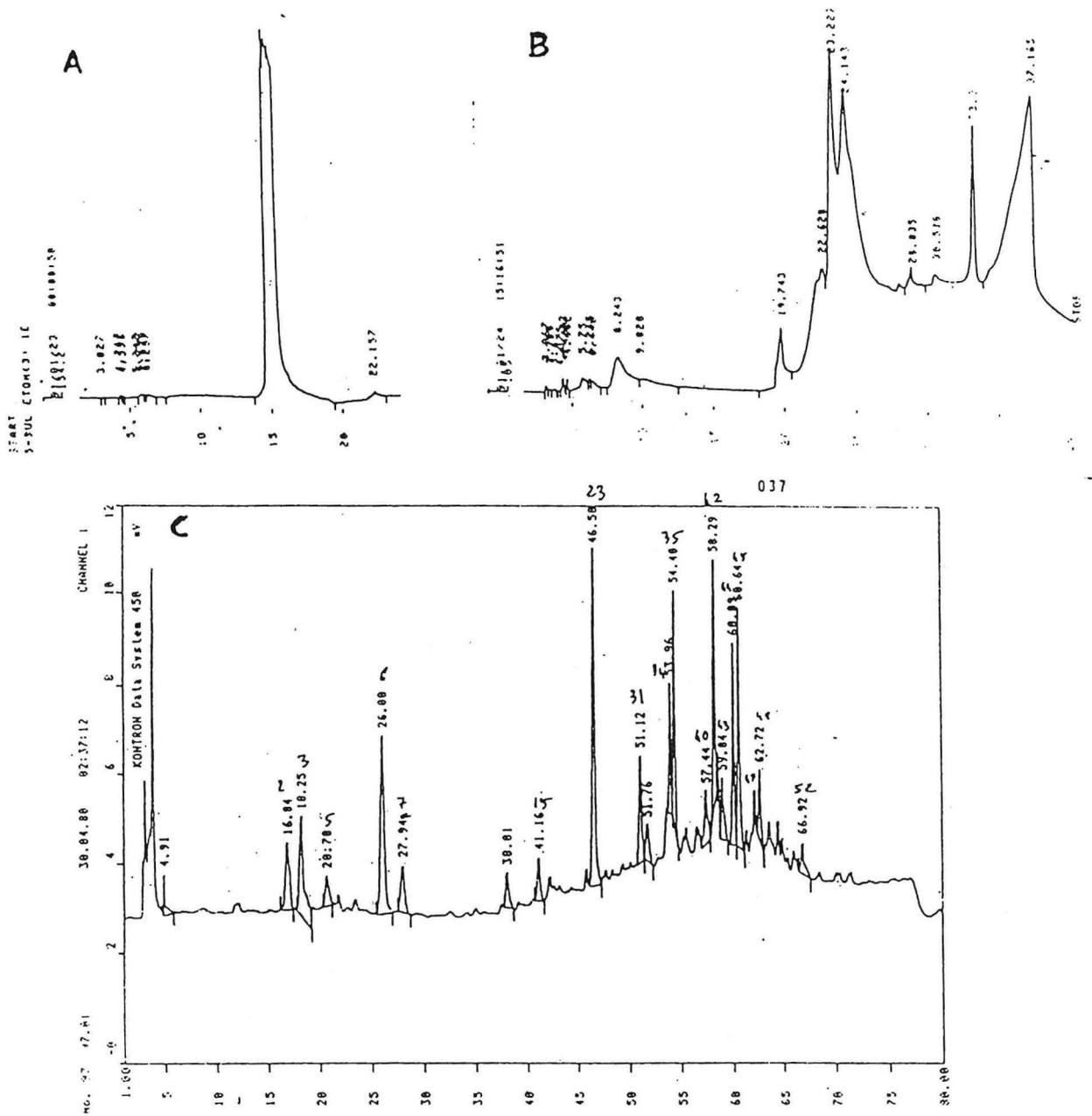


Figure 2 : Profil C.L.H.P. des composés phénoliques racinaires du palmier à huile

A - colonne silice, élution isocratique par paliers dans Hexane - Acétate d'Ethyle - Méthanol

B - colonne silice, élution suivant un gradient linéaire de Méthanol dans un mélange Hexane - Acétate d'Ethyle

C - colonne silice greffée C18 reverse-phase, élution suivant un gradient linéaire d'Acétonitrile dans l'eau.

#### IV.- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

##### IV.1.- Inoculation

L'inoculation est réalisée par application de l'inoculum par grattage au niveau du collet de la plantule (plants IG) ou par trempage des racines dans l'inoculum (plants IT).

Les plantules NG et NT permettent de repérer un effet éventuel de la blessure sur le métabolisme phénolique : Les plantules NG subissent un grattage et une application d'eau distillée au niveau du collet, les plantules NT subissent un trempage des racines dans l'eau distillée.

Les plants NN constituent les témoins n'ayant subi ni inoculation, ni grattage, ni trempage.

##### IV.2.- Extraction et analyse des phénols

L'extraction des phénols a été réalisée par macération à ébullition dans l'éthanol à 70%, en présence de M.B.S.. les analyses en C.L.H.P. ont été effectuées au Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie du Professeur Jay à Lyon, sur colonne Ultrabase C18 reverse-phase, avec élution des composés phénoliques par un gradient d'acétonitrile dans l'eau.

#### V.- RESULTATS

##### V.1.- Séparation chromatographique

La figure 2 montre les profils chromatographiques obtenus avec une colonne de silice simple et élution par un mélange de solvants hexane-acétate d'éthyle-méthanol et les profils obtenus avec une colonne "Ultrabase" reverse-phase C18 et élution par un gradient d'acétonitrile dans l'eau. Cette dernière technique se révèle de loin la meilleure et devra être dorénavant utilisée pour l'analyse des phénols du palmier à huile.

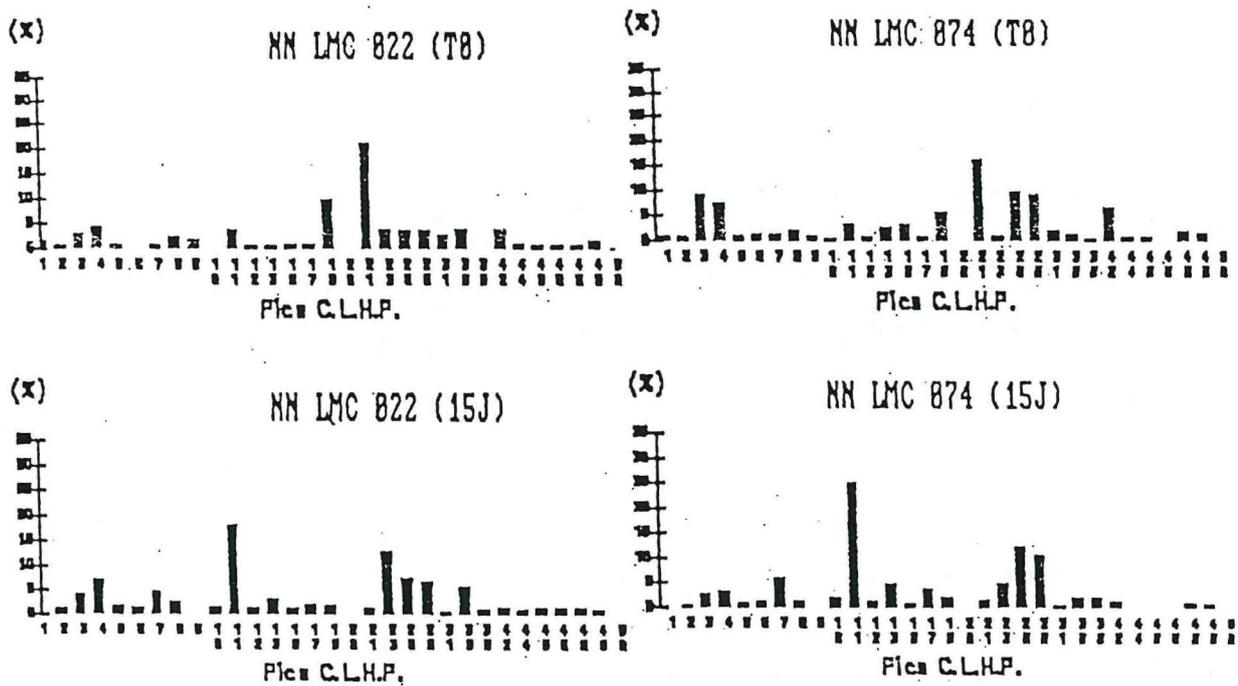
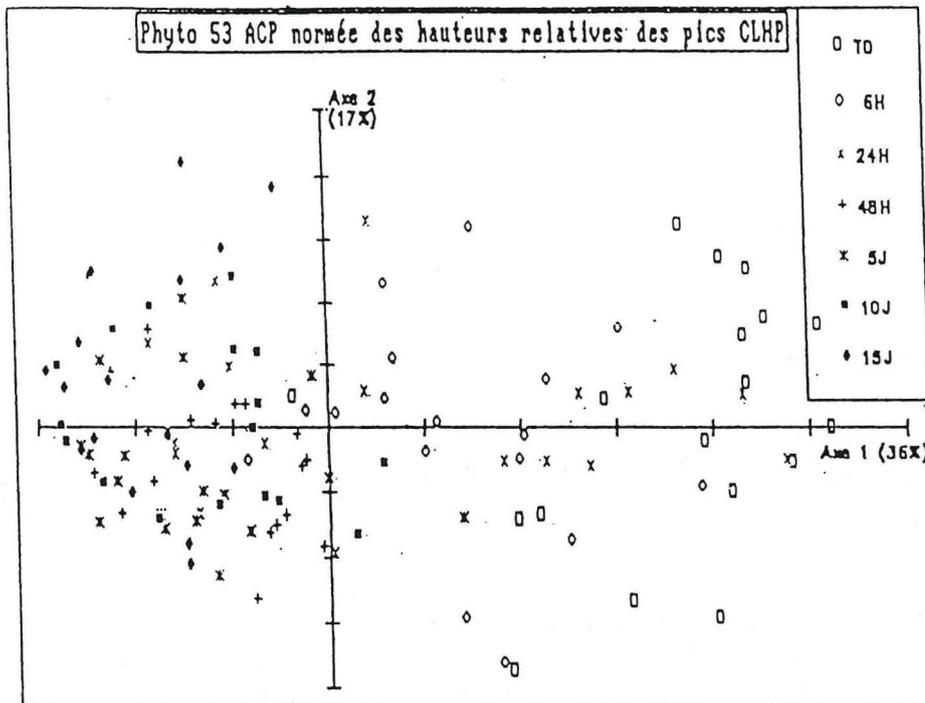


Fig. 3 : Série phyto 53. Evolution des profils phénoliques des pseudobulbes.

A : Plan 1-2 de l'A.C.P. normée des hauteurs relatives des pics phénoliques de tous les individus. Dépouillement par date de prélèvement.

B : Exemples de profils de plantules non inoculées prélevées à T0 et à T0 + 15 jours.

## V.2.- Réponse des pseudobulbes à l'inoculation du *F.o.e* (Série Phyto 53)

L'analyse concerne les prélèvements : T0 (moment de l'inoculation), 6 heures, 1 jour, 2 jours, 5 jours, 10 jours et 15 jours.

### *Modification du profil phénolique des pseudobulbes en fonction du temps.*

Une analyse en composantes principales normée, réalisée à partir des hauteurs relatives des pics des profils phénoliques de l'ensemble des individus, montre l'existence d'une évolution des profils en fonction du temps qui est indépendante du traitement ou du clone (fig. 3A). Cette évolution est liée aux pics 11 et 21. Le pic 21 qui est peu important au moment de l'inoculation augmente progressivement et devient majoritaire 15 jours après l'inoculation (fig. 3b).

### *Modification du profil phénolique des pseudobulbes en réponse à l'inoculation.*

La figure 4 représente le plan 1-2 d'une ACP normée réalisée à partir des profils phénoliques du pseudobulbe des individus récoltés à T0 + 24 heures. Ce plan révèle l'existence d'une forte différence entre les profils des individus inoculés du clone tolérant LMC 022 et ceux du clone sensible LMC 074. Cette différence est liée au pic 42 qui est très élevé pour les individus inoculés du clone tolérant alors qu'il est réduit chez le clone sensible. La figure 5 montre que l'élévation du pic 42 se produit en réponse à l'inoculation par trempage des racines uniquement chez le clone tolérant.

## V.3.- Réponse des racines à l'inoculation du *F.o.e* (Phyto 58)

Les analyses concernent les racines de trois des cinq individus du clone tolérant LMC 077, récoltés 8 jours après inoculation du *F.o.e*. Une ACP normée réalisée sur les hauteurs relatives des pics des profils phénoliques montre que deux des trois individus inoculés par trempage des racines présentent un profil très différent de celui des individus non inoculés (fig. 6). Cette différence se traduit par une diminution de la hauteur relative du pic 23 et une augmentation relative des pics de fin de profil (fig. 7). Les autres traitements, et en particulier l'inoculation par grattage, n'ont pas d'influence sensible sur le profil phénolique à T0 + 8 jours (fig. 6).

