

Sommaire

SOMMAIRE

Préambule	I
Chapitre 1 : Chapitre 1 : Introduction – Revue bibliographique.....	3
1. Le genre <i>Cylindrocladium</i> Morgan et ses espèces : visite d'un taxon en constante réévaluation.....	3
1.1 Une distribution géographique large, des gammes d'hôtes variées, un impact économique certain	3
1.2 Principales caractéristiques morphologiques et biologiques, pouvoir pathogène et méthodes de lutte.....	4
1.2.1 Principales caractéristiques morphologiques et biologiques.....	4
1.2.2 Pouvoir pathogène.....	5
1.2.3 Méthodes de lutte contre les <i>Cylindrocladioses</i>	9
1.3 Une délimitation taxinomique du genre longtemps controversée.....	11
1.4 L'identification des espèces : un problème récurrent au sein du genre	12
1.4.1 La période I (1892 à 1990) : L'époque des espèces morphologiques.....	12
1.4.2 La période II (1990 à 1994) : la parution de deux monographies de référence sur la systématique des espèces de <i>Cylindrocladium</i>	12
1.4.3 La période III (1994 à 1997) : Le recours aux marqueurs moléculaires et la remise en cause des espèces morphologiques.....	13
1.4.4 La période IV (1997 à nos jours) : La demande pour de nouveaux marqueurs discriminants et faciles à mettre en oeuvre	14
2. Le statut des champignons du genre <i>Cylindrocladium</i> au sein du Complexe Parasitaire Racinaire (CPR) des bananiers	15
2.1 Les bananiers	15
2.1.1 Importance socio-économique.....	15
2.1.2 Systématique et organisation génétique – Eléments de botanique	16
2.2 Le Complexe Parasitaire Racinaire des bananiers.....	20
2.2.1 Les nématodes endoparasites	21
2.2.2 Les champignons telluriques	21
2.3 L'interaction <i>Cylindrocladium</i> / bananier / sol.....	22
2.3.1 Le contexte agronomique des premières mentions de <i>Cylindrocladium</i> chez les bananiers	22
2.3.2 La méconnaissance des espèces impliquées chez les bananiers	23
2.3.3 Symptomatologie et conséquences pour le bananier	25
2.3.4 Données fragmentaires sur le processus infectieux et le cycle biologique.....	28
2.3.5 Distribution spatiale en fonction des types de sols - réceptivité des sols à <i>Cylindrocladium</i> sp.	29
2.3.6 Autres facteurs influençant le développement des nécroses racinaires à <i>Cylindrocladium</i>	29
2.3.7 Méthodes de lutte	31
3. La diversité chez les champignons pathogènes des plantes : distribution, origines, et outils d'évaluation	32
3.1 Une diversité fongique dimensionnée à l'échelle de la planète	32
3.2 Une diversité omniprésente chez les champignons parasites des plantes.....	32
3.3 Les origines de la diversité fongique	33
3.4 Les marqueurs phénotypiques, outils traditionnels d'évaluation de la diversité fongique.....	36
3.4.1 Les caractères cultureux et morphologiques	36
3.4.2 Les marqueurs physiologiques et biochimiques	37
3.4.3 Spécificité d'hôtes et spectres de virulences, résistance aux fongicides.....	39

3.4.4 Les types de compatibilité sexuelle et les groupes de compatibilité végétative	40
3.5 Les marqueurs moléculaires	41
4. Brève revue des apports des marqueurs moléculaires à la systématique des champignons phytopathogènes	44
4.1 Un support approprié aux méthodes de classification basées sur la taxinomie numérique	47
4.2 La confirmation de l'origine polyphylétique des « champignons » (<i>sensu lato</i>) au sein du monde vivant	47
4.3 Le réexamen des taxa fongiques supérieurs et de leurs origines phylétiques	49
4.4 Une dimension phylogénétique à la définition de l'espèce chez les champignons	50
4.5 Une résolution des espèces fongiques phytopathogènes jamais atteinte auparavant	52
4.6 L'identification moléculaire des espèces fongiques phytopathogènes : de la systématique au diagnostic des maladies	54
Problématique et Présentation du sujet	56
Chapitre 2 : Analyse de la diversité phénotypique et biologique d'isolats de <i>Cylindrocladium</i> issus de la rhizosphère du bananier	59
1. Introduction	59
2. Matériel et Méthodes	59
2.1 Origine des isolats	59
2.1.1 Isolats de <i>Cylindrocladium</i> non identifiés provenant de la rhizosphère du bananier ou de nécroses racinaires d'héliconia	59
2.1.2. Isolats de référence provenant de mycothèques internationales	60
2.2 Isolement, clonage monoconidien et conservation des isolats	65
2.3 Caractéristiques morphologiques, culturelles et physiologiques étudiées	67
2.3.1 Etude morpho-taxinomique en microscopie photonique	67
2.3.2 Caractères culturels et morphologie des colonies	67
2.3.3 Vitesse de croissance mycélienne et optima thermiques de croissance	68
2.4 Compatibilité sexuelle des isolats	68
2.5 Traitement des données et analyses statistiques	69
2.5.1 Descripteurs de la diversité phénotypique	69
2.5.2 Optima thermiques de croissance	71
3. Résultats	71
3.1 Discrimination des descripteurs de la variabilité morphologique	71
3.2 Analyse globale de la diversité phénotypique	75
3.2.1 Identification de cinq morphotypes (Mti) en bananeraies	75
3.2.2 Comparaison phénotypique des Mti avec des espèces de référence	79
3.2.3 Distribution géographique des morphotypes	79
3.3 Identification des optima thermiques de croissance chez les différents morphotypes, et comparaison avec ceux d'isolats de référence	81
3.4 Compatibilité sexuelle intra et inter morphotypes	86
4. Discussion - Conclusions	87

Chapitre 3 : Analyse du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr chez le genre *Cylindrocladium* et développement d'une méthode de diagnostic moléculaire de ses espèces- Application à la caractérisation génétique des taxa identifiés en bananeraies...93

1. Introduction	93
2. Matériel et méthodes	93
2.1 Extraction de l'ADN génomique fongique, amplification PCR, séquençage, et analyse des séquences nucléotidiques de la région ITS de l'ADNr.....	93
2.2 Amplification PCR et étude du polymorphisme de restriction de l'espaceur IGS de l'ADNr par PCR-RFLP (CAPS).....	95
2.3 Etablissement de la séquence complète de la région IGS chez <i>Cylindrocladium</i>	95
3. Résultats	98
3.1 Analyse du polymorphisme de séquences de la région ITS chez le genre <i>Cylindrocladium</i> ; intérêt pour le diagnostic	98
3.2 Prospection du polymorphisme de site de la région IGS par PCR-RFLP et développement d'une méthode de diagnostic moléculaire des espèces de <i>Cylindrocladium</i> ; application aux taxa identifiés en bananeraies et sur héliconias.....	103
3.2.1 Développement et validation de la méthode ; application à la détermination des haplotypes IGS des morphotypes MT1 et MT2 BAN - <i>Publication n°1</i> -	103
3.2.2 Comparaison des haplotypes IGS entre isolats MT2HEL et MT2BAN - corrections taxinomiques.....	115
3.2.3 Détermination des haplotypes IGS des morphotypes MT3, MT4 et MT5 – autres corrections taxinomiques.....	117
3.3 Premières informations sur le polymorphisme de séquences de l'espaceur IGS chez <i>Cylindrocladium</i>	120
4. Discussion	126

Chapitre 4 : Etude du pouvoir pathogène des espèces de *Cylindrocladium* inventoriées en bananeraies et de leur variabilité génétique intraspécifique.....133

1. Introduction.....	133
2 <u>Article n°2 soumis à publication</u>	134

Chapitre 5 : Conclusion générale - Perspectives167

Références bibliographiques.....	179
---	------------

LISTES DES TABLEAUX *

(*hors publications)

Chapitre 1

Tableau 1. Classification et répartition géographique des principaux bananiers cultivés (Bakry *et al.*, 1997).

Tableau 2. Exemple d'utilisation de marqueurs moléculaires pour l'analyse de la diversité chez les champignons phytopathogènes.

Tableau 3. Principaux indices de similarités sur variables présence ou absence : auteur, expression et propriétés (Perrier, Flori et Bonnot, 1999).

Chapitre 2

Tableau 4. Origine des isolats de *Cylindrocladium* issus de prospection (isolats « terrain »).

Tableau 5. Origine des isolats de *Cylindrocladium* de référence utilisés pour la caractérisation phénotypique et biologique.

Tableau 6. Variables initiales et modalités utilisées pour la caractérisation phénotypique des isolats de *Cylindrocladium*.

Tableau 7. Tableau de contingence de Burt sur les variables qualitatives lors de l'évaluation de la diversité phénotypique globale.

Tableau 8. Principales caractéristiques phénotypiques des 5 morphotypes d'isolats de *Cylindrocladium* identifiés en bananeraies.

Tableau 9. Distribution inter-sites de la diversité phénotypique (morphotypes MT1 et MT5) des isolats de *Cylindrocladium* provenant de bananeraies de Guadeloupe et de Martinique.

Tableau 10a. Compatibilité sexuelle d'isolats MT1, MT5, et d'isolats de référence appartenant aux espèces *Cy. gracile*, *Cy. pteridis* et *Cy. pseudogracile*.

Tableau 10b. Compatibilité sexuelle d'isolats MT2, provenant de bananiers et d'héliconias et de représentants de l'espèce *Cy. spathiphylli* (Réf.).

Tableau 10c. Compatibilité sexuelle d'isolats MT3 et d'isolats de référence à vésicules spatulées appartenant aux espèces *Cy. scoparium* et *Cy. candelabrum*.

Tableau 10d. Compatibilité sexuelle de l'isolat Cam13 (MT4) et d'isolats de référence à vésicules sphéro-pédonculées de l'espèce *Cy. floridanum*.

Chapitre 3

Tableau 11. : Collection élargie d'isolats de référence de *Cylindrocladium* utilisés pour l'analyse du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr

Tableau 12. : Référence des séquences ITS d'isolats de *Cylindrocladium* collectées dans la base GenBank

Tableau 13. : Isolats de *Cylindrocladium* provenant de bananeraies ou isolés d'héliconias dont la région ITS a été amplifiée par PCR puis séquencée

LISTE DES FIGURES *

(*hors publications)

Chapitre 1

Figure 1. Représentation schématique du conidiophore chez le genre *Cylindrocladium* (d'après Crous *et al.*, 1997).

Figure 2. Diversité morphologique des conidies chez le genre *Cylindrocladium* (Peerally, 1991).

Figure 3. Diversité morphologique de la vésicule du stipe chez le genre *Cylindrocladium* (Crous et Wingfield, 1994).

Figure 4. Chaetoglobosines A, C et O produites par *Cy. floridanum* (Ichihara *et al.*, 1996).

Figure 5. Schéma de domestication des bananiers (Jenny *et al.*, 1999).

Figure 6. Représentation schématique d'un bananier (champion, 1963).

Figure 7. Coupe transversale d'un rhizome de bananier (Lassoudière, 1978).

Figure 8. Schéma illustrant la hiérarchie des facteurs limitants le rendement en bananeraies dans différentes zones pédo-climatiques de la Martinique (Delvaux, Perrier, et Guyot, 1990).

Figure 9. Lésions nécrotiques sur racines de bananiers.

Figure 10. Relations entre densité d'inoculum en *Cylindrocladium sp.* et potentiel infectieux (Schadeck et Risède, 1997).

Figure 11. Schéma des forces évolutives générant de la variabilité génétique au sein des populations fongiques phytopathogènes (Burdon et Silk, 1997).

Figure 12. Représentation schématique de l'organisation d'un motif répété en tandem de l'ADNr.

Figure 13. Amorces universelles pour l'amplification PCR des régions variées de l'ADNr chez les champignons (White *et al.*, 1990).

Figure 14. Arbre illustrant les relations phylogénétiques entre les 3 principaux Domaines du monde vivant à partir du polymorphisme de séquence de la petite sous-unité de l'ADNr (Carlile, Watkinson, et Gooday, 2001).

Figure 15. Arbre phylogénétique construit à partir des séquences de la sous-unité 18S de l'ADNr et illustrant les relations entre les organismes traditionnellement étudiés par les mycologistes sous le vocable « champignons » (d'après Taylor, Swann et Berbee, 1994).

Chapitre 2

Figure 16. Procédure générale de traitement des isolats de *Cylindrocladium* pour la caractérisation phénotypique et biologique.

Figure 17. Formes des vésicules terminales des stipes chez les isolats de *Cylindrocladium* identifiés en bananeraies.

Figure 18. Liaison entre longueur et largeur des conidies des isolats de *Cylindrocladium*, illustrée par la forme de la vésicule terminale du stipe .

Figure 19. Liaison entre la hauteur et le diamètre de la vésicule du stipe, illustrée par la forme de la vésicule (hors vésicules clavates).

Figure 20. Analyse globale de variabilité phénotypique : représentation du cercle des corrélations de l'Analyse en Composantes Principales.

Figure 21. Analyse globale de variabilité phénotypique par Analyse en Composantes Principales : représentation des individus sur le premier plan de l'ACP.

Figure 22. Distribution des 5 morphotypes d'isolats de *Cylindrocladium* trouvés en bananeraies, en fonction des origines géographiques.

Figure 23a. Optima thermiques d'isolats MT1, MT5, et de représentants d'espèces de *Cylindrocladium* de référence à vésicules clavates.

Figure 23b. Optima thermiques d'isolats MT2 et de représentants de l'espèce *Cy. spathiphylli* (vésicules sphériques).

Figure 23c. Optima thermiques d'isolats MT3 et MT4 et d'espèces de *Cylindrocladium* de référence à vésicules spatulées ou sphéro-pédonculées.

Figure 24. Périthèces et ascospores du stade téléomorphe *Calonectria* obtenus à l'issue de croisements entre isolats de *Cylindrocladium* à vésicules sphériques provenant de bananeraies (MT2BAN) ou d'héliconias (MT2HEL), ou avec des représentants de référence de l'espèce *Cy. spathiphylli*.

Chapitre 3

Figure 25 : Séquence consensus définie dans la région ITS de l'ADNr du genre *Cylindrocladium*

Figure 26 : Dendrogramme construit par la méthode du Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987) sur la matrice de dissimilarités (Sokal et Michener, 1958) de 55 séquences ITS d'espèces différentes de *Cylindrocladium* et d'isolats de ce genre provenant de bananeraies et d'héliconias (morphotypes MT1 à MT5)

Figure 27 : Profils PCR-RFLP de la région IGS chez *Cylindrocladium spp*

Figure 28 : Profils PCR-RFLP de la région IGS chez différents représentants d'espèces de *Cylindrocladium* à vésicules sphéro-pédonculées

Figure 29 : Dendrogramme construit par la méthode UPGMA sur la matrice de dissimilarité (Sokal et Michener, 1958) de profils PCR-RFLP (CAPS) de l'IGS – enzymes *Pst* I, *Mva* I, *Rsa* I et *Ava* II (64 marqueurs informatifs) – chez des représentants de référence de différentes espèces de *Cylindrocladium* et des isolats de *Cylindrocladium* de morphotype MT3, MT4 et MT5 issus de la rhizosphère du bananier

Figure 30 : Alignement de la séquence nucléotidique de la région IGS chez l'isolat IMI 346843 de l'espèce *Cy. gracile* et l'isolat 167983 de l'espèce *Cy. spathiphylli*

Figure 31 : Déclinaisons et séquence consensus du motif répété de 14 bp chez l'isolat IMI 346843 de l'espèce *Cy. gracile*

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique
ANOVA : Analysis of Variance
ARN : Acide Ribonucléique
BLA : Milieu de culture Banana Leaf Agar
Ca. : *Calonectria*
CAPS : Cleaved Amplified Polymorphism Sequence
CBR : *Cylindrocladium* Black Rot
Cm/j : Centimètre par jour
CPR : Complexe Parasitaire Racinaire
CPS : Cyclic Peptide Synthase
Cy. : *Cylindrocladium*
°C : Degré Celsius
DIP : Diagnostic *In Planta*
f. sp. : *forma specialis*
IGS : Intergenic Spacer
ITS : Internal Transcribed Spacer
Kb : Kilobase
M1-100 CHL : Milieu de culture à 1% d'extrait de Malt, 2 % d'agar, 100 µg/l de Chloraphénicol
M2 : Milieu de culture à 2% d'extrait de Malt et 2% d'agar
MAT gene : Mating type gene
ml : Millilitre
µm : Micromètre
NJ : Neighbor Joining Method
pb : Paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria
% : Pour cent
RAPD : Random – Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RH : Relative humidity
RNP : Root Necrotic Potential (= PNR : Potentiel Nécrotique Racinaire)
SCAR : Sequence Characterized Amplified Region
SCCP : Single Strand Conformation Polymorphism
STMS : Sequence Tagged Microsatellite Site
UPGMA : Unweighted Pair Group Method using Average
VCG : Vegetative Compatibility Groups

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1

Introduction – Revue bibliographique

Préambule

En phytopathologie, l'identification non équivoque de l'agent causal d'une maladie constitue un préalable à la définition de stratégies de contrôle raisonnées (Maclean *et al.*, 1993). Il est donc indispensable de disposer de méthodologies d'estimation de la diversité fongique et donc de procédures d'identification des champignons qui soient suffisamment discriminantes pour permettre la reconnaissance de l'individu, de la population ou de l'espèce étudiés. Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, l'identification des champignons en général, et celle de leurs espèces en particulier fut principalement basée sur l'utilisation des seuls critères morphologiques qui s'avèrent pourtant fréquemment peu discriminants. Le recours à la sexualité (quand elle existe) et la recherche de groupes inter-féconds pour valider l'appartenance à une même espèce ne sont intervenus qu'à partir de la moitié suivante de ce siècle (Brasier, 1997). Puis, c'est au cours des deux dernières décennies qu'il y eut un recours croissant aux techniques de la biochimie et de la biologie moléculaire et aux nouvelles catégories de marqueurs qu'elles génèrent. Si quelques dizaines d'espèces phytopathogènes comme *Magnaporthe grisea* ou *Botrytis cinerea* ont fait l'objet d'études de diversité fines, une majorité d'entre elles restent encore définies de nos jours essentiellement sur la base des critères morphologiques (morpho-espèces) relayés le cas échéant par d'autres critères phénotypiques (croissance, pouvoir pathogène, ...). Il en résulte une sous-estimation des phénomènes de convergence morphologique et la définition de classifications artificielles sans fondement phylogénétique (pas de relations de parenté évolutive).

La présente étude s'inscrit dans le cadre global d'une contribution à la connaissance de la diversité des champignons filamenteux du genre *Cylindrocladium* qui parasitent le système racinaire des bananiers. Ces champignons telluriques furent reconnus au cours des deux dernières décennies comme l'un des facteurs biotiques à l'origine de lésions nécrotiques racinaires qui déterminent de chutes de bananiers et de baisses de productivité dans les systèmes monocultureaux bananiers d'Amérique centrale et des Antilles (Semer *et al.*, 1987 ; Loridat, 1989). Ils furent par la suite signalés sur bananiers sur le continent africain (Kobenan, 1991 ; Castaing *et al.*, 1996). Si quelques éléments de connaissance furent acquis, en particulier sur leur écologie, le diagnostic précis des espèces impliquées en bananeraies ne fut pas posé. Deux types de facteurs semblent avoir contribué à cela. D'une part, une organisation taxinomique du genre perpétuellement remise en question, du fait du faible nombre de marqueurs morphologiques discriminants chez ces champignons, avec dans le même temps une absence d'outils rapides et fiables d'identification des espèces au sein de ce genre. Et d'autre part la méconnaissance de la diversité biologique et moléculaire des isolats impliqués dans la rhizosphère du bananier.

Les objectifs assignés à ce travail de thèse sont d'établir les principales caractéristiques phénotypiques et biologiques des espèces de *Cylindrocladium* présentes dans la rhizosphère du bananier, et de développer une méthode de diagnostic moléculaire des espèces de ce genre.

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui fait le point sur deux domaines d'intérêt de notre problématique de recherches : D'une part, le genre *Cylindrocladium* et les éléments de connaissances que l'on a des champignons de ce genre qui participent au complexe parasitaire racinaire du bananier. Et d'autre part, les avantages et limites des principaux marqueurs de la diversité chez les champignons, avec une attention particulière aux marqueurs moléculaires.

Ce chapitre est suivi de la présentation de notre sujet de recherches et de celle des travaux effectués. Ces travaux s'organisent en 3 chapitres :

Le chapitre 2 présente l'analyse de la diversité phénotypique et biologique (hors pouvoir pathogène) d'isolats de *Cylindrocladium* isolés de la rhizosphère du bananier

Le chapitre 3 expose l'analyse du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr chez le genre *Cylindrocladium* et le développement d'une méthode de diagnostic moléculaire de ses espèces. Il intègre également l'application de cet outil de diagnostic à la caractérisation génétique des taxa identifiés en bananeraies.

Enfin, le chapitre 4 fait le point sur le pouvoir pathogène des espèces de *Cylindrocladium* inventoriées en bananeraies et sur leur variabilité génétique intraspécifique.

1. Le genre *Cylindrocladium* Morgan et ses espèces : visite d'un taxon en constante réévaluation

1.1 Une distribution géographique large, des gammes d'hôtes variées, un impact économique certain

Les champignons filamenteux du genre *Cylindrocladium* Morgan représentent le stade anamorphe du genre euascomycète *Calonectria* De Not. (Pyrénomycètes), qui appartient lui-même à la famille *Nectriaceae*, et à l'ordre des Hypocréales (Rossman, 1979 ; 1983). Ces champignons haploïdes sont présents en zones tropicales, subtropicales, et tempérées, sur les cinq continents. On les trouve aussi bien dans les écosystèmes naturels (Arguedas Gamboa, 1996 ; Grandi et Attili, 1996) que dans les agrosystèmes érigés par l'homme, où ils parasitent un grand nombre de familles botaniques (Peerally, 1991 ; Crous et Wingfield, 1994) tant chez les ptéridophytes, que les gymnospermes ou les angiospermes. Ils affectent ainsi plusieurs dizaines d'espèces forestières ou ornementales, que ce soit au champ, ou surtout en pépinières (Viljoen, Wingfield et Crous, 1992), mais également des espèces fruitières et des espèces entrant dans la composition des prairies (Tozetto et Ribeiro, 1996 ; Waipara *et al.*, 1996). Parmi les essences forestières, ce sont les *Eucalyptus* et les conifères des genres *Pinus* et *Picea* qui sont le plus souvent atteints (Blum, Dianese et Costa, 1992 ; Hamelin *et al.*, 1996). Potentiellement n'importe quel organe aérien, qu'il soit végétatif (feuilles, tiges) ou reproducteur (fleurs, fruits) peut être infecté, de même que les organes souterrains tels que racines, gousses et stolons. Différents types de symptômes incluant des rouilles foliaires, des défoliations, des nécroses et des chancres sur tiges et sur fruits, mais aussi des pourritures et nécroses racinaires, ou des fontes de semis, peuvent alors être induits.

Certaines espèces de *Cylindrocladium* occasionnent de sévères pertes économiques en diminuant le rendement brut des cultures, ou en dépréciant la qualité des produits de récolte (feuillages, fleurs, fruits). *Cy. floridanum* est l'un des champignons impliqués dans la perte annuelle d'environ 65 millions de mètres cubes de bois au Canada (Dumas, 2001). C'est en effet l'un des principaux agents de pourritures racinaires des semis de conifères. Hamelin *et al.* (1996) indiquent que l'impact de ce champignon est double : non seulement il génère des taux de mortalité pouvant dépasser 50% dans les pépinières forestières, mais il diminue également le taux de reprise sur les sites de reforestation. Saunders, Juzwick et Hutchinson (1992) font état de taux de mortalité atteignant 40% la première année suivant la transplantation d'épinettes noires *Picea mariana*, du fait de ce champignon. De même, la pourriture noire ou CBR (*Cylindrocladium* Black Rot) est l'une des principales maladies de l'arachide aux Etats-Unis (Phipps et Beute, 1997 ; Kucharek *et al.*, 2000). Dans les années

1970, elle a provoqué des pertes de rendements considérables chez les producteurs d'arachide de Floride et de Caroline du nord (Rowe, Beute et Wells, 1973). Causée par *Cylindrocladium parasiticum* (syn. *Cy. crotalariae*), la maladie affecte principalement les racines, les stolons et les gousses de l'arachide, et plus rarement les parties aériennes (Sobers et Alfieri, 1972). Cette même espèce affecte également le soja (Ferreira et Dianese, 1999), ainsi que d'autres légumineuses comme le trèfle (Waipara *et al.*, 1996), ainsi que de nombreux autres hôtes (Porter *et al.*, 1991 ; Brenneman, Padgett et McDaniel, 1998).

Enfin, *Cylindrocladium spathiphylli* a induit une crise importante de la production de *Spathiphyllum* en Floride et à Hawaii au début des années 1980 (Uchida, 1989 ; Uchida et Aragaki, 1992). Ce champignon provoquait de sévères nécroses sur les racines et le rhizome des plants infectés, ainsi que sur le collet ou les pétioles des feuilles. Il entraînait selon les cas, la mort des plants infectés, ou les rendait non commercialisables. Cette maladie est encore aujourd'hui l'une des maladies les plus communes du *Spathiphyllum*. A la fin des années 1980, le marché hawaïen de la fleur tropicale a de nouveau été affecté mais cette fois par le « déclin de l'Héliconia » dû à un champignon décrit comme *Cylindrocladium spathiphylli* f. sp. *heliconiae* (Uchida, Aragaki et Yahata, 1989), quoique ce statut de *forma specialis* n'ait pas clairement été validé.

Au delà de ces exemples, une caractéristique relativement fréquente dans les pathologies à *Cylindrocladium* est à relever : ces champignons sont bien souvent décrits comme ayant des gammes d'hôtes larges, si bien qu'une espèce donnée de *Cylindrocladium*, en plus de pouvoir infecter plusieurs hôtes différents, peut former un complexe parasitaire avec d'autres espèces sur le même hôte. Le modèle *Cylindrocladium* / *Eucalyptus* est tout à fait informatif : plusieurs espèces de *Cylindrocladium* sont par exemple signalées sur *Eucalyptus grandis* (Crous, Phillips et Wingfield, 1993). A l'inverse, l'espèce *Cy. quinqueseptatum* est donnée comme affectant à elle seule au moins une vingtaine d'espèces différentes d'*Eucalyptus* (Booth *et al.*, 2000), ainsi que plusieurs autres plantes appartenant à des familles botaniques très différentes de la famille des *Eucalyptus* (*Myrtaceae*) (Crous et Wingfield, 1994).

1.2 Principales caractéristiques morphologiques et biologiques, pouvoir pathogène et méthodes de lutte

1.2.1 Principales caractéristiques morphologiques et biologiques

Les champignons du genre *Cylindrocladium* possèdent une belle couleur fauve en culture axénique. Que ce soit en culture pure, dans les tissus de leurs hôtes végétaux, ou dans

le sol, ils produisent souvent des chlamydospores brunes qui s'agrègent en chaînettes ou en amas plus ou moins sphériques, pour former des microsclérotés (Rowe, Johnston et Beute, 1974). Leur thalle différencie également des conidiophores qui se divisent de façon di ou trichotomiques pour émettre des phialides qui bourgeonnent pour produire à leur tour des conidies (figure 1). Celles-ci sont groupées en bouquet dans un mucilage hydrosoluble. Hyalines, de forme cylindrique, droites ou incurvées, avec des extrémités arrondies, elles sont bi, tri ou pluricellulaires (figure 2). Un stade microconidien a pu être observé chez certains isolats, mais il est considéré, à tort ou à raison, comme un phénotype associé à de longues conservations et donc comme une forme de dégénérescence culturelle (Crous et Peeraly, 1996). L'appareil conidien est surmonté d'une soie ou stipe qui est septé, et dont la partie distale est renflée par une vésicule terminale de forme variable (figure 3). La fonction de ce stipe reste inconnue.

Lorsqu'il est connu, le stade téléomorphe *Calonectria* est, selon l'espèce considérée, homo ou hétérothallique (Crous et Wingfield, 1994). Rossman (1979 ; 1983) différencie le genre *Calonectria* des genres voisins *Ophionectria* et *Nectria* par ses ascocarpes verruqueux à base stromatique foncée, par la coloration caractéristique rouge sang que prennent ces derniers dans une solution de KOH à 3%, mais aussi par le fait que son stade anamorphe appartienne systématiquement au genre *Cylindrocladium*.

Les conidies, ascospores et microsclérotés constituent les principales unités de dissémination de ces champignons. Hwang et Ko (1975) ont montré que chez *Cy. parasiticum*, les stocks respectifs de ces propagules diminuent respectivement de 87, 46 et 20% après 8 mois d'incubation dans un sol, seuls les microsclérotés demeurant viables après ces périodes.

Les microsclérotés révèlent généralement une faible capacité saprophytique, mais constituent chez le genre *Cylindrocladium* la principale structure de conservation dans les sols où ils peuvent survivre pendant plusieurs années (Thies et Patton, 1970).

1.2.2 Pouvoir pathogène

Les travaux relatifs à l'étude du pouvoir pathogène sont restés pour la plupart cantonnés à l'étude de gammes d'hôtes, aucune interaction différentielle n'ayant, à notre connaissance, été enregistrée entre variétés ou cultivars d'un même hôte et isolats d'une espèce donnée de *Cylindrocladium*. En dépit d'une variation importante d'agressivité au sein d'isolats de *Cy. parasiticum* sur 6 variétés d'arachide, Rowe et Beute (1975) n'ont par exemple détecté aucune race physiologique chez cette espèce.

Figure 1 : Représentation schématique du conidiophore chez le genre *Cylindrocladium* (d'après Crous *et al.*, 1997)

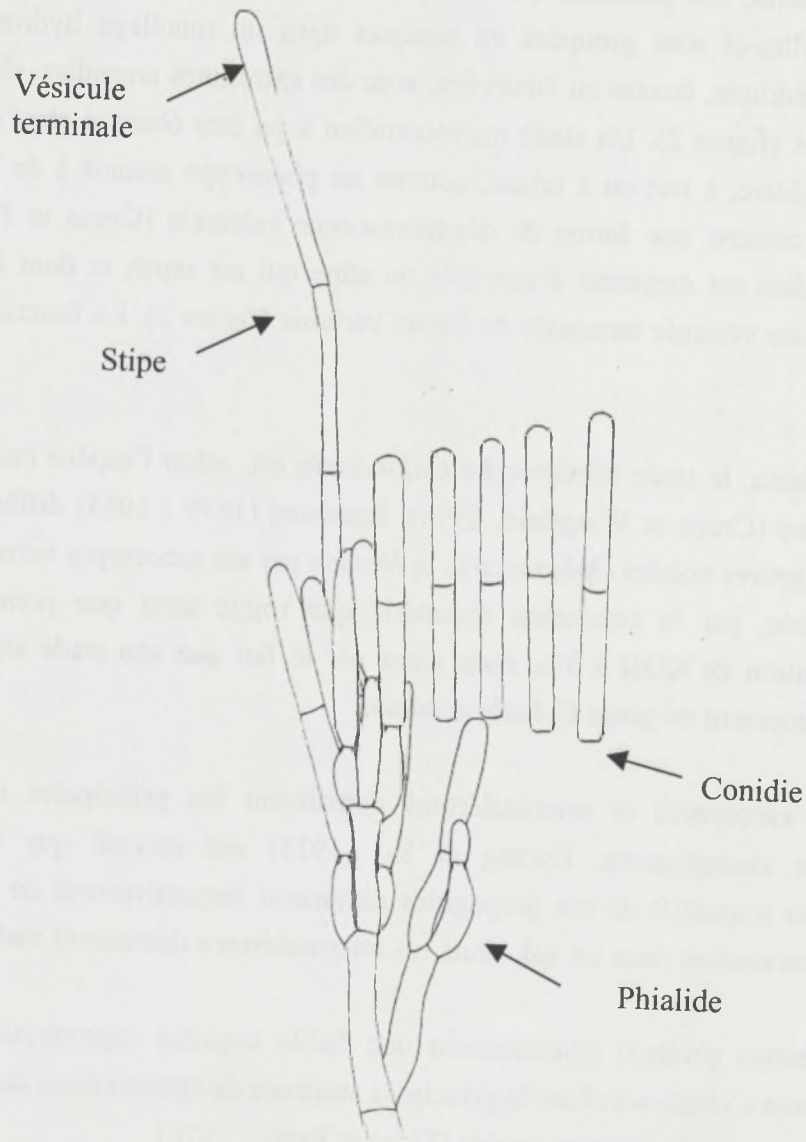


Figure 2 : Diversité morphologique des conidies chez le genre *Cylindrocladium* (Peerally, 1991)



Figure 3 : Diversité morphologique de la vésicule du stipe chez le genre *Cylindrocladium* (Crous et Wingfield, 1994)

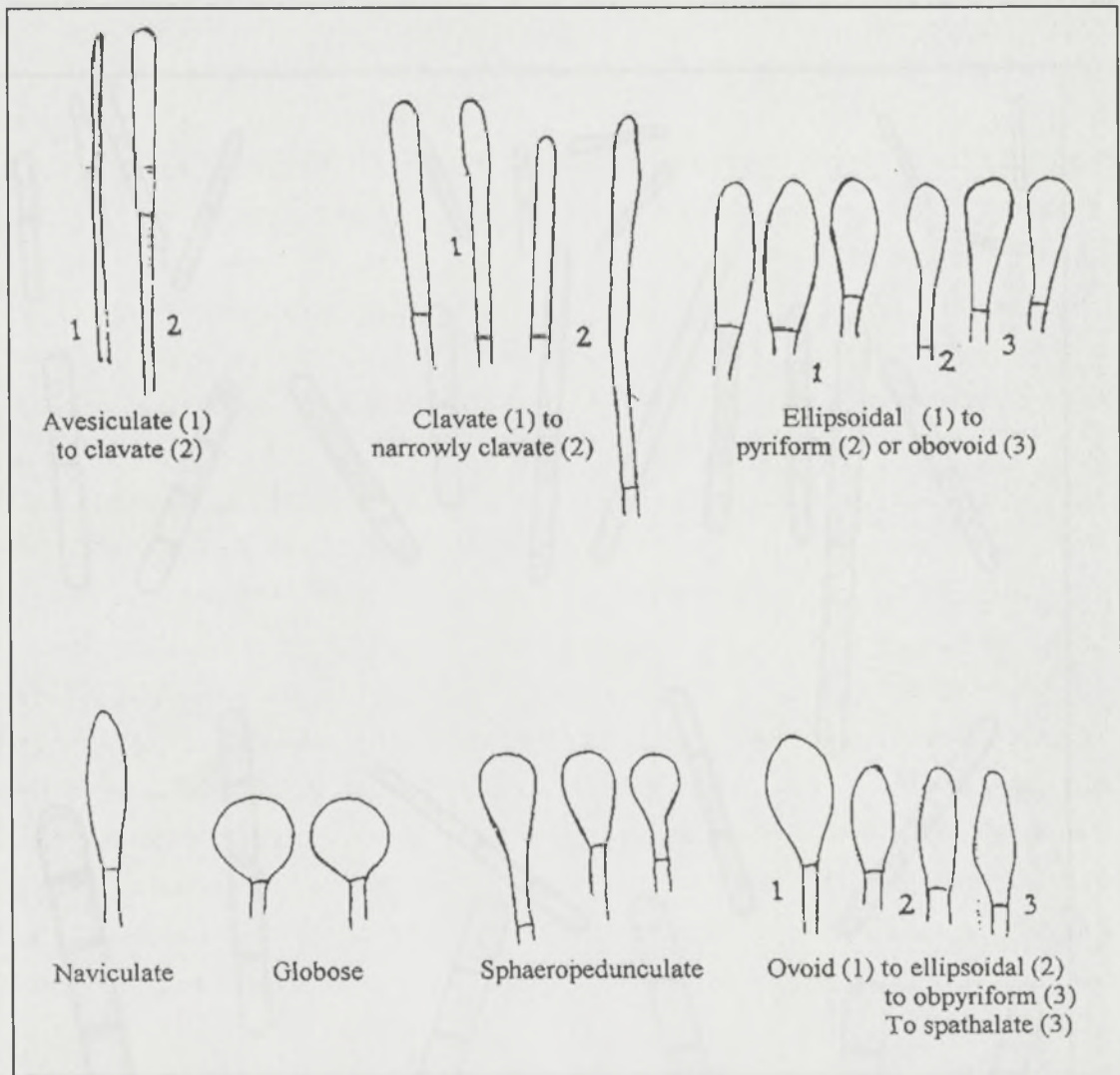
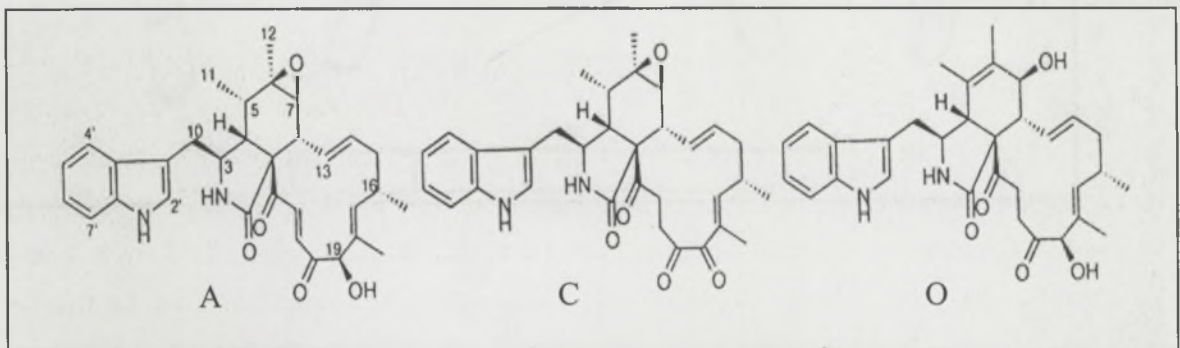


Figure 4 : Chaetoglobosines A, C et O produites par *Cy. floridanum* (Ichihara *et al.*, 1996)



Le déroulement séquentiel du processus infectieux est également peu étudié. Plusieurs travaux ont par contre été consacrés à l'identification et au rôle de certains métabolites phytotoxiques produits par les *Cylindrocladium* en culture pure ou lors de la pathogénèse. Kaushik et Gupta (1992) signalent que les filtrats de culture de *Cy. quinquesseptatum*, autoclavés ou non, provoquent le flétrissement de plantules d'*Eucalyptus tereticornis* dans les 24 heures, et finalement leur mort dans les 10 jours. Ces filtrats inhibent également la germination de semences de 5 espèces d'*Eucalyptus* testées. De même, Ichihara *et al.* (1996) ont montré que *Cy. floridanum* responsable chez la luzerne de l'Alfafa Black Rot Disease produit des composés phytotoxiques appelés Chaetoglobosines A, C et O (Figure 4) qui sont proches de métabolites initialement décrits chez *Chaetomium globosum*. La Chaetoglobosine A et la 19-O-acétylchaetoglobosine A ont aussi été décrites comme des « toxines » produites par *Calonectria morganii*, stade téléomorphe de *Cylindrocladium scoparium* (von Wallbrunn *et al.*, 2001). Ces composés se sont également révélés phytotoxiques sur des semis de cresson. Le rôle exact de ces Chaetoglobosines dans le déterminisme du pouvoir pathogène reste cependant non élucidé.

On peut également citer les travaux de Hirota *et al.* (1973) et de Nikolskaya *et al.* (1995) qui indiquent respectivement que *Cy. scoparium* et *Cy. pteridis* (ex. *Cy. macrosporum*) produisent des tétrapeptides cycliques de structure analogue à la HC toxine de la race 1 de *Cochliobolus carbonum*. Nikolskaya *et al.* (1995) ont d'ailleurs publié les séquences d'amorces dégénérées permettant de cloner par PCR, une famille de gènes codant pour les enzymes CPS (Cyclic Peptide Synthases) qui catalysent la synthèse de ces tétrapeptides. Mais, là encore le statut exact de ce type de toxine dans la pathogénèse des *Cylindrocladium* n'a pas été précisé.

Notons enfin que les nématodes phytophages sont souvent reconnus comme des facteurs aggravant des maladies des plantes causées par les champignons du genre *Cylindrocladium* (Diomande et Beute, 1981).

1.2.3 Méthodes de lutte contre les Cylindrocladioses

Les quelques travaux sur la recherche de techniques de lutte culturale contre les maladies à *Cylindrocladium* ont surtout concerné *Cy. parasiticum* sur arachide. Sidebottom et Beute (1989a) ont ainsi préconisé la pratique de rotations culturales avec le soja pour diminuer l'impact de *Cy. parasiticum* dans les champs d'arachide. Le soja est pourtant hôte de *Cy. parasiticum*, mais les microsclérotés laissés dans les sols à l'issue de sa culture sont décrits par ces auteurs comme ayant une efficacité infectieuse moindre sur arachide. Le maïs est par contre cité comme une culture non hôte (Black et Beute, 1984). Sidebottom et Beute (1989b) indiquent également que les techniques culturales favorisant une température moyenne du sol

plus élevée, par exemple une plantation tardive, diminuent l'impact de la *Cylindrocladium* Black Rot (CBR).

Les méthodes de lutte contre les cylindrocladioses restent donc essentiellement chimiques. Jayasinghe et Wijesundera (1995) ont proposé l'utilisation de Bénomyl, de Mancozèbe, et de mélanges Métalaxyl et Mancozèbe, ou Oxadixyl et Mancozèbe pour la maîtrise de *Cy. quinqueseptatum* sur *Eugenia caryophylla*. Dans les années 1980, le Métam-sodium a été utilisé pour désinfecter le sol des parcelles d'arachide aux Etas-Unis pour lutter contre la CBR (Cline et Beute, 1986). Plus récemment, Kucharek, Atkins et Hoover (1995) ont montré que cette même maladie de l'arachide ainsi que la pourriture blanche due à *Sclerotium rolfsii* pouvaient être contrôlées à l'aide d'applications de Fluaziname (famille des Phénylpyridylamines).

Depuis quelques années cependant, plusieurs travaux sont consacrés à la recherche de méthodes alternatives plus durables et moins polluantes que la lutte chimique. La *Cylindrocladium* Black Rot (CBR, *Cy. parasiticum*) a par exemple été prise en compte dans les programmes d'amélioration génétique de l'arachide. Kucharek *et al.* (2000) ont ainsi sélectionné des cultivars d'arachide résistants à cette maladie, certains d'entre eux exprimant également une résistance à la virose due au Tomato Spotted Wilt Virus. Au Vietnam, pour prévoir le risque de rouille foliaire dans les plantations d'*Eucalyptus camaldulensis* (agent causal *Cy. quinqueseptatum*), Booth *et al.* (2000) ont proposé un système d'avertissement climatique.

Plusieurs composés d'origine biologique ou agents de lutte biologique ont également été évalués en laboratoire ou en pépinière pour lutter contre les champignons du genre *Cylindrocladium*. Laflamme *et al.* (1999) ont montré que le chitosane avait des effets défavorables sur différents champignons telluriques pathogènes en pépinières forestières dont *Cy. floridanum*, en induisant une réduction de la croissance radiale et diverses altérations morphologiques ultrastructurales : forte vacuolisation cellulaire, épaissement de la paroi fongique, distorsion d'hyphes, agrégation cytoplasmique, décollement et altération de la membrane plasmique. Dumas *et al.* (1996) ont illustré la capacité de plusieurs espèces de *Trichoderma* à inhiber *in-vitro* la croissance mycélienne et la production de microsclérotés de *Cy. floridanum*.

De même, Morin, Samson et Dessureault (1999) ont montré que les deux champignons ectomycorhiziens *Paxillus involutus* et *Hebeloma cylindrosporum* inhibent la croissance *in-vitro* de *Cy. floridanum*. Par ailleurs, *P. involutus* réduit significativement le pourcentage de plants infectés d'un semis d'épine-vinette noire (*Picea mariana*) lorsqu'il est inoculé de façon précoce à ce semis.

D'autres études plus rares font référence à la possibilité d'utiliser des bactéries comme agents de lutte biologique contre les champignons du genre *Cylindrocladium*. Dos Santos et

de Melo (1993) rapportent par exemple la bonne efficacité d'isolats de *Bacillus* spp. et de *Streptomyces* sp. pour le contrôle biologique de *Cylindrocladium scoparium*, responsable de fontes de semis sur *Eucalyptus*. Un autre exemple d'utilisation concrète des bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) contre les *Cylindrocladium* est donné par les travaux de Reddy (1997). Après évaluation des possibilités d'utilisation en lutte biologique en pépinières forestières commerciales d'environ 500 micro-organismes d'origines et de natures diverses, cet auteur a sélectionné l'isolat RaI-3 de *Burkholderia cepacia*. Il en a réalisé une formulation liquide, stable, utilisable en pépinières, qui induit une promotion de croissance et une bio-protection de certains conifères contre différents pathogènes fongiques de pépinières, parmi lesquels plusieurs *Cylindrocladium*.

1.3 Une délimitation taxinomique du genre longtemps controversée

Le genre *Cylindrocladium* est aujourd'hui identifié par deux types de caractéristiques morphologiques. D'une part, ses conidiophores pénicillés qui sont surmontés d'un stipe septé à paroi mince, et dont l'apex est renflé en une vésicule. Et d'autre part, ses conidies de taille supérieure à 30 µm, qui sont rangées en paquets cylindriques (Crous et Wingfield, 1994 ; Decock et Crous, 1998). Si le caractère discriminant de ces critères est aujourd'hui admis par la plupart des mycologistes travaillant sur ce genre, ils étaient, jusqu'à récemment encore, souvent controversés, favorisant par là même de très nombreuses confusions taxinomiques.

Le genre fut initialement décrit en 1892 par Morgan sur la base de ses caractéristiques conidiennes, mais sans aucune référence au stipe qui surmonte l'appareil conidiogène. Dans les décennies qui suivirent, l'existence et les caractéristiques du stipe furent, selon les cas, prises en compte ou non, et le faible nombre de caractères morphologiques discriminants aidant, de nombreux nouveaux genres furent définis pour décrire des champignons aujourd'hui reconnus comme des *Cylindrocladium*. C'est ainsi que *Candelospora*, *Tetracytum*, et *Acontiopsis* furent par exemple décrits comme des genres à part entière pendant la première moitié du vingtième siècle, avant d'être par la suite considérés comme synonymes de *Cylindrocladium* (Peerally, 1991). Il y eut au cours de cette période, d'autres types de confusions. Le champignon initialement décrit par Bugnicourt (1939) comme *Cylindrocarpon gracile* fut par la suite redéfini par Boesewinkel (1981) comme une nouvelle espèce de *Cylindrocladium*, alors dénommée *Cy. gracile*. Inversement, Barron (1968) traita le genre *Gliocladosia* comme un synonyme de *Cylindrocladium*.

Au cours des deux dernières décennies, de nouvelles confusions eurent lieu, notamment avec le genre *Cylindrocladiella*. Défini en 1982 par Boesewinkel, ce genre était alors distingué de *Cylindrocladium* essentiellement par un agencement différent de ses

microscélérotes, et surtout par des conidies plus petites et un stipe non septé. En 1991, Peerally ne reconnut pas ces caractères comme discriminants, et considéra alors les deux genres comme synonymes. Deux ans plus tard, Crous et Wingfield (1993) les dissocièrent de nouveau sur la base de comparaisons morphologiques incluant également les genres voisins *Gliocladosis* et *Cylindrocarpon*.

Si depuis quelques années, un consensus semble s'être établi sur la circonscription phénotypique du genre, la systématique de la très importante famille des Nectriacées s'est dans le même temps complexifiée du fait de la définition de nouveaux genres anamorphes très proches sur le plan morphologique du genre *Cylindrocladium*, comme par exemple les genres *Curvocladium* ou *Xenocylindrocladium* (Decock, Henebert et Crous, 1997 ; Decock et Crous, 1998). *Le risque de confusion taxinomique réapparaît, et il paraît important de chercher à disposer de critères discriminant efficacement le genre Cylindrocladium de ses voisins.*

1.4 L'identification des espèces : un problème récurrent au sein du genre

La systématique des espèces de *Cylindrocladium* a elle aussi une histoire extrêmement mouvante et compliquée. Globalement, on peut distinguer 4 grandes périodes.

1.4.1 La période I (1892 à 1990) : L'époque des espèces morphologiques

Boedijn et Reitsma (1950) effectuent l'une des toutes premières revues du genre *Cylindrocladium*, en y reconnaissant sept espèces différentes. Ils prennent en compte non seulement la morphologie des conidies, mais également celle de la vésicule terminale du stipe. Tout au long de cette période, les espèces sont définies sur une base morphologique, et comme nous l'avons déjà évoqué, l'utilité taxinomique de la vésicule fait en particulier l'objet de plusieurs controverses, certains considérant ce caractère comme fiable (Sobers et Alfieri, 1972 ; El-Gholl *et al.*, 1986 ; El-Gholl, Leahy et Schubert, 1989), et d'autres le trouvant au contraire peu stable ou n'y faisant pas référence (Zumpetta, 1976 ; Rossman, 1983). C'est au cours de cette période que Rossman (1979 ; 1983) identifie le stade téléomorphe chez le genre *Cylindrocladium*.

1.4.2 La période II (1990 à 1994) : la parution de deux monographies de référence sur la systématique des espèces de Cylindrocladium

Ces monographies sont celle de Peerally (1991) qui reconnaît 26 espèces, et celle de Crous et Wingfield (1994) qui en discrimine une vingtaine. Elles ont en commun de

reconnaître l'utilité taxinomique des caractéristiques de la vésicule du stipe et d'en tenir compte en conjonction avec celles des conidies (forme, taille et septation). Cependant, on ne se restreint plus seulement au concept de l'espèce morphologique, puisque l'existence et les caractéristiques de la téléomorphe *Calonectria* sont également prises en compte. Ces deux monographies divergent sur la synonymie entre *Cylindrocladiella* et *Cylindrocladium*, celle de Crous et Wingfield (1994) dissociant les deux genres sur la base d'une étude phénotypique détaillée parue une année auparavant (Crous et Wingfield, 1993). L'exploitation approfondie de ces monographies et des clés de détermination qu'elles proposent, révèle que la distinction des espèces au sein du genre *Cylindrocladium* reste compliquée par deux types de facteurs :

- D'une part, les souches peuvent se révéler très pléiomorphes du fait que les caractères considérés comme discriminants d'un point taxinomique peuvent se révéler sensibles aux conditions de milieu. Crous, Phillips et Wingfield (1992) ont par exemple montré que des modifications de potentiel osmotique des milieux de culture entraînent des changements de morphologie des conidies et de la vésicule terminale. Cela a conduit ces auteurs à proposer l'utilisation de milieux de culture standardisés, comme le C.L.A. (Carnation Leaf Agar) dans les études taxinomiques.

- D'autre part, ces mêmes marqueurs morpho-taxinomiques se déclinent de façon quasi-continue d'une espèce à l'autre, tant pour les critères conidiens que pour les critères forme et taille des vésicules, ce qui les rend d'autant moins discriminants. Si ces 2 monographies s'accordent globalement sur plusieurs espèces, elles diffèrent néanmoins sur plusieurs autres.

Notons enfin, que c'est au cours de cette période qu'apparaissent les premières études taxinomiques utilisant des critères biochimiques ou moléculaires en plus des critères morphologiques. C'est ainsi que El-Gholl *et al.* (1992a) ont recours à l'électrophorèse de protéines solubles et d'isozymes, en renfort de la morphologie, pour identifier une nouvelle espèce baptisée *Cylindrocladium ovatum*. De même, Crous *et al.* (1993) différencient des espèces de *Cylindrocladium* à conidies triseptées, par électrophorèse d'estérases et par comparaison des profils de restriction de l'ADN total.

1.4.3 La période III (1994 à 1997) : Le recours aux marqueurs moléculaires et la remise en cause des espèces morphologiques

Cette période se caractérise par des tentatives répétées de correction des incertitudes taxinomiques dans la détermination des espèces chez le genre *Cylindrocladium*, aussi bien en ayant recours à des outils de caractérisation moléculaire, qu'en recherchant des groupes interfertiles. En 1995, puis en 1997, Crous *et al.* utilisent une sonde hétérologue de

Neurospora crassa marquée au P³² pour visualiser le polymorphisme de restriction de l'ADNr nucléaire d'espèces de *Cylindrocladium* à conidies mono à triseptées et à vésicule « clavate » (terme anglais désignant ici une vésicule sans renflement). Sur cette base, l'homonymie de certaines espèces est établie, et de nouvelles espèces sont érigées. C'est ainsi que *Cy. clavatum* et *Cy. gracile* pourtant identifiées comme deux espèces proches, mais différentes dans les 2 monographies de Peeraly (1991) et Crous et Wingfield (1994) sont reconnues comme étant synonymes. Parallèlement, l'existence de plusieurs complexes d'espèces similaires sur le plan morphologique est mise à jour, et il apparaît désormais que les marqueurs morphologiques sont insuffisants à eux tout seuls chez ce genre pour la caractérisation des espèces, d'où le recours aux marqueurs moléculaires, et la prise en compte de la téléomorphe. La correspondance entre anamorphe et téléomorphe est également remise en cause chez plusieurs espèces. *Calonectria gracilis* qui avait été décrit, diagnose latine à l'appui, par Crous, Wingfield et Alfnas (1993) comme la téléomorphe de *Cy. gracile* est revue et allouée comme celle d'une nouvelle espèce *Cy. pseudogracile* (Crous, Theron et Van Zyl, 1997). De même, *Calonectria clavata* décrit par El-Gholl (1993) comme la téléomorphe de *Cy. clavatum* est redéfinie comme celle d'une nouvelle espèce *Cy. flexuosum* (Crous, Korf et Van Zyl, 1995). Le nombre d'espèces reconnues dans le genre augmente et l'examen d'un nombre croissant d'isolats pousse à réviser les limites de mensurations conidiennes ou les formes de vésicule chez plusieurs espèces (Crous et Peeraly, 1996 ; Crous, Theron et Van Zyl, 1997).

Au cours de cette période, les marqueurs moléculaires ont été appliqués seulement à quelques complexes d'espèces. Ces marqueurs sont essentiellement des RFLPs et les techniques qui leurs sont inhérentes restent lourdes à mettre en œuvre et non dénuées de contraintes fortes (marquage radioactif).

1.4.4 La période IV (1997 à nos jours) : La demande pour de nouveaux marqueurs discriminants et faciles à mettre en oeuvre

Dès le début de cette période, de nouvelles espèces sont régulièrement définies (El-Gholl *et al.*, 1997). Deux nouvelles clés de détermination respectivement ciblées sur les espèces de *Cylindrocladium* à conidies à un septum et sur celles du complexe *Cy. candelabrum* paraissent (Crous *et al.*, 1997 ; Schoch *et al.*, 1999). Le nombre d'espèces continue régulièrement d'augmenter. *La nécessité de disposer de nouveaux marqueurs pouvant discriminer n'importe laquelle des espèces du genre, et qui soient faciles à mettre en œuvre pour l'évaluation taxinomique et la phylogénie des espèces anciennement ou nouvellement érigées se fait clairement ressentir.* C'est aussi à ce moment que démarre la

présente thèse. Les travaux réalisés à cette période seront discutés en parallèle aux nôtres dans le chapitre 3.

2. Le statut des champignons du genre *Cylindrocladium* au sein du Complexe Parasitaire Racinaire (CPR) des bananiers

Dans cette partie, nous nous attachons à décrire le pathosystème dans lequel sont impliqués des champignons du genre *Cylindrocladium* en bananeraies. Après une présentation succincte de l'hôte (les bananiers), nous présentons le Complexe Parasitaire Racinaire qui lui est généralement associé, en insistant plus particulièrement sur l'interaction *Cylindrocladium* / bananier / sol.

2.1 Les bananiers

2.1.1 Importance socio-économique

D'après les estimations 1998-1999, la production mondiale de bananes s'élève à environ 88 millions de tonnes (Lescot, 2000). Les bananes consommées à l'état frais (bananes de type « dessert ») représentent 54% de cette production, tandis que les bananes à cuire dont les variétés les plus connues appartiennent au sous-groupe des plantains (AAB) en constituent 46%. Ces dernières constituent un aliment de base essentiel pour de nombreuses populations de la zone tropicale. Toutes catégories de bananes confondues, avec 11 Mt (estimations 1998-1999) l'Inde est le premier pays producteur devant l'Ouganda (10 Mt), le Brésil (5.6 Mt) et l'Equateur (5.4 Mt).

Environ 14.5% de cette production mondiale fait l'objet d'exportations internationales, les « bananes dessert » en représentant la quasi totalité. Cultivées aussi bien dans des systèmes intensifs de type monoculturel que dans des « jardins vivriers » extensifs (culture mixte), elles sont présentes tant en zone tropicale qu'en zone subtropicale où bien souvent elles constituent pour de nombreux pays, une importante source de devises. L'Equateur est le premier pays exportateur de « bananes dessert » avec 3.9 Mt, devant le Costa-Rica (2 Mt) et la Colombie (1.6Mt).

La banane de type « dessert » occupe ainsi le troisième rang de la production fruitière mondiale derrière les agrumes et les raisins, et le second, toujours après les agrumes, quant au volume échangé sur les marchés internationaux. Elle fait l'objet d'une âpre concurrence sur le

marché international entre les pays de la zone dollar (essentiellement l'Amérique latine), ceux de la zone Europe, et les pays ACP (Afrique, Caraïbe, Pacifique). D'un intérêt économique extrêmement sensible, elle est au centre de dissensions maintenant chroniques entre l'OMC (Organisation Mondiale du Commerce) et l'OCMB (Organisation Commune des marchés de la Banane de la C.E.E.) quant aux règles d'approvisionnement du marché européen.

2.1.2 Systématique et organisation génétique – Eléments de botanique

- Systématique – Organisation génétique

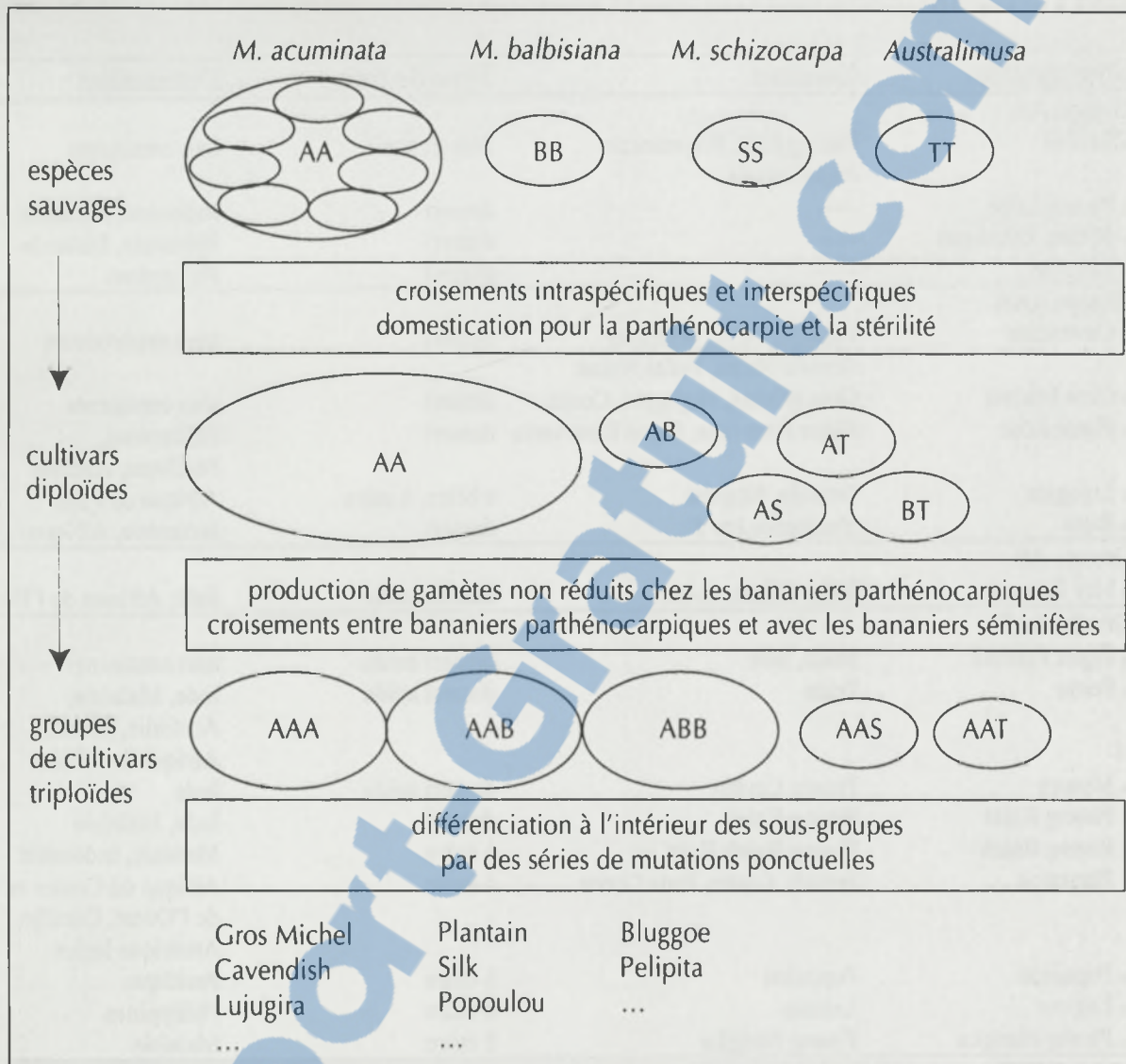
Originaires d'Asie du Sud-Est, les bananiers sont des monocotylédones qui appartiennent au genre *Musa* et la famille des *Musaceae* (Jenny *et al.*, 1999). Les *Musaceae* constituent, avec les 3 familles proches que sont les *Strelitziaceae*, les *Zingiberaceae* et les *Heliconiaceae*, l'ordre des Zingibérales. Le genre *Musa* comprend 4 sections parmi lesquelles la section *Eumusa* qui comporte la majorité des bananiers comestibles car à fruits parthénocarpiques, et leurs ancêtre sauvages séminifères *Musa acuminata* et *Musa balbisiana*. Par leur apport respectif d'un génome A ou d'un génome B, ces deux espèces *M. acuminata* et *M. balbisiana* sont considérées comme étant à l'origine d'une grande partie des clones cultivés pour leurs fruits comestibles, les espèces *M. schizocarpa* et celles de la section *Australimusa* fournissant respectivement les génomes S et T qui ne se retrouvent que chez de rares clones (Jenny *et al.*, 1999) (figure 5). Les variétés cultivées sont parthénocarpiques et souvent fortement stériles. Leur reproduction est assurée par la voie végétative. Elles sont surtout triploïdes (AAA, AAB, ABB) ou diploïdes (AA et plus rarement AB ou BB) (Tableau 1). Dans de nombreuses régions du monde, les variétés de bananes de « type dessert » les plus utilisées sont celles faisant partie du sous-groupe Cavendish, avec en particulier les cultivars « Grande-Naine » et « Poyo ».

- Botanique

Herbes géantes pouvant atteindre 15 m de hauteur (figure 6), les bananiers ont un pseudo-tronc constitué par l'imbrication des longues gaines de leurs feuilles. Le méristème apical est localisé au centre de ce pseudo-tronc au niveau du collet de la plante (Stover et Simmonds, 1987).

Le bouquet foliaire est constitué de quinze à vingt feuilles au limbe allongé, et dont l'émission est relayée par la sortie de l'inflorescence ou régime. Celle-ci est d'abord composée de plusieurs rangées de fleurs femelles ou « mains » dont l'ovaire hyper-développé

Figure 5 : Schéma de domestication des bananiers (Jenny *et al.*, 1999)



A : Génome A fourni par *Musa acuminata* Colla
 B : Génome B fourni par *Musa balbisiana* Colla
 S : Génome S fourni par *Musa schizocarpa* Simmonds
 T : Génome T fourni par *Musa textilis* Née

Tableau 1 : Classification et répartition géographique des principaux bananiers cultivés
 (Bakry *et al.*, 1997)

Sous-groupe	Cultivars	Type de fruit	Distribution
Groupe AA			
• Sucrier	Pisang Mas, Frayssinette Figue sucrée	dessert sucré	tous continents
• Pisang Lilin	----	dessert	Indonésie, Malaisie
• Pisang Berangan	----	dessert	Indonésie, Malaisie
• Lakatan	----	dessert	Philippines
Groupe AAA			
• Cavendish	Lacatan, Poyo, Williams Grande Naine, Petite Naine	dessert	pays exportateurs
• Gros Michel	Gros Michel, Highgate, Cocos	dessert	tous continents
• Figue Rose	Figue Rose rose, Figue Rose verte	dessert	Philippines, Pacifique, Antilles
• Lujugira	Intundu, Mujuba	à bière, à cuire	Afrique de l'Est
• Ibota	Yangambi km 5	dessert	Indonésie, Afrique
Groupe AB			
• Ney Poovan	Safet Velchi, Sukari	dessert acide	Inde, Afrique de l'Est
Groupe AAB			
• Figue Pomme	Maçà, Silk	dessert acide	tous continents
• Pome	Prata	dessert acide	Inde, Malaisie, Australie, Brésil, Afrique de l'Ouest
• Mysore	Pisang Ceylan	dessert acide	Inde
• Pisang Kelat	Pisang Kelat	dessert	Inde, Malaisie
• Pisang Rajah	Pisang Rajah Bulu	à cuire	Malaisie, Indonésie
• Plantains	French, Corne, Faux Corne	à cuire	Afrique du Centre et de l'Ouest, Caraïbe, Amérique latine
• Popoulou	Popoulou	à cuire	Pacifique
• Laknao	Laknao	à cuire	Philippines
• Pisang Nangka	Pisang Nangka	à cuire	Malaisie
Groupe ABB			
• Bluggoe	Bluggoe, Matavia, Poteau, Cacambou	à cuire	Philippines, Caraïbe, Amérique latine
• Pelipita	Pelipita	à cuire	Philippines, Amérique latine
• Pisang Awak	Fougamou	dessert	Thaïlande, Inde, Philippines, Afrique de l'Est
• Peyan	----	à cuire	Philippines, Thaïlande
• Saba	Saba	à cuire	Philippines, Indonésie, Malaisie
Groupe AAA	Champa Nasik	dessert	----

Figure 6 : Représentation schématique d'un bananier (Champion, 1963)

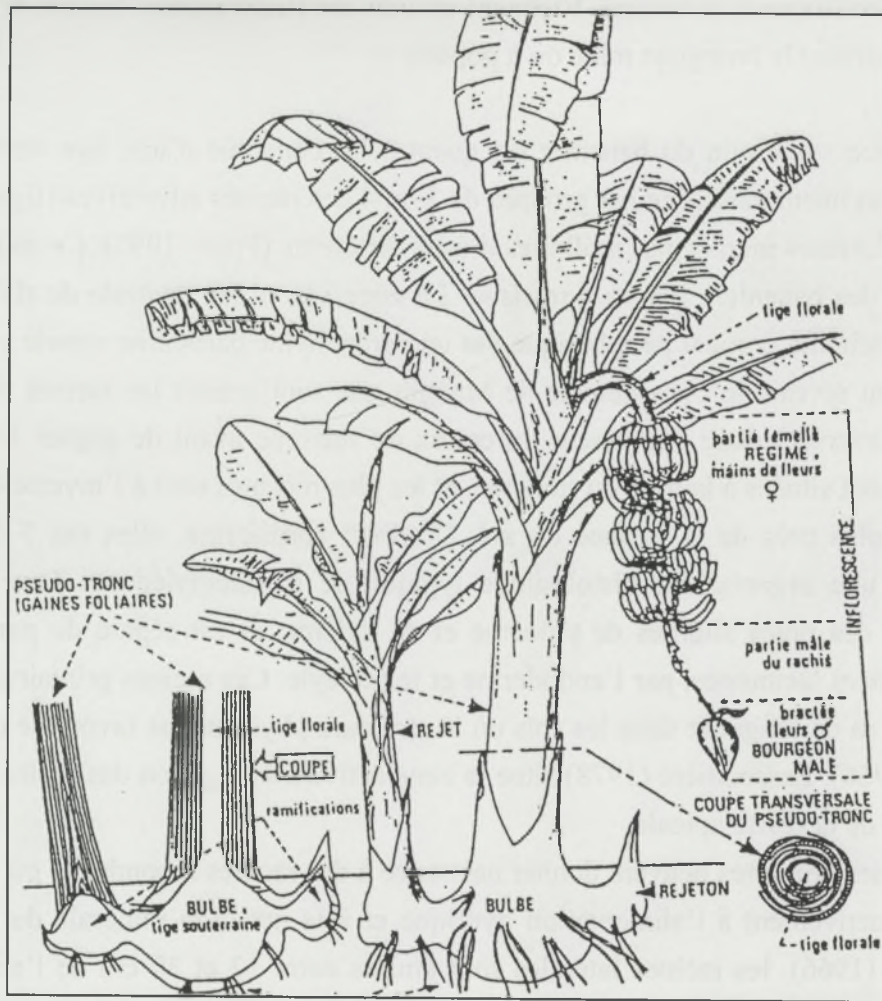
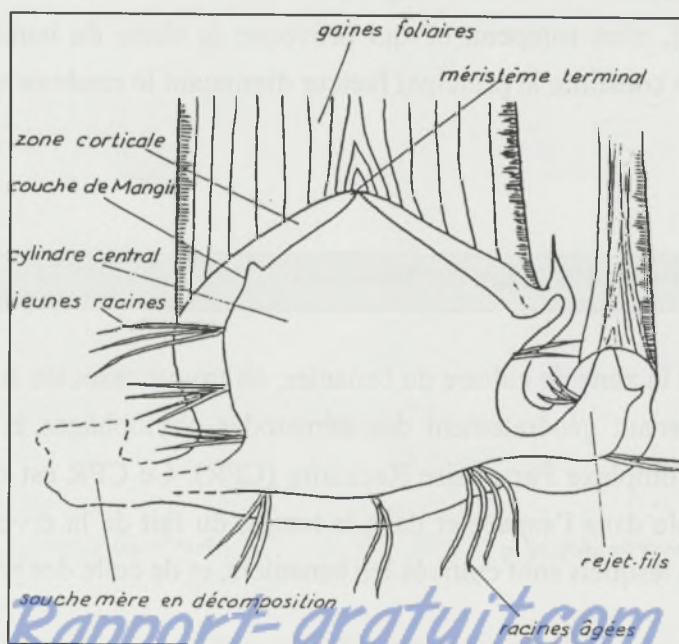


Figure 7 : Coupe transversale d'un rhizome de bananier (Lassoudière, 1978)



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

donnera le fruit consommé, la banane. Viennent ensuite des fleurs mâles formant ce que l'on appelle communément le bourgeon mâle ou « popotte ».

Le système souterrain du bananier est quant à lui constitué d'une tige vraie réduite (rhizome) d'où prennent naissance par groupes de 3 ou 4 des racines adventives (figure 7). Ce rhizome porte plusieurs méristèmes axillaires d'âges différents (Price, 1995). Ce sont eux qui sont à l'origine des bananiers fils ou « rejets ». La zone vasculaire centrale du rhizome est séparée du parenchyme cortical périphérique par un parenchyme particulier appelé couche de Mangin. C'est au niveau de cette couche de Mangin que sont émises les racines primaires. Ces dernières traversent donc l'épaisseur du cortex du rhizome avant de gagner le sol. Les plus anciennes sont situées à la base du rhizome, et les plus récentes sont à l'inverse celles qui sont émises le plus près de la surface du sol. D'aspect cordiforme, elles ont 5 à 10 mm d'épaisseur, et une organisation histologique typique de monocotylédone. Leur cylindre central contient des pôles alternés de phloème et de xylème, et est séparé du parenchyme cortical aux espaces lacunaires, par l'endoderme et le péricyle. Ces racines primaires peuvent atteindre 5 à 10 m de longueur dans les sols où la structure physique est favorable (Beugnon et Champion, 1966). Lassoudière (1978) situe la zone active d'élongation des racines environ 5 mm en arrière de la coiffe apicale.

