

ETUDE DE LA SENSIBILITE DE QUELQUES PLANTES MARAICHERES A *PHOMA SABDARIFFAE* ET A SES PRODUCTIONS TOXIQUES AU GABON.

Alexis Nicaise Lpengue

Laboratoire de Physiologie végétale, Phytopathologie et Amélioration des plantes

Jean Fabrice Yala

Laboratoire de Microbiologie

B. Ibrahim

Alain Souza

Bertrand M'batchi

Laboratoire de Physiologie animale et Pharmacologie

Unité de recherche Agrobiologie,

Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM), Gabon

Abstract

Phoma sabdariffae is the main pathogenic fungus agent of roselle in Gabon. This fungus affects plants by producing toxic compounds. The present work was undertaken in order to study the sensitivity of other vegetables to this fungus and its toxins. The susceptibility of 11 plants, which were cultivated for 40 days in a greenhouse, was also tested by measuring infection indices (*i*) and electrolytes release (*le*) rate. Results showed that, beside the roselle, all other plants are not sensitive to *Phoma sabdariffae*. In fact, no wet rot nor shape reduction was noticed in tested plants. However, all 11 vegetables were sensitive to this fungus culture filtrate, with electrolytes release rate superior to 90%. It then appears that *Phoma sabdariffae* is strictly linked to the roselle, while all its toxic excretions are not host specific, with a broad spectrum activity on other plants.

Keywords: *Phoma sabdariffae*, Toxins, Plants, Susceptibility, Specificity

Resume

Phoma sabdariffae est l'agent pathogène responsable de la pourriture humide de la roselle au Gabon. Son action repose sur l'excrétion de substances toxiques. Le présent travail

a été initié pour étudier la sensibilité d'autres plantes maraîchères à ce champignon, ou à ses productions toxiques. Les effets ont été mesurés par les indices d'infection (*i*) et les taux de libération d'électrolytes (*le*) de 11 plantes préalablement cultivées en serre pendant 40 jours. Les résultats obtenus ont révélé qu'à l'exception de la roselle, toutes les autres plantes maraîchères sont insensibles à *Phoma sabdariffae*. Elles n'ont présenté aucun symptôme typique de pourriture humide, ni subi des réductions morphométriques de croissance. Toutes les plantes se sont en revanche montrées sensibles au filtrat de culture de ce champignon, avec des taux de libération d'électrolytes supérieurs à 90%. *Phoma sabdariffae* semble donc strictement inféodé à la roselle, alors que ses productions toxiques seraient de type non hôte spécifique, avec un large spectre d'action sur d'autres plantes.

Mots clés : *Phoma sabdariffae*, Toxines, Plantes , Sensibilité , Spécificité

Introduction

Phoma sabdariffae Sacc. est le principal agent pathogène de la roselle au Gabon (Lépengué et al., 2007). C'est un champignon Déuteromycète (fungi imperfecti) de la famille des Phomaceae, qui admet également une forme parfaite sexuée (*Trichosphaeria* sp.). Son action repose sur l'excrétion des substances toxiques actives sur 10 des 13 cultivars de roselle actuellement recensés dans ce pays. L'action de ce pathogène agressif se manifeste par la pourriture de tous les organes aériens des plantes attaquées (feuilles, tiges, fleurs, fruits) qui conduit à la mort rapide du végétal (Lépengué et al., 2008).

Jusqu'à présent *Phoma sabdariffae* n'a jamais été retrouvé sur une autre plante que la roselle. Mais en l'absence d'études scientifiques de pathogénicité, il est difficile de conclure que son action est strictement limitée à cette plante. Cette question est pourtant d'importance capitale au Gabon, compte tenu du contexte culturel local. En effet, avec l'exode rural, près des trois quart de la population gabonaise vit dans les principales zones urbaines du pays (Feumetio, 2002). Ce qui a favorisé le développement d'un type d'agriculture dit périurbain, caractérisé par la production de diverses cultures associées sur des espaces agraires réduites, aux alentours des villes (Lépengué et al., 2012). Si ce type culturel a rationalisé l'exploitation des terres arables, il a également soulevé de nombreuses inquiétudes (Lépengué et al., 2011). Au niveau phytopathologique, par exemple, l'éruption d'une pathologie surmontant les barrières génétiques interspécifiques peut rapidement conduire à la destruction totale de toutes les cultures associées (Lepoivre et Semal, 1993). De même la contamination accidentelle des plantes voisines par une toxine non spécifique (à action polyvalente) d'un quelconque pathogène inféodé, peut conduire à des résultats catastrophiques. Il est donc

important de déterminer à chaque apparition pathologique, le risque d'extension de la maladie aux autres cultures. C'est dans ce contexte général que se situe le présent travail. Il étudie spécifiquement la pathogénicité de *Phoma sabdariffae*, l'agent pathogène de la roselle aux autres plantes. Le travail admet 2 objectifs spécifiques :