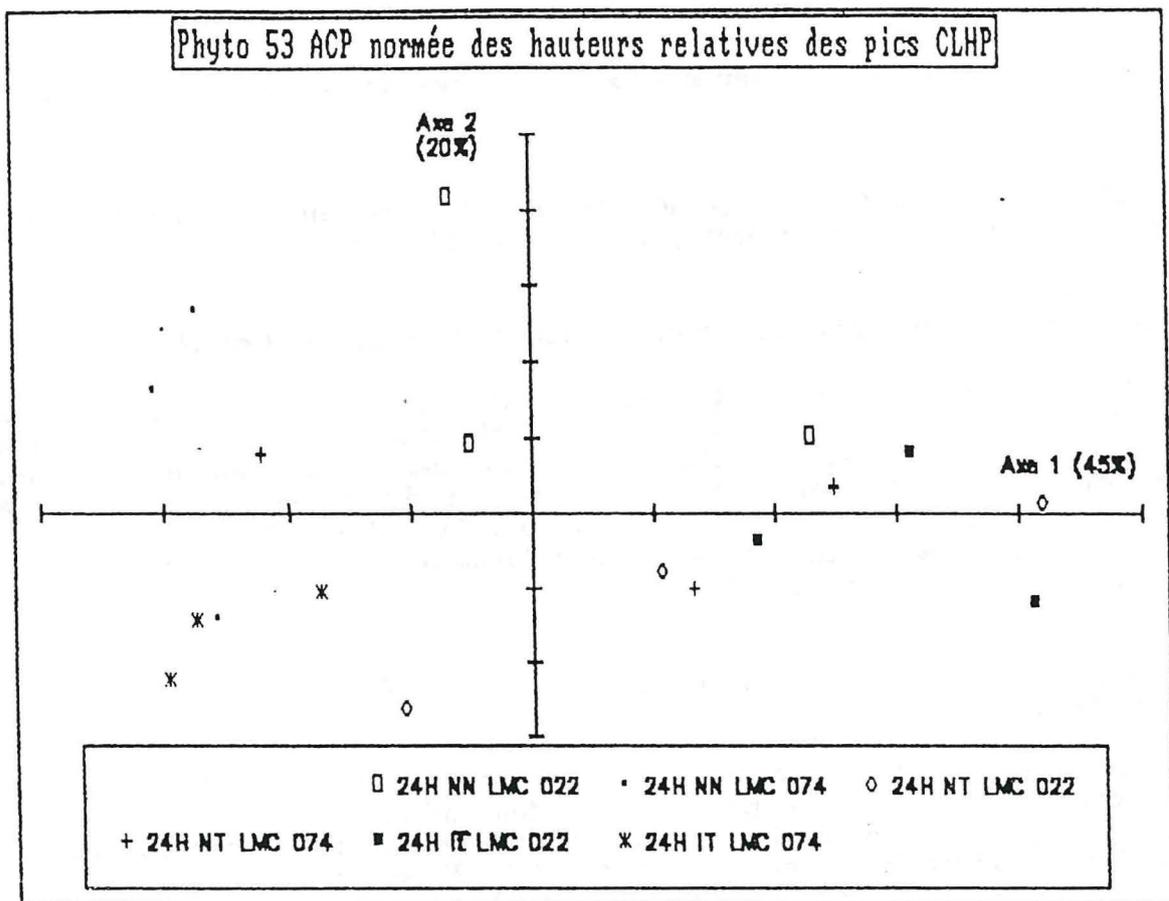


Fig. 4 : (ci-dessus). Série Phyto 53. Influence de l'inoculation et du trempage des racines sur le profil phénolique des pseudobulbes. Plan 1-2 de l'ACP normée des hauteurs relatives des pics C.L.H.P. des individus prélevés à T0 + 24 heures.

Fig. 5 : (ci-contre). Série Phyto 53. Influence de l'inoculation et du trempage des racines sur le profil phénolique des pseudobulbes. Profils C.L.H.P. des individus prélevés à T0 + 24 heures.

A : NN : Non inoculés non trempés.

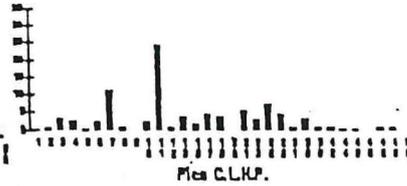
B : IT : Inoculés par trempage des racines.

C : NT : Racines trempées dans l'eau distillée.

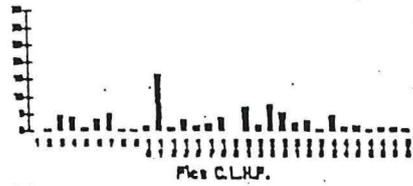
(x) 1 NM LMC 822 (24H)



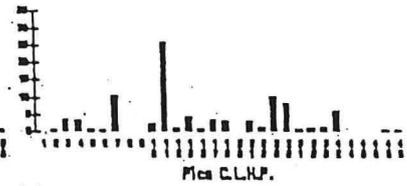
(x) 1 NM LMC 874 (24H)



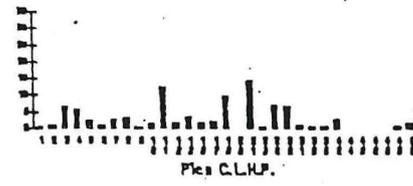
(x) 2 Pica C.L.H.P.



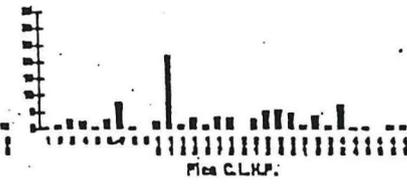
(x) 2 Pica C.L.H.P.



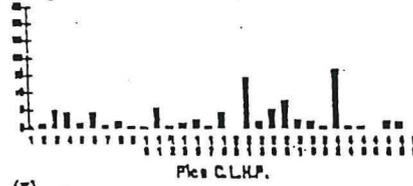
(x) 3 Pica C.L.H.P.



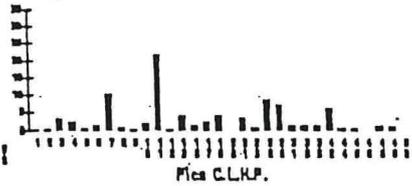
(x) 3 Pica C.L.H.P.



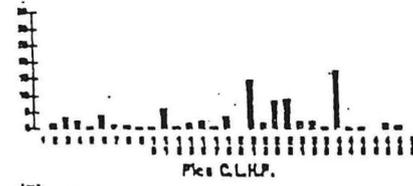
(x) 1 IT LMC 822 (24H)



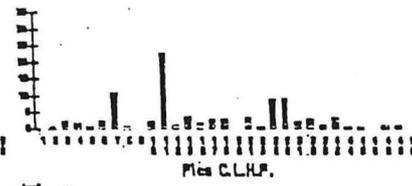
(x) 1 IT LMC 874 (24H)



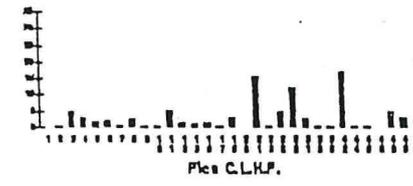
(x) 2 Pica C.L.H.P.



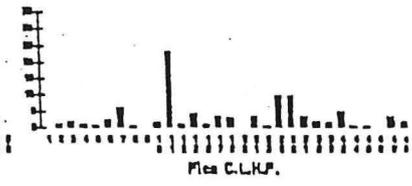
(x) 2 Pica C.L.H.P.



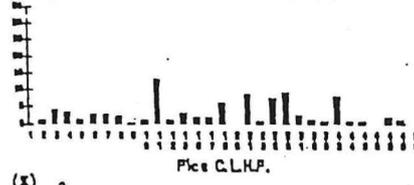
(x) 3 Pica C.L.H.P.



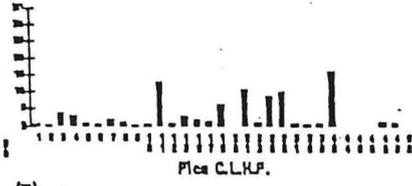
(x) 3 Pica C.L.H.P.



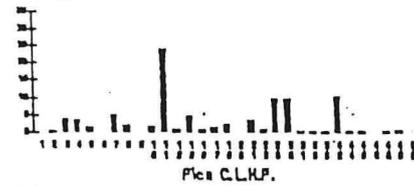
(x) 1 NT LMC 822 (24H)



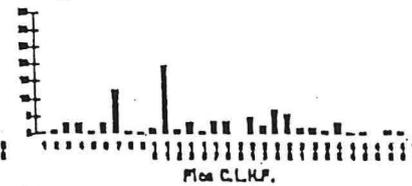
(x) 1 NT LMC 874 (24H)



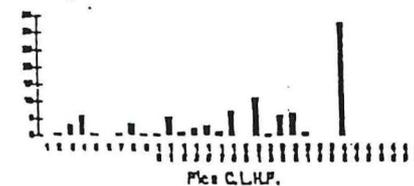
(x) 2 Pica C.L.H.P.



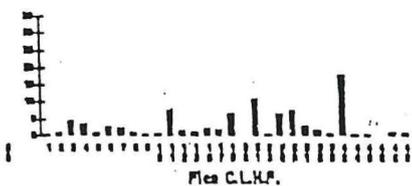
(x) 2 Pica C.L.H.P.



(x) 3 Pica C.L.H.P.



(x) 3 Pica C.L.H.P.



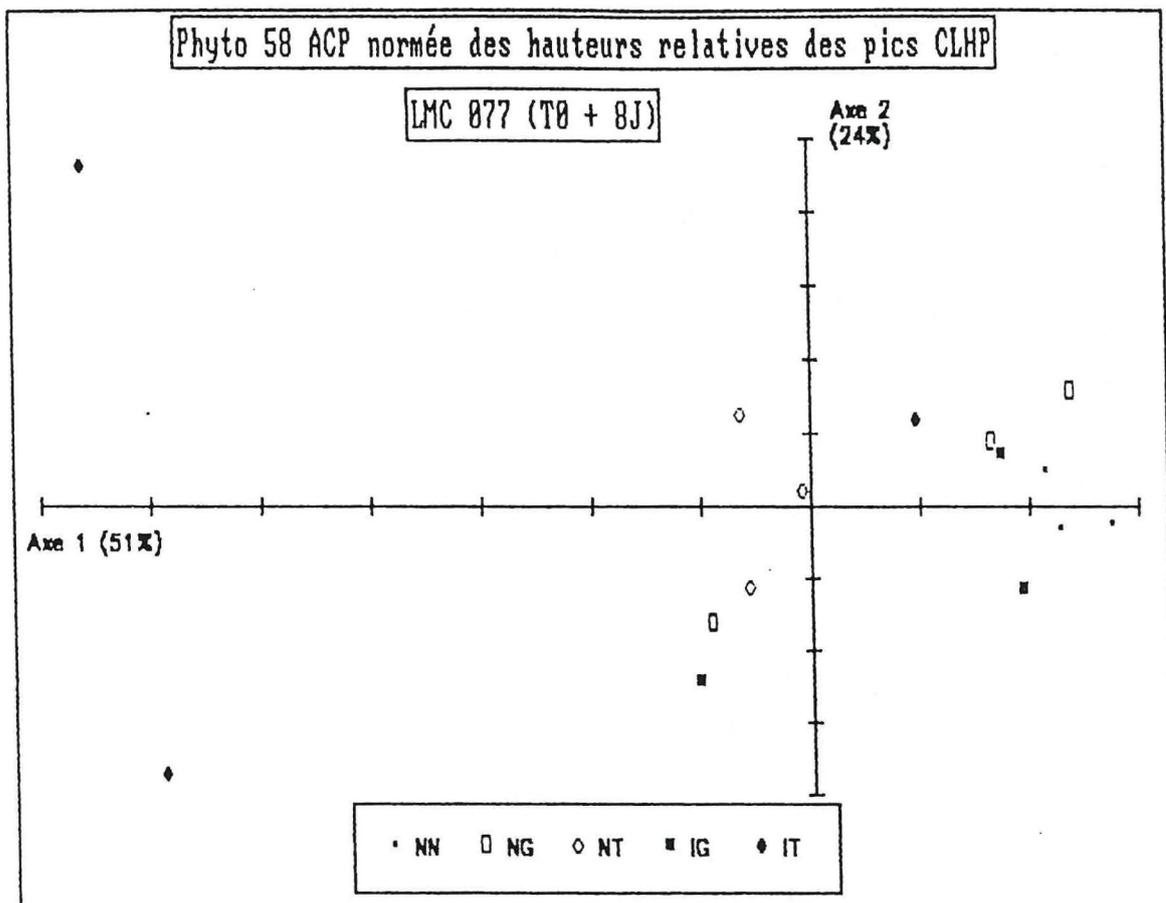


Fig. 6 : Série Phyto 58. Influence du traitement sur les profils phénoliques des racines des plantules du clone LMC 077, prélevées à T0 + 8 jours. Plan 1-2 de l'ACP normée des hauteurs relatives des pics C.L.H.P.

NN : non inoculées, non grattées, non trempées  
 IG : inoculées par grattage du collet  
 IT : inoculées par trempage des racines  
 NG : grattées avec application d'eau distillée au collet  
 NT : racines trempées dans l'eau distillée.