Les racines primaires peuvent donner naissance à des racines secondaires ou tertiaires, qui participent activement à l'alimentation hydrique et à la nutrition minérale du bananier. D'après Riopel (1966), les racines latérales sont émises entre 12 et 30 cm de l'apex d'une racine primaire.

En plus de ces fonctions trophiques et hydriques, les racines assurent l'ancrage du bananier dans le sol. Lorsqu'elles sont fragilisées sous l'effet de contraintes physiques ou biotiques (parasitisme), elles rompent, ce qui provoque la chute du bananier. Price (1995) indique que cette chute constitue le principal facteur diminuant le rendement en bananeraies.

2.2 Le Complexe Parasitaire Racinaire des bananiers

Quelle que soit la zone de culture du bananier, on trouve associée au système racinaire une biocénose comprenant généralement des nématodes phytophages et des champignons telluriques : c'est le Complexe Parasitaire Racinaire (CPR). Ce CPR est quantitativement et qualitativement variable dans l'espace et dans le temps, du fait de la diversité des contextes pédo-climatiques dans lesquels sont cultivés les bananiers, et de celle des pratiques culturales.

2.2.1 Les nématodes endoparasites

Plusieurs genres et espèces de nématodes de biologie très différente sont à l'origine des peuplements nématologiques associés aux racines du bananiers (Gowen et Quénéhervé, 1990). Certains provoquent des lésions nécrotiques sur les racines et le rhizome des bananiers et à terme la chute des plants atteints. L'espèce endoparasite *Radopholus similis* (famille des *Pratylenchidae*) représente l'une des espèces de nématodes les plus dommageables pour le bananier.

2.2.2 Les champignons telluriques

- *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

La « maladie de Panama » est la plus grave maladie tellurique du bananier. Elle est due au complexe *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Après une phase purement tellurique, ces champignons pénètrent les racines et gagnent le xylème causant ainsi une trachéomycose qui entraîne le flétrissement de la plante. Cette maladie a détruit plus de 40000 ha de bananiers dans les années 1960, obligeant l'industrie bananière d'exportation à quasiment abandonner les triploïdes AAA du sous-groupe Gros-Michel, au profit de ceux du sous-groupe Cavendish (Ploetz et Pegg, 1999). Certaines races affectent cependant ces derniers (Bentley *et al.*, 1998).

- Les pourridiés

Une seconde catégorie de champignons affectent le système souterrain des bananiers en occasionnant de véritables pourritures de racines ou de rhizomes, ou les deux à la fois. Ce sont essentiellement des Armillaires (Jones et Stover, 1999) et des *Rosellinia* spp. (Jones, 1999). Leur incidence n'a été rapportée que de façon occasionnelle et locale.

- Les champignons associés aux lésions nécrotiques racinaires (Root Rot Fungi)

Une première catégorie de ces champignons est formée par ceux qui sont considérés comme des colonisateurs secondaires de nécroses (parasites de faiblesse) et ceux dont l'implication dans le déterminisme des nécroses est mal définie. Plusieurs inventaires dont la plupart sont déjà anciens en ont été réalisés (Goos et Timonin, 1962 ; Brun et Laville, 1965 ; Stover, 1966 ; Loridat, 1989). En plus des *Fusarium oxysporum* non pathogènes qui sont des agents communs de la rhizosphère des bananiers, ce sont surtout *Fusarium solani* ainsi que

Fusarium spp., *Rhizoctonia* spp., *Cylindrocarpon musae* qui sont cités, et plus rarement des pythiacées telles que *Pythium* et *Phytophthora* spp. Ces champignons sont impliqués aussi bien dans les nécroses affectant les racines primaires que dans celles qui occasionnent le noircissement et la mort des fines racines latérales nourricières (Jones et Stover, 1999).

Leur rôle exact dans l'étiologie des nécroses est d'autant moins défini, que leur présence est simultanée à celle de communautés plurispécifiques de nématodes phytophages, dont certaines espèces sont reconnues comme des parasites à part entière du système racinaire du bananier (Gowen et Queneherve, 1990). Ponctuellement, certains d'entre eux ont pu être désignés comme capables de générer des dégâts seuls, en l'absence de ces nématodes, mais dans des conditions particulières, comme sur de très jeunes plants (Stover, 1966). Dans d'autres cas comme par exemple dans celui de *Cylindrocarpon musae*, le statut de pathogène de blessure a pu clairement être établi (Booth et Stover, 1974). D'une manière générale, ces champignons sont essentiellement considérés comme des envahisseurs secondaires de nécroses générées par les nématodes endoparasites du bananier, leur action étant plus décrite comme un facteur d'extension supplémentaire des nécroses, que comme un facteur causal (Blake, 1961 ; Mateille et Folkertsma, 1991). Leur effet serait renforcé dans les sols très argileux, de structure compacte, ou en situations hydromorphes (Jones et Stover, 1999). D'après Mateille et Folkerstma (1991), l'association dans une même nécrose d'une espèce donnée de champignons et d'une espèce particulière de nématodes serait aléatoire.

Une seconde catégorie de champignons associés aux lésions racinaires est représentée par les champignons du genre *Cylindrocladium*. Mis en évidence de façon formelle pour la première fois à la Martinique (Loridat, 1986), ils se comportent comme de véritables parasites primaires en étant capables de pénétrer directement dans les racines, et d'y provoquer d'importantes lésions nécrotiques qui altèrent l'ancrage des bananiers et favorisent sa chute.

2.3 L'interaction *Cylindrocladium* / bananier / sol

2.3.1 Le contexte agronomique des premières mentions de *Cylindrocladium* chez les bananiers

Au milieu des années 1980 fut signalée aux Petites Antilles une baisse flagrante de productivité dans les systèmes intensifs monocultureux à base de bananiers. Les chutes de rendement étaient d'importance variable, mais pouvaient atteindre près de 30% dans les bananeraies installées sur sols récents peu altérés. Un diagnostic de la fertilité fut alors entrepris dans ces systèmes intensifs, sous forme d'enquêtes dont les résultats furent publiés

de 1987 à 1992 (Delvaux et Guyot, 1989 ; Loridat, 1989 ; Delvaux, Perrier et Guyot, 1990 ; Dorel et Perrier, 1990).

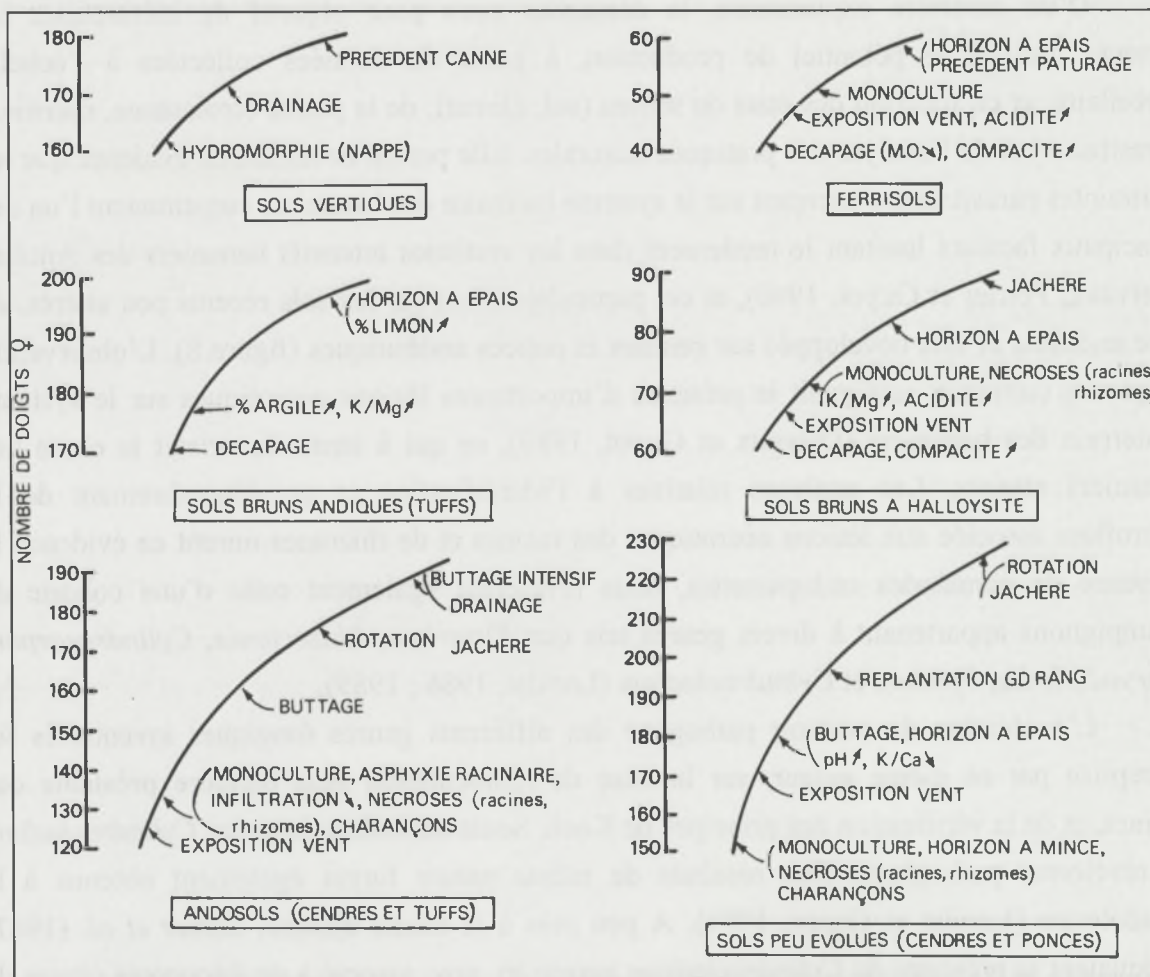
D'un caractère exploratoire, la démarche avait pour objectif de hiérarchiser les facteurs limitant le potentiel de production, à partir de données collectées à l'échelle parcellaire, et en fonction des états du milieu (sol, climat), de la plante (croissance, nutrition, parasitisme) et de l'analyse des pratiques culturales. Elle permit de mettre en évidence que les contraintes parasitaires s'exerçant sur le système racinaire des bananiers constituaient l'un des principaux facteurs limitant le rendement dans les systèmes intensifs bananiers des Antilles (Delvaux, Perrier et Guyot, 1990), et ce, particulièrement sur les sols récents peu altérés, de type andosols et sols développés sur cendres et ponces andésitiques (figure 8). L'observation de profils culturaux soulignait la présence d'importantes lésions nécrotiques sur le système souterrain des bananiers (Delvaux et Guyot, 1989), ce qui à terme favorisait la chute des bananiers atteints. Les analyses relatives à l'identification et au dénombrement de la microflore associée aux lésions nécrotiques des racines et de rhizomes mirent en évidence la présence de nématodes endoparasites, mais révélèrent également celle d'une cohorte de champignons appartenant à divers genres tels que *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpon*, *Botryodiplodia*, *Pythium* et *Cylindrocladium* (Loridat, 1986 ; 1989).

L'évaluation du pouvoir pathogène des différents genres fongiques inventoriés fut entreprise par ce même auteur, sur la base de réinoculation sans blessure préalable des racines, et de la vérification des principes de Koch. Seuls les isolats du genre *Cylindrocladium* se révélèrent pathogènes. Des résultats de même nature furent également obtenus à la Guadeloupe (Loridat et Ganry, 1991). A peu près à la même époque, Semer *et al.* (1987) indiquaient la présence de *Cylindrocladium musae* sp. nov. associé à de fréquentes chutes de bananiers dans les plantations du Costa-Rica.

2.3.2 La méconnaissance des espèces impliquées chez les bananiers

En plus de la Martinique et du Costa-Rica, la présence de champignons du genre *Cylindrocladium* est aujourd'hui signalée sur bananiers aussi bien en Guadeloupe, qu'en Côte d'Ivoire (Kobenan, 1991), ou au Cameroun (Castaing *et al.*, 1996). Un autre inventaire du parasitisme tellurique sur bananiers mené en Caraïbe anglophone dans les années 1994-95 signale également la présence de champignons du genre *Cylindrocladiella* associés à des nécroses racinaires (Fagan, Lubin et Williams, 1995). Compte-tenu des confusions taxinomiques ayant longtemps entaché les deux genres (voir § 1.3), il n'est pas exclus de penser, sous réserves de vérification, qu'il puisse en réalité s'agir de *Cylindrocladium*.

Figure 8 : Schéma illustrant la hiérarchie des facteurs limitants le rendement en bananeraies dans différentes zones pédo-climatiques de la Martinique (Delvaux, Perrier, et Guyot, 1990)



Le nombre de doigts femelles traduit le potentiel de rendement

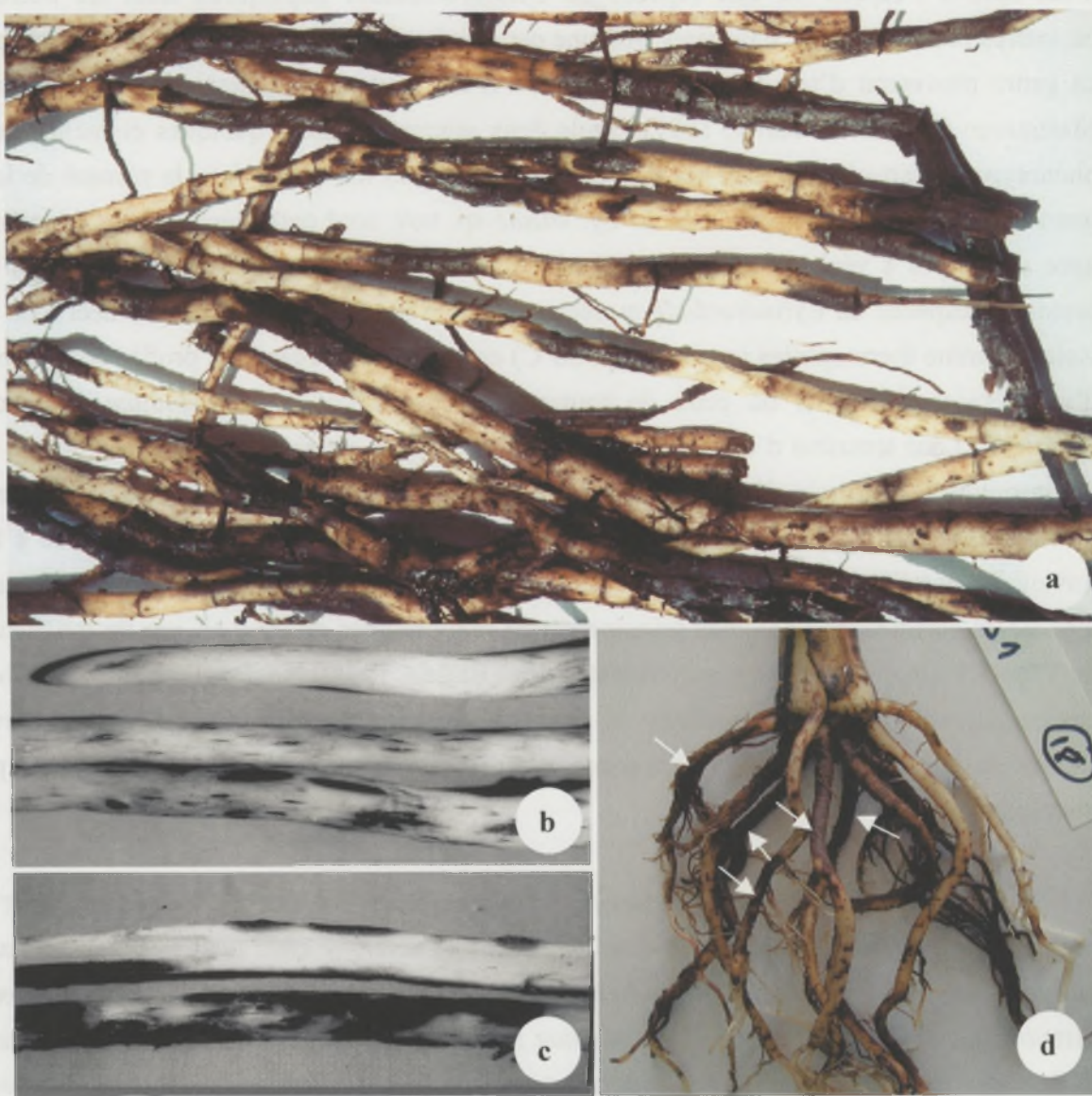
Dans la plupart des situations géographiques évoquées ci-dessus, aucune référence n'est faite à l'espèce ou aux espèces de *Cylindrocladium* impliquées dans les nécroses racinaires et les chutes de bananiers. Aucune caractérisation n'est faite non plus des isolats de ce genre provenant d'une trentaine de variétés d'une collection génétique de bananiers en Martinique (Loridat et Ganry, 1991). Seuls deux auteurs amènent quelques éléments sur le phénotype des souches qu'ils isolent. Semer *et al.* (1987) indiquent dans le résumé de leurs travaux que les isolats costaricains de *Cy. musae* sp. nov. sont pathogènes, et les dépeignent avec des stipes à vésicule terminale sphérique, et des conidies plus longues de 37 % que toutes les espèces de *Cylindrocladium* décrites jusque là. Ces mêmes auteurs décrivent ces isolats comme thermophiles (croissance à 36°C) et comme possédant des profils protéiques et d'isoestérases différents de ceux de toutes les espèces de *Cylindrocladium* à vésicule sphérique. Leur tentative d'obtention du stade téléomorphe est restée vaine. Il ne nous a pas été possible d'obtenir le détail des travaux de ces auteurs. Par ailleurs, la nouvelle espèce qu'ils ont définie n'a jamais été validée, et aucune suite ne semble avoir été donnée à leur travail. En parallèle, nous avons décrit des isolats de Martinique comme ayant des vésicules terminales clavates, des conidies principalement monoseptées de 69 à 86 µm de longueur et de 5.6 à 6.2 µm de largeur sur milieu malt à 1% (Risède, 1994). Nous avons alors rapproché ces caractéristiques morphologiques de celles de l'espèce *Cy. pteridis*, mais sans pouvoir statuer de façon définitive, en l'absence d'utilisation d'autres types de marqueurs plus discriminants.

La comparaison des caractéristiques des isolats du Costa-Rica et de ceux de Martinique suggère qu'il existerait donc une certaine diversité chez les Cylindrocladium du bananier, mais aucun travail de synthèse ne permet de la répertorier, ni d'en apprécier la distribution. Un travail de ce type constitue pourtant une étape incontournable en vue de définir des méthodes de diagnostic performantes, et des stratégies de contrôle qui soient raisonnées.

2.3.3 Symptomatologie et conséquences pour le bananier

Au champ, les symptômes induits par les champignons du genre *Cylindrocladium* sont rarement dissociés de ceux des autres composantes du Complexe Parasitaire Racinaire, et en particulier de ceux des nématodes et des colonisateurs fongiques secondaires. Lors des enquêtes-diagnostic menées aux Antilles françaises, les lésions nécrotiques rougeâtres à noirâtres qui sont associées au CPR sont décrites comme étant localisées d'une part sur les rhizomes à la base des rejets et au niveau des points d'insertion des racines primaires, et

Figure 9 : Lésions nécrotiques sur racines de bananiers



a : Lésions nécrotiques dues au Complexe Parasitaire Racinaire (racines provenant du champ)

b-d : Lésions nécrotiques sur racines de vitroplants de bananiers inoculées en conditions contrôlées par *Cylindrocladium* sp. ; b : Symptômes initiaux : lésions ponctuelles évoluant en tirets ; c : lésions oblongues affectant l'épaisseur du parenchyme cortical ; d : lésions engainantes (flèches blanches)

d'autre part sur les racines. Plusieurs types de nécroses sont observées : Des nécroses ponctuelles, des nécroses en tirets (1-5 mm de long), et des lésions plus importantes (1 à 2 cm de long) ainsi que des plages coalescentes affectant tout le pourtour de portions de racines. Ces nécroses affectent parfois toute l'épaisseur du parenchyme cortical. Dans de tels cas, l'ancrage des bananiers est affecté, et les chutes deviennent nombreuses, occasionnant par là même, une perte directe pour les producteurs par réduction du nombre de plants productifs par unité de surface.

Les symptômes produits lors d'expérimentations en conditions contrôlées associant un substrat préalablement désinfecté à la vapeur, un plant sain issu de culture in vitro et l'isolat à tester renseignent plus directement sur la symptomatologie induite par les champignons du genre *Cylindrocladium* sur bananier. Ces symptômes s'initient par des nécroses rouges à brun noir qui sont d'abord ponctuelles, puis évoluent en tirets, avant de prendre ensuite une forme oblongue, puis de devenir engainantes (figure 9). Ils affectent aussi bien les rhizomes que les divers types de racines (primaires, secondaires, ...). Ils s'étendent parfois à toute la longueur d'une racine. Loridat (1989) et Loridat et Ganry (1991) soulignent en particulier une destruction importante des racines secondaires et des racines les plus fines (« chevelu racinaire »). Ces auteurs enregistrent des réductions de biomasse racinaire de l'ordre de 50% par rapport à des plants sains non inoculés.

En utilisant un dispositif expérimental de même nature et des doses croissantes de microsclérotés produits de façon axénique à partir d'un isolat à vésicule clavate, Risède (1994) obtient des réductions de poids frais total, de poids frais racinaire, et de surface de la dernière feuille émise statistiquement significatives au seuil de 5%. Ces réductions représentent des écarts de respectivement 24%, 31%, ou 30% par rapport à des plants témoins non inoculés. Dans le même temps, les plants inoculés exhibent des nécroses racinaires de même type que celle décrites par Loridat (1989), atteignant 40 à 60% de la surface du système racinaire quelques semaines après l'inoculation. Elles ne touchent que le parenchyme cortical, et pas le cylindre central. Notons que ces symptômes sont similaires à ceux décrits pour les nématodes endoparasites sur bananiers, ce qui suggère que des symptômes attribués pendant des décennies à ces derniers aient aussi pu être le fait de champignons du genre *Cylindrocladium*.

La pathogénie d'isolats de *Cylindrocladium* sur bananiers a également été confirmée par la suite, avec les travaux de Kobenan (1991) et Castaing *et al.* (1996). *Cependant, dans ce type d'expérimentations, compte-tenu de la systématique compliquée de ces champignons, aucune donnée n'a été fournie jusqu'ici sur la nature des espèces inoculées, ni sur la variabilité de leur pouvoir pathogène.*

2.3.4 Données fragmentaires sur le processus infectieux et le cycle biologique

Les travaux de pathogénie réalisés par les différents auteurs précédemment cités indiquent qu'aussi bien le mycélium que les conidies ou les microsclérotés sont infectieux. Schadeck (1997) montre que *Cylindrocladium* sp. a des sites préférentiels de pénétration dans les racines de bananiers. Ce sont principalement les zones situées immédiatement à l'arrière des apex racinaires, et celles où s'effectuent les ramifications racinaires. Les premiers symptômes visibles à l'œil nu apparaissent 20 heures après l'infection sous forme de brunissement ponctuel. Ces premiers résultats méritent d'être complétés par des analyses biochimiques et histopathologiques plus fines afin d'acquérir une meilleure connaissance du processus infectieux.

La progression du mycélium infectieux dans le parenchyme cortical des racines de bananiers aboutit très fréquemment à la formation de microsclérotés, qui constituent, comme cela a été décrit par ailleurs (§1.2.1), la principale unité de conservation chez des isolats de *Cylindrocladium* décrits comme ayant une vésicule clavate (Risède, 1994 ; 1995). L'observation microscopique des colonies formant unités (c. f. u) dans les boîtes d'isolement direct de *Cylindrocladium* sp. à partir de sol de bananeraies (Risède, 1995) révèle qu'elles ont deux origines : des microsclérotés bien individualisés, et des microsclérotés encore enfouis dans des débris de matière organique végétale. Cela suggère que les tissus racinaires de bananier infectés par *Cylindrocladium* puissent constituer une source d'inoculum secondaire, en relâchant dans la rhizosphère des microsclérotés contaminants, au fur et à mesure de leur dégradation dans le sol. Cette hypothèse est confortée par le fait que les densités d'inoculum en *Cylindrocladium* sont plus élevées à l'aplomb des bananiers c'est à dire là où la densité de racines est la plus forte, qu'à 1.50 m de ces derniers dans les inter-rangs (Risède, 1995). Il n'existe pas à notre connaissance d'études documentant l'existence d'hôtes secondaires impliqués dans le cycle biologique de *Cylindrocladium* parasitant le bananier.

La dissémination de ces champignons s'effectue au travers de la diffusion et de l'utilisation de matériel végétal de plantation contaminé (souches et rejets de bananier). C'est le type de matériel végétal qui a été utilisé de façon majoritaire pendant des décennies, avant le recours aux plants sains issus de culture *in vitro*.

Notons enfin que le stade téléomorphe *Calonectria* n'a jamais été observé au champ, même sur des vieux débris racinaires.

Il est flagrant, une fois de plus, que ces résultats méritent d'être complétés, en particulier par une meilleure connaissance de la biologie de l'espèce ou des espèces de Cylindrocladium impliquées dans le déterminisme des lésions nécrotiques racinaires du bananier.

2.3.5 Distribution spatiale en fonction des types de sols - réceptivité des sols à *Cylindrocladium* sp.

Dans une étude réalisée en Martinique, Risède (1995) démontre que les *Cylindrocladium* trouvés en bananeraies ont une distribution différentielle selon les types de sols. Les densités sont élevées (jusqu'à 36 u. f. c. par g de sol sec) dans les sols récents de texture grossière, et à l'opposé faibles dans les sols de texture fine, en particulier dans les lourds vertisols à montmorillonite (0-4 u. f. c.). Lors de l'évaluation en conditions contrôlées de la réceptivité de différents sols à un isolat de *Cylindrocladium* à vésicule terminale sphérique isolé de Guadeloupe, Schadeck et Risède (1997) ont montré que les sols étudiés génèrent des potentiels infectieux (Bouhot, 1980) très différents puisqu'il faut une dose d'inoculum (microsclérotés) dix fois plus importante dans un vertisol que dans un andosol, pour générer des potentiels infectieux équivalents (figure 10).

L'identification des facteurs liés aux sols ou aux bananiers qui sont susceptibles de conditionner la distribution des champignons *Cylindrocladium* fait l'objet d'une thèse préparée par S. Schadeck à l'Université Catholique de Louvain (Belgique).

2.3.6 Autres facteurs influençant le développement des nécroses racinaires à *Cylindrocladium*

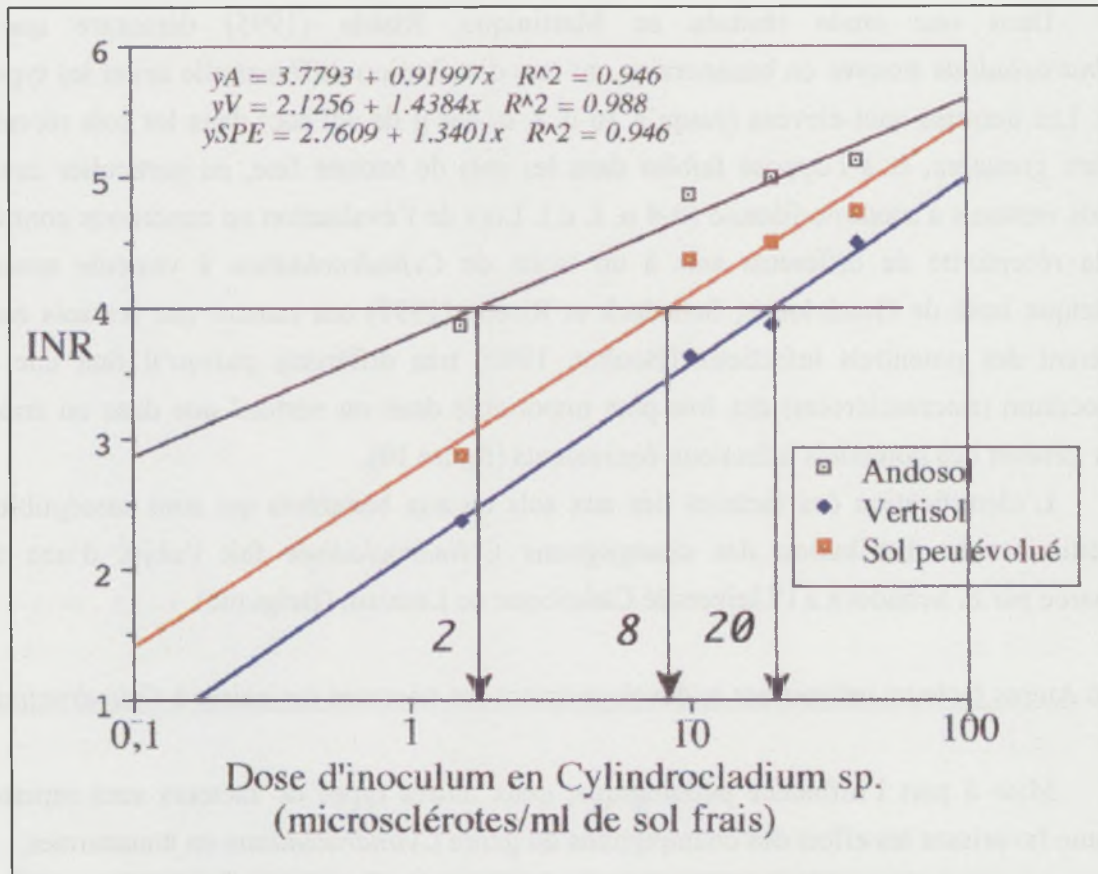
Mise à part l'influence pédologique, deux autres types de facteurs sont répertoriés comme favorisant les effets des champignons du genre *Cylindrocladium* en bananeraies.

Le premier d'entre eux a déjà été évoqué indirectement. Il s'agit de la pratique de la monoculture continue à l'aide de cultivars sensibles. Compte-tenu de la multiplication des microsclérotés dans les tissus racinaires et de leurs persistance dans les sols pendant plusieurs années, la monoculture alimente en effet de façon continue le stock de ces propagules infectieuses dans les sols. Nous avons montré qu'il fallait des rotations culturales d'au moins 4 à 6 ans pour réduire de façon conséquente les densités d'inoculum dans un sol réceptif (Risède, 1995).

Le second type de facteur est d'ordre biotique et concerne les interactions des champignons *Cylindrocladium* avec une composante majeure du CPR, les nématodes endoparasites. Lorigat et Ganry (1991) puis Castaing *et al.* (1996) ont montré par des inoculations factorielles en serre que la dynamique et l'importance des dégâts causés sur bananier par un isolat de *Cylindrocladium* étaient modifiés en présence du nématode *R. similis*. Les protagonistes provoquent des dégâts similaires, mais avec une dynamique différente. Les symptômes sont précoces pour *Cylindrocladium* sp., et plus tardifs pour le nématode. Ces symptômes sont plus importants quand *R. similis* et *Cylindrocladium* sp. sont inoculés de façon simultanée.



Figure 10 : Relations entre densité d'inoculum en *Cylindrocladium* sp. et potentiel infectieux (Schadeck et Risède, 1997)



Le potentiel infectieux des sols est mesuré ici par un indice de nécroses racinaires

Là encore, dans ces études, aucune mention n'est faite des espèces de *Cylindrocladium* étudiées.

2.3.7 Méthodes de lutte

A partir d'expérimentations menées en serre, Semer et al (1987) ont recommandé l'utilisation de Bénomyl (Benzimidazoles) et de Prochloraz pour lutter contre *Cy. musae*. A notre connaissance, la lutte chimique contre les *Cylindrocladium* des bananiers n'est cependant pas pratiquée. En l'absence de connaissances organisées sur les caractéristiques biologiques des espèces impliquées, l'accent est plutôt mis aux Antilles françaises sur la prophylaxie sanitaire et en particulier l'utilisation de matériel de plantation sain issu de culture *in-vitro*. Une valorisation des zones pédo-climatiques les moins réceptives aux champignons *Cylindrocladium* et aux dégâts qu'ils provoquent pourrait également constituer une stratégie culturale supplémentaire.

L'utilisation d'agents de contrôle biologique est prometteuse, non pas à court terme, mais peut-être à moyen terme. Sutra, Risède et Gardan (2000) ont identifié des *Pseudomonas fluorescens* qui exercent *in-vitro* une activité antagoniste contre un isolat de *Cylindrocladium* provenant de bananier. Par ailleurs, un projet européen de recherches étudie actuellement les possibilités d'utiliser l'endomycorhization précoce du vitroplant de bananier à l'aide de Glomales, comme moyen de contrôle alternatif des parasites telluriques des bananiers, parmi lesquels les champignons du genre *Cylindrocladium* (Delvaux, 2000).

A ce stade de notre revue bibliographique, il est utile de rappeler qu'une des difficultés récurrentes auxquelles sont confrontés les phytopathologistes travaillant avec les champignons du genre *Cylindrocladium* est l'identification problématique de ses espèces. Nous avons en effet vu qu'il existe plusieurs complexes d'espèces similaires sur le plan morphologique au sein de ce genre. Pour développer des solutions appropriées à ce problème d'identification, il nous a paru utile de faire le point sur l'importance de la diversité chez les champignons phytopathogènes et sur les outils utilisés pour révéler et évaluer cette diversité, en accordant une attention particulière à l'application de ces outils à la systématique fongique. C'est en effet cette approche raisonnée qui devrait nous permettre de mettre en œuvre les outils adéquats pour la caractérisation des espèces de *Cylindrocladium*.

3. La diversité chez les champignons pathogènes des plantes : distribution, origines, et outils d'évaluation

3.1 Une diversité fongique dimensionnée à l'échelle de la planète

Selon les spécialistes de la diversité fongique, il existerait aujourd'hui sur terre environ 1,5 millions d'espèces différentes de champignons (Hawksworth, 1991 ; Rossman, 1994). Seules 74000 d'entre elles, soient moins de 5 % des espèces existantes, seraient connues (Hawksworth, 2001). Chez ces dernières, le taxon des Ascomycètes est le plus important non seulement en termes de nombre d'espèces, mais aussi en termes d'applications médicales, pharmaceutiques, ou nutritionnelles (Hawksworth et Mouchacca, 1994). Estimant que le ratio espèce / genre est le même chez les Ascomycètes décrits que chez les Ascomycètes non décrits, Hawksworth et Mouchacca (1994) jugent qu'il existerait donc chez ce seul groupe, 62000 genres et 669000 espèces non encore décrits. Evaluant à environ 1700 le nombre d'espèces fongiques décrites chaque année par les systématiciens, ces auteurs indiquent qu'il faudrait donc pas moins de 390 ans pour décrire les seuls Ascomycètes ! Même si ces chiffres sont nécessairement entachés de biais liés à la définition même du concept d'espèces chez les champignons ou à des déterminations erronées (cas des taxa similaires sur le plan morphologique), ils témoignent bien de l'immensité du monde connu et inconnu des champignons.

3.2 Une diversité omniprésente chez les champignons parasites des plantes

Le nombre d'espèces fongiques connues pour être des agents pathogènes des plantes est estimé à 8000 par Agrios (1988). Price (1987) indique qu'à l'instar des autres micro-organismes phytoparasites, les champignons ont par leur temps de génération courts et leurs effectifs larges mais variables (dans le temps et dans l'espace), un potentiel évolutif rapide qui a probablement facilité la divergence des populations et la spéciation.

La plante hôte représente pour une espèce fongique phytopathogène aussi bien un habitat qu'une source de nourriture, et les stratégies de parasitisme développées pour l'exploiter sont diverses. Burdon (1993) distingue par exemple 3 grandes catégories de champignons parasites : Il y a les «killers» qui tuent rapidement la plante par des fontes de semis (*Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp.) ou des trachéomycoses. Il y a ensuite les champignons qui affectent la fécondité de la plante en infectant principalement les inflorescences et les organes reproducteurs, ce sont les «castrators» comme les charbons floraux ou l'ergot des

céréales. Et enfin, il y a ceux qui l'affaiblissent de façon chronique («debilitators») avec des lésions limitées, comme les mildious et la plupart des rouilles.

Cette diversité fongique se retrouve également au niveau de la spécificité de la relation entre l'hôte et son parasite. Dans certains cas cette relation est hautement spécialisée et qualifiée de « gène pour gène » (Flor, 1956). A l'opposé, chez les champignons de genres comme *Colletotrichum*, il y a souvent absence de spécificité fine, et on a affaire des espèces parasites avec un large spectre d'hôtes. Sur le plan trophique, la relation Hôte/Parasite se décline également sur des modes variables allant du biotrophe (strict ou facultatif) au nécrotrophe. En cas d'interaction compatible, elle génère différents types d'infection allant de celle qui est systémique, à celle qui reste très localisée et ne touche que certains tissus ou organes végétaux.

Chez les champignons phytopathogènes, on trouve également une grande diversité dans les modes de dissémination, de conservation, ainsi que dans les stratégies de reproduction. Certains cycles biologiques se caractérisent par des alternances complexes de niveaux de ploïdie, de phases parasites et saprophytes, ou par des successions d'intensité variable de phases de reproductions sexuée et asexuée.

Comme chez d'autres organismes, le support de cette diversité omniprésente chez les champignons phytopathogènes est l'abondante variabilité génétique existant dans leurs populations.

3.3 Les origines de la diversité fongique

Les mutations spontanées et la recombinaison - sexuée ou somatique - sont les 2 processus majeurs introduisant de la variabilité génétique chez les champignons phytopathogènes (figure 11), leur action étant complétée par celle de la migration et du « flux de gènes » qui en résulte (Burdon et Silk, 1997).

Les mutations spontanées peuvent être à l'origine de l'apparition de nouveaux variants dans une population et pas dans une autre. Elles sont d'origine génique, mais sont aussi fréquemment liées aux réarrangements chromosomiques (Zolan, 1995). Leur contribution à la diversité fongique est liée à leur taux d'apparition (taux de mutation), au niveau de ploïdie du pathogène, à la taille de la population considérée, ainsi qu'à l'avantage sélectif conféré par le phénotype mutant (Burdon et Silk, 1997).

Figure 11 : Schéma des forces évolutives générant de la variabilité génétique au sein des populations fongiques phytopathogènes (Burdon et Silk, 1997)

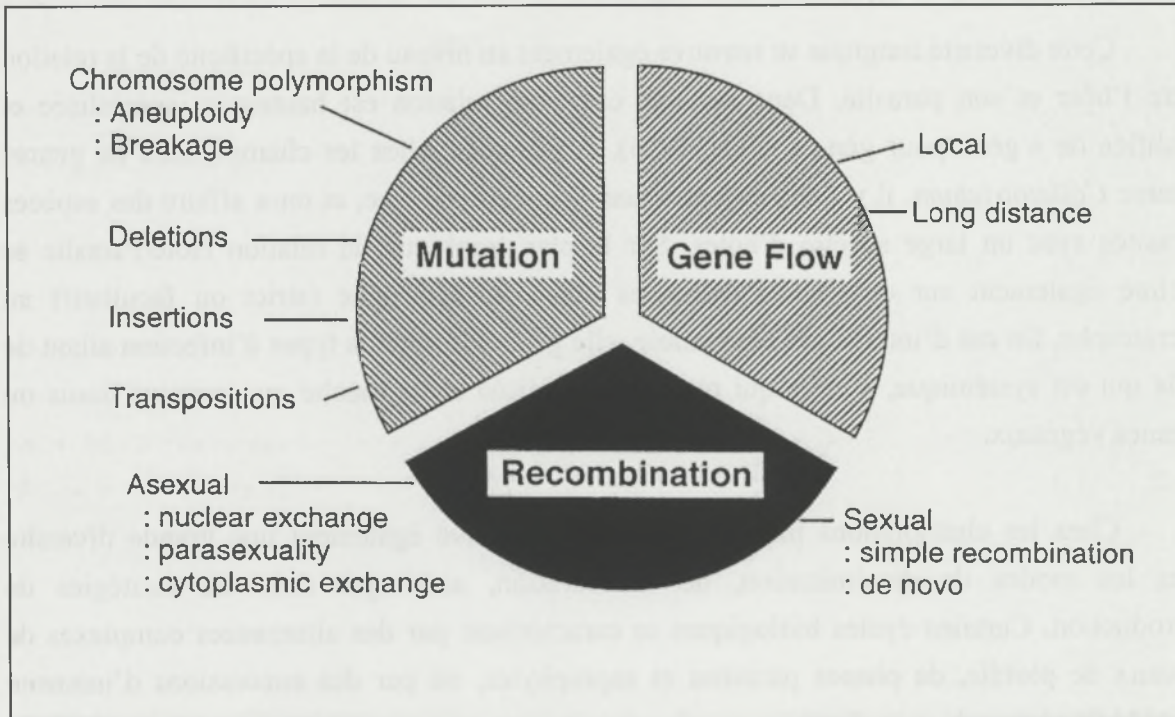
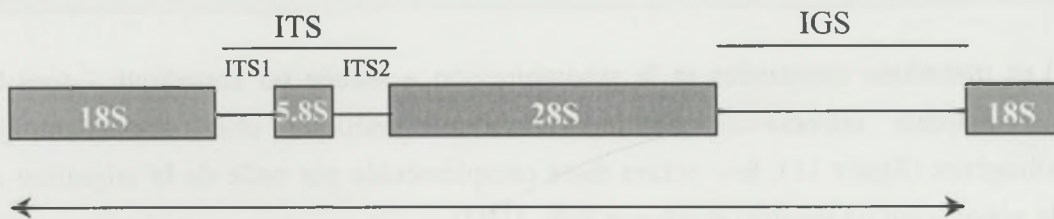


Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation d'un motif répété en tandem de l'ADNr



Motif ribosomique de base répété plusieurs dizaines à plusieurs centaines de fois

. Les sous-unités 18S, 5.8S et 28S (codent pour les ARNs ribosomiques) sont séparés par les espaces ITS (Internal Transcribed Spacer) et IGS (Intergenic Spacer)

La recombinaison s'effectue d'une part au travers de la méiose pendant la reproduction sexuée, et d'autre part grâce à l'hybridation somatique. La recombinaison sexuée provoque à chaque génération une augmentation significative de la diversité génotypique, en produisant de nouvelles combinaisons de gènes (et/ou d'allèles) comme par exemple de nouveaux pathotypes capables de contourner les gènes de résistance de l'hôte déployés par l'homme dans le cadre de la sélection variétale. La recombinaison consécutive à l'hybridation somatique génère quant à elle de la variation génétique grâce à la mise en commun de noyaux de nature différent par hétérocaryose après anastomose des hyphes fongiques. Chez les champignons phytopathogènes, elle s'accompagne fréquemment d'échanges de facteurs extra-nucléaires d'origine cytoplasmique tels que plasmides, ADN_{mt}, et ARNs bicaténaires, certains étant impliqués dans l'hérédité du pouvoir pathogène (Nuss, 1993). L'hybridation somatique peut être en théorie renforcée par le déroulement complet du cycle parasexuel, mais l'existence de ce dernier, reste encore à démontrer de manière indiscutable (Burdon and Silk, 1997).

Le troisième processus majeur introduisant de la variabilité génétique dans les populations phytopathogènes est la migration. Elle est généralement définie comme l'échange ou le mouvement de gamètes, d'individus et de populations à une échelle géographique donnée. Ce mouvement de gènes (et de leurs allèles) d'une population fongique à l'autre s'effectue au travers de souches ou de sous-populations immigrantes disséminées par les différents types d'inoculum fongique (spores de reproduction sexuée ou asexuée, mycélium, sclérotes, ...).

La variabilité génétique produite par les mutations, la recombinaison et la migration est également soumise à d'autres forces évolutives comme la sélection naturelle et la dérive génétique (Leung, Nelson et Leach, 1993). La sélection ne retient que les individus et les populations les mieux adaptés aux conditions environnementales locales. La dérive, qui est en fait la variation aléatoire des fréquences alléliques, est un phénomène touchant les populations isolées, et est par exemple induite lors de leur réduction de taille (suite, par exemple, à un événement climatique saisonnier) ou lors de la fondation d'une population colonisant un nouveau milieu.

Tous ces processus évolutifs qui génèrent puis alimentent la diversité fongique s'exercent de concert localement, mais avec des contributions relatives qui sont variables d'une population fongique à l'autre. Leur impact relatif et les mécanismes qui les sous-tendent ont été revus par différents auteurs dont Burdon et Silk (1997), Milgroom et Fry (1997), McDonald et McDermott (1993).

3.4 Les marqueurs phénotypiques, outils traditionnels d'évaluation de la diversité fongique

Un marqueur de diversité est un caractère que l'on utilise pour décrire et mesurer comment se structure la variabilité au sein d'un ensemble d'individus (sous-populations, populations, espèces, taxa supérieurs). Il se doit donc d'être stable dans le temps, et si possible indépendant de l'environnement. On distingue globalement deux grandes catégories de marqueurs : les marqueurs moléculaires, et ceux qui ne le sont pas.

Chez les champignons comme chez les autres organismes vivants, les marqueurs phénotypiques ont historiquement été les premiers types de marqueurs à avoir été utilisés. Ils résultent de l'interaction entre un génotype et un environnement donnés. Ce sont donc typiquement des marqueurs d'expression du génome, et sont de ce fait sensibles aux influences environnementales (Mills, Sreenivasaprasad et Muthumeenakshi, 1998). Ils peuvent donc ne pas toujours refléter la dissimilarité des populations et la différenciation génétique (McDonald, 1997), et simplement révéler des adaptations à des conditions de milieu. Chez les champignons, ils sont principalement utilisés en systématique, pour le diagnostic, et plus rarement dans les études épidémiologiques. Passons en revue les principaux marqueurs phénotypiques de la diversité fongique.

3.4.1 Les caractères cultureux et morphologiques

L'aspect général du thalle, les caractéristiques de forme, de taille et de couleur des spores de reproduction (sexuée ou asexuée) ou celles des sporocystes et fructifications qui leur sont associés, sont les tous premiers marqueurs de la diversité que les mycologistes aient utilisé pour structurer la diversité fongique et en discriminer les taxa. L'espèce mitosporique *Fusarium oxysporum* est circonscrite par toute une série de critères morphologiques (Nelson, Toussoun et Marasas, 1983) dont les principaux sont la forme des macroconidies, la structure des microconidiophores, la formation et la disposition des chlamydospores (Gordon et Martyn, 1997). Chez le genre Oomycète *Phytophthora*, les espèces sont traditionnellement reconnues sur la base des groupes morphologiques de Waterhouse (1963) basés sur la papillation et la caducité des sporanges, le mode d'attachement amphigyne ou paragyne de l'anthéridie à l'oogone. De tels critères morphologiques ou cultureux sont encore fréquemment utilisés en pratique par de nombreux pathologistes surtout pour les identifications de routine. Au cours de la dernière décennie, avec le développement ou le perfectionnement de nouvelles techniques analytiques comme la microscopie à balayage ou la microscopie confocale, les systématiciens ont même complété ou affiné ces critères en accordant une attention croissante au développement et à l'ultrastructure de certains organes. La systématique actuelle des Ascomycètes s'appuie par exemple sur l'ultrastructure des septa

(Kimbrough, 1994) et l'ontogenèse de l'ascocarpe (Letrouit-Galinou, Parguey-Leduc et Janex-Favre, 1994 ; Parguey-Leduc *et al.*, 1994).

Les marqueurs morphologiques sont utilisés essentiellement à des fins taxinomiques. Chez les champignons comme chez tous les organismes vivants, ils peuvent permettre la distinction de taxa éloignés, mais sont rarement suffisamment nombreux et informatifs pour discriminer des organismes ou des individus proches, ou pour révéler du polymorphisme au sein d'une population. Par leur nature phénotypique, chacun ne révèle qu'une petite part de la diversité fongique, et du fait des phénomènes de convergence morphologique qui sont fréquents chez les champignons (Bruns, White et Taylor, 1991), ils ne permettent pas d'établir sans risque les relations phylogénétiques entre différents organismes ou taxa fongiques (Samuels et Seifert, 1995). Alors que l'évolution parallèle provoque des changements de même nature dans des taxa ayant un ancêtre commun, l'évolution convergente induit des changements similaires dans des groupes sans parenté phylogénétique (pas d'ancêtre commun). En systématique, elle peut donc conduire à la définition erronée de taxa, sans filiation naturelle. La communauté scientifique tend de plus en plus à valider l'utilisation des marqueurs morphologiques en testant leur validité à l'aide de marqueurs d'autres types, en particulier les marqueurs moléculaires.

3.4.2 Les marqueurs physiologiques et biochimiques

Les principaux marqueurs biochimiques et physiologiques de la diversité fongique sont les vitesses de croissance des thalles, les polysaccharides pariétaux, les métabolites secondaires, et les isozymes.

- Vitesse de croissance

Tout comme les marqueurs morphologiques, la mesure de la vitesse de croissance du thalle fongique en relation avec la recherche des *preferenda* et *extrema* thermiques, est l'un des critères les plus simples utilisés par les pathologistes dans le recensement de la diversité fongique. Ce type de critère souffre cependant des mêmes limites que les marqueurs morphologiques et peut se révéler très peu discriminant chez certains groupes fongiques.

- Polysaccharides pariétaux

L'occurrence, la composition et la structure chimique de certains polysaccharides de la paroi fongique sont variables. Plusieurs auteurs ont exploité ces caractéristiques, en utilisant ces polysaccharides comme marqueurs chimio-taxinomiques de la diversité fongique en particulier à des niveaux supraspécifiques (Bartnicki-Garcia, 1968). En s'appuyant sur la similarité de structure des polysaccharides pariétaux de représentants des genres *Calonectria* et *Cylindrocladium*, Ahrazem *et al.* (1997) ont par exemple confirmé le lien de parenté holomorphique entre ces 2 genres. L'utilisation des polysaccharides pariétaux chez les champignons phytopathogènes reste à notre connaissance, peu fréquente.

- Métabolites secondaires

Ce sont pour la plupart des pigments, des composés volatiles ou antibiotiques, et des «toxines» (au sens le plus large du terme) produits en culture pure ou lors de la pathogenèse, mais dont la fonction métabolique n'est pas toujours clairement identifiée. Certains sont utilisés à des fins taxinomiques, et d'autres dans le cadre d'études du pouvoir pathogène chez les champignons parasites des plantes. Chez le genre *Cochliobolus*, la race 1 de l'espèce *C. carbonum* (ex *Helminthosporium carbonum*, téléomorphe *Bipolaris zeicola*) produit un térapeptide cyclique, la HC Toxine, qui ne lui confère la virulence que sur les génotypes de maïs homozygotes récessifs au locus nucléaire *hm* (Pringles et Scheffer, 1967 ; Walton, Earle et Gibson, 1982). Cette HC toxine n'est produite par aucune autre race de *C. carbonum* ni par aucune autre espèce de *Cochliobolus*, et discrimine donc cette race 1. L'utilisation des métabolites secondaires comme marqueurs de la diversité fongique reste cependant limitée car d'une part leur production et leur régulation, autrement dit, leur stabilité est sous la dépendance étroite des conditions de culture des champignons, et d'autre part ils nécessitent des méthodes analytiques relativement lourdes (Mantle, 1994).

- Isozymes

Ce sont des enzymes assurant les mêmes fonctions catalytiques mais dont les séquences en acides aminés varient. Leur polymorphisme de séquence est révélé par leurs différences de mobilité électrophorétique. Les isozymes ont beaucoup été utilisés pour révéler la diversité interspécifique (Cruickshank et Pitt, 1987 ; Louanchi, 1993) et plus rarement intra-spécifique (Michelmores et Hulbert, 1987). Généralement considérés comme sélectivement neutres (McDermott et McDonald, 1993), ce sont des marqueurs majoritairement codominants, permettant donc de distinguer chez les champignons diploïdes, les hétérozygotes des homozygotes. Le typage de la diversité par les isozymes suppose que les champignons étudiés soient cultivables *in-vitro* et que la fonctionnalité des systèmes

enzymatiques soit conservée. Cette contrainte de fonctionnalité limite de fait la variabilité qu'ils peuvent révéler. Par ailleurs, certaines activités enzymatiques sont dépendantes du stade de développement de l'organisme étudié et du milieu (notamment celle du milieu de culture fongique), ce qui affecte la stabilité et la reproductibilité de ce type de marqueurs. Notons enfin que le nombre de systèmes enzymatiques utilisés pour cribler la diversité des champignons phytopathogènes reste peu élevé (une quinzaine) (Michelmore et Hulbert, 1987), ce qui limite le potentiel de révélation du polymorphisme par les isozymes.

3.4.3 Spécificité d'hôtes et spectres de virulences, résistance aux fongicides

- Spécificité d'hôtes et spectres de virulence

La spécificité d'hôtes a souvent été utilisée par les pathologistes pour différencier certaines populations au sein d'une même espèce fongique. Ce critère a par exemple servi à révéler l'existence de spécificités parasitaires liées à l'hôte attaqué (*formae speciales*). Cependant, pour révéler et mesurer la variabilité génétique présente au sein des populations, on a recherché des spectres de virulences ou «pathotypes». Ceux-ci sont détectés à l'aide d'une gamme de variétés/cultivars comportant différents gènes de résistance (Leung, Nelson et Leach, 1993). La virulence est définie ici comme une aptitude qualitative du champignon pathogène à contourner une résistance spécifique de l'hôte (également qualifiée de «verticale»), résistance qui lui est conférée par un gène unique. D'un point de vue génétique, une telle réaction de compatibilité s'inscrit généralement (mais pas exclusivement) dans le cadre du modèle gène pour gène défini par Flor (1956) pour l'interaction *Melampsora lini/Linum usitatissimum*. A un gène d'avirulence de l'agent pathogène ayant deux allèles virulence et avirulence correspond un gène de résistance de l'hôte à deux allèles, résistance et sensibilité. Les spectres de virulence constituent un méthode d'analyse de la diversité fongique fort utile, mais plutôt lourde à mettre en œuvre du fait du grand nombre potentiel de pathotypes pouvant être révélés (théoriquement 2^n pathotypes pour n plantes différentielles), de l'indispensable maîtrise des conditions environnementales lors des inoculations, et de la laborieuse construction de la gamme différentielle d'hôtes à tester. Celle-ci doit être constituée de lignées quasi isogéniques sauf en ce qui concerne les facteurs de résistance testeurs (Leung, Nelson et Leach, 1993)

- Résistance aux fongicides

En réponse à une pression fongicide soutenue, des individus présentant une sensibilité moindre, voire une résistance à ce fongicide peuvent être sélectionnés au sein d'une

population fongique. La détection de tels phénotypes résistants s'effectue généralement soit au laboratoire à l'aide de milieux de culture amendés de fongicides, ou en serre d'après l'évolution des lésions après application du fongicide. L'analyse de la distribution spatio-temporelle de ces phénotypes résistants, par exemple la répartition des classes d'inhibition de croissance par le fongicide au sein des populations fongiques étudiées permet d'identifier les caractéristiques de la résistance (persistante ou non persistante, croisée ou non croisée, ...) et d'adapter les modalités de la lutte chimique en raisonnant le choix des molécules fongicides à appliquer, ainsi que les zones et périodes d'applications.

Les spectres de virulence et la résistance aux fongicides ont en commun d'être des marqueurs sélectionnés (car soumis à une forte pression de sélection). Ils ne donnent probablement qu'une estimation biaisée (en l'occurrence une sous-estimation qui ne concerne souvent que peu de locus) du potentiel de changement génétique présent dans les populations pathogènes (McDonald et McDermott, 1993). Cette part de la diversité génétique globale qu'ils révèlent trouve son intérêt dans la prédiction du risque phytosanitaire et la gestion des populations fongiques phytopathogènes et, plus rarement dans les études de génétique des populations pathogènes.

3.4.4 Les types de compatibilité sexuelle et les groupes de compatibilité végétative

Chez les champignons, le type sexuel et la compatibilité végétative gouvernent des systèmes régulant la reconnaissance du soi et du non-soi (Glass et Kulda, 1992). Ils peuvent donc être utiles pour discriminer la variabilité génétique présente au sein des populations.

- Types sexuels

Les types sexuels sont des marqueurs de la diversité pouvant être utilisés en taxinomie et dans les études épidémiologiques, et ce, malgré le faible polymorphisme qu'ils révèlent généralement. Chez beaucoup de champignons les quelques locus déterminant le type sexuel ont deux ou peu d'allèles, à l'exception notable de l'agent causal du charbon du maïs *Ustilago maydis* qui possède 20 allèles au locus b de compatibilité sexuelle (Leung, Nelson et Leach, 1993). L'analyse de la distribution des types sexuels au sein des populations pathogènes hétérothalliques ainsi que celle de leur lien avec d'autres marqueurs de la diversité permettent néanmoins d'augurer du potentiel évolutif des populations, et donc d'intégrer dans les stratégies de contrôle les changements de structure génétique des populations pathogènes.

- VCG (Vegetative Compatibility Groups)

Au sein d'une population fongique donnée, la compatibilité végétative est l'aptitude qu'ont deux isolats à anastomoser leurs hyphes par fusion somatique, puis à effectuer une plasmogamie par mise en commun de leurs constituants cytoplasmiques pour enfin former un hétérocaryon stable. Cette hétérocaryose est fréquente chez les champignons, et elle constitue la phase préliminaire au cycle parasexuel (Debets, 1998). Présument sélectivement neutres, les groupes de compatibilité végétative (VCG) sont surtout utilisés comme des marqueurs de la diversité à une échelle subsécifique. Ils permettent de détecter la similarité génétique à l'intérieur des populations, mais sans en donner de réelle mesure et sans fournir d'informations génétiques sur la parenté des isolats qui sont non compatibles. Avant l'avènement des marqueurs moléculaires, ils ont été souvent utilisés pour l'identification de lignées clonales, en particulier chez les champignons mitosporiques comme par exemple *Rhizoctonia solani* (Vilgalys et Cubeta, 1994) ou *Fusarium oxysporum* (Tantaoui *et al.*, 1996 ; Alves-Santos *et al.*, 1999). Leur mise en œuvre est limitée par une mise en œuvre lourde des tests de criblage des hétérocaryons, souvent basés sur la complémentation de mutants d'auxotrophie, comme les mutants *nit* (non nitrate utilizing mutants, Puhalla, 1985).

3.5 Les marqueurs moléculaires

Considérés comme sélectivement neutres, les marqueurs moléculaires correspondent à des régions de l'ADN que l'on exploite à l'aide d'outils appropriés de la biologie moléculaire pour révéler et mesurer la variabilité génétique. L'une de leurs caractéristiques majeures est qu'au contraire des marqueurs morphologiques ou de tout autre marqueur traditionnel, ils révèlent du polymorphisme génétique directement au niveau de l'ADN. Ils sont donc indépendants de l'environnement ou du milieu de culture fongique. Ils sont par ailleurs bien plus nombreux que les marqueurs phénotypiques et permettent une mesure précise de la diversité génétique (Nei et Li, 1979 ; Maclean *et al.*, 1993). Ils ont quatre domaines majeurs d'application : la systématique et la phylogénie, le diagnostic des maladies et la détection des champignons pathogènes (dans les plantes ou le sol), la structure génétique des populations et l'épidémiologie, et enfin, les études sur les bases moléculaires de l'interaction hôte / parasite ou sur l'héritabilité et la cartographie de locus. Quoique complémentaires et pouvant faire appel à des marqueurs moléculaires de même nature, les objets de ces champs d'application sont fondamentalement différents (Milgroom et Fry, 1997). Le tableau 2 donne quelques exemples d'utilisation de marqueurs moléculaires chez les champignons.

Tableau 2 : Exemples d'utilisation de marqueurs moléculaires pour l'analyse de la diversité chez les champignons phytopathogènes

Domaines d'applications	Champignons phytopathogènes / Hôtes	Marqueurs moléculaires	Références
Systématique et phylogénie	<i>Ceratocystis</i> spp.	PCR-RFLP de la région ITS (ADN _r)	Witthuhn <i>et al.</i> , 1999
	<i>Claviceps</i> spp. / sorgho	PCR et séquences de l'intron 3 du gène de la β -tubuline et de l'intron 4 du gène du facteur d'élongation de traduction 1 α (EF1 α)	Tooley <i>et al.</i> , 2001
	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2	Séquences de la région ITS (ADN _r)	Salazar <i>et al.</i> , 1999
	<i>Phytophthora</i> spp. et Oomycètes proches	Séquences de la région ITS (ADN _r)	Cooke <i>et al.</i> , 2000
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> / bananier	PCR et séquences du gène nucléaire du facteur EF1 α et du gène mtSSU de l'ADN _r	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998
Diagnostic	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 / Pomme de terre	SCAR dérivés de RAPD (Détection sur tissus et sol infectés)	Bounou <i>et al.</i> , 1999
	<i>Phytophthora medicaginis</i> / Luzerne	PCR et Séquençage de la région IGS2 (ADN _r) (D.I.P. sur tiges et racines infectées)	Liew, Maclean et Irwin, 1998
	<i>Verticillium tricorpus</i> / Pomme de Terre	PCR quantitative sur la région ITS (D.I.P. sur tiges infectées par <i>V. tricorpus</i>)	Moukhamedov <i>et al.</i> , 1994
Structure génétique des populations Et Epidémiologie	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> / bananier	Différentes sondes RFLP monolocus d'ADN nucléaire	Carlier, 1996
	Hybrides naturels de <i>Phytophthora nicotianae</i> et de <i>P. cactorum</i>	RAPD	Man in 't Veld <i>et al.</i> , 1998
	Complexes d'espèces à <i>Leptosphaeria maculans</i> / Colza	Rep-PCR	Jedryczka, Rouxel et Balesdent, 1999
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> / Palmier-dattier	Sondes RFLP d'ADNmt et transposon Fot 1, RAPD	Tantaoui <i>et al.</i> , 1996
Bases moléculaires de l'interaction Hôte / Parasite, héritabilité, cartographie	<i>Cylindrocladium macrosporum</i>	PCR avec amorces dégénérées	Nikolskaya <i>et al.</i> , 1995

D.I. P. : Diagnostic *in Planta*

Nous ne passerons pas en revue ici les nombreuses techniques relatives à la mise en œuvre des différents types de marqueurs moléculaires existants. Pour cela, le lecteur est invité à se reporter à de Vienne et Santoni (1998). Indiquons cependant que l'on peut globalement distinguer deux grandes catégories de marqueurs moléculaires : ceux qui sont codominants et révélés individuellement, et ceux qui sont dominants et révélés en masse. Ces deux catégories de marqueurs détectent chacune du polymorphisme de séquence ou du polymorphisme du nombre d'unités de répétitions. Au sein des marqueurs codominants et révélés individuellement, ceux révélant du polymorphisme de séquences sont mis en évidence soit directement par le biais du séquençage, soit de manière indirecte par des différences de sites de restriction (marqueurs RFLP et marqueurs CAPS) ou encore des différences de conformation de brins d'ADN (marqueurs SCCP). Parmi les marqueurs révélant du polymorphisme du nombre d'unités de répétitions, il y a les STMS (microsatellites). Les marqueurs dominants et révélés en masse les plus utilisés dans les études de diversité fongique sont les RAPD (Williams *et al.*, 1990) et les AFLP (Vos *et al.*, 1995).

Avec l'avancée des techniques de biologie moléculaire, le nombre des marqueurs moléculaires utilisables se multiplie. Le polymorphisme de taille et de nombre de chromosomes qui est extrêmement commun chez les champignons (Kistler et Miao, 1992) est par exemple mieux exploité grâce aux techniques d'électrophorèse en champ pulsé (Masel *et al.*, 1990). Utilisé chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* agent de la maladie de Panama chez les bananiers, ce type de marqueurs a permis de révéler que ce champignon était en fait un complexe d'espèces fongiques dont le nombre de chromosomes varie de 9 à 14, avec une taille totale de génome de 32.1 à 58.9 Mb (Boehm, Ploetz et Kistler, 1994). Autre exemple, les marqueurs Rep-PCR (Repetitive sequence based-PCR) qui exploitent, grâce à la PCR (Saiki *et al.*, 1985) le polymorphisme de séquences localisées entre les séquences répétées dispersées de type REP, ERIC et BOX (Gilson *et al.*, 1984 ; Hulton, Higgins et Sharp, 1991 ; Martin *et al.*, 1992).

Tous ces marqueurs n'ont ni la même facilité de mise en œuvre, ni la même résolution. Ainsi, malgré le fait qu'il donne directement accès aux séquences nucléotidiques, le séquençage reste une technique non compatible avec l'analyse routinière d'un grand nombre d'individus et de locus.

Les RFLP, les STMS ou les AFLP requièrent quant à eux une expertise technique certaine, et présentent aussi certaines contraintes (gels d'acrylamide, et recours fréquent à des produits marqués pour les RFLP et les AFLP). D'autres marqueurs comme les CAPS ou les RAPD sont moins contraignants sur le plan technique. En termes de résolution, dans le cas des RFLP selon le type de sonde employée, on révèle soit un locus particulier, soit de nombreux locus simultanément (empreintes génétiques). Les sondes choisies dans les régions

très conservées de l'ADNr comme le gène 18S ou le gène 5.8S révèlent généralement du polymorphisme permettant de discriminer les taxa fongiques supérieurs (classes, ordres, familles, voir les genres). Les sondes définies dans des locus plus variables ou des ADN évoluant plus rapidement comme par exemple l'ADNmt servent plutôt à comparer des espèces proches ou à détecter de la variabilité intraspécifique (Duncan *et al.*, 1998).

Les marqueurs CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) (ou PCR-RFLP) sont plus faciles à mettre en œuvre que les marqueurs RFLP. Ils sont souvent appliqués à l'ADNr nucléaire. L'agencement particulier de l'ADNr en régions conservées alternant avec des régions plus variables est certainement à la base du succès de son utilisation dans les études de diversité chez les champignons (Figure 12). Les séquences conservées des gènes 18S, 5.8S et 28S servent à la définition d'amorces oligonucléotidiques dites universelles destinées à amplifier les régions plus polymorphes que sont les espaces ITS et IGS (Bruns, White et Taylor, 1991) (Figure 13). Les marqueurs CAPS sont en particulier souvent utilisés en systématique moléculaire et en phylogénie où ils servent à différencier les genres ou espèces fongiques, mais aussi à révéler la diversité intraspécifique.

Les marqueurs RAPD, Rep-PCR, et les STMS sont surtout utilisés pour l'étude de la diversité à un niveau infraspécifique.

4. Brève revue des apports des marqueurs moléculaires à la systématique des champignons phytopathogènes

Dès ses débuts, la systématique fongique, c'est à dire la classification hiérarchisée des champignons a été fondée sur la similitude phénotypique des individus. Elle a donc pendant longtemps surtout reposé sur la morphologie des organes sexuels et de leurs structures associées, celle des organes de conservation, ainsi que celle des spores et sporocystes issus de la reproduction asexuée (Maclean *et al.*, 1993). La ressemblance ou la dissemblance morphologique des organismes étudiés était le plus souvent laissée à l'appréciation personnelle des systématiciens. En plus du faible nombre de marqueurs fournis par la morphologie, ce type d'approche basée le plus souvent sur l'empirisme avait le désavantage de ne pas intégrer la phylogénie des taxa, c'est à dire l'origine et la filiation évolutive des groupes fongiques, et celui de ne pas permettre, la plupart du temps, de distinguer les effets de l'évolution convergente de ceux de l'évolution parallèle, ou alternativement ceux d'une divergence morphologique très rapide (Blackwell et Spatafora, 1994). Il en a donc résulté plusieurs assemblages taxinomiques totalement artificiels (Spatafora et Blackwell, 1994).

Figure 13 : Amorces universelles pour l'amplification PCR de régions variées de l'ADNr chez les champignons (White *et al.*, 1990)

rRNA	GenePrimer ^a	Product Size (bp) ^b	T _m (°C) ^c
Nuclear, small			
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	555	56
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC		68
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	597	68
NS4	CTCCGTCAATTCCTTTAAG		56
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	310	57
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC		65
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	377	65
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA		65
Nuclear, ITS			
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290	65
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	315	63
ITS2	GCTGCGTTCCTTCATCGATGC	290	62
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	330	62
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		58
Mitochondrial, small			
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	716	65
MS2	GCGGATTATCGAATTAATAAC		63
Mitochondrial, large			
ML1	GTACTTTTGCATAATGGGTCAGC	253	68
ML2	TATGTTTCGTAGAAAACCAGC		63
ML3	GCTGGTTTTCTACGAAACATATTTAAG	934	67
ML4	GAGGATAATTTGCCGAGTTCC		68
ML5	CTCGGCAAATTATCCTCATAAG	359	66
ML6	CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC		65
ML7	GACCCTATGCAGCTTCTACTG	735	63
ML8	TTATCCCTAGCGTAACTTTTATC		57

a : Séquences 5'-3' des amorces

b : Taille approximative des produits d'amplification

c : Température d'hybridation

Tableau 3 : Principaux indices de similarité sur variables présence ou absence : auteur, expression et propriétés (P = a+b+c+d) (Perrier, Flori et Bonnot, 1999)

	Auteurs	Expression	Propriétés*			
			(1)	(2)	(3)	(4)
S1	Russel et Rao	a / P	o	o	o	
S2	Simpson	$a / \min [(a+b),(a+c)]$	n		n	
S3	Braun-Blanquet	$a / \max [(a+b),(a+c)]$				
S4	Dice	$a / [a+(b+c) / 2]$	n		n	S7, S8
S5	Ochiai	$a / [(a+b)(a+c)]^{1/2}$	n		o	
S6	Kulczynsky 1	$(a / 2)([1 / (a+b)]+[1 / (a+b (a+c))])$	n		n	
S7	Jaccard	$a / (a+b+c)$	o	o	o	S4, S8
S8	Sokal et Sneath un2	$a / a+2(b+c)$	o	o	o	S4, S7
S9	Kulczynski 2	$A / (b+c)$				
S10	Sokal et Michener	$(a+d) / P$	o	o	o	S11, S12
S11	Rogers et Tanimoto	$(a+d) / a+d+2(b+c)$	o	o	o	S11, S12
S12	Sokal et Sneath un1	$(a+d) / [a+d+(b+c) / 2]$	n		n	S10, S11
S13	Sokal et Sneath un3	$(a+d) / (b+c)$				

* (1) La dissimilarité associée est (o) ou n'est pas (n) une distance, (2) elle est (o) ou n'est pas (n) une distance de Manhattan, (3) sa racine carrée est euclidienne (o) ou ne l'est pas (n), (4) elle est l'équivalente en ordre avec les indices indiqués (l'absence de mention indique que l'on ne connaît pas aujourd'hui la réponse).

4.1 Un support approprié aux méthodes de classification basées sur la taxinomie numérique

Les méthodes de biologie moléculaires ont révolutionné la manière de caractériser, d'identifier et de classer les champignons, en fournissant un très grand nombre de marqueurs comparés aux descripteurs morphologiques, et en renseignant directement sur la variabilité génétique au niveau de l'ADN, et ce, indépendamment de l'influence du milieu externe. Couplés aux méthodes de taxinomie numériques telles que la cladistique ou la phénétique, les marqueurs moléculaires constituent de puissants outils pour l'identification des champignons, particulièrement en systématique fongique. La phénétique permet une mesure objective de dissimilarité génétique des individus étudiés pris deux à deux. Il existe plusieurs indices de dissimilarités dont certains possèdent des propriétés remarquables de représentation sous forme d'arbres (Tableau 3). Les regroupements entre individus voisins s'effectuent sur la base de méthodes itératives (les plus connues sont UPGMA et Neighbor Joining) qui procèdent par agglomérations ascendantes successives, en construisant pas à pas de manière informatisée une représentation arborée de la structuration détectée (Perrier, Flori et Bonnot, 1999). Les méthodes cladistiques et apparentées (par exemple les méthodes de vraisemblances) ordonnent les individus étudiés sur la base de leurs relations de filiation évolutive (il y a donc une idée de hiérarchie) en ne tenant compte que des caractères hérités d'un ancêtre commun par opposition à ceux résultant de phénomènes de convergence (Hennig, 1966 ; Darlu et Tassy, 1993 ; Perrier, Flori et Bonnot, 1999). Les hypothèses *Ad hoc* sur la transformation des caractères sont minimisées à l'aide du critère de parcimonie (Tehler, 1994). Les cladogrammes qui en résultent peuvent alors être traduits en hypothèses phylogénétiques. L'application de ces 2 types de méthodes qui rappelons le sont indépendantes de toute assumption préliminaire sur le processus évolutif lui-même a profondément rationalisé les méthodologies de classification.

