

Activités des toxines sécrétées par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* agent causal du bayoud du palmier dattier et d'autres formes spéciales du *Fusarium oxysporum*

Sedra My H.¹, El Fakhouri R.², Lotfi F.² et Lazrek H.B.²

¹Laboratoire de phytopathologie, génétique et lutte microbiologique (LPGLM), INRA-Marrakech, Maroc

²Laboratoire de chimie bio-organique, Faculté des sciences-semlalia, Marrakech

Résumé

Trois isolats du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), agent causal du Bayoud, de différents niveaux d'agressivité sont tous capables de produire des toxines en milieu de culture Czapeck. Ces toxines provoquent des symptômes de dessèchement sur les feuilles du palmier dattier. En outre, une relation positive a été révélée entre la production de toxines, l'apparition des symptômes, l'agressivité des isolats et la nature ou la concentration des toxines sécrétées dans les milieux de culture. Le filtrat de culture et la fraction F_{II} du F.o.a. ont été testés vis-à-vis de différentes espèces de plantes (tomate, tabac, tournesol, maïs et palmier dattier), ces dernières ont présenté des symptômes de la maladie à l'exception du tabac. L'effet toxique de ce filtrat de culture apparaît supérieur à celui de la fraction F_{II} . De même, l'activité toxique de la fraction F_{II} sur les feuilles détachées des plantules de tomate, de tournesol et du maïs confirme la non spécificité des toxines sécrétées par le F.o.a.

De plus, les fractions F_{II} sécrétées par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *elaeidis* et par un isolat de *Fusarium oxysporum* saprophyte n'ont aucun effet sur les rachis du palmier dattier et seul la fraction F_{II} du F.o.a. possède un effet toxique positif. Les principes actifs des fractions F_{II} du F.o.a sont différents de ceux des trois autres *Fusarium oxysporum*, il s'agit donc de nouvelles toxines dont la caractérisation chimique n'a pas encore été élucidée.

Mots-clés : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, f.sp. *lycopersici*, f.sp. *elaeidis*, F.o. saprophyte, toxines, palmier dattier, spécificité

Abstract : Toxins secreted by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* and other special forms of *F. oxysporum* : activities of these toxins on date palm and other hosts

Three isolates of different aggressiveness levels from *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), causal agent of Bayoud disease, are able to produce toxins in culture filtrate. These toxins have shown symptoms on detached leaves of date palm.

Furthermore, the relationship between toxin production, appearance of symptoms, aggressiveness of isolates, nature or concentration of toxins in culture filtrate was revealed.

Culture filtrate and fraction F_{II} of F.o.a. have been tested towards various species of plants (tomato, date palm, maize, sunflower), and shown disease symptoms except for tobacco. Toxic effect of fraction F_{II} on detached leaves from tomato, sunflower and maize seedlings suppose that toxins secreted by F.o.a. are not specific. In addition, toxic effect of fraction F_{II} from : *Fusarium oxysporum*, f. sp. *albedinis*, F.o. f. sp. *lycopersici*, F.o. f. sp. *elaeidis* and F.o. f. sp. *saprophytic* towards date palm was negative and only fraction F_{II} of F.o.a. has a positive toxic effect. We can conclude that active molecule of fraction F_{II} of F.o.a are likely different from those of the three other *Fusarium*. Thus, a novel toxins was obtained but was not identified yet.

Key words : *Fusarium oxysporum* f.sp., *albedinis*, f.sp. *lycopersici*, f.sp. *elaeidis* and saprophytic strains, toxins, date palm, specificity

ملخص : نشاط الإفرازات السامة للفطر المسبب لمرض البيوض واسلالات أخرى للفوزاريوم او كسيسبروم

سدرة م.ح.¹، الفاخوري ر.²، لطفي ف.² ولزرق ح.ب.²

1 مختبر أمراض النبات والدراسات الجينية والمكافحة البيولوجية، المركز الجهوي للبحث الزراعي، مراكش، المغرب