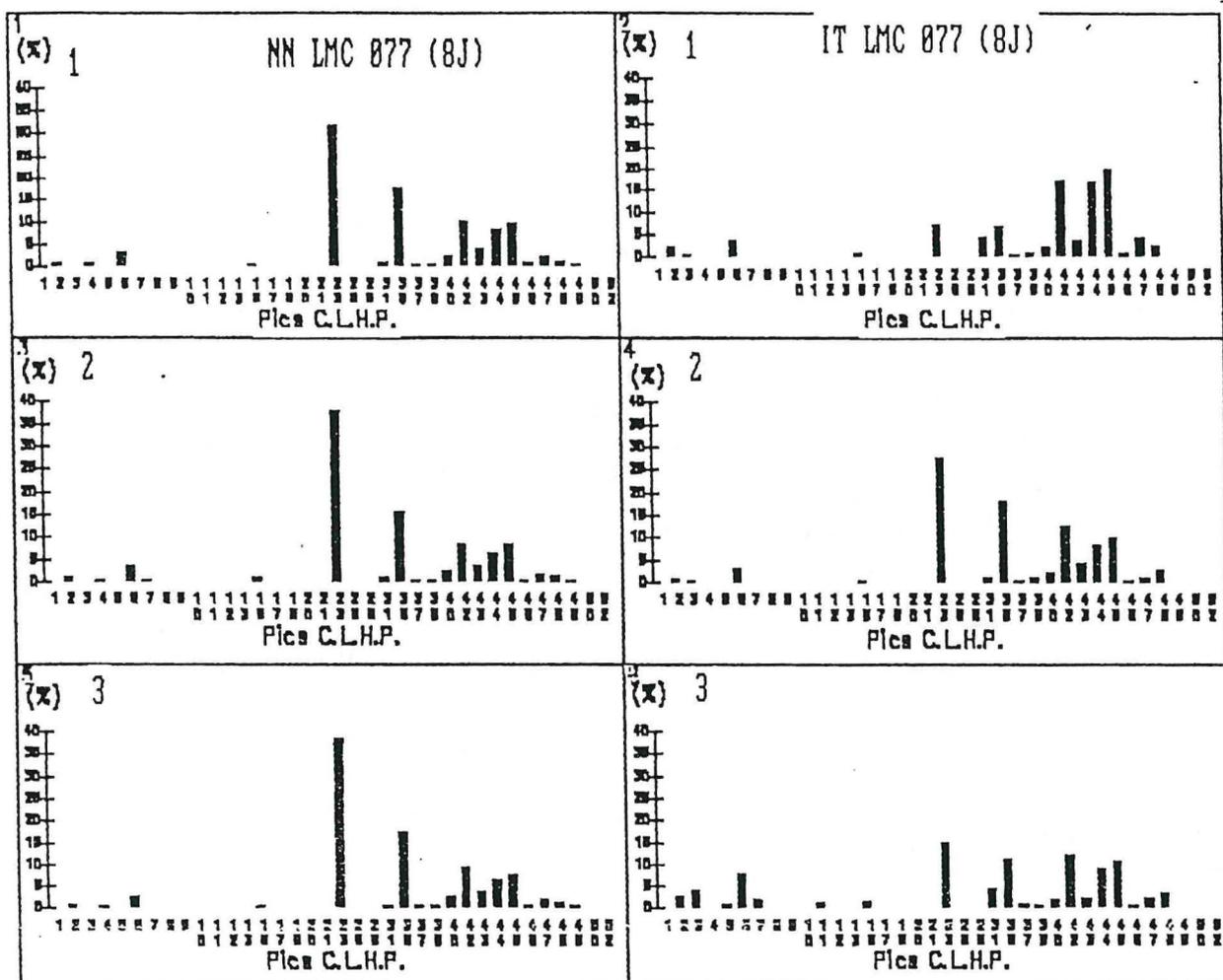


Fig. 7 : Série Phyto 58. Influence du traitement sur le profil phénolique des racines des plantules du clone LMC 077, prélevées à T0 + 8 jours. Profils C.L.H.P. individuels des plantules témoins (NN) et des plantules inoculées par trempage des racines (IT).

## CONCLUSIONS

Ces résultats, bien qu'encore très parcellaires, se révèlent intéressants pour la mise au point d'un test précoce de la tolérance du palmier à huile à la fusariose. En effet, tant au niveau des pseudobulbes que des racines des plantules non inoculées, l'extraction des phénols à température ambiante dans l'éthanol pur met en évidence que les teneurs globales en phénols ainsi extraits sont plus faibles chez les clones sensibles que chez les clones tolérants. Toutefois cette différence ne se révèle pas toujours significative sur un échantillonnage de cinq plantules par clone. Il apparaît donc indispensable d'augmenter le nombre de plantules analysées par clone. D'autre part ces résultats doivent être confirmés par la recherche d'une corrélation entre l'indice de tolérance et la teneur globale en phénols extraits selon ce procédé.

En ce qui concerne la réponse à l'inoculation, il se confirme qu'il existe une réponse précoce au niveau du pseudobulbe. Celle-ci se situe 24 heures après l'inoculation par trempage des racines et affecte le clone tolérant LMC 022 alors que le clone sensible LMC 074 ne réagit pas. L'achèvement de l'analyse et du dépouillement de la série Phyto 58 devrait permettre de d'estimer la généralité de cette réponse par l'étude de deux autres clones tolérants LMC 077 et LMC 165. D'autre part elle indiquera si cette réponse est limitée à l'inoculation par trempage des racines ou si elle s'étend à l'inoculation par grattage du collet.

Les résultats concernant la réponse à l'inoculation au niveau des racines se limitent pour l'instant au clone tolérant LMC 077. Il existe une forte modification du profil phénolique racinaire huit jours après inoculation par trempage des racines. Les résultats indiquent de plus que cette réponse n'est pas homogène pour toutes les plantules issues d'un même clone, certaines réagissant moins fortement que d'autres à l'inoculation. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'observation selon laquelle un certain pourcentage des plantules d'un clone tolérant expriment tout de même les symptômes de la fusariose. L'achèvement du dépouillement de la série Phyto 58 permettra de préciser la durée de cette réponse et sa valeur discriminante vis à vis du caractère de tolérance.

ANNEXE III

**RAPPORT SEMESTRIEL 15/07/91 - 15/01/92**

U.L.B.

Laboratoire de Parasitologie Pr.J.PELSENEER

Laboratoire de Pharmacognosie et de Bromatologie Pr.M.VANHAELEN

## Origine des échantillons:

Binga (Zaïre); le code des graines "Wilt sensibles" est S5304 et les codes des graines "Wilt tolérants" sont S5236 et S5227. Les graines n'ont été ni préchauffées ni traitées par des pesticides.

## Conditions chromatographiques:

### 1. Préparation des extractifs

- 1.1. Séparation des téguments et de l'endosperme des graines
- 1.2. Seuls les téguments sont pulvérisés dans un broyeur Culati équipé d'un tamis 0.5
- 1.3. Macération de la poudre (500 mg) dans un percolateur de 10 ml avec du chloroforme (12 h) puis percolation avec ce même solvant ad 25 ml; après élimination du chloroforme (sous légère pression), addition d' éthanol et macération pendant 2 h puis percolation ad 25 ml.
- 1.4. Evaporation à sec des solutions chloroformiques et éthanoliques et reprise des résidus par 0,5 ml de chloroforme ou d'éthanol

### 2. Chromatographie sur couche mince:

Adsorbant: chromatoplaques Merck silice 60F254 (20 X 10 cm)

Dépôt des échantillons: 3 ou 10 µl des solutions obtenues en 1.4. sous forme de bandes de 9 mm à l'aide d'un appareillage automatisé Camag Linomat IV

Phases mobiles:

- extraits chloroformiques: Chloroforme-méthanol 9:1 (v/v)
- extraits éthanoliques: Chloroforme-méthanol-eau 70:30:4 (v/v)

Révélations:

- chromatogrammes obtenus avec les extraits chloroformiques:  
Pulvérisation d'une solution à 3 % d'acide sulfurique dans l'éthanol puis chauffage à 110° pendant 5 min
- chromatogrammes obtenus avec les extraits éthanoliques:  
Pulvérisation d'une solution de diphénylborinate

### 3. Lectures densitométriques :

Appareillage: Shimadzu high speed TLC scanner CS 930

Conditions:

|                    |        |                    |                |
|--------------------|--------|--------------------|----------------|
| DELT "Y"           | 0.05   | PHOTO MODE         | ABS REFLECTION |
| LINEARIZER         | SX7    | ORDINATE           | X64            |
| ABSCISSA           | X1/2   | OUTPUT             | CURVE & PRINT  |
| DRIFT LINE         | ON     | ACCUM NO.          | 1              |
| BACKGROUND CORRECT | OFF    | PEAK DETECT        | 1              |
| DETECT SIGNAL      | AREA   | DETECT SENSITIVITY | MED.           |
| MIN. WIDTH         | 10     | ID MODE            | EXT            |
| AVERAGE PEAK NO.   | 1      | SIGNAL AVERAGE     | 8              |
| WAVELENGTH 1       | 370 nm | WAVELENGTH 2       | 370 nm         |
| "X" START POS.     | 19     | "X" END POS.       | 19             |
| "X" WIDTH          | 0      | "Y" START POS.     | 25.0           |
| "Y" END POS.       | 60.0   | LANE DIST.         | 11             |
| TOTAL LANE NO.     | 14     |                    |                |
| DRIFT LINE         | 0.0500 | MIN. AREA          | 100.0000       |

## Résultats et discussion

Dans un précédent rapport ainsi que dans une publication récente<sup>1</sup>, nous avons observé que les téguments des graines d'*Elaeis guineensis* contenaient des substances fongistatiques et fongicides vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* elaeidis.

Dans la présente étude, nous tentons de vérifier si ces constituants permettent de différencier les graines appartenant à des croisements considérés comme "sensibles" (Wilt index >100) ou "tolérants" (Wilt index <100).

Dans une première étape, nous avons comparé par chromatographie sur couche mince des extractifs chloroformiques et éthanoliques provenant de téguments correspondant à 10 graines réunies appartenant à plusieurs croisements différents "sensibles" et "tolérants".

Les conditions expérimentales choisies ont permis de montrer qu'effectivement les chromatogrammes correspondant aux extractifs provenant des graines "sensibles" ou aux "tolérants" étaient analogues au sein de chaque groupe. En outre, des différences significatives apparaissent lors de la comparaison de ces groupes et ce, en particulier, pour les extractifs chloroformiques.

Dès lors, dans une deuxième étape, la comparaison a été opérée à partir d'extractifs obtenus à partir de dix graines traitées individuellement et provenant de différents croisements de façon à vérifier l'homogénéité au sein des groupes "sensibles" ou "tolérants".

Pour les trois croisements testés, il apparaît dans les chromatogrammes que la concentration de l'un des constituants de l'extrait chloroformique des téguments est très élevée dans le cas des deux croisements "tolérants" alors qu'elle est faible et variable pour le croisement "sensible"; à titre d'illustration, la figure 1 présente le chromatogramme obtenu à partir des extractifs chloroformiques des croisements code 5304 ("sensibles", spots 1/7, 3/9 et 5/11) et code 5227 ("tolérants", spots 2/8, 4/10, 6/12) ainsi que les lectures densitométriques correspondantes ("sensibles", figures 2, 3 et 4; "tolérants", figures 5, 6 et 7). Ces résultats montrent clairement qu'il existe une différenciation phytochimique entre les croisements "sensibles" et "tolérants". Sous réserve d'une vérification effectuée à partir d'autres croisements de Wilt index connus, la quantification de ce constituant pourrait servir pour caractériser les croisements "tolérants". En outre, nous nous proposons de vérifier l'activité fongistatique/fongicide de ce constituant.

En ce qui concerne les extraits éthanoliques, les différences entre croisements "sensibles" et "tolérants" sont moins marquées et présentent une plus grande variabilité individuelle. Néanmoins les fluorescences observées pourraient indiquer une correspondance possible avec les chromatogrammes des extraits chloroformiques.

---

<sup>1</sup> J. Coremans-Pelseneer, M. Vanhaelen and R. Vanhaelen-Fastré, Chemical resistance of *Elaeis guineensis* Jacq seeds to *Fusarium oxysporum* Schl. elaeidis, Med. Fac. Landbouww. Rijkuniv. Gent, 56/2a, 185-187 (1991)

En conclusion, nous avons montré antérieurement qu'il existait dans les téguments de graines aussi bien "sensibles" que "tolérants" des substances antifongiques. La présente étude nous indique que la détermination des concentrations en constituants extractibles par le chloroforme séparés par chromatographie sur couche mince semble permettre une différenciation des croisements "tolérants".

C'est pourquoi nous nous proposons dans la suite:

- de confirmer cette observation à partir de graines provenant d'autres croisements;
- d'identifier le principal constituant utilisé pour la différenciation;
- d'étudier son pouvoir fongistatique/fongicide vis-à-vis de différentes souches de *Fusarium oxysporum*.

