

## Effet du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* sacc. sur la succion des rondelles de pomme de terre (*Solanum tuberosum*), au Gabon

\*Alexis Nicaise LEPENGUE<sup>1</sup>, B. IBRAHIM<sup>1</sup>, Jean Fabrice YALA<sup>1</sup>, Séverin AKE<sup>2</sup>, Bertrand M'BATCHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie Végétale et Amélioration des plantes, Unité de recherche Agrobiologie, Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM); BP 067 Franceville, Gabon. Tel/Fax : (00241) 67 77 36 / 07684362 / 06764738

<sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie végétale, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan; 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

\*Correspondant : Email : [lepengue\\_nicaise@yahoo.fr](mailto:lepengue_nicaise@yahoo.fr)

**Mots clés :** *Phoma sabdariffae*, Pomme de terre, succion, masse, électrolytes

**Key words:** *Phoma sabdariffae*, Potato, suction, mass, electrolytes

### 1 SUMMARY

*Phoma sabdariffae* (Phomaceae) est le principal agent pathogène de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*, Malvaceae), au Gabon. Son action repose sur l'excrétion de substances toxiques, susceptibles d'affecter de nombreuses fonctions physiologiques, comme la respiration et la photosynthèse. La présente étude a été conçue pour déterminer l'effet de ces toxines sur les phénomènes de succion par la mesure des variations des masses et des libérations d'électrolytes des fragments de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Les résultats ont montré que le filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* perturbait les mécanismes de succion, en provoquant au sein des échantillons végétaux des entrées excessives d'eau ainsi que de fortes libérations d'électrolytes. Les organes essais ne retrouvaient plus leur capacité régulatrice hydrique et ionique, même après le transfert dans les milieux isotonique ou hypotonique, contrairement aux organes témoins. Le filtrat fongique a vraisemblablement provoqué la nécrose des cellules.

### ABSTRACT

*Phoma sabdariffae* (Phomaceae) is the principal pathogenic fungus of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*, Malvaceae), in Gabon. Its action consists on the excretion of toxic substances, which can affect many physiological functions, like respiratory and photosynthesis. The present study was carried out in order to determine the effects of these toxins on plant suction phenomena. Parameters measured were potato (*Solanum tuberosum* L.) weight variations and electrolyte releases. Results showed that *Phoma sabdariffae* culture filtrate disturbed the mechanisms of suction by causing on the vegetable samples excessive water entries and high releases of electrolytes. The tests samples did not find any more their hydrous and ionic regulating capacity, even after the transfer in the isotonic or hypotonic mediums, contrary to the control. Cellular regulatory capacity is definitively lost, after toxic filtrate treatment. The fungus filtrates probably caused cells necrosis.

## 2 INTRODUCTION

*Phoma sabdariffae* Sacc. est un champignon Deutéromycète de la famille des Phomaceae. Il est le principal agent pathogène de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*, Malvaceae), au Gabon (Mouaragadja et M'batchi, 1998). Les travaux de Lépengué *et al.* (2008) ont montré que l'action de ce champignon était liée à l'excrétion de substances toxiques de nature non hôtes-spécifiques, capables d'affecter de nombreuses fonctions physiologiques, dont la photosynthèse et la respiration. *Phoma sabdariffae* n'étant pas tellurique, sa pathogénicité sur les organes végétaux souterrains, de même l'action de ses toxines sur les fonctions physiologiques de ces organes n'ont jamais été étudiées. Or les racines constituent non seulement les supports fixateurs de la plante, et ses principales voies de

nutrition minérale et hydrique, mais aussi les réserves alimentaires, riches en composés nutritifs. Il était donc important de déterminer, si à l'image de la photosynthèse et la respiration, la succion était également affectée par les productions toxiques de ce champignon. C'est pour cette raison que la présente étude a été réalisée. Elle vise à déterminer, par l'étude des variations des masses et des solutés, l'impact du filtrat des milieux de culture de *Phoma sabdariffae* sur la succion des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae). Ce matériel végétal a été choisi par commodité expérimentale, en raison de l'uniformité de sa composition tissulaire (Savouré, 1980).