2 مختبر الكيمياء البيوعضوية، كلية العلوم السملالية، مراكش، المغرب

أثبتت الدراسة أن ثلاث عزلات من الفطر المسبب لمرض البيوض مأخوذة من ثلاث واحات مختلفة، كلها قادرة على إفراز المواد السامة F_I ، F_{II} ، F_{III} في وسط غذائي Czapeck. تحدث هذه المواد السامة أعراض تبييض أوراق معزولة من نخيل التمر، إضافة إلى ذلك بينت النتائج العلاقة الإيجابية بين الإفرازات السامة المستخرجة من محلول الفطر ونوعيتها وتركيزها من جهة، وقدرات الفطر العدائية من جهة أخرى.

لقد أثبتت المادة F_{II} و محلول الفطر المسبب لمرض البيوض (Filtrat) قدرتهما على إصابة نخيل التمر ونبات الطماطم والذرة ونوار الشمس باستثناء نبات التبغ، وينبغي الإشارة إلى أن قوة إفراز السم عند محلول الفطر تفوق قدرة المادة F_{II} .

كما أن المادة F_{II} المستخرجة من محاليل السلالات *F. o. f.sp. elaeidis*, *F. o. sp. saprophyte*, *F. o. f.sp. lycopersici* لم يكن لها أي تأثير على عزف نخيل التمر مما يدعو إلى القول بأن مكونات الفطر المسبب لمرض البيوض *F. o. f.sp. albedinis* تختلف عن مكونات السلالات الأخرى من صنف الفطر المسبب لمرض البيوض. ولذلك تقام بعض الدراسات والأبحاث للتعرف على نوعية وخصوصية هذه المادة.

الكلمات المفتاحية : المواد السامة الفطرية وخصوصيتها، نخيل التمر، الفوزاريوم، مرض البيوض

Introduction

Les phytotoxines fongiques ont été étudiées par les phytopathologistes pour plusieurs raisons. La plus importante est certainement celle qui concerne leur effet sur la croissance des plantes. Actuellement, il a été démontré que la pathogénéicité du parasite est étroitement liée à la capacité de produire des phytotoxines.

Pour de nombreuses maladies fongiques, les toxines produites par les champignons jouent un rôle majeur dans le processus destructif des plantes (Scheffer et Briggs, 1981). Néanmoins, l'étude des toxines reste délicate. Il peut exister une sécrétion simultanée de plusieurs toxines par le champignon, la formation d'un complexe non spécifique ou la possibilité d'une synergie entre deux ou plusieurs composés toxiques (Korpinen et Ylimak, 1972 ; Petitprez et al., 1984).

L'objectif de ce travail est, d'une part, d'étudier la toxicité du filtrat de culture de certains isolats du *F. o. f.sp. albedinis* (*Foa*), agent causal du Bayoud, ce parasite constitue un fléau dévastateur des palmeraies marocaines et algériennes, et d'autre part, de sélectionner les isolats les plus agressifs et leur utilisation dans la production des toxines. Ce travail permettrait en outre d'étudier la spécificité de ces toxines et l'effet des toxines sécrétées par différents *Fusarium oxysporum* sur le palmier dattier.

Matériel et méthodes

Etude de l'agressivité des isolats du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*

Cette étude a porté sur trois isolats du parasite prélevés de palmes atteintes des arbres adultes provenant de différentes régions phoenicoles, le tableau 1 indique la date d'isolement et leur origine. Les isolats ont été préalablement comparés sur leur niveau d'agressivité sur les plantules de trois feuilles du palmier dattier issues du croisement entre parents sensibles Jihel x mâle DS1. Quatre répétitions de 10 plantules ont été utilisées. La mortalité des plantules due à l'attaque du parasite est appréciée tous les mois et pendant 6 mois.

Tous ces isolats ont été conservés dans le sable à la mycothèque du laboratoire de phytopathologie génétique et lutte microbiologique INRA-Marrakech.