- Déterminer les risques d'extension de la maladie engendrée par ce champignon aux plantes associées, dans le contexte des cultures périurbaines ;

- Etudier la spécificité des productions toxiques de ce microorganisme, par leur action pathogène sur les autres cultures non hôtes.

Materiel Et Methodes

Matériel

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de 11 plantes alimentaires, à savoir : la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*), l'amarante (*Amaranthus hybridus* L., Amaranthaceae), l'aubergine (*Solanum melongena* L., Solanaceae), le gombo (*Hibiscus esculenta* L., Malvaceae), le maïs (*Zea mays* L., Poaceae), la corsette (*Corchorus olitorius* L., Tiliaceae), le haricot (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae), le poivron (*Capsicum annum* L., Solanaceae), la morelle (*Solanum scabrum* L., Solanaceae), le piment (*Capsicum frutescens* L., Solanaceae) et la tomate (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae). Les graines de toutes ces plantes ont gracieusement été offertes par les coopératives agricoles du district de Diénga Lewa passo (latitude : 10° 85' S ; longitude : 12° 67' E), au Sud-Est du Gabon.

Méthodes

- Préparation des inoculums et filtrats fongiques

Des pycnides de *Phoma sabdariffae* ont été récoltées au champ sur des plantes malades de roselle, purifiées après 3 repiquages successifs sur milieu Potatoe Dextrose Agar (PDA), et clonées par culture monospore (Lépengué et al., 2007). Les masses sporales ont été récoltées des milieux gélosés avec un scalpel stérilisé, broyées à l'ultra-turrax dans 100 ml d'eau distillée stérile et calibrées à 10⁶ spores/ml à l'aide d'un hématimètre de type Malassez, 2 ml. Le broyat a ensuite été inoculé, sous une hotte aseptique (Steril Gemini) à 5 L d'une solution de milieu nutritif minéral Richards. Les préparations ont été incubées en agitation continue (agitateur Vibramax) pendant 20 j à 28° C, en conditions de lumière alternée de 12 h (Lépengué et al., 2009). Les milieux ont ensuite successivement été filtrés sur papier Wathman n° 2 et sur filtre millipore de 0,22 µm de diamètre, afin d'obtenir le filtrat fongique toxique (ou essai). Un filtrat témoin (ou filtrat vierge) a également été préparé par le même protocole, mais à partir d'un milieu Richards non inoculé.

- Mise en place de l'essai

Cent graines de chacune des 11 plantes ont été désinfectées par trempage pendant 5min

dans 1 L d'hypochlorite de sodium 1%, et desséchées entre 2 épaisseurs de papier buvard (Lépengué et al., 2010). Ces organes ont ensuite été incubés séparément dans des béciers contenant 500 ml d'eau distillée stérile. Après 24 h d'incubation, chaque lot de graines a abondamment été rincé dans 3 L d'eau distillée, desséché entre 2 épaisseurs de papier buvard, et ensemencé dans des boîtes de culture cylindriques contenant 1 dm³ de sol de texture argilo limoneuse, préalablement stérilisé par autoclave pendant 30 minutes à 120 °C. Quatre graines de chaque plante ont été semées par boîte de culture. Pour chaque plante, 10 boites ont été préparées ; ce qui correspond à 40 boîtes, donc à 440 graines pour tout l'échantillonnage. Les préparations ont ensuite été transférées dans une serre en polyéthylène étanche et transparente, d'épaisseur 180 µm et de dimensions 15 x 10 x 2,5 m³ (Lépengué et al., 2011).