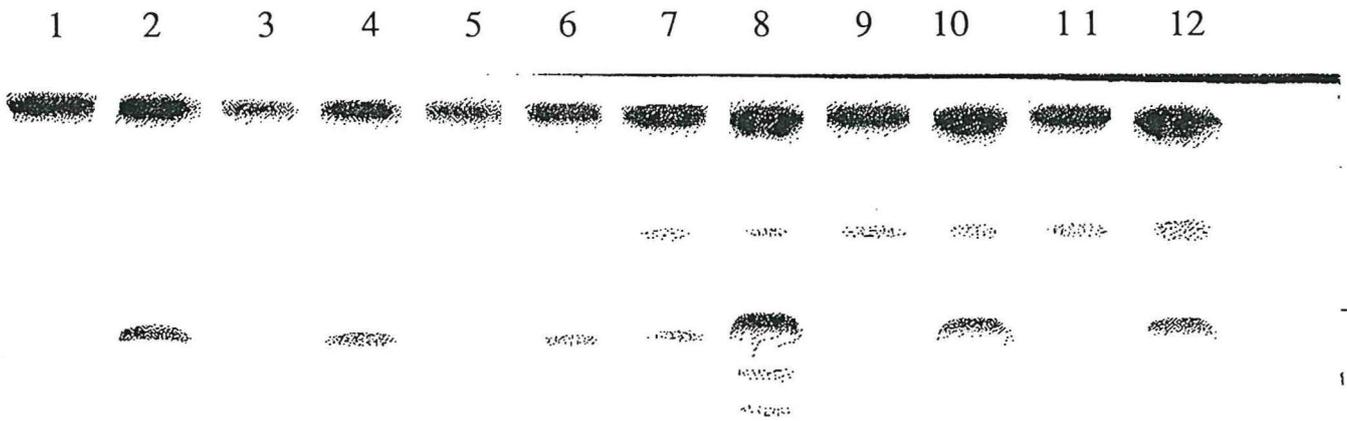


Prof. J. Pelseneer



Prof. M. Vanhaelen

FIGURE 1



Chromatographie comparative d'extraits chloroformiques de téguments de graines

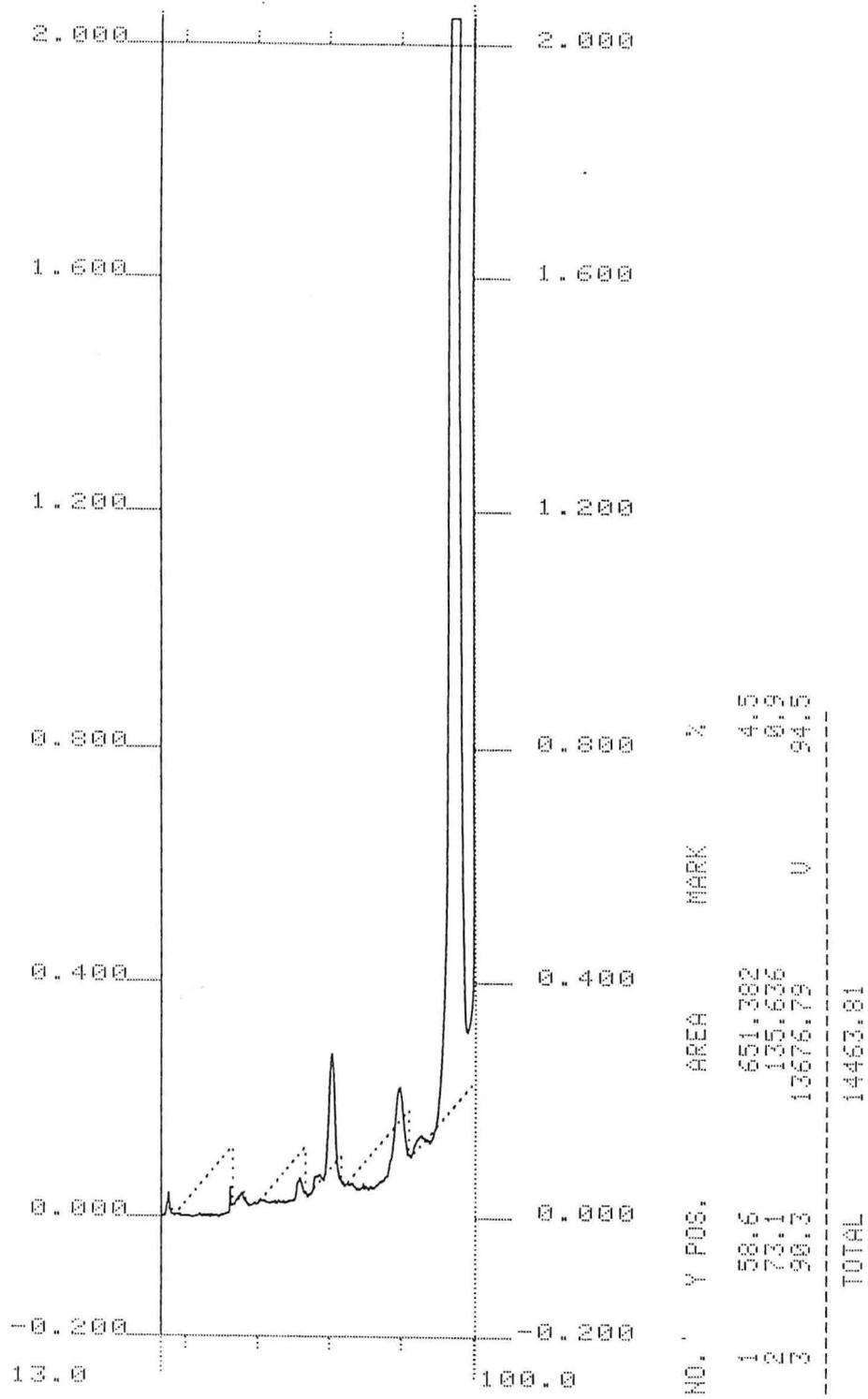
Spots 1 à 6: 3 microlitres

Spots 7 à 12: 10 microlitres

Les nombres pairs correspondent à un croisement "W ilt tolérant"

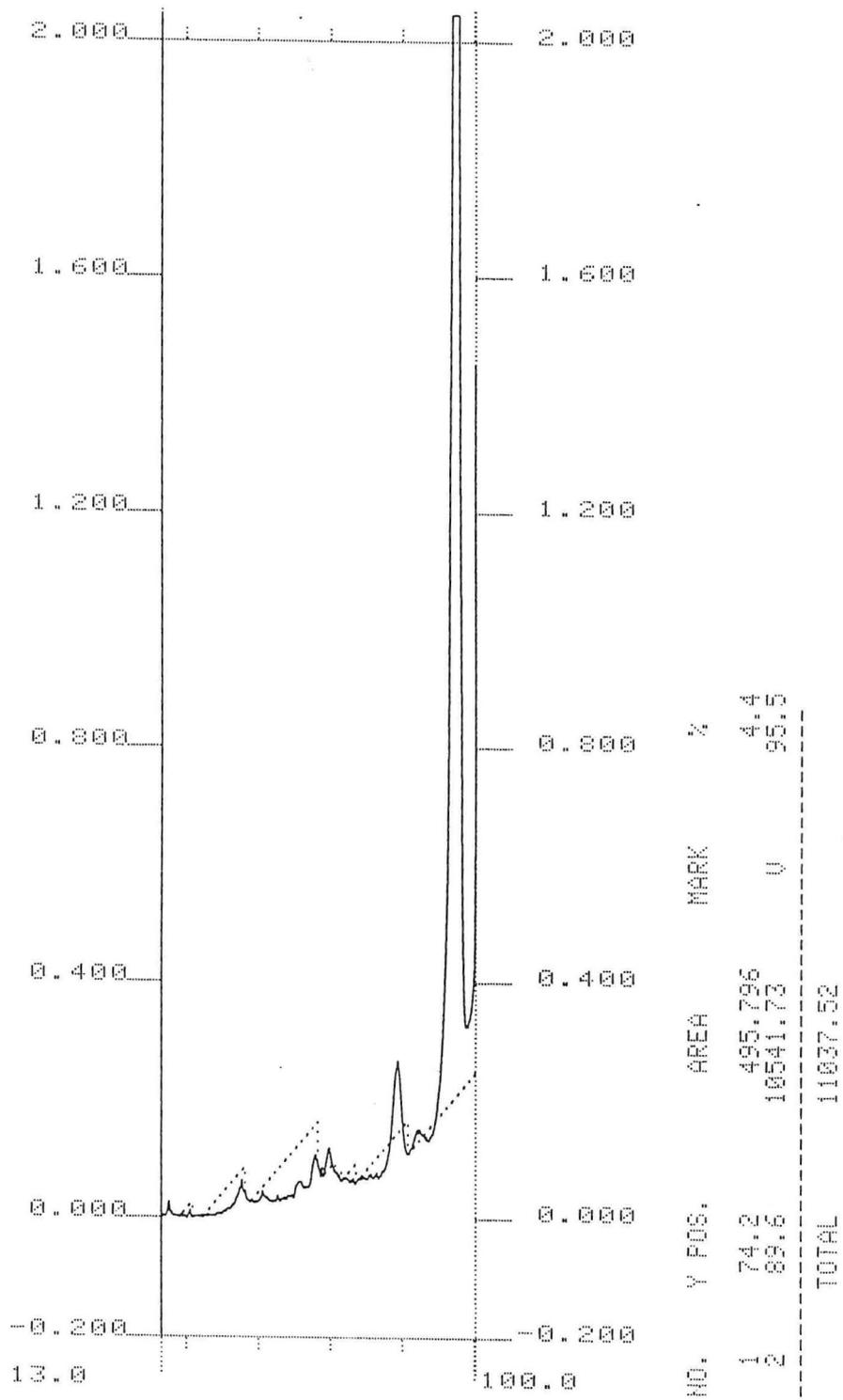
Les nombres impairs correspondent à des croisement "W ilt sensibles"

