



Etude comparée de paramètres photosynthétiques chez différentes variétés de bananiers après infiltration de la juglone, un métabolite toxique de *Mycosphaerella fijiensis*, agent causal de la cercosporiose noire

[Comparative study of photosynthetic parameters in different banana varieties after infiltration of juglone, a toxic metabolite of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka]

Elisée Georges Dadé Ler-N'Ogn AMARI¹, Daouda KONE¹, Emmanuel DICK¹, Siaka TRAORE^{1,2}, Kouman KOBENAN² et Pierre Abo ANNO¹

¹Université de Cocody-Abidjan, UFR Biosciences, Laboratoire de Physiologie Végétale, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire ; ²Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), Station de Recherche de Bimbresso, Laboratoire de Phytopathologie, 01 BP 1536 Abidjan 01 Côte d'Ivoire

Auteur en correspondance : amariler@yahoo.fr : Published online on 07 October 2008.

Résumé

Objectifs : Une évaluation des paramètres photosynthétiques après infiltration de la juglone, une toxine de *Mycosphaerella fijiensis* a été effectuée chez des génotypes de bananiers aux comportements différentiels à l'infection, en vue d'élucider leurs mécanismes de résistance et envisager la sélection précoce de cultivars résistants à la maladie des raies noires (MRN).

Méthodologie et résultats : Six génotypes de vivo plants de bananiers sensibles ou partiellement résistants à la MRN, ont été évalués relativement à l'induction de nécroses foliaires, la perte de chlorophylles et l'inhibition de l'activité physiologique des chloroplastes isolés après traitement à la juglone. Les hybrides tétraploïdes (FHIA23, PITA14) se sont généralement montrés plus résistants à la juglone que les autres cultivars étudiés (Figue Sucrée, Grande Naine, Orishele, Poyo). L'ordre de sensibilité des génotypes à cette toxine, établi à partir du taux de réduction de la teneur en chlorophylles et du taux d'inhibition de l'activité chloroplastique, est partiellement conforme à celui de la maladie au champ.

Conclusion et application des résultats : Les résultats obtenus montrent que les génotypes les plus résistants à la juglone sont aussi les plus résistants à l'infection de *M. fijiensis*. Les paramètres photosynthétiques ont permis d'explicitier le mode d'action de cette toxine ainsi que les mécanismes de résistance à la maladie des différents génotypes de bananiers. La perte de chlorophylles après infiltration de juglone, a confirmé l'influence de *M. fijiensis* sur l'activité photosynthétique. Associée à d'autres paramètres, la perte de chlorophylles peut permettre d'évaluer fiablement la résistance des nouvelles variétés de bananiers à vulgariser. Une combinaison des paramètres évalués pour différents biotests après infiltration de toxine, constitue la stratégie idéale de sélection du génotype de bananiers le plus résistant à l'infection du pathogène.

Mots clés : résistance, juglone, cercosporiose, bananiers , infiltration, photosynthèse.

Citation: AMARI LDGE, KONE D, DICK E, TRAORE S, KOBENAN K and ANNO AP, 2008. Etude comparée de paramètres photosynthétiques chez différentes variétés de bananiers après infiltration de la juglone, un métabolite toxique de *Mycosphaerella fijiensis*, agent causal de la cercosporiose noire. *Journal of Applied Biosciences* 10(2): 523 - 531.

ABSTRACT

Objective: To evaluate photosynthetic parameters after infiltration of juglone, a toxin of *Mycosphaerella fijiensis*, into six banana genotypes showing differential reaction to infection by the Black Leaf Streak Disease (BLSD), in order to elucidate their resistance mechanisms and to consider early selection of cultivars with resistance to the disease.

Methodology and results: Induction of necrosis, loss of chlorophyll and inhibition of physiological activity of isolated chloroplasts were analysed in vivo on six banana genotypes. The tetraploid hybrids (FHIA23, PITA14) were generally more resistant to juglone than the other cultivars studied (Figue Sucrée, Grande Naine, Orishele, Poyo). Sensitivity of genotypes to juglone as determined from chlorophylls loss and inhibition of chloroplast function partially corresponded to their susceptibility to the disease on the field.

Conclusion and application of results: These results broadly suggest that genotypes that are resistant to juglone are also resistant to infection by *M. fijiensis*. The photosynthetic parameters allow elucidation of the mode of action of this toxin and the mechanisms of resistance to the disease by different banana genotypes. Loss of chlorophyll after infiltration of juglone, confirmed *M. fijiensis* influence on photosynthetic activity. Associated with other parameters, chlorophylls loss can allow to reliably evaluate resistance of new varieties of banana to be popularized. A combination of the evaluated parameters in different bioassays after infiltration of toxin might constitute the best strategy of identifying genotypes with the greatest resistance to the pathogen.

Key words: resistance, juglone, black Sigatoka, banana, infiltration, photosynthesis.

Citation: AMARI LDGE, KONE D, DICK E, TRAORE S, KOBENAN K and ANNO AP, 2008. Comparative study of photosynthetic parameters in different banana varieties after infiltration of juglone, a toxic metabolite of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka. *Journal of Applied Biosciences* 10(2): 523 - 531. English abstract. Published online on 07 October 2008.

INTRODUCTION

Dans les différentes zones de production de la banane et de la banane plantain en Afrique, la baisse considérable des récoltes est liée à la forte pression des parasites et des maladies (Pasberg-Gauhl *et al.*, 2000). Parmi les maladies foliaires chez les bananiers, la plus dévastatrice est la maladie des raies noires (MRN) ou cercosporiose noire due à un champignon hémibiotrophique appelé *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Jones, 2000). Ce parasite provoque des nécroses et une sévère réduction de la surface foliaire photosynthétique active. La diminution de la surface des feuilles fonctionnelles entraîne une dépréciation de la qualité et de la quantité des fruits (Mobambo *et al.*, 1996).