4.2 La confirmation de l'origine polyphylétique des « champignons » (*sensu lato*) au sein du monde vivant

Les champignons ont pendant très longtemps été considérés comme faisant partie du Royaume des plantes, jusqu'à ce que sur la base de considérations principalement écologiques ils soient érigés en Royaume à part entière (Whittaker, 1969 ; Brasier, 1997). Leur désignation binomiale (genre et espèce) d'origine linéenne est d'ailleurs encore régie par le Code International de nomenclature botanique. En systématique moléculaire, les régions les plus conservées de l'ADN_r sont très utilisées pour réévaluer la place des champignons au sein du monde vivant. L'analyse du polymorphisme de séquences de la sous-unité 16-18S de

Figure 14 : Arbre illustrant les relations phylogénétiques entre les 3 principaux Domaines du monde vivant à partir du polymorphisme de séquences de la petite sous-unité de l'ADNr (Carlile, Watkinson, et Gooday, 2001)

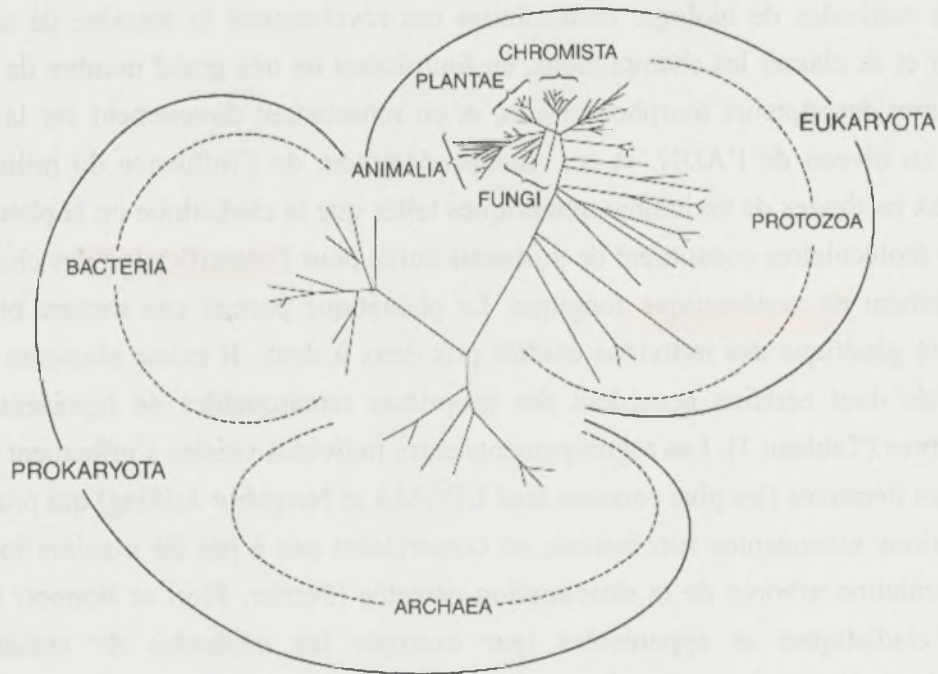
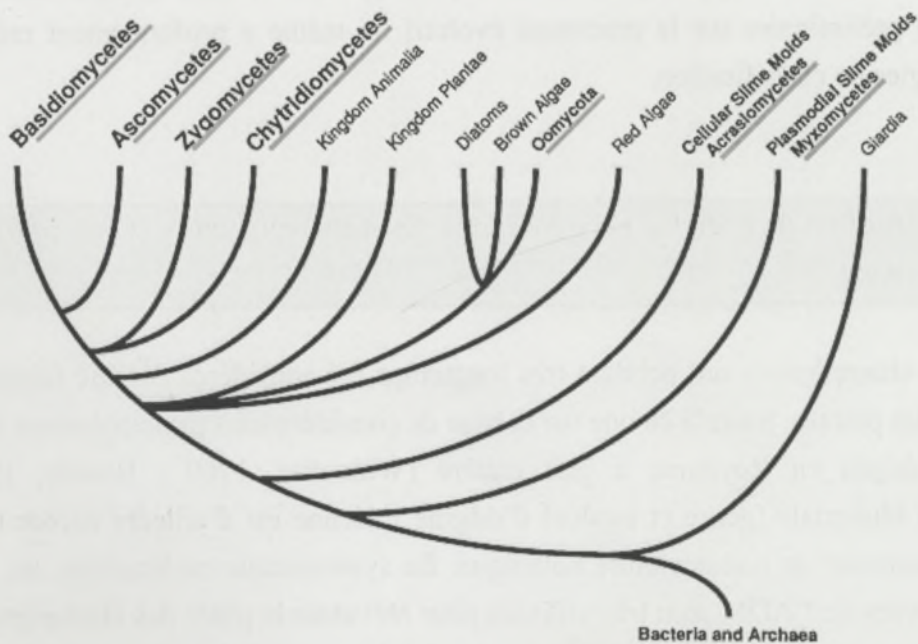


Figure 15 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences de la sous-unité 18S de l'ADNr et illustrant les relations entre les organismes traditionnellement étudiés par les mycologistes sous le vocable « champignons » (d'après Taylor, Swann et Berbee, 1994)



l'ADNr a permis de démontrer que les organismes vivants peuvent être répartis en 3 groupes principaux ou Domaines (figure 14). Les deux premiers sont procaryotes et rassemblent d'une part les bactéries et d'autre part les Archéobactéries. Le troisième domaine est eucaryote et comporte 5 royaumes à savoir les Animaux, les Plantes, les Chromistes (ou Straménopiles), les Protozoaires, et les Champignons. Au sein de ces eucaryotes, les « champignons » *sensu lato* qui sont traditionnellement examinés par les mycologistes constituent un assemblage non pas monophylétique (même origine évolutive), mais polyphylétique (figure 15). Ils appartiennent en effet à 3 royaumes différents, celui des Champignons, celui des Chromistes et enfin celui des Protozoaires (voir pour revue Bruns *et al.*, 1991 ; Förster *et al.*, 1990).

Dans le royaume des champignons, on trouve regroupés dans le même clade les champignons supérieurs (Ascomycètes, Basidiomycètes, et apparentés mitosporiques) et les champignons inférieurs (Zygomycètes et Chytridiomycètes). Ces champignons « vrais » font partie de la radiation terminale des grands groupes d'eucaryotes, intervenue il y a un milliard d'années (Taylor, Swann et Berbee, 1994). La place des Chytridiomycètes (micro-organismes flagellés) au sein de ce clade qui était déjà soupçonnée notamment grâce à l'analyse des polysaccharides pariétaux (Bartnicki-Garcia, 1970) est donc maintenant confirmée. Il faut par ailleurs relever que les plus proches parents des champignons *stricto-sensu* (Royaume des Champignons) sont donc les Animaux.

Le Royaume des Chromistes constitue un clade incluant les Oomycètes bien connus des phytopathologistes, et dont la parenté avec les Diatomées et les algues brunes (Chrysophycées) est ainsi clairement démontrée. Là encore, il y a une congruence certaine avec certains caractères phénotypiques (Bar, 1981), mais aussi avec l'analyse des séquences nucléotidiques d'un autre locus, le gène de la β -tubuline, protéine des microtubules (Weerakoon *et al.*, 1998).

Enfin, on trouve dans le Royaume des Protozoaires deux clades ayant divergé avant la radiation terminale des eucaryotes : d'une part un clade englobant les « mycétozoaires » de type plasmodial (plasmodial slime molds) et les Myxomycètes, et d'autre part un clade regroupant les « mycétozoaires » cellulaires (cellular slime molds) et les Acrasiomycètes.

4.3 Le réexamen des taxa fongiques supérieurs et de leurs origines phylétiques

Les zones conservées de l'ADNr, en l'occurrence les gènes 18S et 28S (Berbee et Taylor, 1994 ; Taylor, Swann et Berbee, 1994), mais aussi des régions déjà plus variables

comme l'espaceur ITS sont souvent utilisées pour préciser les relations phylogénétiques au sein ou entre les différentes classes fongiques ou leurs subdivisions (ordres, familles, genres...). Il est ainsi possible de réexaminer le poids jusqu'alors accordé à certains marqueurs morphologiques ou ontogénétiques comme par exemple les caractéristiques de l'ascocarpe et des asques, ou le développement du centrum chez les ascomycètes filamenteux (Blackwell et Spatafora, 1994 ; Spatafora et Blackwell, 1994). Mugnier (1998) a par exemple reconstruit la phylogénie des euascomycètes (Ascomycètes filamenteux) par analyse des séquences ITS, après amplification PCR avec les amorces universelles ITS1 et ITS4 définies par White *et al.* (1990). Que ce soit avec ce marqueur ou par l'analyse de séquences du gène 18S, les hypothèses taxinomiques engendrées par la morphologie ont souvent mais pas toujours été corroborées, ceci suscitant donc selon les cas de nouveaux éclairages ou de nouvelles controverses (Samuels et Seifert, 1995 ; Mugnier, 1998 ; Taylor, Jacobson et Fisher, 1999). Chez les Ascomycètes par exemple, certaines classes traditionnelles comme celles des Hémiascomycètes, des Plectomycètes et des Pyrénomycètes sont bien représentées par des clades monophylétiques. Cependant des résultats plus contradictoires sont enregistrés chez d'autres. Certains genres comme le genre *Taphrina* (dont un représentant bien connu est *T. deformans*, agent de la cloque du Pêcher), pourtant supposés membres des hémiascomycètes ne font pas partie du clade de ces derniers, et pourraient représenter des branches indépendantes chez les Ascomycètes.

4.4 Une dimension phylogénétique à la définition de l'espèce chez les champignons

Chez les champignons comme chez le reste du monde vivant, les concepts d'espèces ont constamment fait l'objet d'âpres controverses où se mêlaient aussi bien des considérations d'ordre scientifique, qu'historiques, philosophiques ou technologiques. Pendant de très nombreuses décennies, les espèces fongiques ont comme nous l'avons vu été définies essentiellement sur la base de critères morphologiques, malgré la faible polymorphisme révélé par ces derniers.

Cette prédominance du concept de l'espèce morphologique ou morpho-espèce a ensuite été remise en question, dans les années 1950, par la mise en avant du Concept de l'espèce biologique (C.E.B.) par certains évolutionnistes. Mayr (1982) définissait l'espèce biologique comme un ensemble de populations naturellement interfécondes ou potentiellement susceptibles de l'être, et qui sont isolées sur le plan reproductif d'autres ensembles similaires. Chez les champignons, la mise en œuvre du C.E.B s'est effectuée sur la base de la recherche de groupes d'interfertilité à l'aide de tests de compatibilité sexuelle

réalisés *in-vitro*. A l'instar de ce qui a été observé chez d'autres organismes, l'une des conséquences majeures induites par le C.E.B a été l'identification de complexes d'espèces biologiques (et ne se croisant donc pas entre elles) au sein des morpho-espèces, ainsi que nous l'avons vu chez certains taxa du genre *Cylindrocladium*. L'utilisation du C.E.B n'en présente pas moins de nombreuses limites chez les champignons. Le C.E.B est d'abord inapplicable aux champignons mitosporiques puisqu'ils ont justement la particularité de ne pas avoir de téléomorphe connue. Il est ensuite inadéquat aux champignons homothalliques puisque ceux-ci réalisent le cycle sexué sur le mode uniparental. De plus, et d'une manière générale pas seulement restreinte aux champignons, il est également difficile d'appliquer le C.E.B aux populations allopatriques, l'isolement reproductif dans la nature ne pouvant être testé que pour des populations sympatriques. Par ailleurs, l'interfertilité (*in-vitro*) entre des taxa allopatriques est connue chez différents champignons, certains auteurs indiquant qu'elle pouvait justement refléter l'absence de développement de mécanismes d'isolement reproductif après la séparation géographiques des populations (Brasier, 1997). Enfin, même chez certains champignons hétérothalliques, le C.E.B n'est pas non plus toujours facilement applicable du fait même que les barrières d'isolement reproductif peuvent n'être que partielles, comme chez l'exemple bien connu des espèces d'*Ophiostoma* telles que *O. ulmi* et *O. novo-ulmi* qui parasitent les ormes, ces champignons étant capables de se croiser *in-vitro* mais apparemment pas (ou plus ?) dans la nature du fait de barrières post-zygotiques (Brasier, 1997).

Avec l'avènement des marqueurs moléculaires en systématique fongique, plusieurs taxinomistes comme Mills *et al.* (1991) et Maclean *et al.* (1993) ont avancé la notion d'espèce moléculaire (E.M.) pour signifier la distinction de taxa génétiquement distincts sur une base moléculaire. Dans le même ordre d'idées, d'autres comme Donoghue (1985), Cracraft (1990), ou encore Taylor, Jacobson et Fisher (1999) ont avancé le concept d'espèce phylogénétique (C.E.P.). Ces derniers définissent le C.E.P comme le plus petit clade monophylétique d'un groupe d'organismes partageant le même état pour un caractère ancestral, par exemple les mêmes positions nucléotidiques polymorphes au sein d'une séquence donnée. Le C.E.P a l'avantage de permettre d'inclure dans un même système de classification phylogénétique les espèces méiosporiques et les espèces mitosporiques estimées sur la base du même type de critères (moléculaires, donc). L'une de ses principales limites est que son application généralisée nécessiterait la définition d'un nouveau système de nomenclature ayant un support phylogénétique, en remplacement de l'actuel Code Botanique. Or, il n'existe pour l'heure aucune position unitaire sur les modalités de cette révision, même si des propositions ont été faites (Hibbett et Donoghue, 1998).

Actuellement, il n'y a pas de consensus sur la définition de l'espèce fongique. Celle de Brygoo (1991) a l'avantage de pouvoir être appliquée aussi bien aux taxa mitosporiques qu'à ceux qui sont méiosporiques : « ensemble de souches, sexuées ou non, se ressemblant génétiquement entre elles autant que se ressemblent des souches sexuées capables de se croiser entre elles ». La position la plus communément adoptée par les taxinomistes contemporains est de définir les espèces fongiques sur la base d'une approche multicritère basée sur différents jeux de caractères moléculaires indépendants, combinés avec d'autres types de caractères (par exemple phénotypiques) (Maclean *et al.*, 1993 ; Spatafora et Blackwell, 1994).

4.5 Une résolution des espèces fongiques phytopathogènes jamais atteinte auparavant

Les régions les plus variables de l'ADNr comme par exemple la grande sous-unité (28S), mais aussi et surtout les espaceurs ITS et IGS sont actuellement très utilisées en systématique moléculaire pour la résolution des espèces. Les espaceurs et en particulier l'ITS sont fréquemment exploités par amplification PCR suivie ou non de séquençage. Bruns *et al.* (1991) et Lee et Taylor (1992) considèrent que le taux d'accumulation des mutations dans la région ITS est proche du taux de spéciation chez les champignons, d'où le fait que ce locus se prête bien à la discrimination des espèces fongiques. La région IGS plus variable, est plus souvent utilisée pour l'étude de la diversité intraspécifique, mais est également exploitée pour la résolution des espèces comme par exemple chez les Basidiomycètes ou chez les Oomycètes où l'existence de la sous-unité 5S, la rend plus facilement accessible à l'aide d'une sonde ou d'une amorce. Plusieurs autres locus comme par exemple le gène de la β -tubuline (O'Donnell et Cigelnick, 1997), les gènes MAT (Turgeon, 1998) ou encore le gène de l'histone (Glass et Donaldson, 1995) font aussi l'objet d'une utilisation croissante pour la discrimination des espèces. Exploités à l'aide de différentes méthodes de biologie moléculaire, ces locus permettent de confirmer le reclassement d'espèces mitosporiques avec leurs parents méiosporiques (Samuels et Seifert, 1995). Ils ouvrent également la voie au réexamen des espèces fongiques phytopathogènes en apportant de nouvelles informations qui questionnent, remettent en cause ou confirment les morpho-espèces érigées en systématique fongique traditionnelle. Illustrons ces apports à l'aide des deux exemples choisis chez des champignons à la taxinomie souvent controversée .

Le genre oomycète *Phytophthora* est un genre diploïde majeur en pathologie végétale du fait que plusieurs de ses espèces sont à l'origine de graves maladies de type mildious, fontes de semis et dépérissements notamment chez des plantes d'intérêt économique.

L'analyse des relations phylogénétiques au sein de ce genre révèle une absence de congruence entre la structuration en espèces classiquement basée sur les groupes morphologiques de Waterhouse (1963) et la structuration moléculaire effectuée sur la base du séquençage de la région ITS de l'ADN_r (Cooke *et al.*, 2000 ; Förster, Cummings et Coffey, 2000). Les caractères morphologiques régissant traditionnellement ce taxon (mode d'attachement de l'anthéridie à l'oogone, caducité de sporanges, ...) se révèlent, pour la plupart, d'intérêt limité sur un plan phylogénétique car traduisant surtout le poids de la convergence morphologique (Förster *et al.*, 2000). L'utilisation de la région ITS ou d'autres marqueurs comme par exemple les RFLP de l'ADN_{mt} ou de l'ADN nucléaire (Mills, Förster et Coffey, 1991 ; Förster et Coffey, 1993 ; Förster, Cummings et Coffey, 2000) a permis de mettre en évidence une importante diversité génétique chez certains taxa morphologiques très controversés comme *P. cryptogea/drechleri* ou *P. megasperma* qui se révèlent donc être polyphylétiques, et comporter plusieurs espèces phylogénétiques ayant évolué indépendamment. Ces résultats traduisent bien l'inadaptation de la classification traditionnelle des *Phytophthora* et celle des marqueurs morphologiques jusqu'alors utilisés chez ce genre.

Les marqueurs moléculaires clarifient également l'identification et la classification des champignons mitosporiques regroupés en systématique traditionnelle dans les très artificiels des Deutéromycètes ou des *Mycelia sterilia*. Ils sont par exemple nombreux à avoir été appliqués au champignon mitosporique *Fusarium oxysporum* (voir pour revue Woo *et al.*, 1998 ; Kistler, 1997). Ce champignon haploïde est extrêmement commun dans la rhizosphère de plantes, mais possède également des *formae speciales* (plus de 120 en ont été décrites) qui sont à l'origine de graves maladies vasculaires chez des plantes d'intérêt économique (Hawksworth *et al.*, 1995). Le transposon *Palm* permet de différencier les souches de la *forma specialis elaidis* attaquant le palmier à huile des souches non pathogènes, mais dans la plupart des autres cas, les marqueurs moléculaires ne discriminent pas de manière nette souches non pathogènes et *formae speciales* induisant les maladies vasculaires. Chez *F. oxysporum*, les hôtes d'une *forma specialis* donnée étant souvent apparentés (exemple même famille botanique), il a souvent été présumé que les membres fongiques de cette *forma specialis* étaient également apparentés de façon proche, et pouvaient donc avoir un ancêtre commun (Kistler, 1997). L'analyse des séquences nucléotidiques des gènes du facteur d'élongation de traduction EF1 α et de la petite sous-unité de l'ADN_r mitochondrial de représentants de différentes *formae speciales* de *F. oxysporum* à savoir les formes *melonis*, *cubense*, *lycopersici* et *radici-lycopersici* a permis de montrer qu'aucune d'entre elles ne constitue un groupe monophylétique (O'Donnell *et al.*, 1998). Chacune d'entre elles, et en l'occurrence la f. sp *cubense* responsable de la grave maladie de Panama chez les bananiers, est donc vraisemblablement composée de plusieurs espèces phylogénétiques ayant évolué de façon

indépendante, chacune pouvant représenter une espèce cryptique non discernable sur le plan morphologique. La catégorisation en *forma specialis* ne semble donc pas avoir de base phylogénétique. De même, l'occurrence de complexes d'espèces au sein de morpho-espèces traditionnelles a également été confirmée chez de nombreux autres champignons, grâce aux marqueurs moléculaires.

Au delà de ces deux exemples, il faut retenir que l'application des marqueurs moléculaires se révèle particulièrement utile chez les espèces où les différences morphologiques sont subtiles ou ambiguës (Michelmore et Hulbert, 1987).

4.6 L'identification moléculaire des espèces fongiques phytopathogènes : de la systématique au diagnostic des maladies

Le diagnostic précoce et performant d'un champignon phytopathogène, et son suivi régulier au champ sont à la base même d'un contrôle plus efficace de la maladie dont il est responsable, à l'aide par exemple d'un meilleur ajustement des stratégies d'application des fongicides (Maclean *et al.*, 1993). De même, le contrôle des mouvements internationaux de végétaux, la gestion des programmes de quarantaine, la certification sanitaire de plants mais aussi la sélection de matériel végétal dans le cadre de programmes d'amélioration génétique pour la résistance variétale imposent de disposer de techniques de détection fiables et rapides des champignons pathogènes (et plus généralement de tous les agents phytopathogènes) dans les plantes, ou dans des lots de semences. L'apport des marqueurs moléculaires au diagnostic des maladies fongiques ou à la détection des champignons phytopathogènes découle directement de leur aptitude sans précédent à une identification spécifique, et est donc liée aux marqueurs employés en systématique moléculaire. Dans ce domaine, les travaux actuels visent à mettre au point des protocoles et des outils moléculaires hautement spécifiques, sensibles, rapides à mettre en œuvre (Martin, James et Lévesque, 2000), venant ainsi remplacer ou optimiser les techniques classiques de diagnose des champignons pathogènes basées par exemple sur les isollements et les piégeages, ou encore les tests immuno-enzymatiques.

Ces outils moléculaires de diagnostic sont essentiellement des amorces PCR et des sondes d'ADN génomique qui permettent donc d'amplifier ou d'hybrider de manière spécifique une séquence d'ADN fongique cible, généralement multicopie (gènes de l'ADNr, microsatellites, ...). Ils sont appliqués soit à des cultures fongiques pures, soit directement à des tissus végétaux infectés (technique du diagnostic *in planta* ou D.I.P), et plus rarement à

des échantillons de sols supposés contaminés par l'agent pathogène recherché (Nazar *et al.*, 1997 ; Kuske *et al.*, 1998). La quantification directe du champignon recherché grâce à son ADN (Moukhamedov *et al.*, 1994 ; Martin, James et Lévesque, 2000) peut alors être effectuée par des méthodes de « competitive PCR » (Groppe et Boller, 1997).

Le tableau 2 recense quelques exemples d'outils de détection et de diagnostic appliqués à des champignons phytopathogènes. Les protocoles associés visent le plus souvent soit à définir et à sélectionner des amorces ou des sondes spécifiques, soit à éviter l'inhibition de la réaction PCR par les polysaccharides et les composés phénoliques d'origine végétale lors du diagnostic *in planta*, ou par des composés humiques lorsqu'on travaille avec des échantillons de sol (Henson et French, 1993). Dans d'autres cas de figures, c'est l'augmentation de la sensibilité de la méthode qui est recherchée, à l'aide par exemple de la technique de PCR nichée (Mutasa, Chwarszczyńska et Asher, 1996 ; Martin, James et Lévesque, 2000). Enfin, certains protocoles cherchent à détecter de façon simultanée différents champignons dans les mêmes échantillons. C'est le cas de la « Multiplex PCR », qui a par exemple été appliquée à la recherche de *Cylindrocarpon destructans* et de *Cylindrocladium floridanum* en pépinières de conifères (Hamelin *et al.*, 1996).

Toutes ces nouvelles technologies de détection et de diagnostic moléculaires sont actuellement en voie de généralisation, mais ne sont pas encore véritablement utilisées en routine. Il est cependant clair qu'à court terme, leur développement prendra de l'importance, en particulier dans le cas des méthodes dérivées de la PCR, au regard de leur spécificité, leur sensibilité et leur rapidité de mise en œuvre (Gold, Garcia-Pedrajas et Martinez-Espinosa, 2001).

Problématique et Présentation du sujet

Au terme de cette revue bibliographique il apparaît clairement que les champignons du genre *Cylindrocladium* constituent, aux côtés des nématodes endoparasites, une composante importante du Complexe Parasitaire Racinaire qui est à l'origine des lésions nécrotiques des racines des bananiers. L'une des conséquences majeures de ces lésions racinaires est l'altération de l'ancrage des bananiers, et à terme leur chute, ce qui constitue l'un des principaux facteurs limitant du rendement agronomique et la durabilité des plantations.

Dans ce pathosystème, la composante fongique représentée par les champignons du genre *Cylindrocladium* reste pourtant mal connue, ce qui freine la définition de stratégies de contrôle appropriées. Il n'est pas établi si une ou plusieurs espèces sont impliquées. S'il y en a plusieurs, il faut déterminer si elles correspondent à des espèces déjà décrites, ou à de nouveaux taxa. Leur distribution géographique doit aussi être précisée. Il est dans le même temps indispensable de déterminer leur niveau respectif de pathogénie chez les bananiers, et d'évaluer leur diversité génétique.

Nous avons par ailleurs vu qu'au sein du genre *Cylindrocladium*, l'une des contraintes taxinomiques majeures est justement la difficulté à distinguer les espèces, les marqueurs morphologiques se déclinant de façon continue et étant sensibles à l'évolution convergente (existence d'espèces morphologiquement similaires). Cette difficulté est renforcée par ailleurs par le fait que plusieurs espèces peuvent être simultanément présentes sur le même hôte.

La présente étude a pour objectifs de discriminer et d'identifier de façon simple et non équivoque l'espèce ou les espèces de *Cylindrocladium* en cause chez le bananier, et d'en établir les principales caractéristiques biologiques et génétiques. Elle constitue un préalable à la définition et à la mise en place raisonnées de stratégies de contrôle de ces champignons en bananeraies. Elle requiert de ce fait une ouverture sur le développement d'outils de diagnostic moléculaire qui soient performants, faciles d'utilisation, et potentiellement transférables dans les zones de production bananière.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons, dans un premier temps, établi une collection d'isolats de *Cylindrocladium*, issus de la rhizosphère du bananier (ou de champignons supposés comme tels) et provenant de différentes zones géographiques de production. Afin de situer ces champignons dans le cadre taxinomique existant, cette collection a été caractérisée sur la base de descripteurs phénotypiques et biologiques (morpho-taxinomie, croissance,

compatibilité sexuelle) et comparée à des isolats de *Cylindrocladium* de référence provenant de mycothèques internationales. Deux types d'isolats de référence ont été utilisés : des isolats « types » ayant servi à la description d'espèces de *Cylindrocladium*, et d'autre part des isolats additionnels déjà utilisés dans d'autres études par d'autres équipes de recherche. Ces travaux sont répertoriés dans le chapitre 2.

Dans un second temps, et compte-tenu des limitations inhérentes aux marqueurs phénotypiques, nous avons cherché à valider de façon indépendante, ou à dissocier les groupements effectués grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires simples et rapides d'utilisation. Nous avons pour cela prospecté par PCR ciblée le polymorphisme des espaceurs de l'ADNr nucléaire, cette approche étant couplée à l'analyse des séquences nucléotidiques, et à la recherche de marqueurs CAPS (PCR-RFLP). Ceci nous a permis de développer un outil de diagnostic moléculaire adapté à la résolution des espèces au sein du genre *Cylindrocladium*. Cet outil a donc également servi à évaluer la diversité génétique des champignons du genre *Cylindrocladium* inventoriés sur bananiers, et à les situer vis à vis des espèces connues de ce genre. Ces travaux constituent le chapitre 3.

Dans un troisième temps, nous avons cherché à évaluer le pouvoir pathogène des *Cylindrocladium* inventoriés en bananeraies en étudiant leur variabilité d'agressivité sur bananier. Nous avons pour cela développé une méthodologie expérimentale d'évaluation du pouvoir pathogène basée sur l'inoculation contrôlée de plants de bananiers issus de culture *in-vitro*. En parallèle, une première approche de la diversité génétique présente au sein des taxa s'étant révélés pathogènes sur bananiers a été effectuée à l'aide de marqueurs RAPD indépendants donc des marqueurs CAPS initialement utilisés. Ceci fait l'objet du chapitre 4.

2

Analyse de la diversité phénotypique et
biologique d'isolats de *Cylindrocladium* issus
de la rhizosphère du bananier

1. Introduction

Cette première partie de notre étude a pour objectif la caractérisation de la diversité phénotypique et biologique (hors pouvoir pathogène traité au chapitre 4) des isolats de *Cylindrocladium* issus de la rhizosphère du bananier. Elle constitue un premier niveau d'approche directe de la diversité de ces champignons.

Des isolats d'origine multilocale ont été obtenus aussi bien à partir d'échantillons de racines que de sol, et ce, grâce à des méthodologies appropriées d'isolement, d'induction de la sporulation conidienne et de conservation. Sur la base de leur caractérisation morphométrique, une structuration de la diversité morphologique a été recherchée. Les types morphologiques (ou morphotypes) identifiés ont été comparés à des représentants d'espèces connues de *Cylindrocladium* issus d'autres biotopes et provenant de mycothèques internationales. Nous avons également cherché à renseigner le statut biologique de ces groupes morphologiques d'une part en identifiant leur optima thermiques de croissance, et d'autre part en cherchant à préciser leur statut sexuel par induction de leur stade téléomorphe. Dans les chapitres qui suivront nous chercherons à valider ou au contraire à dissocier les groupements établis sur ces bases phénotypiques et biologiques, par l'utilisation de critères génétiques et pathogéniques.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Origine des isolats

2.1.1 Isolats de *Cylindrocladium* non identifiés provenant de la rhizosphère du bananier ou de nécroses racinaires d'héliconia

Des échantillons de racines et de sol ont été prélevés au cours de prospections réalisées dans différents pays, dans des systèmes de culture majoritairement à base de bananiers AAA du sous-groupe Cavendish, et plus rarement de bananiers AAB (plantains). Nous avons réalisé les prospections concernant les Petites-Antilles (Martinique, Guadeloupe, Dominique, Sainte-Lucie) entre Août 1997 et Novembre 1999. Le laboratoire de phytopathologie du CARBAP (Centre Africain de Recherches sur les Bananiers et Plantains) a réalisé la prospection concernant le Cameroun, entre Juillet et Octobre 1998. Des échantillons racinaires nous ont également été expédiés en Décembre 1999 par voie express par O. Arias (Aventis), en provenance du Costa-Rica. Au total, 66 sites différents répartis dans ces 3 grandes zones géographiques (Caraïbe, Cameroun, Costa-Rica) ont été échantillonnés (tableau 4). Le site est

défini ici comme une placette d'environ 30 m sur 30 m comportant des bananiers partageant le même historique, et menés selon le même itinéraire technique. Dans chaque site, les échantillons racinaires ont été prélevés à la pelle-bêche à l'aplomb de un à quatre bananiers, choisis au hasard. Un à trois isolats de *Cylindrocladium*, tous issus de lésions racinaires différentes ont été retenus au hasard par bananier. De plus, sur quelques sites de Guadeloupe, Martinique, et du Cameroun, des échantillons de sol composites réalisés à partir du mélange de dix prélèvements aléatoires dans l'horizon 0-25 cm ont également été prélevés. Recueillis à proximité immédiate de racines de bananiers, ils ont servi à l'isolement direct à partir de sol rhizosphérique de souches de *Cylindrocladium* parmi lesquelles 1 à 5 ont été retenues au hasard dans chacun des sites concernés (tableau 4).

En parallèle à cette recherche d'isolats de *Cylindrocladium* provenant de bananeraies, nous avons également vérifié si ces champignons pouvaient localement être présents chez des plantes appartenant au même ordre botanique que les bananiers (Zingibérales), mais à des familles voisines de celles du bananier (*Musaceae*). Nous avons pour cela examiné des échantillons racinaires de Strélitziacées (*Strelitziaceae*) et d'héliconiacées (*Heliconiaceae*) venant de Guadeloupe. Seuls des échantillons racinaires d'héliconias porteur des nécroses ont permis l'isolement de souches de *Cylindrocladium* que nous avons comparées par la suite à celles provenant de bananeraies.

Au total 171 isolats de *Cylindrocladium* issus de la rhizosphère de bananiers ou d'héliconias, et référencés par la suite comme des « isolats terrain » à identifier, ont été utilisés au cours de la présente étude.

2.1.2. Isolats de référence provenant de mycothèques internationales

Afin de comparer les caractéristiques des isolats « terrain » non identifiés à celles de représentants d'espèces connues et de genres très proches du genre *Cylindrocladium*, une collection d'isolats dits de référence a été constituée. Ces isolats proviennent de l'IMI (International Mycological Institute ; Royaume Uni), de CBS (Centraalbureau Voor Schimmelcultures ; Pays-Bas), de l'ATCC (American Type Culture Collection ; Etats-Unis), du MNHN (Muséum National d'Histoire Naturelle ; France) de la MUCL (Mycothèque de l'Université de Louvain ; Belgique) et de PPRI (Plant Protection Research Institute ; Afrique du Sud). Leur liste est donnée dans le tableau 5. Cette collection de référence comporte, pour partie, des isolats types de *Cylindrocladium*, c'est à dire des isolats ayant servi à définir les espèces considérées lors de leur description initiale (diagnose latine). Elle comporte également des isolats additionnels, acceptés par les taxinomistes spécialistes du genre *Cylindrocladium* comme des représentants valables des espèces considérées.

Chapitre 2 : Analyse de la diversité phénotypique et biologique d'isolats de *Cylindrocladium* issus de la rhizosphère du bananier

Tableau 4 : Origine des isolats de *Cylindrocladium* issus de prospection (isolats « terrain »)

Code site	Origine géographique (localité)	Exploitation	Type de sol	Hôte	Nombre isolats	Isolats issus de nécroses racinaires	Isolats issus du sol
1	Martinique (Me-Rouge)	Parnasse	A	Bananier (AAA, Poyo)	4	Mar1, Mar30, Mar108, Mar109	
2	Martinique (Me-Rouge)	Longchamps	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	6	Mar2, Mar31, Mar32, Mar68 à Mar70	
3	Martinique (Me-Rouge)	Château-Gaillard	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	5	Mar3, Mar33, Mar34, Mar86, Mar87	
5	Martinique (Macouba)	Bellevue	P	Bananier (AAA, Gde Naine)	7	Mar4, Mar5, Mar25, Mar100 à Mar103	
6	Martinique (Macouba)	Bellevue	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Mar26	
7	Martinique (B.-Pointe)	Gradis	P	Bananier (AAA, Poyo)	5	Mar6, Mar7, Mar27, Mar28, Mar105	
9	Martinique (B.-Pointe)	Leyritz	P	Bananier (AAA, Gde Naine)	3	Mar8, Mar29, Mar107	
10	Martinique (Macouba)	Préville	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	7	Mar50 à Mar 56	
11	Martinique (Macouba)	Préville	A	Bananier (AAA, Poyo)	4	Mar9, Mar58 à Mar60	
13	Martinique (G. Morne)	Saint-Michel	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	6	Mar10, Mar12, Mar13, Mar20, Mar21	Mar61
14	Martinique (G. Morne)	Saint-Michel	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	3	Mar22 à Mar24	
17	Martinique (St-Joseph)	Rivière Lézarde	B	Bananier (AAA, Gde Naine)	3	Mar37, Mar38, Mar62	
18	Martinique (St-Joseph)	Rivière Lézarde	B	Bananier (AAA, Gde Naine)	2	Mar39, Mar63	
20	Martinique (St-Joseph)	Désirade	B	Bananier (AAA, Gde Naine)	3	Mar35, Mar36, Mar66	
21	Martinique (François)	Casse-Cou	F	Bananier (AAA, Gde Naine)	3	Mar15, Mar16, Mar67	
22	Martinique (François)	Grands Fonds	F	Bananier (AAA, Gde Naine)	3	Mar14, Mar17, Mar18	
23	Martinique (François)	Simon	V	Bananier (AAA, Gde Naine)	2	Mar11, Mar19	
30	Guadeloupe (CBE)	Bois-Rouge (Le M.)	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	4	Gua1, Gua7, Gua14	Gua24
31	Guadeloupe (CBE)	Bunel (D. R)	A	Bananier (AAA, Poyo)	4	Gua6, Gua71 à Gua73	
32	Guadeloupe (CBE)	Féfé (L.P)	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	2	Gua2, Gua15	
33	Guadeloupe (CBE)	La Digue	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	3	Gua16, Gua17, Gua74	
36	Guadeloupe (CBE)	Neufchâteau	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	3	Gua18 à Gua20	
37	Guadeloupe (CBE)	Changy	B	Bananier (AAA, Gde Naine)	4	Gua3, Gua8, Gua25, Gua75	
38	Guadeloupe (CBE)	Changy	B	Bananier (AAA, Poyo)	7	Gua9, Gua76 à Gua81	
39	Guadeloupe (CBE)	Changy	B	Bananier (AAA, Gde Naine)	6	Gua10, Gua27, Gua82 à Gua85	
39'	Guadeloupe (CBE)	Neufchâteau	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Gua5	
40	Guadeloupe (CBE)	St-Sauveur	B	Bananier (AAA, Gde Naine)	6	Gua88	Gua89 à Gua93
41	Guadeloupe (CBE)	Mineurs	B	Bananier (AAA, Poyo)	3	Gua4, Gua13, Gua94	
42	Guadeloupe (CBE)	Mineurs	B	Bananier (AAA, Gde Naine)	5	Gua11, Gua23, Gua28, Gua29, Gua95	
44	Guadeloupe (CBE)	Changy	B	Bananier (AAA, Gde Naine)	5	Gua26, Gua96, Gua97	Gua12, Gua98
45	Guadeloupe (Tr. Riv.)	Jacquemel (Dambas)	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Gua21	
46	Guadeloupe (Tr. Riv.)	Jacquemel (Dambas)	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Gua99	
47	Guadeloupe (Tr. Riv.)	Jacquemel (Dambas)	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Gua22	

Chapitre 2 : Analyse de la diversité phénotypique et biologique d'isolats de *Cylindrocladium* issus de la rhizosphère du bananier

Suite Tableau 4

Code site	Origine géographique (localité)	Exploitation	Type de sol	Hôte	Nombre isolats	Isolats issus de nécroses racinaires	Isolats issus du sol
50	Guadeloupe (CBE)	Neufchâteau	A	Héliconia	3	Hel2A, Hel2B, Hel2C	
51	Guadeloupe (Goyave)	Questel	F	Héliconia	3	Hel7A1, Hel7A2, Hel8A1	
66	Sainte-Lucie (Deglas)	M. Dossa	F	Bananier (AAA, Poyo)	5	Slu1, Slu3, Slu5, Slu6, Slu104	
71	Sainte-Lucie (Cacao)	Alexis Sadoo	F	Bananier (AAA, Poyo)	3	Slu2, Slu4, Slu7	
76	Dominique (Grand-Bay)	Edward Fregiast	L	Bananier (AAA, Poyo)	1	Dom1	
77	Dominique (Grand-Bay)	Carbon John	A	Bananier (AAA, Poyo)	2	Dom6, Dom7	
78	Dominique (Layou)	Randy Paul	A	Bananier (AAA, Poyo)	1	Dom2	
81	Dominique (CR Maginy)	Clément F. Valmont	F	Bananier (AAA, Poyo)	1	Dom3	
84	Dominique (CR Bataka)	Philomène Benjamin	F	Bananier (AAA, Poyo)	2	Dom4, Dom106	
85	Dominique (Marigot)	Kiplin Alfred	F	Bananier (AAA, Poyo)	1	Dom5	
90	Costa-Rica (Sarapiquí)	Finca Dominica	F	Bananier (AAA, Gde Naine)	2	Cor1, Cor2	
91	Costa-Rica (Sarapiquí)	Finca Dominica	F	Bananier (AAA, Valéry)	3	Cor3 à Cor5	
92	Costa-Rica (Guapiles)	Finca Teresa	S	Bananier (AAA, Valéry)	1	Cor6	
94	Costa-Rica (Sixaiola)	Finca San Bosco	F	Bananier (AAA, Valéry)	1	Cor7	
109	Cameroun (Koto)	-	F	Bananier (Gros-Michel, AAA)	1		Cam14
110	Cameroun (Koto)	-	F	Bananier (-, AAB)	1		Cam2
111	Cameroun (Borendam)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam7	
112	Cameroun (Borendam)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam16	
113	Cameroun (Borendam)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam17	
114	Cameroun (Boubou)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1		Cam6
115	Cameroun (Boubou)	-	Bra	Bananier (AAA, Gde Naine)	1		Cam11
116	Cameroun (Bouba)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam15	
117	Cameroun (Bouba)	-	Bra	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam20	
118	Cameroun (Njombé)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam1	
119	Cameroun (Njombé)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam3	
120	Cameroun (Njombé)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam30	
121	Cameroun (Penja Est)	-	Bra	Bananier (AAA, Gde Naine)	1		Cam19
122	Cameroun (Penja Est)	-	Bra	Bananier (AAA, Gde Naine)	1		Cam8
123	Cameroun (Penja Est)	-	Bra	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam4	
124	Cameroun (Penja Est)	-	Bra	Bananier (AAA, Gde Naine)	1		Cam9
125	Cameroun (Penja Est)	-	Bra	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam5	
126	Cameroun (Penja Est)	-	Bra	Bananier (AAA, Gde Naine)	1		Cam10
127	Cameroun (Njombé)	-	A	Bananier (AAA, Gde Naine)	1	Cam12	

A : Andosol ; B : Sol Brun rouille à halloysite ; Bra : Sol Brun andique ; F : Sol Ferrallitique ; V : Vertisol ; L : Sol Limoneux ; P : Sol Peu évolué ; S : Sol Sableux

Tableau 5 : Origine des isolats de *Cylindrocladium* de référence utilisés pour la caractérisation phénotypique et biologique

N° isolat	Espèces	Origine	
		Hôte	Pays (état, localité)
ATCC 354517 ^a	<i>Cy. candelabrum</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brésil, (Copener, Bahia)
ATCC 22677	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Prunus persica</i>	Etats-Unis (Georgie)
ATCC 18834 ^a	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Japon
PC 551197 ^a	<i>Cy. gracile</i>	<i>Argyreia splendens</i>	Asie du Sud Est
IMI 346843	<i>Cy. gracile</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>	Afrique du Sud (Natal, KwaZulu)
PPRI 4176 ^a	<i>Cy. pseudogracile</i>	<i>Manilkara zapota</i>	Brésil (Para, Belém)
ATCC 46300	<i>Cy. scoparium</i>	<i>Leucothoe cabestei</i>	Etats-Unis (Caroline du nord)
ATCC 44730 ^a	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Spathiphyllum sp.</i>	Etats-Unis (Floride)
IMI 167983	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Camellia sinensis</i>	Maurice
PPRI 4179	<i>Cy. pteridis</i>	<i>Rumorha adiantiformis</i>	Brésil (Viçosa)

^a : isolat type

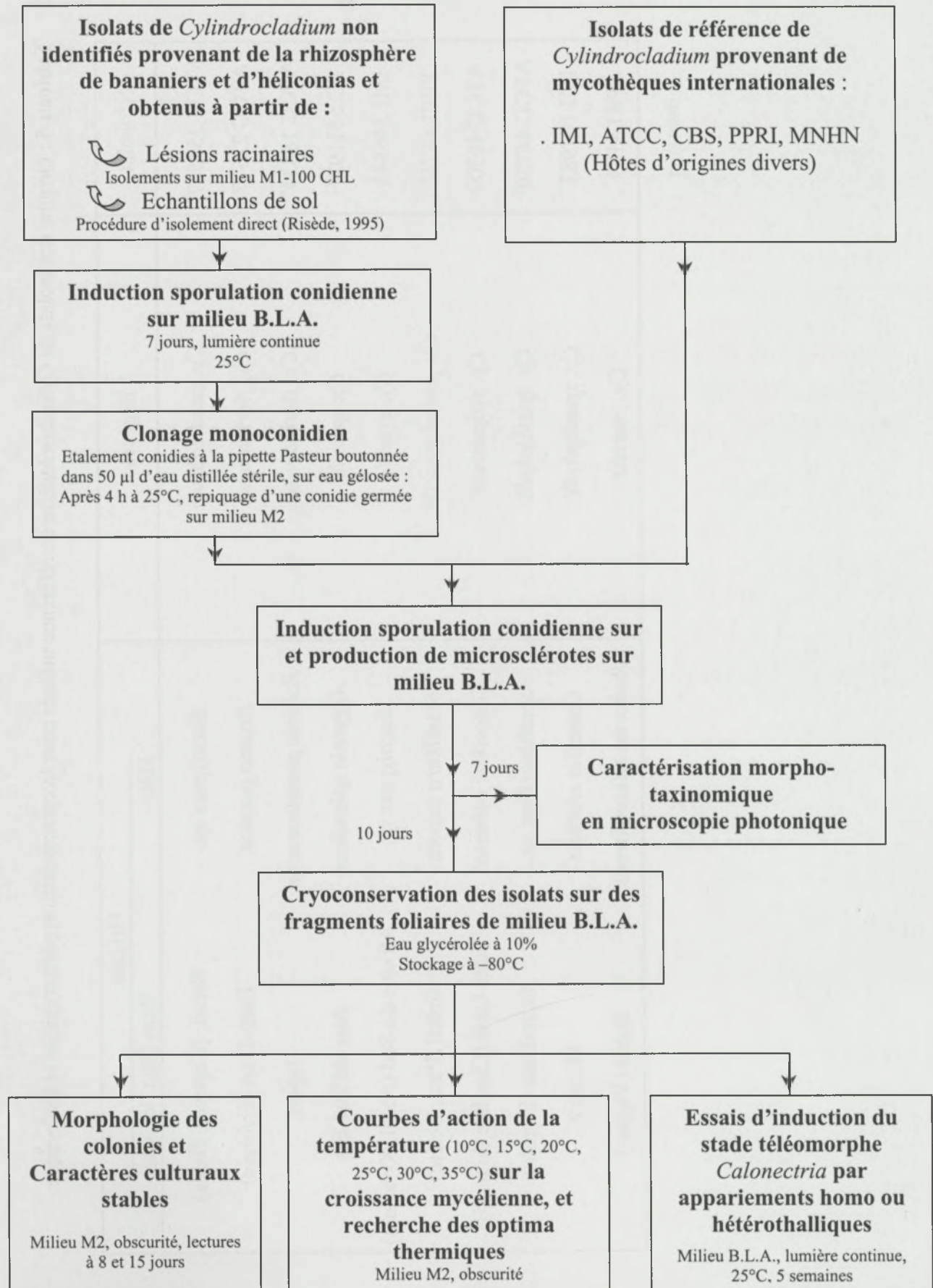


Figure 16 : Procédure générale de traitement des isolats de *Cylindrocladium* pour la caractérisation phénotypique et biologique

2.2 Isolement, clonage monoconidien et conservation des isolats

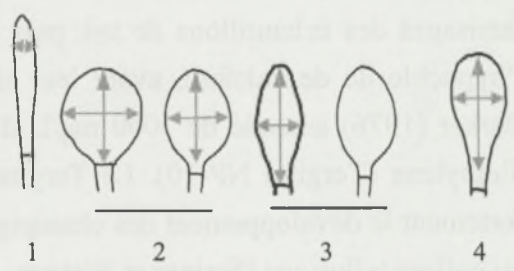
La figure 16 récapitule l'ensemble des procédures d'isolement et de conditionnement des isolats fongiques pour les différents travaux expérimentaux de la caractérisation phénotypique et biologique. Les isolements à partir de lésions racinaires ont été effectués par mise en culture sur milieu gélosé M1-100 CHL (1% d'extrait de Malt, 2% d'agar, 100 mg/L de Chloramphénicol) de fragments de tissus prélevés en avant du front de lésions. Les colonies ont été repiquées après 5-6 jours sur milieu M2 (2% d'extrait de Malt, 2% d'agar). La procédure d'isolement direct du sol des souches de *Cylindrocladium* est celle que nous avons mise au point antérieurement (Risède, 1995). Elle repose sur une série de lavages et de tamisages des échantillons de sol, puis sur une désinfection contrôlée du refus des tamis à l'hypochlorite de calcium, avant leur incorporation au milieu sélectif de Phipps, Beute et Barker (1976) amendé de 1000 mg/L d'éther de nonyl phényl polyéthylène glycol à oxyde d'éthylène (Tergitol NP-10). Le Tergitol NP-10 est un surfactant anionique qui limite très fortement le développement des champignons à croissance rapide dans les dénombrements de mycoflore tellurique (Steiner et Watson, 1965 ; Phipps, Beute et Barker, 1976).

Un milieu favorisant la sporulation conidienne des champignons du genre *Cylindrocladium* a ensuite été recherché. Le milieu C.L.A (Carnation Leaf Agar) a été employé avec succès à de telles fins par Fisher *et al.* (1982) sur *Fusarium*, puis par Crous, Philipps et Wingfield (1992) sur *Cylindrocladium*, mais n'est pas approprié en zone tropicale car les œilletons n'y sont pas cultivés. Nous avons donc adapté un milieu B.L.A (Banana Leaf Agar) réalisé suivant le même principe que le milieu C.L.A mais à partir de fragments foliaires stériles de vitroplants de bananier (2cm * 3cm) n'ayant jamais reçu de fongicides, et disposés en boîtes de Pétri sur eau gélosée à 2%. A 25°C, en lumière continue (tubes blancs fluorescents et tubes de lumière proches UV, longueur d'onde de 265 nm) la conidiogenèse d'isolats de *Cylindrocladium* s'est révélée très abondante sur les fragments foliaires de ce milieu.

Pour le clonage monoconidien des isolats, des conidies sont prélevées sur les fragments foliaires des boîtes de milieu B.L.A., à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Elles sont ensuite étalées en boîte de Pétri sur milieu Eau-Agar (2% d'agar) dans une gouttelette de 50 µl d'eau distillée stérile. Après 4 heures d'incubation à 25°C, une conidie germée est repiquée sur milieu M2, pour chacun des isolats .

En vue de limiter les variations morphologiques et biologiques des isolats dues aux repiquages fréquents, nous avons recherché une technique de conservation adaptée susceptible de fortement ralentir leurs activités métaboliques pendant cette phase. Quelques tests préliminaires comparant la reprise des souches après : i/ Conservation à -20°C avec dessiccation et mise sous vide de cultures réalisées sur papier filtre (Valent *et al.*, 1986) ; ii/ la

Tableau 6 : Variables initiales et modalités utilisées pour la caractérisation phénotypique des isolats de *Cylindrocladium*

	Variables	Codes	Modalités
Caractéristiques prises en compte en microscopie	Conidies	Longueur moyenne (μm)	LoCo
		Largeur moyenne (μm)	LaCo
		Nombre de septa	Nbsept
Vésicule terminale du stipe	Forme	FVT	<p>SP1 : % conidies à 1 septum ; SP2 : % conidies à 2 septa ; SP3 : % conidies à 3 septa</p>  <p>1 : Clavate ; 2 : Sphérique à ellipsoïde 3 : Spatulée à ellipsoïde ; 4 : Sphéro-pédonculée</p>
	Plus grand diamètre horizontal (μm)	Diaves	
	Hauteur* (μm)	Hves	
	Morphologie des colonies et aspect cultural	Aspect du mycélium aérien	AMA
	Marges des colonies	MAC	<ul style="list-style-type: none"> - 1 : Crénelée - 2 : Peu crénelée à lisse
	Couleur mycélium aérien périphérique	CMA	<ul style="list-style-type: none"> - 1 : Blanchâtre - 2 : Hyalin - 3 : Jaunâtre
	Production de microsclérotés	PMS	<ul style="list-style-type: none"> - 1 : Forte avec tendance à l'agrégation - 2 : Forte, mais microsclérotés bien individualisés - 3 : Moyenne - 4 : Faible
Croissance	Vitesse de croissance à 25°C sur milieu M2 (cm/jour)	Vit25	

* : Pas de hauteur prise en compte pour les vésicules de type clavate

conservation en tubes sur pentes gélosées de milieu synthétique pauvre en éléments minéraux (Milieu « S » de Messiaen et Laffont, 1970) ; iii/ la conservation à -80°C dans un mélange cryoprotecteur eau-glycérol (10%), ont été effectués. C'est ce dernier procédé qui a été retenu. Après 10 jours d'incubation à 25°C en lumière continue, des fragments foliaires issus de culture sur BLA de chacun des isolats ont été découpés en petits morceaux, et mis dans des cryotubes de 1.5 ml contenant le mélange eau-glycérol. Ces fragments étaient colonisés par les hyphes mycéliens et étaient porteurs de conidies et de jeunes microsclérotés. Les cryotubes ont ensuite été stockés à -80°C . Avec cette technique, le faciès morphologique des souches est resté stable, même après 4 années de conservation et aucune perte d'aptitude à la sporulation conidienne n'a été constatée. Le redémarrage des cultures s'effectuait, selon les isolats, aléatoirement à partir des conidies, mais de façon toujours systématique à partir des fragments foliaires colonisés par le champignon.

2.3 Caractéristiques morphologiques, culturelles et physiologiques étudiées

2.3.1 Etude morpho-taxinomique en microscopie photonique

Après 7 jours de culture sur milieu B.L.A. à 25°C et en lumière continue, les caractéristiques de forme et de taille des conidies, ainsi que celles des vésicules apicales des conidiophores ont été étudiées en microscopie photonique, à l'aide d'un microscope équipé d'un contraste de phase de Nomarsky et d'un micromètre oculaire. Le tableau 6 récapitule les descripteurs pris en compte. D'autres caractères comme la présence de microconidiophores et de microconidies n'ont pas été pris en compte, ces caractères étant très rares et peu stables au cours du temps. Les montages ont été effectués dans de l'eau distillée et les observations et mesures ont été réalisées à l'objectif * 100. Pour chaque isolat, 50 conidies et 25 vésicules ont été mesurées. Cette étude morphométrique a concerné l'ensemble des isolats « terrain », et 9 isolats de référence retenus d'une part pour leur ressemblance phénotypique avec les isolats « terrain », et d'autre part pour le fait que malgré plusieurs années de conservation, ils sporulaient encore de manière intense. En accord avec les recommandations de Crous, Philipps et Wingfield (1992), les observations et mesures n'ont été réalisées qu'à partir des conidiophores directement produits sur les fragments foliaires, et pas de ceux induits sur la gélose.

2.3.2 Caractères culturels et morphologie des colonies

Les descripteurs retenus pour caractériser l'aspect culturel des thalles et la morphologie des colonies sont l'aspect général du mycélium aérien (AMA), le caractère régulier ou non de la marge des colonies (MAC), la couleur du mycélium aérien sur la

périphérie des colonies (CMA), et l'importance de la production de microsclérotos (PMS) appréciée visuellement. Ces descripteurs ont été appliqués à des cultures de 6–8 jours (AMA, CMA, MAC) ou de 15 jours (PMS) sur milieu M2. Le tableau 6 indique les différentes modalités retenues pour ces variables. D'autres caractères comme l'intensité de la sporulation conidienne ou la forme des microsclérotos n'ont pas été retenus, car peu stables ou peu discriminants.

2.3.3 Vitesse de croissance mycélienne et optima thermiques de croissance

La vitesse de croissance mycélienne à 25°C (variable Vit25) a été mesurée pour tous les isolats « terrain » et 9 isolats d'espèces de référence de *Cylindrocladium*, simultanément à l'étude morpho-taxinomique. Pour cela, la croissance des thalles a été appréciée en boîte de Pétri (90mm) sur milieu M2, par mesure de 2 diamètres perpendiculaires, tous les 2 jours pendant 15 jours, à raison de 8 répétitions par isolat. Les boîtes étaient incubées à l'obscurité, en étuve thermostatée.

En parallèle, un sous-échantillon de 17 isolats représentatifs de la diversité morphologique présente au sein de la collection d'isolats « terrain », ainsi que 10 isolats de référence ayant servi pour les comparaisons morphologiques ont été utilisés pour établir la courbe d'action de la température sur la vitesse de croissance mycélienne. Pour ces 27 isolats, la gamme de température testée est 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, et 35°C. Les mesures de croissance ont été réalisées de la même manière et à la même fréquence qu'indiqué ci-dessus, avec également 8 répétitions par isolat et par température. Deux paramètres ont été utilisés pour caractériser les courbes d'action de la température sur la croissance mycélienne : la température optimale de croissance, et la vitesse de croissance à cet optimum thermique.

2.4 Compatibilité sexuelle des isolats

La compatibilité sexuelle des isolats « terrain » entre eux ou avec des isolats de référence a été testée par culture homothallique ou hétérothallique (2 thalles différents) sur milieu B.L.A. en lumière continue (tubes fluorescents blancs et tubes proches ultraviolets), à 25°C en étuve thermostatée. Plus de 250 croisements différents ont ainsi été réalisés, avec 5 répétitions pour chacun d'eux. Les appariements d'isolats ont été réalisés dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre comportant un fragment foliaire de bananier de 2 * 3 cm disposé sur eau gélosée. Chacune des 2 longueurs du rectangle foliaire étaitensemencée par 2 implants de culture de chacun des 2 isolats.

2.5 Traitement des données et analyses statistiques

2.5.1 Descripteurs de la diversité phénotypique

En croisant les descripteurs phénotypiques et les isolats étudiés, une matrice carrée de type variables * individus a été obtenue. Son analyse s'est déroulée en trois étapes :

- Variables qualitatives

Le codage de l'ensemble des variables qualitatives (FVT, AMA, CMA, MAC, PMS) ayant été effectué sous forme disjonctive complète, c'est à dire que pour tout individu, chaque variable qualitative ne présentant à la fois qu'un seul état possible (soit une seule modalité à la fois), la liaison de ces variables a pu être étudiée sous forme de tableau de contingence de Burt. Un tableau de Burt est une matrice diagonale à n lignes (variables qualitatives) et p colonnes (nombre total de modalités pour l'ensemble de ces variables qualitatives) où à la $i^{\text{ème}}$ ligne et à la $j^{\text{ème}}$ colonne, la valeur n_{ij} représente le nombre d'isolats possédant à la fois le caractère i et le caractère j. Ce tableau comporte donc à la fois des blocs diagonaux donnant pour chaque variable les effectifs correspondant à chaque modalité, et des blocs non diagonaux renseignant sur la répartition des effectifs entre les modalités de variables, lors du croisement des variables deux à deux.



- Variables quantitatives

La liaison entre variables quantitatives a été appréciée en croisant entre elles d'une part celles qui sont caractéristiques des conidies, et d'autre part celles qui sont caractéristiques des vésicules.

- Analyse en Composantes Principales

En dernier lieu, la matrice variables quantitatives indépendantes * individus a servi à la réalisation d'une analyse globale de la diversité phénotypique par ACP (Analyse factorielle en Composantes Principales) avec 169 individus actifs (les isolats « terrain » non identifiés), et 8 isolats d'espèces de référence comme individus supplémentaires. L'ACP est une méthode statistique essentiellement descriptive permettant de savoir comment se structurent les variables utilisées, et comment se répartissent les individus étudiés (Philippeau, 1986). Passant d'un espace de représentation multidimensionnelle des individus (plusieurs variables) à un espace à seulement 2 dimensions (plan) dont les axes ou composantes principales sont des combinaisons linéaires de variables, elle permet une meilleure visualisation des individus. Les individus supplémentaires ne participent pas à l'analyse, mais sont positionnés a

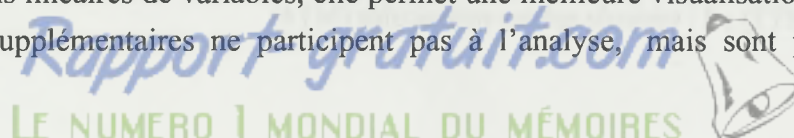
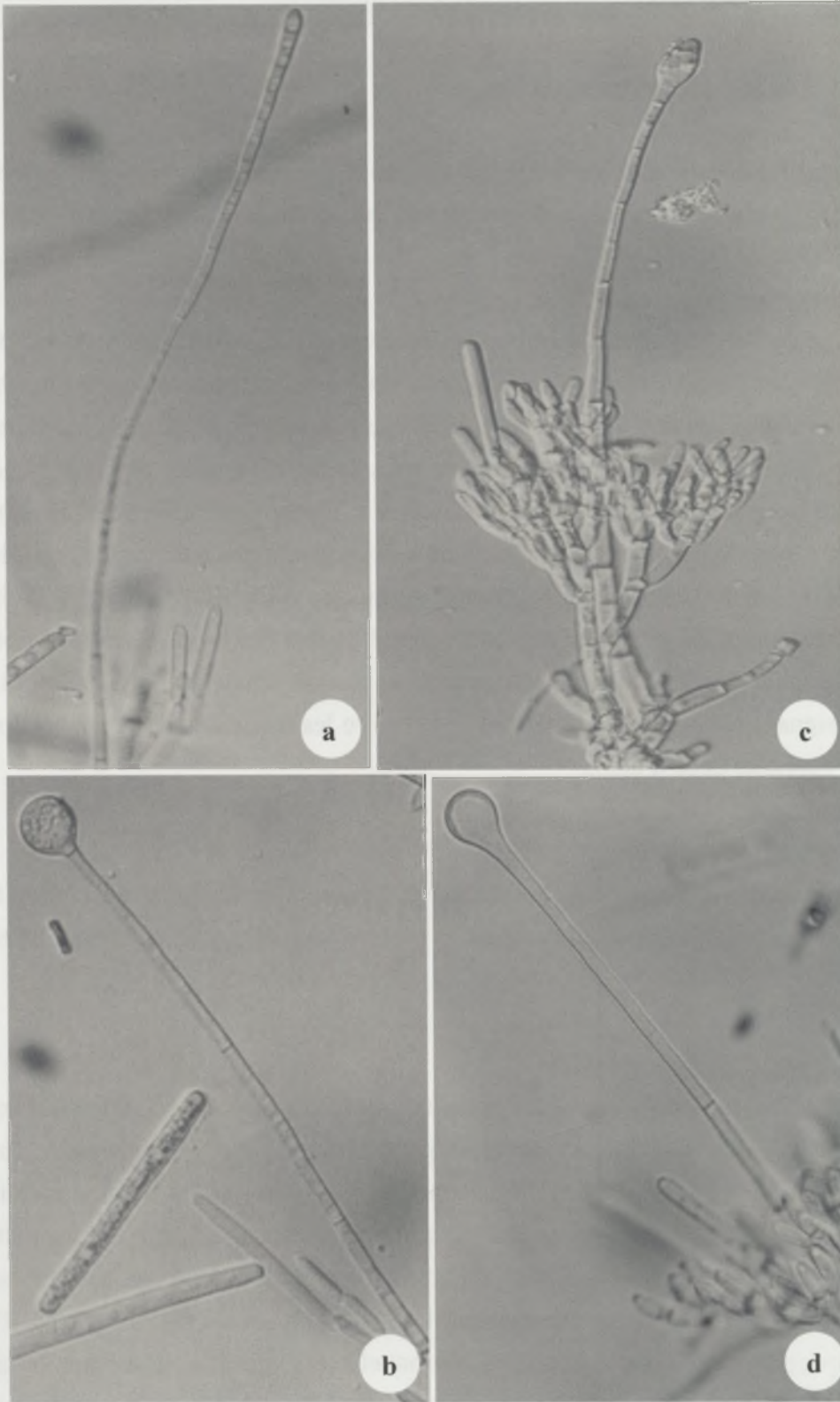


Figure 17 : Formes des vésicules terminales des stipes chez les isolats de *Cylindrocladium* identifiés en bananeraies



a : Vésicule clavate (MT1 et MT5) ; b : vésicule sphérique (MT2) ; c : vésicule spatulée (MT3) ; d : vésicule sphéro-pédonculée (MT4)

posteriori sur le plan, ce qui permet de juger de leurs ressemblances ou non avec les individus actifs (Philippeau, 1986).

2.5.2 Optima thermiques de croissance

Aucun des 27 isolats ayant servi à établir la loi d'action de la température sur la croissance mycélienne, n'a poussé à 10°C. Le seul à avoir poussé à 35°C est l'isolat PPRI 4179 de l'espèce *Cy. pteridis*. Aux 4 autres températures étudiées, pour chaque combinaison isolat * température, les courbes de croissance obtenues étaient quasiment linéaires. Elles avaient une légère inflexion en début et en fin traduisant l'allure sigmoïde habituelle de courbe de croissance biologique. Chacune de ces courbes (27 isolats, 8 répétitions par isolat, 4 températures étudiées) a fait l'objet d'un ajustement linéaire. Elle a été caractérisée par la pente a de la droite de régression $y = a * t$ (avec y = croissance ; t = temps), la régression ayant été calculée à l'aide de la procédure PROCREG du logiciel S.A.S. Cela a donc fourni 8 « points-pente » par isolat et par température. Mais ne disposant pas des courbes réelles de croissance en fonction de la température pour chacune de ces répétitions (en effet, ce ne sont pas les « mêmes » boîtes de culture qui sont suivies à chaque température), nous avons considéré chaque boîte comme un échantillon possible de l'ensemble des boîtes possibles à une température donnée. Chacune des courbes formées de points de l'une quelconque des 8 répétitions de chaque température devenait alors une courbe possible de l'ensemble des courbes. Ces 8⁴ courbes possibles ont été construites sous Visual Basic, et pour chacune d'elles le programme a stocké la valeur maximale de la vitesse de croissance et la température correspondante. Pour chaque isolat, cela a alors permis le calcul d'un point maximal moyen représentant la vitesse de croissance maximale. La température moyenne lui correspondant représentait alors l'optimum thermique de croissance de l'isolat considéré.

3. Résultats

3.1 Discrimination des descripteurs de la variabilité morphologique

Quatre types différents de vésicules apicales de stipes sont répertoriées : des vésicules clavates (pas à peu renflées), des vésicules de forme plutôt sphérique, des vésicules spatulées et des vésicules sphéro-pédonculées (figure 17 a-d). L'analyse des blocs diagonaux du tableau de Burt (tableau 7) fait ressortir que les deux premiers types cités sont très fréquents puisque constituant plus de 95% des types recensés. Le type spatulé est rare, et le type sphéro-pédonculé n'a été rencontré qu'une seule fois. Les types majoritaires concernant l'aspect

Tableau 7 : Tableau de contingence de Burt sur les variables qualitatives lors de l'évaluation de la diversité phénotypique globale

		FVT				Aspect cultural											
						AMA			MAC		CMA			PMS			
		Clav.	Sphér.	Spath.	Sph.-Péd	Ras	Duv.	Foison	Crénel	Lisse	Blanch.	Hyalin	Jaun.	+Aggr	+ Ind.	Moy.	Faible
FVT	Clav.	105															
	Sphér.	0	57														
	Spath.	0	0	6													
	S-Péd	0	0	0	1												
AMA	Ras	104	2	3	0	109											
	Duvet	1	55	0	0	0	56										
	Foison.	0	0	3	1	0	0	4									
MAC	Crén.	88	0	4	0	91	0	1	92								
	Lisse	17	57	2	1	18	56	3	0	77							
CMA	Blan.	2	49	1	1	2	49	2	2	51	53						
	Hyal.	102	8	5	0	106	7	2	89	26	0	115					
	Jaun.	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1				
PMS	+ aggr	93	0	5	0	96	0	2	90	8	2	96	0	98			
	+ ind	11	57	0	0	12	56	0	0	68	49	19	0	0	68		
	Moy	1	0	1	0	1	0	1	2	0	1	0	1	0	0	2	
	Faible	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1

FVT : Forme de la vésicule Terminale du stipe ; AMA : aspect du Mycélium Aérien ; MAC : Marge des colonies ; CMA : Couleur du Mycélium Aérien ; PMS : Production de Microsclérotos. Clav. : Clavate ; Sphér. Sphérique à ellipsoïde ; Spath : spatulée ; Duv. : Duveteux ; Foison. : Foisonnant ; Crén. : Crénelé ; Blanch. : Blanchâtre ; Jaun. : Jaunâtre ; + Aggr : Production de microsclérotos forte avec tendance à l'aggrégation ; +Ind : Production forte de microsclérotos bien individualisés ; Moy. : Production moyenne

aérien du mycélium sont les types « Ras à moyen » (modalité 1) et « moyen à long d'aspect duveteux » (modalité 2). Les marges des colonies fongiques sont pour la plupart lisses, ou crénelées. Le mycélium aérien présent à la marge des colonies est majoritairement blanc ou hyalin, et la production de microsclérotés est généralement forte, avec deux types dominants : les souches produisant des microsclérotés ayant tendance à s'agréger, et celles qui au contraire produisent des microsclérotés plutôt bien individualisés.

L'analyse des blocs non diagonaux du Tableau de Burt (tableau 7) révèle que le caractère FVT (Forme de la Vésicule Terminale du stipe) est le plus discriminant de tous les descripteurs qualitatifs et que pour une majorité de souches, il renseigne efficacement sur la plupart des autres caractères qualitatifs. Ainsi les souches à vésicules clavates ont principalement un mycélium aérien plutôt ras, des colonies à marge crénelée, un mycélium aérien hyalin et des microsclérotés à forte tendance agrégative. A l'inverse, les souches à vésicules sphériques associent un mycélium aérien duveteux, à des colonies surtout à marge lisse, et à un mycélium aérien plutôt blanchâtre, ainsi qu'à des microsclérotés bien individualisés. Les souches à vésicules spatulées ont un mycélium ras ou foisonnant, des colonies souvent crénelées, un mycélium aérien majoritairement hyalin et des microsclérotés ayant tendance à s'agréger. L'unique isolat à vésicules sphéro-pédonculées a un mycélium foisonnant, une marge lisse, un mycélium aérien blanchâtre, et une production de microsclérotés faible. Du fait de la faible variabilité de réponses indépendantes du critère FVT (forte liaison des descripteurs qualitatifs), nous avons par la suite minoré l'importance des critères qualitatifs autres que FVT, pour privilégier l'information recueillie sous forme quantitative que nous avons par la suite exploitée sous forme d'analyse factorielle en composantes principales, illustrée à l'aide du critère FVT.

En ce qui concerne les variables morphologiques quantitatives, une analyse rapide des liaisons entre les critères « Longueur » (LoCo) et « largeur » (laCo) des conidies indique que ces deux variables sont plutôt bien corrélées (figure 18). Cela a motivé le choix de n'en retenir qu'une seule des deux, à savoir la variable « LoCo » comme descripteur de la taille des conidies, et le rapport LoCo/laCo comme descripteur de la forme, toutes les conidies observées étant droites et cylindriques. En ce qui concerne la vésicule terminale du stipe, le descripteur Hves (hauteur des vésicules) n'existant pas pour les souches à vésicules clavates, nous n'avons finalement retenu que le critère Diaves (plus grand diamètre horizontal) comme descripteur quantitatif de la taille des vésicules, et ce, en dépit d'une discrimination plutôt forte de ces deux caractères pris en compte simultanément (figure 19).