## 3 MATERIEL ET METHODES

**3.1 Matériel :** Le matériel utilisé était constitué de *Phoma sabdariffae* Sacc., un champignon imparfait de la famille des Phomaceae, et de 10 tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae).

### 3.2 Méthodes

**3.2.1 Préparation des filtrats fongique et vierge :** Des pycnides de *Phoma sabdariffae* ont été récoltées au champ sur des plantes infectées 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 scapel stérilisé, broyées à l'ultra-turrax dans 100 ml d'eau distillée stérile, et calibrées à  $10^6$  spores/ml à l'aide d'un hématimètre de type Malassez. Cinquante (50) ml de ce broyat ont été prélevés et inoculés, sous une hotte aseptique (Steril Gemini) à 5 L d'une solution de milieu nutritif Richards. La préparation a ensuite été incubée en agitation continue (agitateur Vibramax) pendant 20 j à 28° C, en lumière alternée de 12 h, et filtrée successivement sur papier Wattman n° 2 et sur filtre millipore de 0,22 µm de diamètre. Ce qui a permis d'obtenir le filtrat fongique (ou toxique). Un filtrat témoin (ou filtrat vierge) a également été préparé par le même protocole, à partir d'un milieu Richards non inoculé.

**3.2.2 Effet du filtrat fongique sur la succion des pommes de terre :** Pour chaque filtrat, fongique (essai) ou vierge (témoin), 5 éprouvettes graduées correspondant à 5 périodes d'incubation (0 min, 30 min, 60 min, 90 min. et 120 min.) ont été préparées. Cinquante (50) ml de chaque filtrat ont ensuite été transvasés dans l'éprouvette correspondante, et leur conductivité initiale ( $C_i$ ) mesurée à l'aide d'un conductimètre de marque Jenway 1034. Dix (10) fragments cylindriques de pomme de terre (de 5cm de longueur et 5 mm de diamètre), prélevés à l'aide d'un emporte-pièce métallique, ont été pesés sur une balance de marque Ohaus Analytic 60, et introduits dans chaque éprouvette graduée. La masse initiale relevée a été notée  $M_i$ . Cinquante (50) fragments ont donc au total été préparés par filtrat, pour les 5 périodes d'incubation considérées. Toutes les 30 minutes, les organes végétaux ont été retirés d'une éprouvette, desséchés au papier Joseph, et pesés comme précédemment. La masse finale obtenue a été notée  $M_f$ . La conductivité finale ( $C_f$ ) des filtrats ont également été mesurées. Pour chaque durée d'incubation, les variations de masse (% M), et de libération d'électrolytes (% Le) ont été calculés par les formules suivantes (Lépengué, 2008) :

$$\% M = \frac{M_f - M_i}{M_i} \times 100$$

Equation [1]

$$\% Le = \frac{C_f - C_i}{C_i} \times 100$$

Equation [2]

**3.2.3 Effet du milieu isotonique sur les fragments de pomme de terre traités au filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* :** Après les différentes incubations aux filtrats fongique ou vierge, les fragments de pomme de terre ont été retirés, desséchés entre 2 épaisseurs de papier Joseph, et placés dans 5 autres éprouvettes graduées, contenant chacune 50 ml d'une solution de saccharose isotonique,  $10^{-2}$  M. La concentration de cette solution a préalablement été déterminée avant l'incubation des organes dans les filtrats essai et témoin. Après 1 heure d'incubation, les variations de masse et de libération d'électrolytes ont été calculées sur le modèle des équations précédentes [1] et [2].