Dans la stratégie de contrôle de cette grave maladie, diverses méthodes de lutte sont mises en œuvre. Mais, face aux nombreux inconvénients socio-économiques et environnementaux de la lutte chimique, le recours à la résistance variétale est souhaité surtout chez les petits agriculteurs (Calvo, 1997; Roméro & Sutton, 1998). Cependant, les méthodes usuelles de sélection d'hybrides résistants en conditions naturelles d'infection ou en conditions contrôlées d'inoculation du pathogène s'avèrent longues, fastidieuses et coûteuses. Dès lors, la vulgarisation de géotypes de bananiers résistants à la maladie des raies noires nécessite une sélection rapide et simple du grand nombre

d'hybrides que produisent les programmes d'amélioration génétique du bananier (Ortiz *et al.*, 1997).

Ainsi, des méthodes d'évaluation de la réactivité aux métabolites de *M. fijiensis*, sont développées en vue de sélectionner les variétés de bananiers les plus résistantes à la MRN. Mais, c'est la parfaite compréhension du mode d'action des toxines d'une part et des mécanismes de résistance des bananiers d'autre part, qui déterminent la fiabilité de toute stratégie de sélection. Les biotests déjà effectués révèlent les chloroplastes cellulaires comme étant les sites primaires d'actions des toxines du pathogène. En effet, l'application des extraits toxiques bruts du champignon conduirait à des modifications structurales et sans doute fonctionnelles de l'appareil photosynthétique, selon que les géotypes de bananiers soient sensibles ou résistants (Harelimana *et al.*, 1997).

Dans ce travail nous avons étudié la sensibilité de différentes variétés de bananiers à la juglone, un métabolite toxique de *M. fijiensis*, afin de vérifier les possibilités d'utilisation des paramètres photosynthétiques comme critères d'évaluation simple de la résistance. Ceci a permis d'élucider les mécanismes de réaction des bananiers à la cercosporiose noire en vue de la sélection précoce de géotypes résistants.

Matériel et méthodes

Matériel végétal : Des vivo plants de six génotypes de bananiers et de bananiers plantain fournis par le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) de Côte d'Ivoire ont été utilisés dans cette étude. Trois cultivars très sensibles (Grande Naine, AAA ; Orishele, AAB ; Poyo, AAA) et un cultivar sensible (Figue Sucrée, AA) ont été comparés à 2 hybrides (FHIA23, AAAA et PITA14, AAAB) partiellement résistants à la MRN (N'Guessan *et al.*, 2000). Ces plants ont été mis en croissance dans les conditions de photopériode naturelle au sein d'un abri recouvert d'un film en plastique transparent et contenant des mousses constamment humidifiées. Au stade 5 à 6 feuilles, les plants ainsi acclimatés ont été utilisés pour les différents tests.

Préparation de la toxine : La toxine utilisée dans cette étude a été la juglone commerciale (Sigma-Aldrich). Cette molécule de formule brute $C_{10}H_6O_3$ est la 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone et possède des propriétés identiques à celles de la juglone naturelle. Des solutions de juglone de concentrations croissantes (0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 ppm) ont été préparées dans du méthanol (MeOH) à 10 %.

Infiltration des solutions dans les feuilles : Les bananiers préalablement acclimatés en atmosphère humide au sein de l'abri ont été utilisés pour les infiltrations. Dans la face inférieure de la deuxième feuille totalement déroulée en dessous du cigare, 20 μ l de juglone ou de solutions témoins (eau distillée et méthanol à 10 %) ont été injectés à l'aide d'une seringue de 1ml dont l'aiguille enfoncée dans une gomme percée affleure l'épiderme foliaire. Pour chaque feuille traitée, 4 sites d'application par solution à infiltrer ont été réalisés à raison de 2 par demi limbe (Harelimana, 1997). Pour chaque variété 3 bananiers ont été traités par essai puis les plantes ont été replacées sous l'abri dans les conditions ambiantes.

Détermination des intensités de nécroses : Les nécroses sont reconnaissables par des taches brunâtres ou noirâtres laissées au niveau des sites infiltrés. Parallèlement à la concentration minimale d'induction de nécroses (CMIN) notée pour chaque variété de bananiers, une échelle visuelle d'estimation de la sévérité de ces nécroses a permis l'évaluation de la toxicité des solutions dans les feuilles en survie sur plante 48 h après les infiltrations.

A l'aide d'une gamme de valeurs (adaptée à celle de Stierle *et al.*, 1991) allant de 0 à 4, à chaque site infiltré a été affecté un indice (i) en fonction de la surface nécrosée (Sn) par rapport à celle infiltrée (Si). Sur cette échelle, on note :

0 = absence de nécrose ; 1 = Sn inférieure au $\frac{1}{4}$ de Si ; 2 = Sn comprise entre $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{2}$ de Si ; 3 = Sn comprise entre $\frac{1}{2}$ et $\frac{3}{4}$; 4 = Sn supérieure aux $\frac{3}{4}$ de Si.

Par adaptation de la formule de Townsend et Heuberger pour le calcul de l'indice d'infection (Pérez *et al.*, 2002), l'intensité de nécrose (IN) de chaque génotype par solution infiltrée a été déterminée à partir de la formule suivante :

$$IN = (\sum in / 4N) \times 100 \text{ (exprimée en \%)},$$

i représente l'indice de nécrose affecté à chacun des sites infiltrés pour chaque solution, *n* le nombre de sites infiltrés ayant le même indice de nécrose pour chaque solution, *N* le nombre total de sites infiltrés pour chaque solution: ici *N* = 4. L'ensemble du test a été répété 3 fois.