FIGURE 2



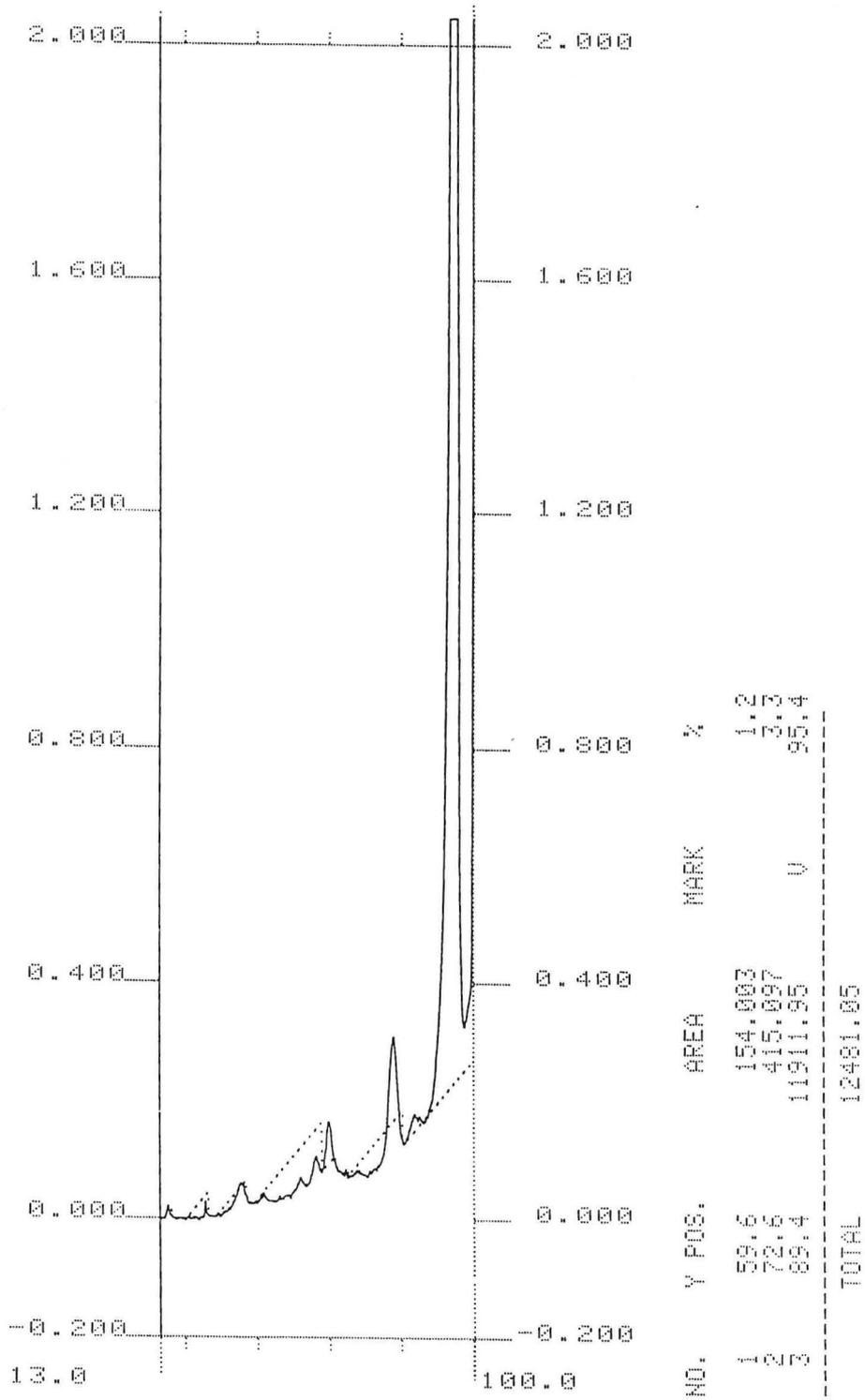
Lecture densitométrique à 370 nm spot 1

FIGURE 3



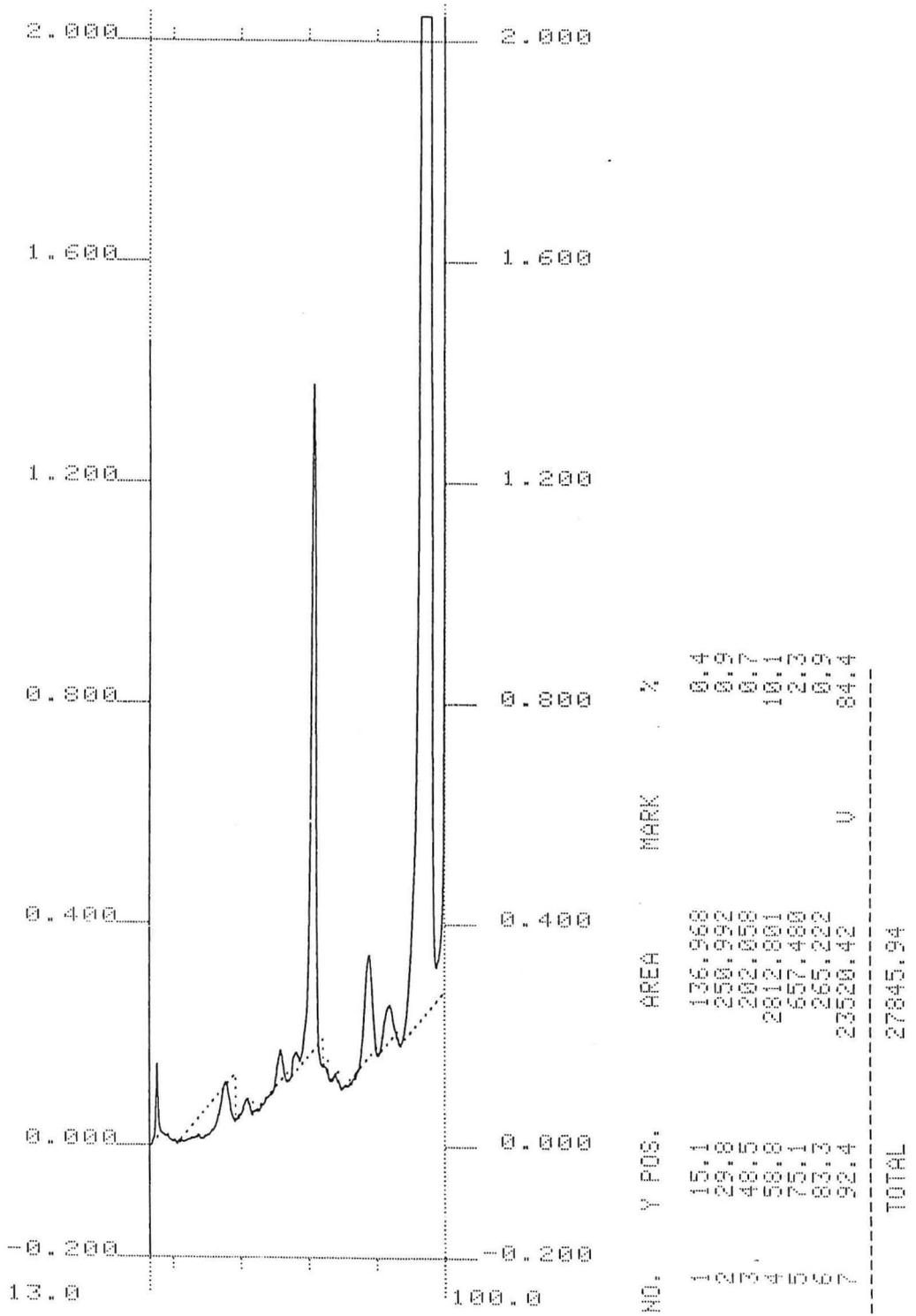
Lecture densitométrique à 370 nm spot 3

FIGURE 4



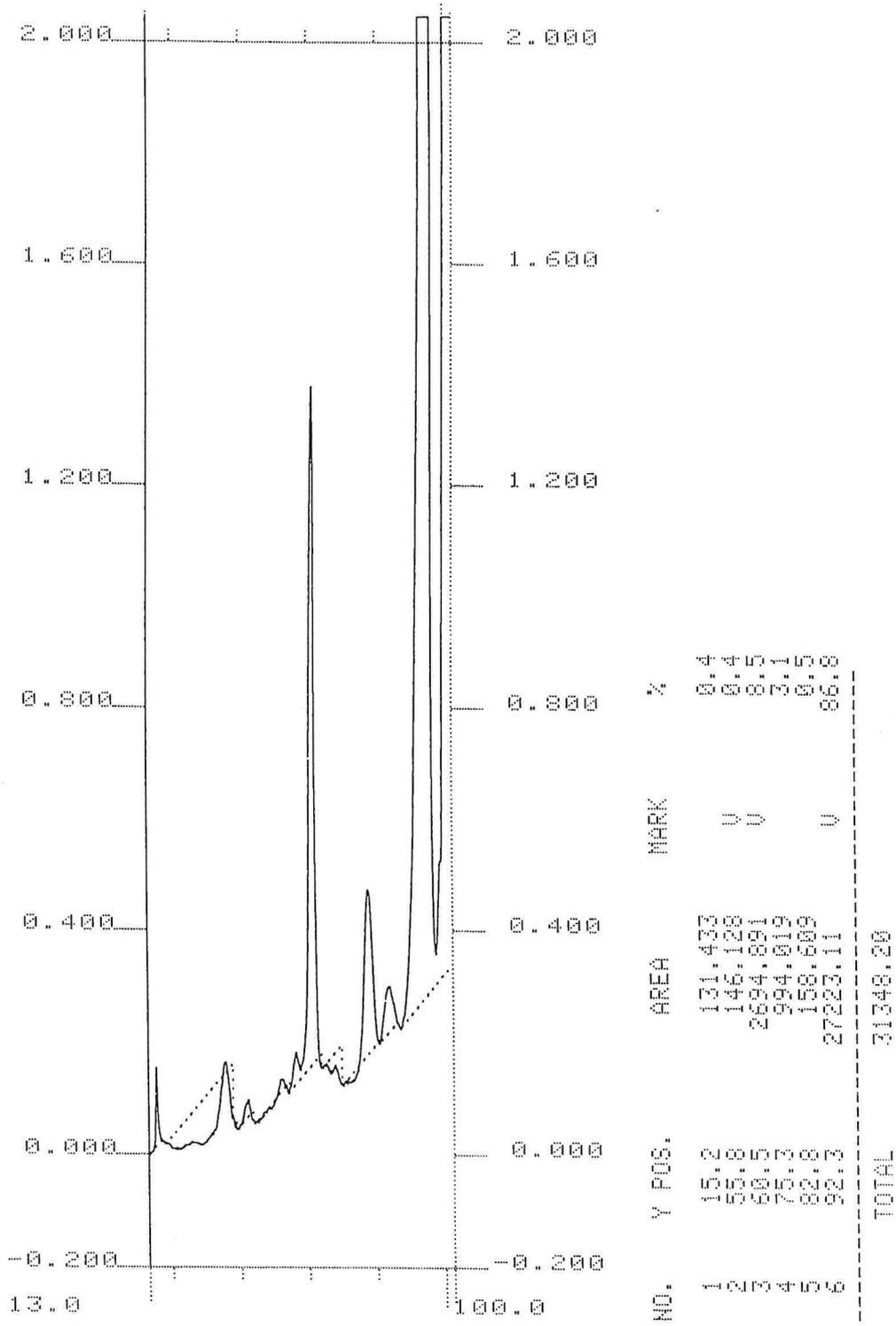
Lecture densitométrique à 370 nm spot 5

FIGURE 5



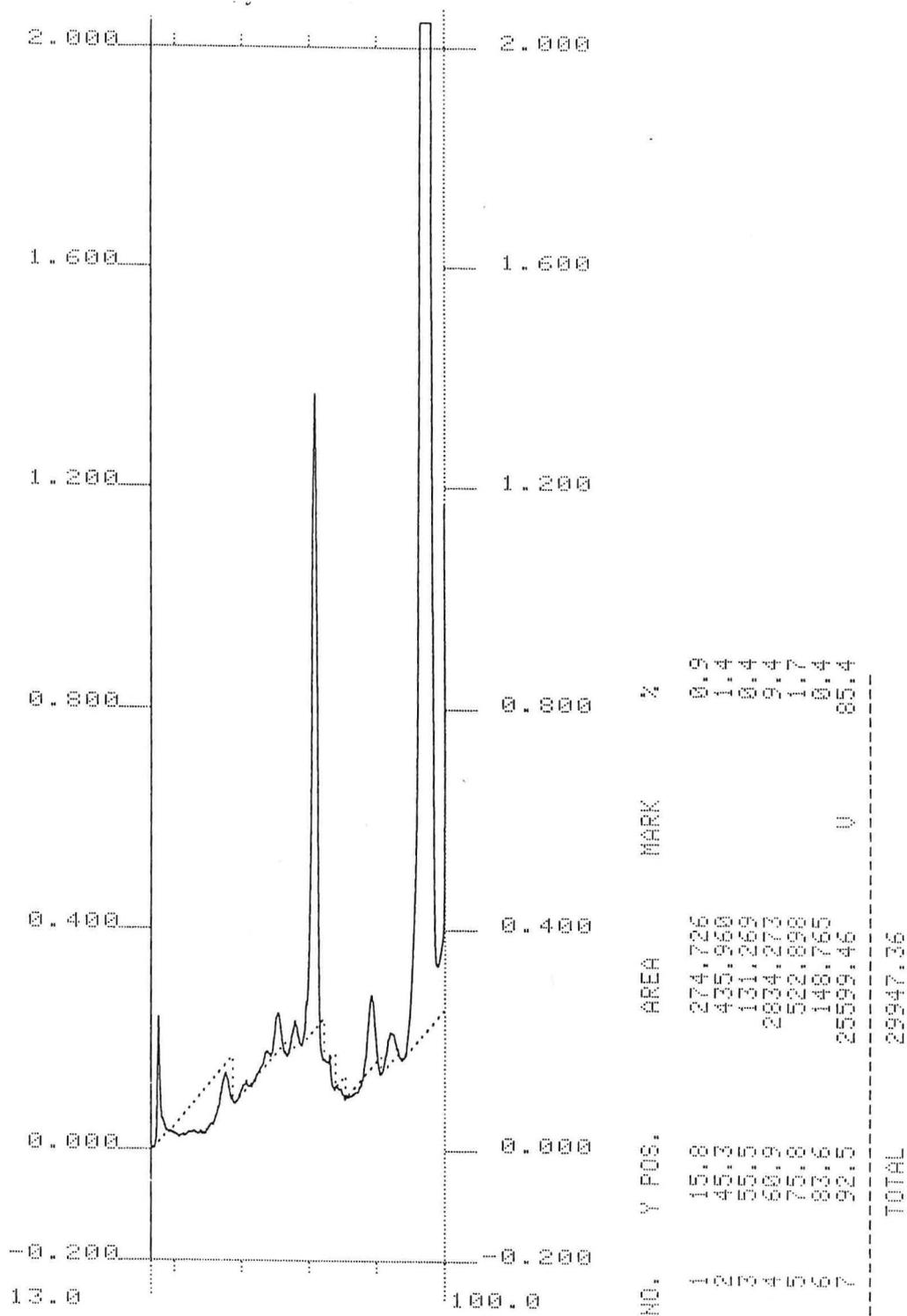
Lecture densitométrique à 370 nm spot 2

FIGURE 6



Lecture densitométrique à 370 nm spot 4

FIGURE 7



Lecture densitométrique à 370 nm spot 6

ANNEXE IV

DEFENCE REACTION MECHANISMS ON OIL PALM  
WITH RESPECT TO *FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. ELAEIDIS*  
BIOCHEMICAL ANALYSIS PROJECT 7.3 § 7.4

PROGRESS REPORT FOR THE PERIOD OF  
AUGUST 1991 - JANUARY 1992

## ANNEXE IV

DEFENCE REACTION MECHANISMS ON OIL PALM WITH RESPECT TO FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. ELAEIDS. BIOCHEMICAL ANALYSIS PROJECT 7.3 \$ 7.4.

### PROGRESS REPORT FOR THE PERIOD OF AUGUST 1991 - JANUARY 1992.

#### SUMMARY

During the period covered by this report, new sets of oil palm seeds were planted, in the nursery, for further inoculation and enzyme activity studies.

The pectolytic and cellulolytic enzymes produced in vivo within the infected oil palm (host) root tissues and in vitro in culture medium by the FOE (Pathogen) are being characterized. Characterization is aimed at determining the origin of the increased enzymic activities detected within the infected palm tissues.

The data contained in the last report submitted to you in Montpellier are being statistically analysed.

#### 2.1 PLANTING MATERIALS

A total number of 1500 oil palm seedlings have been planted. This number comprised of 500 seedlings each from the previously stated wilt-susceptible and wilt-tolerant NIFOR progenies and 500 seedlings from a wilt-tolerant progeny (D 115 D x L 2T) collected from Mr. DeFranqueville in Dabou (Cote D'Ivoire) last August. Unfortunately, the wilt-susceptible seeds from L 430 T x L 404 D crossed also collected from Mr. DeFranqueville failed to germinate after our routine heat treatment.

I have communicated this problem to Mr. DeFranqueville and requested for a possible replacement of the seeds (see attached letter to Mr. DeFranqueville).

The seedlings were planted on 4.12.91 and will be due for inoculation on 3.02.92. For the inoculation, the inoculum density, of the pathogen and the inoculation technique to be employed have been mutually decided between Mr. DeFranqueville and myself in Dabou.

## 2.2 ENZYME CHARACTERIAZATION

Characterization of the in vivo and in vitro enzymes involved in the wilt disease is in progress. Characterization involves the determination of optimum PH, optimum temperature for the enzyme activities, molecular weights etc. The data will be supplied in the next progress report. The serological studies has not yet commenced and reports on it will be brought to you in the subsequent report.

## 2.3 FRACTION COLLECTOR

I am happy to inform you that the Fraction Collector has now been collected, after a series of efforts. I collected the equipment on Friday 24.01.92 in Lagos. The clearing fee amounted to N3,577 (three thousand, five hundred and seventy seven naira only). The equipment is now being installed in our laboratory.

DR. I. J. OSAGIE.