Figure 18 : Liaison entre longueur et largeur des conidies des isolats de *Cylindrocladium*, illustrée par la forme de la vésicule terminale du stipe (169 isolats « terrain » et 11 isolats de référence)

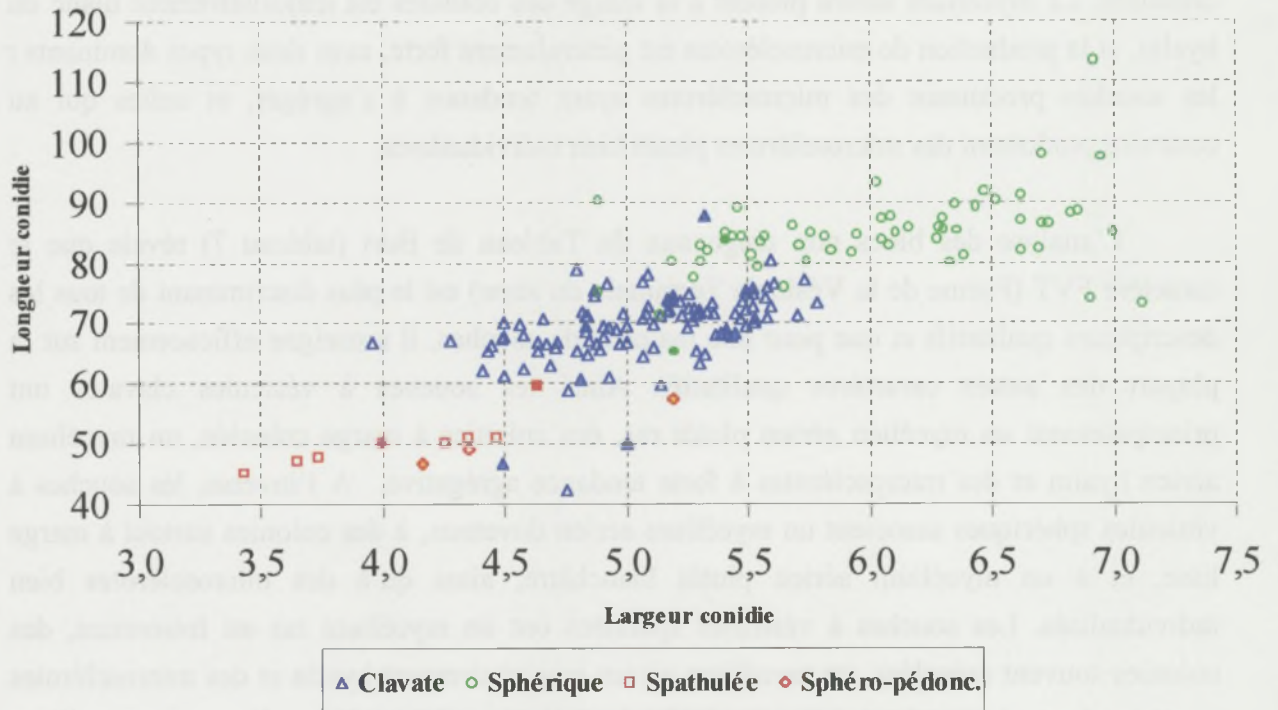
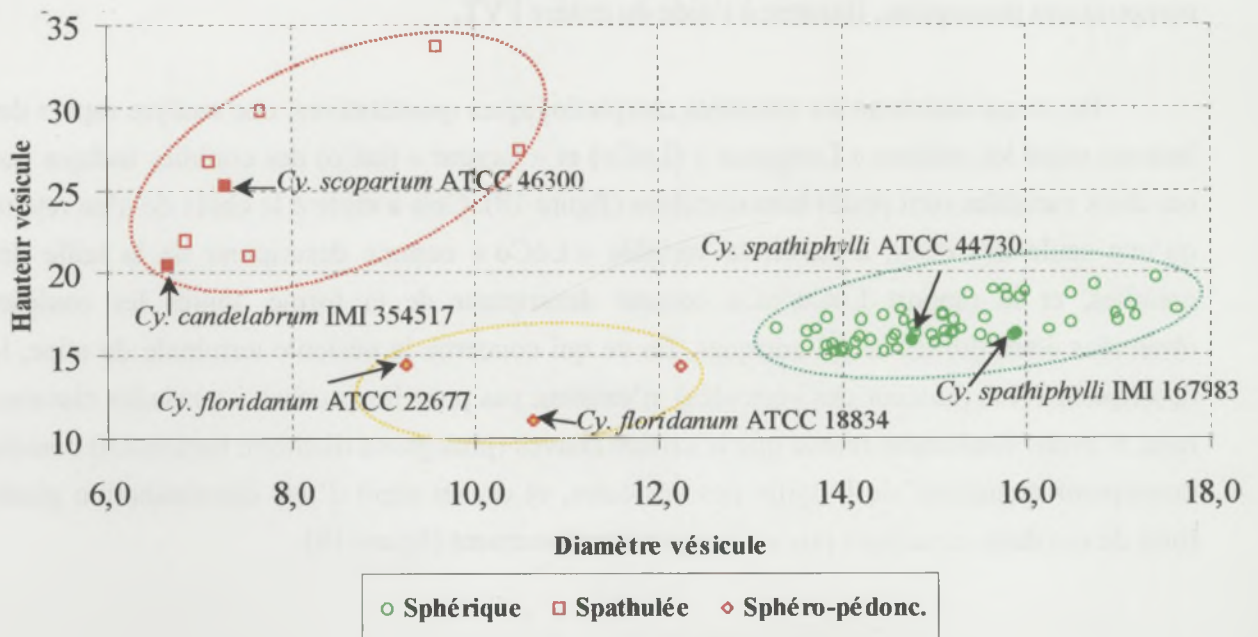


Figure 19 : Liaison entre la hauteur et le diamètre de la vésicule du stipe, illustrée par la forme de la vésicule (hors vésicules clavates, 64 isolats « terrain »-symboles vides-, et 6 isolats de référence -symboles pleins-)



3.2 Analyse globale de la diversité phénotypique

3.2.1 Identification de cinq morphotypes (Mti) en bananeraies

Parmi les descripteurs utilisés dans l'analyse globale de la diversité phénotypique, les variables DiaVes (diamètre de la vésicule terminale du stipe), Nbsepta (Nombre de septa des conidies), LoCo (longueur des conidies) et Vit25 (vitesse de croissance à 25°C sur milieu gélosé malt à 2 %) contribuent respectivement à 27.75 %, 24.49 %, 23.15 % et 20.48 % de la formation de l'axe 1 du premier plan factoriel de l'ACP, soit au total à plus de 95 %. Les variables LoCo/laCo (rapport longueur moyenne des conidies sur largeur moyenne) et Vit25 déterminent quant à elles respectivement 66.91 % et 19.15 % de l'inertie de l'axe 2. La direction de ces variables est donnée par le cercle des corrélations en figure 20. Les deux axes déterminent un plan factoriel représentant plus de 83 % de la variation expliquée, et sur lequel les isolats terrain principalement isolés de la rhizosphère du bananier et minoritairement de celle d'héliconias se répartissent en 2 groupes majeurs (par leurs effectifs) et 3 groupes mineurs facilement illustrés par la forme de la vésicule terminale (figure 21).

Le premier groupe majeur ou morphotype MT1 a une dispersion faible et est constitué d'isolats ayant des vésicules clavates donc de faible diamètre, des vitesses de croissance à 25°C plutôt lentes, des conidies de taille moyenne, à un septum.

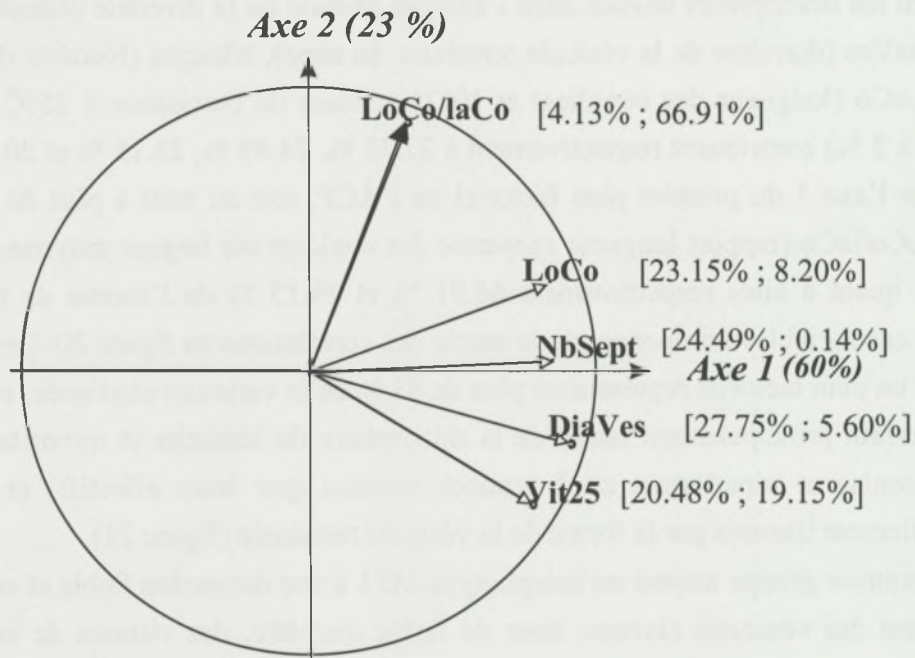
Le second groupe majeur MT2 semble plus variable et rassemble des isolats à vésicule sphérique (diamètre important), à vitesse de croissance Vit25 élevée. Ces isolats MT2 s'opposent aux MT1 également par la plus grande taille de leurs conidies, et un nombre moyen de septa plus élevé. Tous les isolats provenant d'héliconias appartiennent à ce morphotype MT2 et ont donc par la suite été désignés comme « MT2HEL ».

Le groupe mineur MT3 rassemble des isolats à vésicule spatulée se caractérisant surtout par des conidies de petite taille à un septum, avec un rapport LoCo/laCo faible.

Les 2 autres groupes MT4 et MT5 n'ont en fait chacun qu'un seul représentant (respectivement les isolats Cam13 et Cam14). Le morphotype MT4 se caractérise surtout par ses vésicules sphéro-pédonculées, ses conidies de petite taille à un septum avec un rapport LoCo/laCo faible, et sa vitesse de croissance très élevée. Le morphotype MT5 se distingue principalement du morphotype MT1 par ses caractéristiques conidiennes. En effet, si comme MT1 il possède des vésicules clavates, il s'en démarque par des conidies plus petites avec un rapport LoCo/laCo faible.

Le tableau 8 récapitule les caractéristiques phénotypiques marquantes de ces 5 morphotypes de *Cylindrocladium* identifiés en bananeraies.

Figure 20 : Analyse globale de la variabilité phénotypique : représentation du cercle des corrélations de l'ACP (5 variables quantitatives, 169 isolats « terrain » actifs, 9 isolats de référence de *Cylindrocladium* placés en individus supplémentaires) sur le premier plan factoriel (83% de l'inertie totale)



Les contributions des variables à la construction des axes 1 et 2 sont indiquées entre crochets ; La part de chacun des axes 1 et 2 dans l'explication de la variation est donnée entre parenthèses

Figure 21 : Analyse globale de la variabilité phénotypique par Analyse en Composantes Principales : représentation des individus sur le premier plan de l'ACP [169 isolats « terrain » (symboles vides) et 9 isolats de *Cylindrocladium* de référence (symbole pleins)]

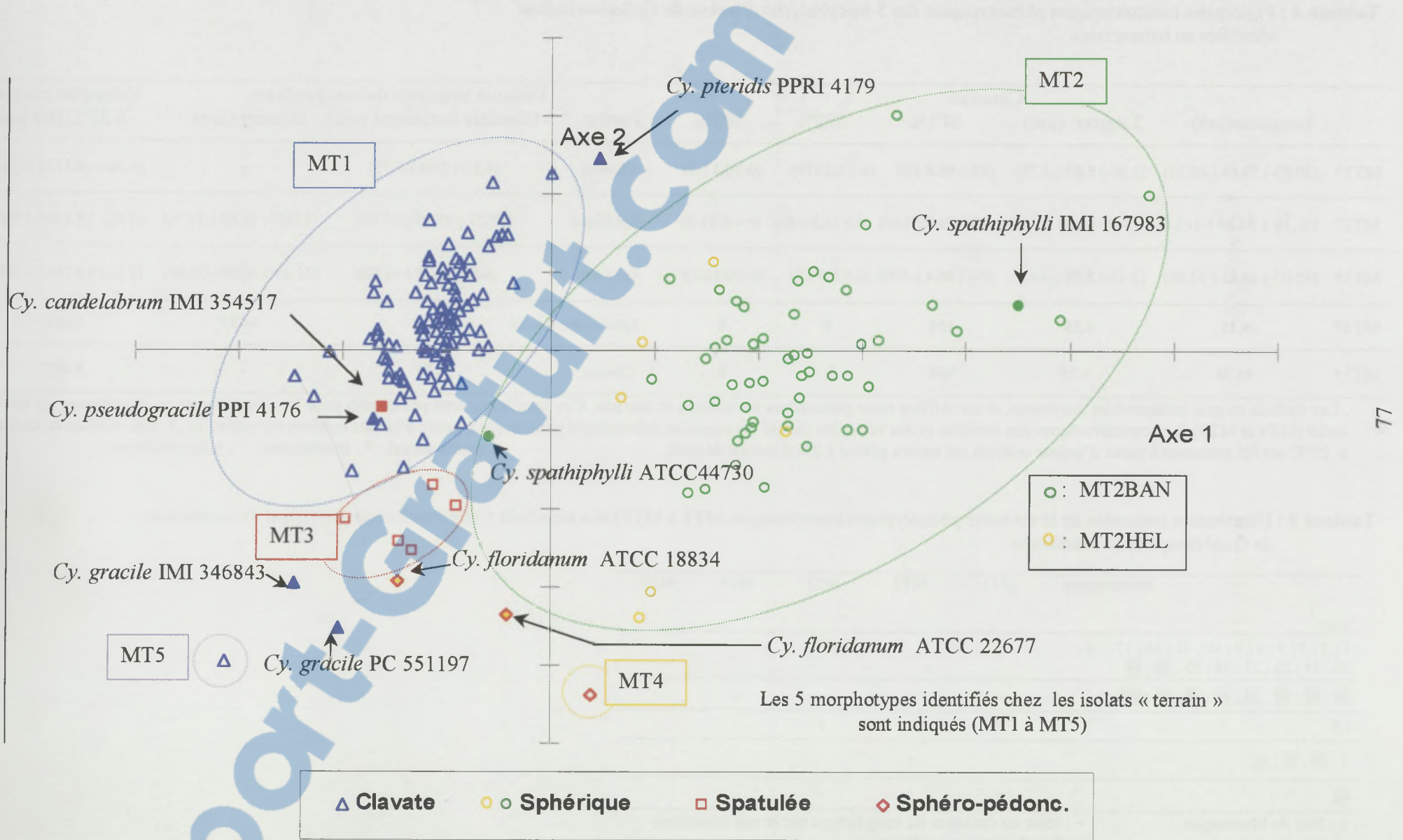


Tableau 8 : Principales caractéristiques phénotypiques des 5 morphotypes d'isolats de *Cylindrocladium* identifiés en bananeraies

	Longueur(µm)	Conidies			Forme	Vésicule terminale du conidiophore		Vitesse de croissance à 25°C (cm/jour)	
		Largeur (µm)	SP1%	SP2%		SP3%	Diamètre horizontal (µm)		Hauteur (µm)
MT1*	(59.03-) 70.04 (-80.31)	(3.96-) 5.09 (-5.78)	(88-) 98.8 100	(0-) 1.2 (10)	(0-) 0.1 (-2)	Clavate	(4.33-) 5.03 (-5.73)	-	(0.266-) 0.512 (-0.773)
MT2°	(71,16-) 84,88 (-113,42)	(4.89-) 6.05 (-7.12)	(18-) 74.8 (-100)	(0-) 24.5 (-80)	(0-) 0.7 (-8)	Sphérique	(13.27-) 15.09 (-17.63)	(15.03-) 16.80 (-19.76)	(0.613-) 0.830 (-1.047)
MT3*	(45.07-) 48.61 (-51.06)	(3.43-) 3.98 (-4.47)	(94-) 98.4 (-100)	(0-) 1.3 (-4)	(0-) 0.3 (-2)	Spatulée	(6.84-) 8.20 (-10.48)	(21.45-) 26.90 (-33.68)	(0.615-) 0.784 (-0.897)
MT4*	49.15	4.35	100	0	0	Sphéro-pédonculée	12.23	14.37	1.401
MT5*	42.36	4.75	100	0	0	Clavate	4.27	-	0.607

78 . Les chiffres en gras indiquent les moyennes, et les chiffres entre parenthèses les minima et maxima. Ces derniers ne sont pas donnés pour les morphotypes ne comprenant qu'un seul isolat (MT4 et MT5). Les caractéristiques des conidies et des vésicules ont été mesurées en microscopie photonique à partir d'isolats cultivés sur milieu BLA. Les vitesses de croissance à 25°C ont été mesurées à partir d'isolats cultivés sur milieu gélosé à 2% d'extrait de malt.

. Statut sexuel : * : indéterminé ; ° : hétérothallique

Tableau 9 : Distribution inter-sites de la diversité phénotypique (morphotypes MT1 à MT5) des isolats de *Cylindrocladium* provenant de bananeraies de Guadeloupe et de Martinique

Morphotypes	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5
Sites					
1 ; 2 ; 3 ; 5 ; 6 ; 9 ; 10 ; 11 ; 14 ; 17 ; 18 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 38 ; 39 ; 40 ; 44	+	-	-	-	-
31 ; 32 ; 33 ; 36 ; 45 ; 46 ; 47 ; 49 ;	-	+	-	-	-
13	+	-	+	-	-
7 ; 30 ; 37 ; 42	+	+	-	-	-
41	+	+	+	-	-

. x : Site de Martinique

+ : Mise en évidence du morphotype sur le site considérés

. y : Site de Guadeloupe

- : Pas de mise en évidence

3.2.2 Comparaison phénotypique des Mti avec des espèces de référence

La figure 21 indique également que les isolats MT1 se regroupent, sur le plan phénotypique, entre l'isolat PPRI 4176 représentant l'espèce *Cy. pseudogracile* et l'isolat PPRI 4179 qui est un représentant de l'espèce *Cylindrocladium pteridis*. Ils se distinguent de ce dernier par un rapport LoCo/laCo plus faible. Ils paraissent plus éloignés des représentants de l'espèce *Cy. gracile* (PC 55197 et IMI 346843) et s'en distinguent en particulier par de plus grandes conidies. L'unique isolat MT5 (Cam14) est par contre, lui, proche de ces deux représentants de l'espèce *Cy. gracile*.

Les isolats MT2 se répartissent entre les 2 représentants de l'espèce *Cylindrocladium spathiphylli* que sont ATCC 44730 et IMI 167983. Ils présentent donc une similarité phénotypique certaine avec les représentants de cette espèce. Pour les critères Loco, Nbsept, Diaves, et Vit25, ils paraissent globalement plus proches de IMI 167983. Il est intéressant de noter que l'on retrouve au sein de ce groupe MT2, tous les isolats provenant d'héliconias, et que ceux-ci ne semblent donc présenter aucune dissemblance morphométrique majeure avec les isolats MT2 provenant de bananeraies. On peut toutefois noter qu'ils sont pour la plupart localisés dans la partie gauche du nuage de points MT2 la plus proche de l'autre représentant de l'espèce *Cy. spathiphylli*, à savoir ATCC 44730. Cela traduit une septation moins importante pour ATCC 44730 et les isolats MT2 provenant d'héliconias que pour les isolats MT2 issus de bananeraies.

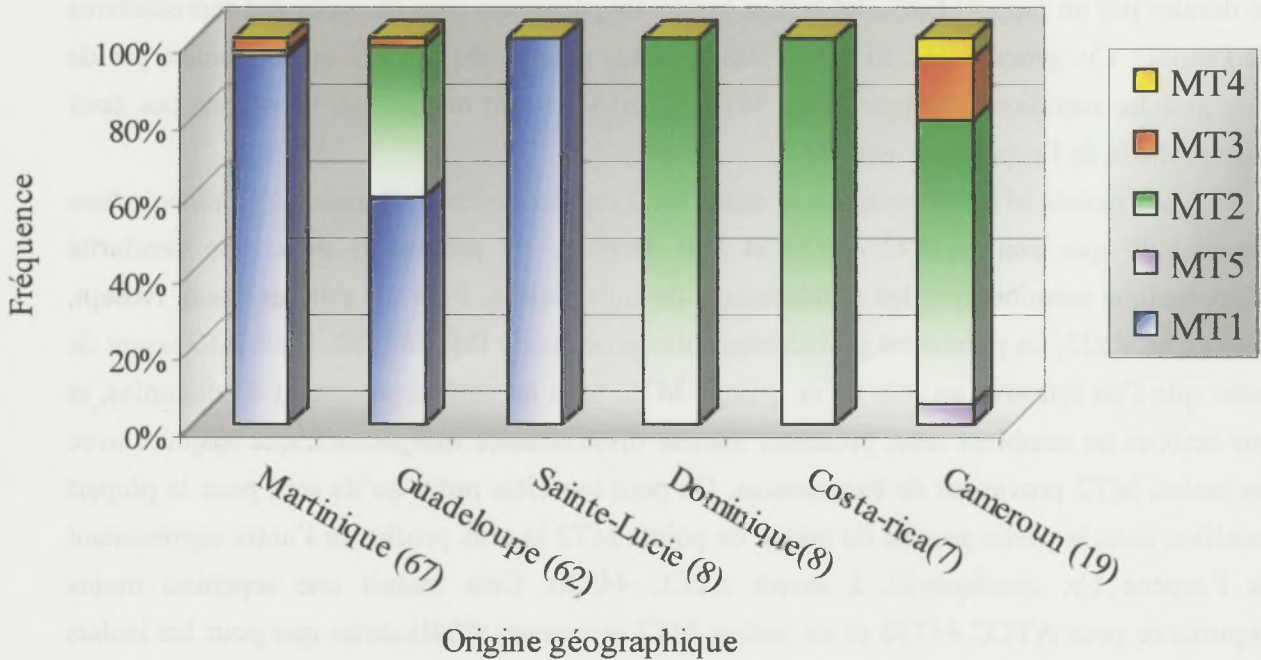
Les isolats MT3 se rassemblent entre un représentant de l'espèce *Cy. floridanum* (ATCC 18834) et un autre isolat à vésicule spatulée, le représentant ATCC 354517 de l'espèce *Cy. candelabrum*. Il n'a pas été possible d'inclure dans cette ACP le représentant d'une autre espèce proche à vésicule spatulée, l'espèce *Cy. scoparium*. Néanmoins, si l'on se reporte à la figure 19, et compte tenu du fait que la taille des conidies de cette espèce est donnée dans la littérature comme similaire à celle des conidies de *Cy. candelabrum* (Crous et Wingfield, 1994), les isolats MT3 pourraient aussi être proches, d'un point de vue phénotypique, de *Cy. scoparium*.

Enfin, l'unique isolat MT4 reste un peu isolé, quoique proche d'un représentant de l'espèce *Cy. floridanum*, par sa vitesse élevée de croissance à 25°C, et son faible rapport conidien Loco/laco.

3.2.3 Distribution géographique des morphotypes

La figure 22 donne la distribution géographique des cinq morphotypes identifiés en bananeraies. Sur l'échantillon d'isolats étudiés, le type MT2 est le plus fréquent puisqu'il est trouvé aussi bien aux Antilles, qu'en Amérique centrale (Costa-Rica) ou sur le continent africain (Cameroun). Le type MT1 n'est décelé qu'aux Antilles où il est très nettement

Figure 22 : Distribution des 5 morphotypes d'isolats de *Cylindrocladium* trouvés en bananeraies, en fonction des origines géographiques



majoritaire en Martinique. Ce morphotype MT1 est également le seul qui ait été trouvé à Sainte-Lucie. Le morphotype MT3 quoique peu fréquent se retrouve aussi bien aux Antilles françaises qu'au Cameroun. Les morphotypes rares MT5 et MT4 n'ont été recensés qu'au Cameroun. C'est donc dans ce dernier pays que la diversité phénotypique est la plus importante. Une analyse rapide de la distribution entre les sites de ces morphotypes dans les deux zones géographiques où l'échantillonnage a été le plus important (Martinique et Guadeloupe) indique que plusieurs morphotypes peuvent coexister sur le même site (tableau 9).

3.3 Identification des optima thermiques de croissance chez les différents morphotypes, et comparaison avec ceux d'isolats de référence

Les vitesses moyennes de croissance à 25°C étant sensiblement différentes entre certains Mti (tableau 8), nous avons donc étudié la loi d'action de la température sur la croissance de représentants de ces 5 Mti et d'isolats d'espèces de référence. Nous avons en particulier recherché s'ils présentaient des optima thermiques de croissance différents, pouvant constituer un critère supplémentaire de discrimination. Les figures 23a-c indiquent que pour une majorité d'isolats, l'optimum thermique de croissance se situe autour de 25-26°C. C'est le cas pour les isolats des morphotypes MT1 et MT5 et pour le représentant IMI 346843 de l'espèce *Cy. gracile*. Par contre, l'optimum thermique d'un second représentant de l'espèce *Cy. gracile* PC 551197 et ceux des représentants des espèces *Cylindrocladium pteridis* et *Cy. pseudogracile* se situent nettement plus autour de 30°C. Les vitesses de croissance à ces optima sont d'ailleurs plus élevées chez ces 2 dernières espèces que chez les isolats MT1. Cela suggère une plus grande proximité physiologique des isolats MT1 et MT5 avec IMI 346843 qu'avec l'autre représentant de l'espèce *Cy. gracile* ou avec les représentants des espèces *Cy. pseudogracile* et *Cy. pteridis*. Dans le même temps, cela illustre l'existence d'une variabilité physiologique certaine au sein de l'espèce *Cy. gracile*.

Les isolats MT2 se répartissent en 2 groupes. Les isolats MT2HEL provenant d'héliconias présentent des optima thermiques de croissance se situant autour de 20-22°C et proches de celui du représentant ATCC 44730 de l'espèce *Cy. spathiphylli* (22.7°C). Les isolats MT2BAN provenant de bananeraies, ont comme IMI 167983 l'autre représentant de l'espèce *Cy. spathiphylli*, un optimum thermique de croissance plus élevé, se situant vers 25°C. Les vitesses de croissance à ces optima thermiques sont bien plus faibles pour les isolats du premier groupe, que pour ceux du second. Au sein du morphotype MT2, il existe donc une disparité physiologique entre isolats du bananier et isolats d'héliconias qui se

Figure 23a : Optima thermiques d'isolats MT1, MT5, et de représentants d'espèces de *Cylindrocladium* de référence à vésicules clavates

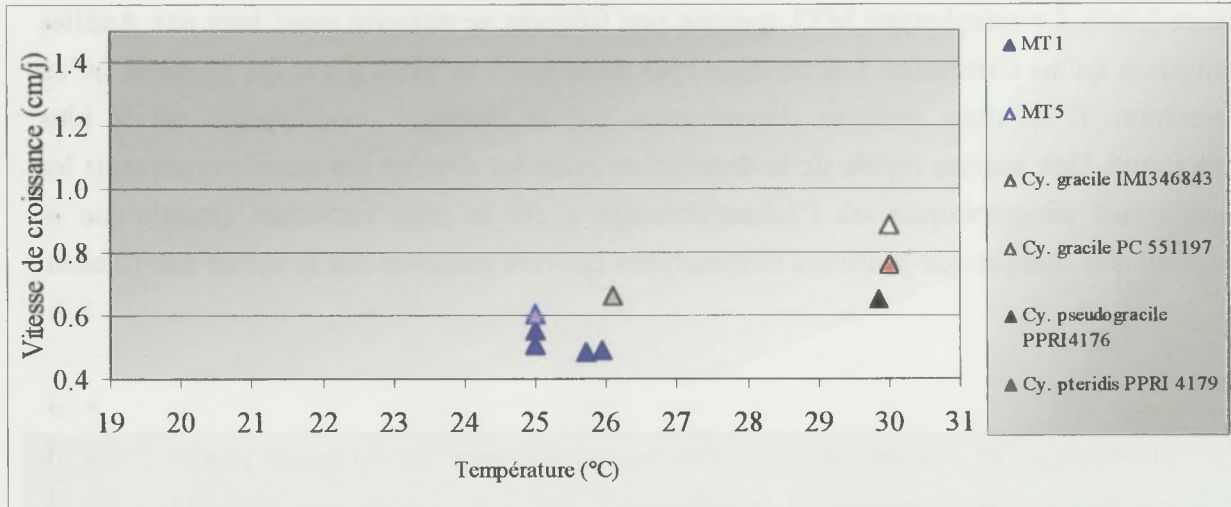


Figure 23b : Optima thermiques d'isolats MT2 et de représentants de l'espèce *Cy. spathiphylli* (vésicules sphériques)

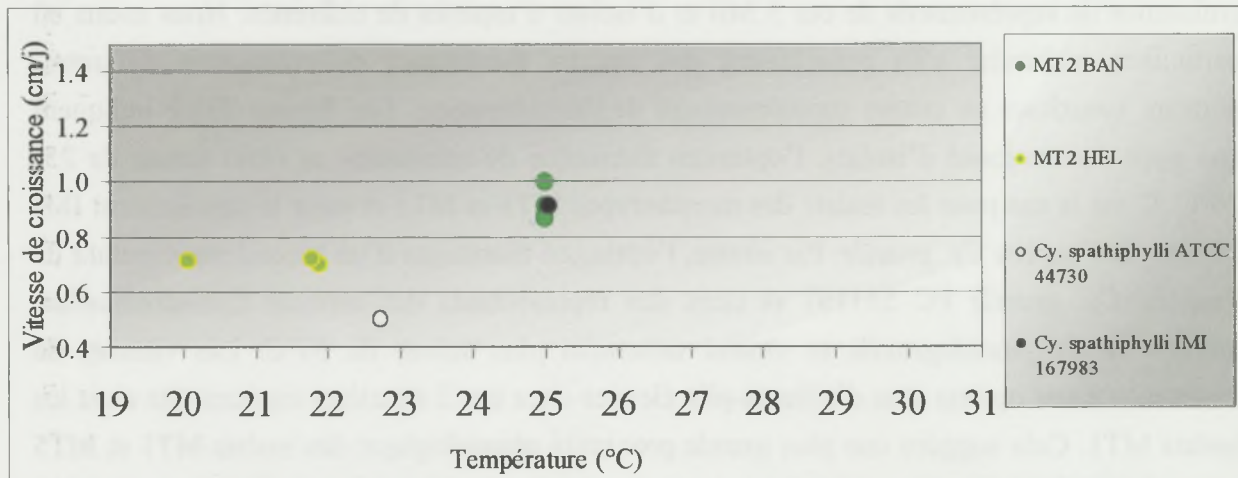


Figure 23c : Optima thermiques d'isolats MT3, MT4 et d'espèces de *Cylindrocladium* de référence à vésicules spatulées (symboles carrés gris et noir) ou sphéro-pédonculées (symboles en losange blanc ou noir)

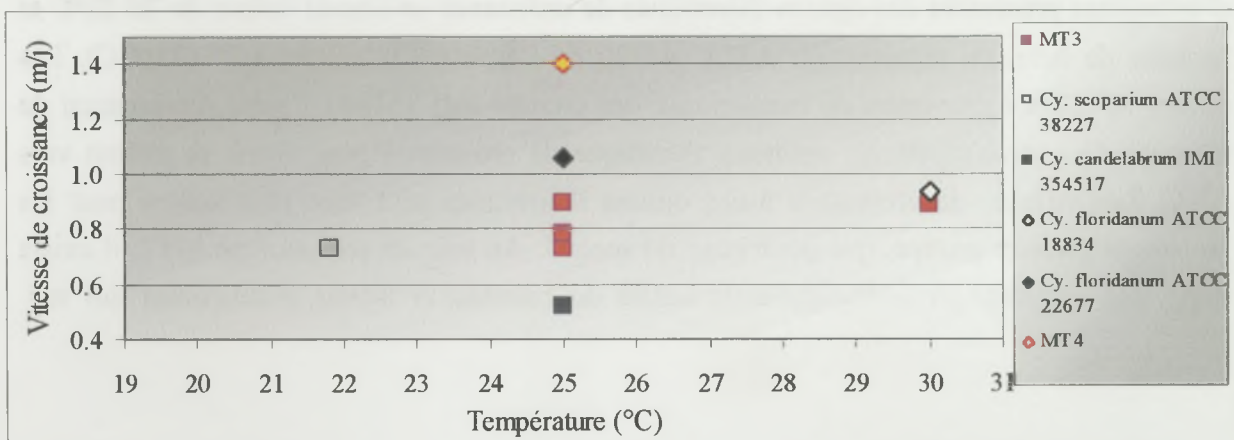
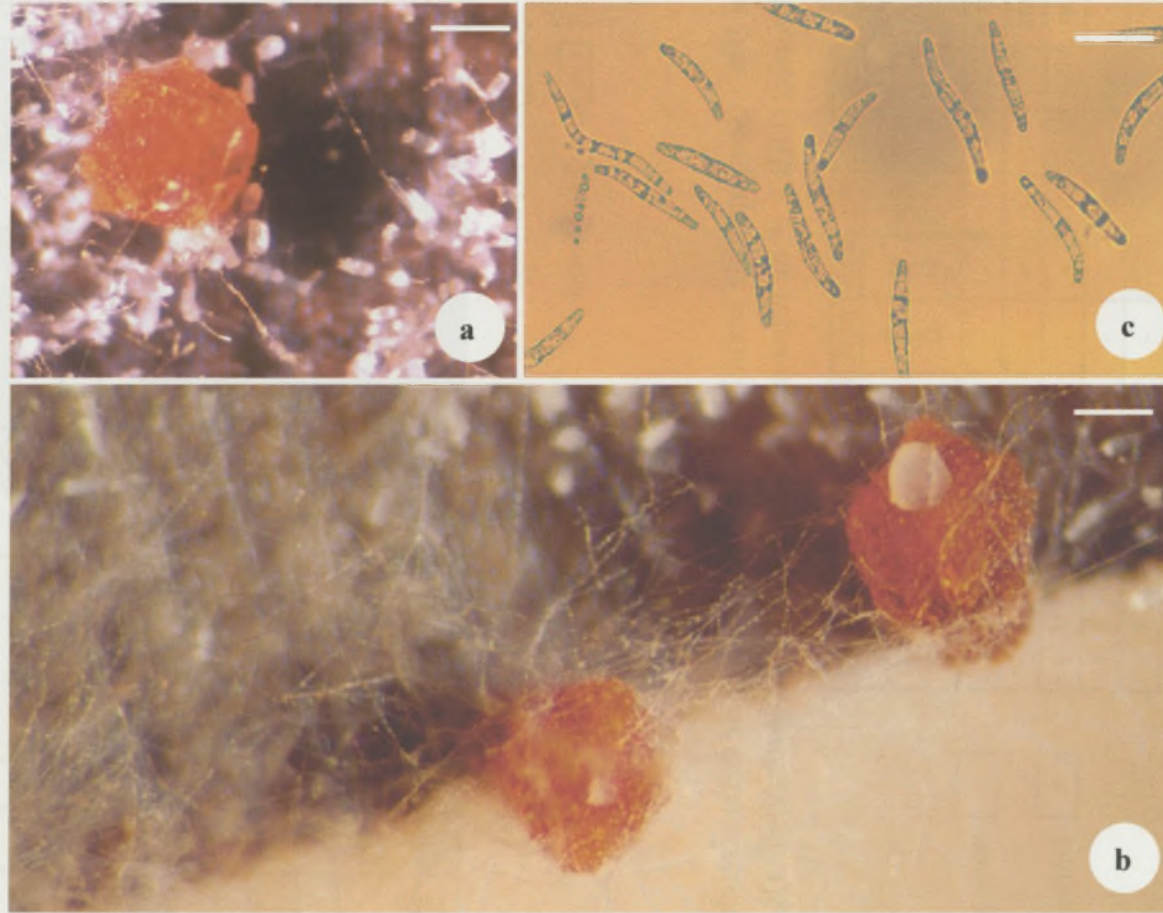


Figure 24 : Périthèces et ascospores du stade téléomorphe *Calonectria* obtenus à l'issue de croisements entre isolats de *Cylindrocladium* à vésicules sphériques provenant de bananeraies (MT2BAN) ou d'héliconias (MT2HEL), ou avec des représentants de référence de l'espèce *Cy. spathiphylli*



a : Périthèce immature (barre = 217 μm) ; b : Périthèce déchargeant sa gelée d'ascospores (barre = 210 μm) ;
c : Ascospores bi-cellulaires (barre = 27.9 μm)

Tableau 10a : Compatibilité sexuelle d'isolats MT1, MT5 et d'isolats de référence appartenant aux espèces *Cy. gracile*, *Cy. pteridis* et *Cy. pseudogracile*

	1			2			3	MT5	MT1					
	PC 551197	ATCC 22833	IMI 346843	PPRI 4179	IMI 354530	ATCC 34395	PPRI 4176	Cam14	Mar1	Mar4	Mar11	Gua8	Gua12	Slu2
PC 551197	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-
ATCC 22833		-	-					-	-	-	-	-	-	-
IMI 346843			-					-	-	-	-	-	-	-
PPRI 4179				-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
IMI 354530					-	-		-	-	-	-	-	-	-
ATCC 34395						-		-	-	-	-	-	-	-
PPRI 4176							+							
Cam14								-	-	-	-	-	-	-
Mar1									-	-	-	-	-	-
Mar4										-	-	-	-	-
Mar11											-	-	-	-
Gua8												-	-	-
Gua12													-	-
Slu2														-

- : Pas de périthèces

+ : Périthèces fertiles

1 : Représentants de l'espèce *Cy. gracile*

2 : Représentants de l'espèce *Cy. pteridis*

3 : Représentant de l'espèce *Cy. pseudogracile*

Tableau 10b : Compatibilité sexuelle d'isolats MT2 isolés de bananeraies (BAN) ou d'héliconias (HEL), et de représentants de l'espèce *Cy. spathiphylli* (Réf.)

	Réf.	Réf.	Réf.	BAN.	BAN.	BAN.	BAN.	BAN.	HEL.	HEL.
	ATCC 44730	IMI 167983	CBS 538.87	Cor4	Cam8	Dom4	Gua5	Cam1	Hel2A	Hel2B
ATCC 44730	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
IMI 167983		-	-	+	-	-	-	-	-	-
CBS 538.87			-	-	-	-	-	-	-	-
Cor4				-	-	-	-	-	+	+
Cam8					-	-	-	-	-	-
Dom4						-	-	-	+	+
Gua5							-	-	-	-
Cam1								-	-	-
Hel2A									-	-
Hel2B										-

- : Pas de périthèces

+ : Périthèces fertiles

Tableau 10c : Compatibilité sexuelle d'isolats MT3 et d'isolats à vésicules spatulées appartenant aux espèces *Cy. scoparium* et *Cy. candelabrum* (Réf.)

	1				2	MT3						
	ATCC 46300	CBS 23051	CBS 149.49	ATCC 38227	ATCC 354517	Mar13	Mar12	Gua13	Cam10	Cam11	Cam9	Cam12
ATCC 46300	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 23051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 149.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 38227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 354517	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mar13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mar12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gua13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cam10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cam11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cam9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cam12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Pas de périthèces 1 : Représentants de l'espèce *Cy. scoparium*
 + : Périthèces fertiles 2 : Représentant de l'espèce *Cy. candelabrum*

Tableau 10d : Compatibilité sexuelle de l'isolat Cam13 (MT4) et d'isolats à vésicules sphéro-pédonculées de l'espèce *Cy. floridanum* (Réf.)

	Réf.	Réf.	Réf.	Réf.	BAN.
	ATCC 42971	ATCC 18882	ATCC 22677	ATCC 18834	Cam13
ATCC 42971	+	+	+	+	+
ATCC 18882	-	+	+	+	+
ATCC 22677	-	-	-	-	-
ATCC 18834	-	-	-	+	+
Cam13	-	-	-	-	-

- : Pas de périthèces
 + : Périthèces fertiles

retrouve également au sein même de l'espèce *Cy. spathiphylli* dont nous avons précédemment souligné la similarité phénotypique avec ces isolats MT2.

Chez les isolats à vésicules spatulées, on observe une structuration en 3 groupes : Certains isolats MT3 ont une croissance optimale à 25°C comme le représentant de l'espèce *Cy. candelabrum*, tandis qu'un autre isolat MT3 a son optimum thermique de croissance à 30°C, alors que dans le même temps le représentant de l'espèce *Cy. scoparium* a le sien à 21.8°C. Cette situation témoigne là encore de l'existence d'une variabilité physiologique au sein de ces isolats MT3, variabilité dont il faudra vérifier si elle se retrouve sur le plan génétique.

Enfin, chez les isolats à vésicules sphéro-pédonculées, il existe deux situations tranchées. D'une part un optimum thermique de croissance à 25°C pour l'unique isolat MT4 et le représentant ATCC 22677 de l'espèce *Cy. floridanum*, et d'autre part un optimum thermique à 30°C pour le second représentant de l'espèce *Cy. floridanum*. Cela pourrait témoigner là encore d'une certaine disparité physiologique au sein de l'espèce *Cy. floridanum*, l'isolat MT4 paraissant plus proche du représentant ATCC 22677 de *Cy. floridanum*.

3.4 Compatibilité sexuelle intra et inter morphotypes

L'objectif recherché avec ces croisements était d'identifier s'il existait au sein des isolats de *Cylindrocladium* provenant de bananeraies et d'héliconias des entités biologiques constituées d'individus inter-féconds entre eux, mais pas avec d'autres. Aucun des croisements de représentants des morphotypes MT1 et MT5 soient entre eux ou avec des souches de référence à vésicules clavates appartenant aux espèces *Cy. gracile* et *Cy. pteridis* ne génère de périthèce fertile (tableau 10a). Seuls des protopérithèces, toujours vides sont fréquemment induits dans les cultures de MT1 ou de MT5 sur milieu B.L.A. Il est à noter qu'aucun des croisements intra ou inter spécifiques réalisés avec les représentants de ces 2 espèces *Cy. gracile* et *Cy. pteridis* ne génère non plus de périthèces. Seul l'isolat PPRI 4176 de l'espèce *Cy. pseudogracile* se révèle autofertile, en produisant très facilement en « monoculture » de nombreux périthèces fertiles du stade téléomorphe *Calonectria gracilis* (tableau 10a). Cela confirme donc le statut homothallique de cette espèce (Crous, Theron et Van Zyl, 1997).

Au sein des isolats à vésicules sphériques, plusieurs individus se révèlent sexuellement compatibles en générant au bout de 4 à 5 semaines des périthèces verruqueux de couleur brun orangé qui se révèlent fertiles (tableau 10b, figure 24a-c). C'est le cas des deux références de l'espèce *Cylindrocladium spathiphylli*, à savoir les isolats ATCC 44730 (référence type) et

IMI 167983 qui se révèlent interfertiles ce qui confirme l'hétérothallisme de cette espèce. Des isolats MT2 provenant de bananiers (Dom4) ou d'héliconias (Hel2A et Hel2B) sexualisent avec l'une ou l'autre de ces 2 références. Ces mêmes isolats provenant de bananier ou d'héliconias se révèlent à leur tour également interfertiles entre eux, en induisant des périthèces typiques du stade téléomorphe *Calonectria*. Ces résultats suggèrent donc très fortement l'appartenance des isolats MT2 à l'espèce *Cylindrocladium spathiphylli*. Les isolats ATCC 44730 et IMI 167983 ont respectivement été utilisés comme testeurs de signe « - » et « + » par El-Gholl *et al.* (1992b), puis par Crous et Peerally (1996). L'existence d'un hétérothallisme bipolaire chez *Ca. spathiphylli* ayant été montré par El-Gholl *et al.* (1992b), on peut déduire de ces croisements que les isolats Dom4 et Cor4 provenant de bananier sont de signe « - », et que les isolats Hel2A et Hel2B provenant d'héliconias sont de signe « + ».

Les isolats MT3 ne sont compatibles avec aucun des isolats de référence à vésicule spatulée que nous avons testés, à savoir des représentants des espèces *Cylindrocladium scoparium* ou *Cy. candelabrum* (tableau 10c). Seuls deux représentants de l'espèce *Cylindrocladium scoparium* se révèlent interfertiles entre eux lorsqu'ils sont croisés, ce qui confirme l'hétérothallisme de cette espèce (Crous, Alfenas et Wingfield, 1993).

Le statut sexuel de l'unique isolat MT4 (Cam13) est demeuré indéterminé, car cet isolat n'a produit de périthèces ni seul, ni lorsqu'il a été croisé avec des isolats de l'espèce *Cy. floridanum* qui possèdent comme lui des vésicules sphéro-pédonculées. Les isolats de référence de l'espèce *Cy. floridanum* que nous avons utilisés ont eu quant à eux des comportements différant d'un isolat à l'autre. Dans tous les croisements où ils étaient impliqués, y compris dans leurs auto-croisements, les isolats ATCC 42971, ATCC 18882, et ATCC 18834 ont facilement généré des périthèces fertiles (tableau 10d). Leur autofertilité démontre leur homothallisme. A l'inverse, l'isolat ATCC 22677 n'a pas engagé le cycle sexué en auto-croisement, ce qui suggère qu'il soit hétérothallique ou stérile.

Enfin, aucun des croisements inter Mti n'a généré de périthèces fertiles.

4. Discussion - Conclusions

De tous les descripteurs morphologiques et culturaux de type qualitatif pris en compte dans notre étude, le caractère « Forme de la vésicule » des stipes (FVT) apparaît être le plus discriminant, ce qui en souligne l'intérêt comme descripteur phénotypique chez le genre *Cylindrocladium*. L'utilité de ce caractère a fait l'objet de nombreuses controverses parmi les taxinomistes du genre *Cylindrocladium*, et nos résultats sont en conformité avec ceux de

El-Gholl, 1986, 1989 ; Peerally, 1991 ; Crous et Wingfield, 1994). En combinant ce caractère FVT avec d'autres critères morphométriques relatifs aux anamorphes (caractéristiques des conidies, diamètre moyen des vésicules) et avec un critère physiologique (vitesse de croissance à 25°C), nous avons pu, pour la première fois démontrer l'existence d'une diversité phénotypique au sein des isolats de *Cylindrocladium* provenant de la rhizosphère du bananier. Cinq types morphologiques aux caractéristiques physiologiques et biologiques variables ont été identifiés et étudiés, certains d'entre eux pouvant être simultanément présents dans un même site.

Le morphotype le plus fréquent en bananeraies est le morphotype MT2. Il est présent aussi bien dans les petites Antilles, qu'au Costa-Rica, ou au Cameroun. Les caractéristiques morphométriques du stade anamorphe de ces isolats MT2, à savoir des conidies hyalines, droites, cylindriques, de 71 à 113 µm de long, principalement mono ou biseptées, ainsi que la forme sphérique de la vésicule apicale de leurs conidiophores les rapprochent indubitablement des caractéristiques décrites pour l'espèce *Cy. spathiphylli* (El-Gholl *et al.*, 1992b ; Crous et Wingfield, 1994). En comparant ces isolats MT2 provenant de bananeraies (MT2BAN) à des isolats de morphotype similaire mais provenant d'héliconias (MT2HEL) ainsi qu'à des représentants de référence de l'espèce *Cy. spathiphylli*, deux types d'éléments peuvent être mis en exergue : i/ Les isolats MT2BAN paraissent phénotypiquement plus proches de l'isolat de référence de l'espèce *Cy. spathiphylli* IMI 167873 isolé de théier en 1991 à l'île Maurice (Crous et Peerally, 1996) que de l'isolat ATCC 44730 qui est déposé à l'ATCC comme souche type de l'espèce *spathiphylli*, et qui a été isolé de *Spathiphyllum*. Or, cet isolat IMI 167983 a été décrit par ces mêmes auteurs comme représentatif d'une certaine diversité morphologique pouvant exister au sein même de l'espèce *spathiphylli*, du fait de ses conidies fréquemment triseptées. Les différences observées chez cet isolat dans notre étude se traduisent effectivement par une septation conidienne généralement plus importante que chez la souche type, mais aussi par un optimum thermique de croissance supérieur, comparable à celui des souches MT2BAN. ii/A l'inverse, les isolats MT2HEL présentent des caractéristiques morphométriques et un optimum thermique de croissance plus proches de ceux de l'isolat type de l'espèce *spathiphylli* que de ceux de l'isolat IMI 167983.

Ces résultats illustrent donc l'existence d'une variabilité phénotypique et physiologique au sein des isolats MT2 et suggèrent qu'elle puisse être liée, dans le cas de figure qui nous intéresse, à leur hôte d'origine. Nous tenterons de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse à l'aide de marqueurs moléculaires et de marqueurs du pouvoir pathogène, dans les chapitres suivants. En ce qui concerne les études sur la compatibilité sexuelle des isolats MT2, elles suggèrent qu'indépendamment de leur hôte d'origine (bananier ou héliconia), ces isolats puissent appartenir à une seule et même entité biologique, à savoir l'espèce *Cy. spathiphylli*. Ils peuvent en effet se croiser entre eux, ou avec des isolats de référence de l'espèce *Cy. spathiphylli* permettant ainsi l'obtention in-vitro du stade

téléomorphe *Calonectria*. L'espèce *Cy. spathiphylli* a été décrite pour la première fois sur *Spathiphyllum* en 1982 par Schoulties, El-Gholl et Alfieri, et est signalée sur d'autres hôtes comme les héliconias, les Strelitzias, les Araucarias, et ce, dans différentes régions géographiques comme les Etats-Unis, l'Europe ou l'Australie (Peerally, 1991 ; Crous et Wingfield, 1994). Si l'appartenance des isolats MT2 à cette espèce est confirmée, ce serait donc la première fois qu'elle serait rapportée de façon argumentée comme présente sur *Musaceae*, tant en Amérique centrale que dans la Caraïbe ou sur le continent africain. Cette confirmation passe cependant à notre avis par la démonstration complémentaire d'une similarité génétique entre ces isolats MT2 et les isolats de référence de l'espèce *Cy. spathiphylli*. Les croisements interspécifiques restent en effet en théorie possibles chez des organismes en cours de spéciation pour lesquels aucune barrière biologique n'est encore érigée. Chez les champignons filamenteux, on connaît par exemple des hybridations naturelles entre les espèces *Phytophthora nicotianae* et *Phytophthora cactorum* (Man in't Veld *et al.*, 1998), ainsi qu'entre des espèces du genre *Ophiostoma* (Brasier *et al.*, 1998).

Le second morphotype de *Cylindrocladium* présent en bananeraies est représenté par les isolats MT1. Ce morphotype ne semble présent que dans la caraïbe et en particulier dans le sud de l'Arc antillais. C'est par exemple le morphotype dominant en Martinique, ce qui confirme des résultats précédents (Risède, 1994). Les caractéristiques morphométriques de ces isolats MT1 permettent de les situer comme proches d'un complexe d'espèces similaires sur le plan morphologique (espèces à vésicules clavates), identifiées par l'équipe sud-africaine de Crous *et al.* en 1997, grâce à des marqueurs RFLP et à des études de compatibilité sexuelle. Ce complexe comprend les espèces *Cy. pseudogracile*, *Cy. gracile*, *Cy. pteridis* prises comme références à vésicules clavates dans notre étude, ainsi que l'espèce *Cy. graciloideum*. Ces auteurs ont décrit *Cy. pseudogracile* et *Cy. graciloideum* comme des espèces homothalliques, *Cy. pteridis* comme une espèce hétérothallique, mais n'ont pas réussi à induire de stade téléomorphe chez *Cy. gracile*. Dans notre étude, les isolats MT1 semblent proches d'un point de vue morphométrique des espèces *Cylindrocladium pteridis* et *Cy. pseudogracile*, mais s'en différencient par des optima thermiques et des vitesses de croissance à ces optima plus faibles. Ils se distinguent également du représentant de l'espèce *Cy. pteridis* par leurs conidies qui ont un rapport Longueur / largeur plus faible. Dans le même temps, nous trouvons l'espèce *Cy. pseudogracile* très clairement homothallique, alors qu'aucune des autres espèces de référence clavates, ni aucun des isolats MT1 testés n'a engagé le cycle sexué en « monoculture » dans notre étude. Cela pourrait donc suggérer que ces isolats MT1 n'appartiennent ni à l'espèce *pseudogracile*, ni d'ailleurs à l'espèce *Cy. graciloideum* également donnée dans la littérature comme homothallique (Crous *et al.*, 1997). La présence fréquente de protopérithèces et l'absence systématique de périthèces dans les cultures de MT1 nous incitent à penser que ces isolats sont probablement hétérothalliques et

de même signe de compatibilité sexuelle, mais peut-être pas stériles. Cette hypothèse ne pourrait cependant être validée que par l'obtention d'isolats réalisant le cycle sexué. Il faut enfin relever que les isolats MT1 avaient des conidies plus grandes que celles des représentants de l'espèce *Cy. gracile* tout en ayant un optimum thermique de croissance très proche de celui du représentant IMI 346843 de l'espèce *Cy. gracile*, mais plus faibles que celui de l'autre représentant de cette espèce, la souche type PC 551197. Ces résultats ne permettent pas à eux seuls d'identifier les isolats MT1 et suggèrent également l'existence d'une variabilité physiologique au sein de l'espèce *Cy. gracile* pour laquelle nous n'avons pas réussi, comme l'équipe sud-africaine précédemment citée, l'induction du stade téléomorphe. Mais en définitive, ils ne dégagent pour l'heure aucune piste claire quant à l'identité des isolats MT1, et nous incitent à rechercher et à développer dans la suite de notre étude, des marqueurs complémentaires, plus discriminants.

Le morphotype MT5 est un autre morphotype de *Cylindrocladium* trouvé en bananeraies. Il n'a qu'un seul représentant (l'isolat Cam14) et n'est présent qu'au Cameroun. Ses caractéristiques phénotypiques le rapprochent du même complexe d'espèces duquel sont proches les isolats MT1. Par ses caractéristiques conidiennes en particulier, il ressemble à l'espèce *Cy. gracile*. Il présente d'ailleurs le même optimum thermique que l'un des représentants de cette espèce, l'isolat IMI 346843. Les études de compatibilité sexuelle du représentant MT5 avec des isolats de référence du complexe d'espèces à vésicules clavates cité précédemment (complexe *Cy. gracile*-like), ou avec des isolats MT1 ne nous ont cependant pas davantage renseigné sur son statut spécifique car son stade téléomorphe n'a pu être induit, et ce, malgré la présence de protopérithèces. La confirmation de la conspécificité de ce morphotype avec l'espèce *Cy. gracile* - dont rappelons-le le stade téléomorphe est inconnu à ce jour - pourrait par conséquent être établie sur une base génétique, en recourant aux marqueurs moléculaires.

Le morphotype MT3 est un autre morphotype de *Cylindrocladium* détecté en bananeraies. Il est présent aussi bien dans la Caraïbe qu'en Afrique. Avec ses conidies de petite taille à un septum, ses vésicules spatulées, il présente des similitudes avec un complexe d'espèces hétérothalliques et similaires sur le plan morphologique décrit par Schoch *et al.*, en 1999 (c'est à dire près de deux ans après le début de notre étude) sur la base de croisements et de séquences ITS. Ce complexe comprend l'espèce *Cy. candelabrum* que nous avons utilisée comme référence, mais aussi les espèces *Cy. insulare*, *Cy. mexicanum* et *Cy. pauciramosum* pour lesquelles aucun représentant n'était disponible dans les mycothèques internationales. Le morphotype MT3 se démarque cependant des espèces de ce complexe par un statut sexuel non déterminé du fait que nous n'avons pu induire son stade téléomorphe, que ce soit de façon homothallique ou hétérothallique (croisements entre eux d'isolats de ce morphotype MT3).

Nous jugeons également ses caractéristiques morphométriques voisines de celles d'une autre espèce à vésicule spatulée souvent confondue avec *Cy. candelabrum* non incluse dans l'ACP. Il s'agit de l'espèce hétérothallique *Cy. scoparium* (Crous, Alfenas et Wingfield, 1993) qui est sexuellement incompatible avec *Cy. candelabrum*. Il est cependant difficile de comparer sur des bases solides les mensurations conidiennes des isolats MT3 à celles des espèces *Cy. candelabrum* et *Cy. scoparium*, car une analyse approfondie des quatre clés de détermination disponibles dans la littérature et qui font référence à ces espèces, à savoir celle de Peeraly (1991), celle de Crous et Wingfield (1994), celle de Crous *et al.* (1997), et celle de Schoch *et al.* (1999) révèle une disparité flagrante dans les gammes de variation morphométrique acceptées par ces auteurs chez ces 2 espèces. L'utilisation de descripteurs morphologiques même pris en conjonction avec une étude de compatibilité sexuelle ne nous permet donc pas pour l'instant d'identifier ces isolats MT3. Avec des optima thermiques de croissance variables mais nettement supérieurs à celui de l'isolat de *Cy. scoparium* testé, ou supérieurs ou égaux à celui de l'isolat IMI 354517 de l'espèce *Cy. candelabrum*, ils révèlent par ailleurs entre eux une variabilité physiologique certaine.

Enfin, le morphotype MT4 est le cinquième morphotype de *Cylindrocladium* trouvé en bananeraies. C'est un morphotype rare, à un seul représentant dans notre étude (isolat Cam13), et qui a été trouvé uniquement au Cameroun. Ses caractéristiques morphologiques à savoir ses conidies droites, hyalines, monoseptées et de petite taille, ainsi que ses vésicules sphéro-pédonculées le rapprochent de l'espèce *Cy. floridanum*. Cependant sur la base des seules caractéristiques morphométriques, cette espèce est fréquemment confondue dans la littérature avec l'espèce *Cy. scoparium* pourtant à vésicules spatulées, et présente également certaines similitudes avec l'espèce *Cy. ovatum* (El-Gholl *et al.*, 1992a). Cela nous amène à considérer comme nécessaire la recherche de descripteurs supplémentaires permettant de poser une diagnose efficace du représentant MT4 et des espèces citées auxquelles il est susceptible d'appartenir. Il est par ailleurs intéressant de relever que les isolats de référence de l'espèce *Cy. floridanum*, à savoir l'isolat type ATCC 18834 originaire du Japon et l'isolat ATCC 22677 originaire des Etats-Unis présentent entre eux des différences notables en termes d'optima thermiques et de comportement sexuel. L'unique représentant de MT4 semble d'ailleurs proche pour ces critères du représentant ATCC 22677, mais sans que l'on ne puisse, sur ces seules bases, valider son identité.

En conclusion, cette première partie de notre étude met en exergue l'existence d'au moins 5 morphotypes d'isolats de *Cylindrocladium*, présents ou non en mélange dans les bananeraies. Leur distribution géographique est variable. Ainsi, le morphotype MT2 se retrouve dans les 3 grandes régions géographiques d'où viennent nos isolats, mais à l'inverse les morphotypes MT1, MT4 et MT5 ne sont présents que dans l'une de ces régions à la fois.

Les caractéristiques phénotypiques de ces morphotypes ne permettent pas à elles seules d'établir avec certitude à quelles espèces ils appartiennent, du fait de leur ressemblance avec différents complexes d'espèces déjà décrites et similaires sur le plan morphologique. Le statut sexuel de 4 de ces morphotypes (MT1, MT3, MT4 et MT5) étant par ailleurs demeuré indéterminé du fait que leurs représentants n'ont pas engagé le cycle sexuel, il se confirme qu'il n'est pas possible pour l'heure de statuer clairement sur leur identité. Seul le morphotype MT2 semble clairement constituer un groupe biologique à part entière puisqu'il regroupe des individus qui ne sont féconds qu'entre eux ou avec des représentants de l'espèce hétérothallique *Cy. spathiphylli*. Cela suggère que les isolats de ce morphotype MT2 appartiennent à l'espèce *Cy. spathiphylli*, mais mérite d'être confirmé par d'autres critères. Les isolats de *Cylindrocladium* trouvés sur héliconias appartiennent très clairement à ce morphotype MT2, mais présentent des optima thermiques de croissance différents de ceux provenant de bananiers. Eux aussi se croisent avec les représentants de l'espèce *Cy. spathiphylli*.

Ces résultats nous confirment donc la nécessité de recourir à d'autres types de marqueurs, potentiellement indépendants de tout phénomène de convergence morphologique, afin d'examiner de façon complémentaire mais plus discriminante la validité et l'identité de ces différents morphotypes. C'est dans cette optique que nous avons cherché à développer dans les chapitres suivants des marqueurs moléculaires de la diversité génétique des *Cylindrocladium* qui soient faciles à mettre en œuvre, avant de les appliquer ensuite aux morphotypes issus de bananeraies.

Analyse du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr chez le genre *Cylindrocladium* et développement d'une méthode de diagnostic moléculaire des espèces – Application à la caractérisation génétique des taxa identifiés en bananeraies

1. Introduction

Ce chapitre regroupe les travaux relatifs à la recherche de polymorphisme génétique utile pour la distinction des espèces au sein du genre *Cylindrocladium*. Ces travaux ont permis le développement d'un outil rapide et fiable de diagnostic moléculaire des espèces de *Cylindrocladium*. L'outil a ensuite servi au réexamen des groupes phénotypiques de *Cylindrocladium* identifiés en bananeraies (MT1 à MT5). Nous avons privilégié l'ADNr comme molécule d'étude. L'occurrence chez cette molécule de multiples copies d'unités répétées alternant zones conservées et zones plus variables la rend en effet facilement accessible (à l'aide de sondes ou d'amorces), et hautement informative (Bruns, White et Taylor, 1991 ; Seifert, Wingfield et Wingfield, 1995). Elle est de ce fait très utilisée en systématique fongique moléculaire, ainsi que nous l'avons vu au chapitre 1. Nous avons examiné par PCR deux locus connus pour être les régions les plus variables de l'unité répétée de l'ADNr. Le premier d'entre eux est la région ITS (Internal Transcribed Spacer) qui s'étend de la petite sous-unité (gène 18S) à la grande sous-unité (gène 28S) couvrant ainsi le gène 5.8S de l'ADNr et ses espaceurs flanquants ITS1 et ITS2. Les espaceurs ITS ont fréquemment été utilisés pour estimer la divergence inter ou intraspécifique chez de nombreux champignons (voir chapitre 1) mais plus rarement chez *Cylindrocladium*. Au moment où démarre notre travail ce locus n'a été examiné de façon restreinte que chez quelques taxa du genre *Cylindrocladium*, sans extension de l'analyse à un plus grand nombre d'espèces. Le second locus que nous avons prospecté est l'espaceur intergénique IGS situé entre les sous-unités 28S et 18S. Non transcrit, il est connu pour comprendre le site d'initiation de la transcription de la RNA polymérase, les signaux de maturation des ARN ribosomiques, le site de terminaison de transcription, et peut-être les séquences impliquées dans la réplication de l'ADN ribosomique (van't Hof et Lamm, 1991). Il n'avait jusqu'ici jamais été étudié chez le genre *Cylindrocladium*. Dans la discussion qui suivra la présentation de nos résultats, nous intégrerons des éléments de bibliographie très récents sur la systématique des *Cylindrocladium* qui aideront encore à situer nos résultats.

2. Matériel et méthodes

2.1 Extraction de l'ADN génomique fongique, amplification PCR, séquençage, et analyse des séquences nucléotidiques de la région ITS de l'ADNr

Les méthodes analytiques relatives à l'extraction de l'ADN fongique, à l'amplification

Tableau 11 : Collection élargie d'isolats de référence de *Cylindrocladium* utilisés pour l'analyse du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr

N° isolat	Espèces	Origine	
		Hôte	Pays (état, localité)
ATCC 38226	<i>Cy. avesculatum</i>	<i>Ilex vomitoria</i>	Etats-Unis (Floride)
IMI 354517 ^a	<i>Cy. candelabrum</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brésil (Bahia, Copener)
CBS 186.36 ^a	<i>Cy. citri</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Etats-Unis (Floride)
ATCC 42971	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Rumohra adiantiformis</i>	Etats-Unis (Floride)
ATCC 18882 ^a	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Prunus persica</i>	Etats-Unis (Floride)
ATCC 18834 ^a	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Japon
CBS 170.77	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Idesia polycarpa</i>	Nouvelle-Zélande
ATCC 22677	<i>Cy. floridanum</i> / <i>Cy. canadense</i> *	<i>Prunus persica</i>	Etats-Unis (Georgie)
PC 551197 ^a	<i>Cy. gracile</i>	<i>Argyrea splendens</i>	Asie du Sud Est
ATCC 22833	<i>Cy. gracile</i> **	<i>Pinus caribaea</i>	Brésil
IMI 346843	<i>Cy. gracile</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>	Afrique du Sud (Natal, KwaZulu)
ATCC 76225 ^a	<i>Cy. ovatum</i>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Brésil (Monte Dourado, Para)
PPRI 4162	<i>Cy. ovatum</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>	-
CBS 473.76	<i>Cy. parasiticum</i>	<i>Guzmania sp.</i>	Pays-Bas
PPRI 4176 ^a	<i>Cy. pseudogracile</i>	<i>Manilkara zapota</i>	Brésil (Para, Belém)
IMI 354530	<i>Cy. pteridis</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Brésil (Viçosa)
PPRI 4179	<i>Cy. pteridis</i>	<i>Rumohra adiantiformis</i>	Brésil (Viçosa)
PPRI 4157	<i>Cy. pteridis</i>	Hôte inconnu	Brésil (Viçosa)
ATCC 34395	<i>Cy. pteridis</i>	<i>Arachnoides adiantiformis</i>	Etats-Unis (Floride)
CBS 230.51 ^a	<i>Cy. scoparium</i>	<i>Anacardium sp.</i>	Brésil (CE, Fortaleza)
CBS192.49	<i>Cy. scoparium</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>	Brésil
ATCC 38227	<i>Cy. scoparium</i>	<i>Mahonia bealei</i>	Etats-Unis (Floride)
ATCC 46300	<i>Cy. scoparium</i>	<i>Leucothoe catesbaei</i>	Etats-Unis (Caroline du Nord)
ATCC 44730 ^a	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Spathiphyllum sp.</i>	Etats-Unis (Floride)
CBS 538.87	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Spathiphyllum sp.</i>	France
IMI 167983	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Camellia sinensis</i>	Maurice
IMI 354528	<i>Cy. spathiphylli</i> / <i>Cy. pacificum</i> ***	<i>Araucaria heterophylla</i>	Etats-unis (Hawaii)
ATCC 62616 ^a	<i>Cy. spathulatum</i>	<i>Eucalyptus viminalis</i>	Brésil (ES)
MUCL 39315 ^a	<i>Xenocylindrocladium serpens</i>	Arbre inconnu	Equateur (Sucumbios, Cuyabeno)
MUCL 40269 ^a	<i>Curvieladium cigneum</i>	<i>Unknown angiosperm</i>	Guyane française (Matoury)
MUCL 636	<i>Cylindrocladiella parva</i>	Hôte inconnu	République Démocratique du Congo
MUCL 31395	<i>Cylindrocladiella camelliae</i>	<i>Acacia dealbata</i>	Japon

^a : isolat type

* : *Cy. floridanum* groupe II (*sensu* Victor *et al.*, 1997), récemment redéfini comme *Cy. canadense* par Kang *et al.* (2001)

** : enregistré comme *Cy. clavatum*^a, synonymie reconnue avec *Cy. gracile* par Crous, Korf et Van Zyl (1995)

*** : d'abord reconnu comme *Cy. spathiphylli* (Crous et Wingfield, 1994), puis récemment redéfini comme *Cy. pacificum* (Kang *et al.*, 2001)

. Les isolats dont le N° est en grisé ont eu leur région ITS séquencée dans le cadre de la présente étude

PCR et au séquençage de la région ITS sont détaillées dans la publication présentée au paragraphe 3.2.1, et le lecteur est invité à s'y reporter.

La stratégie d'étude de l'ITS s'appuie sur une démarche en deux temps. Nous avons d'abord réalisé une évaluation du polymorphisme de cette région, sur la base de l'analyse de 59 séquences nucléotidiques. Ces séquences proviennent d'isolats représentant différentes espèces du genre *Cylindrocladium*, ou d'isolats représentant les cinq morphotypes identifiés en bananeraies (chapitre 2). Sur les 59 séquences étudiées, 42 ont été obtenues dans le cadre de nos travaux, tandis que les 17 autres ont collectées dans la base de données GenBank (tableaux 11 à 13). Cette soixantaine de séquences ITS a été alignée à l'aide du programme d'alignement multiple BioEdit, des ajustements manuels étant ensuite effectués si nécessaires. Une matrice de dissimilarités a été établie sur la base du coefficient de Sokal et Michener (1958) qui s'appuie sur le nombre de divergences par paire de séquences. Cette matrice a ensuite servi à l'élaboration d'un dendrogramme par la méthode du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) à l'aide du logiciel DARWIN (Perrier, Flori et Bonnot, 1999).

Dans un second temps, cette étude a été complétée par une comparaison du polymorphisme de séquence de la région ITS chez des représentants du genre *Cylindrocladium* et quelques représentants de genres voisins au sein de l'ordre des Hypocréales, à savoir les genres *Cylindrocladiella*, *Curviciadium* et *Xenocylindrocladium* (paragraphe 3.2.1).

2.2 Amplification PCR et étude du polymorphisme de restriction de l'espaceur IGS de l'ADNr par PCR-RFLP (CAPS)

Les méthodes relatives à l'analyse du polymorphisme de restriction de l'espaceur intergénique IGS chez le genre *Cylindrocladium* sont également détaillées dans la publication présentée au paragraphe 3.2.1. Elles ont par la suite été appliquées au reste de notre collection « d'isolats terrain » sans fournir de profils de restriction différents de ceux présentés dans cette publication.

2.3 Etablissement de la séquence complète de la région IGS chez *Cylindrocladium*

Nous avons également cherché à accéder directement à l'information portée par l'espaceur intergénique afin de jeter les premières bases qui permettront ultérieurement de renseigner les profils de restriction de façon complémentaire, mais aussi de définir des

Tableau 12 : Références des séquences ITS d'isolats de *Cylindrocladium* collectées dans la base GenBank

N° isolat	Espèces	Origine		N° séquence ITS
		Hôte / substrat	Pays (Etat, localité)	
98-54	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Spathiphyllum</i>	Afrique du Sud	AF 124347
P86-0210	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Heliconia</i>	Etats-Unis (Floride)	AF 124346
P87-01967	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Heliconia</i>	Etats-Unis (Floride)	AF 124345
STE-U 768	<i>Cy. insulare</i>	Sol	Madagascar	AF 059282
STE-U 971	<i>Cy. pauciramosum</i>	-	Afrique du Sud	AF 059280
STE-U 1675	<i>Cy. candelabrum</i>	<i>Eucalyptus</i>	Brésil (Bahia)	AF 059281
UFV 215	<i>Cy. rumohrae</i>	<i>R. adiantiformis</i>	Panama	AF 231972
FTCC 1002	<i>Cy. heptaseptatum</i>	<i>R. adiantiformis</i>	Etats-Unis (Floride)	AF 231966
FTCC 1003	<i>Cy. heptaseptatum</i>	<i>R. adiantiformis</i>	Etats-Unis (Floride)	AF 231967
ATCC 48895	<i>Cy. theae</i>	<i>Rhododendron</i>	Etats-Unis (Floride)	AF 231961
ATCC 16550	<i>Cy. quinqueseptatum</i>	<i>Scolopendrium sp.</i>	Iles Salomon	AF 231968
STE-U 1589	<i>Cy. multiseptatum</i>	<i>Eucalyptus</i>	Indonésie	AF 210881
STE-U 1602	<i>Cy. multiseptatum</i>	<i>Eucalyptus</i>	Indonésie	AF 210882
STE-U 705	<i>Cy. colhounii</i> var. <i>colhounii</i>	Sol	Afrique du Sud	AF 231954
STE-U 307	<i>Cy. colhounii</i> var. <i>macroconidiale</i>	<i>Eucalyptus</i>	Afrique du Sud	AF 231955
UFV 90	<i>Cy. ovatum</i>	Sol	Brésil (Amazonas)	AF 210884
STE-U 941	<i>Cy. mexicanum</i>	Sol	Mexique	AF 059283

Tableau 13 : Isolats de *Cylindrocladium* provenant de bananeraies ou isolés d'héliconias dont la région ITS a été amplifiée par PCR puis séquencée

MT1	MT2	MT3	MT4	MT5
Mar 1, Mar11, Slu2, Gua8	Dom 4 (Ban.), Cor4 (Ban.), Cam1 (Ban) Hel2B (Hel.), Hel7A1 (Hel.), Hel8A1(Hel.)	Mar12, Mar13, Gua 13, Cam10, Cam11	Cam13	Cam14

(Ban) : isolat MT2 provenant de bananeraies

(Hel.) : isolat MT2 provenant d'héliconias

L'origine géographique des isolats est donnée par les 3 premières lettres de leur nom :

Mar : Martinique ; Gua : Guadeloupe ; Slu : Sainte-Lucie ; Cor : Costa-Rica ; Cam : Cameroun

amorces « espèces-spécifiques » chez le genre *Cylindrocladium*. Pour cela, après amplification PCR de l'espaceur intergénique à l'aide des amorces universelles NS21 (Simon, Lalonde et Bruns 1992) et CNL12 (Duchesne et Anderson 1990), le fragment amplifié a été purifié grâce au kit GeneClean II (Bio101, Biogen). Il a ensuite été inséré dans le vecteur pGEM-T (Promega) et introduit dans des cellules d'*Escherichia coli* SURE compétentes par transformation. Les colonies recombinantes ont été identifiées par α -complémentation après une nuit de croissance à 37°C sur milieu 2YT contenant de l'X-gal et de l'IPTG supplémenté de 100 μ g/l d'Ampicilline. La présence des inserts clonés a été vérifiée par digestion *Apa* I-*Sac* I de minipréparations des plasmides. Les clones positifs ont été purifiés à l'aide du kit Nucleospin (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur, et leur séquence nucléotidique a été obtenue par primer-walking après sous-traitement à la société ESGS. Ces travaux ont concerné l'isolat IMI 346843 de l'espèce *Cy. gracile* et l'isolat IMI 167983 de l'espèce *Cy. spathiphylli*. Les séquences ont été alignées avec le programme d'alignement multiple CLUSTALW (version 1.81).