Dosage des pigments chlorophylliens : Les chlorophylles ont été extraites selon la méthode de Moran (1982) après que les bananiers aient été infiltrés de juglone dans les mêmes conditions que précédemment. Les concentrations de juglone utilisées pour ce test étaient: 0 (c'est-à-dire du MeOH à 10 %) ; 25 ; 50 ; 100 et 250 ppm. Pour chaque essai 0,1 g de fragment de feuille traitée ou non a été prélevé et incubé dans des flacons contenant 3 ml de N,N-diméthylformamid pendant 24 h à l'étuve à 37 °C. La densité optique (DO) des extraits pigmentaires obtenus a été mesurée au spectrophotomètre aux longueurs d'ondes 630, 647 et 664 nm. Les extraits obtenus de fragments de feuilles non infiltrées de solution, ont constitué les témoins. Ainsi, les teneurs en chlorophylles ('a', 'b', 'c' et 'totales') exprimées en $mg \cdot g^{-1}$ de matière fraîche (MF) ont été déterminées suivant les équations de la méthode trichromatique de Jeffrey et Humphrey (1975) de formules :

$$\text{Chlorophylle 'a' (cha)} = 11,85 \cdot DO_{664} - 1,5 \cdot DO_{647} - 0,08 \cdot DO_{630} \times V / 10^3 \cdot M$$

$$\text{chlorophylle 'b' (Chb)} = 21,03 \cdot DO_{647} - 5,43 \cdot DO_{664} - 2,66 \cdot DO_{630} \times V / 10^3 \cdot M$$

$$\text{chlorophylle 'c' (Chc)} = 24,52 \cdot DO_{630} - 7,60 \cdot DO_{647} - 1,67 \cdot DO_{664} \times V / 10^3 \cdot M$$

$$\text{chlorophylles 'totales' (Chtot)} = 21,78 \cdot DO_{630} + 11,89 \cdot DO_{647} + 4,75 \cdot DO_{664} \times V / 10^3 \cdot M$$

V désigne le volume de l'extrait brut en millilitre (ml) et M, la masse de matière fraîche (MF) traitée ou non en gramme (g).

Le taux de réduction de la teneur en chlorophylle (Tx Red) par rapport aux témoins (extraits chlorophylliens issus de portions de feuilles non infiltrées de juglone ni de MeOH), a été obtenu à partir de la formule suivante:

$$Tx \text{ Red (\%)} = ((Ch_{\text{témoin}} - Ch_{\text{essai}}) / Ch_{\text{témoin}}) \times 100$$

Ch, représente la teneur de chlorophylles (a, b, c ou tot) des extraits de feuille traitée (essai) ou non (témoin). Trois répétitions ont été effectuées pour cette expérience.

Extraction des chloroplastes : Les chloroplastes ont été extraits au froid (0° C) selon le protocole décrit par Busogoro *et al.*, (2004a). De jeunes feuilles ont été

récoltées et rincées à l'eau distillée puis découpées en petits fragments. Ces fragments ont été ensuite broyés au mixer avec 25 ml du tampon d'extraction dont la composition a été modifiée : saccharose 0,5 M ; tampon phosphate 0,1 M ; sorbitol 330 mM ; KCl $8 \cdot 10^{-2}$ M ; CaCl 0,5 mM. Le broyat a été filtré sur 2 épaisseurs de mousseline et 2 couches de toile. Le filtrat a été centrifugé à 250 trs / min pendant 5 min. Le surnageant a été recueilli et centrifugé à 3200 trs / min pendant 5 min. Le culot a été repris dans 10 ml de tampon d'extraction et la suspension obtenue a été déposée sur 10 ml de percoll à 35 % et centrifugée à 1200 trs / min pendant 5min. La phase verte contenant les chloroplastes a été récupérée et ramenée à un volume final de 10 ml avec du tampon d'extraction puis centrifugée à 3200 trs / min pendant 5. Le culot obtenu a été repris dans le tampon d'extraction et l'homogénat de chloroplastes est calibré à $14 \cdot 10^6$ chloroplastes / ml à l'aide d'une lame de Burkner.

Activité par la réaction de Hill des chloroplastes isolés soumis à l'effet de la juglone : Pour la mesure de l'activité physiologique des chloroplastes isolés 890 μ l de la suspension calibrée à $14 \cdot 10^6$ chloroplastes / ml ont été mis dans des tubes de spectrophotomètre en présence de 100 μ l de juglone aux concentrations de 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 ppm ou d'une solution de méthanol 10 % utilisée comme témoin. L'activité des chloroplastes a été suivie après ajout de 110 μ l d'une solution 0,5 mM de 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP). La DO a été mesurée à la longueur d'onde de 595 nm

RÉSULTATS

L'infiltration avec l'eau et le méthanol à 10 % n'a causé aucune nécrose sur les feuilles des bananiers, après 48 h d'observation (Tableau 1).

Un minimum de 12,5 ppm de juglone a été suffisant pour que les nécroses apparaissent chez Orishele et Grande Naine alors que chez Figue Sucrée et Poyo il a fallu 25 ppm ou encore 50 ppm de juglone ont été nécessaires chez PITA14 et FHIA23 pour induire les nécroses. La concentration minimale de juglone à partir de laquelle les nécroses se forment aussi bien chez les hybrides que chez les cultivars étudiés est 50 ppm.

Au-delà de 50 ppm (concentration minimale commune d'induction des nécroses), presque tous les cultivars ont plus de la moitié de leur surface totale infiltrée nécrosée. A 100 ppm, les intensités de nécroses chez Figue Sucrée et Orishele sont respectivement 44,4 et 48,61 % tandis qu'elles excèdent 50 % chez Grande Naine et Poyo et sont inférieures à 40 % chez les hybrides partiellement résistants à la MRN (PITA14 et FHIA23). Ces derniers ont présenté les plus faibles

contre une suspension de chloroplastes sans DCPIP, servant de blanc pour le réglage du zéro d'absorbance. Après cette première lecture de DO, au bout de 20 min d'éclaircissement à l'aide d'une ampoule de 100 W, les cuves contenant les traitements ont été à nouveau lues contre celle représentant le blanc maintenu constamment à l'obscurité.