(SCIENTIST IN-CHARGE OF PROJECT)

**RAPPORT SEMESTRIEL (août 1991 - février 1992)**

**ANNEXE V**

**LABORATOIRE de PHYTOPATHOLOGIE du CENTRE  
ORSTOM de MONTPELLIER**

**CONTRAT DE RECHERCHES C.E.E. (STD 2)  
FUSARIOSE/PALMIER A HUILE**

**RAPPORT SCIENTIFIQUE**

Durant le semestre écoulé, les recherches ont porté essentiellement sur la variabilité du pouvoir pathogène et sur la compatibilité végétative. Les études concernant les relations hôte-parasite ont été momentanément interrompues.

## I - VARIABILITE du POUVOIR PATHOGENE

Dans les deux rapports précédents, il a été fait référence à la mise en place, puis au dépouillement d'un essai d'inoculation mettant en oeuvre environ 500 vitro-plants de palmiers destiné à tester l'influence de l'âge des cultures et du bouturage répété d'une culture sur l'agressivité des clones 6, 13 et 16 du *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis*. A partir de l'examen des symptômes externes, des symptômes internes et de l'isolement (ou non) du parasite dans le bulbe, les plants inoculés ont été répartis en deux catégories : sains et fusariés. Quelques plants sont morts suite au repiquage effectué après le sevrage. La répartition des plants dans les catégories : morts, fusariés et sains en fin d'essai, 8 semaines après l'inoculation est donnée dans le tableau 1.

L'analyse statistique traite d'abord des plants morts en posant comme hypothèse que leur pourcentage est le même dans toutes les conditions y compris le témoin. L'analyse de variance après transformation des pourcentages de plants morts en  $2 \text{ Arc sin } \sqrt{\%}$  montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les pourcentages ; la mortalité ne semble donc pas liée à l'inoculation. En conséquence, dans la suite de l'analyse sont pris en compte seulement les plants survivants en fin d'expérience, qui sont classés en sains et fusariés ; comme précédemment, l'interprétation statistique est réalisée par une analyse de variance après transformation des pourcentages de plants fusariés (en  $2 \text{ Arc sin } \sqrt{\%}$ ). Les résultats présentés dans le tableau 1 montrent que le risque est très supérieur au seuil de 5 % que nous nous sommes fixé ; en conséquence, les pourcentages de plants fusariés sont homogènes dans l'ensemble de l'expérimentation.

Cela signifie en définitive que le pouvoir pathogène des souches inoculées aux différents lots de plantes est constant.

Les conclusions détaillées que l'on peut tirer de cette expérience sont donc les suivantes :

- 1 - Les isolats 16 F, 104 et 146 provenant de Côte d'Ivoire ont le même pouvoir pathogène.
- 2 - Les clones 6, 13 et 16 obtenus par isolement monospore à partir des isolats 16 F, 104 et 146 respectivement, ont le même pouvoir pathogène que les isolats dont ils proviennent.
- 3 - Ces clones gardent leur pouvoir pathogène lorsqu'ils sont conservés à 25° C en culture en tube de 10 à 229 jours pour 6 et 13, de 60 à 200 jours pour 16 ou lorsqu'ils sont repiqués toutes les semaines en tube pendant 32 semaines pour 6 et 13, pendant 11 semaines pour 16.

Dans les limites de l'expérience, il semble que l'on puisse conclure à la stabilité du pouvoir pathogène au cours du vieillissement des clones du *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* ou après un grand nombre de repiquages successifs. Ces résultats sont très différents de ceux obtenus avec le *Verticillium dahliae*, où, dans les mêmes conditions, le pouvoir pathogène s'était révélé très variable.

TABLEAU 1 : Influence du vieillissement et de la méthode de conservation sur le pouvoir pathogène des clones 6, 13 et 16<sup>(1)</sup> du *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* (2ème essai)

| Souche inoculée      | Nombre de plants inoculés | Nombre de blocs | Nombre de plants morts <sup>(2)</sup> | Nombre de plants sains <sup>(2)</sup> | Nombre de plants fusariés <sup>(2)</sup> |
|----------------------|---------------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 16F <sup>(1)</sup>   | 20                        | 2               | 3                                     | 5                                     | 12                                       |
| 104                  | 20                        | 2               | 1                                     | 7                                     | 12                                       |
| 146                  | 20                        | 2               | 2                                     | 5                                     | 13                                       |
| 6.1 <sup>5(3)</sup>  | 20                        | 2               | 1                                     | 2                                     | 17                                       |
| 6.1 <sup>10</sup>    | 15                        | 2               | 0                                     | 1                                     | 14                                       |
| 6.1 <sup>15</sup>    | 20                        | 2               | 0                                     | 5                                     | 15                                       |
| 6.1 <sup>32</sup>    | 20                        | 2               | 1                                     | 2                                     | 17                                       |
| 13.1 <sup>5(3)</sup> | 20                        | 2               | 1                                     | 3                                     | 16                                       |
| 13.1 <sup>10</sup>   | 20                        | 2               | 1                                     | 4                                     | 15                                       |
| 13.1 <sup>15</sup>   | 20                        | 2               | 2                                     | 5                                     | 13                                       |
| 13.1 <sup>32</sup>   | 20                        | 2               | 2                                     | 1                                     | 17                                       |
| 16.1 <sup>2(3)</sup> | 15                        | 2               | 1                                     | 1                                     | 13                                       |
| 16.1 <sup>6</sup>    | 20                        | 2               | 0                                     | 8                                     | 12                                       |
| 16.1 <sup>11</sup>   | 20                        | 2               | 0                                     | 7                                     | 13                                       |
| 61 <sup>(4)</sup>    | 20                        | 2               | 1                                     | 4                                     | 15                                       |
| 65                   | 20                        | 2               | 0                                     | 6                                     | 14                                       |
| 614                  | 20                        | 2               | 1                                     | 6                                     | 13                                       |
| 137 <sup>(4)</sup>   | 20                        | 2               | 0                                     | 3                                     | 17                                       |
| 1314                 | 20                        | 2               | 0                                     | 6                                     | 14                                       |
| 161 <sup>(4)</sup>   | 20                        | 2               | 0                                     | 7                                     | 13                                       |
| 166                  | 20                        | 2               | 0                                     | 5                                     | 15                                       |
| 1611                 | 20                        | 2               | 0                                     | 4                                     | 16                                       |
| Témoin               | 10                        | 1               | 0                                     | 10                                    | 0  |

(1) 16F : isolat venant d'un palmier fusarié en Côte d'Ivoire utilisé en routine à la station IRHO de DABOU (Côte d'Ivoire) pour tester la sensibilité des palmiers

104 : isolat provenant d'un jeune palmier inoculé avec l'isolat 16 F

146 : isolat provenant du bulbe d'un palmier adulte fusarié récolté en Côte d'Ivoire.

Les clones 6, 13 et 16 proviennent par culture monospore respectivement des isolats 16F, 104 et 146

(2) Evaluation faite 61 jours après inoculation

(3) Cultures jumelles 6.1 et 13.1 repiquées toutes les semaines, pendant 5 semaines (6.1<sup>5</sup> et 13.1<sup>5</sup>), 10 semaines (6.1<sup>10</sup> et 13.1<sup>10</sup>), 15 semaines (6.1<sup>15</sup> et 13.1<sup>15</sup>) et 32 semaines (6.1<sup>32</sup> et 13.1<sup>32</sup>) - cultures du clone 16.1 repiquées toutes les semaines pendant 2 semaines (16.1<sup>2</sup>), 6 semaines (16.1<sup>6</sup>) et 11 semaines (16.1<sup>11</sup>)

(4) cultures jumelles des clones 6 et 13 réalisées après 10 jours de cultures en boîte de Petri (61, 131 et 161), puis ultérieurement conservées 65 j et 228 j pour le clone 6, (6.5 et 6.14) 92 j et 229 j pour le clone 13 (13.7 et 13.14) - cultures jumelles du clone 16 conservées pendant 60 j (161), 132 j (16.6) et 200 j (16.11)

TABLEAU 1 (suite)

**Analyse de la variance** : (après transformation des pourcentages de plants fusariés par le facteur  $2 \text{ Arc sin } \sqrt{\%}$ )

| Source de variation | SCE     | DDL | CM      | F    | Alpha  |
|---------------------|---------|-----|---------|------|--------|
| Totale              | 5,53194 | 43  |         |      |        |
| Facteur TRAI        | 2,00090 | 21  | 0,09528 | 0,59 | 0,8815 |
| Résiduelle          | 3,53104 | 22  | 0,16050 |      |        |

Un autre essai, moins complet car réalisé plus tôt, avait été mis en place précédemment. Le nombre de plants morts suite au repiquage était nettement plus élevé (tableau 2). Les interprétations faites de la même manière que précédemment aboutissent au même résultat : il n'apparaît pas de différence dans le pouvoir pathogène des souches inoculées. On conclut donc encore une fois à la stabilité du pouvoir pathogène des clones.

Un autre type d'essai a porté sur la comparaison du pouvoir pathogène de sous-clones obtenus par isolement monospore à partir d'une culture jumelle du clone 6 âgée de 228 jours (6.14). Les résultats sont consignés dans le tableau 3.

L'interprétation statistique montre que le nombre de morts dans chaque condition n'est pas lié au traitement et que le pourcentage de palmiers fusariés par rapport aux palmiers survivants en fin d'essai est homogène dans toutes les conditions. Ceci montre que les 10 sous-clones testés ont le même pouvoir pathogène et, qu'en outre, celui-ci est identique à celui de la culture mère âgée de 229 jours d'où proviennent les sous-clones.

L'étude de la variabilité du pouvoir pathogène dans la descendance par microconidies de cultures âgées des clones 13 et 16 est actuellement en cours. Avec cet essai devrait se terminer l'étude de la variabilité intraclonale du pouvoir pathogène chez le *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis*.

TABLEAU 2 : Influence du vieillissement et de la méthode de conservation sur le pouvoir pathogène des clones 6 et 13<sup>(1)</sup> du *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* (1er essai)

| Traitements          | Nombre de plants | Nombre de blocs | Nombre de plants morts <sup>(2)</sup> | Nombre de plants sains <sup>(2)</sup> | Nombre de plants fusariés <sup>(2)</sup> |
|----------------------|------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 16F <sup>(1)</sup>   | 20               | 2               | 6                                     | 7                                     | 7  |
| 104 <sup>(1)</sup>   | 20               | 2               | 14                                    | 1                                     | 5  |
| 6.1 <sup>5(3)</sup>  | 20               | 2               | 14                                    | 3                                     | 3  |
| 6.1 <sup>10</sup>    | 20               | 2               | 13                                    | 4                                     | 3  |
| 13.1 <sup>5(3)</sup> | 20               | 2               | 9                                     | 7                                     | 4  |
| 13.1 <sup>10</sup>   | 20               | 2               | 9                                     | 3                                     | 8  |
| 6.1 <sup>(4)</sup>   | 20               | 2               | 15                                    | 2                                     | 3  |
| 6.6                  | 20               | 2               | 11                                    | 2                                     | 7  |
| 13.1 <sup>(4)</sup>  | 20               | 2               | 14                                    | 4                                     | 2  |
| 13.6                 | 20               | 2               | 10                                    | 2                                     | 8  |
| Témoins              | 20               | 2               | 7                                     | 11                                    | 2  |

**Analyse de la variance** : (après transformation des pourcentages de plants fusariés par le facteur  $2 \text{ Arc sin } \sqrt{\%}$ )

| Source de variation | SCF     | DDL | F    | ALPHA  |
|---------------------|---------|-----|------|--------|
| Totale              | 7,85402 | 19  |      |        |
| Facteur TRAI        | 2,77311 | 9   | 0,61 | 0,7677 |
| Résiduelle          | 5,08091 | 10  |      |        |

- (1) 16F : isolat venant d'un palmier fusarié en Côte d'Ivoire utilisé en routine à la station IRHO de DABOU (Côte d'Ivoire) pour tester la sensibilité des palmiers  
104 : isolat provenant d'un jeune palmier inoculé avec l'isolat 16 F  
Les clones 6 et 13 proviennent par culture monospore respectivement des isolats 16F et 104.

(2) Evaluation faite 107 jours après inoculation

(3) Cultures jumelles 61 et 131 repiquées toutes les semaines, pendant 5 semaines (6.1<sup>5</sup> et 13.1<sup>5</sup>) et 10 semaines (6.1<sup>10</sup> et 13.1<sup>10</sup>)

(4) Cultures jumelles des clones 6 et 13 réalisées après 10 jours de cultures en boîte de Petri (61, 131) puis ultérieurement conservées pendant 78 jours (6.6 et 13.6)

TABLEAU 3

Pouvoir pathogène des descendants par microconidies d'une culture du clone 6 âgée de 229 jours

| Traitements            | Nombre de plants | Nombre de blocs | Nombre de plants morts <sup>(1)</sup> | Nombre de plants sains <sup>(1)</sup> | Nombre de plants fusariés <sup>(1)</sup> |
|------------------------|------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| CJ 6.14 <sup>(2)</sup> | 20               | 2               | 5                                     | 5                                     | 10                                       |
| sc 6.1 <sup>(3)</sup>  | 20               | 2               | 4                                     | 7                                     | 9  |
| sc 6.2                 | 20               | 2               | 4                                     | 12                                    | 4  |
| sc 6.3                 | 20               | 2               | 3                                     | 10                                    | 7  |
| sc 6.4                 | 20               | 2               | 4                                     | 13                                    | 3  |
| sc 6.5                 | 20               | 2               | 5                                     | 7                                     | 8  |
| sc 6.6                 | 20               | 2               | 4                                     | 6                                     | 10                                       |
| sc 6.7                 | 20               | 2               | 8                                     | 7                                     | 5  |
| sc 6.8                 | 20               | 2               | 8                                     | 9                                     | 3  |
| sc 6.9                 | 20               | 2               | 3                                     | 10                                    | 7  |
| sc 6.10                | 20               | 2               | 2                                     | 14                                    | 4  |
| Témoin                 | 20               | 2               | 3                                     | 17                                    | 0  |

**Analyse de la variance :** (après transformation des pourcentages de plants fusariés par le facteur  $2 \text{ Arc sin } \sqrt{\%}$ )

| Source de variation | SCE     | DDL | CM      | F    | Alpha  |
|---------------------|---------|-----|---------|------|--------|
| Totale              | 4,54556 | 21  |         |      |        |
| Facteur TRAI        | 2,64482 | 10  | 0,26448 | 1,53 | 0,2475 |
| Résiduelle          | 1,90074 | 11  | 0,17279 |      |        |

(1) Evaluation faite 72 jours après inoculation

(2) CJ 6.14 : culture jumelle du clone 6 âgée de 14 jours - Morphotype duveteux

(3) sc 6.1, 6.2,...6.10 sous-clones obtenus par culture monospore à partir de la culture CJ 6.14 ; ils sont tous de morphotype duveteux

## II - DETERMINATION des GROUPES de COMPATIBILITE VEGETATIVE dans la COLLECTION d'ISOLATS de *F. OXYSPORUM* f. sp. *ELAEIDIS*

Les objectifs de cette étude et la technique utilisée ont été décrits dans le rapport précédent. Nous nous limiterons donc à décrire avec précision quels sont les groupes de compatibilité (GCV) que nous avons déterminés à l'heure actuelle.