**3.2.4 Effet du milieu hypotonique sur les fragments de pomme de terre traités au filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* :** Le comportement des fragments de pomme de terre dans le milieu hypotonique (également déterminé

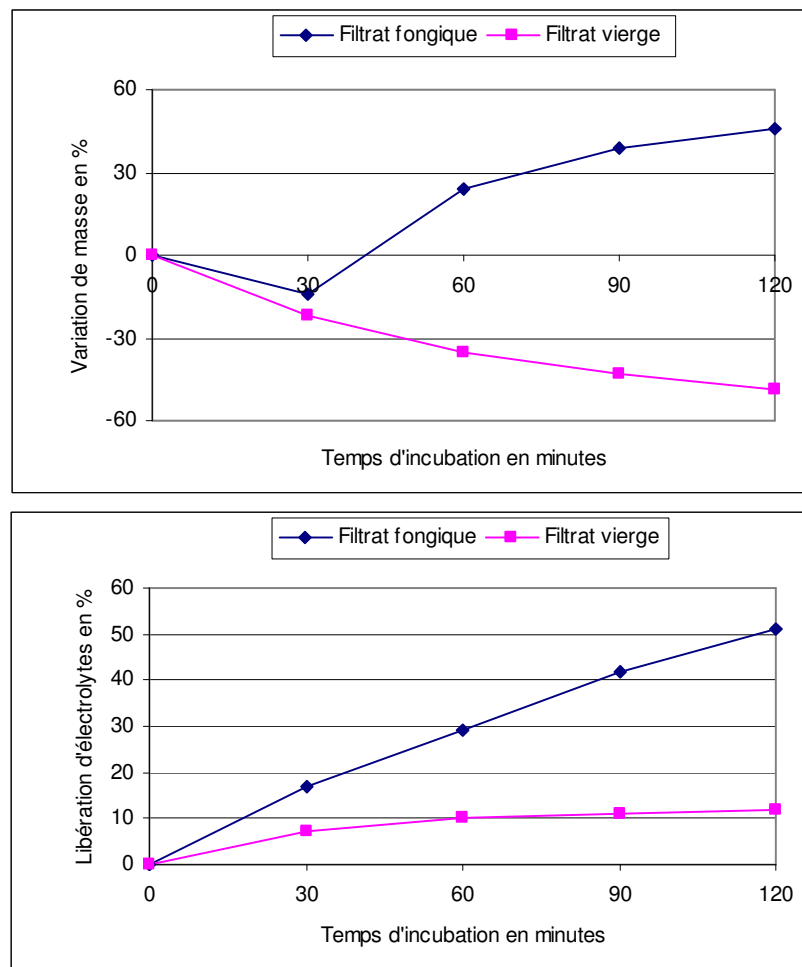
avant l'incubation des échantillons dans les filtrats fongique et vierge) a été étudié par 2 procédés différents. Les organes traités aux filtrats fongique ou vierge ont, soit directement été transférés dans la solution hypotonique de concentration  $10^{-5}$  M de saccharose, soit transitoirement incubés pendant 1 h dans la solution isotonique, avant de subir le traitement hypotonique. Après 1 heure d'incubation dans ce dernier milieu (hypotonique), les variations de masse et de libération d'électrolytes des échantillons ont été calculées sur le modèle des équations précédentes [1] et [2].

**3.2.5 Répétition et traitement statistique :** Toutes les expériences réalisées ont été répétées 3 fois et soumises à une analyse de variance (ANOVA) au logiciel Statistica 6.0. En cas de différences significatives, les moyennes ont été séparées, à l'aide des tests de Newman et Keuls, au seuil de 5 %.

## 4 RESULTATS

**4.1 Effet du filtrat fongique sur les rondelles de pomme de terre :** Les différents comportements des fragments de pomme de terre incubés dans les filtrats fongique (essai) et vierge (témoin) ont été résumés aux figures 1 A & B. Leur analyse a révélé que les organes placés dans le filtrat fongique présentaient des hausses progressives de masse, après une légère baisse durant les 30 premières minutes de traitement (figure 1A). Les

plus fortes augmentations de masse ont été enregistrées à la 120<sup>e</sup> minute, et équivalaient à 46 % de la masse initiale des fragments végétaux. Les organes incubés dans le filtrat vierge ont, à l'opposé, présenté des pertes progressives et irréversibles de masse du début à la fin de l'expérience. Les plus fortes valeurs de baisse ont été notées à la dernière période d'étude (120<sup>e</sup> minute), et correspondaient à des valeurs de - 49 %.