Chaque boîte a quotidiennement été arrosée par 500 ml d'eau distillée, jusqu'au 10^e jour, avant de subir une inoculation artificielle selon les techniques préconisées par Lépengué et al. (2007). Celles-ci consistent à pulvériser la suspension sporale (10⁶ spores/ml) du champignon sur la face inférieure des feuilles de plantes, préalablement affaiblies par une interruption d'arrosage d'un jour. Une seconde serre identique à la première mais ne subissant pas les inoculations fongiques a été construite pour servir de témoin.

- Mesure de la sensibilité des plantes à *Phoma sabdariffae*

La notation des symptômes des plantes traitées a été effectuée 30 jours après les inoculations. L'ampleur de l'attaque fongique a été quantifiée à l'aide d'une échelle de notation (mesurant de 0 à 5) établie à partir du nombre de feuilles infectées (Lépengué et al., 2008), et la sévérité (*s*) de la maladie calculée par l'indice moyen d'infection (*i*) tel que :

$$i = \frac{\sum (X_i - 1)n_i}{E[(X_i) - 1]N}$$

$$s = i \times 100$$

Où : X_i = Note de la maladie pour chaque plante.

n_i = Effectif de la catégorie X_i .

N = Nombre total des plantes observées.

$E(X_i)$ = Étendue de l'échelle.

- Etude de la croissance primaire et secondaire des plantes

La croissance primaire des plantes a été mesurée au 40^e jour à l'aide d'un décimètre en relevant la hauteur allant du sol à la première fourche foliaire. La croissance secondaire (diamètre des plantes) a quant à elle été déterminée à l'aide d'un pied à coulisse numérique (Fisherbrand, $P \pm 0.01$ mm), au niveau du collet (Lépengué et al., 2012). Les variations

morphométriques (v) de chaque paramètre de croissance (primaire et secondaire) ont été déterminées comme suit :

$$v = \frac{Me - Mt}{Mt} \times 100$$

Où : M_t : Mesure moyenne du paramètre de croissance chez la plante témoin ;

M_e : Mesure du même paramètre chez la plante essai.

- Etude de la sensibilité des plantes vis-à-vis du filtrat toxique de *Phoma sabdariffae*

La sensibilité des plantes a été mesurée par le test de libération d'électrolytes (Lépengué et al., 2009). Le principe de ce test est d'exposer les échantillons végétaux aux toxines contenues dans un milieu d'incubation aqueux. La libération de solutés par diffusion, suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire, est mesurée par les changements de la conductivité électrique de cette solution. À l'aide d'un emporte-pièce, des rondelles de 5 mm de diamètre ont été prélevées sur des tissus de plantes témoins âgées de 40 jours préalablement rincés à l'eau distillée stérile. Ces rondelles ont ensuite été placées par lot de 15 unités dans des fioles contenant 10 ml de filtrat de culture (de conductivité initiale C_i) et incubées pendant 2h, en agitation continue, à la température de 25 °C (Lépengué et al., 2008). Pour chaque plante, 2 lots de 10 fioles de filtrat inoculé (essais) ou sain (témoins) ont été préparés. Au terme du temps d'incubation, les solutions ont encore été filtrées sur une membrane millipore de 0,22 μ m de diamètre. Les conductivités finales (C_f) des solutions d'incubation des rondelles ont été mesurées au conductimètre (Jenway 3410 Electrochemistry Analyser), à électrodes pipettes en platine (Lépengué et al., 2009). L'appareil a été calibré à la fréquence de 5 000 Hz avec une intensité électrique de 12,5 mA.

Le pourcentage de libération d'électrolytes des rondelles foliaires (le) de chaque plante a été calculé de la manière suivante :

$$le = \frac{\Delta C_e - \Delta C_t}{\Delta C_t} \times 100$$

Avec : ΔC_e : variation de la conductivité des solutions contenant les filtrats essais

ΔC_t : variation de la conductivité des solutions contenant les filtrats témoins

Analyses statistiques

Chaque expérience décrite dans ce travail a été répétée 3 fois. Le logiciel statistica 6.0. A été utilisé pour réaliser l'analyse de variance (anova). En cas de différences significatives, les tests de comparaisons multiples de newman-keuls ont été utilisés au seuil de 5%.

Resultats

Pathogénicité de *Phoma sabdariffae* vis-à-vis des plantes maraîchères.