Calcul du taux d'inhibition de l'activité chloroplastique : Après la lecture des DO à t_{0min} et t_{20min} , la variation $\Delta DO = DO_{t_{20min}} - DO_{t_{0min}}$ a été calculée. Cette différence correspond à la réduction du DCPIP par l'activité des chloroplastes. Elle a permis de déterminer le taux d'inhibition (% Inh) de l'activité des chloroplastes en présence de juglone, par rapport au témoin (MeOH 10%) grâce à la formule suivante :

$\% Inh = (100 - (100 \Delta DO_{essai} / \Delta DO_{témoin}))$ exprimé en %.

Pour chaque essai 3 tubes de spectrophotomètre ont été préparés et l'expérience a été répétée 3 fois.

Analyse statistique des données : Les données collectées pour les intensités de nécroses et les taux d'inhibition de l'activité chloroplastique ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel STATISTICA 6.0 et les différences significatives entre groupes homogènes ont été déterminées par le test de Newmann-Keul à $p < 0,05$. Pour les taux de réduction de la teneur en chlorophylles les données ont été analysées par ANOVA à partir du Logiciel SAS version 9.1 et les comparaisons de moyennes ont été faites selon le test de Fisher au seuil de 5 %.

intensités de nécroses (avec IN < 40 %), particulièrement lorsque la concentration est inférieure ou égale à 100 ppm de juglone (Figure 1).

Aussi bien, avec les solutions témoins (eau, MeOH 10 %) que les solutions de juglone aux concentrations extrêmes (12,5 et 500 ppm) utilisées dans ce test, l'analyse de variances au seuil alpha égale 5 % n'a montré aucune différence significative pour l'intensité de nécroses. Par contre, des différences significatives selon le test de Newmann-Keul, ont été observées entre les génotypes de bananiers, 48 heures après le traitement avec 25, 50, 100 et 250 ppm de juglone (respectivement $p = 5,06 \cdot 10^{-4}$; $p = 5,6 \cdot 10^{-5}$; $p = 3,24 \cdot 10^{-4}$; $p = 3,910^{-2}$).

Le taux de réduction de la teneur en chlorophylles de chaque génotype de bananiers a été évalué en quantifiant la perte de pigments photosynthétiques des feuilles soumises à l'effet de la juglone (Figure 2). Les taux de réduction les plus élevés ont été enregistrés au niveau de la chlorophylle 'c' avec



un pic de 39,49 % à 250 ppm. Les valeurs les plus faibles ont concerné la chlorophylle 'a' avec un maximum de taux de réduction égal à 18,87 % à 250 ppm de juglone. Le taux de réduction mesuré pour la

chlorophylle 'c' est environ 2 fois supérieur à celui de la chlorophylle 'a' tandis que la valeur relative à la chlorophylle 'b' est sensiblement identique à celle des chlorophylles totales (Figure 2).

Tableau 1: Sensibilité de 6 géotypes de bananiers à différentes concentrations de juglone 48 heures après infiltration dans les feuilles.

Géotypes	Comportement à l'infection	Concentrations de juglone infiltrée (ppm)						
		0	12,5	25	50	100	250	500
Orishele	TS	-	+	+	+	+	+	+
Grande Naine	TS	-	+	+	+	+	+	+
Poyo	TS	-	-	+	+	+	+	+
Figue Sucrée	S	-	-	+	+	+	+	+
PITA14	PR	-	-	-	+	+	+	+
FHIA23	PR	-	-	-	+	+	+	+

+ = induction de nécroses ; - = pas d'induction de nécroses ; 0 = témoins (eau et méthanol 10 %) ; TS= phénotype très sensible ; S = phénotype sensible ; PR = phénotype partiellement résistant

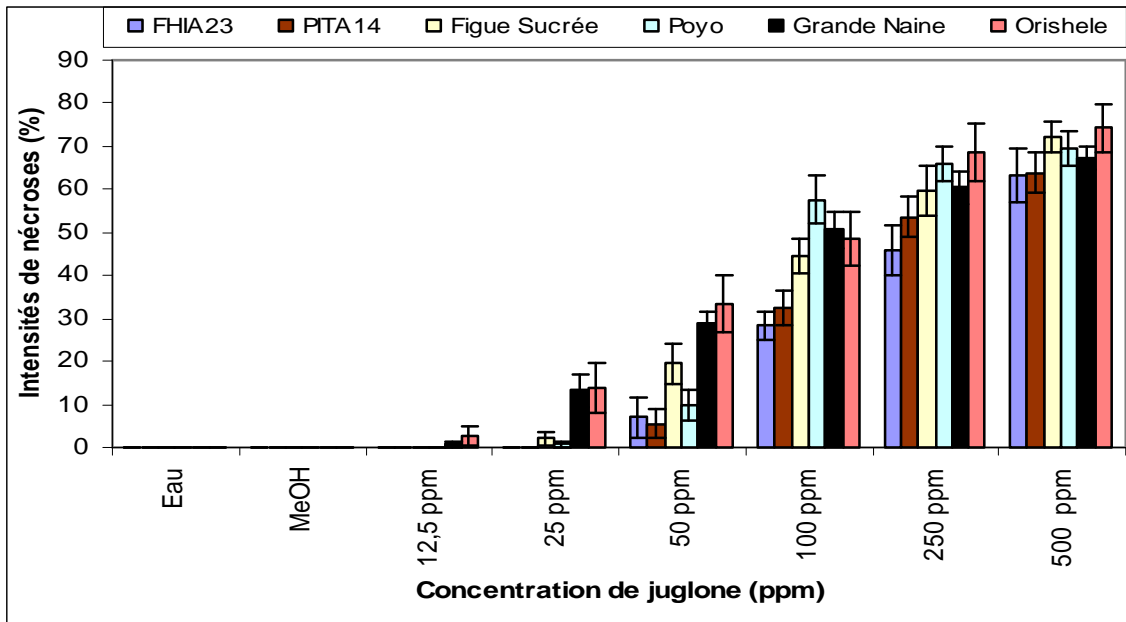


Figure 1: Intensités de nécroses des variétés de bananiers testées 48 heures après infiltration de la juglone à différentes concentrations. Les bars représentent les déviations standard.