Précisons que ces groupes ont été identifiés avec un clone issu d'isolement monospore représentatif de chaque isolat.

GCV 1 - regroupe des isolats d'origine africaine (Bénin, Côte d'Ivoire) et d'origine sud-américaine (Brésil, Equateur).

Bénin - P16.18 - palmier fusarié  
P32.22b - base du stipe d'un palmier fusarié  
P32.22m - milieu du stipe du même palmier fusarié que ci-dessus

Côte d'Ivoire - 16 F - isolement monospore - palmier fusarié : plusieurs souches ont été obtenues à partir de jeunes palmiers fusariés suite à l'inoculation de 16 F ; elles sont toujours compatibles avec 16 F et donc rangées dans le GCV 1  
146 - palmier fusarié en Côte d'Ivoire

Brésil - 6F, 7F, 66, 91, 12.15 et 13.17, 9.26 - isolats de palmiers fusariés

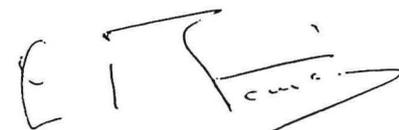
Equateur - 10 F et 11 F - isolats de palmiers fusariés

GCV 2 - 3 isolats du Ghana :  
G12 : isolat provenant du milieu d'un stipe de palmier fusarié - KUSI  
G20 : palmier à huile fusarié - KWAE  
G31 : palmier à huile fusarié - PRETSEA

GCV 3 - 1 isolat du Ghana : G13, provenant de la base du stipe du même palmier fusarié duquel est issu G12

GCV 4 - 1 isolat du Zaïre ZA 150  
GCV 5 - 1 isolat du Cameroun MCA 143  
GCV 6 - 1 isolat du Nigeria N1

GCV 7 - 1 isolat de *F. oxysporum* issu de la rhizosphère d'un palmier fusarié en Côte d'Ivoire



C. BOISSON  
15 janvier 1992

REPORT ON RESISTANCE MECHANISMS  
INVOLVED IN FUSARIUM WILT  
OF OIL PALM

ANNEXE VI

J FLOOD & T PAUL

(December 1991).

A Comparative investigation of wilt susceptible (WS) and wilt resistant (WR) material inoculated with fungal isolates from different regions

Introduction

It has been previously demonstrated at Bath that differential responses occur between oil palm and fungal isolates from different countries/regions (Flood *et al* 1991 and unpublished results). The EC project has extended these experiments to include six oil palm lines inoculated with seven fungal isolates from Brazil, West Africa and Malaysia.

Experimental

Clonal plantlets were supplied by Unifield T C Ltd. Cambridge Road, Bedford. The plantlets were hardened off in propagators by gradually reducing the humidity over a period of 2 months. After which they were individually potted into black polyethylene bags (80mm x 190mm) and left for one month before inoculation.

Pre-heat treated seeds were supplied by the Joint Research Scheme, Binga, Zaire. Germinated seeds were transferred to plastic seed trays containing Fisons F<sub>2</sub> compost: Fisons M2 compost:perlite and maintained in a heated greenhouse until the 1-2 leaf stage when they were transferred into individual polyethylene bags (as above). The seedlings were inoculated when at the 3 leaf stage.

In total, 2 clonal lines and four seedling crosses were used in the study and were chosen to represent a range of resistance/ susceptibility.

Seven fungal isolates (Table 1) were used in the investigation. For inoculation, fungal isolates from soil culture were grown on PDA for 2 days and then five mycelial plugs (8 mm diameter) were added to 100 ml of sucrose-salts medium (Cooper & Wood, 1975).

Table 1 Details of Isolates

| ISOLATE        | IDENTITY AND ORIGIN   |
|----------------|---|
| F <sub>3</sub> | <i>F.oxysporum</i> f.sp <i>elaeidis</i> ; diseased palm; Binga, Zaire     |
| Y <sub>1</sub> | <i>F.oxysporum</i> f.sp <i>elaeidis</i> ; diseased palm; Yaligimba, Zaire |
| BOs            | <i>F.oxysporum</i> ; soil; Bosonjo, Zaire                                 |
| R <sub>1</sub> | <i>F.oxysporum</i> var <i>redolens</i> ; diseased palm; Yaligimba, Zaire  |
| CAM            | <i>F.oxysporum</i> ; soil; Ndian Estate, Cameroon                         |
| LEY            | <i>F.oxysporum</i> ; soil; Layang-Layang, Malaysia                        |
| 1379           | <i>F.oxysporum</i> f.sp <i>elaeidis</i> ; diseased palm; Denpasar, Brazil |

The cultures were maintained for 5 days at 100 rpm and 28<sup>0</sup>C and then filtered to remove mycelial aggregates. The resulting spore suspension was adjusted to 3.3 x 10<sup>7</sup> spores ml<sup>-1</sup> and 10 ml of this suspension was applied to the soil at the base of sixteen replicate plants. Controls received 10 ml of similarly diluted sucrose-salts medium. The plants were not disturbed nor was the root system deliberately wounded. The plants were maintained in a heated greenhouse at 28<sup>0</sup>C and 70 - 90% RH for 7 months.

Height (of youngest fully expanded leaf) and wilt index was assessed every month. The wilt index (0-5) was used to express severity of disease (Flood *et al*, 1989). At the end of the experiment, final height

(Table 2) and final wilt index (Table 3) were recorded. The plants were split longitudinally to assess percentage vascular discoloration of the "bulb" tissue (Table 4). Reisolation of the fungus on *Fusarium* selective media (Papavizas, 1961) was also attempted (Table 5).

Table 2: Final height of inoculated palms.

| ISOLATES       | OIL PALM LINE |               |               |              |               |               |
|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
|                | WS<br>CLONE 1 | WR<br>CLONE 2 | WS<br>CROSS 1 | WST<br>CROSS | WR<br>CROSS 1 | WR<br>CROSS 2 |
| LEY            |               | 91.0 (a)      | 112.8(a)      |              | 117.0(ab)     | 117.3(a)      |
| CAM            | 94.4(a)       | 113.7(a)      | 104.4(a)      | 114.3(ab)    | 125.0(a)      | 105.0(a)      |
| BOS            |               | 101.4(a)      | 87.3(ab)      |              | 105.9(ab)     | 104.8(a)      |
| Y1             | 57.6(b)       | 98.8(a)       | 65.0(bc)      | 105.9(ab)    | 109.3(ab)     | 79.1(b)       |
| R1             | 59.5(b)       | 100.0(a)      | 61.6(bc)      | 93.6(b)      | 105.9(ab)     | 88.1(ab)      |
| F <sub>3</sub> | 61.1(b)       | 93.7(a)       | 67.6(bc)      | 112.3(ab)    | 96.4(bc)      | 86.4(b)       |
| 1379           | 46.3(b)       | 89.7(a)       | 56.4(c)       | 70.2(c)      | 72.4(c)       | 75.1(b)       |
| CONTROL        | 89.4(a)       | 104.5(a)      | 100.1(a)      | 121.7(a)     | 121.3(ab)     | 103.4(ab)     |

Values represent a mean of 16 replicates

Within each column, values with the same letter are nsd ( $p > 0.05$ ) using Kruskal Wallis and repeated U-tests.

Table 3: Final wilt index of inoculated palms

| ISOLATES       | OIL PALM LINE |               |               |              |               |               |
|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
|                | WS<br>CLONE 1 | WR<br>CLONE 2 | WS<br>CROSS 1 | WST<br>CROSS | WR<br>CROSS 1 | WR<br>CROSS 2 |
| LEY            |               | 0 (a)         | 0 (a)         |              | 0 (a)         | 0 (a)         |
| CAM            | 0 (a)         | 0 (a)         | 0 (a)         | 0 (a)        | 0.1(a)        | 0 (a)         |
| BOS            |               | 0 (a)         | 0.4(a)        |              | 0 (a)         | 0.3(a)        |
| Y1             | 0.6(a)        | 0 (a)         | 1.4(ab)       | 0.18(a)      | 0.2(a)        | 1.4(b)        |
| R1             | 0.6(a)        | 0 (a)         | 2.0(b)        | 0.87(b)      | 0 (a)         | 0.8(ab)       |
| F <sub>3</sub> | 0.9(ab)       | 0 (a)         | 1.9(b)        | 0.18(a)      | 0.7(a)        | 1.1(ab)       |
| 1379           | 1.9(b)        | 0 (a)         | 2.7(b)        | 2.1(c)       | 0.9(a)        | 1.9(b)        |
| CONTROL        | 0 (a)         | 0 (a)         | 0 (a)         | 0 (a)        | 0 (a)         | 0 (a)         |

Values represent a mean of 16 replicates

Wilt index based on disease score 0 - no symptoms; 1 - slight necrosis/chlorosis; 2 - necrosis/chlorosis over one quarter of plant and some shortening of leaves; 3 - several necrosis/chlorosis over one half of plant and many young leaves are stunted; 4 - several necrosis/chlorosis over three quarters of the plant and extensive stunting ; 5 - plant death. (Flood et al 1989).

Within the same column, values with the same letter are nsd ( $p > 0.05$ ) using Kruskal Wallis and repeated U tests.

Table 4 Percentage vascular necrosis in bulb tissue of infected palms

| ISOLATES       | OIL PALM TISSUE |               |               |              |               |               |
|----------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
|                | WS<br>CLONE 1   | WR<br>CLONE 2 | WS<br>CROSS 1 | WST<br>CROSS | WR<br>CROSS 1 | WR<br>CROSS 2 |
| LEY            |                 | 0 (a)         | 1.2(a)        |              | 0 (a)         | 0 (a)         |
| CAM            | 4.9(a)          | 0 (a)         | 10.5(a)       | 0 (a)        | 0 (a)         | 0 (a)         |
| BOS            |                 | 1.3(a)        | 34.2(ab)      |              | 13.0(ab)      | 9.5(ab)       |
| Y1             | 39.7(b)         | 8.7(a)        | 53.9(bc)      | 3.1(a)       | 5.9(a)        | 53.2(c)       |
| R1             | 39.3(b)         | 3.2(a)        | 58.9(bc)      | 19.7(a)      | 5.9(a)        | 28.1(abc)     |
| F <sub>3</sub> | 42.8(b)         | 14.7(a)       | 63.1(bc)      | 18.4(a)      | 32.8(bc)      | 36.7(bc)      |
| 1379           | 67.9(b)         | 12.3(a)       | 78.4(c)       | 50.8(b)      | 43.7(c)       | 56.2(c)       |
| CONTROL        | 0(a)            | 0(a)          | 0(a)          | 0(a)         | 0 (a)         | 0 (a)         |

Values represent a mean of 16 replicates

Within each column, values with the same letter are nsd ( $p > 0.05$ ) using Kruskal Wallis and repeated U tests.

Table 5 Reisolation of F. oxysporum from infected bulb tissue

| ISOLATES       | OIL PALM LINE |               |               |              |               |               |
|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
|                | WS<br>CLONE 1 | WR<br>CLONE 2 | WS<br>CROSS 1 | WST<br>CROSS | WR<br>CROSS 1 | WR<br>CROSS 2 |
| LEY            |               | 0:16(a)       | 1:15(a)       |              | 2:14(a)       | 2:14(ab)      |
| CAM            | 8:8(a)        | 1:15(ab)      | 3:13(ab)      | 1:15(a)      | 1:15(a)       | 0:16(a)       |
| BOS            |               | 0:16(a)       | 9:7(bc)       |              | 12:4(bc)      | 6:10(bc)      |
| Y1             | 14:1(b)       | 0:16(a)       | 12:4(cd)      | 5:11(ab)     | 6:10(ab)      | 13:3(de)      |
| R1             | 12:1(b)       | 2:14(ab)      | 12:4(cd)      | 13:3(c)      | 6:10(ab)      | 8:8(bcd)      |
| F <sub>3</sub> | 11:4(ab)      | 6:10(b)       | 14:2(cd)      | 10:6(bc)     | 11:5(bc)      | 11:5(cde)     |
| 1379           | 16:0(b)       | 4:12(ab)      | 15:1(d)       | 15:1(c)      | 13:3(c)       | 14:1(e)       |

Pairs of values represent with: without fungus.