Les résultats de ce travail ont révélé que des 11 plantes étudiées, seule la roselle s'est montrée sensible à *Phoma sabdariffae*, avec des taux de pathogénicité supérieurs à 80% (Figure 1). Sur cette plante, des symptômes de pourriture ont été notés sur l'ensemble des organes aériens (feuilles, fleurs, tiges, branches). La maladie a également été observée sur tous les pieds étudiés, avec des intensités variées. Les cas les plus sévères ont abouti à la défoliation complète des plantes. Les 10 autres plantes n'ont présenté aucun faciès maladif caractéristique des pourritures engendrées par ce champignon.

Impact de *Phoma sabdariffae* sur la croissance des plantes

L'étude de la variation des paramètres morphométriques a confirmé que la roselle était la seule plante de l'échantillonnage sensible aux inoculations de *Phoma sabdariffae* (Figure 2). Elle a, en effet, été le seul végétal à subir des réductions significatives des croissances longitudinale (38%) et tangentielle (29%). De nombreux pieds de cette plante ont présenté des aspects effilés et/ou nains. Les 10 autres plantes n'ont pas montré des variations remarquables de croissance en hauteur ou en diamètre. Les plantes inoculées dans la serre essai ont présenté les mêmes aspects morphologiques que celles conservées comme témoins.

Toxicité du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* sur les plantes maraîchères

La figure 3 présente les effets du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* (contenant les toxines fongiques) sur les différentes plantes maraîchères. Son analyse a clairement révélé que les productions toxiques de cet agent pathogène induisaient les augmentations significatives des taux de libération d'électrolytes de toutes les plantes étudiées. La roselle a été l'espèce la plus sensible avec des hausses de libération d'électrolytes de 122%. Les plantes de piment avec des augmentations correspondantes de 93% ont constitué les cultures les moins sensibles de tout l'échantillonnage.

Discussion

Les résultats de ce travail ont montré qu'à l'exception de la roselle, aucune autre plante n'est sensible à *Phoma sabdariffae*. En effet aucun organe (tiges, feuilles, rameaux etc.) des 10 plantes restantes n'a présenté des symptomatologies caractéristiques des pourritures attribuées à ce champignon. Les mesures morphométriques ont montré, par ailleurs que les quelques légères réductions de croissances longitudinales et tangentielles des plantes traitées, n'étaient pas significatives, à l'exception de celles produites par la roselle. Toutes ces plantes alimentaires (aubergine, gombo, corète, piment, amarante, morelle, tomate, concombre) ne sont donc pas sensibles à *Phoma sabdariffae*. Elles sont donc de type non hôte, au sens défini par Meeley et al. (1992).

La relation non hôte découle généralement d'une inadaptation fondamentale préexistante des deux antagonistes (hôte et pathogène) à interagir : présence de substances

toxiques préformées dans l'hôte ; inadaptation morphologique et/ou biochimique des surfaces et ouvertures naturelles de l'hôte à interagir avec l'agent pathogène ; déclenchement rapide des réactions induites chez la plante etc. (Lepoivre et Semal, 1993). Ces différents modes de défense, sont résumés en deux types de résistance : la résistance passive et la résistance active (Lépengué et al., 2008). La résistance des 10 plantes alimentaires vis-à-vis de *Phoma sabdariffae* après inoculation repose vraisemblablement sur la mise en place (individuelle ou synergique) de ces 2 types de mécanismes biologiques.

Les résultats de cette étude ont également montré que le filtrat de culture toxique de *Phoma sabdariffae* affectait toutes les plantes expérimentés, avec des taux de libération d'électrolytes supérieurs à 90%. Les toxines de ce champignon présentent donc un spectre d'action plus étendue que l'agent pathogène lui-même qui parait inféodé à la roselle. Même si la structure moléculaire de ces composés n'est pas encore formellement déterminée, leur comportement les apparente à des toxines de type non hôte spécifique. L'existence de ce type de composés est bien connue en phytopathologie (Meeley et al., 1992). C'est le cas de la BZR, toxine produite par *Bipolaris zeicola*, agent pathogène du maïs, dont l'action toxique peut s'étendre sur l'avoine et le riz. C'est également le cas de la phaséolotoxine de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Hoitink et Sinden, 1970), de la tabtoxine produite par *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Mitchell, 1984) ou de la fusicoccine produite par *Fusicoccum amygdali* (Ballio, 1991). Ces toxines affectent plus de plantes que leurs agents pathogènes producteurs eux-mêmes. En l'absence de données sur la structure moléculaire des toxines produites par *Phoma sabdariffae*, il est difficile de spécifier exactement leur mode d'action ayant conduit à l'intoxication des plantes étudiées. Mais de façon générale, toutes les toxines procèdent par 2 types de mécanismes : les actions physiques et les actions biochimiques.