Le cultivar Figue Sucrée a présenté les pertes les plus abondantes de pigments, tandis que l'hybride FHIA23 a enregistré les plus faibles pertes de chlorophylles ('b' et 'totales'). A l'exception de la chlorophylle 'a', pour les autres formes du pigment, le cultivar Grande Naine, très sensible à la MRN a eu un comportement semblable à celui de l'hybride FHIA23, partiellement résistant à l'infection. En revanche, l'hybride PITA14 ainsi que les cultivars Orishele et Poyo ont eu des réponses intermédiaires entre celles des variétés précitées.

Des différences très hautement significatives selon le test de Fisher, ont été enregistrées entre les géotypes de bananiers étudiés quant à leur perte en

chlorophylles 'a', 'b', 'c' et 'totales' ($p < 0,0001$ pour chaque forme de chlorophylle). Toutefois, quelle que soit la concentration de juglone, la forme de chlorophylle ou la variété de bananier, le taux de réduction de la teneur en chlorophylles n'excède pas 40 %.

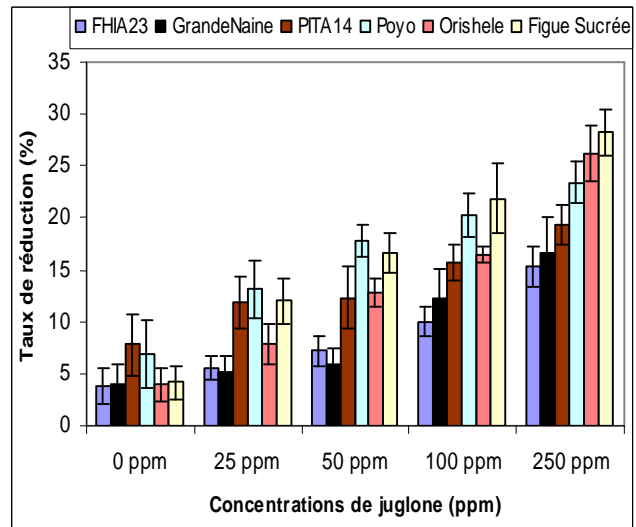
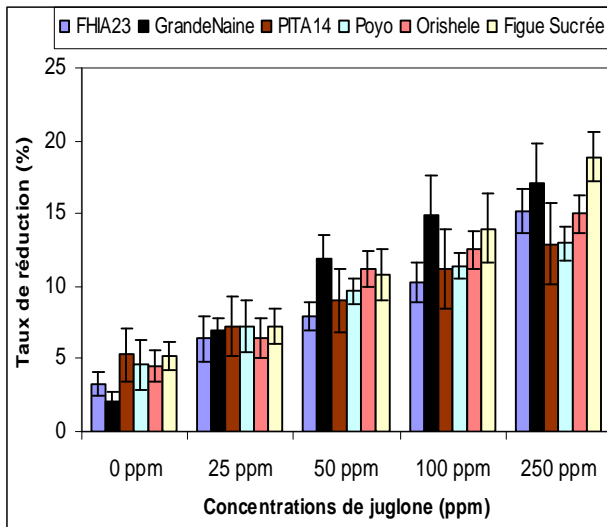
Les taux d'inhibition de l'activité des chloroplastes isolés traduisent la capacité d'altération par la juglone des propriétés de transfert d'électrons des membranes de ces organites chez les différentes variétés de bananiers. Dans la gamme des concentrations de 12,5 ppm à 100 ppm de juglone, l'effet inhibiteur de la toxine sur les chloroplastes chez les hybrides (FHIA23 et PITA14) est relativement moins marqué que sur les chloroplastes des cultivars (Figure



3). En effet, pour ces différentes concentrations de juglone, les taux d'inhibition varient respectivement de 20,51 à 62,67 % chez les hybrides et de 24,18 à 76,19 % chez les cultivars. Au delà de 100 ppm, les taux d'inhibition varient peu pour toutes les variétés de bananiers. Par ailleurs, dans ce test, l'inhibition de l'activité des chloroplastes n'est pas toujours progressive chez les génotypes PITA14, Grande Naine et Orishele.