Within each column, values with the same letter are nsd ( $p = > 0.05$ ) using  $X^2$  analysis and Fisher's Exact Test.

The Malaysian isolate (LEY) and the isolate from Cameroon (CAM) did not induce significant symptoms in any oil palm line-tested (Tables 2, 3, 4) despite being reisolated from the bulb tissue (Table 5). These isolates rather than reducing growth appeared to slightly promote growth of some oil palm lines as compared to the controls although this was not significant (Table 2). Where tested, isolate Bos (Zaire) also generally failed to induce significant symptoms (Tables 2, 3, 4) although some vascular necrosis was observed in wilt susceptible cross 1 (not significant) and the fungus was able to penetrate wilt susceptible and wilt resistant seedlings (Table 5).

Wilt susceptible clone 1 was confirmed as susceptible to isolates Y<sub>1</sub>, F<sub>3</sub> and R<sub>1</sub> (Zaire) and isolate 1379 (Brazil). Plants inoculated with these isolates exhibited a 51 - 68% reduction in height (Table 2), extensive vascular browning was observed (Table 4) and the majority of inoculated plants contained the pathogen (Table 5). In comparison, with wilt resistant clone 2, no external symptoms were observed (Table 3) although some stunting was apparent with plants inoculated with isolate 1379 but even this was not significant. Slight vascular necrosis was observed (Table 4) but this also was not significantly different from the controls. Nevertheless, some inoculated plants did contain the pathogen (Table 5).

With regard to seedling crosses, wilt susceptible cross 1 exhibited severe stunting (56 - 67% reduction in height, Table 2, widespread chlorosis and necrosis (Table 3) and significant vascular browning in the bulb (Table 4) when inoculated with Y<sub>1</sub>, F<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> or 1379. Reisolation of these isolates from the majority of inoculated palms (Table 5) confirmed the susceptibility of this cross.

Wilt standard cross 1 was generally unaffected by isolates F<sub>3</sub> and Y<sub>1</sub> but R<sub>1</sub> and 1379 did significantly reduce growth (Table 2) and caused extensive chlorosis and necrosis (Table 3) and the majority of inoculated palms contained the pathogen.

Wilt resistant cross 1 was generally unaffected by isolates R<sub>1</sub> and Y<sub>1</sub>, with regard to external symptoms (Table 2, 3) and internal symptoms (Table 4) but these isolates were reisolated from the bulbs of some inoculated plants (Table 5). In comparison, isolates F<sub>3</sub> and 1379 did

significantly reduce growth (Table 2), induced vascular browning (Table 4) and could be consistently reisolated from the bulb of inoculated palms (Table 5).

Wilt resistant cross 2 was affected by isolates F<sub>3</sub>, Y<sub>1</sub> and 1379; significant chlorosis and necrosis (Table 3) occurred with Y<sub>1</sub> and 1379 while all 3 isolates induced significant vascular necrosis (Table 4) and were consistently reisolated from inoculated palms. Isolate R<sub>1</sub> did not induce many symptoms in this cross; some vascular browning was observed but this was not significant and only 50% of inoculated plants contained the fungus.

Comparative resistance <sup>of</sup> ~~in~~ all host lines inoculated with isolates Y<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>, F<sub>3</sub> and 1379 (Table 6) revealed that there were no significant differences in the resistance of any palm line when isolate F<sub>3</sub> was used but with the other 3 isolates significant differences did occur. WR clone 2 was consistently the most resistant palm line. Thus, WR clone 2 could be considered as a wilt resistant standard against which all other material could be compared. Anything significantly different from this clone was designated as susceptible while lines not significantly different from this clone were designated resistant (Table 7).

Table 6 Comparative resistance of oil palm lines to four fungal isolates.

| OIL PALM<br>LINE | ISOLATES       |                |                |          |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------|
|                  | F <sub>3</sub> | Y <sub>1</sub> | R <sub>1</sub> | 1379     |
| WS<br>CROSS 1    | 13:3 (a)       | 11:5 (a)       | 12:4 (a)       | 16:0 (a) |
| WS<br>CLONE 1    | 11:4 (a)       | 12:3 (a)       | 11:3 (a)       | 15:1 (a) |
| WST<br>CROSS     | 7:9 (a)        | 3:13 (b)       | 12:4 (a)       | 15:1 (a) |
| WR<br>CROSS 1    | 11:5 (a)       | 4:12 (b)       | 3:13 (b)       | 13:3 (a) |
| WR<br>CROSS 2    | 10:6 (a)       | 13:3 (a)       | 8:8 (ab)       | 14:1 (a) |
| WR<br>CLONE 2    | 7:9 (a)        | 3:13 (b)       | 2:14 (b)       | 5:11 (b) |

Ratios represent with : without vascular necrosis.

Within each column, values with the same letter are, nsd ( $\chi^2$  analysis and Fisher's Exact Test) ( $p > 0.05$ ).

Table 7 Comparative resistance of oil palm lines to three fungal isolates.

| OIL PALM<br>LINE | ISOLATE        |                |      |
|------------------|----------------|----------------|------|
|                  | Y <sub>1</sub> | R <sub>1</sub> | 1379 |
| WS<br>Cross 1    | S              | S              | S    |
| WS<br>Clone 1    | S              | S              | S    |
| WSt<br>Cross     | R              | S              | S    |
| WR<br>Cross 1    | R              | R              | S    |
| WR<br>Cross 2    | S              | S/R            | S    |
| WR<br>Clone 2    | R              | R              | R    |

Analysis was conducted on data from Table 6.

S indicates that ratio is significantly different from standard resistant. (WR clone 2).

R indicates that ratio is not significantly different from standard resistant (WR clone 2).

S/R indicates that ratio is only significantly different from standard resistant (WR clone 2) if a one way test is used.

Thus from table 7, all oil palm lines (with the exception of WR clone 2) would be regarded as susceptible if they were inoculated with isolate 1379 but if  $R_1$  were used to screen these oil palm lines, WR cross 1 and WR clone 2 would be considered resistant; WR cross 2 would also have some measure of resistance. The wilt standard cross, WR cross 1 and WR cross 2 would be considered resistant if isolate  $Y_1$  was used.

Conversely, the comparative aggressiveness of isolates can also be assessed (Table 8). Isolate  $F_3$  was not used in the analysis since it failed to induce significant differences in host material but  $Y_1$ ,  $R_1$  and 1379 can be compared. With the most susceptible lines (WS cross 1 and WS clone 1) and the most resistant (WR clone 2) there was not a significant difference in levels of aggressiveness of these isolates. Isolate  $R_1$  was significantly different from 1379 when WR cross 2 was inoculated and isolate  $Y_1$  was intermediate between the two but the most significant differences were demonstrated with the wilt standard cross and WR cross 1. Thus, with WR cross 1, isolate 1379 caused significantly more disease ( $p < 0.004$ ) than the Zairean isolates but this may be explained in terms of the overall greater aggressiveness of 1379. However, with the wilt standard cross, isolates  $R_1$  and 1379 produced similar levels of disease which was significantly more ( $p < 0.004$ ) than the level induced by  $Y_1$ ; in all other host material  $Y_1$  and  $R_1$  were similar in aggressiveness.

Table 8 A Comparison of aggressiveness of three fungal isolates to six oil palm lines

| OIL PALM LINE | ISOLATES       |                |         |
|---------------|----------------|----------------|---------|
|               | Y <sub>1</sub> | R <sub>1</sub> | 1379    |
| WS CROSS 1    | 11:5(a)        | 12:4(a)        | 16:0(a) |
| WS CLONE 1    | 12:3(a)        | 11:3(a)        | 15:1(a) |
| WST CROSS     | 3:13(b)        | 12:4(a)        | 15:1(a) |
| WR CROSS 1    | 4:12(b)        | 3:13(b)        | 13:3(a) |
| WR CROSS 2    | 13:3(ab)       | 8:8(b)         | 14:1(a) |
| WR CLONE 2    | 3:13(a)        | 2:14(a)        | 5:11(a) |

Ratios represent with : without vascular necrosis.

Within each row, values with the same letter are, nsd ( $X^2$  analysis and Fisher's Exact Test) ( $p > 0.05$ ).

#### Discussion

Of the seven isolates tested, LEY (Malaysia<sup>an</sup>) and CAM (Cameroon) are considered as avirulent, producing insignificant effects in inoculated plants. Isolate BOS (Zaire) induced only very few symptoms (some vascular necrosis) but was able to penetrate host material. This isolate is also considered to be avirulent. In contrast, all other isolates namely, Y<sub>1</sub>, F<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> (Zaire) and 1379 (Brazil) induced severe symptoms in oil palm. Isolate 1379 (Brazil) induced symptoms even in material considered to have some degree of resistance to Zairean isolates; only WR clone 2 was resistant to 1379.

These results confirm previous findings (Flood et al 1991 and unpublished results) that in nursery trials different responses occur between oil palm and fungal isolates from different countries/regions. Obuekwe and Osagie (1989) similarly reported differences in symptom<sup>m</sup> development in oil palm lines inoculated with isolates from Zaire, Nigeria and Cameroon and there is <sup>also</sup> evidence that pathogen variability between regions occurs in the field. Oil palm material selected for tolerance to vascular wilt in Cameroon showed wilt symptoms within three and a half years of field transplanting in Nigeria (Aderungboye, 1982). Similarly Oritsejafor (1989) reported that tolerant material imported from the Ivory Coast was very susceptible under field conditions in Nigeria and progenies selected for tolerance in Nigeria have proved susceptible when planted in the Ivory Coast (Renard, 1991 pers.comm).

Breeding for resistance is the only practical, long-term method of control for vascular wilt of oil palm and screening for resistance at the nursery or pre-nursery stage using selected isolates is an integral part of any breeding programme. A selected isolate should clearly distinguish between wilt susceptible and wilt resistant material; F<sub>3</sub> did not clearly do this in the current study. Also, the isolate used should be sufficiently aggressive to cause clear rapid, symptom development.

In this study, the response of most host lines to most isolates was consistent with the results of Meunier et al 1979; de Franqueville, 1989 and Obuekwe and Osagie, 1989. Thus the degree of aggressiveness can vary but the degree of virulence remains the same. However, there were exceptions to these general conclusions ie there was some evidence that a genetic interaction occurred between some isolates and palm lines. An

interaction occurs when one cross susceptible to one strain is resistant to the other strain. Here, the wilt standard cross would appear to be susceptible to isolate  $R_1$  but resistant to isolate  $Y_1$ . However, much more work is needed to confirm this - in particular the experiments needed to be repeated using a higher number of replicates. Also, the experiments need to be extended so that many more isolates of similar levels of aggressiveness are used to challenge a wide range of oil palm material so that any differences in virulence can be detected.

These trials have the advantage of being conducted under standard conditions of temperature and humidity and of inoculum dose to challenge the palms. Also many isolates from several countries can be compared without the risk of introducing a more aggressive isolate into a country where oil palm is grown. Further trials are in progress - isolates from Zaire, Ivory Coast, Nigeria, Brazil and Ecuador are being tested on a range of oil palm progenies. These studies should also give further information concerning genetic interactions between isolates and oil palm lines which would be useful for international breeding programmes. Also, studies of isolate/cross interactions may lead to a fuller understanding of the genetics of host-resistance in this crop; identification of virulence genes, and hence the identification of corresponding resistance genes and how they are inherited should allow more logical breeding programmes to be developed.

In addition, the present studies have also allowed the identification of extremes of wilt susceptibility/resistance and virulent isolates which can now be used to develop techniques to investigate the underlying resistance mechanisms involved in this complex host-pathogen interaction.

REFERENCES

- ADERUNGBOYE, F.O. (1982). Significance of vascular wilt in oil palm plantations in Nigeria. In The Oil Palm in Agriculture in the Eighties Vol.II (ed. E. Pushparajah and Chew Poh Soon) P.481. Kuala Lumpur Incorporated Society of Planters.
- COOPER, R. M. & WOOD, R. K. S. (1975). Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Physiological Plant Pathology 5, 135 - 156.
- FLOOD, J., COOPER, R. M. & LEES, P. E. (1989). An investigation of pathogenicity of four isolates of *Fusarium oxysporum* from South America, Africa and Malaysia to clonal oil palm. Journal of Phytopathology 124, 80-88.
- de FRANQUEVILLE, H. (1989). Former savannah or former forest: effect of pathogen isolates on the performance of oil palm families with respect to *Fusarium* wilt. International Conference on Palms and Palm products. Nigeria November 1989.
- MEUNIER, J., RENARD, J. L. & QUILLEC, G. (1979). Heredity of resistance to *Fusarium* wilt in the oil palm *Elaeisguineensis* Jacq. Oleagineux 34, 560-61.
- FLOOD, J., MEPSTED, R., VELEZ, A., PAUL, T. & COOPER R. M. (1991) Comparison of virulence of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp *elaeidis* from Africa and South America. Plant Pathology (in press).
- OBUEKWE, C. O. & OSAGIE, I. J. (1989). Morphological changes in infected wilt-resistant and wilt-susceptible oil palm progenies and hydrolytic enzyme activities associated with the *F.oxysporum* f.sp. *elaeidis* pathogen. Oleagineux 44, 393 - 401.
- ORITSEJAFOR, J. (1989). Status of the oil palm vascular wilt disease in Nigeria. International conference on Palms and Palm products. Nigeria, November 1989.
- PAPAVIZAS, G. (1967). Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of Fusaria from soil. Phytophatology 57, 848 - 852.