B

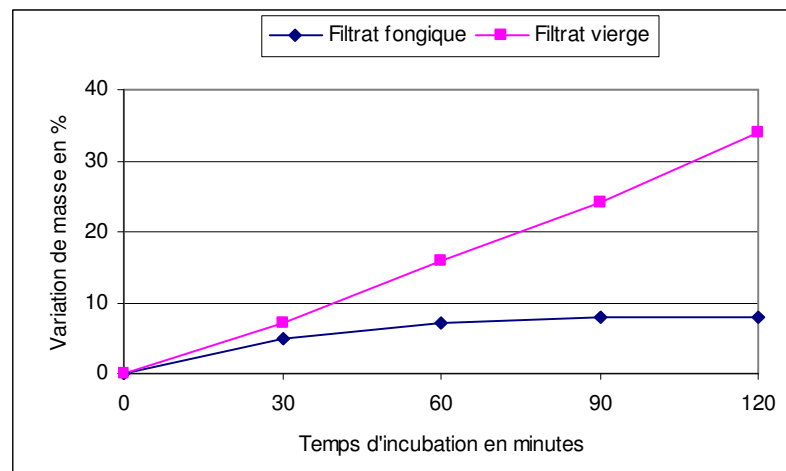
**Figure 1:** Impact du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* sur la masse (A) et la libération d'électrolytes (B) des fragments de pomme de terre à différentes durées d'incubation.

Les résultats de cette étude ont également montré que les fragments de pomme de terre traités au filtrat fongique libéraient des quantités de solutés significativement plus élevées que les organes soumis au filtrat vierge (figure 1B). Les plus forts taux de libération d'électrolytes ont respectivement été de 51 % et de 12 %, pour les filtrats fongique et vierge, et furent obtenus à la dernière période d'incubation (120<sup>e</sup> minute).

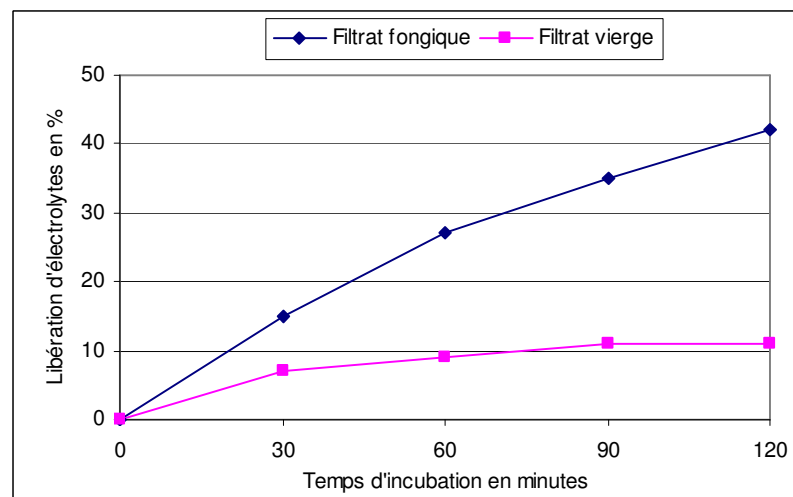
#### 4.2 Comportement des rondelles de pomme de terre dans la solution isotonique :

Les résultats de l'effet du milieu isotonique sur les fragments de pomme de terre préalablement traités aux filtrats fongique (essai) ou vierge (témoin) ont été résumés aux figures 2 A & B. Dans les 2 cas, les organes végétaux ont présenté des hausses

progressives de masse (figure 2A). Mais leurs valeurs étaient en moyenne significativement plus élevées chez les organes essais que chez les fragments témoins. Ce qui, au terme de l'expérimentation, a donné des gains de masse respectivement supérieurs à 33 % et inférieurs à 9 %, pour les organes essais et témoins. En ce qui concerne la conductivité, les résultats ont montré que le transfert des fragments de pomme de terre des solutions fongique ou vierge vers le milieu isotonique, s'accompagnait des libérations variables de solutés dans le milieu récepteur (figure 2 B). Les taux d'électrolytes libérés par les organes essais étaient en moyenne significativement plus élevés que ceux produits par les fragments témoins.