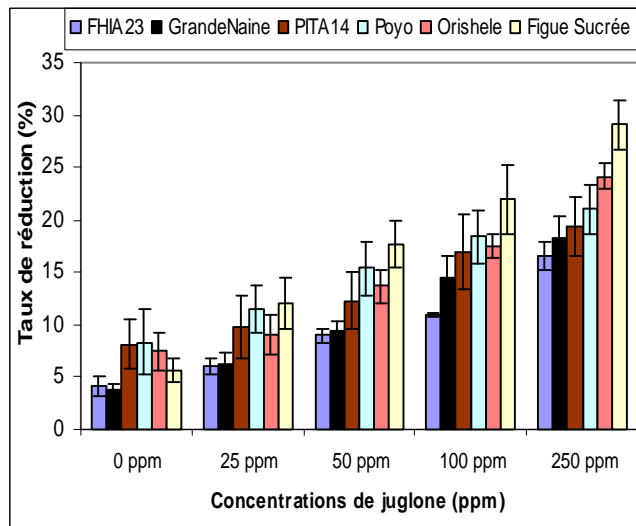
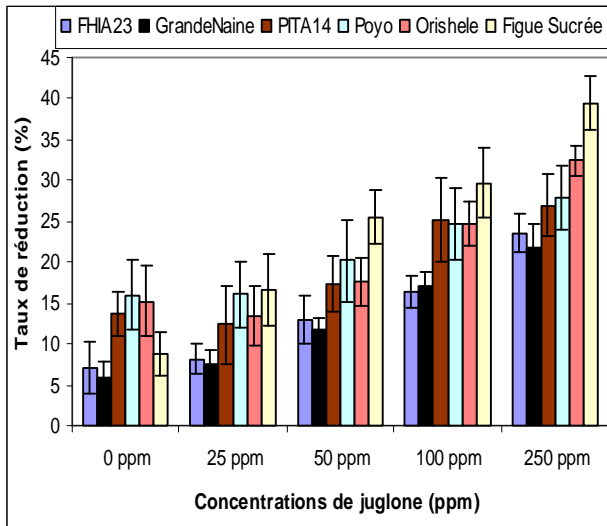
Seuil alpha égale à 0,05, l'analyse de variances n'a indiqué aucun effet variétés pour le taux d'inhibition de l'activité chloroplastique avec les concentrations 12,5 ; 25 ; 100 ; 250 et 500 ppm de juglone. Seule la

concentration 50 ppm de juglone a révélé des différences significatives ($p = 0,022$) entre les génotypes étudiés au regard de l'inhibition par la juglone des propriétés de transfert d'électrons des chloroplastes isolés. Contrairement à Orishele et Grande Naine, à 50 ppm de juglone Figue Sucrée, Poyo, FHIA23 et PITA14 ont des taux d'inhibition inférieurs à 50 %. Pour chaque variété de bananiers testée, le taux d'inhibition de l'activité des chloroplastes isolés, croissant jusqu'à 100 ppm de juglone, atteint un plateau au-delà de cette concentration (Figure 3).



Chlorophylle 'a'

Chlorophylle 'b'



Chlorophylle 'c'

Chlorophylle 'totale'

Figure 2: Taux de réduction de la teneur en chlorophylle a; b, c et chlorophylles totales. Les bars représentent les déviations standard.

DISCUSSION

Le développement des lésions nécrotiques suite à l'infiltration de la juglone dans les feuilles, montre la

toxicité de cette substance sur les différentes variétés de bananiers utilisées. L'eau et le méthanol à 10% ne sont

pas toxiques pour les bananiers. La réaction respective à la juglone des cultivars et hybrides de bananiers, a confirmé leur comportement observé au champ vis-à-vis de la MRN.

L'induction de nécroses après infiltration de la juglone dans les feuilles de bananiers, est un test beaucoup plus simple à réaliser. En outre, contrairement aux extraits toxiques brut (ETB) de *M. fijiensis*, ce test nécessite de faibles concentrations de juglone pour déclencher l'apparition des nécroses. En effet, selon Harelimana (1997), il faut avec les ETB, des concentrations élevées de l'ordre de 500 ppm pour induire les nécroses alors qu'avec la juglone, la

concentration minimale commune pour provoquer la formation des lésions nécrotiques est de 50 ppm. L'infiltration de juglone dans les feuilles en survie sur plante, s'avère plus sensible qu'avec les ETB. Le gradient de sensibilité des variétés de bananiers obtenu avec les concentrations minimales d'induction de nécroses et celui des intensités de nécroses sont similaires au niveau d'infection au champ par *M. fijiensis*.

Dans ce test, la notation des indices de nécroses étant basée sur une échelle arbitraire, il serait intéressant de lui associer d'autres paramètres d'évaluation pour une plus grande fiabilité du classement des différents génotypes de bananiers.

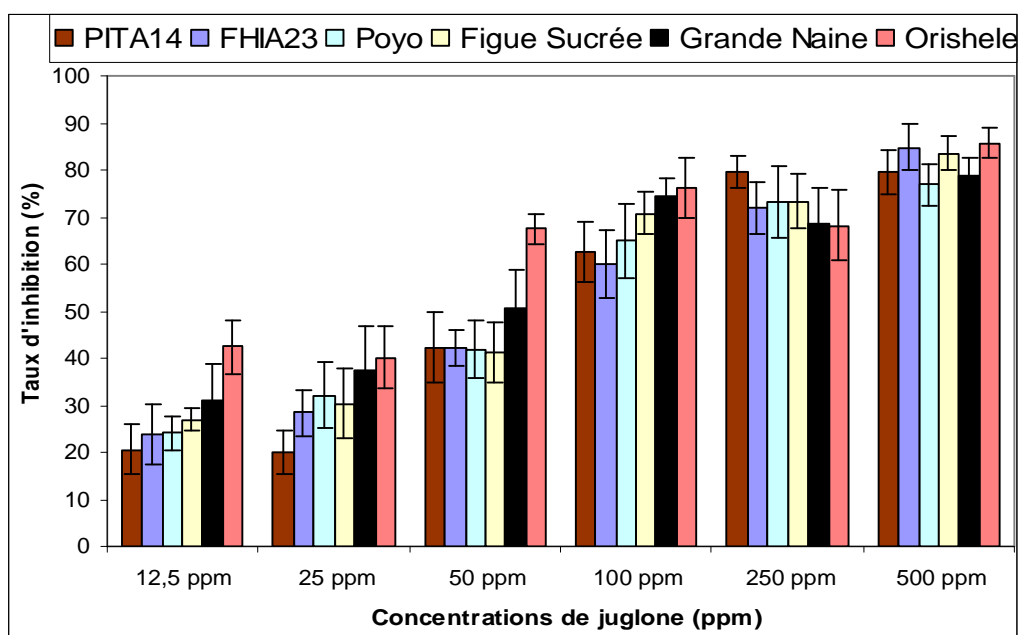


Figure 3: Effet de la juglone sur les propriétés de transfert d'électrons par les chloroplastes isolés des variétés de bananiers testés à partir de la réaction de Hill. Les bars représentent les déviations standard.