Sur le plan physique, l'action des substances toxiques consiste en l'occlusion vasculaire des tissus conducteurs des plantes affectées. Cet encombrement provoque l'obstruction des vaisseaux conducteurs et prive les parties aériennes de la sève brute (Beed et al., 1994). Il s'ensuit un déficit alimentaire et hydrique des parties supérieures aboutissant à la mort de la plante (Otani et al., 1995).

Sur le plan biochimique, l'action des toxines repose sur l'existence au niveau des cellules de la plante-hôte d'un ou de plusieurs récepteurs membranaires sur lesquels se fixent ces composés toxiques (Johal et Briggs, 1992). Ces sites sont généralement localisés au niveau des membranes cytoplasmiques, mitochondriales, chloroplastiques ou nucléaires (Rhoades et al., 1995). Selon les sites cellulaires cibles, les actions toxiques interfèrent alors

avec les transports ioniques, la synthèse protéique, la mitose, la production d'énergie, la photosynthèse, la respiration etc., aboutissant à la mort des cellules, des organes et de la plante entière (Heller et al., 2006).

Les actions toxiques du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* sur les 11 plantes alimentaires expérimentées dans cette étude doivent s'inscrire dans l'un ou l'autre de ces modèles biologiques. Les études à venir de caractérisation moléculaire devraient permettre de mieux préciser le type exact de modèle utilisé par ce pathogène.

Conclusion

Phoma sabdariffae l'agent pathogène de la roselle paraît strictement inféodé à cette plante. Les 10 autres végétaux lui ont été totalement insensibles. Les productions toxiques de ce pathogène ont en revanche présenté des activités étendues sur l'ensemble des plantes étudiées. Les toxines de *Phoma sabdariffae* semblent donc être de nature non hôte spécifique, avec un spectre d'action plus large que le champignon lui-même. Les études à venir sur leur caractérisation moléculaire devraient permettre d'éprouver cette hypothèse. Pour l'heure, le mode de culture périurbain du Gabon peut se poursuivre sans risque avéré de contamination de la pourriture humide aux autres plantes associées.

References:

- Ballio A. Non-host selective fungal phytotoxins : biochemical aspects of their mode of action. *Experientia*, **47** : 783-790, 1991.
- Beed F.D., Onfroy C. and Tivoli B. Virulence for faba bean and production of ascochyta by *Ascochyta fabae*. *Plant Pathol.*, **43** : 987-997, 1994.
- Feumetio B. Les marchés émergents d'Afrique. Afrique Edit. Paris, 106 p, 2002.
- Heller R., Esnault R. and Lance C. Physiologie végétale. Développement. 6e édition de l'Abrégé, édition Dunod, Paris, 144-145, 2006.
- Hoitink H.A.J. and Sinden S.L. Partial purification and properties of chlorosis inducing toxins of *Pseudomonas phaseolicola* and *P. glycinea*. *Phytopathology*, **60** : 1236-1237, 1970.
- Johal G.S. and Briggs G.S. Reductase activity encoded by the HM disease resistance gene in maize. *Science*, **258** : 985-987, 1992.
- Lépengué A.N., M'batchi B. et Aké S. Impact de *Phoma sabdariffae* Sacc. sur la croissance et la valeur marchande de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au Gabon. *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, 10: 207-216, 2007.