A

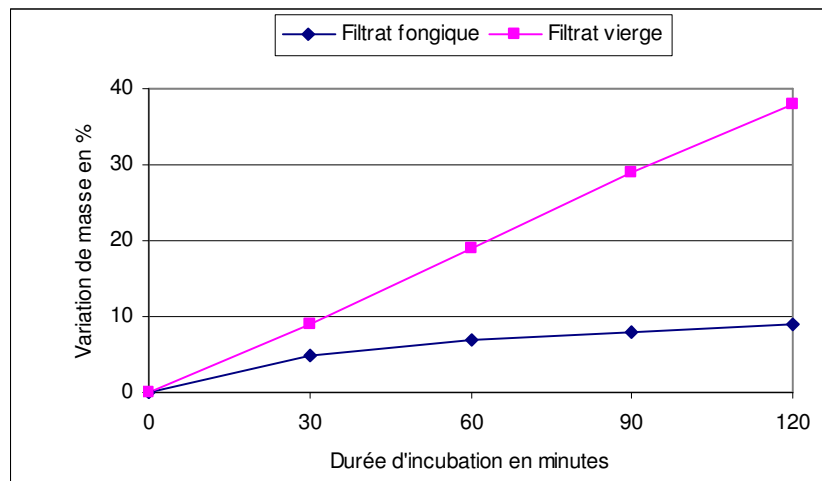


B

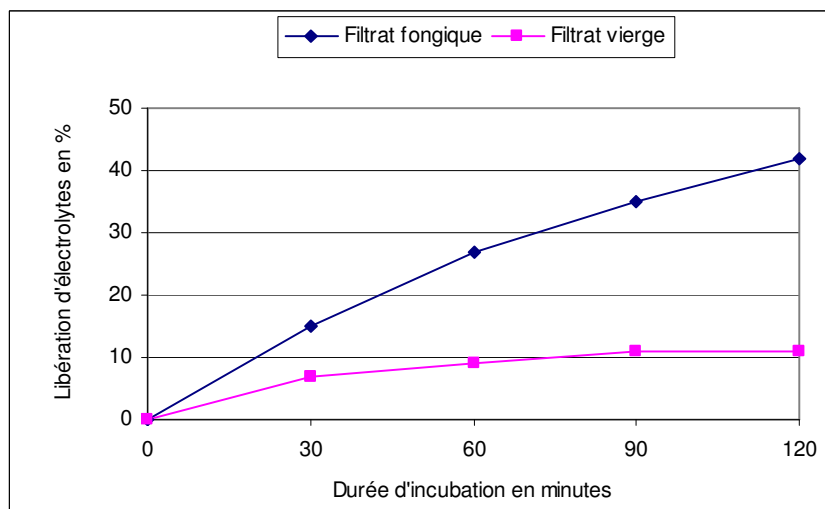
**Figure 2 :** Evolution des masses (A) et des électrolytes (B) dans le milieu isotonique de saccharose, des fragments de pomme de terre préalablement traités au filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* (filtrat fongique ou essai) et vierge (filtrat témoin).

**4.3 Comportement des rondelles de pomme de terre après transfert du milieu isotonique vers le milieu hypotonique :** Les résultats de l'action du milieu hypotonique sur les fragments de pomme de terre préalablement traités aux filtrats fongique ou vierge, puis transférés dans le milieu isotonique sont assez semblables à ceux obtenus précédemment, après un seul transfert dans le milieu isotonique. On a notamment observé que les augmentations de masse des organes issus du milieu fongique dépassaient les valeurs de 30 %,

alors que celles des fragments provenant du milieu vierge n'atteignaient même pas 10 % (figure 3 A). Pour la libération d'électrolytes, les taux enregistrés ont en moyenne été plus élevés chez les organes issus du filtrat toxique, que chez ceux provenant du filtrat vierge (figure 3 B). L'analyse statistique a montré que les variations de masse et des solutés des organes exposés aux 2 traitements (filtrats fongique et vierge) étaient significativement différentes, au seuil de 5 %.