L'évaluation de la perte de chlorophylles chez les différentes variétés de bananiers révèle des niveaux de sensibilité à la juglone peu conforme à ceux de l'infection en conditions naturelles par le pathogène. La perte de chlorophylles pourrait être un indicateur beaucoup plus complexe de la toxicité plutôt qu'une simple perturbation de la perméabilité des membranes cellulaires (Abbas *et al.*, 1998). En effet, chez les génotypes de bananiers résistants à la cercosporiose noire, la réaction au stress oxydatif provoqué par l'effet toxique de la juglone, pourrait avoir induit un blocage ou un ralentissement de la dégradation de la chlorophylle. D'après les travaux de Suzuki *et al.* (2004), le ralentissement de la sénescence et le maintien de la survie des feuilles chez le brocoli après traitement à la vapeur d'éthanol, résulteraient de l'inhibition de la dégradation de la chlorophylle et de la suppression de la production d'éthylène via l'inhibition de l'activité des ACC oxydases.

A l'instar de l'oxydation des chlorophylles et leur élimination à travers les membranes désorganisées par la toxine, un autre niveau de complexité de la perte de ces pigments, serait l'interférence entre les différentes formes chlorophylliennes du fait du chevauchement de leurs spectres d'absorption et d'émission (Lorenzen, 1981). La présence simultanée des chlorophylles et de leurs intermédiaires de dégradation (phéopigments) qui absorbent à des longueurs d'ondes voisines, peut avoir entraîné une sous-estimation ou une surestimation de la concentration des chlorophylles. Par ailleurs, suite à la rupture des membranes due aux naphthoquinones fongiques, la sortie de chlorophylles des chloroplastes est en plus accompagnée d'une perte de nucléotides, d'acides aminés, de protéines et de sels minéraux (Medenstev & Akimenko, 1998). La complexité de la réduction de la teneur en chlorophylle sous l'effet de la juglone pourrait avoir été accentuée en outre par

l'interaction entre les radicaux libres et les systèmes antioxydants qui sont formés. En effet, ces deux groupes de composés dont la synthèse est stimulée variablement avec la sensibilité des génotypes étudiés, interagissent suite à l'agression par les molécules naphtoquinoniques telle la juglone (El Hadrami *et al.*, 2005).

En dessous de 50 ppm de juglone, l'inhibition de l'activité des chloroplastes isolés pourrait dépendre de la dose de toxine utilisée, mais au delà elle resterait stationnaire chez toutes les variétés de bananiers. Toutefois, d'après les travaux de Busogoro *et al.* (2004b), chez le cultivar Grande Naine sensible à la MRN, l'inhibition serait fonction de la concentration de juglone tandis que chez Fougamou, une autre variété de bananier partiellement résistant à l'infection, cette inhibition demeurerait stable à partir de 20 ppm.

Le gradient de sensibilité des variétés de bananiers à partir de 100 ppm de juglone, s'est avéré complexe, car les résultats obtenus sont peu conformes à ceux de la sensibilité établie au champ et même à ceux de l'induction de nécroses. Dans ce cas, les génotypes de bananiers sensibles et résistants à la MRN présentent relativement le même comportement. Ainsi, pour de fortes concentrations de juglone, les systèmes antioxydants pourraient alors être débordés au niveau des chloroplastes isolés tant chez les variétés sensibles que résistantes à la maladie. En effet, selon Busogoro *et al.* (2004b), la variabilité de résistance des chloroplastes vis-à-vis de la juglone entre les variétés de bananiers, refléterait leur différence de composition respective en systèmes antioxydants. De ce fait, de faibles concentrations de juglone voisines de la concentration minimale commune (50 ppm) pour l'induction de nécroses, seraient nécessaires pour révéler les différences significatives de comportement entre les génotypes de bananiers dans le test d'inhibition de l'activité des chloroplastes isolés. Par contre, pour la perte de chlorophylles des feuilles en survie sur plante, de fortes concentrations de juglone, supérieures à 250 ppm seraient plutôt indispensables. Etamé (2003) indique pour les différents tests biologiques que les concentrations de 50 ppm, 25 ppm et 10 ppm de juglone, peuvent être retenues respectivement pour le test d'induction de nécroses, de mesure de la fluorescence chlorophyllienne et de la réaction de Hill.

REFERENCES CITEES

Abbas HK, Paul RN, Riley RT, Tanaka T, Shier WT, 1998. Ultrastructural effects of AAL-Toxin TA from the fungus *Alternaria alternata* on black nightshade (*Solanum nigrum* L.) leaf discs and correlation with biochemical measures of toxicity. *Toxicon* 36 (12): 1821-183.

De plus, bien que les chloroplastes puissent constituer les sites primaires d'action des toxines de *M. fijiensis* (Harelimana *et al.*, 1997), il peut être admis que la mise en œuvre des mécanismes de résistance de la plante, impliquerait à la fois différents compartiments cellulaires. Par conséquent, à l'instar d'autres processus physiologiques, il pourrait exister une coopération entre plusieurs compartiments de la cellule afin de parvenir à un meilleur niveau de détoxification des diverses formes actives d'oxygène.