Tableau 1. Date d'isolement et origine des isolats du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*

Isolat	Cultivar du palmier dattier	Date d'isolement	Origine géographique
<i>F. o. a</i> 133	Saïr	1985	Tissergale (Draà)
<i>F. o. a</i> 145	Saïr Layalate	1986	Tata (Bani)
<i>F. o. a</i> 66a	Boufeggous	1986	Zagora (Draà)

Culture du champignon en milieu liquide et obtention des filtrats de culture

La culture est effectuée sur un milieu Czapeck liquide (2g de NaNO_3 ; 1g de K_2HPO_4 ; 0.5g de KCl ; 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 30g de saccharose dans 1000 ml d'eau distillée à pH=4). Le milieu de culture est réparti dans des erlens de 250 ml à raison de 200ml/erlen, autoclavés à 120 °C pendant 20 minutes. Les erlens contenant le milieu de culture sontensemencés, par une suspension du *F.o.a.* de chaque isolat de concentration estimée auparavant par la cellule de Mallassez à 10^6 spores/ml. Ces erlens sont ensuite placés sur une table d'agitation de type Bolafite à raison de 80 tours/mn, à température ambiante du laboratoire. Après 8 jours, la culture obtenue est centrifugée à 6000 tours/mn pendant 10 minutes. Le surnageant ainsi obtenu, constitue le filtrat de culture.

Appréciation du degré de toxicité de filtrat de culture des isolats

La toxicité des filtrats de culture est étudiée selon la méthode de Schipper (1978) (absorption pétioleaire) sur les feuilles détachées prélevées de jeunes vitroplants âgés de trois ans et appartenant au cultivar Jihel connu par sa sensibilité au Bayoud. Cette méthode adaptée sur les feuilles de palmier dattier (Sedra *et al.*, 1993) consiste à recouper les pétioles des feuilles au scalpel pour favoriser l'absorption et les placer dans des tubes à essai contenant la solution à tester à une température de 27 °C. Pour chaque traitement, cinq feuilles ont été soumises au filtrat et cinq feuilles constituent le témoin. Les différences de toxicité des filtrats des isolats s'expriment par des différences dans le délai d'apparition des symptômes.

Etude de la spécificité des toxines du *F. o. f.sp albedinis*

L'étude de la spécificité des toxines sécrétées par *F. o. f.sp albedinis* (Sedra *et al.*, 1993) est réalisée sur les feuilles détachées des plantules de 5 espèces : tomate, tabac, tournesol, maïs et palmier dattier cultivées sous serre vitrée. Ces tests sont réalisés en tubes à essai comme il est décrit précédemment.

Compte tenu des résultats de plusieurs essais réalisés sur les feuilles (Sedra *et al.*, 1993), nous estimons qu'une concentration de 0,04 mg/ml du produit toxique est suffisante pour observer rapidement les symptômes.

Dans ce même essai, en utilisant les feuilles détachées des plantules des 5 espèces, nous avons comparé l'activité du filtrat de culture et celle de la fraction F_{II} extraite à partir du filtrat de culture du *F. o. f.sp albedinis* (El Fakhouri *et al.*, 1996a), après dissolution dans un volume d'eau distillée égal au volume du filtrat de culture du départ utilisé. Nous avons environ deux mg de la fraction F_{II} pour 100 ml de culture (tableau 2). Chaque feuille reçoit deux ml de solution.

Tableau 2. Niveaux d'agressivité sur les plantules et quantité de toxines secrétées par divers isolats du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*

Isolats	% d'attaque des plantules*	Fractions		
		I	II	III
		Quantité de toxines en mg/ml		
133	55 a	45 a	30 a	20 a
145	30 b	20 b	15 c	10 b
66a	25 b	20 b	25 bc	20 a

* : Pourcentage d'attaque moyen des plantules des palmiers issues du croisement entre parents sensible Jihel x mâle local Ds1. Résultat obtenu après 6 mois d'observation . Les chiffres moyens suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents pour $p = 0,05$ (Test de Duncan).

Effet des toxines de différent *Fusarium oxysporum* sur le palmier dattier

Dans un essai préliminaire, nous avons montré que les fragments de rachis donnent des résultats similaires que les feuilles détachées. La toxicité de la fraction F_{II} extraite à partir du filtrat de culture de différents *Fusarium oxysporum* a été comparée sur les rachis du palmier dattier.