A

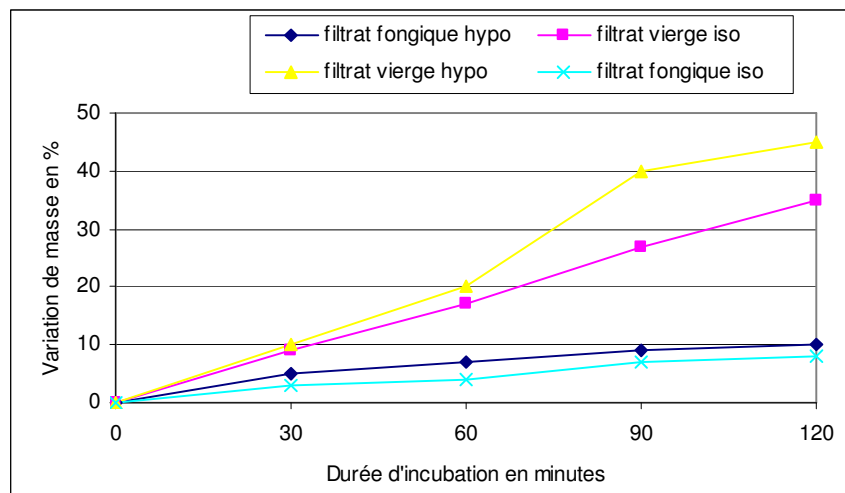


B

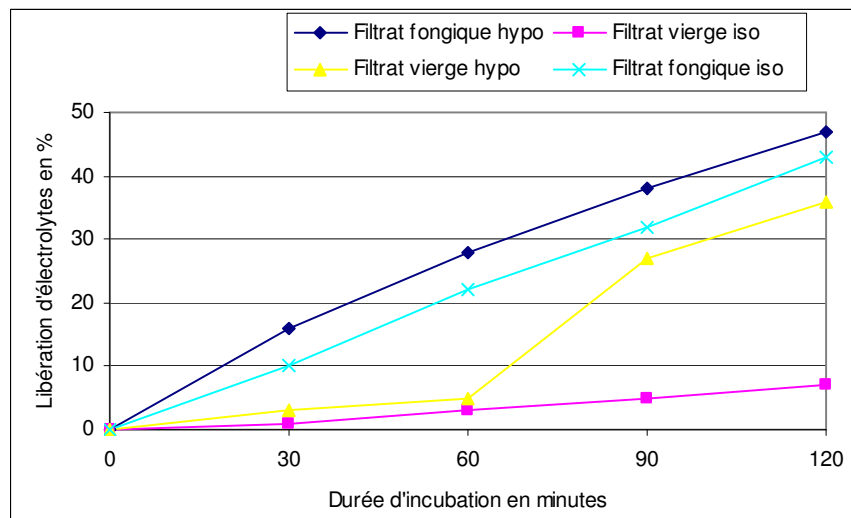
**Figure 3 :** Evolution des masses (A) et des électrolytes (B) dans les milieux hypotoniques de saccharose des fragments de pomme de terre traités au filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* (filtrat fongique ou essai) et vierge (témoin), et préalablement incubés dans une solution isotonique.

**4.4 Comportement des rondelles de pomme de terre après différents types de transferts dans la solution hypotonique :** Les résultats de cette étude ont montré que les échantillons de pomme de terre préalablement traités au filtrat fongique présentaient de faibles augmentations de masse, indépendamment des types de transfert (direct ou indirect) effectués (figure 4 A). Dans les 2 cas, les

gains de masse ont été inférieurs à 11 %. En revanche, chez les organes provenant du milieu vierges, une forte hausse de masse a été notée (supérieure à 34 %), dans les 2 types de transfert, avec toutefois, une plus grande élévation (à partir de la 60<sup>e</sup> minute) chez les organes directement transférés dans le milieu hypotonique.



A



B

**Figure 4 :** Evolution des masses (A) et des électrolytes (B) dans les milieux hypotoniques de saccharose, des fragments de pomme de terre préalablement traités au filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* (filtrat fongique ou essai) et vierge (témoin) et transférés directement dans les milieux hypotoniques, ou après incubation dans une solution isotonique.