L'évaluation de la réponse à la juglone suivant les paramètres photosynthétiques a donné pour les six variétés de bananiers un gradient de sensibilité partiellement conforme à leurs comportements face à la MRN. Néanmoins, les hybrides tétraploïdes partiellement résistants à cette maladie se sont révélés plus résistants à la juglone que les cultivars. Quant à l'évaluation du comportement des bananiers à partir des paramètres d'induction des nécroses après infiltration de juglone dans les feuilles en survie sur plante, celle-ci donne des résultats similaires à ceux dus à l'infection par le pathogène. Ainsi, PITA14 et FHIA23 ont eu un meilleur niveau de résistance à la juglone contrairement à Grande Naine et Orishele qui se sont montrés sensibles. Toutefois, Figue Sucrée et Poyo ont présenté des comportements intermédiaires entre les deux groupes précédents.

La perte de chlorophylles et l'inhibition de l'activité des chloroplastes isolés ont permis une meilleure interprétation du mode d'action de la toxine ainsi que des mécanismes de résistance des variétés de bananiers à la maladie des raies noires. L'évaluation de la perte en chlorophylles après infiltration de la juglone, a confirmé l'influence de *M. fijiensis* sur l'activité photosynthétique. Par conséquent, associée à d'autres paramètres, la perte de chlorophylles peut permettre d'évaluer de manière fiable la résistance de nouvelles variétés de bananiers à vulgariser.

En outre, la combinaison de méthodes simples pour une évaluation rapide de la sensibilité pourrait être la meilleure stratégie de sélection précoce des génotypes de bananiers résistants à la MRN à partir des toxines.

Busogoro JP, Etame JJ, Harelimana G, Lognay G, Messian J, Lepoivre P, Van Custem P, 2004a. Experimental evidence for the action of *Mycosphaerella fijiensis* toxins on banana photosynthetic apparatus. *In: Banana improvement: Cellular, Molecular, Biology and Induced Mutations*. Jain, SM and R, Sweenen

- (eds.). Science Publishers, Enfield, USA. pp 161-170.
- Busogoro JP, Etame JJ, Lognay G, Messian J, Van Custem P, Lepoivre P, 2004b. Analysis of the mechanisms of action of *Mycosphaerella fijiensis* toxins during the development of black leaf streak disease. *In: Banana improvement: Cellular, Molecular, Biology and Induced Mutations*. Jain, SM and R, Sweennen (eds.). Science Publishers, Enfield, USA. pp 171-181.
- Calvo BCM, 1997. Monitoreo de sensibilidad de las ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet a fungicidas utilizados en su combate. *In: Informe anual, 1996. CORBANA. Direction de investigaciones y servicios agrarias. CORBANA. Corporacion Bananera Nacional. San José (CRI)*. pp 43-51.
- El Hadrami A, Koné D, Lepoivre P, 2005. Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to Black Leaf Streak Disease. *European Journal of Plant Pathology* 113: 241 – 254.
- Etamé AJJ, 2003. Caractérisation des toxines de *Mycosphaerella fijiensis*, l'agent de la cercosporiose noire du bananier pour leur utilisation comme agent de sélection précoce de variétés de bananier résistantes à cette maladie. Thèse de doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. 171 pp.
- Harelimana G, 1997. Etude de l'implication des toxines de *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet dans les mécanismes de résistance partielle des bananiers à la cercosporiose noire. Thèse de doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique, Unité de phytopathologie de la Faculté Agronomique de Gembloux. 153 pp.
- Harelimana G, Lepoivre P, Jijakli H, Mourichon X, 1997. Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivar resistant to Black Leaf Streak. *Euphytica* 96: 125 – 128.
- Jeffrey SW. and Humphrey GF, 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton, *Biochem, Physiol. Pflanzen Bd.* 167: 191-194.
- Jones DR, 2000. Diseases of banana, Abacá and Enset. CABI, New York, USA. p. 544.
- Lorenzen CJ, 1981. Chlorophyll b in the Eastern North Pacific Ocean. *Deep Sea Res.* 28A: 1049-1056.
- Medenstev AG. and Akimenko VK, 1998. Naphtoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry* 47: 935 – 959.
- Mobambo KN, Gauhl F, Swennen R, Pasberg-Gauhl C, 1996. Assessment of the cropping cycle effects on black leaf streak severity and yield decline of plantain hybrids. *International Journal of Pest Management* 42 (1): 1-8.
- Moran R, 1982. Formilae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-diméthylformamide. *Plant Physiol.* 69: 1376-1381.
- Ortiz R, Vulsteke D, Ferris RSB, 1997. Developing new plantain cultivars for Africa. *Seeds Varieties* 10: 39-57.
- N'Guessan AEB, Koné D, Kobenan K, Aké S, Tenkouano A, 2000. Caractéristiques et évaluation de comportement de quelques hybrides tétraploïdes de bananiers plantain dans le Sud de la Côte d'Ivoire. *Bioterre (Revue Internationale des sciences de la Vie et de la Terre)*, 1: 6-21.
- Pasberg-Gauhl, Gauhl F, Jones DR, 2000. Fungal diseases of the foliage: Distribution and economic importance. *In: Diseases of Banana, Abacá and Enset*. Jones D.R. (Ed). CABI New York, USA. pp 37-141
- Pérez L, Hernandez A, Hernandez L, Pérez M. 2002. Effect of trifloxystrobin and azoxystrobin on the control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on banana and plantain. *Crop Protection* 21: 17-18.
- Romero RA. and Sutton TB, 1998. Characterisation of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka of banana in Costa Rica. *Plant Disease* 82 (8): 931-934.
- Stierle AA, Upadhayay R, Hershenthorn J, Strobel GA, Molina G, 1991. The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease of banana and plantains. *Experientia* 47: 853-859.
- Suzuki Y, Uji T, Terai H, 2004. Inhibition of senescence in broccoli florets with ethanol vapour from alcohol powder. *Postharvest Biology and Technology* 31: 177-182.