- Lépengué A.N., M'batchi B. et Aké S. Production, caractérisation et utilisation des composés toxiques de *Phoma sabdariffae* Sacc. dans la sélection des cultivars résistants de roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au Gabon. *Agronomie Africaine* 20 (1) : 59-67, 2008.
- Lépengué A.N., Mouaragadja I., M'batchi B. and Aké S. Etude de quelques caractéristiques physicochimiques du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc., agent pathogène de la roselle. *Science et Nature* 6 (2) : 95-105, 2009.
- Lépengué A.N., Mouaragadja I., M'batchi B. et S. Aké. Effet du Chlorure de sodium (NaCl) sur la germination et la croissance du maïs (*Zea mays* L. Poaceae) au Gabon. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 4 (5) : 1602 – 1609, 2010.
- Lépengué A.N., Mouaragadja I., Ontod Tshi Tshi D., Mbadoumou Nembe B., Mokea Niaty A., Ake S. et M'batchi B. Rôle de l'acide borique dans la synthèse de quelques composés biochimiques de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au Gabon. *Rev. CAMES - Série A*, 12 (2) : 216-220, 2011.
- Lépengué A.N., Mouaragadja I., Chérif M., Aké S. et M'batchi B. Amélioration de la croissance du maïs (*Zea mays* L. var. LG 60, Poaceae) par des traitements à la colchicine. *Journal of Applied Biosciences* 52: 3660– 3668, 2012.
- Lepoivre P. et Semal. Les relations hôte-parasite. *Traité de pathologie végétale. Les presses agronomiques de Gembloux*, 249-302, 1993.
- Meeley R.B., Joahl G.S., Briggs G.S. and Walton J.D. A biochemical phenotype for a disease resistance gene maize. *Plant Cells*, 4 : 71-77, 1992.
- Mitchell R.E., 1984. The relevance of non-host specific toxins in the expression of virulence by pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22: 215-245, 1984.
- Otani K., Kohmoto K., and Kodama M. Alternariatoxins and their effects on host plants. *Canadian Journal of Botany*, 73 : 453-458, 1995.
- Rhoades D.M., Levings C.G. and Siedow J.N. URF13, a ligand gated, pore-forming receptor for T-toxin in inner membrane of cms-T mitochondria. *Journal of Bioenergy and Biochemistry*, 27 : 437-445, 1995.

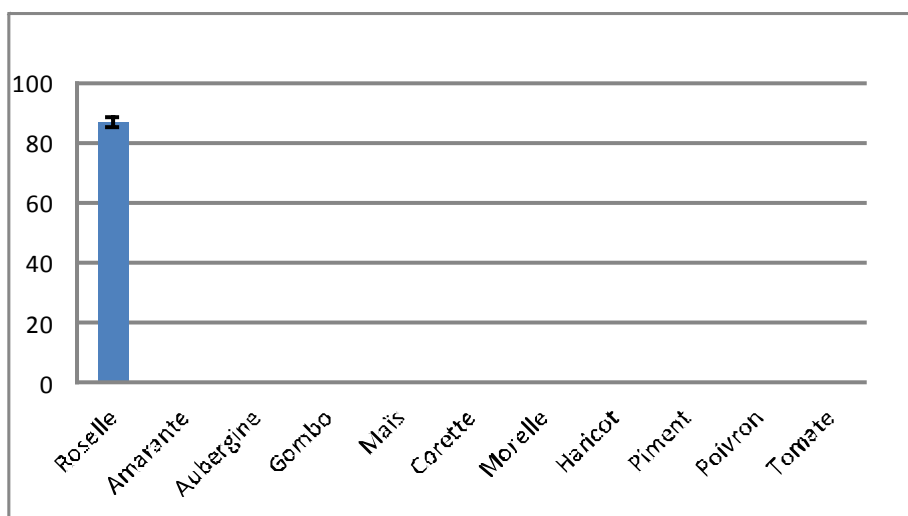
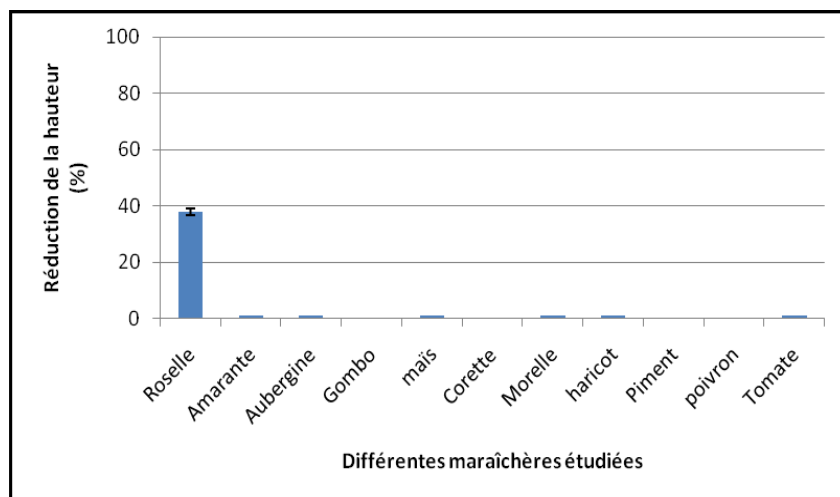
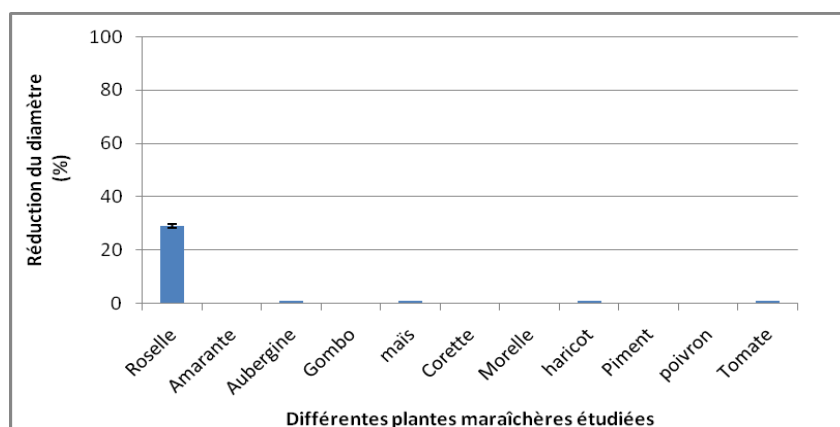