Trois formes spéciales du *Fusarium oxysporum* : f.sp. *albedinis*, f.sp. *lycopersici*, f.sp. *elaeidis* et f.sp. saprophyte isolées à partir du sol ont été utilisées dans cette étude.

L'effet toxique de la fraction F_{II} de différents isolats a été apprécié par trempage des fragments de cultivar sensible Boufeggous préalablement lavés dans des solutions contenant la substance à tester. Les rachis témoins sont trempés dans l'eau stérile. Les boîtes de Petri contenant les fragments de rachis sont placées à la lumière du jour, dans une température ambiante allant de 22 °C à 27 °C. Les anomalies observées sur les rachis sont notées régulièrement pendant 20 jours. Les symptômes observés sont :

- nécrose
- dessèchement total du rachis

Résultats et discussions

Niveaux d'agressivité des isolats du *F. o.* f.sp *albedinis* et leur aptitude à sécréter des toxines

Les résultats présentés dans le tableau 2 indiquent que l'isolat *F. o. a.* 133 est le plus agressif des isolats avec 55% d'attaque des plantules contre 25% et 30% pour les autres isolats respectifs 66a et 145. Les plantules témoins inoculés avec l'eau restent indemnes. De plus, tous les isolats du *F. o.* f.sp *albedinis* secrètent des toxines. Le tableau 2 indique le poids des fractions, extraites à partir du filtrat de culture de chaque isolat pour un litre de culture. Les chiffres munis de la même lettre sur la même colonne ne sont pas significativement différents pour $p = 0,05$ (test du Duncan). Le tableau 3 montre le niveau d'agressivité de leurs toxines sur les feuilles détachées de palmier dattier. En outre, tous les isolats du *F. o.* f.sp *albedinis* secrètent des toxines

capables de provoquer les symptômes de dessèchement sur les feuilles. En effet, ce symptôme apparaît plus tôt pour l'isolat 133 que pour les isolats 145 et 66a. L'isolat 145 présente un comportement plus proche de l'isolat 66a. Le dessèchement est total après 10 jours pour l'isolat 133 et après 16 à 18 jours pour les autres isolats. Dans le cas du témoin, les feuilles ne présentent aucun symptôme.

Tableau 3. Effet des toxines des différents isolats du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* sur le dessèchement des feuilles du cultivars Jihel exprimé par l'indice de dessèchement des feuilles notées de 0 à 3

Nombre de jour d'observation*	Isolats du <i>F. o. f.sp albedinis</i>		
	133	145	66a
2	1	0	0
4	1	0	0
6	2	0	1
8	2	1	1
10	3	1	1
12	3	1	1
14	3	1	2
16	3	2	2
18	3	3	3

* : Après trempage des feuilles dans la solution de toxine.

0 : Pas de symptôme

1 : Très léger dessèchement

2 : Nécrose marginale

3 : dessèchement total des feuilles

Cette variabilité des isolats du *F. o. f.sp. albedinis* pour la production de la toxine, laisse suggérer que la différence de l'apparition des symptômes pour les différents isolats peut être attribuée à l'agressivité de l'isolat et qu'il existerait une relation entre l'agressivité et la nature ou la concentration des toxines sécrétées (Publication en cours de préparation). Cette variabilité a été déjà démontrée par plusieurs auteurs dans d'autres *Fusarium* tels que *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Kern, 1972) et *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (Davis, 1969). Ainsi, Lemaire *et al.*, (1984) ont constaté qu'il existe une variabilité chez les souches de *pyrenochaeta lycopersici*, agent causal de la tomate et du melon, pour la production de la toxine, toutes les souches très toxiques sont agressives, mais il existe des souches très agressives non toxiques.