3. Résultats

3.1 Analyse du polymorphisme de séquences de la région ITS chez le genre *Cylindrocladium* ; intérêt pour le diagnostic

L'amplification PCR de la région ITS contenant l'espaceur ITS1, le gène 5.8S et l'espaceur ITS2 à l'aide des amorces universelles ITS1 et ITS4 (White *et al.*, 1990) génère un fragment unique d'environ 550 bp, aussi bien chez les isolats de *Cylindrocladium* dits de référence, que chez les isolats « terrain » provenant de bananeraies ou issus d'héliconias. L'alignement des séquences obtenues à partir des amplifiats PCR de ces isolats et de celles trouvées dans la base internationale GenBank indique une très forte conservation de la région ITS chez le genre *Cylindrocladium* avec 97 à 100% d'identité selon les paires de séquences analysées. Sur une longueur de séquence analysée de 445 nucléotides, seules 42 différences nucléotidiques ont été trouvées dans tout l'ITS, 13 se trouvant dans l'espaceur ITS1, les 29 autres se situant dans l'espaceur ITS2. Ces rares événements nucléotidiques sont principalement des insertions/délétions et moins fréquemment des substitutions. Ils n'impliquent le plus souvent qu'un seul ou deux nucléotides à la fois. Il existe cependant une « longue » insertion de 7 nucléotides ACCT..GGG dans l'espaceur ITS2 des représentants *Cy. floridanum* (vésicules sphéro-pédonculées) ainsi que chez les isolats IMI 354528, CBS 17077 et CBS 473.76, mais aussi chez l'unique représentant du morphotype MT4, l'isolat Cam13. Cette insertion remarquable dans un contexte si peu polymorphe est absente chez tous les

Figure 25 : Séquence consensus définie dans la région ITS de l'ADNr du genre *Cylindrocladium*

CCGAGTTTAC	AA.CTCCCAA	AcCCCATGTG	AACATACCTG	TTTCGTTCCC	TCGGCGGTGT
CCGGcAACGG	CCCGCCAGAG	GACCCAACAA	ACtCTTTTGA	ATTTTTCAGT	ATcTTCTGAG
TgAaAAAaA.	.cAATAAATc	AAAACTTTCA	ACAACGGATC	TCTTGGTTCT	GGCATCGATG
AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGT	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC
TTTGAACGCA	CATTGCGCCC	GCCAGTATTC	TGGCGGGCAT	GCCTGTTCGA	GCGTCATTTc
AACCCTCAAG	CtC.....	aGCTTGGTGT	TGGGGATCGG	CAgGGCGtCC	TcCGGGTTCGc
GCCGTCCCCC	AAATtTAGTG	GCGGTCTCgC	TGTAGCTTCC	TcTGCGTAGT	AATACACCTC
GC.TCTGGAG	.tCtCGGtGC	G.aCCACGCC	GTAAAACCCC	CAACTTTTT	

Une position avec une base signalée en minuscule indique que c'est la base trouvée le plus fréquemment à cette position dans les différentes séquences analysées

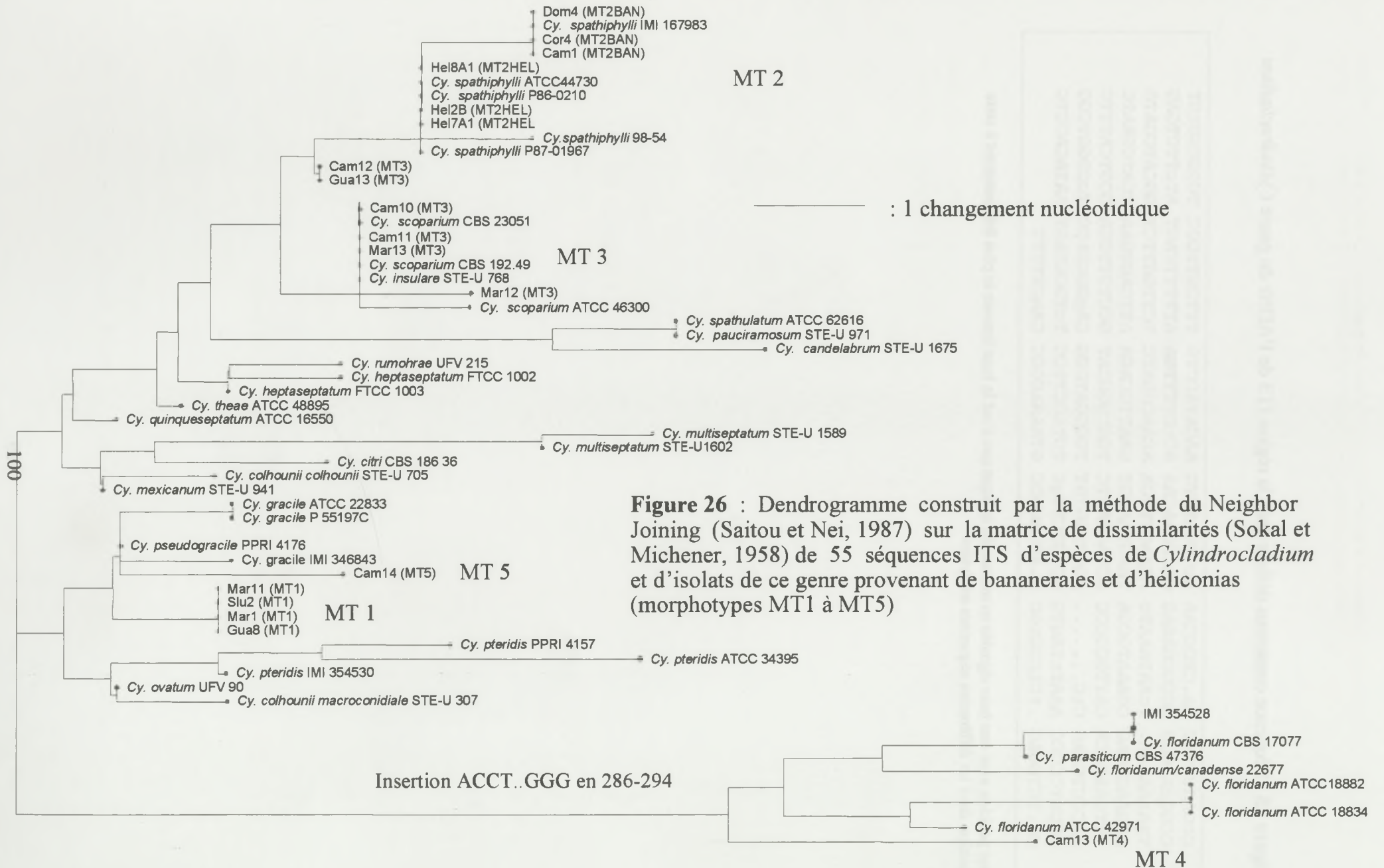


Figure 26 : Dendrogramme construit par la méthode du Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987) sur la matrice de dissimilarités (Sokal et Michener, 1958) de 55 séquences ITS d'espèces de *Cylindrocladium* et d'isolats de ce genre provenant de bananeraies et d'héliconias (morphotypes MT1 à MT5)

autres isolats du genre *Cylindrocladium* dont la séquence est alignée ici. Les autres divergences nucléotidiques étant particulièrement ténues, plusieurs espèces comme par exemple *Cy. scoparium* et *Cy. insulare*, ou *Cy. spathulatum* et *Cy. pauciramosum* ont des séquences présentant 100% d'homologie entre elles. Ce faible polymorphisme de séquences de la région ITS facilite la définition d'une séquence consensus comme marqueur potentiel du genre (figure 25), mais ne permet pas donc toujours la discrimination des espèces au sein du genre *Cylindrocladium*.

Le dendrogramme résultant de ces alignements renseigne cependant de façon partielle sur le positionnement des isolats « terrain » provenant de bananeraies ou d'héliconias, non seulement entre eux, mais aussi vis à vis des différentes espèces de *Cylindrocladium* (figure 26). Il met ainsi en évidence l'existence de trois principaux clusters :

Le premier de ces clusters est aussi le plus distant des deux autres du fait qu'il ne rassemble que les isolats présentant l'insertion ACCT..GGG citée plus haut. On peut distinguer au sein de ce cluster une sous-structure à 4 niveaux avec :

- un premier niveau rassemblant les isolats IMI 354528, CBS 17077 et CBS 473.76, les deux premiers présentant des séquences identiques.

- un second niveau n'incluant que le représentant ATCC 22677 de l'espèce *Cy. floridanum*.

- un troisième niveau regroupant trois autres représentants de l'espèce *Cy. floridanum*.

- un quatrième niveau positionnant l'isolat Cam13, unique représentant du morphotype (MT4), au sein de ce premier cluster, mais de façon distante vis à vis des 3 autres sous-clusters. On retrouve donc une situation de même type que celle observée lors de l'étude phénotypique, avec un positionnement du représentant MT4 proche de *Cy. floridanum*.

Le second cluster rassemble essentiellement des isolats à vésicules clavates, dont en particulier ceux d'un complexe d'espèces similaires sur le plan morphologique que nous avons déjà évoqué au chapitre précédent, et que nous appellerons ici le complexe « *gracile-like* ». Rappelons que ce complexe comprend les espèces *Cy. gracile*, *Cy. pseudogracile*, *Cy. graciloideum*, et *Cy. pteridis* (Crous *et al.*, 1997). Il est éclaté dans ce second cluster en 2 branches majeures : La première rassemble i/les représentants des espèces *Cy. gracile*, *Cy. pseudogracile* et *Cy. graciloideum* auxquels s'agrègent de façon plus éloignée l'isolat Cam14, qui est l'unique représentant du morphotype MT5. ii/ les représentants du morphotype MT1 parmi lesquels il n'y a aucune variation de séquences, malgré leurs origines géographiques différentes au sein de la Caraïbe (Martinique, Guadeloupe, et Sainte-Lucie). La seconde branche principale distingue d'un côté les représentants de l'espèce *Cy. pteridis* au sein

desquels existent quelques variations de séquences, et de l'autre, le représentant de l'espèce *Cy. ovatum* (vésicule ovoïde) et celui de l'espèce *Cy. colhounii macroconidiale* (vésicule clavate). Ces résultats renforcent donc l'hypothèse émise au chapitre 2 à savoir celle d'un positionnement proche des isolats MT1 et MT5 du complexe « *gracile-like* ». Ils suggèrent de plus que ces 2 morphotypes issus de bananeraies diffèrent de l'espèce *Cy. pteridis*.

Le troisième cluster est celui qui inclut le plus grand nombre d'espèces. Il comprend entre autres, 3 sous-clusters qui nous intéressent particulièrement. Le premier d'entre eux regroupe les isolats de l'espèce *Cy. spathiphylli* et les isolats MT2 (vésicules sphériques) selon une partition en deux similaire à celle suggérée par l'analyse phénotypique (chapitre précédent) : La souche-type de l'espèce *Cy. spathiphylli* (ATCC 44730) s'agrège avec les isolats MT2HEL provenant d'héliconias, tandis que l'isolat additionnel *Cy. spathiphylli* IMI 167983 s'agrège de son côté avec les isolats MT2BAN issus de la rhizosphère du bananier. Ces deux sous-groupes ne diffèrent que par la substitution d'un A en T en position 86. Le second sous-cluster rassemble sans les discriminer les représentants de l'espèce *Cy. scoparium*, le représentant de l'espèce *Cy. insulare*, et la plupart des représentants du morphotype MT3 identifiés en bananeraie. Deux autres représentants du morphotype MT3 s'agrègent dans ce sous-cluster, mais de façon plus lointaine (Gua13 et Cam12). Enfin, le troisième sous-cluster regroupe les représentants de l'espèce *Cy. spathulatum* et *Cy. pauciramosum* du fait de leurs séquences identiques, et intègre également de façon un peu plus distante (2 événements nucléotidiques) le représentant de l'espèce *Cy. candelabrum*. Si comme au chapitre 2 avec les descripteurs phénotypiques, ces résultats illustrent une certaine proximité des isolats MT3 avec les espèces du complexe *Candelabrum-like* et avec l'espèce *Cy. scoparium*, ils suggèrent néanmoins deux éléments supplémentaires : Il y a tout d'abord le fait que le polymorphisme de séquences, même faible, éclate ce complexe en soulignant la différence génétique de l'espèce *Cy. mexicanum* vis à vis des autres espèces de ce complexe, et en discriminant *Cy. scoparium* et *Cy. insulare* de *Cy. pauciramosum* et *Cy. candelabrum*. Il y a aussi le fait que ces isolats MT3 sont génétiquement plus proches des espèces *Cy. scoparium* et *Cy. insulare*, ces dernières étant non discernables entre elles sur la base du polymorphisme de séquences ITS.

La comparaison des séquences nucléotidiques de la région ITS de représentants du genre *Cylindrocladium* avec celles d'autres genres voisins au sein des Hypocréales permet de facilement discriminer le genre *Cylindrocladium*. Ces résultats sont présentés au paragraphe 3.2.1 dans la publication **Mycologia** 93 (3) 2001 494-504.

En conclusion, l'analyse du polymorphisme de séquences de la région ITS permet donc de confirmer la pertinence de la typologie phénotypique des isolats « terrain » effectuée au chapitre 2, et la renseigne de façon complémentaire. Cependant les divergences nucléotidiques qui la sous-tendent (« single nucleotide polymorphism »), sont malgré tout insuffisantes pour constituer les bases d'un diagnostic moléculaire fiable et robuste des espèces de *Cylindrocladium*. Cela nous a donc poussé à prospecter un autre locus de l'ADNr supposé être plus variable, à savoir l'espaceur intergénique IGS.

3.2 Prospection du polymorphisme de site de la région IGS par PCR-RFLP et développement d'une méthode de diagnostic moléculaire des espèces de *Cylindrocladium* ; application aux taxa identifiés en bananeraies et sur héliconias

3.2.1 Développement et validation de la méthode : application à la détermination des haplotypes IGS des morphotypes MT1 et MT2 BAN - *Publication n°1* -

Ces résultats sont présentés dans la publication : « Typing *Cylindrocladium* species by analysis of rDNA spacers polymorphism : application to field isolates from the banana rhizosphere » parue dans *Mycologia* 93 (3) 2001 494-504. Voir pages suivantes.

Typing *Cylindrocladium* species by analysis of ribosomal DNA spacers polymorphism: Application to field isolates from the banana rhizosphere

Jean-Michel Risède¹

Laboratoire de Pathologie végétale, Station de
Neufchâteau, CIRAD-FLHOR, 97130 Capesterre
Belle-eau, Guadeloupe (F.W.I)

Philippe Simoneau

UMR de Pathologie Végétale, Faculté des
Sciences, Université d'Angers, 2 Bd Lavoisier, F-49045
Angers, France

INTRODUCTION

The genus *Cylindrocladium* Morgan includes about thirty species with worldwide distribution, among which many are plant pathogens responsible for serious economic losses (Peerally 1991, Crous and Wingfield 1994). Most species of *Cylindrocladium* have a known teleomorph belonging to the ascomycete genus *Calonectria* De Not (Rossman 1979, 1983) and they are often polyphagous. They are consequently hosted individually or in complexes with various plant species that exhibit a wide variety of disease symptoms such as damping off, leaf spots, stem lesions, cankers, stunting, root and fruit rots.

In the last decade banana trees have been reported to be affected in the Caribbean, in Costa Rica, the Ivory Coast and Cameroon by a soilborne pathogenic complex including endoparasitic nematodes and *Cylindrocladium* fungi (Semer et al 1987, Loidat 1989, Kobenan 1991, Castaing et al 1996). These pathogens were known to induce root and corm rot, as well as growth and yield decreases in banana fields. The fungus causing toppling disease in the banana plantations of Costa Rica (Semer et al 1987) was described as having a globose vesicle-ended stipe and was named *Cylindrocladium musae*. This name, however, was never validly published. In Martinique (Caribbean) the causative *Cylindrocladium* fungus was shown to be a primary pathogen able to enter root and corm tissues alone without the help of nematodes, then inducing extensive necrosis. In his attempt to identify this fungus at the species level, Risède (1994) described it as having straight, cylindrical, mostly 1-septate conidia, and stipe hyphae arising from conidiophores ending in a clavate vesicle. The apparent relation of this fungus to *Cy. pteridis* was emphasized, without any final conclusion as to its identity. Until now, no confirmation of species diagnosis of these banana root pathogens has been made.

Delineation of *Cylindrocladium* species remains problematic, especially for some species, and this explains why taxonomy within the genus has frequently been revised and updated during the last decade. In this genus, species identification is currently based on conidial characters such as shape, size and number of septa, along with the shape of the terminal vesicle at the end of the stipe that arises from the conidiophore. These characters, which are tradition-

Abstract: Forty-four unidentified isolates of *Cylindrocladium* were recovered from banana root lesions and soils from intensive cropping systems in the Caribbean region, Costa Rica and Cameroon. They were then examined and compared with reference isolates using combinations of morphological characters, sexual crosses and polymorphism of amplified rDNA spacers. According to conidium and vesicle morphology, they were consistently classed into two distinct morphotypes, MT1 and MT2. Sequences of PCR products of their internal transcribed spacer (ITS) region compared with similar sequences from reference isolates representing 7 species of *Cylindrocladium* revealed a very low polymorphism. By contrast, polymorphism in the amplified intergenic spacer region (IGS), as revealed by RFLP analysis, was found to be consistent with the current taxonomy of *Cylindrocladium* species, and sufficient to distinguish taxa at the inter- and intraspecific level. Using this IGS typing procedure, MT1 field isolates were found to group unequivocally with *Cy. gracile*, while MT2 isolates grouped with *Cy. spathiphylli*. The existence of intraspecific variation in the latter species was clearly demonstrated. Reports of these two species from the banana rhizosphere were confirmed by sexual crosses for *Cy. spathiphylli*, but not for *Cy. gracile*, which presently has no known teleomorph. IGS-RFLP markers therefore proved to constitute a rapid and suitable complement to morphological and mating studies for delineation of *Cylindrocladium* species.

Key Words: *Calonectria*, IGS, ITS, PCR-RFLP, taxonomy

Accepted for publication November 28, 2000.

¹ Corresponding author, Email: risede@cirad.fr

ally considered as distinctive, nevertheless vary continuously in size and shape among species, especially for species showing straight and primarily 1-septate conidia. Moreover, *Cylindrocladium* isolates may exhibit extensive pleiomorphy in culture (Crous et al 1992) that can cause confusion. They may also sporulate sparsely, or lose their ability to produce stipe extensions in culture (Watanabe 1994). Furthermore, previously accepted phenotypic variation among and within species has recently been reconsidered with the discovery of new biological species, leading to the conclusion that there are several species in the genus that appear morphologically similar (Crous and Peeraly 1996, Crous et al 1997a, Victor et al 1997, Schoch et al 1999).

In order to improve the characterization of some *Cylindrocladium* species, molecular approaches have recently been introduced. They include rDNA restriction length polymorphism (Crous et al 1997b), random amplification of polymorphic DNA (El-Gholl et al 1997), DNA fingerprinting with heterologous minisatellite (Jeng et al 1997) or telomeric (Overmeyer et al 1996) probes. Sequence analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS) have also been used in conjunction with sexual compatibility to delineate four *Cylindrocladium* species in the *Cy. candelabrum* species complex (Schoch et al 1999). Nevertheless, with the exception of the latter study and few others (Hamelin et al 1996, Jeng et al 1997, Crous et al 1999), analysis of ribosomal DNA spacers polymorphism is still poorly documented and has not yet been widely used in the genus *Cylindrocladium* for taxonomic purposes. As shown for other fungi, ITS and the intergenic spacer (IGS) could however present intergenic, inter- or even intraspecific polymorphism and thus constitute valuable molecular tools for identification (Nazar et al 1991, Poupard et al 1993, Erland et al 1994, Cooke and Duncan 1997).

In the present study, the potential use of such molecular analysis for the discrimination of *Cylindrocladium* species sharing extensive morphological similarities was assessed. *Cylindrocladium* species producing primarily 1-septate straight conidia were selected and polymorphism in the ITS and IGS regions was investigated by nucleotide sequence comparisons and PCR-RFLP respectively. Results obtained from the IGS region were then used together with morphological characteristics and mating studies to type or confirm the taxonomic status of unidentified field isolates originating from banana rhizosphere.

MATERIALS AND METHODS

Isolates.—We obtained 24 *Cylindrocladium* reference isolates that represent 10 species producing cylindrical straight and

mainly 1-septate conidia from international fungal culture collections. These strains were ex-type strains or isolates whose species status has previously been certified by taxonomists (TABLE I). Five other fungi belonging either to another species in the genus *Cylindrocladium* (species with 3-septate conidia) or to related genera were also included in the present study for molecular comparisons (TABLE I). Moreover, 44 undetermined *Cylindrocladium* isolates all showing straight, mainly 1-septate conidia and clavate or globose vesicles were recovered from banana root lesions or from intensive banana growing soils of the Caribbean region, Costa Rica (Central America) and Cameroon (West Africa) according to previously described procedures (Risède 1994, 1995). Among them four isolates were obtained from Saint Lucia (Slu1–Slu4), eleven from Martinique (Mar1–Mar11), five from Dominica (Dom1–Dom5), twelve from Guadeloupe (Gual–Gual12), four from Costa Rica (Cor1–Cor4) and eight from Cameroon (Cam1–Cam8). Morphological characterization was performed on 7-day-old cultures grown at 25 C, either on Carnation Leaf Agar (CLA) as recommended (Crous et al 1992) or alternatively on Banana Leaf Agar (BLA) under continuous fluorescent cool white and near-ultraviolet lights. The latter medium, in which banana leaves were substituted for carnation leaves, was found to be very effective for inducing conidiogenesis. Since morphological characteristics of strains on this medium were not significantly different from that observed on CLA, it was convenient for fungal morphotaxonomic studies in tropical countries where carnation is difficult to obtain. Wherever possible for each isolate, length, width, and septation of 50 conidia, and shape and size of 25 vesicles were examined in water at appropriate magnification using bright field and Nomarsky microscopy. Extreme values are given in parenthesis.

Mating studies.—Sexual compatibility was tested by pairing isolates on BLA medium. Two types of sexual crosses were made. (i) Six unidentified *Cylindrocladium* field isolates showing clavate terminal vesicles were randomly selected from the different geographical origins and subsequently mated in all possible combinations with reference isolates of *Cy. pteridis* (PPRI 4157, IMI 354530, ATCC 34395) and *Cy. gracile* (PC 551197, ATCC 22833, IMI 346843). Crosses with the reference strain of *Cylindrocladium pseudogracile* (PPRI 4176) were not made, since this isolate readily formed fertile perithecia when paired with itself, thus confirming its homothallic status (Crous et al 1997a). (ii) Five randomly selected unidentified *Cylindrocladium* field isolates showing globose vesicles and originating from different geographical regions were mated in all possible combinations with 2 reference isolates of *Cy. spathiphylli* (ATCC 44730 and IMI 167983). Mating type of the latter reference was previously determined as (+) (Crous and Peeraly 1996). Pairing cultures were replicated five times and incubated at 25 C for 4 wk under continuous fluorescent cool white and near-ultraviolet lights. They were examined weekly under a binocular stereo microscope for perithecial development. Perithecia were considered as fertile when they yielded ascospores that were able to germinate and grow on 1% malt extract agar medium.

TABLE I. Geographic origin, collection and GenBank accession numbers of reference isolates of *Cylindrocladium* and related genera used in the study

Stain No	Species	Origin		GenBank No ^a
		Host	Location	
ATCC 42971	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Rumorha adiantiformis</i>	Florida, U.S.A.	—
ATCC 18882 ^b	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Prunus persica</i>	Florida, U.S.A.	AF261742
ATCC 22677	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Prunus persica</i>	Georgia, U.S.A.	AF261740
ATCC 18834 ^b	<i>Cy. floridanum</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Japan	AF261741
CBS 230.51 ^b	<i>Cy. scoparium</i> (registered as <i>Cy. scoparium brasiliense</i> ^b)	<i>Anacardium</i> sp.	CE, Fortaleza, Brazil	—
CBS192.49	<i>Cy. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Brazil	—
ATCC 38227	<i>Cy. scoparium</i>	<i>Mahonia bealei</i>	Florida, U.S.A.	—
ATCC 46300	<i>Cy. scoparium</i>	<i>Leucothoe catesbaei</i>	North Carolina, U.S.A.	—
IMI 354517 ^b	<i>Cy. candelabrum</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Copener-Bahia, Brazil	—
ATCC 62616 ^b	<i>Cy. spathulatum</i>	<i>Eucalyptus viminalis</i>	ES, Brazil	AF261739
ATCC 76225 ^b	<i>Cy. ovatum</i>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Para, Monte Dourado, Brazil	—
PPRI 4162	<i>Cy. ovatum</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	—	—
ATCC 44730 ^b	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Spathiphyllum</i> sp.	Florida, U.S.A.	AF124344
IMI 167983	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Camellia sinensis</i>	Mauritius	AF261738
CBS 538.87	<i>Cy. spathiphylli</i>	<i>Spathiphyllum</i> sp.	France	—
PC 551197 ^b	<i>Cy. gracile</i>	<i>Argyrea splendens</i>	South East Asia (Indo China)	AF261737
ATCC 22833	<i>Cy. gracile</i> (registered as <i>Cy. clavatum</i> ^b)	<i>Pinus caribaea</i>	Brazil	AF261736
IMI 346843	<i>Cy. gracile</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	KwaZulu-Natal, South Africa	AF261735
PPRI 4176 ^b	<i>Cy. pseudogracile</i>	<i>Manilkara zapota</i>	Para, Belém, Brazil	AF261734
IMI 354530	<i>Cy. pteridis</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	Viçosa, Brazil	AF261731
PPRI 4179	<i>Cy. pteridis</i>	<i>Rumorha adiantiformis</i>	Viçosa, Brazil	—
PPRI 4157	<i>Cy. pteridis</i>	<i>Unknown host</i>	Viçosa, Brazil	AF261732
ATCC 34395	<i>Cy. pteridis</i>	<i>Arachnoides adiantiformis</i>	Florida, U.S.A.	AF261733
ATCC 38226	<i>Cy. avesiculatum</i>	<i>Ilex vomitoria</i>	Florida, U.S.A.	—
CBS 186.36 ^b	<i>Cy. citri</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Florida, U.S.A.	AF261743
MUCL 39315 ^b	<i>Xenocylindrocladium serpens</i>	<i>Undetermined tree</i>	Sucumbios, Cuyabeno, Ecuador	AF261744
MUCL 40269 ^b	<i>Curvocladium cigneum</i>	<i>Unknown angiosperm</i>	Matoury, French Guiana	AF261747
MUCL 636	<i>Cylindrocladiella parva</i>	<i>Unknown host</i>	Democratic Republic of Congo	AF261745
MUCL 31395	<i>Cylindrocladiella camelliae</i>	<i>Acacia dealbata</i>	Japan	AF261746

^a ITS sequences of isolates with GenBank numbers of AF2617XX were determined in the present study.

^b Ex-type strain.

DNA techniques.—Genomic DNA was extracted using a microwave procedure (Goodwin and Lee 1993). The final DNA pellet was resuspended in 100 μ L of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8) and stored at -20 C until used.

PCR amplification of ribosomal gene spacers. The whole ITS region (ITS1 + 5.8S + ITS2) was amplified using the universal primers ITS1 and ITS4 (White et al 1990). The set of primers CNL12 (Duchesne and Anderson 1990) and NS 21 (Simon et al 1992) was used to amplify the IGS region of the ribosomal DNA. Each amplification reaction was performed using a M.J. RESEARCH PTC 100 thermal cycler in a total volume of 50 μ L that included one unit of Eurobio Taq DNA Polymerase in appropriate reaction buffer containing 1.5 mM MgCl₂, 50 pmol of each primer, 100 μ M of each dNTP and 2 μ L of diluted genomic fungal DNA (ca 10 ng DNA) as template. Thermal cycling parameters were set at 95 C for 30 s (denaturation), 55 C (ITS) or 52 C (IGS) for 30 s (annealing) and 72 C for 90 s (ITS) or 3 min (IGS) (extension). After 30 cycles, a final extension step (72 C for 10 min) was added.

Sequence analysis. Sequencing of the ITS region was performed with an automatic sequencer (373XL Applied BioSystems) by Genome Express (Grenoble, France). Reactions were carried out directly on PCR products, and both DNA strands were sequenced with the same ITS standard primers used in the amplification step. Seventeen reference isolates representing 7 species of *Cylindrocladium* and the 3 related genera *Xenocylindrocladium*, *Curvocladium* and *Cylindrocladiella* were studied. Their GenBank accession numbers are given in TABLE I. Moreover, four MT1 field isolates Mar1, Mar11, Gua8, Slu2 and three MT2 field isolates Cam1, Cor4, Dom4 were also sequenced. Their GenBank accession numbers are AF268484–AF268487 and AF268481–AF268483, respectively. Alignments of the nucleotide sequences were performed with the multiple-alignment program CLUSTAL W (Thompson et al 1994) and are deposited in TreeBASE as S526-M771. Further adjustments were made by eye where necessary. Phylogenetic trees were constructed by using the Neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) of the program NEIGHBOR from the software package PHYLIP (Felsenstein 1995). The distance matrix was calculated according to Kimura two-parameters correction. The results were evaluated with bootstrap using 500 replications. Alignments included the previously known ITS sequence of a *Cy. floridanum* isolate (GenBank U36443) and also the ITS sequence of a *Fusarium sambucinum* isolate (GenBank U38279) used here as outgroup.

RFLP analysis. Polymorphism in the rDNA IGS regions was investigated by restriction of amplification products with different restriction enzymes: *Dra* I, *Eco* RI, *Bam* HI, *Eco* RV, *Pst* I, *Hind* III, *Mva* I, *Rsa* I and *Ava* II. Digestions were carried out as recommended by the manufacturer (Eurogentec, Belgium). DNA restriction fragments were separated on 1.8 % agarose gels in TBE buffer (90 mM Tris-borate, 1 mM EDTA pH 8.0), stained with ethidium bromide and photographed under UV light. Reactions and digests were replicated at least three times to be sure of reproducibility. For RFLP patterns, absence or presence of

bands were scored 0 or 1 respectively. Only bands larger than 200 bp were taken into account. These data were used to estimate the genetic distance between pairs of isolates according to Sokal and Michener (1958). The resulting dissimilarity matrix was submitted to cluster analysis based on the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) and permitted to generate a scale dendrogram drawn with NJPLOT software (Perrière and Gouy 1996).

RESULTS

Morphological characterization of field isolates.—The 44 unidentified *Cylindrocladium* isolates originating from banana rhizospheres showed typical phenotypic features of the genus, such as a septate sterile appendage ending in a vesicle, and penicillate conidiophores bearing conidia longer than 30 μ m arranged in cylindrical clusters (Decock and Crous 1998). Depending on the conidial size and septation, and also on the shape of the terminal vesicle of the stipe, these isolates fell into two morphologically distinct types. Morphotype 1 (MT1) contained isolates Slu1–Slu4, Mar1–Mar6, Mar8–Mar11 and Gua8–Gua12, all showing clavate vesicles (mean width: 5 μ m), and straight cylindrical conidia (50–)59–77(–94) \times (3–)4.5–5.4(–7) μ m that were 1-septate (FIG. 1A, B). Isolates Mar7, Gua1–Gua7, Cor1–Cor4, Dom1–Dom5, Cam1–Cam8 exhibited globose to ellipsoid vesicles (mean width: 15.3 μ m) along with straight cylindrical conidia (60–)77–97(–116) \times (3.5–)5–7(–8) μ m (FIG. 1C, D) and were classified as morphotype 2 (MT2). In MT2, 81% of conidia were 1-septate, while 19% were 2-septate and 1% 3-septate. Perithecial development was never observed in monocultures of MT1 isolates, and according to the keys for species of *Cylindrocladium* (Crous and Wingfield 1994, Crous et al 1997a), they consequently appeared to be phenotypically related to *Cy. pteridis* or *Cy. gracile*, and not to other morphologically similar species such as *Cy. graciloideum* or *Cy. pseudogracile* which are known to be homothallic (Crous et al 1997a). Similarly, based on morphological characters MT2 could be assigned to *Cy. spathiphylli*. Therefore, alternative characters were required, in particular for MT1, for an unequivocal assignment to species.

Polymorphism in the amplified ITS region.—Amplification of the whole ITS region generated a unique DNA fragment of about 550 bp for all reference and field isolates of *Cylindrocladium* used in this study. Alignment of nucleotide sequences revealed that in the *Cylindrocladium* genus very little sequence variation occurred in the ITS region between or within the tested species: 97–100% sequence homology was found with rare events such as insertion/deletion or substitution of a single nucleotide. Moreover, con-

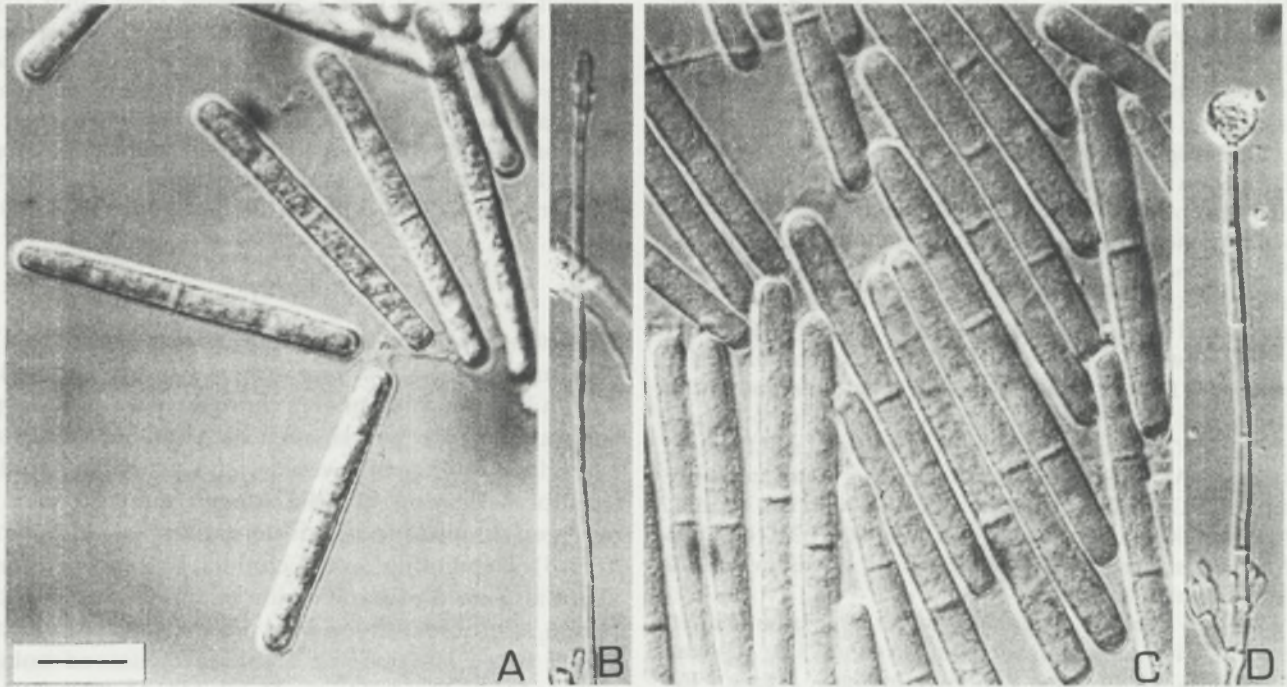
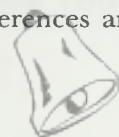


FIG. 1. *Cyindrocladium* isolates from banana rhizosphere. A. One-septate conidia of MT1 isolates. B. Clavate vesicle of MT1 isolates. C. Mostly one-septate conidia of MT2 isolates. D. Conidiophore of MT2 isolate showing globose vesicle. Bar = 20 μ m.

cerning the species *Cy. floridanum*, the three isolates that were sequenced showed a 6-nucleotide (TCGGGA) insertion in the ITS2 region which is also reported in the published ITS sequence of a *Cy. floridanum* isolate from a forest nursery (Jeng et al 1997). On the basis of the ITS sequence, discrimination between species was not always possible as illustrated by isolates of different species (ATCC 22833 *Cy. gracile* and PPRI 4176 *Cy. pseudogracile*) that showed 100% sequence homology in this region. Among the four MT1 field isolates, ITS sequences were identical and only differed from the two above-mentioned sequences by a single nucleotide inserted at the 3' end of ITS1. Similarly, the three ITS sequences from MT2 field isolates were 100% homologous to that of *Cy. spathiphylli* IMI 167983. These sequences differed from that of ex-type strain of *Cy. spathiphylli* ATCC 44730 by a single nucleotide substitution at position 112 (numbering according to Jeng et al 1997). Interestingly, this substitution was not found in any of the recent published ITS sequences from other *Cy. spathiphylli* isolates from *Spathiphyllum* plants in Africa (Schoch and Crous 1999). The phylogenetic tree resulting from an alignment of selected ITS sequences further illustrated the high ITS sequence homogeneity in the *Cyindrocladium* genus (FIG. 2). All tested *Cyindrocladium* isolates readily clustered together, even *Cy. citri* which primarily has 3-septate conidia. All taxa, however, were

easily discriminated from representatives of related or more distant genera.

Polymorphism in the IGS amplified region.—Amplified IGS fragments from all reference and field isolates of *Cyindrocladium* exhibited an identical size of about 3.3 Kb. Among the nine tested restriction endonucleases, four generated reproducible polymorphism that can be used to delineate between *Cyindrocladium* species. *Pst* I was found to cut amplified IGS region of all isolates except *Cy. ovatum* and *Cy. candelabrum* (FIG. 3A) for which no *Pst* I restriction site was detected. This enzyme was useful to discriminate between other tested species, each producing a unique profile, except *Cy. floridanum* that yielded polymorphic *Pst* I profiles. Restriction enzymes *Mva* I, *Rsa* I and *Ava* II also produced distinctive IGS restriction patterns for each species of *Cyindrocladium* (FIG. 3B–D). Moreover, with these enzymes, intraspecific polymorphism was observed for some of the tested species. In particular, *Ava* II revealed intraspecific variation within the species *Cy. spathiphylli*, separating the reference isolates into two subgroups with ex type culture ATCC 44730 and isolate CBS 538.87 in the first one, and isolate IMI 167983 in the second (FIG. 3D). For each of the four enzymes, there was a unique profile for all MT1 isolates. The *Pst* I profile was identical to that obtained with the different tested *Cy. gracile* references and clearly different from



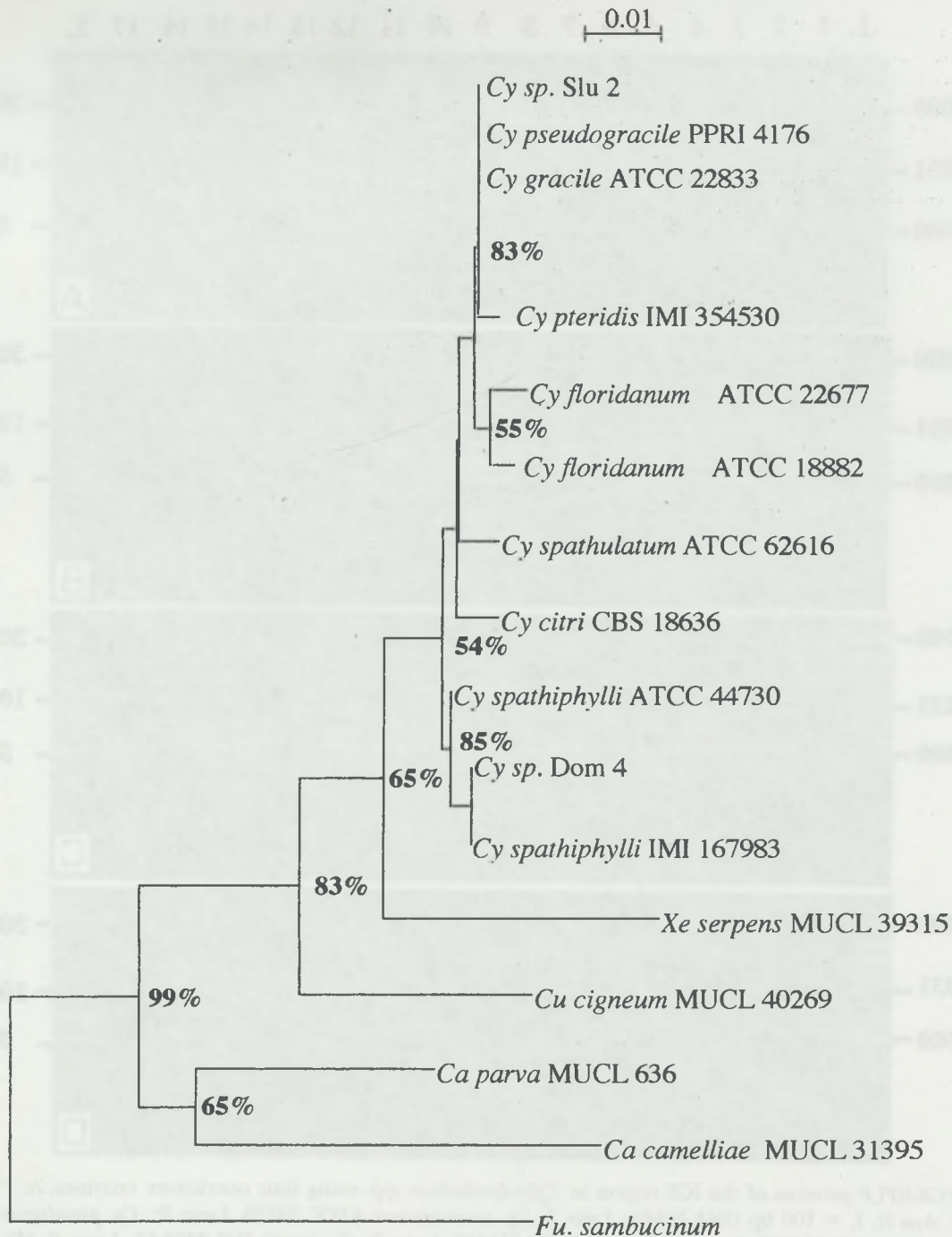


FIG. 2. Neighbor-joining tree derived from sequences of the ITS region of *Cylindrocladium* species and related genera. Distances were calculated using the aligned sequences and the program DNADIST with Kimura 2-parameters method. A *Fusarium sambucinum* sequence (GenBank U38279) was used as outgroup. The bar indicated a distance of 0.01 (one base change per 100 nucleotide positions). Bootstrap values of 50% or greater from 500 bootstrap replications are indicated.

those of other species and in particular from that of *Cy. pteridis* (FIG. 3A). With the 3 other enzymes, the restriction profiles were identical (*Rsa* I) or very similar to those of the different tested isolates of *Cy. gracile* (FIG. 3B–D). For *Pst* I, *Mva* I and *Rsa* I, all MT2 isolates and the different reference isolates of *Cy. spa-*

thiphylli exhibited exactly the same patterns (FIG. 3A–C). The unique *Ava* II IGS profile of MT2 isolates was identical to that of IMI 167983 (FIG. 3D). A dissimilarity matrix based upon 72 informative restriction fragments was elaborated and subjected to UPGMA clustering. The resulting dendrogram is

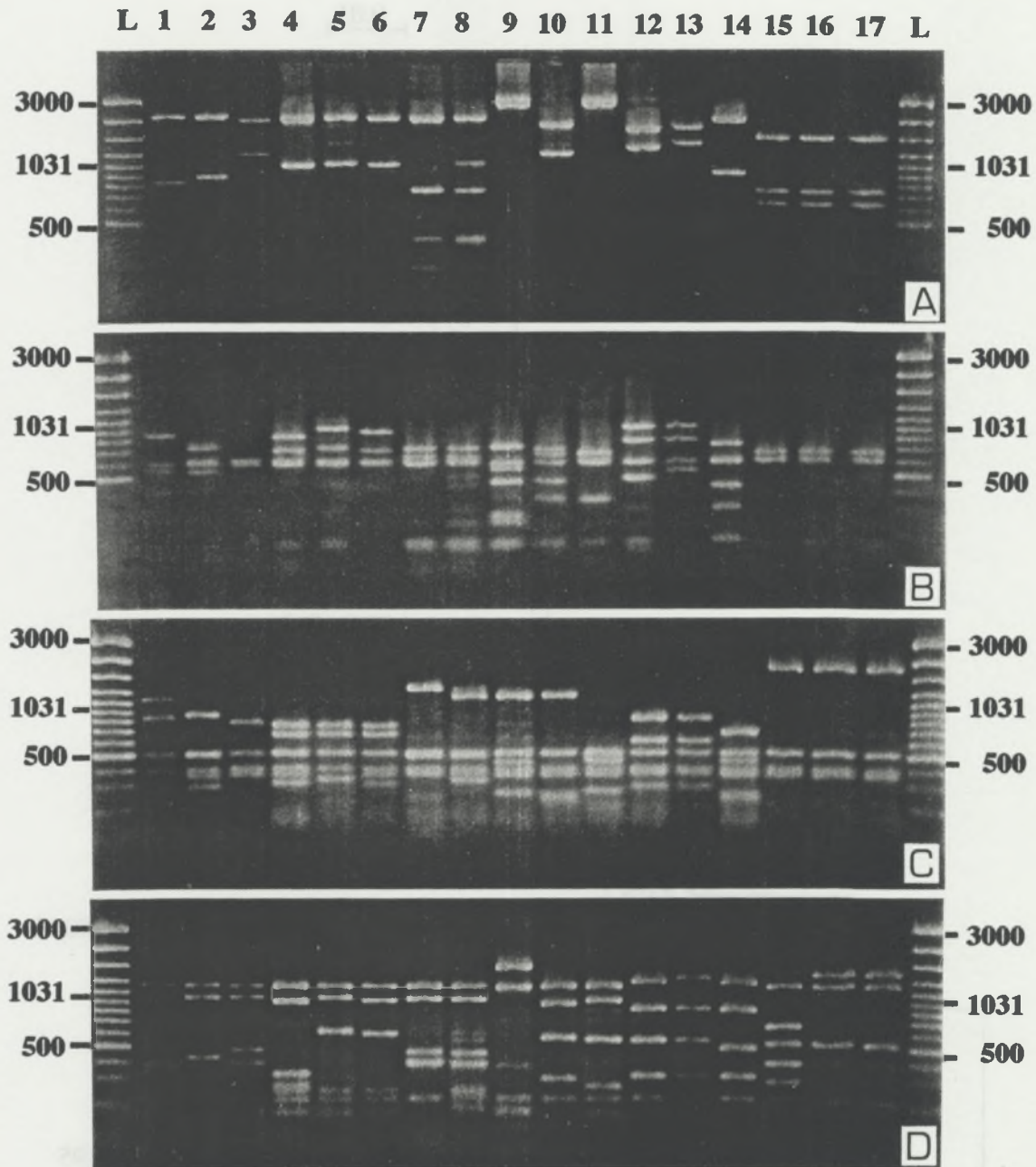


FIG. 3. PCR-RFLP patterns of the IGS region in *Cylindrocladium* spp. using four restriction enzymes. A. *Pst* I. B. *Mva* I. C. *Rsa* I. D. *Ava* II. L = 100 bp DNA ladder. Lane 1: *Cy. avesiculatum* ATCC 38226. Lane 2: *Cy. pseudogracile* PPRI 4176. Lane 3: *Cy. pteridis* IMI 354530. Lane 4: *Cy. gracile* PC 551197. Lane 5: *Cy. gracile* IMI 346843. Lane 6: MT1 isolate from banana rhizosphere (Slu2). Lane 7: *Cy. scoparium* CBS 23051. Lane 8: *Cy. scoparium* ATCC 38227. Lane 9: *Cy. candelabrum* IMI 354517. Lane 10: *Cy. spathulatum* ATCC 62616. Lane 11: *Cy. ovatum* ATCC 76225. Lane 12: *Cy. floridanum* ATCC 18834. Lane 13: *Cy. floridanum* ATCC 42971. Lane 14: *Cy. floridanum* ATCC 22677. Lane 15: *Cy. spathiphylli* ATCC 44730. Lane 16: *Cy. spathiphylli* ATCC 167983. Lane 17: MT2 isolate from banana rhizosphere (Cor4). Amplification and restriction were as described in Materials and methods. Patterns of *Cy. gracile* ATCC 22833, *Cy. scoparium* CBS 192.49, *Cy. ovatum* PPRI 4162, *Cy. floridanum* ATCC 18882 and *Cy. spathiphylli* CBS 538.87, were as in lanes 4, 7, 11, 13 and 15, respectively. Patterns of *Cy. pteridis* strains PPRI 4179, PPRI 4157 and ATCC 34395 were as in Lane 3. Numbers on the sides of the gels indicate the size of DNA fragments in bp.

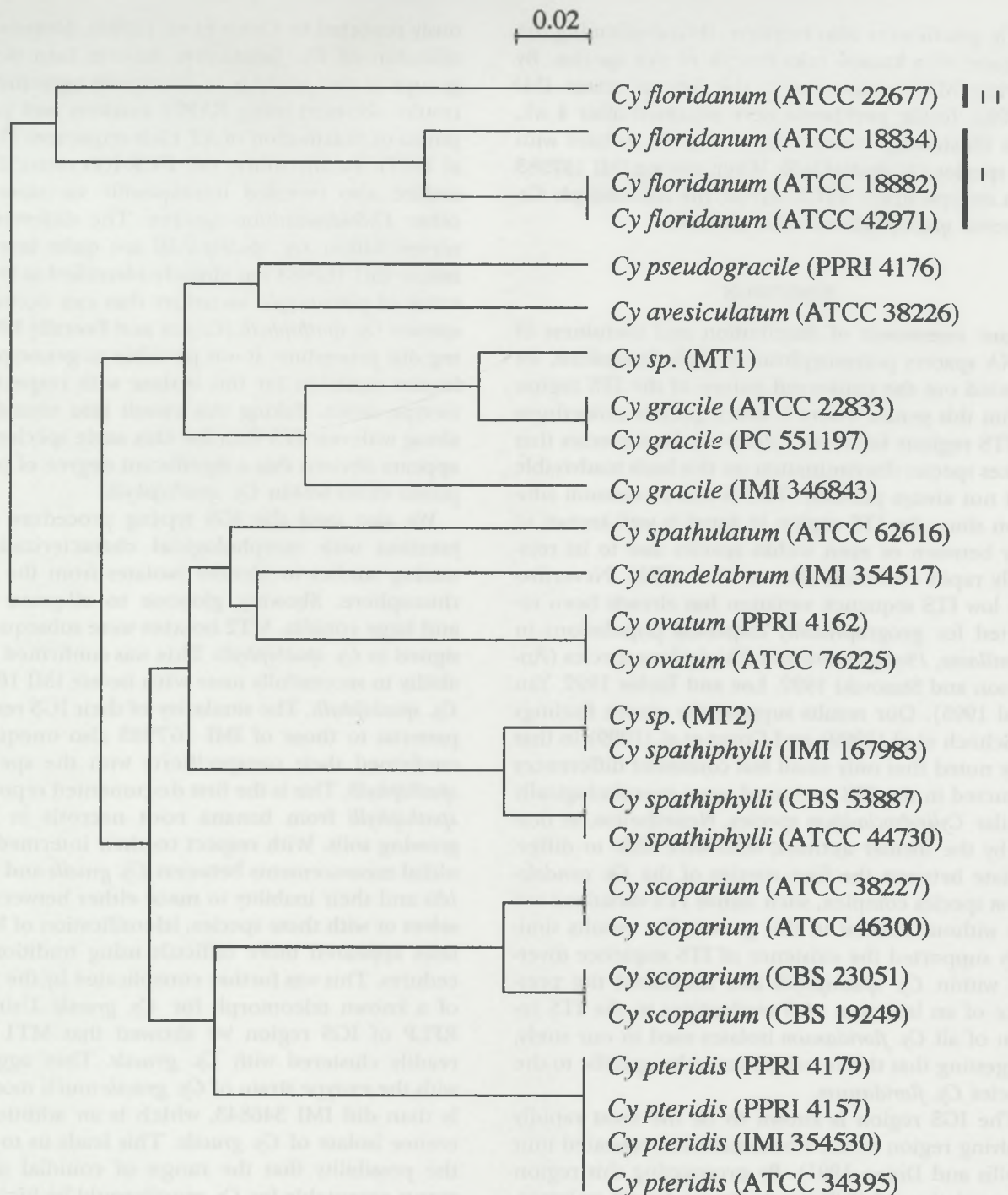


FIG. 4. Dendrogram produced by UPGMA cluster analysis from PCR-RFLP of IGS in *Cylindrocladium* species using 72 informative markers from endonucleases *Pst* I, *Mva* I, *Rsa* I and *Ava* II digestion patterns. Scale for branch length is given.

shown in FIG. 4. All reference isolates clustered together according to species except *Cy. floridanum*, for which isolates fell into two different main groups (I and II). Intraspecific variation in the IGS region was also illustrated by the existence of sub-clusters for *Cy. spathiphylli*, *Cy. scoparium* and *Cy. gracile* species. In this dendrogram MT1 isolates clustered with *Cy.*

gracile, while MT2 isolates strongly aggregated with *Cy. spathiphylli*.

Sexual compatibility.—None of the sexual crosses involving MT1 isolates yielded viable perithecia but only protoperithecia-like structures that always remained sterile. Mating tests among reference isolates

of *Cy. gracile* were also negative, thus confirming the absence of a known teleomorph of this species. By pairing MT2 isolates with the known tester IMI 167983, fertile perithecia were obtained after 4 wk, thus illustrating conspecificity of MT2 isolates with the species *Cy. spathiphylli*. When mating IMI 167983 with ex-type strain ATCC 44730, the teleomorph *Calonectria spathiphylli* was also obtained.

DISCUSSION

In our assessment of distribution and usefulness of rDNA spacers polymorphism in *Cylindrocladium*, we pointed out the conserved nature of the ITS region within this genus. There is much genetic relatedness of ITS regions between *Cylindrocladium* species that makes species discrimination on this basis inadvisable and not always possible. This is not a common situation since the ITS region in fungi is well known to vary between or even within species due to its relatively rapid evolution (Bruns et al 1991). Nevertheless low ITS sequence variation has already been reported for geographically dispersed populations in *Armillaria*, *Phytophthora* and *Phialophora* species (Anderson and Stasovski 1992, Lee and Taylor 1992, Yan et al 1995). Our results support the recent findings of Schoch et al (1999) and Crous et al (1999) in that they noted that only small but consistent differences occurred in the ITS region of some morphologically similar *Cylindrocladium* species. Nonetheless, as noted by the former authors, who were able to differentiate between the four species of the *Cy. candellabrum* species complex, such minor ITS variations are not without interest in this genus. Our results similarly supported the existence of ITS sequence diversity within *Cy. spathiphylli* and illustrated the presence of an insertion of 6 nucleotides in the ITS region of all *Cy. floridanum* isolates used in our study, suggesting that this insertion could be specific to the species *Cy. floridanum*.

The IGS region is known to be the most rapidly evolving region of the ribosomal DNA repeated unit (Hillis and Dixon 1991). By prospecting this region by restriction of PCR products, we found polymorphism that can easily be used for discrimination of *Cylindrocladium* at the species and at the intraspecific levels. This IGS typing procedure indeed yielded results that are congruent with the current taxonomy of *Cylindrocladium* species based on phenotypic characterization supplemented by mating studies and molecular markers such as RFLP. In particular, comparison of the IGS restriction patterns of the ex-type strain of *Cy. gracile* (PC 551197) and the ex-type strain of *Cy. clavatum* (ATCC 22833) strongly supports synonymy between these two species as previ-

ously reported by Crous et al (1995). Moreover, classification of *Cy. floridanum* isolates into two main groups in our study is in complete agreement with results obtained using RAPD markers and polymorphism of distribution of AT rich sequences (Victor et al 1997). Furthermore, the PCR-IGS restriction procedure also revealed intraspecific variation within other *Cylindrocladium* species. The differences observed within *Cy. spathiphylli* are quite interesting; isolate IMI 167983 was already identified as representative of phenotypic variation that can occur in the species *Cy. spathiphylli* (Crous and Peeraly 1996). Using our procedure, it was possible to genotype a molecular variation for this isolate with respect to the ex-type strain. Taking this result into consideration along with our ITS data for this same species, it now appears obvious that a significant degree of polymorphism exists within *Cy. spathiphylli*.

We also used the IGS typing procedure in conjunction with morphological characterization and mating studies to identify isolates from the banana rhizosphere. Showing globose to ellipsoid vesicles and large conidia, MT2 isolates were subsequently assigned to *Cy. spathiphylli*. This was confirmed by their ability to successfully mate with isolate IMI 167983 of *Cy. spathiphylli*. The similarity of their IGS restriction patterns to those of IMI 167983 also unequivocally confirmed their conspecificity with the species *Cy. spathiphylli*. This is the first documented report of *Cy. spathiphylli* from banana root necrosis or banana growing soils. With respect to their intermediary conidial measurements between *Cy. gracile* and *Cy. pteridis* and their inability to mate either between themselves or with these species, identification of MT1 isolates appeared more difficult using traditional procedures. This was further complicated by the absence of a known teleomorph for *Cy. gracile*. Using PCR-RFLP of IGS region we showed that MT1 isolates readily clustered with *Cy. gracile*. They aggregated with the ex-type strain of *Cy. gracile* much more closely than did IMI 346843, which is an additional reference isolate of *Cy. gracile*. This leads us to suggest the possibility that the range of conidial measurements acceptable for *Cy. gracile* could be higher than previously thought. Taken together, our results with field isolates demonstrate that at least two *Cylindrocladium* species could be associated with necrotic lesions on banana roots or isolated from banana field soils, and that these two pathogenic species may be present in the same geographic area. It should be also noted that in Costa Rica only *Cylindrocladium* isolates with globose vesicles have been isolated from banana roots as previously reported (Semer et al 1987) and *Cy. musae* should therefore be considered as a synonym of *Cy. spathiphylli*. Similarly strains

showing clavate vesicles that were examined by Risède (1994) are better assigned to *Cy. gracile* or to a new yet undescribed related species.

Such a procedure based on restriction of IGS-PCR products appears to constitute a valid and powerful strategy for taxonomic purposes within the genus *Cylindrocladium*. It could therefore be successfully applied to other species or isolates of this genus, thus representing a rapid, discriminative and reproducible method for delineating strains at the species level.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Dr J. Mouchacca (Museum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie, Paris) for providing isolate PC 55197. They are also grateful to B. Paulo-Rhino and F. Lheureux for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Anderson JB, Stasovski E. 1992. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84:505-516.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Systemat* 22:525-564.
- Castaing V, Beveraggi A, Fouré E, Fogain R. 1996. Detection of a *Cylindrocladium* sp. in Cameroon. Studies on pathogenic activity and interactions with *R. similis*. *Infomusa* 5:4-7.
- Cooke DEL, Duncan JM. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycol Res* 101:667-677.
- Crous PW, Kang JC, Schoch CL, Mchau GRA. 1999. Phylogenetic relationships of *Cylindrocladium pseudogracile* and *Cylindrocladium rumohrae* with morphologically similar taxa, based on morphology and DNA sequences of internal transcribed spacers and beta-tubulin. *Can J Bot* 77:1813-1820.
- , Korf A, Van Zyl WH. 1995. Nuclear DNA polymorphisms of *Cylindrocladium* species with 1-septate conidia and vesicles. *Syst Appl Microbiol* 18:224-230.
- , Mchau GRA, Van Zyl WH, Wingfield MJ. 1997a. New species of *Calonectria* and *Cylindrocladium* isolated from soil in the tropics. *Mycologia* 89:653-660.
- , Peerally A. 1996. *Gliocladiopsis irregularis* sp. nov. and notes on *Cylindrocladium spathiphylli*. *Mycotaxon* 65:119-128.
- , Phillips AJL, Wingfield MJ. 1992. Effects of cultural conditions on vesicle and conidium morphology in species of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella*. *Mycologia* 84:497-504.
- , Theron L, Van Zyl WH. 1997b. Delineation of *Cylindrocladium* species with 1-3-septate conidia and clavate vesicles based on morphology and rDNA RFLPs. *Mycol Res* 101:210-214.
- , Wingfield MJ. 1994. A monograph of *Cylindrocladium* including anamorphs of *Calonectria*. *Mycotaxon* 51:341-435.
- Decock C, Crous PW. 1998. *Curvieladium* gen. nov., a new hyphomycete genus from French Guiana. *Mycologia* 90:276-281.
- Duchesne LC, Anderson JB. 1990. Location and direction of transcription of the 5SrRNA in *Armillaria*. *Mycol Res* 94:266-269.
- El-Gholl NE, Alfenas AC, Junghans DT, Schubert TS, Miller JW, Leahy RM. 1997. Description of *Calonectria rumohrae* sp. nov. (anamorph = *Cylindrocladium rumohrae* sp. nov.). *Mycotaxon* 64:467-484.
- Erland S, Henrion B, Martin F, Glover LA, Alexander IJ. 1994. Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. *New Phytol* 126:525-532.
- Felsenstein J. 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. Seattle: University of Washington, Department of Genetics, USA. Distributed by the author.
- Goodwin DC, Lee SB. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques* 15:438-444.
- Hamelin RC, Bérubé P, Gignac M, Bourassa M. 1996. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 62:4026-4031.
- Hillis DM, Dixon MT. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol* 66:411-53.
- Jeng RS, Dumas M, Liu FH, Wang CL, Hubbes M. 1997. DNA analysis of *Cylindrocladium floridanum* isolates from selected forest nurseries. *Mycol Res* 101:285-291.
- Kobenan K. 1991. Parasites et ravageurs des bananiers en Côte d'Ivoire. *Fruits* 46:633-641.
- Lee SB, Taylor JW. 1992. Phylogeny of five fungus-like protistan *Phytophthora* species inferred from the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Mol Biol Evol* 9:636-653.
- Loridat P. 1989. Etude de la microflore fongique et des nématodes associés aux nécroses de l'appareil souterrain du bananier en Martinique. Mise en évidence du pouvoir pathogène du genre *Cylindrocladium*. *Fruits* 44:587-597.
- Nazar RN, Hu X, Schmidt J, Culham D, Robb J. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiol Mol Pl Pathol* 39:1-11.
- Overmeyer K, Lünemann S, von Wallbrunn C, Meinhardt F. 1996. Genetic variability among isolates and sexual offspring of the plant pathogenic fungus *Calonectria morgani* on the basis of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Curr Microbiol* 33:249-255.
- Peerally A. 1991. The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. *Mycotaxon* 40:323-366.
- Perrière G, Gouy M. 1996. WWW-Query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78:364-369.
- Poupard P, Simonet P, Cavelier N, Bardin R. 1993. Molec-

- ular characterization of *pseudocercospora herpotrichoides* isolates by amplification of ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Pl Pathol* 42:873-881.
- Risède JM. 1994. Eléments de caractérisation de *Cylindrocladium* sp. agent de nécroses racinaires du bananier en Martinique. *Fruits* 49:167-178.
- . 1995. Spatial and temporal distribution in soils of *Cylindrocladium* sp. fungal pathogen of bananas. *Phytopathology* 85:1563.
- Rossmann AY. 1979. *Calonectria* and its type species, *C. dalmaniana*, a later synonym of *C. pyrochroa*. *Mycotaxon* 8:321-328.
- . 1983. The phragmosporous species of *Nectria* and related genera. *Mycol Pap* 150:1-164.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Schoch CL, Crous PW. 1999. First report of *Cylindrocladium* root and petiole rot to *Spathiphyllum* in South Africa. *S African J Bot* 65:208-211.
- , Wingfield BD, Wingfield MJ. 1999. The *Cylindrocladium candelabrum* species complex includes four distinct mating populations. *Mycologia* 91:286-298.
- Semer CR, Mitchell DJ, Mitchell ME, Martin FR, Alfenas AC. 1987. Isolation, identification and chemical control of *Cylindrocladium musae* sp. nov. associated with toppling disease of banana. *Phytopathology* 77:1729.
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* 58:291-295.
- Sokal RRR, Michener CD. 1958. A statistical method for evaluation of systematic relationships. *Univ Kansas Sci Bull* 38:1409-1438.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673-4680.
- Victor D, Crous PW, Janse BJH, Wingfield MJ. 1997. Genetic variation in *Cylindrocladium floridanum* and other morphologically similar *Cylindrocladium* species. *Syst Appl Microbiol* 20:268-285.
- Watanabe T. 1994. *Cylindrocladium tenue* comb. nov. and two other *Cylindrocladium* species isolated from diseased seedlings of *Phellodendron amurense* in Japan. *Mycologia* 86:151-156.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, p 315-322.
- Yan ZH, Rogers SO, Wang CJK. 1995. Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. *Mycologia* 87:72-83.

3.2.2 Comparaison des haplotypes IGS entre isolats MT2HEL et MT2BAN - corrections taxinomiques

Les isolats MT2HEL ont montré des profils de restriction identiques à ceux de ATCC 44730 isolat type de l'espèce *Cy. spathiphylli*, isolé de *Spathiphyllum*. Le fait qu'ils partagent exactement le même haplotype IGS que cet isolat avec lequel ils sont capables de se croiser (chapitre 2) confirme de façon indéniable leur appartenance à l'espèce *Cy. spathiphylli*. L'haplotype est ici défini comme l'ensemble des profils de restriction déterminés pour les 4 enzymes de restriction utilisés pour révéler le polymorphisme de la région IGS.

L'enzyme *Ava II* discrimine les isolats MT2HEL des isolats MT2BAN (paragraphe 2.3.1) confirmant ainsi l'existence d'une diversité intraspécifique marquée au sein de l'espèce *Cy. spathiphylli*. Au sein de cette espèce, les isolats originaires issus de deux groupes d'hôtes peuvent désormais être distingués sur une base moléculaire : d'une part, les isolats provenant d'un groupe *Spathiphyllum* – Héliconias, et d'autre part les isolats isolés d'un second groupe d'hôtes formé par les bananiers et le thé (isolats MT2BAN et isolat de référence IMI 167983 isolé de théier à l'île Maurice).

Nous avons également appliqué cette méthodologie de diagnostic par PCR-RFLP de l'IGS à trois isolats provenant des collections CBS de Baarn (Pays-Bas) et de l'IMI (Kew, Royaume-Uni), et dont le statut taxinomique nous paraissait mal défini. Il s'agit des isolats CBS 240.66 isolé de racines de bananier en 1966 par J. Brun (I.F.A.C.) en Guadeloupe, CBS 567.74 isolé d'héliconias par G.H. Boerema en 1974, et IMI 354528 isolé d'*Araucaria heterophylla* à Hawaii en 1987 par Aragaki. L'isolat IMI 354528 était donné par Crous et Wingfield dans leur monographie de 1994 comme un représentant de l'espèce *Cy. spathiphylli*. Les 2 isolats CBS étaient identifiés par cette mycothèque comme appartenant à l'espèce *Cylindrocladium pteridis*. Leur typage par PCR-RFLP de l'IGS a permis d'établir leur identité de façon indiscutable, sur une base génétique : Ils appartiennent tous deux très clairement à l'espèce *Cy. spathiphylli*, CBS 240.66 partageant le même haplotype que nos isolats MT2 isolés de bananier, et CBS 567.74 le même que celui des isolats de l'espèce *Cy. spathiphylli* provenant de *Spathiphyllum* ou d'héliconia. L'isolat IMI 354528 a présenté quel que soit l'enzyme testé, des profils de restriction IGS bien spécifiques et toujours très différents de ceux des isolats de l'espèce *Cy. spathiphylli*. Cela nous a amené à considérer qu'il ne pouvait en aucune manière appartenir à cette espèce, et nous avons dès lors cherché à poser son diagnostic par comparaison à d'autres espèces de référence (voir paragraphe suivant).

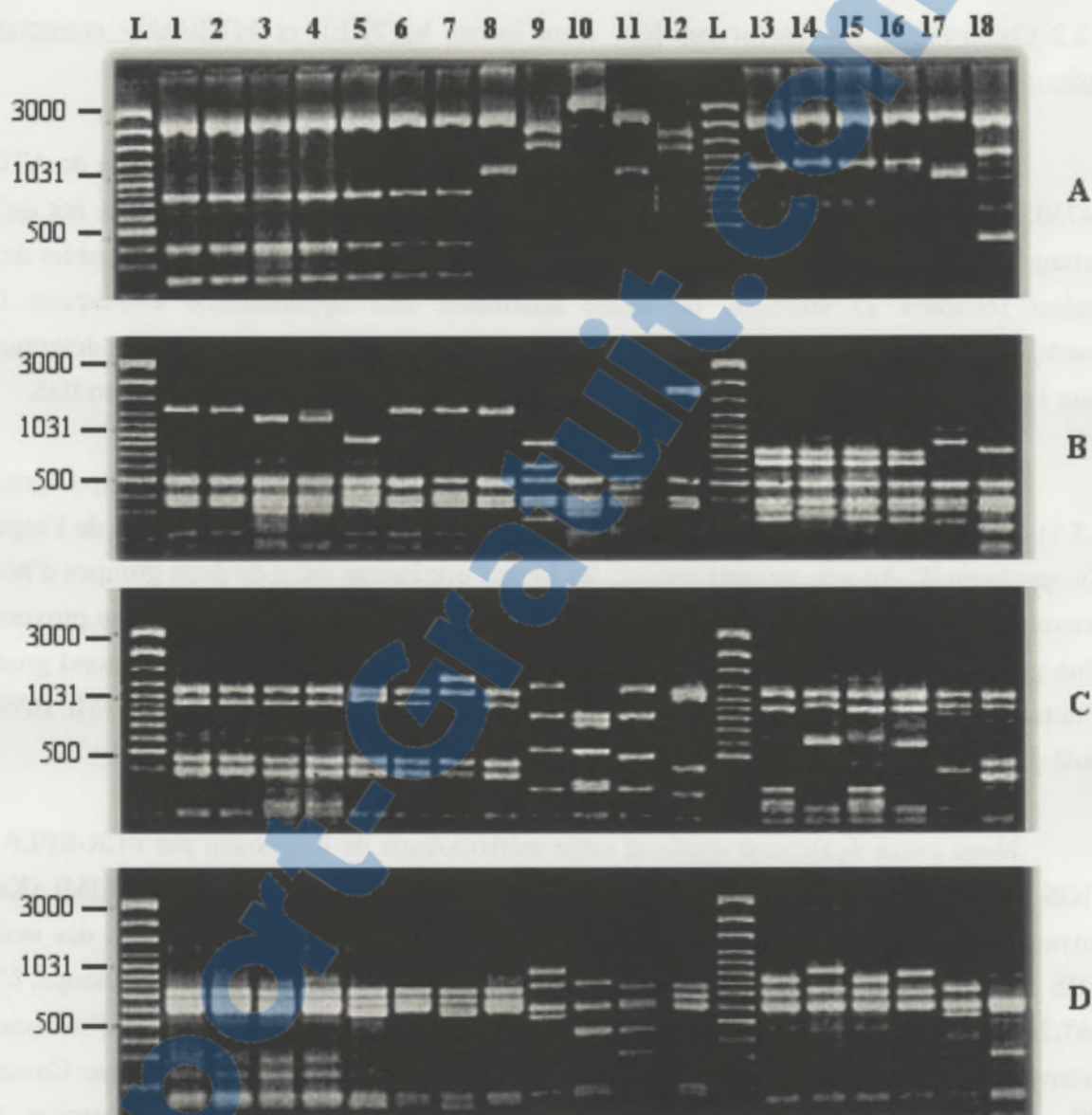


Figure 27 : Profils PCR-RFLP de la région IGS chez *Cylindrocladium* spp. Quatre enzymes de restriction sont utilisés : A : *Pst* I ; B : *Rsa* I. C : *Ava* II. D : *Mva* I. L = Marqueur de taille 100 bp. Puit 1: *Cy. scoparium* CBS 230.51. Puit 2 : *Cy. scoparium* CBS 192.49. Puit 3 : *Cy. scoparium* ATCC 38227. Puit 4 : *Cy. scoparium* ATCC 46300. Puit 5 : Isolats de morphotype MT3 (Mar12) provenant de la rhizosphère du bananier. Puit 6 : Isolats MT3 (Gua13). Puit 7 : Isolats MT3 (Cam9). Puit 8 : Isolats MT3 (Cam12). Puit 9 : *Cy. floridanum* ATCC 42971. Puit 10: *Cy. floridanum* CBS 170.77. Puit 11: *Cy. floridanum/canadense* ATCC 22677. Puit 12 : Isolats de morphotype MT4 provenant de la rhizosphère du bananier (Cam13). Puit 13 : *Cy. gracile* PC 551197. Puit 14 : *Cy. gracile* IMI 346843. Puit 15 : Isolats de morphotype MT5 (Cam14) provenant de la rhizosphère du bananier. Puit 16: Isolats de morphotype MT1 (Slu2) provenant de la rhizosphère du bananier. Puit 17 : *Cy. pseudogracile* PPRI 4176. Puit 18 : *Cy. pteridis* IMI 354530. Les profils de *Cy. gracile* ATCC 22833 sont identiques à ceux du puit 13. Les profils de l'isolat Mar13 (MT3) sont identiques à ceux de Mar12 (puit 5) et ceux des isolats Cam10 and Cam11 (MT3) identiques à ceux de Cam9 (puit 7). Les nombres sur les côtés des gels indiquent la taille des fragments (bp).