Légende :

Filtrat fongique hypo : Mesure des organes traités au filtrat fongique et transféré directement dans les milieux hypotoniques

Filtrat fongique iso : Mesure des organes traités au filtrat fongique et ayant transité dans le milieu isotonique.

Filtrat vierge hypo : Mesure des organes traités au filtrat vierge et transféré directement dans les milieux hypotoniques

Filtrat vierge iso : Mesure des organes traités au filtrat vierge et ayant transité dans le milieu isotonique.

L'étude des solutés a montré que les organes traités au filtrat fongique, et ceux issus du filtrat vierge, et transférés directement dans le milieu hypotonique, libéraient de fortes quantités d'électrolytes, contrairement à ceux qui avaient transité par le milieu isotonique (figure 4 B). A la 120<sup>e</sup> minute, par

exemple, ces taux étaient nettement supérieurs à 35 %, chez les 3 premiers milieux précités, alors qu'ils n'atteignaient même pas, pour la même période, 8 %, dans le dernier milieu. L'étude statistique a montré que la différence de solutés libérés entre les



3 premiers milieux et le dernier, était significative au 5

## DISCUSSION

Les résultats de ce travail ont révélé que les fragments de pomme de terre incubés dans le filtrat vierge présentaient de pertes progressives de masse et de solutés. Les pertes de masse traduisent une sortie d'eau des organes vers le milieu extérieur. C'est un phénomène physique de diffusion lié à la pression osmotique, donc à la concentration du milieu (Heller *et al.*, 2002). Le milieu d'incubation (filtrat vierge) serait donc plus concentré (hypertonique) que le milieu intérieur (la pomme de terre), qui serait alors hypotonique. Pour les fragments traités au filtrat fongique toxique, une légère perte de masse, suivie d'une rapide augmentation des valeurs ont été notée, concomitamment à de fortes libérations d'électrolytes. Cette succession de perte et de regain de masse est un fait insolite, qui pourrait être lié à de mouvements diffusifs de sortie et d'entrée d'eau dans l'organe, suite à un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire des cellulaires constitutives (Heller *et al.*, 2002).

Les résultats de la libération d'électrolytes (fortes sorties de solutés) sont en accord avec cette hypothèse de perturbation de la régulation des échanges ioniques membranaires entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Les composés toxiques présents dans le filtrat fongique pourraient avoir provoqué des ruptures pariétales et membranaires des cellules, comme l'ont rapporté Johal et Briggs (1992) chez le maïs infecté par *Cochliobolus carbonum*. En effet, plusieurs toxines fongiques admettent au niveau des membranes cellulaires des plantes hôtes, des sites récepteurs sur lesquelles elles peuvent se fixer, et qui sont généralement des pompes protéiques de types Na-K ATPases, K-Mg ATPases ou K ATPases, (Meeley *et al.*, 1992). Ces fixations perturbent le fonctionnement normal des pompes protéiques, conduisant, entre autres, à la sortie incontrôlée des solutés cytosoliques vers le milieu extérieur, concomitamment à une entrée d'eau. De tels phénomènes ont été rapportés chez les mandariniers, en réponse aux toxines produites par *Alternaria alternata* (Otani *et al.*, 1995). Un phénomène similaire a également été signalé chez l'avoine, en réaction aux toxines de *Helminthosporium victoriae* (Wolprtt *et al.*, 1995). Les résultats de cette étude ont également montré que le transfert des organes témoins dans la solution qui leur était

seuil de 5 %.

préalablement isotonique s'accompagnait d'un regain de masse, suivi d'une faible libération d'électrolytes. Chez les organes traités au filtrat toxique, seules les pertes de solutés se sont avérées significatives. Ces résultats rendent compte de 2 phénomènes physiologiques classiques (Heller *et al.*, 2002). Dans le cas des organes témoins, le regain de masse traduit un reflux d'eau dans les fragments végétaux, conséquemment au phénomène diffusif de pression osmotique, dû à l'hypertonie des organes par rapport au milieu d'incubation. La faible sortie d'électrolytes est le reflet d'un réel contrôle des échanges ioniques par les organes au niveau de leurs membranes cellulaires. Pour les échantillons préalablement soumis au filtrat fongique, ces résultats rendent compte de leur inactivité, donc de leur mort probable. En effet, les faibles variations de masse, ainsi que les fortes sorties de solutés laissent penser à de phénomènes passifs de diffusion incontrôlée à travers la membrane cellulaire. Le séjour des pommes de terre dans le filtrat fongique a possiblement provoqué la nécrose des tissus, perturbant ainsi la régulation des échanges inter membranaires.