Figure 1 : Sensibilité de quelques plantes maraîchères à l’agent pathogène *Phoma sabdariffae* Sacc, après 40 jours d’incubation en serre, à la température de 28 °C.



A



B

Figure 2 : Effet de *Phoma sabdariffae* sur les paramètres de croissance de quelques plantes maraîchères en conditions de serre.

(A) Réduction de la croissance longitudinale

(B) Réduction de la croissance tangentielle

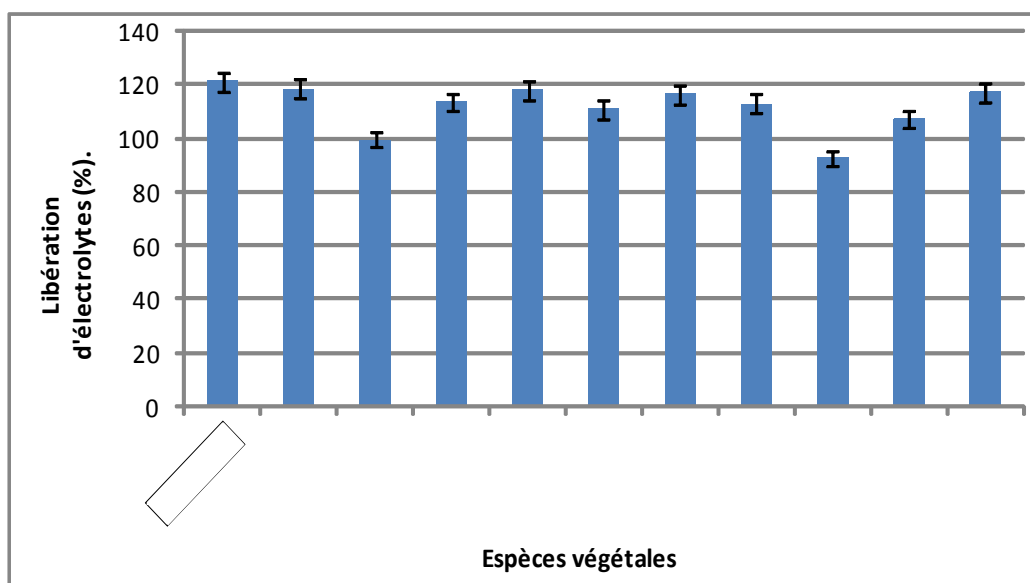


Figure 3 : Sensibilité (en libération d'électrolytes) de quelques plantes alimentaires au filtrat de culture de *Phoma sabdariffae*, à la température de 28 °C.