3.2.3 Détermination des haplotypes IGS des morphotypes MT3, MT4 et MT5 – autres corrections taxinomiques

La méthode de diagnostic moléculaire des espèces de *Cylindrocladium* par PCR-RFLP de l'IGS a clairement permis d'établir l'identité de l'isolat Cam14, unique représentant du morphotype MT5. La figure 27 A-D indique que cet isolat partage en effet exactement le même haplotype IGS que l'isolat PC 551197 (isolat type de l'espèce *Cy. gracile*), ce qui illustre donc son appartenance à cette espèce. Rappelons brièvement ici que les profils « types » de l'espèce *Cy. gracile* diffèrent légèrement de ceux des isolats du morphotype MT1 avec lesquels ils s'agrègent pourtant facilement (figure 29), ce qui suggère l'existence d'une variabilité génétique insoupçonnée au sein de cette espèce.

La figure 27 A-D indique également que différents profils de restriction proches les uns des autres sont obtenus pour les représentants du morphotype MT3. Pour l'enzyme *Pst* I, tous les profils de ces représentants MT3 sauf celui de l'isolat Cam12 sont identiques entre eux et quasi identiques à ceux des isolats de référence de l'espèce *Cy. scoparium*. Pour les 3 autres enzymes, les profils obtenus pour ces isolats MT3 se révèlent également peu différents entre eux, tout en demeurant dans le même temps toujours très proches de ceux des isolats de référence de l'espèce *Cy. scoparium* avec lesquels ils s'agrègent (figure 29). Cela suggère leur conspécificité avec cette espèce, en dépit de quelques différences entre eux dans la façon avec laquelle ils s'agrègent avec les représentants de cette espèce. Ainsi l'isolat Gua13 provenant de Guadeloupe a la même identité génétique (au locus considéré) que les deux souches de référence de l'espèce *Cy. scoparium* CBS 192.49 et CBS 23051, puisqu'il a le même haplotype qu'elles. La souche Cam12 du Cameroun d'une part, et d'autre part les autres souches MT3 du Cameroun et les souches MT3 de Martinique se regroupent avec les isolats de référence *Cy. scoparium* de façon un peu plus distante. Il faut enfin noter que les enzymes *Rsa* I et *Ava* II mettent également en évidence du polymorphisme intraspécifique au sein de cette espèce *Cy. scoparium* en distinguant d'une part les isolats de référence CBS 23051 et CBS 192.49, et d'autre part les deux isolats de référence ATCC 46300 et ATCC 38227 qui sont rappelons-le sexuellement compatibles, et ont entre eux des profils toujours quasi identiques. Le diagnostic moléculaire par PCR-RFLP de l'IGS révèle donc une diversité génétique certaine au sein de l'espèce *Cy. scoparium* et des isolats MT3.

Nous avons également comparé les profils de restriction obtenus pour l'unique représentant du morphotype MT4 (l'isolat Cam13) avec ceux d'isolats de phénotype proche, c'est à dire possédant des vésicules sphéro-pédonculées (figures 27 et 28). Parmi ces isolats à vésicules sphéro-pédonculées (isolats *floridanum*-like), nous avons inclus :

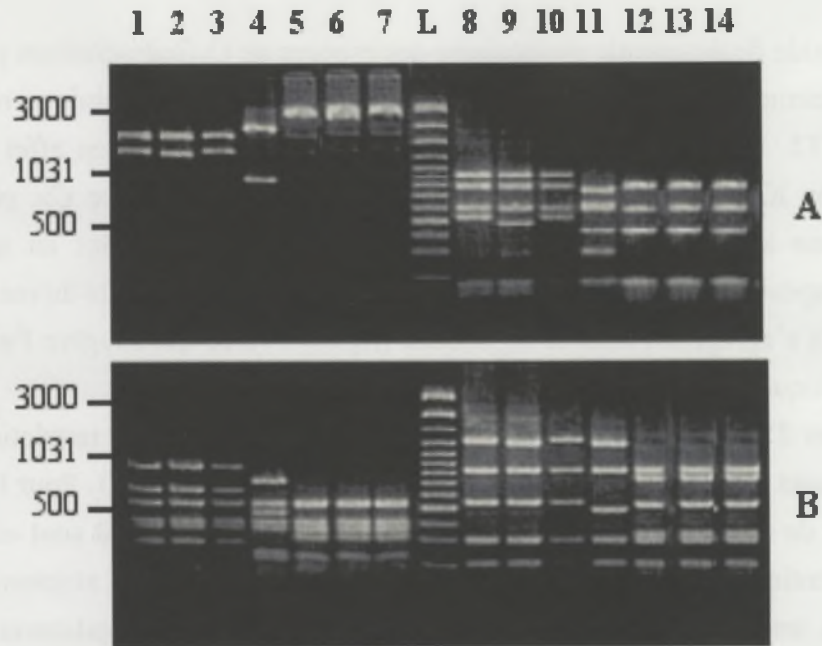


Figure 28: Profils PCR-RFLP de la région IGS chez différents représentants d'espèces de *Cylindrocladium* à vésicules sphéro-pédonculées . A) Puits 1 à 7 : *Pst* I. Puits 8 à 14: *Mva* I. B) Puits 1 à 7 : *Rsa* I. Puits 8 à 14 : *Ava* II. L = Marqueur de taille 100 bp. Puits 1 & 8 : *Cy. floridanum* ATCC 18882. Puits 2 & 9 : *Cy. floridanum* ATCC 18834. Puits 3 & 10 : *Cy. floridanum* ATCC 42971. Puits 4 & 11: *Cy. floridanum/canadense* ATCC 22677. Puits 5 & 12 : *Cy. floridanum* CBS 170.77. Puits 6 à 13 : *Cy. parasiticum* CBS 473.76. Puits 7 à 14 : IMI 35428. Les nombres sur les côtés des gels indiquent la taille des fragments (bp).

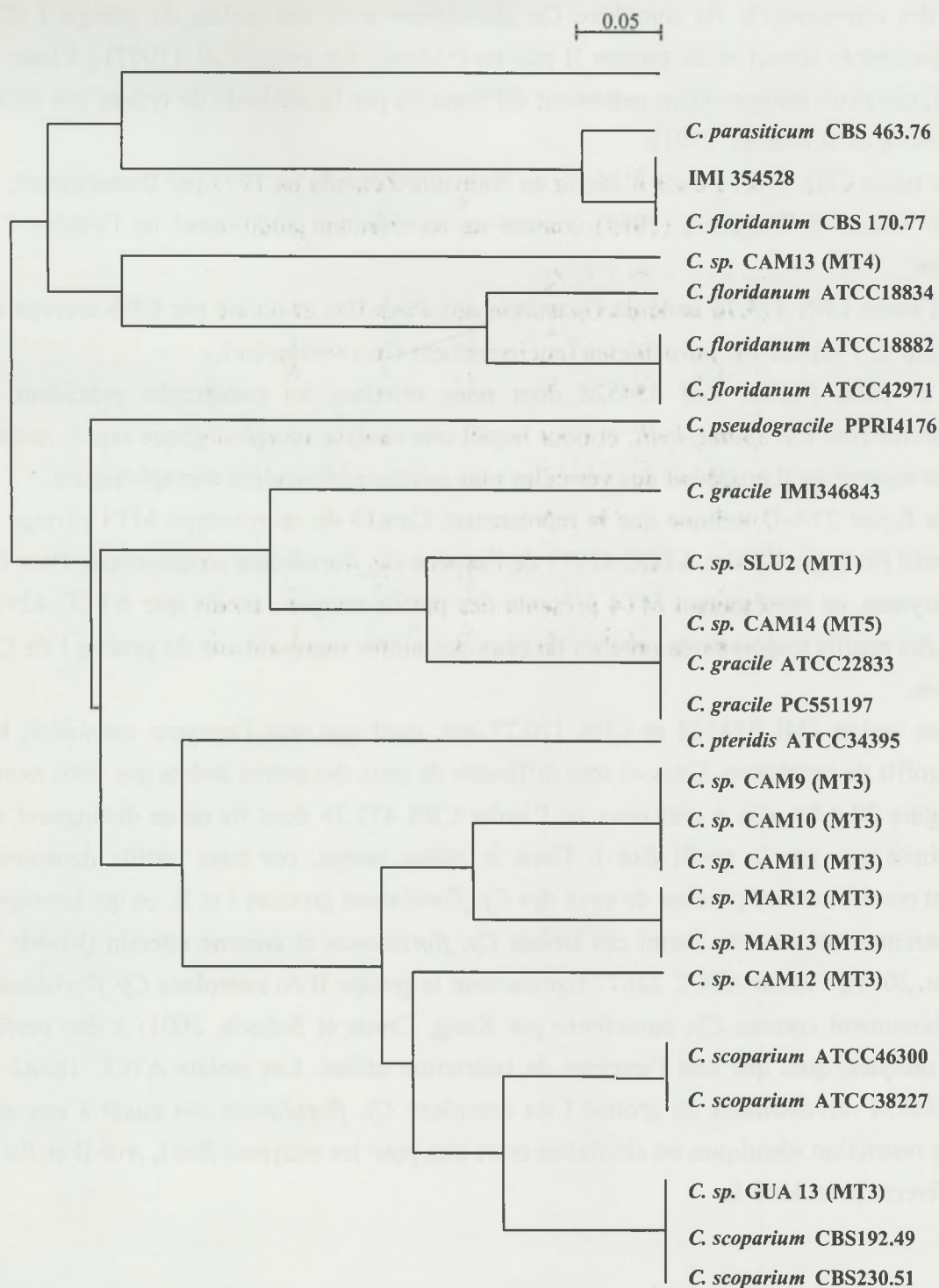


Figure 29 : Dendrogramme construit par la méthode UPGMA sur la matrice de dissimilarités (Sokal et Michener, 1958) de profils PCR-RFLP (CAPS) de l'IGS - enzymes *Pst* I, *Mva* I, *Rsa* I et *Ava* II (64 marqueurs informatifs) - chez des représentants de référence de différentes espèces de *Cylindrocladium* et des isolats de *Cylindrocladium* de morphotypes MT3, MT4 et MT5 issus de la rhizosphère du bananier

. des représentants du complexe *Cy. floridanum* avec des isolats du groupe I (*Cy. floridanum stricto sensu*) et du groupe II mis en évidence par Jeng *et al.* (1997) ; Victor *et al.* (1997), ces deux groupes étant nettement différenciés par la méthode de typage par PCR-RFLP (Risède et Simoneau, 2001).

. l'isolat CBS 170.77 isolé d'*Idesia* en Nouvelle-Zélande en 1977 par Boesewinkel, et donné par Crous et Wingfield (1994) comme un représentant additionnel de l'espèce *Cy. floridanum*

. l'isolat CBS 473.76 isolé de *Guzmania* aux Pays-Bas et donné par CBS comme un représentant de l'espèce *Cy. parasiticum* (anciennement *Cy. crotalariae*),

. et enfin l'isolat IMI 354528 dont nous rejetons au paragraphe précédent la conspécificité avec *Cy. spathiphylli*, et pour lequel une analyse morphologique rapide nous a également montré qu'il possédait des vésicules plus sphéro-pédonculées que sphériques.

La figure 27A-D indique que le représentant Cam13 du morphotype MT4 partage le même profil *Pst* I que l'isolat ATCC 42971 de l'espèce *Cy. floridanum stricto sensu*. Pour les autres enzymes, ce représentant MT4 présente des profils uniques, tandis que ATCC 42971 présente des profils toujours très proches de ceux des autres représentants du groupe I de *Cy. floridanum*.

Les isolats IMI 354528 et CBS 170.77 ont, quel que soit l'enzyme considéré, les mêmes profils de restriction. Ceux-ci sont différents de ceux des autres isolats que nous avons testés (figure 28 a-b), mis à part ceux de l'isolat CBS 473.76 dont ils ne se distinguent de façon subtile que par le profil *Rsa* I. Dans le même temps, ces trois profils demeurent cependant manifestement proches de ceux des *Cy. floridanum* groupes I et II, ce qui témoigne d'un apparentement certain. Parmi ces isolats *Cy. floridanum* et comme attendu (Risède et Simoneau, 2001), l'isolat ATCC 22677 représentant le groupe II du complexe *Cy. floridanum* (décrit récemment comme *Cy. canadense* par Kang, Crous et Schoch, 2001) a des profils toujours uniques, quel que soit l'enzyme de restriction utilisé. Les isolats ATCC 18882 et ATCC 188834 représentants du groupe I du complexe *Cy. floridanum* ont quant à eux des profils de restriction identiques ou similaires entre eux pour les enzymes *Rsa* I, *Ava* II et *Pst* I, mais différents pour *Mva* I.

3.3 Premières informations sur le polymorphisme de séquences de l'espaceur IGS chez *Cylindrocladium*

Les séquences de l'espaceur intergénique que nous avons obtenues pour les représentants IMI 346843 et IMI 167983 des espèces *Cy. gracile* et *Cy. spathiphylli* avaient des tailles respectives de 3294 pb et 3170 pb. Elles comportent à leur début la partie 3'

terminale de l'ARN 28S et à leur fin l'extrémité 5' de l'ARN 18S . L'espaceur proprement dit couvre respectivement 2443 et 2319 pb. Un fort polymorphisme de substitution est observé entre les représentants des deux espèces dans les deux premiers tiers de la séquence IGS (figure 30). Il s'accompagne également de plusieurs événements significatifs de types insertions ou délétions pouvant quelquefois affecter plusieurs dizaines de nucléotides.

On note également l'existence de deux motifs répétés dispersés, l'un de 14 bp et l'autre de 68 bp. Celui de 14 bp est répété 22 fois chez IMI 346843 et 18 fois chez IMI 167983. On relève une certaine variation nucléotidique entre les différentes copies de ce motif. La figure 31 donne les différentes « déclinaisons » de ce motif chez IMI 346843, ainsi que la séquence consensus qui en résulte. Ce motif est quelquefois trouvé en tandem plus ou moins chevauchants. Le motif de 68 pb n'est quant à lui répété que deux fois chez les deux isolats étudiés, chacune dans l'une des deux moitiés de la séquence IGS.

Enfin, on note pour la souche IMI 346843 la présence d'une répétition en tandem de 7 éléments GGAGGGCT parfaitement conservée.

Figure 30 : Alignement de la séquence nucléotidique de la région IGS chez l'isolat IMI 346843 de l'espèce *Cy. gracile* et l'isolat IMI 167983 de l'espèce *Cy. spathiphylli*

- Nucléotides surlignés en gris : Fin de la sous-unité 28S et début de la sous-unité 18S
- Nucléotides imprimés en rouge : nucléotides différant entre les deux séquences
- Nucléotides surlignés en jaune : répétition d'un motif de 68bp
- Nucléotides surlignés en bleu : répétition dispersée d'un motif de 14 bp
- Nucléotides surlignés en alternance vert-gris : répétition parfaite en tandem

Cy gra CTGAACGCCTCTAAGTCAGAATCCATGCCAGAACGCGGTGATAACCACCCGCACGTACAGA
Cy spa CTGAACGCCTCTAAGTCAGAATCCATGCCAGAACGCGGTGATAACCACCCGCACGTATAGA

Cy gra TGGACAAGAATAGGCTTCGGCTTAGTGTCTTAGCAGGCGATTCTTCCACAGCGCAGGAAG
Cy spa TGGACAAGAATAGGCTTCGGCTTAGTGTCTTAGCAGGCGATTCTTCCACAGCGCAGGAAG

Cy gra CGCGTTGTGGTATTTTCGCGTATTGTAATTTCAACACGAGCGGGGTCAAATCCTTTGCAGA
Cy spa CGCGTTGTGGTATTTTCGCGTATTGTAATTTCAACACGAGCGGGGTCAAATCCTTTGCAGA

Cy gra CGACTTAGCTGTGCGAAACGGTCCTGTAAGCAGTAGAGTAGCCTTGTTGTTACGATCTGC
Cy spa CGACTTAGCTGTGCGAAACGGTCCTGTAAGCAGTAGAGTAGCCTTGTTGTTACGATCTGC

Cy gra TGAGGGTAAGCCGTCCTTCGCCTCGATTTCCC CAATGCGAGCTCCGCCAGACGGGGCAGT
Cy spa TGAGGGTAAGCCGTCCTTCGCCTCGATTTCCC CAATGCGAGCTCCGCCAGACGGGGCAGT

Cy gra GTAGGGGTTGTTTCGTGTGTTTCTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTGTG
Cy spa GTAGGGGTTGTTTCGTGTGTTTCTCCTTTTTT-----CCTTTTTGTG

Cy gra GGCGAGCAGGTACAGGGTAAGTCGGTCTGACTTGGTCGGATTTCGGCTGACCTGTTGCTTC
Cy spa GGCGAGCAGGTACAGGGTAAGTCGGTCTGACTTGGTCGGATTTCGGCTCATCCGTTGCTGC

Cy gra TGCTCTGGAAGAGTGCAGGTATAGGGTAAGTCGCTTGGACTTGGTCGAGATGGAGGCTGG
Cy spa TGCTATGGAAGGGGCTGGTATAGGGTAAGTCGCTTGGACTTGGTCGAGATGGAGGTTTG

Cy gra CTAGGCGGCGGTTCGTGTGAGAGATCGGGTGCAGGGTAGGAGTCTAGGGTAAGTTGGCTGG
Cy spa CTGGGTTGCGGACGCGTGAGAGATCTGGTGCAGGGTAGGAGTCTAGGGTAGGCTGGCTGG

Cy gra AGTTGGTCGAGGTAGGTGCTCTTTCGTGTCTGGAGCGGGTATAGGGTAGGATCTAGGGT
Cy spa AGTTGGTCGAGGTGAAGGCTCTTCTGTGTCCAGGCGCAGGTATAACGGT-----

Cy gra GCGTTCGAGGAATAAGGGCTGTTAGATGGGCTGGTGGTGGTTGGTGTTCGTGTGTG
Cy spa -----GCAGGTGGT--TT-----

Cy gra GAAGGTGCAAGTATAGGGTAGGAGTGTAGGGTAAGTCCCGCCAGTGAACCGGCCTTAAAG
Cy spa -----GGTGTAGGGTAGGAGTGTAGGGTAAGTCCCGCAGTGAACCGGCCTATATAG

Cy gra GCCACTCCAGGCCGTCCAGGGCGCGCAATCTGGGTCGCCATAGCGTATTTGTATAGGGTA
Cy spa GGCACTTCAGGCGGTTCAGGGCGCGCAGCCAGGCTCGATATAGAGTGTTGTATAGGGTA

Cy gra GGCTGCGTCATAGGGCGGTAGTGCAGGGTAGGTCAGGGTAAGCAAATTTTGGGTTACA
Cy spa AGCTGTGTTACAGGGTGGAGTGCAGGGTAGGTCAGGGTAAGCTGAGTCCCAGCCTGCA

Chapitre 3 : Analyse du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr chez le genre *Cylindrocladium* et développement d'une méthode de diagnostic moléculaire de ses espèces - Application à la caractérisation génétique des taxa identifiés en bananeraies

Cy gra GAAGGGTGC GGTGC GGTGTATAGCC G GCTGCTGTTGGCCTAGGGCAGCTCGGGTGTGCT
 Cy spa GAAGGGTGCAGTGTGTGTATAGCGGTTTGTGCTGGCCTGGGGAAGCTCGGGTGTGCT

Cy gra GTGGGCGGCGTGGTGTGTGGCGCTGTGCAGGTGCTGCTAGGCGTGAGTCGATTTTTTTGTT
 Cy spa GC GGGCGGCGTGGAGCGGCGCTGTGGAGGTGCTGCTGGGCGTGAGTCGATCTTTTTGTT

Cy gra TCCCCATACTAAATAGTTTTTGC GGAAAATCAAAGTGGCCCTCGAGCCATGCCTAGCGTG
 Cy spa TCCCCATACTAAATCTTTTTTGC GGAAAATCAAAGTGGCCCTCAAGCCAGGCCTGGCGTG

Cy gra CGCCGTACCAAACCTCCCCGGAGGATATATAAGAGGCGCCGGCCGGGGCCCGCACTAA
 Cy spa AGCCATACCAAACCTCCCTCGGAGGATATATAAGAGGCGCCGGCCGGGGCCCGCACGAA

Cy gra GCTGCAGGGTAAGTAAAAATCAAAAAAGTTGTTAAGACGCTTGGCTAGGCAGCTAGTTGT
 Cy spa GCTGCAGGGTAAGTAAAAATGGAAAAGTTGTTAAGGTGCTTGGCTAGGCAAGCTAGTTG

Cy gra TGGTAGAGAGGAACTTTTTGCATTCGGGCAGGCGGGTGTGCGGAGGGCTGGAGGGCTG
 Cy spa TGGTAGAGAGGACTTGTTTTTCTTCCGGGCAGGCGGGCGTGC GGAGGGCTGGAGGTCTG-

Cy gra AGGGCTGGAGGGCTGGAGGGCTGGAGGGCTGGAGGGCTTGGCAAGGGGGGGCGTCATGCC
 Cy spa -----CTTCCTCGC-GGCGCGCCAGCGAGCGGCAGTGT-----AGGGTAG-----

Cy gra CGAGGGCGGC GGTATAGGGTAGTTAGAATAGTGTCTACAGGGTAGCTACAGGGTAGGC TAT
 Cy spa CAAAACAGCGCCGTAGGGGTGTT-----GCTATAGGGTAGCTACCGGGTAAGCTAT

Cy gra TGTTCTTACTGTAGGGTAGTGTAGGGTAGGTACAGGGTAGCCAGAATTCTAATTATTG
 Cy spa TGTT---ATT-----GGTGTAGGGTAGGTGTAGGGTAGTTAGAATTGCTAATTATTG

Cy gra AACATTGGGTGACGGGTGAGCTGTGTGTGTTGCGTGCAGCAGGCCTTGTTTTTAGTTGGT
 Cy spa A GACTTGGTTGGCGGGTGGCTGTGTGCGACGCGTGCAGCAGGCCTTGTTTTTGGTTGGT

Cy gra AGTGGGTTATG--TGATAATTGACTATATA-TATATATAATGATTCAAAGTGTAAATAAT
 Cy spa AATATGTTGGGAATGATATTTATGATATTTACTATAAA-AATTATTTA--TGATAAAAAC

Cy gra AACATAACCTTTTTTCTTTGGGCACGTTT-----TTGGG
 Cy spa AATATAGCCTTTTTTCTATGGACGCCTTAATGCAGTGTAGCCGCTGGAAACAAGTGTGTG

Cy gra TTGGGTGGAGGCCGGCTGGTGTGCTGTGTGGGAGTGTGCTGGTTGGTATGCTAGCAGT
 Cy spa CTGGGTGGGGGTGGTTGGTGTGCTGTATGGAAGTGTGCTTGTT----TGCTGACA--

Cy gra AATTTATTTGCATTTGAAATTTTCTGACAATGGGCTTCGGAAACCTAAATCCC GCCACAC
 Cy spa --TTTGTGTGCATCCGAAATTTTCCAACAATAGGCTTCAGCAGCCTTAATCCC GCCACAC

Cy gra CAGCCCGACCGCTGCAAAACCGGCACCATGCGAAGGAAGAGGCTCTAGCAACCCTCCCGG
 Cy spa CAGCCCGACCGCTGCAAAACCGGCACCAAGCGATGTAAGAGGCTCTAGCAGCCCTCCTGG

Cy gra TGCTTTCTCGACCGCACAGGACGCCTATCGCTGCCTCCAGGGCCGAAAAACTGGTTTGC
 Cy spa CACTTTTCTCAACCGCTCACAGCGCCTGCAGCCGCTCCAGGGCCGAAAAACCGGGTTGC

Cy gra TGGTCCAGGGTAGCTGTCTAGGGTAGGGGTGCCGACCGCGAAAAGAGAAACGACCAAGTC
 Cy spa TGGTGTAGGGTAGTGTCTAGGGTAGGG-----CGAGGGCGAAAACGACCAAGTC

Chapitre 3 : Analyse du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr chez le genre *Cylindrocladium* et développement d'une méthode de diagnostic moléculaire de ses espèces - Application à la caractérisation génétique des taxa identifiés en bananeraies

Cy gra CCCCCGGCCTACCCTACACCTCACTTCAACCGCTCCTGGCGCCTGCCACAGGAGTCGCAC
 Cy spa CCCCCGGCCTACCCTGCACCTCGCTTCAGCCGCTCCTGGCGCCC GCCACAGGAGTCGCAC

Cy gra GGGGACAAGCTCTTACAGTCAGACTCGCCGGACCTGACTCTACCTGCATGCAAAGTTTT
 Cy spa GGAGACAAGCTCTTCGCCGT CAGACTCGCCTGAGCTGGCTCTACCTGCATGCAAAGTTTT

Cy gra GGAAGTCTGCGTGCAGAACGGTCGAAAGGTTGTGTGGTCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT
 Cy spa GTTAGTCTGCGTGC GGAACGGTCGAAAGGTTGTGTGGCCGTGAGTCGATTTTTTTGTTTT

Cy gra CCCATAGTAAATAATTTTTGCGGAAAATAAAAAGTGGCCCTCGAGCCCGGTCTGGCGTGCG
 Cy spa CCCATACTAAATCTTTTTGCGGAAAATAAAAAGTGGCCCTCGAGCCCGGTCTGGCGTGCG

Cy gra CCCACTAAAAAGCCTCGGAGGGTATAAGAGAGGGGGGCAAAGCAGCCGGCTGGAAACA
 Cy spa CCCACTAAAAAGCCTCGGAGGGTATAAGAGAGGGGGGCAAAGCAGCCGGCTGGAAACA

Cy gra GTCGGCGGCGGCGCCTCACCAACCTCTAAGTGGTCCCGAAAGGCGCCGCGACTTCTAGAA
 Cy spa GTCGGCGGCGGCGCCTCACCAACCTCTAAGTGGTCCCGAAAGGCGCCGCGACTTCTAGAA

Cy gra CAGTTGTACCTGATCTTGCAGACAACCACTGCGTGTCTCTCTGAACCGACTCAGTAGGCT
 Cy spa CAGTTGTACCTGATCTTGCAGACAACCACTGCGTGTCTCTCTGAACCGACTCAGTAGGCT

Cy gra CCGGCCTCGTCAGCGGGGAGTTCGTAGTGGAAGTCGACCTCCACGAAAGCGAACGCTCAG
 Cy spa CCGGCCTCGTCAGCGGGGAGTTCATAGTGGAAGTCGACCTCCACGAAAGCGAACGCTCAG

Cy gra GCGTTACGCCGTACTGGAGCTGCCC GGCAATAGCGGACGCAGGCTTGCTTGCAGCCGCTG
 Cy spa GCGTTACGCCGTACTGGAGCTGCCC GGCAATAGCGGACGCAGGCTTGCTTGCAGCCGCTG

Cy gra CTGGATGGGCTCTGTGGGTAAC TGGCCGCTGGCTAGACCTACCAACTGAGCAACGGGAGG
 Cy spa CTGGATGGGCTCTGTGGGTAAC TGGCCGCTGGCTAGACCTACCAACTGAGCAACGGGAGG

Cy gra TAACCTCGCGTGGCGGACACCGGAATGGTAGAAGCCCCGCGCTGAGTCCTCCTCCTGGGG
 Cy spa TAACCTCGCGTGGCGGACACCGGAATGGTAGAAGCCCCGCGCTGAGTCCTCCTCCTGGGG

Cy gra CCCCTAAGCCACACAGCCCACAGCGGGTGTAGTGCGGTGGACGGTGCGCCCGGGGAACT
 Cy spa CCCCTAAGCCACACAGCCCACAGCGGGTGTAGTGCGGTGGACGGTGCGCCCTGGGGAACT

Cy gra TAGGGGGGGAAAGCGGATTGCCAACC GCGGCGTCATAGGCCTTGCCGACGGCGCTGTGGA
 Cy spa TAGGGGGGGAAAGCGGATTGCCAACC GCGGCGCCATAGGCCTTGCCGACGGCGCTGTGGG

Cy gra AGGCGTGTCTTCACTGACACCACCTGTAAATATCTCTCCGAGCCTTCTAGGCAGCGGT
 Cy spa CGGCGTGTCTTCACTGACACCACCAAGTAAATATCTCTCCGAGCCTTCTAGGCAGCGGT

Cy gra AGCCGTCCCCCGGCGAACGATAGTTACCTGGTTGATTCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTC
 Cy spa AGCCGTCCCCCGGCGAACGATAGTTACCTGGTTGATTCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTC

Cy gra TCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCAATTATACAGCGAAACTGCGAATGGC
 Cy spa TCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCAATTATACAGCGAAACTGCGAATGGC

Cy gra TCATTATATAAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATT
 Cy spa TCATTATATAAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATT

Cy gra CTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCGACTTCGGAAGGGATGTATTTATTAGATTAAAA
 Cy spa CTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCGACTTCGGAAGGGATGTATTTATTAGATTAAAA

Cy gra ACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTCATGATAACTCCTCGAATCGCATGGCCTTG
 Cy spa ACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTCATGATAACTCCTCGAATCGCATGGCCTTG

Cy gra TGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCCCTATCAACTTTCGATGTTTGGGTATTGGCC
 Cy spa TGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCCCTATCAACTTTCGATGTTTGGGTATTGGCC

Cy gra AAACATGGTTGCAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGA
 Cy spa AAACATGGTTGCAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGA

Cy gra AACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGG
 Cy spa AACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGG

Cy gra AGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTCGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTAC
 Cy spa AGGTAGTGATAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTCGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTAC

Cy gra AATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA
 Cy spa AATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA

Cy gra ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATT
 Cy spa ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATT

Figure 31 : Déclinaisons et séquence consensus du motif répété de 14 bp chez l'isolat IMI 346843 de l'espèce *Cy. gracile*

GGTACAGGGTAAGT
 GGTATAGGGTAAGT
 GGTGCAGGGTAGGA
 AGTCTAGGGTAAGT
 GGTATAGGGTAGGT
 TATCTAGGGTAAGC
 GGTATAGGGTAGGA
 AGTGTAGGGTAAGT
 GGCATAGGGTATTT
 TGTATAGGGTAGGC
 AGTGCAGGGTAGGT
 GGTCCAGGGTAAGC
 GCTGCAGGGTAAGT
 GGTATAGGGTAGTT
 GCTACAGGGTAGCT
 GCTACAGGGTAGGC
 ACTGTAGGGTAAGT
 AGTGTAGGGTAGGT
 GGTCCAGGGTAGCA
 AGTCTAGGGTAGGG
 CTCGGAGGGTATAT
GgtatAGGGTAggt : Séquence consensus (les positions variables les plus fréquentes sont en minuscules)

4. Discussion

En utilisant la méthodologie PCR couplée à l'analyse des séquences nucléotidiques ou à l'analyse RFLP, nous avons examiné la variabilité génétique des régions ITS et IGS au sein du genre *Cylindrocladium*. Ceci nous a permis d'évaluer dans quelle mesure ces locus pouvaient servir d'une part à discriminer efficacement ce genre d'autres genres voisins de l'ordre des Hypocréales, mais aussi à définir une méthode de diagnostic moléculaire fiable des espèces, afin d'établir par la suite de façon fiable l'identité des morpho-espèces de *Cylindrocladium* identifiés en bananeraies.

Trois grands types d'enseignements peuvent être tirés de ces travaux :

. La variabilité génétique dans la région ITS chez *Cylindrocladium* : Un polymorphisme discriminant au niveau générique, et discret mais informatif au niveau spécifique

La région ITS couvrant le gène 5.8S de l'ADNr et ses espaceurs flanquants constitue un bon marqueur moléculaire du genre *Cylindrocladium*. L'analyse des séquences nucléotidiques de cette région permet en effet de discriminer de façon non équivoque le genre *Cylindrocladium* d'autres genres considérés comme proches au sein de l'ordre des Hypocréales. Ce sont les genres *Xenocylindrocladium* et *Curviciadium*, qui se révèlent les plus proches sur le plan phylogénétique de *Cylindrocladium*. Le genre *Cylindrocladiella* est plus distant, et apparemment plus variable pour cette région. Ces résultats sur le positionnement phylogénétique de *Cylindrocladium* vis à vis de genres proches des Hypocréales sont conformes aux récents résultats de Schoch *et al.* (2000a) qui ont également utilisé le locus ITS pour discriminer ces genres.

Nous avons dans le même temps trouvé que la région ITS se révèle cependant très fortement conservée entre les différences espèces de *Cylindrocladium*, et que ce faible degré de variabilité génétique ne permet pas toujours de résoudre certains taxa ou espèces proches. Lorsqu'elle existe entre espèces différentes, la divergence génétique ne porte généralement que sur un ou quelques nucléotides seulement, ce qui constitue une base de différenciation moléculaire étroite et délicate à utiliser en termes taxinomiques ou de diagnostic, au regard du poids pouvant être pris par les erreurs de séquençage dans un contexte aussi peu polymorphe. Ce polymorphisme limité dans la région ITS chez *Cylindrocladium* n'en reste pas moins informatif pour plusieurs autres taxa et espèces au sein du genre, ce que confirment de récents résultats sud-africains. Ainsi, Schoch *et al.* (2000b) et Kang, Crous et Schoch (2001) en

confrontant chez quelques taxa du genre *Cylindrocladium* la région ITS à d'autres locus comme le gène de la β -tubuline, le gène de l'histone, ou encore la séquence HMG (High Mobility Group) du gène MAT2 ont obtenu des arbres phylogénétiques globalement congruents entre ces différents locus, mais ont dans le même temps souligné la moindre résolution de l'ITS.

La diversité nucléotidique de l'ITS a fréquemment été reconnue comme suffisante pour discriminer les espèces chez de nombreux champignons Ascomycètes comme par exemple chez *Fusarium* (Bridge et Arora, 1998), ou encore chez des Oomycètes comme les *Pythium* (Raffin, Brygoo et Tirilly, 1995). Néanmoins, un faible polymorphisme de cette même région a déjà été enregistré chez certaines espèces fongiques (Lee et Taylor, 1992 ; Anderson et Stasovski, 1992).



. La discrimination moléculaire des espèces chez *Cylindrocladium* et l'identification des morpho-espèces identifiées en bananeraies : Une meilleure résolution et une meilleure robustesse de l'espaceur IGS

Compte tenu des résultats enregistrés dans la région ITS, nous nous sommes donc intéressés à une autre région de l'ADNr à savoir l'espaceur intergénique IGS situé entre le gène 28S d'une unité répétée et le gène 18S de l'unité suivante. Cette région n'avait jusqu'ici jamais été prospectée chez le genre *Cylindrocladium*. Considérée chez les eucaryotes comme la région de l'unité répétée de l'ADNr évoluant le plus rapidement (Hillis et Dixon, 1991), l'IGS était en effet susceptible de révéler plus de polymorphisme utile pour la discrimination spécifique ou infraspécifique chez le genre *Cylindrocladium* que l'ITS. De taille sensiblement plus importante que l'ITS, la réussite de son amplification PCR n'était pas acquise d'avance du fait de l'existence dans cette région de la molécule d'ADNr de structures secondaires (Baldrige, Dalton et Fallon, 1992) qui auraient pu perturber l'appariement des amorces nucléotidiques, ou altérer le bon déroulement des processus de dénaturation, de d'hybridation et d'extension. L'amplification PCR de l'IGS chez *Cylindrocladium* s'est avérée au départ délicate, mais a rapidement été fiabilisée dans un cadre de travail bien standardisé.

Après la phase d'amplification PCR, nous n'avons observé aucune hétérogénéité de longueur des fragments IGS amplifiés chez *Cylindrocladium*. Un polymorphisme de site qui a l'avantage de déterminer des profils de restriction différant d'une espèce à l'autre a par contre été détecté. Au sein d'une même espèce, ces profils sont soit uniques, soit pluriels mais toujours proches et similaires. Ce résultat fait de la méthode PCR-RFLP appliquée à l'IGS un

solide outil de diagnostic moléculaire des espèces chez *Cylindrocladium*, outil qui nous a permis de réexaminer l'organisation des principaux taxa sein de ce genre, et de lever ainsi des incertitudes taxinomiques chez des isolats tests, avant d'établir de façon désormais bien argumentée le statut génétique des morphotypes identifiés en bananeraies ou sur héliconias.

En 1997, sur la base de marqueurs RAPD et de l'étude de polymorphisme A+T, Victor *et al.* avaient distingué deux groupes génétiques au sein du taxon *Cy. floridanum*. Ceci justifie la dénomination de complexe utilisée pour ce taxon, plutôt que celle d'espèce. Le premier des deux groupes était constitué d'isolats homothalliques tels ATCC 18834 et ATCC 18882 (*Cy. floridanum* groupe I), tandis que le second rassemblait des isolats sans stade téléomorphe connu tels l'isolat ATCC 22677 (*Cy. floridanum* groupe II). Le dendrogramme que nous avons construit à partir des données de PCR-RFLP sur l'IGS permet non seulement de confirmer que le taxon *Cy. floridanum* présente une certaine hétérogénéité génétique, mais il met également en évidence que ce « complexe » est encore plus variable que l'on ne le pensait. On retrouve en effet non seulement les groupes I et II *sensu* Victor *et al.* (1997), mais également deux autres groupes qui peuvent être nommés III et IV et qui sont respectivement représentés par les isolats IMI 354528, CBS 170.77 et CBS 473.76 d'une part, et par Cam13 l'unique isolat MT4 d'autre part. L'utilisation du diagnostic PCR de la région IGS a d'emblée permis de corriger le statut taxinomique de ATCC 354528 initialement donné par Crous et Wingfield en 1994 comme un représentant de l'espèce *Cy. spathiphylli*, pour le placer dans un sous-groupe distinct au sein de ce complexe *Cy. floridanum*. L'analyse du polymorphisme ITS suggérait déjà ceci, du fait même que cet isolat possède l'insertion de 7 nucléotides présente chez les isolats de ce complexe.

Le statut différencié de IMI 354528 au sein du complexe *Cy. floridanum* a été confirmé il y a seulement quelques mois par les très récents résultats de Kang, Crous et Schoch (2001). Sur la base de l'un des deux arbres les plus parcimonieux obtenus à partir des séquences de l'ITS, de la β -tubuline et de l'histone, ces auteurs ont appliqué le concept de l'espèce phylogénétique (PSC) au complexe *Cy. floridanum*, et y ont érigé une nouvelle espèce *Cy. pacificum* sp. nov. qui rassemble IMI 354528 et les isolats partageant le même polymorphisme de séquences. Ils ont de même assimilé les isolats *Cy. floridanum* groupe II (dont fait partie ATCC 22677) à des représentants d'une autre nouvelle espèce qu'ils ont dénommée *Cy. canadense* sp. nov. Au sein du dendrogramme élaboré à partir des données IGS, le représentant IMI 473.76 de l'espèce *Cy. parasiticum* se retrouve fortement agrégé aux groupes III (*Cy. pacificum*) et II (*Cy. canadense*). Un tel apparentement de l'espèce *Cy. parasiticum* avec les groupes *Cy. floridanum* II et III se retrouve dans la très récente publication de Schoch *et al.* (2001), où le marqueur utilisé est le gène de la β -tubuline. Cela

suggère qu'il faille réexaminer le statut de cette espèce sur la base d'un plus grand nombre d'isolats et d'une approche multilocus intégrant notamment les diagnostics PCR ITS et IGS.

Au sein du complexe *Cy. floridanum*, nous avons également trouvé un groupe IV représenté par l'unique représentant du morphotype MT4 issu de bananeraie. Ce morphotype possède incontestablement un statut génétique distinct de *Cy. floridanum* stricto sensu (groupe I *sensu* Victor) et des nouvelles espèces *Cy. pacificum* et *Cy. canadense*. Ce morphotype dont nous n'avons pu obtenir le stade téléomorphe *in-vitro*, et pour lequel grâce au diagnostic PCR de l'IGS nous possédons désormais une signature moléculaire fiable (groupe IV), pourrait également représenter une espèce moléculaire à part entière, probablement plus proche de *Cy. floridanum* stricto sensu (ou groupe I) que des espèces *Cy. canadense* et *Cy. pacificum* (respectivement groupes II et III au sein du complexe), ainsi que le suggèrent les dendrogrammes que nous avons élaborés à partir du polymorphisme de séquences des régions ITS et IGS.

A l'issue de la typologie effectuée du chapitre 2, nous avons souligné la similitude phénotypique des isolats MT3 avec les 4 espèces hétérothalliques du complexe *candelabrum*-like, mais aussi avec l'espèce proche *Cy. scoparium*. L'application de la méthode PCR-RFLP de l'IGS aux isolats de ce morphotype MT3 permet d'écarter l'hypothèse de l'appartenance de ces isolats à l'espèce *Cy. candelabrum*, et de diagnostiquer qu'ils se regroupent de façon nette avec les représentants de l'espèce *Cy. scoparium*. Le polymorphisme de séquence ITS suggérait déjà que ces isolats MT3 ne puissent appartenir aux espèces *Cy. mexicanum*, *Cy. candelabrum* ou *Cy. pauciramosum*, mais ne permettait pas dans le même temps leur distinction des deux espèces *Cy. scoparium* et *Cy. insulare*, elles mêmes étant non discernables avec ce marqueur. Dans notre étude du polymorphisme CAPS de l'IGS, nous n'avons pu caractériser par CAPS-IGS de représentants de l'espèce *Cy. insulare*, aucun spécimen de cette espèce n'ayant pu être examiné. Quoiqu'il en soit, il est nécessaire que ce diagnostic soit réalisé ultérieurement, car dans leur récente étude Schoch *et al.* (2001) placent les 2 espèces *Cy. scoparium* et *Cy. insulare* dans un clade où elles ne présentent que 1% de divergence nucléotidique, en indiquant de surcroît qu'elles sont sexuellement compatibles. Cela traduit bien la nécessité qu'il y a les réexaminer avec de nouveaux marqueurs comme les CAPS-IGS.

Parmi les isolats MT3, l'isolat Gua13 a présenté des profils CAPS-IGS identiques à ceux des isolats CBS 192.49 et CBS 230.51 de l'espèce *Cy. scoparium*. Son morphotype similaire à celui de *Cy. scoparium* et sa caractérisation moléculaire non équivoque nous incite à penser qu'il appartient bien à cette espèce. C'est la première fois que l'espèce *Cy. scoparium* est détectée sur bananier, et signalée dans la caraïbe. Les autres isolats MT3

étendent probablement sa distribution géographique à l'Afrique, mais cela reste à confirmer ainsi que nous l'avons évoqué ci-dessus.

Le morphotype MT2 est le seul des 5 morphotypes identifiés en bananeraies auquel on puisse appliquer de façon concordante les concepts d'espèce morphologique, d'espèce biologique et d'espèce moléculaire. Le diagnostic PCR par l'IGS permet en effet de confirmer qu'il appartient incontestablement à l'espèce *Cy. spathiphylli*. Déjà décrite sur *Spathiphyllum* et héliconias (voir chapitre 1), cette espèce n'avait cependant jamais été signalée auparavant sur bananier. Notre étude confirme que sa zone de distribution géographique s'étend à l'Afrique ainsi que l'ont récemment reporté Schoch et Crous (1999), mais indique également qu'elle est présente aussi bien dans la Caraïbe qu'en Amérique centrale (Costa-Rica). Le diagnostic par PCR-RFLP de l'IGS permet également de détecter de façon très nette et pour la première fois chez *Cy. spathiphylli* l'existence d'une diversité génétique intraspécifique séparant les isolats provenant d'héliconias ou de *Spathiphyllum*, de ceux isolés de bananier ou de théier. Il faut noter que cette structuration était également suggérée par le locus ITS.

Le diagnostic PCR de l'IGS permet également de résoudre le complexe *gracile*-like, l'espèce *Cy. graciloideum* mise à part, car n'ayant pas été testée. Il discrimine en effet parfaitement les espèces *Cy. pteridis*, *Cy. pseudogracile* et *Cy. gracile*. Dans le même temps, il indique que le représentant du morphotype MT5 appartient très clairement à cette espèce *Cy. gracile*, puisqu'il est génétiquement identique (pour ce locus marqueur) à l'isolat type de cette espèce tout en présentant dans le même temps un morphotype similaire. Les isolats MT1 ont quant à eux des profils CAPS-IGS toujours très proches de ceux des représentants de référence de cette espèce quoiqu'en divergeant légèrement. La prise en compte d'une part de certaines de leurs caractéristiques phénotypiques qui sont atypiques pour l'espèce *Cy. gracile* (taille des conidies par exemple, chapitre 2) et d'autre part de cette petite différence IGS suggère qu'ils constituent un biotype particulier (uniquement caribéen ?) de l'espèce *Cy. gracile*, voire même peut-être une espèce proche. La validation de cette dernière hypothèse nécessite un réexamen de leur diversité génétique et de celle de l'espèce *Cy. gracile* à l'aide d'un second marqueur moléculaire neutre, réexamen que nous aurons l'occasion d'effectuer au chapitre 4.

. Les applications possibles du diagnostic PCR des espèces de *Cylindrocladium* par les espaceurs de l'ADNr

La séquence consensus que nous avons identifiée dans la région ITS ouvre la

perspective de la définition d'amorces oligonucléotidiques « genre spécifique » des champignons du genre *Cylindrocladium*. La famille des Nectriacées étant la plus importante des Hypocréales (Schoch, 2001), et son importance risquant de s'accroître avec la description de nouveaux genres, une telle paire d'amorces peut être utile sur le plan taxinomique. Elle peut en particulier aider à situer le genre *Cylindrocladium* vis à vis de champignons très proches sur le plan morphologique (type *Cylindrocladium*-like).

L'espaceur IGS constitue un bon marqueur moléculaire de la diversité des espèces et est aussi dans une certaine mesure, utile pour révéler de la diversité infraspécifique chez le genre *Cylindrocladium*. Son utilisation par PCR-RFLP se révèle aussi discriminante au niveau spécifique que les très récentes méthodes basées sur l'analyse de séquences de locus tels que le gène de la β -tubuline ou le gène de l'histone (Kang, Crous et Schoch, 2001 ; Schoch et al., 2001). Mais elle présente dans le même temps le double avantage d'éviter le recours systématique au séquençage qui ne saurait être pratiqué comme méthode d'identification de routine, et celui d'être plus rapide. En effet, utilisée en complément de la méthode d'extraction rapide de l'ADN proposée par Goodwin et Lee (1993), cette technique de diagnostic moléculaire permet en moins de 36 h d'obtenir les profils de restriction de n'importe quel isolat de *Cylindrocladium*. Ces profils peuvent alors rapidement être comparés à ceux d'espèces connues, et être stockés sous forme de fichiers informatiques. Simple à mettre en œuvre, cette méthode de diagnostic moléculaire peut facilement en l'état être transférée dans les zones de production bananières. Ce transfert pourrait même être effectué pour n'importe quelle autre production végétale affectée par une cylindrocladiose.

Une première analyse de la séquence IGS chez deux isolats représentant les espèces *Cy. gracile* et *Cy. spathiphylli* indique clairement l'existence de domaines variables et de domaines conservés, ainsi que cela a déjà été signalé chez les végétaux et chez d'autres eucaryotes supérieurs. En plus du polymorphisme de substitution et d'événements de type insertions-délétions, on trouve en particulier chez les 2 isolats de *Cylindrocladium* séquencés un motif répété 14 bp qui a déjà été signalé chez d'autres champignons filamenteux comme *Magnaporthe grisea* (Sone et al., 2000) ou chez *Fusarium oxysporum* (Avelange, 1994). Nous avons également mis en évidence l'existence d'un autre motif plus long (68bp) répété deux fois, ainsi que celle de séquences répétées en tandem. La fonction de telles séquences reste pour l'heure à préciser. Néanmoins, dans un tel contexte d'alternance de zones conservées et variables, et compte-tenu des résultats apportés par la PCR-RFLP sur l'IGS des champignons *Cylindrocladium*, l'étude du polymorphisme de séquences de la région IGS chez le genre *Cylindrocladium* mérite d'être poursuivie et approfondie de manière à déterminer dans quelles mesures certains motifs pourraient ultérieurement servir au

développement d'amorces nucléotidiques « espèces spécifiques » utilisables pour la mise au point de tests de détection sensibles et spécifiques, réalisés soit *in-planta*, ou à partir d'échantillons de sol.

En conclusion, suite au développement d'un outil de diagnostic moléculaire fiable et rapide des espèces de *Cylindrocladium* basé sur l'amplification PCR puis la digestion enzymatique de l'espaceur intergénique de l'ADNr, cette étude a pour la première fois permis de démontrer qu'au moins 4 espèces moléculaires de *Cylindrocladium* sont présentes quelquefois localement en mélange dans la rhizosphère du bananier. Il importe maintenant d'évaluer le statut pathogène de chacune des espèces de ce complexe et de déterminer celles qui sont à l'origine de nécroses racinaires chez le bananier. Nous avons couplé cette approche à une étude du polymorphisme génétique intra spécifique chez celles qui se sont avérées pathogènes chez le bananier. Ces travaux font l'objet du chapitre 4.

Etude du pouvoir pathogène des espèces de
Cylindrocladium inventoriées en bananeraies
et de leur variabilité génétique intraspécifique

1. Introduction

Nous avons vu au cours des chapitres précédents que différentes espèces de *Cylindrocladium* sont présentes dans la rhizosphère du bananier, quelquefois en complexe. Nous n'avons jusqu'ici pas encore déterminé lesquelles d'entre elles étaient pathogènes chez le bananier, ni si elles révélaient toutes le même degré de pathogénie. Dans le même ordre d'idées, il était également important d'évaluer si des génotypes distincts liés par exemple à l'origine géographique ou encore au niveau de pathogénie pouvaient être identifiés au sein des taxa pathogènes chez le bananier.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce chapitre 4 ont par conséquent un objectif double :

i/ Evaluer le pouvoir pathogène sur bananier des différentes espèces de *Cylindrocladium* trouvées dans sa rhizosphère. Pour cela, nous avons été amenés à développer une méthodologie qui soit reproductible et permette une appréciation semi quantitative de l'importance des lésions nécrotiques racinaires. Elle associe :

- du matériel végétal issu de vitroculture qui est comparable par ses origines, sa durée de sevrage et par la variété utilisée à celui qui est utilisé en plein champ par les producteurs de bananes. Il est utilisé dans le cadre d'un dispositif en pots placés en chambre de culture où les conditions de température et d'hygrométrie sont contrôlées.

- un substrat dépourvu de minéraux argileux et choisi donc inerte de manière à s'affranchir des effets « sol » sur l'interaction bananier / *Cylindrocladium*. Nous avons en effet vu au cours de notre revue bibliographique du chapitre 1 que cette interaction était sous la dépendance du type de sol.

- un inoculum fongique calibré et directement mis en contact avec le système racinaire de manière à encore favoriser l'interaction immédiate entre la plante et le champignon.

- Une mesure pondérée et quantifiée de la sévérité des lésions nécrotiques racinaires.

ii/ Réaliser chez les espèces identifiées comme pathogènes chez le bananier une première évaluation la diversité intraspécifique à l'aide de marqueurs moléculaires, principalement des marqueurs RAPD. Il s'agissait aussi de vérifier s'il était possible de mettre en évidence une relation entre un génotype donné et son origine géographique, son hôte d'origine (cas des MT2) ou son pouvoir pathogène sur bananier. Le recours à un type de marqueurs très différent des espaceurs de l'ADNr (RAPD) a dans le même temps permis de valider et d'affiner les structurations taxinomiques effectuées avec ces derniers.

Ces différents travaux sont présentés sous forme d'une publication soumise à la revue *European Journal of Plant Pathology* (*Article n°2 soumis à publication*).

2. Article n°2 soumis à publication (à EJPP)

Short title: Variation in banana-infecting *Cylindrocladium*

Pathogenic and genetic diversity of soilborne isolates of *Cylindrocladium* from banana cropping systems

Jean-Michel Risède*

Laboratoire de Pathologie végétale, Station de Neufchâteau, CIRAD-FLHOR, 97130
Capesterre Belle-eau, Guadeloupe (F.W.I)

Philippe Simoneau

UMR de Pathologie Végétale, Faculté des Sciences, Université d'Angers, 2 Bd Lavoisier, F-
49045 Angers, France

* Corresponding author: Email: risede@cirad.fr

Abstract:

Pathogenicity together with genetic variation were investigated within a collection of one hundred and four banana-infecting isolates of *Cylindrocladium* Morgan (teleomorph *Calonectria* de Not, Ascomycetes) issued from diverse countries and representing previously described morphological taxa or species. These fungi have been reported for many years, with endoparasitic nematodes, as being major causal agents of root necrotic lesions that favour root breakage and toppling of banana plants. Notwithstanding this fact neither the individual pathogenic effects of implicated taxa nor their genetic diversity were still circumscribed. In the present study, among the 5 morphological different taxa (MT1 to MT5) found in the banana rhizosphere, only isolates showing atypical morphology of *Cy. gracile* (MT1) and *Cy. spathiphylli* isolates (MT2) revealed pathogenicity on banana cv Grande Naine. When comparing the latter isolates with others from the same species but coming from different hosts, analysis of rDNA spacers polymorphism grouped these isolates of *Cy. spathiphylli* according to hosts with a partition banana – tea vs *Heliconia* – *Spathiphyllum*. Furthermore,

isolates from *Heliconia* were found non pathogenic on banana. Pathogenicity assessment of representative isolates from these two taxa on a range of six banana genotypes yielded no evidence for interactions between isolates and genotypes, but significant differences of susceptibility between genotypes that could be exploited by breeders. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis revealed a genetic similarity varying from 70 to 100% was detected within *Cy. spathiphylli* isolates from bananas irrespective to their geographical or host origins. In the same time *Cy. gracile*-like isolates (MT1) were shown to share a high degree of genetic conservation but only 60% similarity with *Cy. gracile*, a species with which they were previously shown to be closely related. Taking into account their morphology, pathogenicity and genetic characteristics they were thus considered as a separate undescribed species for which the proposed name is *Cy. macrogracile* sp. nov. These results provide ungiven highlights on the diversity of *Cylindrocladium* fungi pathogenic to bananas.

Key Words: *Calonectria*, RAPD, CAPS, rDNA, aggressiveness, *Heliconia*

INTRODUCTION

Banana is an herbaceous monocotyledon (genus *Musa*, family Musaceae) with edible varieties being diploid (AA, AB) or triploid (AAA, AAB or ABB) (Jenny *et al* 1999). Through cooking varieties, banana represents a major food crop that strongly contribute to subsistence of many populations from tropical and subtropical developing countries. Dessert varieties among which the well known variety Grande Naine (AAA, subgroup Cavendish) are also widely used and produce fruits which are among the most exchanged on international markets.

Banana is frequently grown as a monocrop and consequently suffer from many recurrent pests and diseases (Jones 1999). Toppling disease is in particular one of the main factor that decreases yields in banana farms (Price 1995). The disease initiates by brownish to blackish root necrotic lesions that affect the underground stem (also called rhizome or corm) and mainly the root system, the latter being constituted by primary fleshy roots arisen from the corm that further divide in secondary, tertiary or smaller feeding roots (Lassoudière 1978). Caused by a pathogenic complex comprising endoparasitic nematodes along with soilborne root rot fungi, these necrotic lesions lead to root breakage and toppling of banana plants, thus

inducing direct losses of bunches (Loridat 1989 ; Gowen 1995 ; Price 1995). They also decrease nutrients uptake. Root rot fungi within this biotic complex differ in pathogenic status. Most of them are considered as secondary invaders of the lesions and are not able to enter the roots alone, thus not being true primary pathogens. Conversely, fungi of the genus *Cylindrocladium* Morgan were clearly shown to actively participate to the necrotic process that later induce toppling disease and yield decrease (Semer 1987 ; Loridat 1989 ; Risède, 1994). This genus is known to have many species affecting plants from many botanical families throughout the world (Peerally 1991 ; Crous and Wingfield 1994). Some of them have teleomorphes that always belong to the filamentous euascomycete genus *Calonectria* de Not (Nectriaceae, Hypocreales) (Rossman 1979, 1983).

Cylindrocladium fungi have been reported as banana root rotting agents in Central America (Semer et al 1987), in the Caribbean region (Loridat, 1989 ; Risède, 1994), and in Africa (Kobenan 1991 ; Castaing *et al* 1996). However the implicated species were underknown until recently and this slowed development of adequate diagnostic tools and control strategies. Using morphology, sequences analysis of the amplified ITS region and CAPS polymorphism of the amplified IGS region of rDNA, Risède and Simoneau (2001) recently found that two major *Cylindrocladium* taxa initially called MT1 and MT2 were associated with necrotic lesions in bananas. MT1 taxon grouped *Cy. gracile*-like isolates showing atypical morphology of *Cy. gracile* (large cylindrical monoseptate conidia and clavate vesicle) but close phenetic clustering with typical reference isolates of *Cy. gracile*. MT2 isolates were shown to belong to the species *Cy. spathiphylli*. Three other taxa (MT3 to MT5) that were minor in frequency, and obviously represented distinct morphological taxa from MT1 and MT2 were also found (unpublished results). Based on the same morphological and molecular typing methods, MT3 and MT4 isolates were respectively considered as members of the *C. scoparium* and *C. floridanum* species complexes, while the single MT5 isolate was recognized as a typical member of the species *C. gracile*. None of these taxa were ever reported on bananas.

The relative incidence in the disease of each *Cylindrocladium* taxon of this complex occurring in the banana rhizosphere is until now unknown. Similarly there is no available study aimed at evaluating the genetic variation within their populations.

As a consequence, two main objectives were assigned to the present study. Firstly, the relative pathogenic contribution of each species or species-like taxa (MT1 to MT5) associated

with *Cylindrocladium* root rot lesions of bananas was determined. To reach this goal we developed a reproducible procedure for pathogenicity evaluation of *Cylindrocladium* isolates on banana plants. Secondly, we assessed genetic variation within *Cylindrocladium* taxa shown to be pathogen on bananas. Using RAPD markers and CAPS IGS profiles we evaluated intraspecific diversity in these taxa and investigated whether a relation could be detected between fungal genotypes, and their origin and pathogenicity.

MATERIALS AND METHODS

* Fungal Isolates--

A collection of one hundred and four field isolates from banana cropping systems was established by root rot or soil direct isolations according to previously described procedures (Risède, 1994 ; Risède, 1995). Most of them belonged to MT1 and MT2 taxa, while the other showed MT3, MT4, and MT5 morphology. Code number and geographic origin of these *Ban* isolates are given in TABLE I. Following single spore transfer, all isolates were stored by cryopreservation at -80 C of pre-colonized banana leaf fragments in glycerol 10%. Six additional field isolates were also recovered in Guadeloupe from root lesions of *Heliconia caribaea*, a floral species whose botanical family (*Heliconiaceae*) is a sister family to the bananas one (*Musaceae*) within the Zingiberale order. These *Hel* isolates exhibited similar morphology than *Cy. spathiphylli* isolates from bananas and were further examined and compared to those ones. A small collection of reference isolates of *Cylindrocladium* species was also used. Their code collection, host and origin are listed in TABLE II.

* Pathogenicity assays on banana plants--

A two step procedure was followed : i/Whole potted plants of the banana variety Grande Naine were used to assess intraspecific and interspecific variability in general aggressiveness within a subset of forty nine *Ban* and *Hel* isolates from the diverse geographic origins. This dessert variety was chosen because it is widely grown in all producing banana regions and cause of the fact that almost all our *Ban* isolates were found on it. ii/ Reactions of six different banana genotypes were also evaluated towards two *Ban* isolates shown to be aggressive in step one. These varieties are : IDN 110 (AA), Pisang Madu (AA), IRFA 914 (AAB), Kunnan (AB), PKW (BB), and Grande Naine (AAA).

Plant material preparation

Micropropagated bananas plants were weaned during 4 weeks on peat moss in small pots (4 cm * 4 cm * 4 cm) under greenhouse benches (23-28 C ; 80-90% RH ; daily drip fertilization). They were left to grow 4 weeks more in 0.6 liter pots on the same substrate, still under greenhouse conditions.

Inoculum production and inoculation procedure

Intense conidiogenesis was obtained by growing cultures on Banana Leaf Agar (BLA) (Risède and Simoneau, 2001) under continuous fluorescent cool white and near-ultraviolet lights, at 25 C during 7 days. Cultures were then flooded with sterile water amended with Triton X 100 surfactant (250 µl/l), and then gently shaken. Resulting conidial suspension was filtered through a 32 µm sieve, and the filtrate was softly concentrated by centrifugation at 2000 rpm during 2 min. Conidial concentration was further adjusted to $2 \cdot 10^3$ conidia / ml using a Malassez haemocytometer. Just before inoculation, peat were gently removed from the root system of 8 weeks old banana plants, under tap water. Plants were then dipped during 20 s in 250 ml of the prepared conidial suspensions. They were left to drain one minute before immediate transplantation in 2 liter pots filled with a mixture of quartzic sand and perlite (1 v : 1 v). Eighteen plants were inoculated for each of the 49 tested isolates. They were then maintained in a growth chamber during all the experiment (daytime temperature : 26 C ; nighttime temperature : 22 C ; 80-90% RH ; daily photoperiod : 12 h) according to a total randomized disposal.

Disease assessment

Root lesions severity was assessed four, eight and twelve days after inoculation on six plants / date / isolate. After gentle removing of potting mixture from the root system under tap water, each primary root and its lateral daughters (further considered as a "bundle") was then detached from the corm. Each of these root bundles was visually rated using the following 0-5 scale : 0 : no lesions ; 1 : 1 – 20 % of root area is necrotic ; 2 : 21 - 40 % ; 3 : 41 – 60 % ; 4 : 61 – 80 % ; 5 : > 80 %. A Root Necrotic Potential (RNP) was then defined for each isolate on each plant, at each date. RNP is a global measure of isolate aggressiveness and is quantified as given by the following formula :

$$\text{RNP} = \frac{[0.105 * \text{Number of bundles rated "1"}] + [0.305 * \text{Nber of bdl. rated "2"}] + \dots + [0.905 * \text{Nber of bdl. rated "5"}]}{\text{Total number of bundles}}$$

where 0.105, 0.305, 0.505, 0.705 and 0.905 are the central value of the five classes of root necrotic area. At each date, mean value of RNP was calculated for each isolate from the six replicates. Evolution of this mean RNP was monitored 4, 8 and 12 days after inoculation. RNP data were submitted to variance analysis using the SAS GLM procedures (SAS Institute, Cary, NC). The residuals of the data met the assumption of normality with the (RNP)^{1/2} transformation. Tukey's studentized Range Test was used for comparisons and groupings among isolates.

*** Sexual compatibility between *Cy. spathiphylli* isolates from bananas and *Cy. spathiphylli*-like isolates from *Heliconias*--**

To test a possible conspecificity of *Cy. spathiphylli* isolates issued from bananas and *Cy. spathiphylli*-like isolates from *Heliconias*, sexual compatibility was checked between isolates Hel2A, Hel2B on one hand, and 84B1, 91C2 and the two reference isolates of *Cy. spathiphylli* ATCC44730 and IMI167983 on the other hand. Pairwise cultures of isolates were grown on BLA medium (Banana Leaf Agar Medium, Risède and Simoneau 2001) and incubated at 25 C for 4-5 wk under continuous fluorescent cool white and near-ultraviolet lights. Five replicates were done for each pairing cultures. Cultures were examined weekly under a binocular stereo microscope for perithecial development. Perithecia were considered fertile when yielding ascospores that were able to germinate and grow on 1% malt extract agar medium.



*** Genetic characterization--**

Isolation of genomic DNA

For each isolate, Petri dishes of malt extract agar (2%) overlaid with a sterile cellophane membrane sheet were inoculated with a mycelial suspension. Forty eight to sixty hours later, mycelia were scraped off the membrane on a two cm² area, and stored at -80 C. Genomic DNA was extracted using the microwave miniprep method of Goodwin and Lee

(1993). The final DNA pellet was resuspended in 100 µL of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8) and stored at -20 C until use.

rDNA spacers polymorphism between *Cy. spathiphylli* isolates from bananas and *Cy. spathiphylli*-like isolates from *Heliconias*

As a first evaluation of genetic diversity among *Cy. spathiphylli* isolates issued from bananas and those possibly related originating from *Heliconias* (*Hel*), rDNA spacers polymorphism was investigated. The whole transcribed ITS region of three randomly chose *Hel* isolates was amplified using universal primers ITS1 and ITS4 (White *et al* 1990). Their ITS PCR products were then directly sequenced with an automatic sequencer (373XL Applied BioSystems) by Genome Express (Grenoble, France). Sequencing was performed on both DNA strands with the same ITS primers that in the amplification step. Using the multiple-alignment program CLUSTAL W (Thompson *et al* 1994), nucleotide sequences of *Hel* isolates were then aligned and compared with the previous published sequences of *Cy. spathiphylli* reference isolates as well as with those of three of our *Ban Cy. spathiphylli* isolates (Dom4, Cor4 and Cam1) issued from bananas. CAPS polymorphism was also investigated after PCR amplification of the intergenic spacer (IGS region) using CNL12 and NS21 primers (Duchesne and Anderson 1990) as previously described (Risède and Simoneau 2001).

RAPD Techniques

Eighteen and twenty four decamer primers randomly chosen among Operon Kits E, BH, H and S (Operon Technologies Inc., Alameda, CA., U.S.A.) were respectively tested on genomic DNA from sixteen geographically diverse *Ban* and *Hel* isolates from MT1 and MT2 taxa. After further testing for optimization of reaction conditions, six primers showing exploitable and reproducible banding patterns were retained : OPE-02 : 5'-GGTGCGGGAA-3' ; OPE-03 : 5'-CCAGATGCAC-3' ; OPE-04 : 5'-GTGACATGCC-3' ; OPBH-03 : 5'-GGAGCAGCAA-3' ; OPBH-04 : 5'-ACCTGCCAAC-3' ; OPBH-06 : 5'-TCGTGGCACA-3'. The first five ones were used to evaluate genetic diversity among isolates showing clavate vesicles i.e. MT1, MT5 and reference isolates. The last five primers were used to prospect polymorphism among *Ban* and *Hel* isolates showing MT2 morphology along with *Cy. spathiphylli* reference strains, all showing spherical vesicles. Each PCR amplification was

performed with a M. J. RESEARCH PTC 100 thermal cycler in a total volume of 50 μ l containing 1 unit of Eurobio *Taq* DNA Polymerase in appropriate PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each nucleotide, 2 μ M of a single primer, and 25 ng of genomic DNA. Thermal cycling parameters were set at 92 C for 30 s (denaturation), 37 C for 30 s (annealing) and 72 C for 1 min (extension). After 40 cycles, PCR products were resolved by electrophoresis using 1.5 % agarose gels in TBE Buffer (90 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA pH 8.0. A 100 bp Ladder (MBI Fermentas Ltd) was used as DNA size marker. Each isolate was characterized by the combination of fingerprints patterns obtained with the five primers. Without taking its intensity into account, presence (1) or absence (0) of a band was scored as two alleles at a single locus. Dissimilarity binary matrices were thus constructed to estimate the genetic distance between pairs of isolates according to Sokal and Michener coefficient (1958). They allowed to carry out cluster analyses using the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) and the Phylogeny Inference package (PHYLIP ver 3.55c, Felsenstein 1995). Dendrograms were drawn using the computer software program NJPLOT (Perrière et Gouy 1996).

RESULTS

*Pathogenicity characteristics of *Cylindrocladium field isolates**

Inoculation of banana plants cv Grande Naine with 49 *Ban* or *Hel Cylindrocladium* isolates yielded in most of cases root necrotic lesions obviously differing in intensity according to isolates. When present symptoms were found to be similar to those previously described by Loridat (1989). Type of symptoms did not vary among isolates. Necrotic lesions generally started as individual flecks of 1-5 mm long that enlarged in length, width and in depth thus giving well defined oblong lesions able to coalesce and to rot large portions of roots. They affected fine lateral roots, as well as all other root types like secondary or primary roots (Figure 1a). For some isolates necrotic lesions were already important as soon as four days after inoculation. General aggressiveness of each isolate could be evaluated by the Root Necrotic Potential (RNP) based on a weighted measure of root lesions severity. ANOVA on RNP after root square transformation to normalize variance allowed to detect significant differences among isolates (TABLE III). Mean RNP comparisons with Tukey test revealed a continuous variation with many overlapping groups. Nevertheless as a general trend

concomitant to RNP evolution dynamics in time, two main categories of isolates could be observed (Figure 2a-c).

The first one only included isolates for which isolation frequency from inoculated plants were superior to 80% (data not shown) and that were clearly revealed pathogenic on banana. Indeed for these isolates RNP consistently raised up with time. This first category of isolates encompassed all *Cy. spathiphylli* isolates issued from banana and all *Cy. gracile*-like isolates showing MT1 morphology. *Ban Cy. spathiphylli* isolates were found to be highly aggressive whereas MT1 isolates generally showed medium aggressiveness.

The second category of isolates grouped the single MT5 isolate showing typical morphology of *Cy. gracile*, along with MT3, MT4 isolates and *Hel* isolates. All these isolates were re-isolated from inoculated plant with frequencies inferior to 30%. They were weakly to almost non aggressive on banana cv Grande Naine and could be characterized by mean RNP inferior to 0.1 that remained very low even 12 days after inoculation (Figure 2).

Two isolates of the "aggressive category" were further studied by inoculation to 6 different banana genotypes. Gua9 and Gua5 that respectively belonged to MT1 group and to *Cy. spathiphylli* species were chosen for their significantly different levels of aggressiveness on cv. Grande Naine. All genotypes expressed symptoms towards both of them at 4 days after inoculation, but with different levels of lesions severity (Figure 3). Root damage further grew up 8 or 12 days after inoculation with different extent. Indeed at these two dates, ANOVA performed on lesions severity expressed as RNP revealed significant effect of isolate and of genotype (TABLE IV). No interaction isolate * genotype could be detected 8 days after inoculation. Isolates were ranked by banana genotypes in the same manner, Gua5 being always more aggressive than Gua9. In the same time, genotypes were ranked by the two isolates in a identical way. Tukey studentized range test applied on mean RNP indicated that 8 days after inoculation, IDN 110 (AA) was significantly the most susceptible banana genotype (TABLE V). It was immediately followed by IRFA 914 (AAB) and Kunnan (AAB) that also revealed high susceptibility. Grande Naine differed from this second group exhibiting a mean susceptibility. At the opposite, both PKW (BB) and P. Madu (AA) were shown to be significantly less susceptible than any of the four other banana genotypes. With RNP inferior to 0.2, P. Madu was at 8 days the genotype showing the lowest susceptibility towards isolates Gua9 and Gua5. Twelve days after inoculation although a significant interaction isolate * genotype was detected, its contribution to total variation was much lower than that of isolates or even that of

genotypes (TABLE IV). At this date mean square for isolates effect was much higher than that for genotypes, therefore illustrating primacy of variation between the two considered fungal isolates (figure 1 b-c).