Etude de la spécificité des toxines du *F. o. f.sp albedinis*

Les différentes espèces testées vis-à-vis du filtrat de culture et de la fraction F_{II} (excepté le tabac) ont présenté des symptômes caractérisés par une nécrose pétiolaire, provoquant l'enroulement des feuilles puis un dessèchement total. Les feuilles témoins ne présentent aucun symptôme pendant toute la durée du test. En effet, l'apparition des symptômes a été plus précoce pour le filtrat de culture dès le 2^{ème} jour du test (fig.1). Le 7^{ème} jour, toutes les feuilles sont entièrement touchées. Cette forte toxicité est due, du fait que le filtrat de culture contient

les divers toxines de nature peptidique (El Fakhouri *et al.*, 1996a) ainsi que d'autres molécules toxiques, telles que l'acide fusarique mis en évidence par Surico et Graniti (1977) et Mochlisse en (1987).

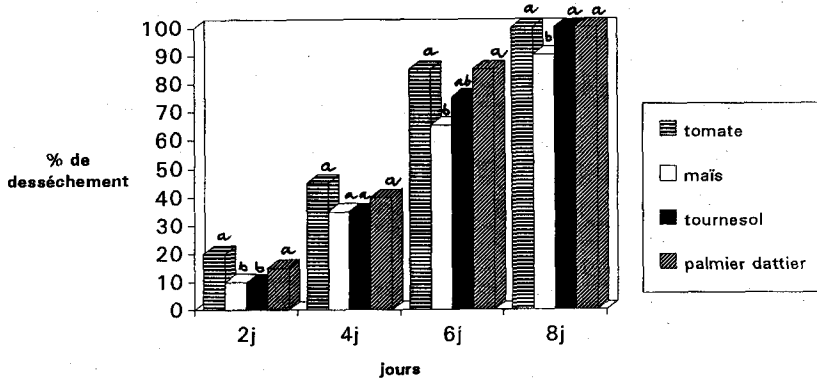


Figure 1. Effet du filtrat de culture du *Foa* sur les feuilles détachées des plantules de tomate, tournesol, palmier dattier et maïs. Pourcentage moyen des feuilles desséchées calculé à partir de 3 répétitions de 5 feuilles chacune. Pour chaque durée, les histogrammes affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents pour $p = 0,05$ (test de Newman et Keuls).

Alors que pour la fraction F_{II} , les symptômes n'apparaissent qu'à partir du 6^{ème} jour (fig.2). Le léger retard dans l'apparition des symptômes avec la fraction F_{II} devrait être attribué, soit au fait que la fraction F_{II} est plus diluée que le filtrat, soit à une différence de concentrations relatives à différents composés dans chacun deux. Il est intéressant de noter que l'activité toxique de la fraction F_{II} sur les feuilles détachées des plantules de tomate, de tournesol et de maïs confirme la non spécificité de ces toxines pour leur hôte : le palmier dattier. Des travaux sur d'autres types de plantes sont en cours pour confirmer cette non spécificité des toxines sécrétées par le *F. o. f.sp albedinis*.

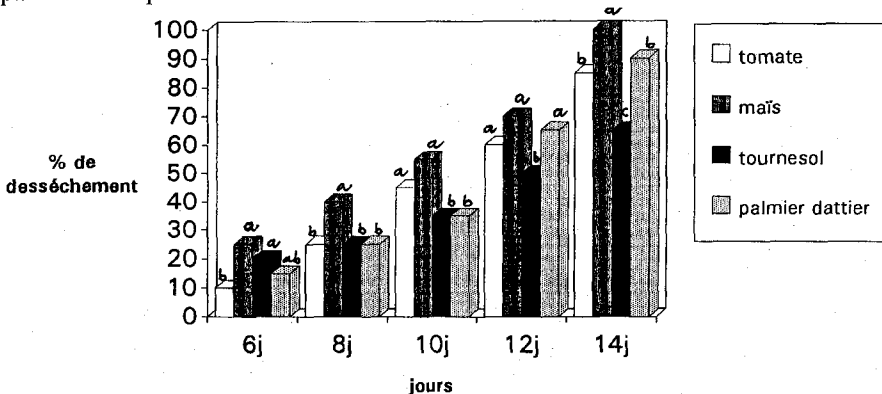


Figure 2. Effet de la fraction F_{II} du *Foa* sur les feuilles détachées des plantules de tomate, tournesol, palmier dattier et maïs. Pourcentage moyen des feuilles desséchées calculé à partir de 3 répétitions de 5 feuilles chacune. Pour chaque durée, les histogrammes affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents pour $p = 0,05$ (test de Newman et Keuls).