Les résultats de ce travail ont aussi montré que les organes initialement incubés dans le filtrat vierge présentaient un regain de masse, et de faibles libérations de solutés après avoir été transférés du milieu isotonique vers le milieu hypotonique. Mais les mesures de ces 2 paramètres étaient significativement plus élevées chez les organes directement transférés du filtrat vierge vers le milieu hypotonique. Chez les organes essais, aucune variation significative de masse n'a été enregistrée, quoique les taux de libération d'électrolytes fussent élevés. Ces différents comportements physiologiques des organes provenant des milieux témoins sont vraisemblablement liés à un effet de choc ionique, comme l'ont rapporté Nabors *et al.* (1980), au sujet de la sensibilité des cellules du tabac au NaCl. En effet, le passage brutal d'un milieu hypertonique vers un milieu hypotonique peut engendrer un stress chimique qui aboutit à l'éclatement des cellules et au dysfonctionnement de l'appareil membranaire. Ceci expliquerait donc la surélévation des valeurs de masse et de solutés libérés par les organes issus directement du milieu hypertonique, comparativement à ceux provenant



du milieu isotonique, qui auraient de ce fait été

ménagés.

## 6 CONCLUSION

Tout comme la photosynthèse ou la respiration, la succion est également sensible au filtrat de culture de *Phoma sabdariffae*. L'action toxique traduite par de fortes hausses de masse et de libération d'électrolytes suggère d'importantes mortalités

cellulaires des tissus de pomme de terre étudiés. Les travaux à venir devraient permettre de déterminer si ces conclusions sont extrapolables aux racines de la roselle, la plante hôte.

## 7 BIBLIOGRAPHIE

- Heller R, Esnault R. and Lance C: 2002. Physiologie végétale. Développement. 6<sup>e</sup> édition de l'Abrégé, édition Dunod, Paris, 366 p.
- Johal GS. and Briggs GS : 1992. Reductase activity encoded by the HM disease resistance gene in maize. *Science*, **258** : 985-987.
- Lépengué AN : 2008. *Contribution à la protection de la roselle (Hibiscus sabdariffa L. var. sabdariffa), contre la pourriture engendrée par Phoma sabdariffae Sacc. et Trichosphaeria sp., au Gabon: Etude des mécanismes d'action fongiques phytotoxiques.* Doctorat d'Université, UFR Biosciences, Univ. Cocody-Abidjan, 294 p.
- Lépengué AN, M'batchi B. and Aké S: 2007. 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.
- Lépengué AN, M'batchi B. and Aké S: 2008. 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.
- Meeley RB, Johal GS, Briggs GS. and Walton JD : 1992. A biochemical phenotype for a disease resistance gene maize. *Plant Cell*, **4** : 71-77.
- Mouaragadja I. and M'batchi B: 1998. Etude et identification de la pourriture de l'oseille de Guinée au Gabon. *Fruits*, **53** (1): 57-68.
- Nabors MW, Gibbs SE, Bernstein CS. and Neis ME: 1980. NaCl-tolerant tobacco plant from cultured cells. *Z.P.F. Lanzen Physiol.*, **97**: 13-17.
- Otani H, Kohmoto K. and Kodama M: 1995. *Alternaria* toxins and their effects on host plants. *Can J. Bot.*, **73** : 453-458.
- Savouré JC : 1980. Manipulations pratiques en physiologie végétale. Masson, Paris, 1980.
- Wolpert TJ, Navarre DA, Lorang JM. and Moore DL: 1995. Molecular interactions of victorin and oats. *Can J. Bot.*, **73**: 475-482.