Sexual compatibility between banana Cy. spathiphylli isolates and Cy. spathiphylli-like isolates from Heliconias

Ban *Cy. spathiphylli* isolates Dom4 and Cor4 were able to successfully mate with the two *Hel Cy. spathiphylli*-like isolates, Hel2A and Hel2B. These ones also mated with the *Cy. spathiphylli* ex-type strain ATCC44730. Fertile perithecia of the *Calonectria* teleomorph were also obtained from crosses between banana *Cy. spathiphylli* isolates and the other reference strain IMI167983, thus confirming previous results (Risède and Simoneau 2001). These findings illustrated the conspecificity of *Hel* isolates with the species *Cy. spathiphylli*.

rDNA spacers polymorphism between *Cy. spathiphylli* isolates from bananas and *Hel* isolates

Following PCR amplifications, ITS sequences were determined for Hel7A1, Hel8A1 and Hel2B and deposited in GenBank. Using CLUSTALW they were aligned and compared with the previously published sequences of the *Cy. spathiphylli* field isolates Cam1, Cor4 and Dom4 issued from banana (Risède and Simoneau, 2001), but also with the ITS sequences of 3 *Cy. spathiphylli* isolates issued from *Spathiphyllum* (Schoch and Crous 1999), and those of 2 *Cy. spathiphylli* reference isolates, one from *Spathiphyllum* (the ex-type strain ATCC 44730) and the other from tea (IMI 167983). These eleven sequences differed by only one single nucleotide substitution in position 112 (numbering as in Jeng *et al* 1997) and therefore determined two groups of isolates. One encompassed *Cy. spathiphylli* isolates from *Spathiphyllum* together with *Cy. spathiphylli*-like isolates from *Heliconias*. The other clustered all banana *Cy. spathiphylli* isolates and the unique *Cy. spathiphylli* reference isolate from tea as previously indicated by Risède and Simoneau (2001).

When studying polymorphism in the amplified intergenic spacer of rDNA, all *Cy. spathiphylli* isolates irrespective to their host showed similar *Pst* I, *Rsa* I and *Mva* I profiles. Only *Ava* II revealed intraspecific polymorphism within this species as yet pointed out by Risède and Simoneau (2001). Two types of patterns were found among these isolates (Figure 4). The first one was shared by *Cy. spathiphylli* isolates from *Spathiphyllum* and *Heliconias*, meanwhile the

second one characterized *Cy. spathiphylli* isolates from banana and tea.

Genetic variation within *Cy. gracile*-like and *Cy. spathiphylli* isolates using RAPD markers

Two different RAPD analysis were conducted. The first one concerned 52 *Cy. gracile*-like isolates from banana (MT1). The unique MT5 isolate, 3 *Cy. gracile* reference strains, and 2 *Cy. pteridis* reference isolates were also used in this study that was conducted with the five primers OPE 02 to 04, OPBH03 and BH04. These ones generated 4 to 7 reproducible PCR products from 200 to 1200 bp. When combining the banding patterns from these five primers, 58 fragments could be scored as polymorphic markers. Nevertheless the detected polymorphism was mainly due to a distinct genetic divergence between MT1 isolates on one hand, and the single MT5 isolate along with the *Cy. gracile* reference strains, on the other hand. MT1 isolates indeed exhibited almost uniform banding patterns (Figure 5) irrespective to the different tested primers, thus revealing their very low intra-group polymorphism. No relation could be observed between their genotypes and their geographic origin in the caribbean region, or neither with their level of aggressiveness on bananas. Cluster analysis based on UPGMA further confirmed these two groups as distinct entities (I and II) that both distantly clustered with *Cy. pteridis* a morphologically similar species (Figure 6). Within the group I represented by all isolates showing MT1 morphology, isolates were found to share about 95% similarity. In the second group (II) the MT5 isolate showing typical *Cy. gracile* morphology was found to closely cluster with reference strains of this mitosporic species, thus supporting its conspecificity. MT1 isolates shared only 60 % similarity with the *Cy. gracile* cluster (II). Considering their *Cy. gracile* atypical morphology, their pathogenicity on bananas (*versus* the non pathogenicity of the tested *Cy. gracile* Ban isolate) and above all their distinct genetic status that was pointed out by RAPD markers, we consider these MT1 isolates as members of an undescribed *Cylindrocladium* species for which we propose the name *Cy. macrogracile* sp. nov.

The second RAPD analysis focused on the extent of genetic variation within the species *Cy. spathiphylli* and was therefore conducted with 40 Banana and 5 *Heliconia* field isolates, 2 reference strains from *Spathiphyllum* (ATCC 44730 and CBA 538.87) and another one from tea (IMI 167983). The selected primers OPE 03, 04 and OPBH 03, 04, 06 generated 4 to 7 reproducible PCR products ranging from less than 200 bp to more than 1031 bp. Divergence

among RAPD profiles was low and mainly originated from *Hel* isolates and some *Ban* isolates from Costa-Rica (Figure 7). When subjected to UPGMA analysis, total data set allowed to generate a dendrogram where *Ban* and *Hel* *Cy. spathiphylli* isolates fell into one major cluster, two minor ones and one unique isolate Cor4 (Figure 8). Cluster I grouped about 90% of the studied isolates. It encompassed all *Ban* isolates from Cameroon and Caribbean region, some from Costa-Rica, and the unique maurician reference isolate IMI 169983 issued from tea. Although this cluster enclosed many subclusters, genetic similarity was higher than 90% within it. Cluster II showed two subgroups. The first one was composed by 3 *Hel* isolates and the second by the 2 reference strains issued from *Spathiphyllum*. These subgroups exhibited about 86% similarity. Cluster III grouped together the two other *Hel* isolates, and 2 *Ban* isolates from Costa-Rica. Although differing, *Ban* and *Hel* isolates shared about 92% similarity in this cluster. Lastly, *Ban* isolate Cor4 (IV) from Costa-Rica revealed only 70% similarity with all other *Cy. spathiphylli* isolates used in this study.

DISCUSSION

Banana-infecting *Cylindrocladium* isolates were firstly reported about thirteen to fifteen years ago by Semer et al (1987). Since then, other works confirmed their presence and incidence in the pathosystem banana-soil-soilborne pathogens together with the well-known endoparasitic nematodes (Loridat 1989). Their implication in banana cropping systems as a species complex was in particular pointed out by Risède and Simoneau (2001). Despite this, until now no study aimed at evaluating the pathogenic status of the different involved species and surveying their genetic variation was carried out. This is nevertheless a critical step towards designing appropriated diagnostic tools and developing rationalized control strategies based for instance on the deployment of tolerant or resistant banana cultivars. In the current study we resolved the *Cylindrocladium* species complex found on bananas by identifying which of them were the truly pathogens responsible for root necrotic lesions and pointing out the extent of their genetic variation. A reproducible potted test allowed to diagnose in less than two weeks the Root Necrotic Potential of *Cylindrocladium* isolates as a measure of their general aggressiveness. This test had the advantage to use whole plants that are similar in age to those used as planting material, rather than more juvenile plant material whose susceptibility towards fungal infection could be exacerbated. Based on direct contact between plant tissue

and inoculum along with use of an inert standard substrate, the test was also designed to favour rapid infection and true expression of root tissue reactions without interaction with the substrate in which the plants were potted. According to their receptivity to soilborne pathogens, natural soil substrates are known to possibly interfere with disease expression (Bouhot, 1980). Further pathogenic characterization was done for two isolates of different aggressiveness using a range of 6 banana genotypes. In addition we also used RAPD and rDNA spacers polymorphism to investigate genetic variation within the species shown to be truly pathogenic on banana. Indeed these two types of neutral markers are useful to discriminate intraspecific differences within particular *Cylindrocladium* taxa (Risède et Simoneau 2001 ; Victor et al 1997 ; Overmeyer et al 1996).

Among the *Cylindrocladium* complex present in the banana rhizosphere, we found that two small-spored taxa showing MT3 and MT4 morphology and respectively described as *Cy. scoparium* and *Cy. floridanum*-like isolates (unpublished) were weakly aggressive on Grande Naine. Taken into account their low re-isolation frequency after artificial inoculation and very low aggressiveness, these taxa are thought to act in the field as secondary invaders of necrotic lesions caused by other root pathogens like parasitic nematodes.

Cy. gracile-like isolates (MT1) and the MT5 isolate were shown to fall into two related but distinct genetic groups, also differing by aggressiveness. Comparisons between the unique small-spored isolate showing MT5 morphology (Cam14) and reference strains of the species *Cy. gracile* using RAPD markers clearly yielded a high genetic similarity between these isolates, thus confirming conspecificity. In the same time isolate Cam14 was found to be weakly pathogenic on Grande Naine. Conversely, exhibiting medium Root Necrotic Potential that increased with time and high isolation frequency after inoculation, *Cy. gracile*-like isolates with MT1 morphology were found to be one of the main pathogenic taxa fully responsible for the determinism of necrotic lesions on banana root system. RAPD analysis revealed MT1 isolates as a genetically homogeneous group that only shared 60% similarity with typical *Cy. gracile* strains. In the same time genotypes within this group did not correlate with geographic origin in the caribbean region nor with level of aggressiveness. Considering the *Cy. gracile* atypical morphology of MT1 isolates along with their pathogenicity on bananas and also with their distinct genetic status, we considered them as representatives of an undescribed species we called *Cy. macrogracile* sp. nov. This newly described *Cylindrocladium* species is for the moment identified only in the Caribbean region, on bananas. Further work is needed to precise

its geographic distribution and host range.

The last other species involved in the *Cylindrocladium* complex inducing root necrotic lesions in banana is *Cy. spathiphylli*. Using isolates of this species issued either from banana or *Heliconia* we found significant intraspecific differences in aggressiveness on banana cv Grande Naine. Showing high Root Necrotic Potential that rose with time and high isolation frequency after inoculation, *Ban C. spathiphylli* isolates were found to be the most aggressive within the *Cylindrocladium* complex species found in the banana rhizosphere. At the opposite, *Hel Cy. spathiphylli* isolates revealed weak to non aggressiveness on banana. Such a phenotypic discrimination correlated with divergent rDNA spacer polymorphism.

Single nucleotide polymorphism in the ITS 1 region and *Ava* II CAPS polymorphism in the IGS region previously shown to separate *Spathiphyllum C. spathiphylli* isolates from those issued from banana or tea (Risède and Simoneau, 2001) also allowed to locate *Heliconia* isolates, thus determining a genetic distinction according to the host that opposes *Heliconia - Spathiphyllum* vs banana - tea. When further assessing genetic variation within the species *Cy. spathiphylli* by RAPD markers, partition according to the host was less clear. Indeed a large majority of *Ban* strains clustered together along with the tea isolate, and irrespective to their geographical origin. In the same time some *Hel* isolates also grouped with the two considered isolates from *Spathiphyllum*. But 2 *Ban* isolates from Costa-Rica also clustered with 2 other *Hel* isolates, while another *Ban* costarican isolate more distantly clustered with all the other *Cy. spathiphylli* considered here, showing 70% similarity with them. It is striking to observe that only costarican isolates showed noticeable genetic divergence within *Ban* isolates. This remains unexplained for the moment but can probably be considered together with two facts. First, costarican *Cy. spathiphylli* strains sometimes exhibited in culture an unusual microconidial state. This phenotypic character is associated by some authors with long term preservation (Crous and Peerally 1996) but its significance require further investigation. Secondly, Costa-Rica is one of the biggest producer of dessert bananas in the world, while it is also a major grower of tropical flowers, among which *Heliconia*. Banana and *Heliconia* belong to the same botanical order (Zingiberales). Knowing that *Ban* and *Hel Cy. spathiphylli* isolates were proved to successfully mate under laboratory conditions, it would be of value to further screen a larger number of *Cy. spathiphylli* isolates from Costa-Rica, with intensive sampling on the two sister plants. This would allow to evaluate whether favorable environment



could have promoted genetic proximity between the two types of isolates.

Notwithstanding this result it must be highlighted that genetic similarity remains globally high in both the two main pathogenic *Cylindrocladium* taxa infecting banana. RAPD analysis illustrated genetic similarity as high as 95-100 % in MT1 isolates, and 70-100% in *Ban Cy. spathiphylli* isolates. An underlying cause of this situation may be attributed to a possible predominant asexual propagation of *Cylindrocladium* isolates that is favored by the fact that in this genus, the main survival and dissemination structures in soil and in host infected tissue are microsclerotia (Thies et Patton, 1970). In the particular case of bananas, *Calonectria* teleomorphes have indeed never been observed in the field, even on old roots or corms. Bananas being disseminated during decades by corms and suckers (vegetative reproduction) that were probably infected by *Cylindrocladium* fungi, this could also help to disseminate the same genotypes in this fungal genus. Anyhow, preliminary studies on genetic structure of the concerned *Cylindrocladium* populations using adequate sampling and gametic disequilibrium measures would enable to check such an hypothesis.

Lastly using two aggressive isolates, one *Cy. macrogracile* and one from *Cy. spathiphylli*, we also investigate pathogenicity on a range of six different banana genotypes. Differences of RNP between the two types of isolates were once clearly revealed for both the different varieties. In the same time although true differential interactions were not recorded, genotypes did not express the same level of root lesions severity towards these isolates. The popular Grande Naine (AAA) which is widely grown throughout the world exhibited medium root necrotic damage whereas Kunnan (AB), IRFA 914 (AAB) and above all IDN110 (AA) showed high lesions severity. Interestingly, PKW (BB) and P. Madu (AA) were shown to be merely less susceptible. Knowing that diploid varieties are currently used as genitors in banana breeding programs, these two varieties could valuably represent clones of interest for genetic improvement of bananas towards *Cylindrocladium* fungi. This opportunity will advantageously be further evaluated by screening a larger number of *Cylindrocladium* isolates.

In conclusion results from this study contribute to a better knowledge of the different *Cylindrocladium* species occurring on bananas and clarify their relative contribution to the root necrotic lesions with which they are associated. These results also depict extent of the genetic variation within the two main pathogenic species and underline a challenging opportunity for breeders to lower impact of these soilborne pathogens in banana cropping systems.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are greatly indebted to thank Cécile Dubois for substantial help in data analysis (CIRAD, Montpellier, France) and B. Paulo-Rhino for valuable technical assistance (CIRAD, Guadeloupe).

LITERATURE CITED

- Bouhot D 1980. Le potentiel infectieux des sols. Thèse de Doctorat d'état, Université de Nancy, 151 p.
- Castaing V, Beveraggi A, Fouré E, Fogain R. 1996. Detection of a *Cylindrocladium* sp. in Cameroon. Studies on pathogenic activity and interactions with *R. similis*. Infomusa 5:4-7.
- Crous PW, Peeraly A. 1996. *Gliocladiopsis irregularis* sp. nov. and notes on *Cylindrocladium spathiphylli*. Mycotaxon 65:119-128.
- , Wingfield MJ. 1994. A monograph of *Cylindrocladium* including anamorphs of *Calonectria*. Mycotaxon 51:341-435.
- Duchesne LC, Anderson JB. 1990. Location and direction of transcription of the 5SrRNA in *Armillaria*. Mycol Res 94:266-269.
- Felsenstein J. 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. Seattle: University of Washington, Department of Genetics, USA. Distributed by the author.
- Goodwin DC, Lee SB. 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. Biotechniques 15:438-444.
- Gowen S. and Queneherve P. (1990). Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. In : Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Eds : Luc et al. Wallingford, Oxon, U.K., C. A. B. International, 431-460.

Jeng RS, Dumas M, Liu FH, Wang CL, Hubbes M. 1997. DNA analysis of *Cylindrocladium floridanum* isolates from selected forest nurseries. *Mycol Res* 101:285-291.

Jenny C, Carreel F, Tomekpe K, Perrier X, Dubois C, Horry JP and Tezenas du Montcel H. 1999. Les bananiers. In: Diversité génétique des plantes cultivées. Eds : Hamon et al., Montpellier, France, 113-139.

Jones DR 1999. Diseases of banana, abaca and enset. Edited by DR Jones, CABI publishing, Wallingford, Oxon, UK.

Kobenan K. 1991. Parasites et ravageurs des bananiers en Côte d'Ivoire. *Fruits* 46:633-641.

Lassoudière A. 1978. Quelques aspects de la croissance et du développement du bananier Poyo en Côte d'Ivoire. Le système radical. *Fruits* 33:314-338.

Loridat P. 1989. Etude de la microflore fongique et des nématodes associés aux nécroses de l'appareil souterrain du bananier en Martinique. Mise en évidence du pouvoir pathogène du genre *Cylindrocladium*. *Fruits* 44:587-597.

Overmeyer K, Lünemann S, von Wallbrunn C, Meinhardt F. 1996. Genetic variability among isolates and sexual offspring of the plant pathogenic fungus *Calonectria morganii* on the basis of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Curr Microbiol* 33:249-255.

Peerally A. 1991. The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. *Mycotaxon* 40:323-366.

Perrière G, Gouy M. 1996. WWW-Query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78: 364-369.

Price NS. 1995. Banana morphology - Part I : roots and rhizomes. In : *Bananas and Plantains*. Eds : Gowen Chapman et al. London, 179-189.

Risède JM. 1994. Eléments de caractérisation de *Cylindrocladium* sp. agent de nécroses racinaires du bananier en Martinique. *Fruits* 49:167-178.

--- 1995. Spatial and temporal distribution in soils of *Cylindrocladium* sp. fungal pathogen of bananas. *Phytopathology* 85:1563.

Risède J.M. & Simoneau P. (2001) Typing *Cylindrocladium* species by analysis of ribosomal DNA spacers polymorphism: application to field isolates from the banana rhizosphere. *Mycologia* 93: 494-504.

Rossmann AY. 1979. *Calonectria* and its type species, *C. daldiniana*, a later synonym of *C. pyrochroa*. *Mycotaxon* 8:321-328.

--- 1983. The phragmosporous species of *Nectria* and related genera. *Mycol Pap* 150:1-164.

Schoch CL, Crous PW. 1999. First report of *Cylindrocladium* root and petiole rot to *Spathiphyllum* in South Africa. *S African J Bot* 65:208-211.

Semer CR, Mitchell DJ, Mitchell ME, Martin FR, Alfenas AC. 1987. Isolation, identification and chemical control of *Cylindrocladium musae* sp. nov. associated with toppling disease of banana. *Phytopathology* 77:1729.

Sokal RRR and Michener CD. 1958. A statistical method for evaluation of systematic relationships. *Univ Kansas Sci Bull* 38:1409-1438.

Thies WG and Patton R F. (1970). Biology of *Cylindrocladium scoparium* in Wisconsin forest tree nurseries. *Phytopathology*, 60, 1662-1668.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of

progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acids Res 22:4673-4680.

Victor D, Crous PW, Janse BJH, Wingfield MJ. 1997. Genetic variation in *Cylindrocladium floridanum* and other morphologically similar *Cylindrocladium* species. Syst Appl Microbiol 20:268-285.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, p 315-322.

Table I: Geographic origin, host and morphotype of *Cylindrocladium* isolates used in this study

Isolates	Origin	Host
<i>MT1 group</i> : <i>Cy. gracile</i> -like isolates (large cylindrical and 1-septate conidia, clavate vesicle)		
. Gua8 to Gua12 ; Gua24 to Gua29	Guadeloupe	Banana*
. Mar1 to Mar5 ; Mar8 to Mar11 ; Mar14 to Mar39	Martinique	Banana
. Slu1 to Slu7	Saint-Lucia	Banana
<i>MT2 group</i> : <i>Cy. spathiphylli</i> (large cylindrical and 1 to 3-septate conidia, globose vesicle)		
. Gua1 to Gua5 ; Gua14 to Gua23	Guadeloupe	Banana
. Mar7	Martinique	Banana
. Dom1 ; Dom2 ; Dom4 to Dom7	Dominica	Banana
. Cam1 to Cam8 ; Cam15 to Cam19	Cameroon	Banana
. Cor1 to Cor7	Costa-Rica	Banana
. Hel7A1 ; Hel7A2 ; Hel8A1 ; Hel2A Hel 2B ; Hel2C	Guadeloupe	Heliconia
<i>MT3 Group</i> : <i>Cy. scoparium</i> (small cylindrical and 1-septate conidia, ovoid to spatulate vesicle)		
. Gua13	Guadeloupe	Banana
. Mar12, Mar13	Martinique	Banana
. Cam9 to Cam12	Cameroon	Banana
<i>MT4 group</i> : <i>Cy. floridanum (sensu lato)</i> (small cylindrical and 1-septate conidia, spheropedonculate vesicle)		
. Cam13	Cameroon	Banana
<i>MT5 group</i> : <i>Cy. gracile</i> (small cylindrical and 1-septate conidia, clavate vesicle)		
. Cam14	Cameroon	Banana

*All Banana isolates are issued from AAA cultivars except Cam2 and Cam13 from AAB cultivars

Table II: Geographic origin, host, collection number and species of reference isolates used in this study

Collection Number	Species	Origin	Host
PC 551197 ^a	<i>C. gracile</i>	South east Asia	<i>Argyrea splendens</i>
ATCC 22833	<i>C. gracile</i>	Brazil	<i>Pinus caribaea</i>
IMI 346843	<i>C. gracile</i>	South Africa	<i>Eucalyptus</i> sp.
PPRI 4157	<i>C. pteridis</i>	Brazil	Unknown
IMI 354530	<i>C. pteridis</i>	Brazil	<i>Eucalyptus grandis</i>
ATCC 44730 ^a	<i>C. spathiphylli</i>	U. S. A.	<i>Spathiphyllum</i> sp.
CBS 538.87	<i>C. spathiphylli</i>	France	<i>Spathiphyllum</i> sp.
IMI 167983 (tea)	<i>C. spathiphylli</i>	Mauritius	<i>Camellia sinensis</i>

^a Ex-type strain

Table III: Analysis of variance on aggressiveness on banana cv Grande-Naine among 49 *Cylindrocladium* field isolates from banana (43) and *Heliconia* (6). Aggressiveness was measured by Root Necrotic Potential as determined in Materials and Methods. Data were root square-transformed prior to the analysis to normalize variance

Date	Source of variation	DF ^a	Mean square	Pr > F ^b
<i>4 days after inoculation</i>	Isolate	48	0.10594716	< .0001
	Error	242	0.00129684	
<i>8 days after inoculation</i>	Isolate	48	0.20376438	< .0001
	Error	239	0.00132279	
<i>12 days after inoculation</i>	Isolate	48	0.27838807	< .0001
	Error	239	0.00150136	

^a Degrees of freedom

^b The probability values associated with the F tests

Table IV: Analysis of variance describing effects of isolate, banana genotype and interaction on Root Necrotic Potential (RNP), 8 or 12 days after inoculation of 2 *Cylindrocladium* isolates (Gua9 or Gua5) on 6 banana genotypes. RNP was determined as indicated in Materials and Methods. Data were root square-transformed prior to the analysis to normalize variance

Date	Source of variation	DF ^a	Mean square	Pr > F ^b
<i>8 days after inoculation</i>				
	Isolate	1	1.04560239	< 0.0001
	Genotype	5	0.27535182	< 0.0001
	Isolate * Genotype	5	0.00278337	0.1128*
	Error	53	0.00147792	
<i>12 days after inoculation</i>				
	Isolate	1	1.31800308	< 0.0001
	Genotype	5	0.39531587	< 0.0001
	Isolate * Genotype	5	0.01828277	< 0.0001
	Error	51	0.00109387	

^a Degrees of freedom

^b The probability values associated with the F tests

* Non significant

Table V : Tukey Grouping of 6 banana genotypes based on expression of Root Necrotic Potential of 2 *Cylindrocladium* isolates (Gua9 or Gua5), 8 days after inoculation. RNP was defined as in Materials and Methods. RNP data were root square-transformed prior to the analysis to normalize variance

Mean*	N	Genotype
0.68103 ^a	10	IDN 110 (AA)
0.59257 ^b	11	IRFA 914 (AAB)
0.54909 ^b	12	Kunnan (AB)
0.49122 ^c	11	Grande Naine (AAA)
0.35804 ^d	10	P.K.W. (BB)
0.23629 ^e	11	P. Madu (AA)

* Means followed by the same letter are not significantly different (P=0.05) according to Tukey Studentized Range Test

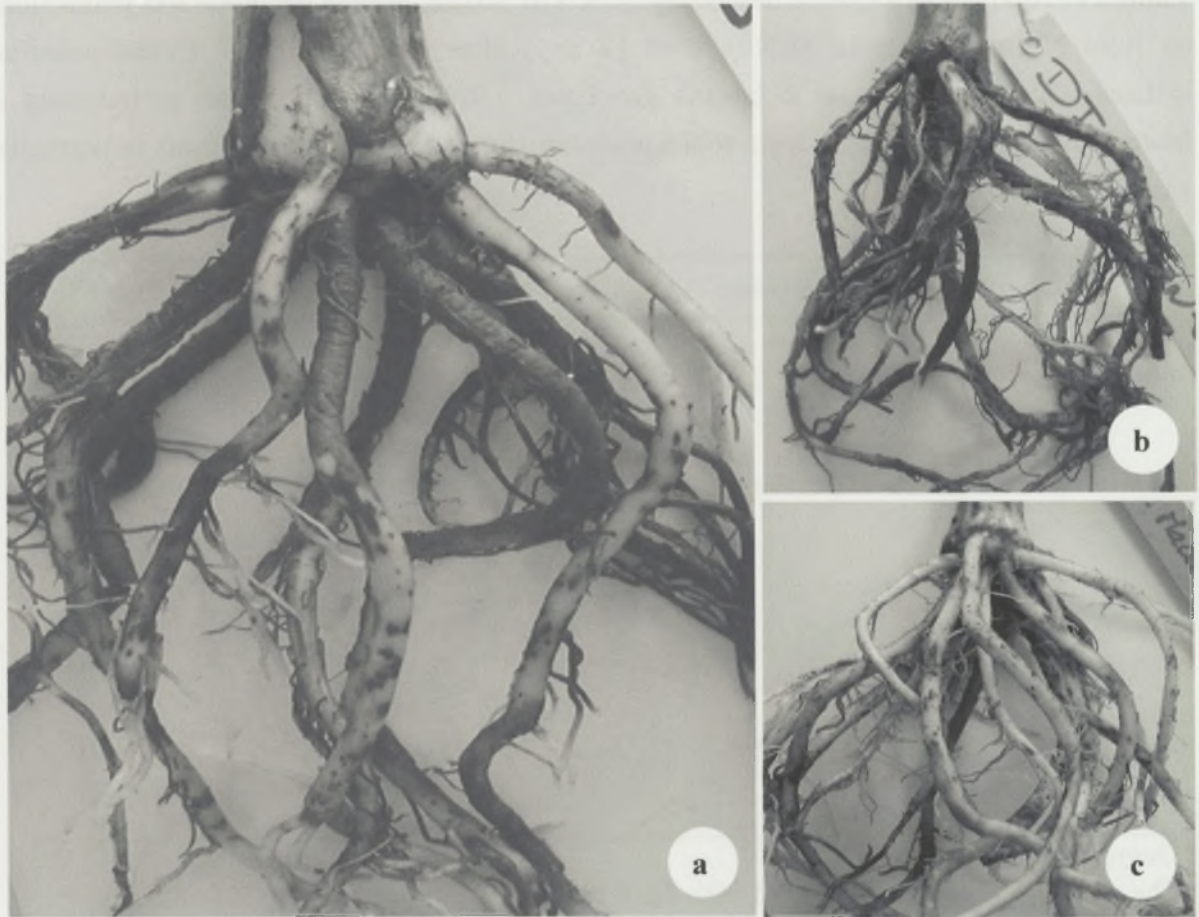
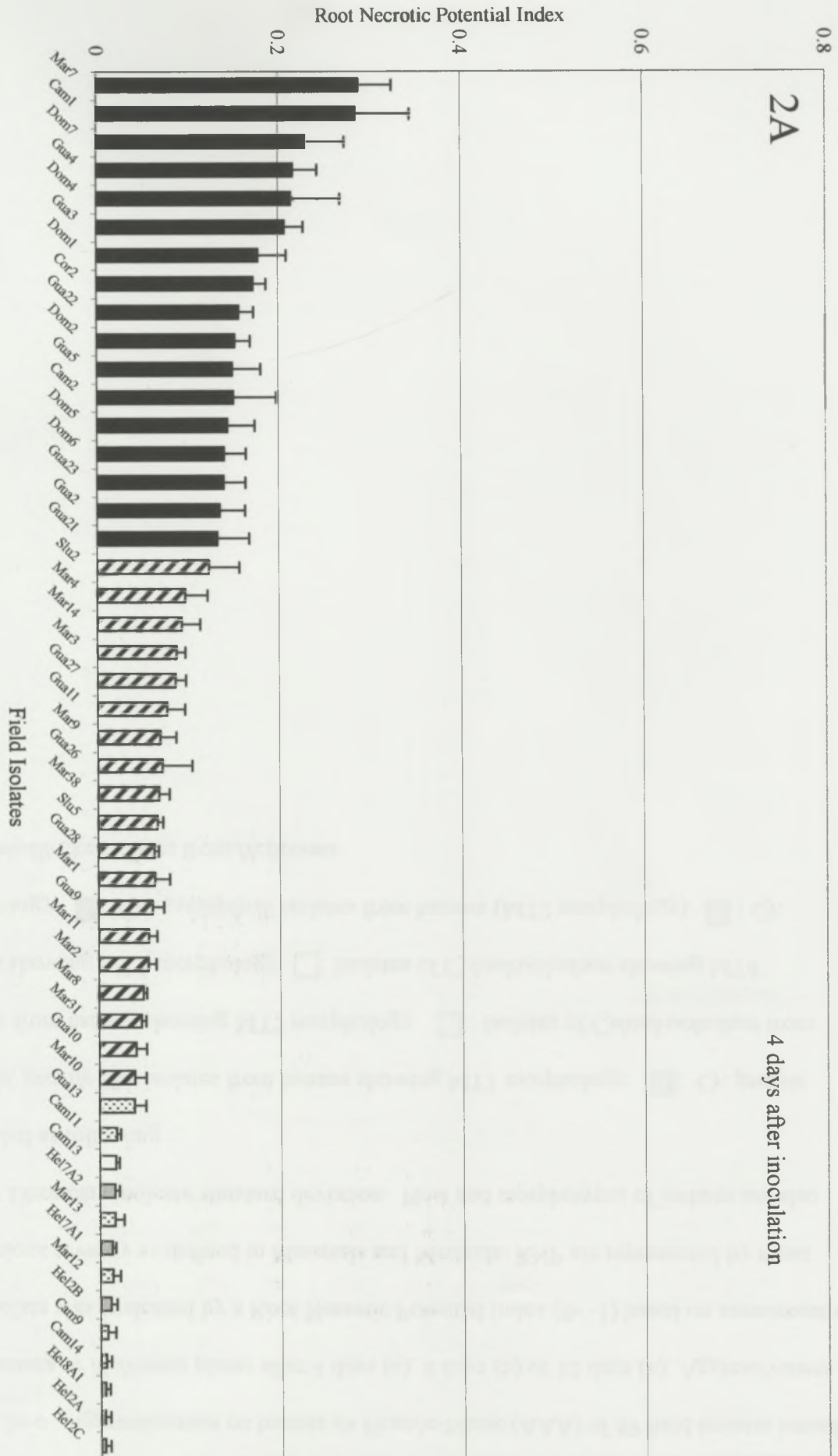
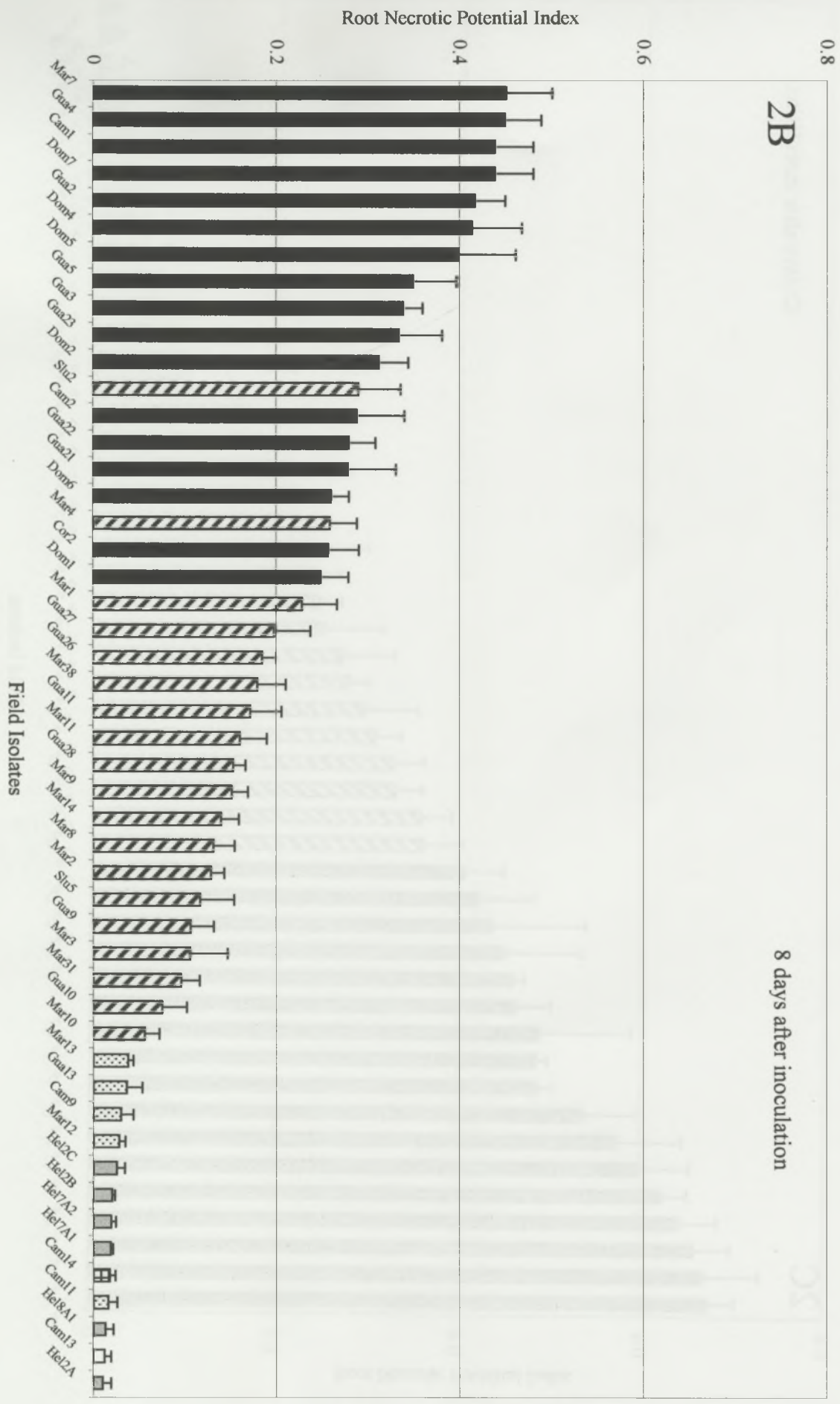


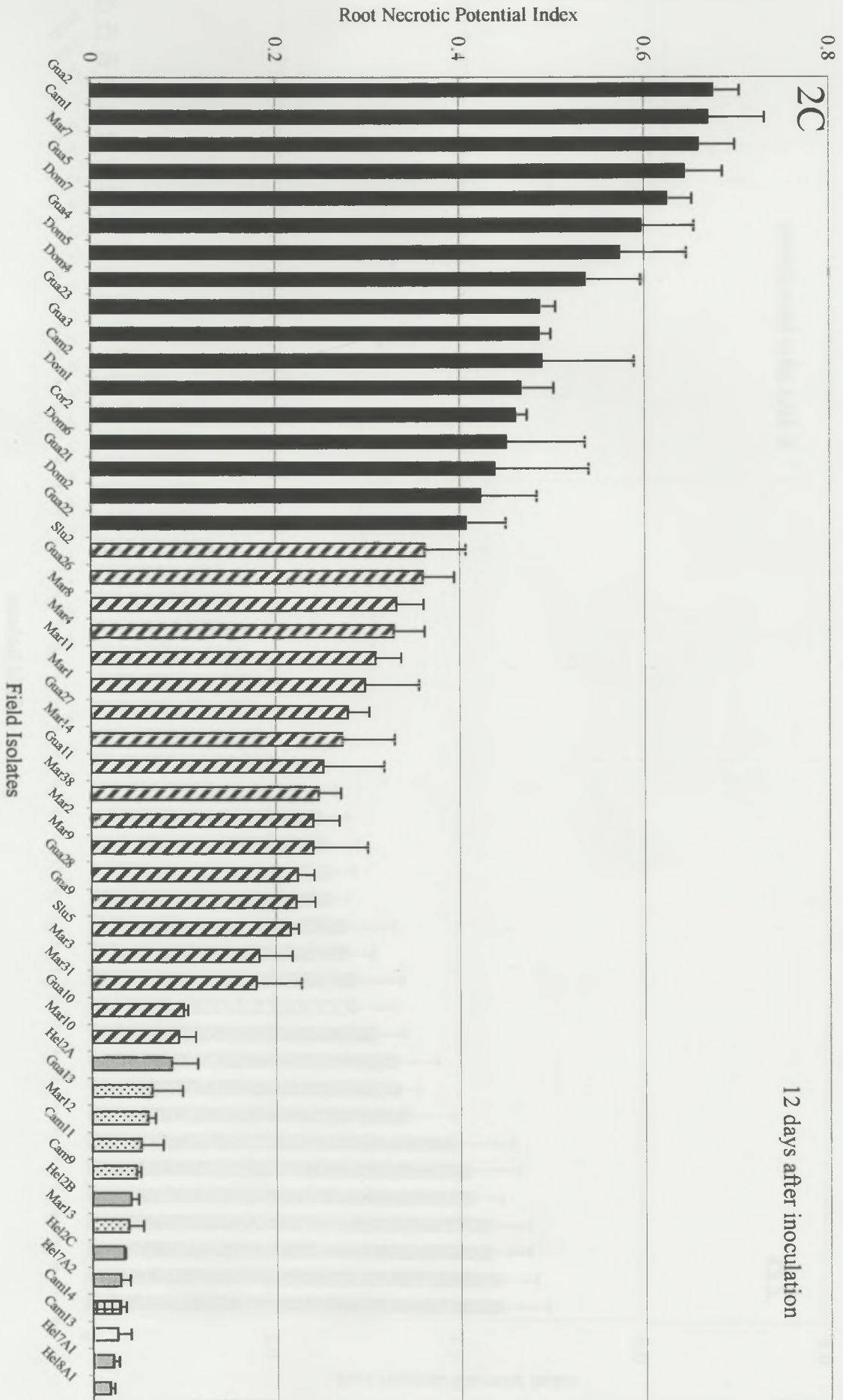
Figure 1 : Necrotic lesions on banana roots induced by a *Cy. spathiphylli* isolate from the banana rhizosphere (Gua5) ; a : Variety Grande Naine (AAA) 8 days after inoculation ; b : Variety Kunnan (AB) 12 days after inoculation ; c : Variety Pisang Madu (AA) 12 days after inoculation.

Figure 2a-c : Aggressiveness on banana cv Grande-Naine (AAA) of 49 field isolates issued from banana or *Heliconia* plants after 4 days (a), 8 days (b) or 12 days (c). Aggressiveness of each isolate was evaluated by a Root Necrotic Potential index (0- -1) based on assessment of root lesions severity as defined in Materials and Methods. RNP are represented by mean values. Error bars indicate standard deviation. Host and morphotypes of isolates are also illustrated as following :

▣: *Cy. gracile*-like isolates from banana showing MT1 morphology. ▤: *Cy. gracile* isolates from banana showing MT5 morphology. ▥: Isolates of *Cylindrocladium* from banana showing MT3 morphology. □: Isolates of *Cylindrocladium* showing MT4 morphology. ■: *Cy. spathiphylli* isolates from banana (MT2 morphology). ◻: *Cy. spathiphylli*-like isolates from *Heliconia*







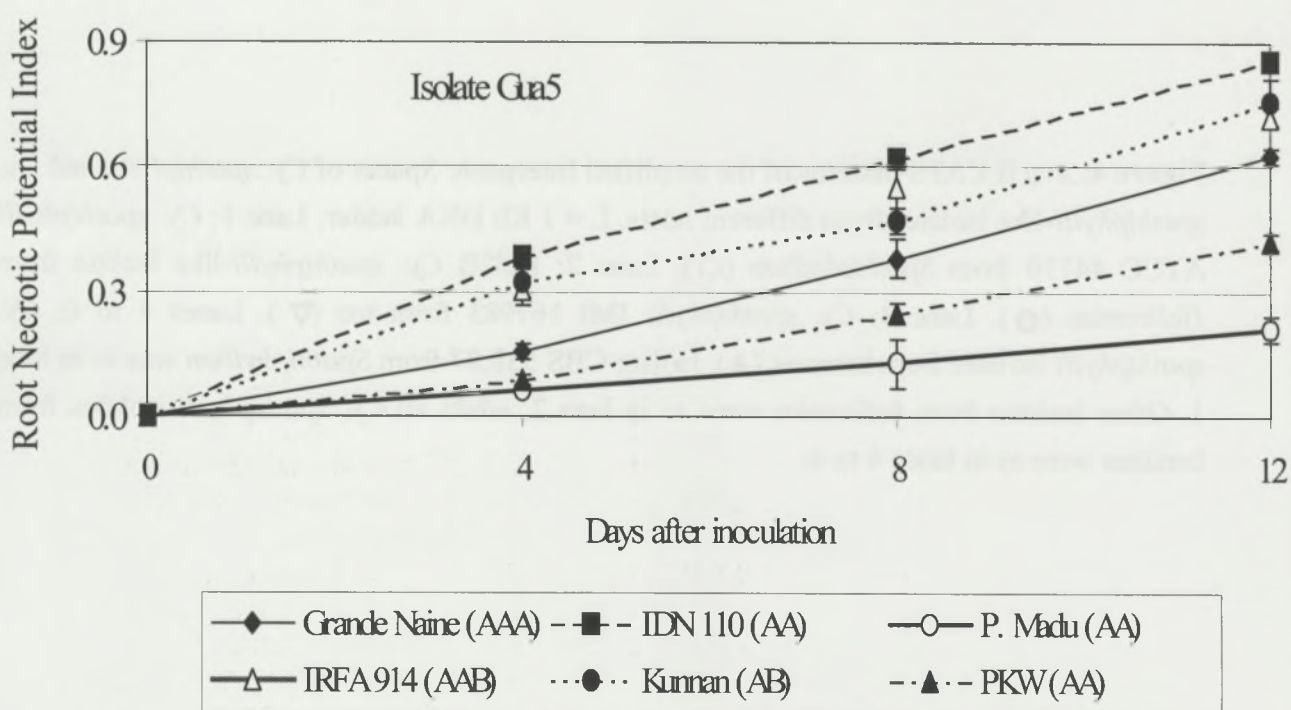
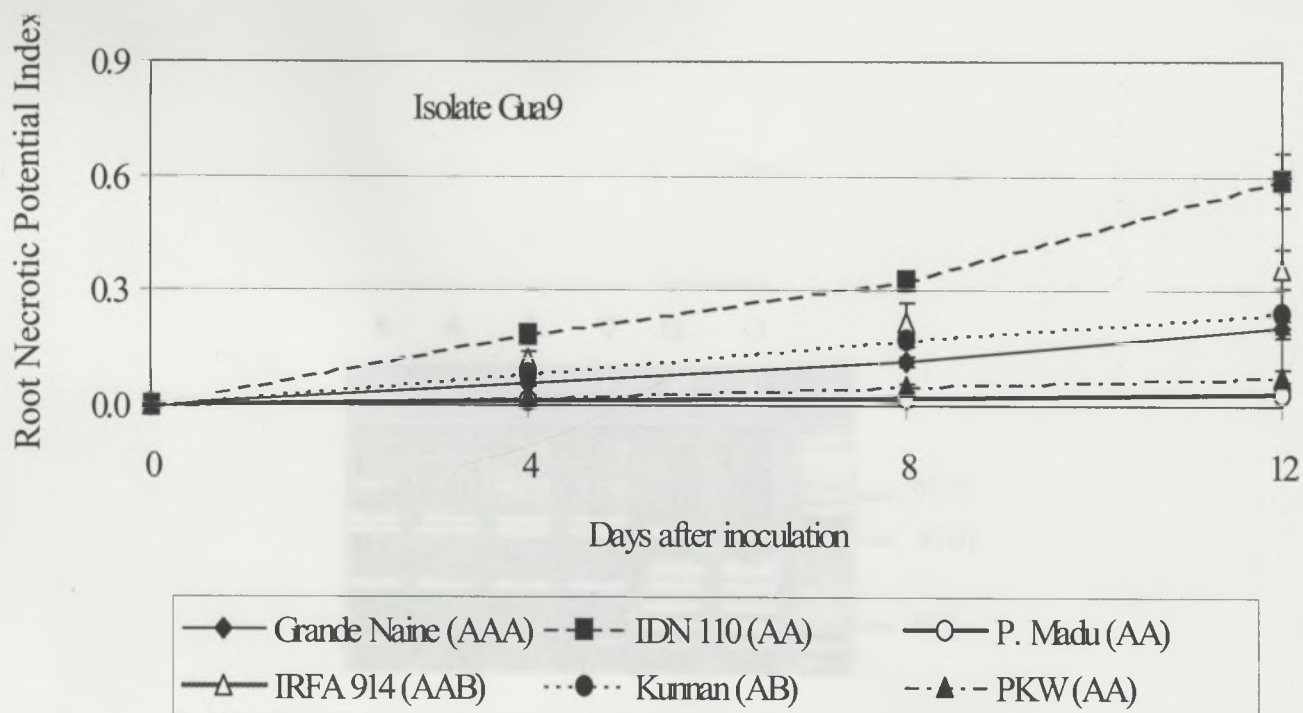


Figure 3: Pathogenicity of a *Cy. gracile-like* isolate with MT1 morphotype (Gua9) and a *Ban Cy. spathiphylli* isolate (Gua5) towards 6 banana genotypes. These 2 isolates were isolated from banana fields. Pathogenicity was measured by Root Necrotic Potential, as defined in materials and Methods. Error bars indicate standard deviation.



Figure 4: *Ava* II CAPS patterns of the amplified Intergenic Spacer of *Cy. spathiphylli* and *Cy. spathiphylli*-like isolates from different hosts. L = 1 Kb DNA ladder. Lane 1: *Cy. spathiphylli* ATCC 44730 from *Spathiphyllum* (○). Lane 2: Hel2B *Cy. spathiphylli*-like isolate from *Heliconias* (●). Lane 3: *Cy. spathiphylli* IMI 167983 from tea (▽). Lanes 4 to 6: *Cy. spathiphylli* isolates from bananas (▲). Isolate CBS 538.87 from *Spathiphyllum* was as in lane 1. Other isolates from *heliconias* were as in lane 2, while all *Cy. spathiphylli* isolates from bananas were as in lanes 4 to 6.

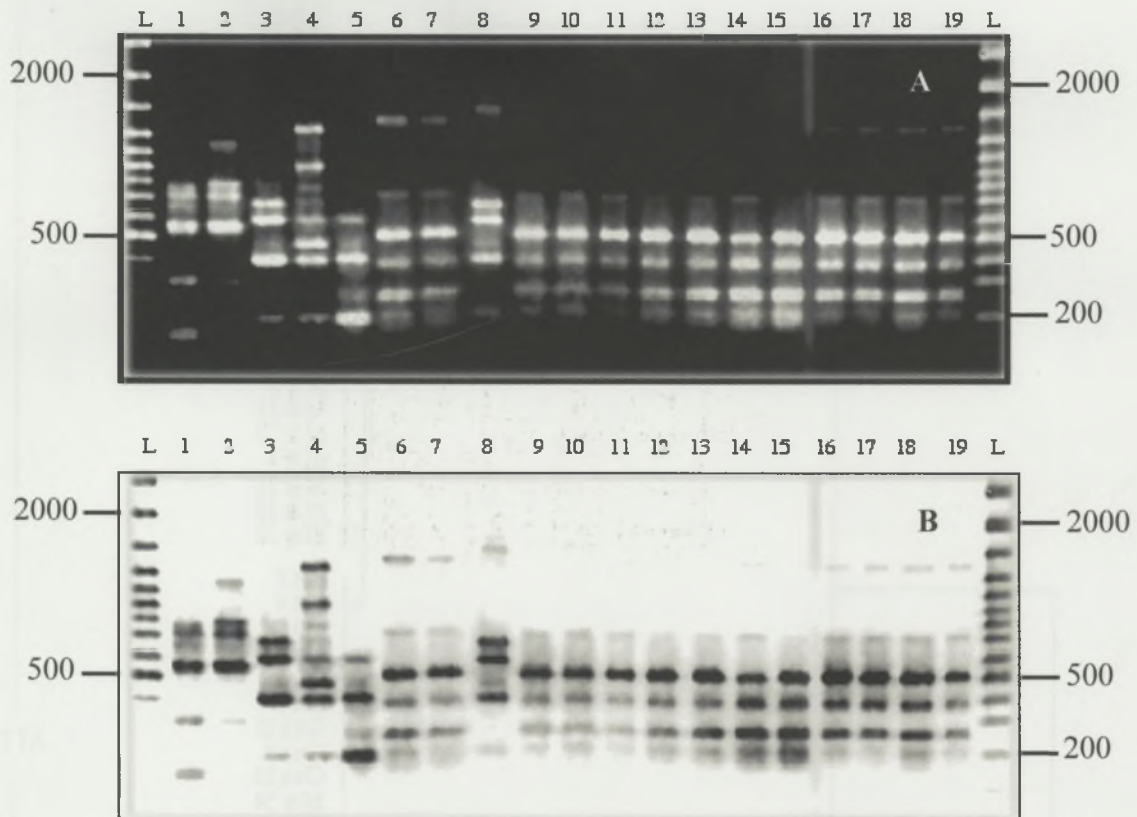


Figure 5 : RAPD profiles of *Cylindrocladium* isolates with clavate vesicles generated by OPE 02 primer. A and B, respectively positive and negative image of the gel. L = 100 bp DNA ladder ; Lane 1: *Cy. pteridis* PPRI 4157. Lane 2: *Cy. pteridis* IMI 354530. Lane 3: *Cy. gracile* PC 551197. Lane 4: *Cy. gracile* ATCC 22833. Lane 5: *Cy. gracile* IMI 346843. Lane 8: *Cy. gracile* isolate (MT5) from banana (Cam14). Lanes 6, 7 ; 9 to 19: *Cy. gracile*-like isolates (MT1) from banana (respectively, Mar 14, Mar15 ; Mar1, Mar 3, Mar20, Mar24, Gua9, Gua12, Gua25, Gua28, Slu1, Slu4, Slu5). Numbers beside the gel indicate the size of DNA fragments in bp.

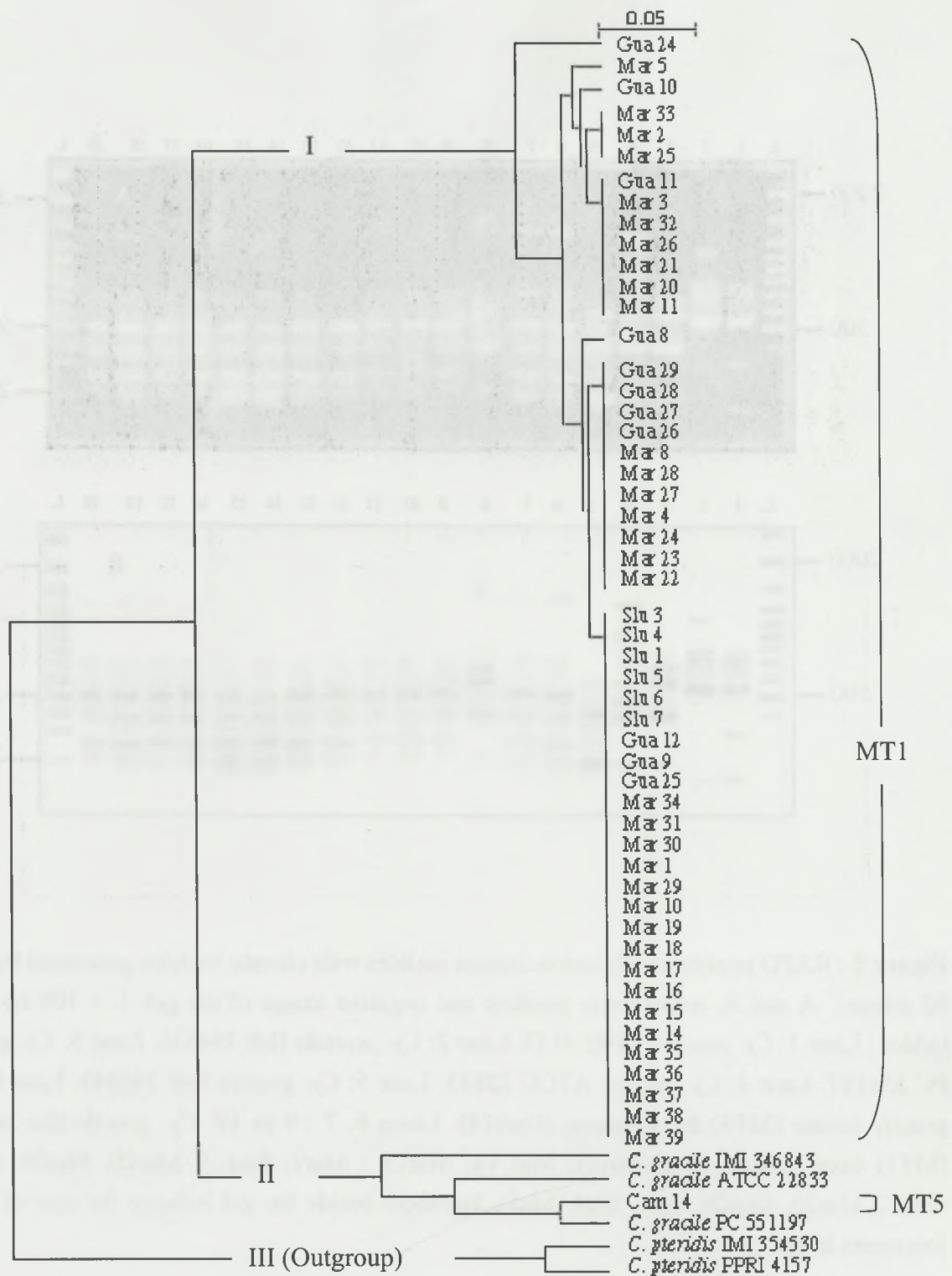


Figure 6: Dendrogram based on UPGMA analysis of 52 *Cy. gracile*-like field isolates from bananas (MT1), 1 *Cy. gracile* field isolate from bananas (MT5), 3 *Cy. gracile* reference isolates, and 2 *Cy. pteridis* reference isolates used as outgroup. Genetic distances were calculated using Sokal and Michener coefficient (1958) on banding patterns showing 58 polymorphic band positions from 5 RAPD primers.

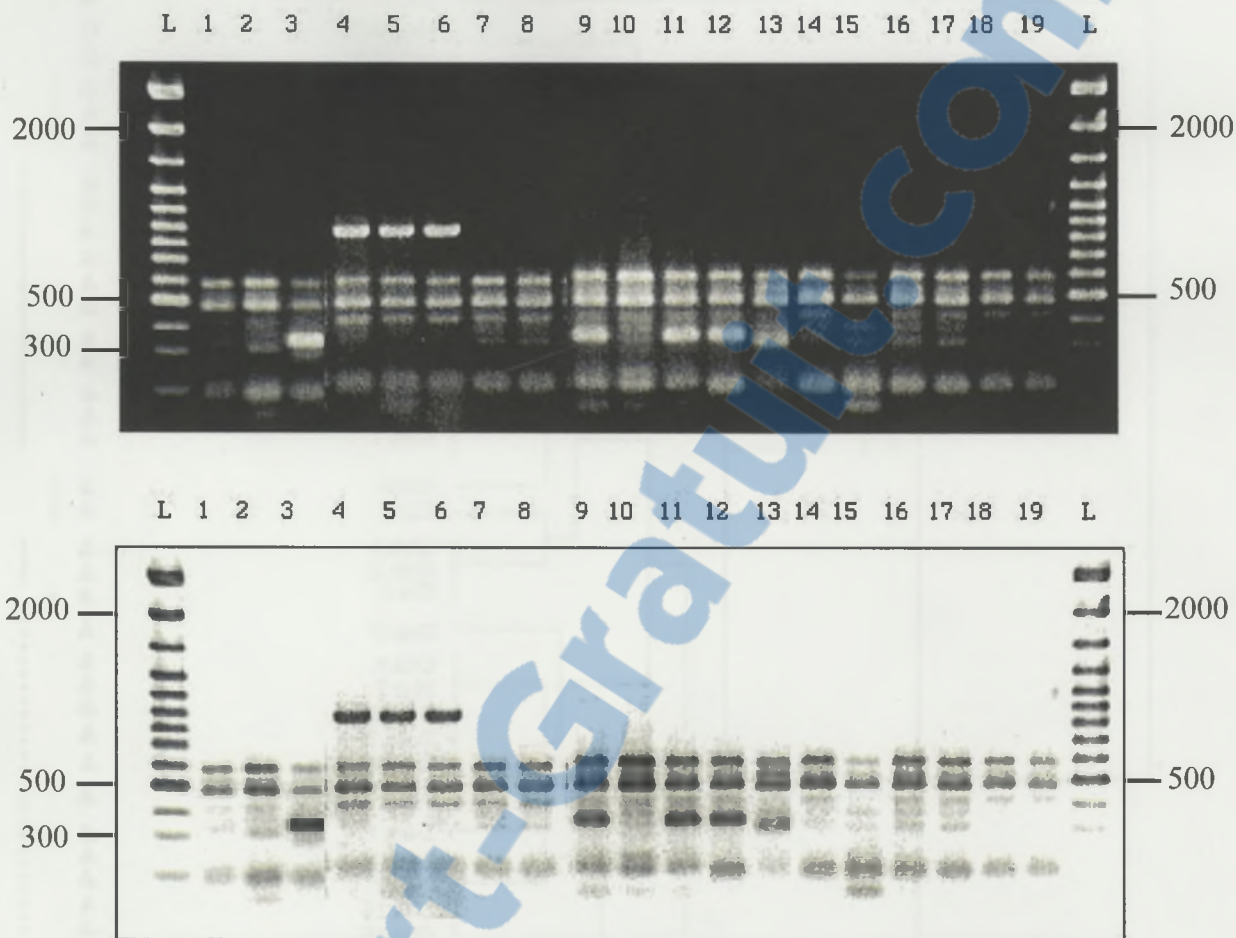


Figure 7 : RAPD profiles of *Cy. spathiphylli* isolates generated by OPE 03 primer. A and B, respectively positive and negative image of the gel. L = 100 bp DNA ladder ; Lane 1: ATCC 44730 (*Spathiphyllum*). Lane 2: IMI 167893 (tea). Lane 3: CBS 538.87 (*Spathiphyllum*). Lane 4: Hel8A1 (*Heliconia*). Lane 5: Hel2b (*Heliconia*). Lane 6: Hel2c (*Heliconia*). Lane 7: Gua4 (Banana). Lane 8: Gua3 (Banana). Lane 9: Cor1 (Banana). Lane 10: Cor2 (Banana). Lane 11: Cor5 (Banana). Lane 12: Cor3 (Banana). Lane 13: Cor4 (Banana). Lane 14: Cor6 (Banana). Lane 15: Cor7 (Banana). Lane 16: Cam2 (Banana). Lane 17: Cam1 (Banana). Lane 18: Cam8 (Banana). Lane 19: Cam19 (Banana). For each isolate, host is given in parentheses. Moreover, for isolates issued from banana, geographic origin is given by the names : Gua: Guadeloupe. Cor: Costa-Rica. Cam: Cameroon.

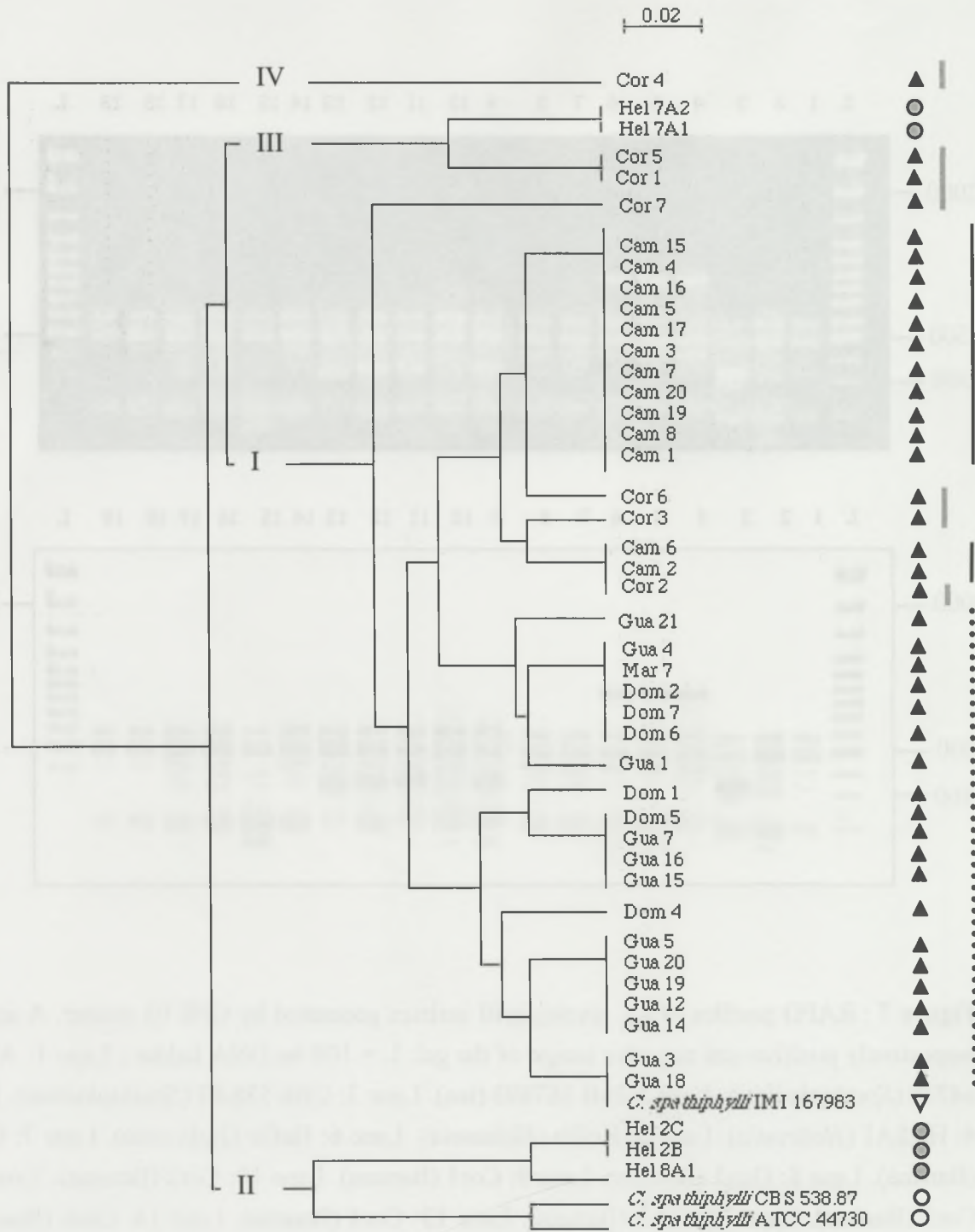


Figure 8: Dendrogram based on UPGMA analysis of 40 *Cy. spathiphylli* field isolates from bananas (▲), 2 *Cy. spathiphylli* reference isolates from *Spathiphyllum* (○), 1 *Cy. spathiphylli* reference isolate from tea (▽), and 5 *Cy. spathiphylli* field isolates from *Heliconias* (●). Genetic distances were calculated using Sokal and Michener coefficient (1958) on banding patterns showing 25 polymorphic band positions from 5 RAPD primers. Origins of banana field isolates are also indicated: Costa-Rica : — ; Cameroon : — ; Caribbean region :.....

Conclusion générale - Perspectives

CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES

Connus depuis près d'une quinzaine d'années pour être impliqués dans le déterminisme des lésions nécrotiques racinaires à l'origine des chutes de bananiers, les champignons filamenteux du genre *Cylindrocladium* n'avaient jusqu'ici jamais fait l'objet de diagnostic précis en bananeraies. Cet état de fait s'explique en grande partie par leur systématique extrêmement mouvante et souvent controversée, et par la difficulté qui en découle à discriminer de façon fiable les espèces au sein de ce genre. Les travaux que nous avons développés dans le cadre de la présente étude avaient pour objectif premier d'identifier l'espèce ou des espèces de *Cylindrocladium* pathogènes chez les bananiers, et d'établir leurs principales caractéristiques biologiques et génétiques. Ils avaient aussi l'ambition de développer une méthode de diagnostic de ces champignons qui soit facile à mettre en œuvre et transférable dans les zones de production bananières, tout en étant sûre et rapide.

1- La démarche méthodologique suivie

Pour atteindre ces objectifs, une approche académique basée sur la prise en compte de critères de nature différente a été développée. Nous avons d'abord établi à l'aide de méthodes d'isolements appropriées une collection de 171 isolats de *Cylindrocladium* issus de la rhizosphère du bananier et provenant de 3 grandes zones géographiques de production, à savoir la Caraïbe (Sainte-Lucie, Martinique, Dominique, Guadeloupe), l'Amérique centrale (Costa-Rica), et l'Afrique (Cameroun). Ces isolats ont ensuite été caractérisés à l'aide de critères morphologiques, physiologiques (croissance) et biologiques (compatibilité sexuelle, pouvoir pathogène). Ils ont alors été situés dans le cadre taxinomique existant, par comparaison à des isolats de référence exhibant un phénotype similaire aux leurs. Provenant de régions et d'hôtes divers, ces isolats de référence représentaient des espèces déjà décrites et acceptées comme telles.

Cette approche a permis de dégager au sein des isolats rhizosphériques du bananier une structuration phénotypique dont la validité a alors été testée de façon indépendante par une caractérisation de la diversité génétique des taxa identifiés. Nous avons pour cela d'abord prospecté par PCR ciblée le polymorphisme de séquences ou de restriction de deux locus de l'ADNr nucléaire, l'espaceur transcrit ITS, et l'espaceur intergénique non transcrit IGS, en utilisant notre collection d'isolats de référence. Cela nous a permis de développer une méthodologie de diagnostic moléculaire rapide et fiable des espèces de *Cylindrocladium*. Cet outil a alors été utilisé pour le typage moléculaire des isolats provenant de bananiers.

Ensuite, grâce à la mise au point d'une méthodologie rapide d'évaluation du pouvoir pathogène des champignons du genre *Cylindrocladium* sur bananier, nous avons ensuite identifié les taxa qui sont à l'origine des lésions nécrotiques observées sur le système racinaire

des bananiers. La variabilité génétique à l'intérieur des taxa identifiés comme étant pathogènes sur bananiers a alors été évaluée en parallèle à l'aide de marqueurs RAPD.

2- Le bilan des connaissances acquises

- **La mise à jour d'une diversité morphologique et biologique au sein des *Cylindrocladium* du bananier**

Cinq types morphologiques ou morphotypes (MT1 à MT5) principalement définis par la taille et le nombre de septa des conidies, les dimensions et la forme de la vésicule du stipe des conidiophores, ainsi que la vitesse de croissance à 25°C des isolats sur milieu gélosé à 2% d'extrait de Malt ont été identifiés au sein des *Cylindrocladium* trouvés en bananeraies. Plusieurs de ces morphotypes pouvaient simultanément être présents dans une même bananeraie. L'optimum thermique de croissance et la compatibilité sexuelle (intra ou inter taxa) ont été étudiés aussi bien pour des représentants de chacun de ces types morphologiques que pour des représentants d'espèces de référence connues ayant des morphotypes proches.

Ces travaux indiquent que le morphotype MT1 rassemble des isolats caractérisés par de grandes conidies monoseptées, des vésicules clavates et une vitesse de croissance moyenne à 25°C. Il est similaire aux morphotypes décrits pour un complexe d'espèces biologiques distinctes mais similaires sur le plan morphologique et qui rassemble les espèces *Cy. pseudogracile*, *Cy. gracile*, *Cy. graciloideum*, et *Cy. pteridis* (Crous *et al.*, 1997). Au sein de ce complexe « *Cy. gracile-like* », les espèces *Cy. pseudogracile* et *Cy. graciloideum* sont données comme homothalliques, ce que nous avons aisément pu vérifier pour *Cy. pseudogracile* dont nous avons un représentant dans notre collection de référence, mais pas pour *Cy. graciloideum* absent de notre collection de souches. Les isolats MT1 n'ayant réalisé le cycle sexué ni de façon homothallique, ni de façon hétérothallique, cela suggérait qu'ils ne puissent appartenir à aucune de ces deux espèces, sans que l'on ne puisse statuer à l'aide de ces seuls critères phénotypiques sur leur conspécificité avec les espèces *Cy. pteridis* ou *Cy. gracile*, connues pour être hétérothallique pour la première, et sans stade téléomorphe identifié pour la seconde.

Concernant les isolats partageant le morphotype MT2, plusieurs critères morphologiques et biologiques ont convergé pour suggérer leur appartenance à l'espèce *Cy. spathiphylli*. Il y a d'une part le fait qu'avec des conidies de grande taille, monoseptées à triseptées, et une vésicule terminale sphérique à ellipsoïde, ils présentaient des caractéristiques morphologiques très proches de celles de cette espèce. Et d'autre part, ils se révélaient *in-*

in vitro sexuellement compatibles avec l'un des représentants de référence de cette espèce en produisant des périthèces viables du stade téléomorphe *Calonectria*.

Les isolats appartenant aux morphotypes MT3, MT4, et MT5 possédaient tous des conidies monoseptées de petite taille. Aucun d'entre eux n'a réalisé dans nos conditions expérimentales le cycle sexué, que ce soit de façon homo ou hétérothallique. Avec ses vésicules spatulées, le morphotype MT3 est apparu proche sur le plan morphologique d'un complexe d'espèces distinctes sur le plan biologique mais similaires sur le plan morphologique, complexe récemment décrit par Schoch *et al.* (1999) et qui inclue les espèces *Cy. candelabrum*, *Cy. insulare*, *Cy. mexicanum*, et *Cy. pauciramosum*, auxquelles on peut également rajouter l'espèce *Cy. scoparium* connue pour être phénotypiquement très proche de l'espèce *Cy. candelabrum* (Crous et Wingfield, 1994).

Les morphotypes MT4 et MT5 se sont révélés être des morphotypes très rares. Avec ses vésicules sphéro-pédonculées, l'unique isolat MT4 paraissait morphologiquement proche de représentants de l'espèce *Cy. floridanum sensu lato*. Dans le même temps, le seul isolat du morphotype MT5 paraissait, comme les isolats du morphotype MT1, proche du complexe *Cy. gracile-like*, et se distinguait surtout de ces isolats MT1 par la petite taille de ses conidies.

Là encore, les critères morphologiques et biologiques se sont avérés insuffisants à eux seuls pour établir une hypothèse claire et unique sur l'identité de ces trois morphotypes MT3, MT4, MT5. Nous avons donc dès lors cherché à développer des marqueurs moléculaires de la diversité des champignons du genre *Cylindrocladium* permettant d'établir de façon fiable l'identité des morphotypes identifiés en bananeraies.

• **Une diversité génétique congruente avec les types morphologiques identifiés - l'évidence pour l'implication de 5 espèces de *Cylindrocladium* dans la rhizosphère du bananier**

La caractérisation génétique des cinq types morphologiques de *Cylindrocladium* inventoriés en bananeraies a été effectuée sur la base de l'identification de positions nucléotidiques polymorphes de l'espaceur ITS de l'ADNr après amplification PCR, et par la recherche de marqueurs CAPS de l'espaceur intergénique IGS qui soient polymorphes. Un second type de marqueurs, les marqueurs RAPD a aussi, selon les cas, été utilisé. Nous avons pu établir sur ces bases que les 5 morphotypes identifiés en bananeraies correspondent bien à

5 groupes génétiques distincts qui ont été situés vis à vis d'espèces connues de *Cylindrocladium*.

L'analyse du polymorphisme de restriction de la région IGS a en particulier révélé que les isolats MT1 et MT5 partageaient des haplotypes respectivement proches ou identiques à ceux des représentants de l'espèce *Cy. gracile*. Cela suggérait donc qu'ils soient fortement apparentés à cette espèce, voire même qu'ils puissent en être conspécifiques. Pour l'unique isolat MT5, l'hypothèse de conspécificité qui était parfaitement cohérente avec son phénotype a été validée par la suite tant par les marqueurs CAPS-IGS qu'avec les marqueurs RAPD, par comparaison à des représentants de référence de l'espèce *Cy. gracile*. Pour les isolats MT1, cette forte proximité génétique avec l'espèce *Cy. gracile* prise en compte simultanément avec leur morphologie conidienne atypique pour cette espèce, nous ont d'abord amené à les considérer comme une population particulière de cette espèce. Le recours aux marqueurs RAPD qui ont l'avantage de permettre une prospection simultanée de plusieurs locus du génome et non plus une seule région a permis d'affiner cette hypothèse. Les marqueurs RAPD ont en effet révélé que ces isolats MT1 ne possédaient que 60% de similarité génétique avec les représentants de l'espèce *Cy. gracile*. Ceci nous a dès lors amené à considérer qu'ils ne constituaient donc pas seulement une population particulière de l'espèce *Cy. gracile*, mais plus sûrement une espèce proche, non encore décrite au sein du genre *Cylindrocladium*. Nous avons dénommé cette espèce *Cy. macrogracile* sp. nov.

La conspécificité des isolats MT2 avec l'espèce *Cy. spathiphylli* a été confirmée par tous les marqueurs moléculaires que nous avons utilisés.

Les isolats MT3 ont de même été assignés à l'espèce *Cy. scoparium* (*sensu lato*) sur la base du polymorphisme de séquences de la région ITS et de marqueurs CAPS de la région IGS de l'ADNr. Ce diagnostic mérite cependant d'être confirmé en examinant de manière contradictoire à l'aide des mêmes marqueurs, des représentants de l'espèce *Cy. insulare* Schoch et al. (1999). Cette nouvelle espèce est en effet décrite dans le cadre des récents travaux de taxonomie moléculaire de Schoch *et al.* (2001) comme particulièrement proche de *Cy. scoparium* par le polymorphisme de séquence des gènes de la β -tubuline. Ces mêmes auteurs les décrivent même toutes les deux comme sexuellement compatibles en indiquant qu'il faudra de toute évidence revoir leur systématique! Son diagnostic par CAPS-IGS en particulier permettrait de confirmer, si elle se révèle génétiquement distincte de *Cy. scoparium*.

Le polymorphisme des régions ITS et IGS a aussi révélé une certaine proximité génétique de l'unique isolat MT4 avec les représentants de l'espèce *Cy. floridanum sensu lato*. Le réexamen récent de cette espèce par Kang, Crous et Schoch (2001) sur la base du

polymorphisme de séquences de l'ITS, des gènes de l'histone et de la β -tubuline et de tests de compatibilité sexuelle a permis de la redéfinir comme un complexe incluant 3 espèces distinctes, *Cy. floridanum sensu stricto* (ou groupe 1 *sensu* Victor *et al.*, 1997), *Cy. canadense*, et *Cy. pacificum*. La première de ces espèces est homothallique, tandis que le stade téléomorphe demeure inconnu ou incertain pour ces 2 dernières. Le dendrogramme obtenu à partir des profils de restriction IGS de ces différents taxa a montré que l'isolat de morphotype MT4 s'agrégeait de façon distante avec les représentants de ces différentes espèces de ce complexe *Cy. floridanum*-like. Ce représentant MT4 pourrait donc correspondre à une espèce non encore décrite de ce complexe. Cette hypothèse qui est fortement plausible ne peut cependant pas être solidement établie sur la base d'un isolat unique et devra donc être étayée par l'isolement puis l'examen moléculaire d'un plus grand nombre d'isolats de morphotype MT4.

Ces travaux ont donc clairement démontré que cinq espèces de *Cylindrocladium* peuvent potentiellement être présentes en complexe dans la rhizosphère du bananier. Nous n'avons détecté la nouvelle espèce *Cy. macrogracile* pour l'instant que dans la Caraïbe où elle constitue dans certaines îles comme la Martinique, l'espèce la plus fréquente sur bananiers. Les isolats de cette espèce que nous avons examinés étant issus d'échantillons de sol de bananeraies ou de lésions racinaires de bananiers, son seul hôte connu pour l'heure est donc le bananier. Son aire de répartition et sa gamme d'hôtes devront être précisées.

origine ?
L'espèce *Cy. spathiphylli* est comme nous l'avons vu au chapitre 1 une espèce phytopathogène (tellurique ou foliaire) déjà connue chez de nombreux hôtes (*Spathiphyllum*, héliconia, ...) et dans de nombreux pays. Nos travaux la signalent donc pour la première fois sur bananier et élargissent son aire de distribution à l'Amérique centrale et à l'Afrique de l'ouest. C'est manifestement l'espèce de *Cylindrocladium* la plus fréquente chez le bananier puisque on la retrouve dans les 3 grandes zones géographiques prospectées. Compte-tenu de ses fréquences d'isolement faibles à nulles enregistrées à la Martinique et à Sainte-Lucie, elle pourrait être moins présente dans le sud de l'Arc antillais, mais ceci mérite confirmation par des échantillonnages plus larges.

L'espèce *Cy. scoparium sensu lato* est elle aussi une espèce phytopathogène déjà signalée en Amérique du Nord, au Brésil et en Europe (Schoch *et al.*, 1999), et connue sur plusieurs hôtes (Peerally, 1991). Elle n'avait jusqu'ici jamais été décrite sur bananiers. Nous l'avons détectée à de faibles fréquences dans la Caraïbe, alors qu'elle semble plus courante au Cameroun. Nous la signalons pour la première fois dans ces 2 zones géographiques.

Enfin, l'isolat de l'espèce *Cy. gracile* et celui que nous avons décrit comme *Cy. floridanum*-like n'ont été identifiés qu'au Cameroun. Compte-tenu du fait qu'ils ont tous deux été isolés d'échantillons de sol provenant de bananeraies et non de lésions racinaires du bananier, ce dernier ne représente pour eux qu'un hôte possible. Des échantillonnages plus larges devraient également permettre d'établir si on les retrouve associés ou non aux lésions nécrotiques des racines de bananiers.

- **Un pouvoir pathogène sur bananier différant selon les espèces impliquées**

La mise au point d'un test rapide mais fiable d'évaluation du pouvoir pathogène des isolats de *Cylindrocladium* sur vitroplants de bananier a permis de déterminer quelles étaient les espèces de *Cylindrocladium* pathogènes au sein du complexe trouvé en bananeraies. Nous avons aussi pu préciser leur contribution relative au déterminisme des lésions nécrotiques racinaires. L'agressivité générale de ces isolats a été appréciée par des mesures pondérées de l'importance de lésions nécrotiques sur le système racinaire du cultivar Grande-Naine, cultivar qui rappelons-le est utilisé dans de nombreuses zones de production. Il ressort de ces travaux que *Cy. spathiphylli* et *Cy. macrogracile* sont les deux principales espèces pathogènes chez le bananier. C'est l'espèce la plus fréquente en bananeraies, en l'occurrence *Cy. spathiphylli*, qui est la plus agressive. L'espèce *Cy. macrogracile* exprime quant à elle une agressivité moyenne. Les 3 autres espèces du complexe se révèlent faiblement à non pathogènes, ce qui suggère qu'elles se comportent au champ comme des parasites de faiblesse voire des saprophytes qui colonisent de façon secondaire des lésions nécrotiques causées par les deux précédentes ou par d'autres agents biotiques comme les nématodes phytoparasites de la famille des *Pratylenchidae*.

L'évaluation de 6 géotypes de bananiers vis à vis de deux représentants des espèces *Cy. spathiphylli* et *Cy. macrogracile* a confirmé les différences de pouvoir pathogène entre ces deux espèces. Elle a également mis en exergue des différences de sensibilité marquées entre ces 6 variétés, mais pas de vraies interactions différentielles isolats * géotypes de bananiers.

Ainsi, si le cultivar Grande-Naine (AAA) a exprimé une sensibilité moyenne, les variétés Kunnan (AB), IRFA 914 (AAB) et surtout IDN 110 (AA) se sont révélées très sensibles. Dans le même temps, les variétés diploïdes P.K.W. (BB) et surtout Pisang Madu (AA) étaient significativement moins sensibles que les 4 autres testées. Ces résultats méritent bien évidemment d'être confirmés sur un plus grand d'isolats, mais ils permettent d'emblée d'entrevoir de réelles possibilités de lutte génétique contre les *Cylindrocladium* pathogènes des bananiers, par la voie de l'amélioration variétale. Les géniteurs diploïdes sont en effet

fréquemment utilisés par les sélectionneurs dans les programmes d'amélioration génétique des bananiers.

- **Une variabilité génétique intra-spécifique plutôt faible chez les 2 principales espèces pathogènes du bananier**

Les marqueurs RAPD ont indiqué une très forte conservation génétique (95-100% de similarité) au sein des isolats caribéens de *Cy. macrogracile*, ce qui suggère une propagation quasi clonale chez cette espèce, pour laquelle, rappelons-le, nous n'avons pas identifié de stade téléomorphe. Il est possible que cette situation ait pu être favorisée par le fait que les principales structures de survie et de dissémination de ces champignons, via le matériel végétal ou le sol infectés, sont les microsclérotés. Ils sont en effet eux-mêmes issus de la reproduction asexuée.

Au sein des isolats de l'espèce *Cy. spathiphylli* provenant de bananiers, les marqueurs RAPD ont également révélé une homogénéité génétique plutôt élevée quoique moins importante que chez *Cy. macrogracile*. Cela suggère là encore que chez cette espèce qui théoriquement peut engager le cycle sexué, le mode dominant de reproduction demeure la reproduction asexuée.

Lorsque sur la base de critères phénotypiques ou génétiques, nous avons comparé ces isolats « Bananiers » de l'espèce *Cy. spathiphylli* à d'autres isolats de la même espèce mais provenant d'hôtes différents, il en est ressorti de façon nette qu'il existe plusieurs biotypes au sein de l'espèce *Cy. spathiphylli*. En effet, si les isolats de cette espèce provenant de lésions racinaires d'héliconias se sont montrés sexuellement compatibles *in-vitro* avec des isolats issus de bananiers (ou avec des représentants de référence de l'espèce *Cy. spathiphylli*), ils se sont dans le même temps révélés peu à pas pathogènes sur bananiers. Une telle partition selon l'hôte d'origine au sein de l'espèce *Cy. spathiphylli* est également mise en évidence par le biais des marqueurs moléculaires. Nous avons ainsi détecté dans l'espaceur ITS un polymorphisme nucléotidique ténu mais qui séparait les isolats de *Cy. spathiphylli* provenant de bananier de ceux issus d'héliconias, ce qu'a confirmé, de façon très nette cette fois, l'analyse du polymorphisme de restriction de l'espaceur IGS révélé par l'enzyme *Ava* II. L'application de la PCR-RFLP (ou CAPS) à la région IGS chez des isolats de *Cy. spathiphylli* provenant de bananier, d'héliconia, de *Spathiphyllum* et de thé a même permis de préciser que l'unique isolat provenant du thé que nous avons dans notre collection partage exactement le même haplotype que les isolats provenant de bananiers, tandis que les isolats provenant

Spathiphyllum et d'héliconias partagent un second haplotype. Une telle partition selon l'hôte est cependant moins nette avec les marqueurs RAPD même si plus de 95 % des isolats *Cy. spathiphylli* provenant de bananiers se rassemblent dans un groupe majeur avec l'unique isolat *Cy. spathiphylli* isolé de thé. En effet dans le même temps, si quelques isolats provenant d'héliconias s'agrègent bien avec les isolats de *Spathiphyllum* dans le dendrogramme issu des profils de restriction, d'autres en revanche s'agrègent avec les quelques isolats provenant de bananier qui ne font pas partie du groupe majeur précédemment décrit. Cette situation mérite d'être approfondie pour vérifier si des échanges génétiques même faibles n'ont malgré tout pas lieu entre les isolats provenant de bananiers et ceux issus d'héliconias.

- **Une exploitation bénéfique du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr pour la systématique des *Cylindrocladium***

Le diagnostic des isolats de *Cylindrocladium* non identifiés provenant de bananiers à l'aide des espaceurs de l'ADNr a été rendu possible grâce à la mise en évidence dans ces régions d'un niveau de polymorphisme compatible avec la discrimination d'espèces, par ailleurs connues et acceptées comme telles.

Le locus ITS s'est révélé être plutôt un bon marqueur du genre *Cylindrocladium* que de ses espèces. En effet, le polymorphisme de séquences de cette région a clairement permis de le discriminer d'autres genres voisins au sein des Hypocréales, tels *Cylindrocladiella*, *Curviciadium* ou *Xenocylindrocladium*. Ces résultats ont été confirmés par ceux de Schoch *et al.* (2000). Une séquence consensus a également été déterminée dans le cadre de notre étude. Elle ouvre le champ de la synthèse d'amorces oligonucléotidiques qui soient «genre-spécifique», et donc utilisables en systématique pour la discrimination des champignons du genre *Cylindrocladium* vis à vis d'autres membres de la famille des *Nectriaceae*. Cette région ITS s'est révélée dans le même temps très fortement conservée entre les différentes espèces de *Cylindrocladium* et s'avère donc délicate d'utilisation pour le diagnostic, en particulier au regard du poids potentiel pouvant être pris par les erreurs de séquençage dans un contexte si peu polymorphe. Néanmoins en dépit de ce faible polymorphisme, la région ITS est informative chez plusieurs taxa dont en particulier *Cy. spathiphylli*, ou encore l'espèce *Cy. floridanum sensu lato* chez qui elle comporte par exemple une insertion de 7 nucléotides dont la valeur phylogénétique mérite d'être approfondie.

Le polymorphisme de l'espaceur intergénique IGS n'avait jusqu'à la présente étude, jamais encore été utilisé comme marqueur de la diversité chez le genre *Cylindrocladium*. Nous avons montré que son exploitation par PCR-RFLP constituait un puissant outil de

diagnostic moléculaire des espèces chez ce genre. Fiable, il a permis la confirmation du statut taxinomique d'espèces discriminées par d'autres équipes de recherche sur la base d'autres marqueurs comme par exemple les RFLP ou + récemment d'autres locus (β -tubuline, ...) ainsi que la synonymie de certaines espèces. Il a également permis d'effectuer des corrections taxinomiques pour des isolats mal identifiés. D'une résolution apparemment comparable à celle obtenue par séquençage des gènes de l'histone, de la β -tubuline, ou encore du gène MAT2 (voir les travaux récents de Kang, Crous et Schoch, 2001 ; Schoch *et al.*, 2001), cet outil peut facilement être mis en œuvre, et ce, dans des délais courts, puisque en moins de 36 h la signature moléculaire d'un isolat non identifié de *Cylindrocladium*, en l'occurrence son profil de restriction, peut être obtenue et comparée à d'autres profils connus. Par rapport aux méthodes de séquençage, cet outil de diagnostic des espèces par les IGS a de plus l'avantage de pouvoir être utilisé en routine, ce qui le rend tout à fait indiqué pour un transfert dans les zones de production bananières affectées par des champignons *Cylindrocladium*, mais de façon plus large, dans toutes les régions agricoles confrontées à des cylindrocladioses.

3/ Les perspectives de recherche

Au delà de la nécessité d'échantillonnages géographiques plus larges destinés à préciser les aires de répartition des différentes espèces pathogènes de *Cylindrocladium* inventoriées chez les bananiers, et de l'application de la méthode de diagnostic CAPS de l'IGS dans les zones de production bananière pour l'identification des espèces de *Cylindrocladium* localement présentes, 4 axes principaux de recherche nous paraissent devoir être privilégiés, avec pour certains un développement à court terme, et de possibles applications industrielles :

i) Poursuivre l'analyse de la séquence IGS chez le genre *Cylindrocladium* pour l'optimisation du diagnostic CAPS et la mise au point de test de détection à l'aide d'amorces « espèces-spécifiques »

Les méthodes actuellement utilisées en routine pour l'identification des champignons du genre *Cylindrocladium* reposent essentiellement sur l'isolement de ces champignons à partir d'un organe infecté ou d'un échantillon de sol contaminé (procédure d'isolement direct ou piégeage) suivie d'une caractérisation morpho-taxinomique. Ces procédures sont coûteuses en temps pour la plupart, et fastidieuses pour certaines (isolement direct du sol), sans compter que comme nous l'avons vu, la caractérisation morphologique s'avère souvent insuffisante à elle seule pour une discrimination fiable des espèces. Nous avons montré au cours de la présente étude l'utilité de la région IGS de l'ADNr pour le diagnostic des espèces chez le

genre *Cylindrocladium*. L'exploitation de ce locus pourrait être poursuivie à deux niveaux, sur la base de l'analyse de sa séquence nucléotidique que nous avons démarrée. Un examen et une exploitation approfondis de cette séquence chez quelques isolats judicieusement choisis devraient permettre d'identifier d'autres sites potentiels de restriction utilisables comme marqueurs de la diversité spécifique chez le genre. La carte de restriction de ce locus pourrait ainsi être établie et testée à l'aide des enzymes appropriés sur la base de doubles digestions. Cette démarche contribuerait dans le même temps à optimiser la méthode de diagnostic par PCR-CAPS de l'IGS en augmentant le nombre d'enzymes de restriction révélant du polymorphisme à l'échelle interspécifique.

Mais, l'analyse de la séquence IGS devrait également permettre de développer à très court terme, en l'espace de quelques mois, des amorces oligonucléotidiques qui soient espèces-spécifiques chez le genre *Cylindrocladium*. Une première étape consisterait à en tester expérimentalement la spécificité et l'absence de réaction croisée entre les différentes espèces de *Cylindrocladium*. Cette absence de réaction croisée devra également être établie tant vis à vis de représentants des principaux genres fongiques de la rhizosphère des bananiers, que vis à vis de l'ADN des bananiers eux-mêmes. De telles amorces pourraient alors être utilisées pour des tests de détection *in-planta* à partir d'échantillons végétaux infectés ou supposés comme tels, mais aussi à partir d'échantillons de sol (Volossiouk, Robb et Nazar, 1995 ; Whisson, Herdina et Francis, 1995). Elles faciliteraient ainsi considérablement la détection et l'identification des champignons du genre *Cylindrocladium*. Une fois mises au point et validées, elles pourraient rapidement avoir des applications industrielles (diagnostic, certification sanitaire) tant en bananeraies que sur les marchés de l'agro-foresterie, ou sur ceux de la flore tropicale coupée qui sont rappelons-le également affectés par des cylindrocladioses.

ii) Approfondir l'étude de la variabilité génétique des populations chez les *Cylindrocladium* pathogènes des bananiers en réalisant une première approche de leur structure génétique

Il serait utile de vérifier si la faible diversité génétique observée chez les espèces pathogènes des bananiers *Cy. macrogracile* et *Cy. spathiphylli* se retrouve avec des marqueurs moléculaires neutres de la diversité intraspécifique autres que les RAPD, comme par exemple les marqueurs Rep-PCR, voire même les microsatellites ou les AFLP. Outre, la recherche d'une validation des résultats obtenus par les RAPD, ces autres marqueurs permettraient de jeter les bases d'une première étude de la structure génétique des populations de ces deux espèces. A partir d'échantillonnages adaptés à ce genre d'études, ils renseigneraient sur l'importance des diversités allélique et génotypique entre populations d'origines diverses, ou encore sur l'importance du déséquilibre de liaison permettant par là même d'évaluer le poids

de la recombinaison sexuée ou encore de confirmer si le mode de propagation est essentiellement clonal chez ces champignons. Ils éclaireraient du même coup les stratégies à privilégier dans le cadre d'un éventuel déploiement de la résistance variétale des bananiers.

iii) Acquérir une meilleure connaissance du processus infectieux des bananiers par les champignons du genre *Cylindrocladium*, et mieux cerner les déterminants du pouvoir pathogène des espèces impliquées

Les 2 principales espèces de *Cylindrocladium* à l'origine des lésions racinaires nécrotiques chez les bananiers étant maintenant identifiées, il importe maintenant de comprendre le déroulement du processus infectieux des bananiers. L'identification des différentes phases (pénétration, incubation, latence, évolution des lésions, etc...) de ce processus infectieux et la caractérisation de leur amplitude devraient en effet permettre une standardisation objective des critères d'évaluation des réactions variétales des bananiers vis à vis de ces espèces pathogènes. L'évaluation des possibilités de lutte génétique contre les *Cylindrocladium* pathogènes des bananiers pourra alors être entreprise de façon rationnelle, en travaillant avec des isolats représentatifs de la différenciation génétique observée au sein des populations de *Cy. macrogracile* et *Cy. spathiphylli*.

Il serait utile également de mieux connaître les déterminants du pouvoir pathogène de ces champignons. L'une des premières pistes de recherches pouvant rapidement être explorée est celle des CPS (Cyclic Peptides Synthases), enzymes décrites par Hirota *et al.* (1973) et Nikolskaya *et al.* (1995) comme catalysant chez *Cy. scoparium* et *Cylindrocladium pteridis* la synthèse d'analogues structuraux (tétrapeptides) de la HC toxine. Rappelons que cette toxine (sélective de l'hôte) est connue pour être un déterminant primaire du pouvoir pathogène chez la race 1 de *Cochliobolus carbonum*, champignon pathogène du maïs. Nikolskaya *et al.* (1995) ont développé des amorces oligonucléotidiques dégénérées permettant d'isoler par PCR la famille de gènes codant pour les CPS. Une étude comparative incluant des isolats types de ces 2 espèces et ceux d'autres espèces de *Cylindrocladium*, des représentants des 5 espèces de *Cylindrocladium* trouvés en bananeraies, et enfin des isolats types de genres voisins de *Cylindrocladium* renseignerait déjà efficacement sur la présence ou non de gènes de structure de ces CPS chez différentes espèces du genre *Cylindrocladium*, et chez les genres voisins. La confirmation de la présence de ces gènes chez les espèces de *Cylindrocladium* non pathogènes des bananiers suggérerait déjà que les tétrapeptides dont la synthèse est catalysée par les CPS n'ont pas un rôle majeur dans le pouvoir pathogène chez *Cylindrocladium*.

iv) Etablir la spécificité d'hôtes des espèces de *Cylindrocladium* pathogènes des bananiers en vue d'optimiser la lutte culturale

Si nous avons pu montrer au cours de la présente étude que les isolats de *Cy. spathiphylli* provenant d'héliconias se révèlent peu ou pas pathogènes sur bananier, il serait utile de préciser si les isolats de bananiers se révèlent à leur tour pathogènes ou non sur héliconias ainsi que sur les autres plantes utilisées en rotations culturales assainissantes vis à vis des nématodes du bananier. Parmi ces dernières, il faudrait tester de façon prioritaire la Canne à sucre, l'ananas, et voire même l'espèce fourragère *Digitaria decumbens* que certains producteurs commencent à s'approprier. Une démarche similaire vis à vis de *Cy. macrogracile* permettrait donc d'établir de façon claire le statut et de la spécificité d'hôtes de ces deux espèces et de renseigner par la même occasion sur la pertinence qu'il y a à utiliser certains hôtes dans le cadre de stratégies culturales visant par exemple à réduire les densités de microsclérotos infectieux au champ en évitant les plantes hôtes, ou en recourant à celles induisant une efficacité infectieuse moindre des microsclérotos. Une approche globale des problèmes parasitaires telluriques sur bananier prenant en compte les différentes composantes du complexe parasitaire racinaire serait ainsi enclenchée.

* * *

Références bibliographiques

- Agrios G.** (1988). *Plant Pathology*. New-york, Academic Press. 803 p.
- Ahrazem O., Prieto A., Leal J. A., Gomez-Miranda B., Domenech J., Jimenez-Barbero J. and Bernabé M.** (1997). Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides from the cell-wall of genera *Cylindrocladium* and *Calonectria*. *Carbohydrate Research*, **303**, 67-72.
- Alves-Santos F. M., Benito E. P., Eslava A. E. and Diaz-Minguez J. M.** (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3335-3340.
- Anderson J. B. and Stasovski E.** (1992). Molecular Phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia*, **84**, 505-516.
- Arguedas Gamboa M.** (1996). Inventory of diseases in forest species in Costa-Rica. *Revista Forestal Centroamericana*, **5**, 20-24.
- Avelange I.** (1994). Recherche d'un outil de caractérisation visant à construire une classification phylogénétique englobant l'ensemble des souches de l'espèce *Fusarium oxysporum*. *Thèse de doctorat en Sciences*, Université de Paris Sud, Orsay. 106 p.
- Bakry F., Carreel F., Caruana M. L., Côte F., Jenny C. and Tezenas du Montcel H.** (1997). Les bananiers. In : *L'amélioration des plantes tropicales*. Eds : ORSTOM CIRAD & Montpellier, France. Charrier et al., 109-140.
- Baldrige G. D., Dalton M. W. and Fallon A. M.** (1992). Is high-order structure conserved in eukaryotic ribosomal DNA intergenic spacers? *Journal of Molecular Evolution*, **35**, 514-523.
- Bar D. J. S.** (1981). The phylogenetic and taxonomic implications of flagellar rootlet morphology among zoosporic fungi. *BioSystems*, **14**, 359-370.
- Barron G. L.** (1968). The genera of Hyphomycetes from soil. *Williams and Wilkins, Baltimore*, .
- Bartnicki-Garcia S.** (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual review of Microbiology*, **22**, 87-108.
- Bartnicki-Garcia S.** (1970). Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. In : *Phytochemical phylogeny*. Eds : Harborne. London, Academic Press, 81-103.
- Bentley S., Pegg K. G., Moore N. Y., Davis R. D. and buddenhagen I. W.** (1998). Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by DNA fingerprinting. *Phytopathology*, **88**, 1283-1293.
- Berbee M. L. and Taylor J. W.** (1994). 18S ribosomal DNA sequence data and dating, classifying and ranking the fungi. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.TO., 213-221.
- Beugnon M. and Champion J.** (1966). Etude des racines du bananier. *Fruits*, **21**, 309-327.
- Black M. C. and Beute M. K.** (1984). Different ratios of general : specific virulence variance among isolates of *Cylindrocladium crotalariae* from different peanut genotypes. *Phytopathology*, **74**, 941-945.
- Blackwell M. and Spatafora J. W.** (1994). Molecular data sets and broad taxon sampling in detecting morphological convergence. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.TO., 243-248.
- Blake C. D.** (1961). Root rot of bananas caused by *Radopholus similis* (Cobb) and its control in New South Wales. *Nematologica*, **6**, 295-310.

- Blum L. E. B., Dianese J. C. and Costa C. L.** (1992). Comparative pathology of *Cylindrocladium clavatum* and *C. scoparium* on *Eucalyptus* spp. and screening of *Eucalyptus* provenances for resistance to *Cylindrocladium* damping-off. *Tropical Pest Management*, **38**, 155-159.
- Boedijn K. B. and Reitsma J.** (1950). Notes on the genus *Cylindrocladium*. *Reinwardtia*, **1**, 51-60.
- Boehm E. W. A., Ploetz R. C. and Kistler H. C.** (1994). Statistical analysis of electrophoretic karyotype variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, **7**, 196-207.
- Boesewinkel H. J.** (1981). A new species of *Cylindrocladium* in New Zealand. *Transactions of the British Mycological Society*, **76**, 341-343.
- Boesewinkel H. J.** (1982). *Cylindrocladiella*, a new genus to accommodate *Cylindrocladium parvum* and other small-spored species of *Cylindrocladium*. *Canadian Journal of Botany*, **60**, 2288-2294.
- Booth C. and Stover R. H.** (1974). *Cylindrocarpon musae* sp. nov. commonly associated with burrowing nematode (*Radopholus similis*) lesions on bananas. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **63**, 503-507.
- Booth T. H., Jovanovic T., Old K. M. and Dudzinski M. J.** (2000). Climatic mapping to identify high-risks areas for *Cylindrocladium quinquesepatum* leaf blight on *Eucalyptus* in mainland South East Asia and around the world. *Environmental Pollution*, **108**, 365-372.
- Bouhot D.** (1980). Le potentiel infectieux des sols. *Thèse de Doctorat d'état*, Université de Nancy, 151 p.
- Bounou S., Jabaji-Hare S. H., Hogue R. and Charest P. M.** (1999). Polymerase chain reaction-based assay for specific detection of *Rhizoctonia solani* AG.3 isolates. *Mycological Research*, **103**, 1-8.
- Brasier C. M.** (1997). Fungal species in practice : identifying species units in fungi. In : *The units of biodiversity*. Eds : Claridge et al. Chapman & Hall, 135-170.
- Brasier C. M., Kirk S. A., Pipe N. D. and Buck K. W.** (1998). Rare interspecific hybrids in natural populations of the Dutch Elm Disease *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo ulmi*. *Mycological Research*, **102**, 45-57.
- Brenneman T. B., Padgett G. B. and McDaniel R. G.** (1998). First report of *Cylindrocladium* Black Rot (*C. parasiticum*) on partridgepea and sicklepod. *Plant Disease*, **82**, 1064-1066.
- Bridge P. D. and Arora D. K.** (1998). Interprétation of PCR methods for species definition. In : *Applications of PCR in Mycology*. Eds : Bridge et al. , Wallingford, C.A.B International, 63-84.
- Brun J. and Laville E.** (1965). Etude de la mycoflore des racines du bananier Poyo. *Fruits*, **20**, 123-128.
- Bruns T. D., White T. J. and Taylor J. W.** (1991). Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **22**, 525-564.
- Brygoo Y.** (1991). Vers une nouvelle définition de l'espèce chez les champignons? *Phytoma, la défense des végétaux*, **430**, 27-30.
- Bugnicourt F.** (1939). Les *Fusarium* et *Cylindrocarpon* de l'Indochine. *Encycl. Mycol.*, **11**, 1-206.
- Burdon J. J.** (1993). The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **31**, 305-323.
- Burdon J. J. and Silk J.** (1997). Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*, **87**, 664-669.
- Carlier J.** (1994). Etude de la structure des populations par RFLP de *Mycosphaerella fijiensis*, agent responsable de la maladie des raies noires des bananiers. *Thèse*, Université de Paris XI, 70 p.

- Carlile M. J., Watkinson S. C. and Gooday G. W.** (2001). *The fungi*. Avon, Great Britain, Academic Press. 588 p.
- Castaing V., Beveraggi A., Foure E. and Fogain R.** (1996). Detection of a *Cylindrocladium* sp. in Cameroon. Studies of pathogenic activity and interactions with *R. similis*. *Infomusa*, **5**, 4-7.
- Champion J.** (1963). *Le bananier*. Paris, Maisonneuve et Larose. 263 p
- Cline W. O. and Beute M. K.** (1986). Effect of Metam sodium, peanut genotype and inoculum density on incidence of *Cylindrocladium* black rot. *Peanut Science*, **13**, 41-45.
- Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M., Wagels G. and Brasier C. M.** (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, **30**, 17-32.
- Cracraft J.** (1990). Speciation and its ontology : the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In : *Speciation and its consequences*. Eds : Otte and Endler. Sunderland, Massachusetts, 28-59.
- Crous P. W., Alfenas A. C. and Wingfield M. J.** (1993). *Calonectria scoparia* and *Calonectria morganii* sp. nov. and variation among isolates of their *Cylindrocladium* anamorphs. *Mycological Research*, **97**, 701-708.
- Crous P. W., Janse B. J. H., Victor D. and Alfenas A. C.** (1993). Molecular characterization of *Cylindrocladium* spp. with three-septate conidia and ovoid-like vesicles. *Systematic and Applied Microbiology*, **16**, 266-273.
- Crous P. W., Korf A. and Van Zyl W. H.** (1995). Nuclear DNA polymorphisms of *Cylindrocladium* species with 1-septate conidia and clavate vesicles. *Systematic and Applied Microbiology*, **18**, 244-250.
- Crous P. W., Mchau G. R. A., Van Zyl W. H. and Wingfield M. J.** (1997). New species of *Calonectria* and *Cylindrocladium* isolated from soil in the tropics. *Mycologia*, **89**, 653-660.
- Crous P. W. and Peeraly A.** (1996). *Gliocladosia irregularis* sp. nov. and notes on *Cylindrocladium spathiphylli*. *Mycotaxon*, **LVIII**, 119-128.
- Crous P. W., Philipps A. J. L. and Wingfield M. J.** (1992). Effects of cultural conditions on vesicle and conidium morphology in species of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella*. *Mycologia*, **84**, 497-504.
- Crous P. W., Phillips A. J. L. and Wingfield M. J.** (1993). New records of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* spp. in South Africa. *Plant Pathology*, **42**, 302-305.
- Crous P. W., Theron L. and Van Zyl W. H.** (1997). Delineation of *Cylindrocladium* species with 1-3-septate conidia and clavate vesicles based on morphology and rDNA RFLPs. *Mycological Research*, **101**, 210-214.
- Crous P. W. and Wingfield M. J.** (1993). A re-evaluation of *Cylindrocladiella*, and a comparison with morphological similar genera. *Mycological Research*, **97**, 433-448.
- Crous P. W. and Wingfield M. J.** (1994). A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. *Mycotaxon*, **51**, 341-435.
- Crous P. W., Wingfield M. J. and Alfenas A. C.** (1993). Additions to *Calonectria*. *Mycotaxon*, **XLVI**, 217-234.
- Cruickshank R. H. and Pitt J. I.** (1987). Identification of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* by enzyme electrophoresis. *Mycologia*, **79**, 614-620.
- Darlu P. and Tassy P.** (1993). *Reconstruction phylogénétique*. Paris, France, Masson. 245 p.
- de Vienne D. and Santoni S.** (1998). Les principales sources de marqueurs. In : *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. Eds : de Vienne D. INRA éditions, 200 p.

- Debets A. M.** (1998). Parasexuality in fungi : mechanisms and significance in wild populations. In : *Molecular variability of fungal pathogens*. Eds : Bridge et al. Egham, U.K., C.A.B. International, 41-52.
- Decock C. and Crous P. W.** (1998). *Curvocladium* gen. nov. an new hyphomycete genus from French Guiana. *Mycologia*, **90**, 276-281.
- Decock C., Henebert G. L. and Crous P. W.** (1997). *Nectria serpens* sp. nov. and its hyphomycetous anamorph *Xenocylindrocladium* gen. nov. *Mycological Research*, **101**, 786-790.
- Delvaux B.** (2000). Scientific progress report. In : Alleviating abiotic and biotic soil constraints by combining Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) with banana and plantain micropropagation systems. *CEE ERB IC18 CT97-0208*
- Delvaux B. and Guyot P.** (1989). Caractérisation de l'enracinement du bananier au champ. Incidence sur les relations sol-plante dans les bananeraies intensives de la Martinique. *Fruits*, **44**, 633-647.
- Delvaux B., Perrier X. and Guyot P.** (1990). Diagnostic de la fertilité de systèmes culturaux intensifs à la Martinique. *Fruits*, **45**, 223-236.
- Diomande M. and Beute M. K.** (1981). Effects of *Meloidogyne hapla* and *Macroposthonia ornata* on *Cylindrocladium* black rot of peanut. *Phytopathology*, **71**, 491-496.
- Donoghue M. J.** (1985). A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *The bryologist*, **88**, 172-181.
- Dorel M. and Perrier X.** (1990). Influence du milieu et des techniques culturales sur la productivité des bananeraies de Guadeloupe. *Fruits*, **45**, 237-244.
- dos Santos T. M. C. and de Melo I. S.** (1993). Influence of antagonistic microorganisms on pre- and post-emergence damping-off in *Eucalyptus* caused by *Rhizoctonia solani* and *Cylindrocladium scoparium*. *Summa Phytopathologica*, **19**, 127-129.
- Duchesne L. C. and Anderson J. B.** (1990). Location and direction of transcription of the 5.8S rRNA in *Armillaria*. *Mycological Research*, **94**, 266-269.
- Dumas M.** (2001). Lutte biologique dans les forêts et processus interactifs. *Nouvelles Express*, **5**, 2 p.
- Dumas M. T., Strunz G. M., Boyonosky N. W. and Finlay H. J.** (1996). In vitro interactions between *Cylindrocladium floridanum* and species of *Trichoderma*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **18**, 325-329.
- Duncan J. M., Cooke D., Birch P. and Toth R.** (1998). Molecular variability in sexually reproducing fungal plant pathogens. In : *Molecular variability of fungal pathogens*. Eds : Bridge et al. Egham, U.K. C.A.B. International, 19-39.
- El-Gholl N. E., Alfenas A. C., Crous P. W. and Schubert T. S.** (1992a). Description and pathogenicity of *Cylindrocladium ovatum* sp. nov. *Canadian Journal of Botany*, **71**, 466-470.
- El-Gholl N. E., Alfenas A. C., Junghans D. T., Schubert T. S., Miller J. W. and Leahy R. M.** (1997). Description of *Calonectria rumohrae* sp. nov. (anamorph = *Cylindrocladium rumohrae* sp. nov.). *Mycotaxon*, **LXIV**, 467-484.
- El-Gholl N. E., Alfieri S. A. and Barnard E. L.** (1993). Description and pathogenicity of *Calonectria clavata* sp. nov. *Mycotaxon*, **XLVIII**, 201-216.
- El-Gholl N. E., Kimbrough J. W., Barnard E. L., Alfieri S. A. and Schoulties C. L.** (1986). *Calonectria spathulata* sp. nov. *Mycotaxon*, **26**, 151-164.
- El-Gholl N. E., Leahy R. M. and Schubert T. S.** (1989). *Cylindrocladium leucothoeae* sp. nov. *Canadian Journal of Botany*, **67**, 2529-2532.

- El-Gholl N. E., Uchida J. Y., Alfenas A. C., Schubert T. S., Alfieri J. R. and Chase A. R.** (1992b). Induction and description of perithecia of *Calonectria spathiphylli* sp. nov. *Mycotaxon*, **XI**, 285-300.
- Fagan H., Lubin C. and Williams J.** (1995). Scientific progress report n°2, WINBAN. In : New approaches to develop integrated control of root parasitism for improving the sustainability of banana cropping systems. *C.E.E -TS93-CT92-0104*
- Ferreira M. A. and Dianese J. C.** (1999). Screening soybean germplasm for resistance to *Cylindrocladium clavatum*. *Journal of Pest Management*, **45**, 249-253.
- Fisher N. L., Burgess L. W., Toussoun T. A. and Nelson P. E.** (1982). Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, **72**, 151-153.
- Flor H. H.** (1956). The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*, **8**, 29-54.
- Förster H. and Coffey M. D.** (1993). Molecular taxonomy of *Phytophthora megasperma* based on mitochondrial and nuclear DNA polymorphism. *Mycological Research*, **97**, 1101-1112.
- Förster H., Coffey M. D., Ellwood H. and Sogin M. L.** (1990). Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoospore fungi and implications of fungal evolution. *Mycologia*, **82**, 306-312.
- Förster H., Cummings M. P. and Coffey M. D.** (2000). Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS1 DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI. *Mycological Research*, **104**, 1055-1061.
- Gilson E., Clement J. M., Brutlag D. and Hofnung M.** (1984). A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *EMBO. J.*, **3**, 1417-1421.
- Glass N. L. and Donaldson G.** (1995). Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 1323-1330.
- Glass N. L. and Kuldau G. A.** (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, **30**, 201-224.
- Gold S. E., Garcia-Pedrajas M. D. and Martinez-Espinosa A. D.** (2001). New (and used) approaches to the study of fungal pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*, **39**, 337-365.
- Goodwin D. C. and Lee S. B.** (1993). Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques*, **15**, 438-444.
- Goos R. D. and Timonin M. I.** (1962). Fungi from the rhizosphere of banana in Honduras. *Canadian Journal of Botany*, **40**, 1371-1377.
- Gordon T. R. and Martyn R. D.** (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, 111-128.
- Gowen S. and Queneherve P.** (1990). Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. In : *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Eds : Luc et al. Wallingford, Oxon, U.K., C. A. B. International, 431-460.
- Grandi R. A. P. and Attili D. S.** (1996). Hyphomycetes on *Alcornea triplinervia* (Spreng.) Muell. Arg. leaf litter from the Ecological Reserve Jureia-Itatins, State of Sao-Paulo, Brazil. *Mycotaxon*, **60**, 373-386.
- Groppe K. and Boiler T.** (1997). PCR assay based on a microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epichloe* endophytes in grass tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1543-1550.
- Hamelin R. C., Bérubé P., Gignac M. and Bourassa M.** (1996). Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 4026-4031.

- Hawksworth D. L.** (1991). The fungal dimension of biodiversity : magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, **95**, 641-655.
- Hawksworth D. L.**, Ed. (1994). *Ascomycets systematics : Problems and perspectives in the nineties*. Egham, Surrey, I.M.I and N.A.T.O. 453 p.
- Hawksworth D. L.** (2001). The magnitude of fungal diversity : the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, **12**, 1422-1432.
- Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C. and Pegler D. N.** (1995). Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. Wallingford, Oxon, C.A.B. International.
- Hawksworth D. L. and Mouchacca J.** (1994). Ascomycete systematics in the nineties. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.T.O., 3-11.
- Hennig B.** (1966). Phylogenetics systematics, University of Illinois Press, Urbana.
- Henson J. M. and French R.** (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, **31**, 81-109.
- Hibbett D. S. and Donoghue M. J.** (1998). Integrating phylogenetic analysis and classification in fungi. *Mycologia*, **90**, 347-356.
- Hillis D. M. and Dixon M. T.** (1991). Ribosomal DNA : Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, **66**, 411-453.
- Hirota A., Suzuki A. and Tamura S.** (1973). Characterization of four amino-acids constituting Cyl-2, a metabolite from *Cylindrocladium scoparium*. *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1185-1189.
- Hulton C. S. J., Higgins C. F. and Sharp P. M.** (1991). ERIC sequences : a novel family of repetitive elements in the genomics of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, **5**, 825-834.
- Hwang S. C. and Ko W. H.** (1975). Biology of conidia, ascospores, and microsclerotia of *Calonectria crotalariae* in soil. *Phytopathology*, **66**, 51-54.
- Ichihara A., Katayama K., Teshima H., Oikawa H. and Sakamura S.** (1996). Chaetoglobosin O and other phytotoxic metabolites from *Cylindrocladium floridanum*, a causal fungus of Alfafa black rot disease. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **60**, 360-361.
- Jayasinghe C. K. and Wijesundera R. L. C.** (1995). In vitro evaluation of fungicides against clove isolates of *Cylindrocladium quinquesepatum* in Sri Lanka. *International Journal of Pest Management*, **41**, 219-223.
- Jedryczka M., Ouxel T. and Balesdent M. H.** (1999). Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 813-823.
- Jeng R. S., Dumas M., Liu F. H., Wang C. L. and Hubbes M.** (1997). DNA analysis of *Cylindrocladium floridanum* isolates from selected forest nurseries. *Mycological Research*, **101**, 285-291.
- Jenny C., Carreel F., Tomekpe K., Perrier X., Dubois C., Horry J. P. and Tezenas du Montcel H.** (1999). Les bananiers. In : *Diversité génétique des plantes cultivées*. Eds : Hamon et al. Montpellier, France, 113-139.
- Jones D. R.** (1999). Fungal diseases of the root, corm and pseudostem - *Rosellinia* root and corm rot. In : *Diseases of Banana, Abaca and Enset*. Eds : Jones D.R. Worcestershire, U.K., C.A.B. International, p 159.
- Jones D. R. and Stover R. H.** (1999). Fungal diseases of the root, corm and pseudostem - *Armillaria* corm rot. In : *Diseases of Banana, Abaca and Enset*. Eds : Jones D.R. Worcestershire, U.K., C.A.B. International, p 359.

- Kang J. C., Crous P. W. and Schoch C. L.** (2001). Species concepts in the *Cylindrocladium floridanum* and *Cy. spathiphylli* complexes (Hypocreaceae) based on multi-allelic sequence data, sexual compatibility and morphology. *Systematic and Applied Microbiology*, **24**, 206-217.
- Kaushik J. C. and Gupta V. K.** (1992). Production of toxic metabolite by *Cylindrocladium quiqueseptatum* causing seedling blight of *Eucalyptus*. *Plant Disease Research*, **07**, 70-72.
- Kimbrough J. W.** (1994). Septal ultrastructure and ascomycete systematics. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.T.O., 127-141.
- Kistler H. C.** (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **87**, 474-479.
- Kistler H. C. and Miao V. P. W.** (1992). New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annual review of Phytopathology*, **30**, 131-152.
- Kobenan K.** (1991). Parasites et ravageurs des bananiers en Côte d'Ivoire. *Fruits*, **46**, 633-641.
- Kucharek T. A., Atkins J. and Hoover R.** (1995). Suppression of white mold and *Cylindrocladium* black rot in peanut with Fluzinam. *Proceedings of the Soil and Crop Science Society of Florida*, **54**, 36-41
- Kucharek T. A., Atkins J. D., D.W. G. and Kemerait R. C.** (2000). The performance of selected genotypes of peanut to natural inocula of *Cylindrocladium* black rot and tomato spotted wilt virus in Florida. *Soil and Science Crop*, **59**, 72-76.
- Kuske C. R., Banton K. L., Adorada D. L., Stark P. C., Hill K. K. and Jackson P. J.** (1998). Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 2463-2472.
- Laflamme P., Benhamou N., Bussièrès G. and Dessureault M.** (1999). Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany*, **77**, 1460-1468.
- Lassoudière A.** (1978). Quelques aspects de la croissance et du développement du bananier Poyo en Côte d'Ivoire. Le système radical. *Fruits*, **33**, 314-338.
- Lee S. B. and Taylor J. W.** (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *J. Mol. Evol.*, **9**, 636-653.
- Lescot T.** (2000). Banane : Production, commerce et variétés. *Fruitrop*, **75**, 1-5.
- Letrouit-Galinou M. A., Parguey-Leduc A. and Janex-Favre M. C.** (1994). Ascoma structure and ontogenesis in ascomycete systematics. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.T.O., 23-36.
- Leung H., Nelson R. J. and Leach J. E.** (1993). Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Advances in Plant Pathology*, **10**, 157-205.
- Liew E. C. Y., Maclean D. J. and Irwin J. A. G.** (1998). Specific based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mycological Research*, **102**, 73-80.
- Loridat P.** (1986). Contribution à l'étude des facteurs limitant le rendement en bananeraie martiniquaise. *M. Sc*, Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture de Versailles, France, 69 p.
- Loridat P.** (1989). Etude la microflore fongique et des nématodes associés aux nécroses de l'appareil souterrain du bananier en Martinique. Mise en évidence du pouvoir pathogène du genre *Cylindrocladium*. *Fruits*, **44**, 587-597.

- Loridat P. and Ganry J.** (1991). Mise en évidence d'une interaction nématode-champignon (*Radopholus similis* - *Cylindrocladium sp.*) comme composante du parasitisme tellurique des bananiers en culture intensive aux Antilles, **Proceedings of the 9th ACORBAT Meeting, Maracaibo, Vénézuéla**, 283-305
- Louanchi M.** (1993). Contribution à l'étude de *Rigidoporus lignosus* agent du pourridié blanc des racines d'*hevea brasiliensis*: étude de la diversité génétique des populations et détection par les méthodes enzymatiques. *Thèse de Doctorat en Sciences*, Université de Paris-Sud, Orsay. 103 p.
- Maclean D. J., Braithwaite K. S., Manners J. M. and Irwin J. A. G.** (1993). How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis? *Advances in Plant Pathology*, **10**, 207-244.
- Man in't Veld W. A., Veenbaas-Rijks W. J., Ilieva E., de Cock A. W., Bonants P. J. M. and Pieters R.** (1998). Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology*, **88**, 922-929.
- Mantle P. G.** (1994). Secondary metabolites of some non-lichenized ascomycetes. In : *Ascoma structure and ontogenesis in ascomycete systematics*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.TO., 145-153.
- Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenbeck R., Morrison D. A., Boulnois G. J. and Claverys J. P.** (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, **20**, 3479-3483.
- Martin R. R., James D. and Lévesque C. A.** (2000). Impacts of molecular diagnostic on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology*, **38**, 207-239.
- Masel A., Braithwaite K. S., Irwin J. A. G. and Manners J. M.** (1990). Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Current Genetics*, **18**, 81-86.
- Mateille T. and Folkertsma S.** (1991). A survey of nematodes and fungi in roots of banana cv. Poyo in the Ivory Coast. *Revue Nématol.*, **14**, 3-8.
- Mayr E.** (1982). The growth of biological thought. Diversity, evolution and inheritance. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.
- McDermott J. M. and McDonald B. A.** (1993). Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology*, **31**, 353-373.
- McDonald B. A.** (1997). The population genetics of fungi : tools and fungi. *Phytopathology*, **87**, 448-453.
- McDonald B. A. and McDermott J. M.** (1993). Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*, **Bioscience43**, 311-319.
- Messiaen C. M. and Laffont R.** (1970). Les maladies des plantes maraîchères. Seconde ed, Editions INRA. 441 p
- Michelmore R. W. and Hulbert S. H.** (1987). Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, **25**, 383-404.
- Milgroom M. G. and Fry W. E.** (1997). Contributions of population genetics to plant disease epidemiology. *Advances in Botanical Research*, **24**, 1-30.
- Mills P. R., Sreenivasaprasad S. and Muthumeenakshi S.** (1998). Assessing diversity in *Colletotrichum* and *Trichoderma* species using molecular markers. In : *Molecular variability of fungal pathogens*. Eds : Bridge et al. Egham, U.K. C.A.B. International, 105-120.
- Mills S. D., Förster H. and Coffey M. D.** (1991). Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analysis. *Mycological Research*, **95**, 31-48.

- Morgan A. P.** (1892). Two new genera of Hyphomycetes. *Botanical Gazette*, **17**, 190-192.
- Morin C., Samson J. and Dessureault M.** (1999). Protection of black spruce seedlings against *Cylindrocladium* root rot with ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany*, **77**, 169-174.
- Moukhamedov R., Hu X., Nazar R. N. and Robb J.** (1994). Use of Polymerase Chain Reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology*, **84**, 256-259.
- Mugnier J.** (1998). Molecular evolution and phylogenetic implications of ITS sequences in plant and fungi. In : *Molecular variability of fungal pathogens*. Eds : Bridge et al. Egham, U.K., C.A.B. International, 253-277.
- Mutasa E. S., Chwarszczynska D. M. and Asher M. J. C.** (1996). Single-tube, nested PCR for the diagnostic of *Polymyxa betae* in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. *Phytopathology*, **86**, 493-497.
- Nazar R. N., Robb E. J., Hu X., Volossiuk T. and Lee S. W.** (1997). Development of PCR-based diagnostics for soilborne plant pathogens. *J. Plant Biol.*, **40**, 176-181.
- Nei M. and Li W. H.** (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 5269-5273.
- Nelson P. E., Toussoun T. A. and Marasas W. F. O.** (1983). *Fusarium* species : An illustrated manual for identification. University Park, State Univ. Press. 193 p.
- Nikolskaya A., Panaccione D. G. and Walton J. D.** (1995). Identification of peptide synthase-encoding genes from filamentous fungi producing host-selective phytotoxins or analogs. *Gene*, **165**, 207-211.
- Nuss D. L.** (1993). Biological control of chestnut blight : an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews*, **56**, 561-573.
- O'Donnell K. and Cigelnick E.** (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **7**, 103-116.
- O'Donnell K., Kistler H. C., Cigelnick E. and Ploetz R. C.** (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana : concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2044-2049.
- Ogoshi A.** (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology*, **12**, 125-143.
- Parguey-Leduc A., Janex-Favre M. C., Letrouit-Galinou M. A. and Bellemère A.** (1994). M. Chadeffaud and ascomycete systematics. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.TO., 37-41.
- Peerally A.** (1991). The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. *Mycotaxon*, **40**, 323-366.
- Perrier X., Flori A. and Bonnot F.** (1999). Les méthodes d'analyse des données. In : *Diversité génétique des plantes cultivées*. Eds : Hamon et al. Montpellier, France, 43-76.
- Philippeau G.** (1986). Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales? Paris, Institut Technique des Céréales et Fourrages. 63 p
- Phipps P. M. and Beute M. K.** (1997). *Cylindrocladium* black rot. In : *Compendium of Peanut diseases*. Eds : Amer. Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Phipps P. M., Beute M. K. and Barker K. R.** (1976). An elutriation method for quantitative isolation of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia from peanut field soil. *Phytopathology*, **66**, 1255-1259.

- Ploetz R. C. and Pegg K. G.** (1999). Fungal diseases of the root, corm and pseudostem - *Fusarium* Wilt. In : *Diseases of Banana, Abaca and Enset*. Eds : D.R. Jones. Worcestershire, U.K., C.A.B. International, 143-159.
- Porter D. M., Wright F. S., Taber R. A. and Smith D. H.** (1991). Colonization of peanut seed by *Cylindrocladium crotalariae*. *Phytopathology*, **81**, 896-900.
- Price N. S.** (1995). Banana morphology - Part I : roots and rhizomes. In : *Bananas and Plantains*. Eds : Gowen Chapman et al. London, 179-189.
- Price P. W.** (1987). Evolutionary perspectives on host plants and their parasites. *Advances in Plant Pathology*, **8**, 1-30.
- Pringles R. B. and Scheffer R. P.** (1967). Isolation of the host specific toxin and a related substance with nonspecific toxicity from *Helminthosporium carbonum*. *Phytopathology*, **57**, 1169-1172.
- Puhalla J. E.** (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, **63**, 179-183.
- Rafin C., Brygoo Y. and Tirilly Y.** (1995). Restriction analysis of amplified ribosomal DNA of *Pythium* spp. isolated from soilless culture systems. *Mycological Research*, **99**, 277-281.
- Reddy M. S.** (1997). Status on commercial development of *Burkholderia cepacia* for biological control of fungal pathogens and growth enhancement of conifer seedlings for a global market. *U.S. Forest Service General Technical Report, PNW 0*, 235-244.
- Riopel J. L.** (1966). The distribution of lateral roots of *Musa acuminata* cv Gros-Michel. *American Journal of Botany*, **53**, 403-407.
- Risède J. M.** (1994). Eléments de caractérisation de *Cylindrocladium* sp. agent de nécroses racinaires du bananier en Martinique. *Fruits*, **49**, 167-178.
- Risède J. M.** (1995). Scientific progress report n°2, CIRAD. In : New approaches to develop integrated control of root parasitism for improving the sustainability of banana cropping systems. *C.E.E -TS93-CT92-0104*
- Risède J. M. and Simoneau P.** (2001). Typing *Cylindrocladium* species by analysis of ribosomal DNA spacers polymorphism : application to field isolates from the banana rhizosphere. *Mycologia*, **93**, 494-504.
- Rossman A. Y.** (1979). *Calonectria* and its type species, *C. daldiniana*, a later synonym of *C. pyrochroa*. *Mycotaxon*, **8**, 321-328.
- Rossman A. Y.** (1983). The phragmosporus species of *Nectria* and related genera. *Mycological Papers*, **150**, 1-164.
- Rossman A. Y.** (1994). The need for identification services in agriculture. In : *The identification and characterization of pest organisms*. Eds : D.L. Hawsworth. Wallingford, C.A.B. International, 35-46.
- Rowe R. C. and Beute M. K.** (1975). Variability of virulence of *Cylindrocladium crotalariae* isolates on peanut. *Phytopathology*, **65**, 422-425.
- Rowe R. C., Beute M. K. and Wells J. C.** (1973). *Cylindrocladium* Black Rot of Peanuts in North Carolina in 1972. *Plant Disease Reporter*, **57**, 387-389.
- Rowe R. C., Johnston S. A. and Beute M. K.** (1974). Formation and dispersal of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia in infected peanuts roots. *Phytopathology*, **64**, 1294-1297.
- Saiki R. K., Scharf F., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. and Arnheim N.** (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.

- Saitou N. and Nei M.** (1957). The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Salazar O., Schneider J. H. M., Julian M. C., Keijer J. and Rubio V.** (1999). Phylogenetic subgrouping of *Rhizoctonia solani* AG2 based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*, **91**, 459-467.
- Samuels G. J. and Seifert K. A.** (1995). The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, **33**, 37-67.
- Saunders J. E., Juzwik J. and Hutchinson R.** (1992). Outplanting survival of *Cylindrocladium* root rot affected black spruce seedlings. *Can. J. For. Res.*, **22**, 1204-1207.
- Schadeck S.** (1997). Scientific progress report n°4, UCL. In : New approaches to develop integrated control of root parasitism for improving the sustainability of banana cropping systems. *C.E.E -TS93-CT92-0104*
- Schadeck S. and Risède J. M.** (1997). Scientific progress report n°4, UCL & CIRAD. In : New approaches to develop integrated control of root parasitism for improving the sustainability of banana cropping systems. *C.E.E -TS93-CT92-0104*
- Schoch C. L. and Crous P. W.** (1999). First report of *Cylindrocladium* root and petiole rot to *Spathiphyllum* in South Africa. *South African Journal of Botany*, **65**, 208-211.
- Schoch C. L., Crous P. W., Wingfield B. D. and Wingfield M. J.** (1999). The *Cylindrocladium candelabrum* species complex includes four distinct mating populations. *Mycologia*, **91**, 286-298.
- Schoch C. L., Crous P. W., Wingfield B. D. and Wingfield M. J.** (2001). Phylogeny of *Calonectria* based on comparisons of β -tubulin DNA sequences. *Mycological Research*, **105**, 1045-1052.
- Schoch C. L., Crous P. W., Wingfield M. J. and Wingfield B. D.** (2000a). Phylogeny of *Calonectria* and selected hypocrealean genera with cylindrical macroconidia. *Studies in Mycology*, **45**, 45-62.
- Schoch C. L., Crous P. W., Witthuhn R. C., Cronwright G., El-Gholl N. E. and Wingfield B. D.** (2000b). Recombination in *Calonectria morgani* and phylogeny with other heterothallic small-spored *Calonectria* species. *Mycologia*, **92**, 665-673.
- Schouties C. L., El-Gholl N. E. and Alfieri S. A.** (1982). *Cylindrocladium spathiphylli* sp. nov. *Mycotaxon*, **XVI**, 265-272.
- Seifert K. A., Wingfield B. D. and Wingfield M. J.** (1995). A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 760-767.
- Semer C. R., Mitchell D. J., Mitchell M. E., Martin F. R. and Alfenas A. C.** (1987). Isolation, identification and chemical control of *Cylindrocladium musae* sp. nov. associated with toppling disease of banana. *Phytopathology*, **77**, p. 1729, Abstr. of Pres. of the annual meeting of Amer. Phyto. Soc.
- Sidebottom J. R. and Beute M. K.** (1989a). Inducing soil suppression to *Cylindrocladium* black rot of peanut through crop rotation with soybean. *Plant Disease*, **73**, 679-685.
- Sidebottom J. R. and Beute M. K.** (1989b). Control of *Cylindrocladium* black rot of peanut with cultural practices that modify soil temperature. *Plant Disease*, **73**, 672-676.
- Simon L., Lalonde M. and Bruns T. D.** (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 291-295.
- Sobers E. K. and Alfieri S. A.** (1972). Species of *Cylindrocladium* and their hosts in Florida and Georgia. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, **85**, 366-369
- Sokal R. R. R. and Michener C. D.** (1958). A statistical method for evaluation of systematic relationships. *Univ. Kansas Science Bulletin*, **38**, 1409-1438.

- Sone T., Fukiya S., Kodama M. and Tomita F.** (2000). Molecular structure of rDNA repeat unit in *Magnaporthe grisea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **64**, 1733-1736.
- Spatafora J. W. and Blackwell M.** (1994). Cladistics analysis of partial ssrDNA sequences among unitunicate perithecial ascomycetes and its implications on the centrum development. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.TO., 233-242.
- Steiner G. W. and Watson R. D.** (1965). Use of surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology*, **55**, 728-730.
- Stover R. H.** (1966). Fungi associated with nematode and non nematode lesions on banana roots. *Canadian Journal of Botany*, **44**, 1703-1710.
- Stover R. H. and Simmonds N. W.** (1987). Bananas. Essex, Longman. Third edition. 468 p
- Sutra L., Risède J. M. and Gardan L.** (2000). Isolation of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrotizing fungi. *Letters in applied Microbiology*, **31**, 289-293.
- Tantaoui A., Ouinten M., Geiger J. P. and Fernandez D.** (1996). Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* causing Bayoud disease of date palm in Morocco. *Phytopathology*, **86**, 787-792.
- Taylor J. W., Jacobson D. J. and Fisher M. C.** (1999). The evolution of asexual fungi : reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, **37**, 197-246.
- Taylor J. W., Swann E. and Berbee M. L.** (1994). Molecular evolution of ascomycete fungi : phylogeny and conflict. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.TO., 201-212.
- Tehler A.** (1994). Cladistic analysis in ascomycete systematics : Theory and practice. In : *Ascomycete systematics : problems and perspectives in the nineties*. Eds : Hawksworth D.L. Egham, Surrey, U.K., I.M.I. and N.A.TO., 185-197.
- Thies W. G. and Patton R. F.** (1970). Biology of *Cylindrocladium scoparium* in Wisconsin forest tree nurseries. *Phytopathology*, **60**, 1662-1668.
- Tooley P. W., Goley E. D., Carras M. M., Frederick R. D. and Weber E. L.** (2001). Characterization of *Claviceps* species pathogenic on sorghum by sequence analysis of the β -tubulin gene intron 3 region and EF-1 alpha gene intron 4. *Mycologia*, **93**, 541-551.
- Tozetto L. and Ribeiro W. R. C.** (1996). Leaf spots of mangoes caused by *Cylindrocladium scoparium* in central Brazil. *J. Phytopathology*, **144**, 471-472.
- Turgeon B. G.** (1998). Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology*, **36**, 115-137.
- Uchida J. Y.** (1989). *Cylindrocladium* rot of *Spathiphyllum*. *HITAHR Brief*, **78**, 1-4.
- Uchida J. Y. and Aragaki M.** (1992). Further characterization of *Cylindrocladium spathiphylli* from *Spathiphyllum* in Hawaii and Florida. *Mycologia*, **84**, 810-814.
- Uchida J. Y., Aragaki M. and Yahata P. S.** (1989). Heliconia root rot and foliar blight caused by *Cylindrocladium*. *HITAHR Brief*, **85**, 2 p.
- Valent B., Crawford M. S., Weaver C. G. and Chumley F. G.** (1986). Genetic studies of fertility and pathogenicity in *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*). *Iowa State Journal of Research*, **60**, 569-594.
- van't Hof J. and Lamm S. S.** (1991). Single stranded replication intermediates of ribosomal DNA replicons of pea. *EMBO J.*, **10**, 1949-1953.

- Victor D., Crous P. W., Janse B. J. H. and Wingfield M. J.** (1997). Genetic variation in *Cylindrocladium floridanum* and other morphological similar *Cylindrocladium* species. *Systematic and Applied Microbiology*, **20**, 268-285.
- Vilgalys R. and Cubeta M. A.** (1994). Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology*, **32**, 135-155.
- Viljoen A., Wingfield M. J. and Crous P. W.** (1992). Fungal pathogens in *Pinus* and *Eucalyptus* seedling nurseries in South Africa : a review. *South African Forestry Journal*, **161**, 45-51.
- Volossiouk T., Robb E. J. and Nazar R. N.** (1995). Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3972-3976.
- von Wallbrunn C., Luftmann H., Bergander K. and Meinhardt F.** (2001). Phytotoxic chaetoglobosins are produced by the plant pathogen *Calonectria morgani* (Anamorph *Cylindrocladium scoparium*). *Journal of general and applied microbiology*, **47**, 33-38.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kupier M. and Zabeau M.** (1995). AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414.
- Waipara N. W., di Menna M. E., Cole A. L. J. and Skipp R. A.** (1996). Pathogenicity of *Cylindrocladium scoparium* to pasture clover and grass species. *Australasian Plant Pathology*, **25**, 205-211.
- Walton D. J., Earle E. D. and Gibson B. W.** (1982). Purification and structure of the host-specific toxin from *Helminthosporium carbonum* race 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **107**, 785-794.
- Waterhouse G. M.** (1963). Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycology Paper*, **92**, 22 p. C.M.I. Kew. U.K.
- Weerakoon N. D., Roberts J. K., Lehnen L. P., Wilkinson J. M., Marshall J. S. and Hardham A. R.** (1998). Isolation and characterization of the single β -tubulin gene in *Phytophthora cinnamomi*. *Mycologia*, **90**, 85-95.
- Whisson D. L., Herdina L. and Francis L.** (1995). Detection of *Rhizoctonia solani* AG-8 in soil using a specific DNA probe. *Mycological Research*, **99**, 1299-1302.
- White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : *PCR protocols : A guide to methods and applications*. Eds : Innis et al. London, Academic Press, 315-322.
- Whittaker R. H.** (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, **163**, 150-160.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. and Tinguey S. V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 6531-6535.
- Witthuhn R. C., Wingfield B. D., Wingfield M. J. and Harrington T. C.** (1999). PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis sensu stricto*. *Mycological Research*, **103**, 743-749.
- Woo S. H., Noviello C. and Lorito M.** (1998). Sources of molecular variability and applications in characterization of the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. In : *Molecular variability of fungal pathogens*. Eds : Bridge et al. Egham, U.K., C.A.B. International, 187-208.
- Zolan M. E.** (1995). Chromosome length polymorphism in fungi. *Microbiol. Rev.*, **59**, 686-698.
- Zumpetta G. M.** (1976). An electrophoretic study of the genus *Cylindrocladium* as a possible taxonomic tool. *M.Sc. Thesis*, California State College, California, Pennsylvania. 91 p.

RESUME : Des champignons filamenteux du genre *Cylindrocladium* sont impliqués en bananeraies dans le déterminisme de lésions racinaires qui altèrent l'ancrage des plants et provoquent leur chute. Ils n'ont pourtant jamais fait l'objet d'un diagnostic précis, probablement du fait de la difficulté à discriminer les espèces chez ce genre. Une étude multicritère de diversité a donc été réalisée afin de caractériser les espèces impliquées chez le bananier, et d'en développer une méthode de diagnostic moléculaire qui soit rapide et fiable.

L'analyse phénotypique et biologique a dégagé une structuration des isolats présents en bananeraies en 5 morphotypes. Leur distribution géographique est variable. Les isolats des morphotypes MT1, MT3 à M5 ont des caractéristiques les rapprochant de différents complexes d'espèces similaires sur le plan morphologique, mais ne permettant pas de les identifier clairement. Ceux du morphotype MT2 paraissent appartenir à l'espèce *Cy. spathiphylli*.

L'analyse du polymorphisme des espaceurs de l'ADNr après amplification PCR révèle que la région ITS est très fortement conservée chez le genre *Cylindrocladium* et que la région IGS contient un polymorphisme compatible avec la discrimination des espèces. La caractérisation de l'IGS par CAPS constitue un solide outil de diagnostic moléculaire des espèces de *Cylindrocladium*, rapide et simple à mettre en œuvre, facilement transférable en zones de production. Elle indique que les isolats MT2 et MT5 sont respectivement conspécifiques aux espèces *Cy. spathiphylli* et *Cy. gracile*, alors que les isolats MT3 et MT4 s'apparentent respectivement aux espèces *Cy. scoparium* et *Cy. floridanum sensu lato*. Les isolats MT1 apparaissent proches de l'espèce *Cy. gracile* malgré un phénotype atypique. Les marqueurs RAPD révèlent qu'ils n'ont que 60% de similarité génétique avec *Cy. gracile*, ce qui compte-tenu de l'ensemble de leurs caractéristiques a amené à les ériger en une espèce proche mais différente, dénommée *Cy. macrogracile*.

L'évaluation du pouvoir pathogène sur bananier de ces 5 taxa fait apparaître que les espèces *Cy. spathiphylli* et *Cy. macrogracile* sont respectivement fortement et moyennement agressives sur la variété Grande-Naine (AAA). Les 3 autres espèces sont peu ou pas pathogènes. L'inoculation de 6 géotypes différents de bananiers révèle des différences marquées de sensibilité, mais pas de vraies interactions différentielles isolats * géotypes.

Les marqueurs RAPD indiquent de plus une faible variabilité génétique au sein des espèces *Cy. spathiphylli* et *Cy. macrogracile* trouvées en bananeraies, ce qui suggère une propagation clonale. Chez *Cy. spathiphylli*, une partition selon l'hôte d'origine sépare les isolats « bananiers » d'autres collectés sur héliconias. Elle s'illustre à des degrés divers par le polymorphisme des espaceurs de l'ADNr, les marqueurs RAPD et le pouvoir pathogène sur bananier.

Ces travaux déterminent plusieurs perspectives de recherches en particulier celle d'une définition rapide, à partir de l'IGS, d'amorces oligonucléotidiques espèces-spécifiques qui faciliteraient encore l'identification de ces champignons et permettraient le développement de tests de détection à partir d'échantillons végétaux ou de sol.

DISCIPLINE : Pathologie végétale

MOTS-CLES : *Cylindrocladium*, bananier, *Calonectria*, diversité, ITS, IGS, RAPD, CAPS, agressivité

LABORATOIRE D'ACCUEIL : CIRAD, Station de Neufchâteau, Laboratoire de Pathologie végétale, 97130 Capesterre Belle-Eau, Guadeloupe.

Analysis of diversity within the fungal genus *Cylindrocladium* : application to the phenotypic, molecular and pathogenic characterization of isolates from the banana rhizosphere

ABSTRACT : Filamentous fungi of the genus *Cylindrocladium* are known since many years to be partly responsible for root necrotic lesions that induce root breakage and toppling disease in banana cropping systems. Until now the implicated taxa have never been typed probably because species are difficult to identify in this genus. Consequently a multiphasic diversity study aimed at characterizing these species and developing a molecular diagnostic tool of *Cylindrocladium* species was undertaken.

Phenotypic and biological analysis of *Cylindrocladium* isolates from the banana rhizosphere yielded a structuration according to 5 morphotypes with different geographical distribution. Isolates from MT1, MT3, MT4 and MT5 morphotypes could not be clearly identified by their phenotypic traits because of their similarity with different complexes of morphologically similar species. MT2 isolates seemed to be conspecific with the species *Cy. spathiphylli*.

Analysis of ribosomal DNA spacers polymorphism pointed out the conserved nature of ITS region in the genus *Cylindrocladium* whereas the IGS region displayed polymorphism that can easily be used for discrimination of species. CAPS on the amplified intergenic spacer represents a rapid and reliable molecular diagnostic tool of *Cylindrocladium* species that can easily be transferred in banana producing zones. It revealed that MT2 and MT5 isolates are respectively conspecific with the species *Cy. spathiphylli* and *Cy. gracile* while MT3 and MT4 are related to the species *Cy. scoparium* and *Cy. floridanum sensu lato*. Despite their atypical phenotype, MT1 isolates were shown to be closely related to the species *Cy. gracile*. RAPD markers revealed that they only have 60% genetic similarity with this species. Taking into account their overall characteristics, they were further recognized as a related undescribed species called *Cy. macrogracile*.

Pathogenicity evaluation of these 5 taxa towards banana yielded that *Cy. spathiphylli* and *Cy. macrogracile* as respectively highly and moderately aggressive on the variety Grande-Naine (AAA). The 3 other species showed weak to no pathogenicity. Inoculation of 6 different banana genotypes revealed significant differences in susceptibility, but no true differential interactions between isolates and banana genotypes.

RAPD markers also indicated a low genetic variation within the species *Cy. spathiphylli* and *Cy. macrogracile* therefore suggesting their possible clonal propagation in banana cropping systems. Within *Cy. spathiphylli* a partition according to host separated isolates originating from bananas to those coming from heliconias. This partition was illustrated at different levels by rDNA spacers polymorphism, RAPD markers and pathogenicity on bananas.

This study offers many challenging research perspectives among which the possibility to develop from the IGS region species-specific PCR primers that could further simplify identification of these fungi and favour the development of detection tests from plant or soil samples.

KEY WORDS : *Cylindrocladium*, banana, *Calonectria*, diversity, ITS, IGS, CAPS, RAPD, aggressiveness