Effet des toxines des différents *Fusarium oxysporum* sur le palmier dattier

Les résultats de l'action des toxines extraites par les différents *Fusarium oxysporum* sur les fragments de rachis montrent une variabilité du comportement des *Fusarium oxysporum* testés. En effet, seules les toxines issues du *F. o. f.sp albedinis* sont capables d'exercer une action phytotoxique sur le palmier dattier en provoquant des symptômes morbides, qui peuvent se résumer en une nécrose suivi d'un dessèchement total des rachis du palmier dattier. Les autres fractions F_{II} du *F. f.sp lycopersici*, *f.sp elaeidis* et *F. oxysporum* saprophyte n'ont aucun effet toxique.

A ce phénomène, deux hypothèses peuvent être émises pour les toxines sécrétées par le *F.o.a.* et les autres toxines sécrétées par les trois autres *Fusarium oxysporum* :

- Soit que les principes actifs des différentes fractions F_{II} sont de nature chimique différente.
- Soit qu'il s'agit de même nature chimique, mais de structure différente.

Par ailleurs, le comportement négatif des 3 *Fusarium oxysporum* vis à vis du palmier dattier rejette l'idée de la présence d'acide fusarique et des toxines peptidiques sécrétées par le *F. o. f.sp. albedinis* (El Fakhouri *et al.*, 1996b) parmi les principes actifs des différentes fractions des trois parasites, car selon Mokhlisse (1987), l'acide fusarique possède une action phytotoxique importante sur le palmier dattier. La présence de nouvelles toxines est donc confirmée, et ceci pourrait être directement lié avec la nature du parasite et non avec le protocole d'extraction des toxines. L'identification et la caractérisation de ces toxines ne sont pas encore élucidées de façon précise.

La résistance du matériel végétal aux toxines du *F.o. f.sp lycopersici*, *F.o. f.sp elaeidis* peuvent être attribuée à la spécificité de ces toxines pour leurs hôtes respectives tomate et palmier à huile. Il est donc nécessaire d'attendre les tests préconisés ici pour le palmier dattier pour d'autres familles de plantes, ce que nous envisageons de réaliser.

Conclusion

Ce travail a permis d'évaluer la différence de toxicité entre le filtrat de culture et la fraction F_{II} du *F.o.a.* vis-à-vis des plantes étudiées. La sélection des isolats a montré l'existence d'un gradient d'agressivité entre eux. En outre, nous avons pu définir la spécificité et l'effet des toxines sécrétées par différents *Fusarium oxysporum* sur le palmier dattier.

Références bibliographiques

- Davis D. (1969). Fusaric acid in selective pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* . **59**, 1391-1395.
- El Fakhouri R. (1993). Identification et étude de la toxicité des différents constituants peptidiques des toxines sécrétées par le *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, agent causal du Bayoud. Thèse de 3^{ème} cycle. (Marrakech-Maroc).

- El Fakhouri R. (1993). Identification et étude de la toxicité des différents constituants peptidiques des toxines sécrétées par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. Thèse de 3^{ème} cycle. (Marrakech-Maroc).
- El Fakhouri R., Lazrek H.B., Bahraoui E., Sedra MY.H. et Rochat H. (1996a). Preliminary investigation on a peptidic toxins produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Phytopathology Mediterraneana* . **35**, 11-15.
- El Fakhouri R., Lotfi F., Sedra MY.H. et Lazrek H.B. (1996b). Production et caractérisation chimique des toxines sécrétées par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, agent causal du Bayoud. *Al Awamia* n°93, 81-92.
- Kern H. ; Naef-Roth S. et Rufner F. (1972). The influence of nutritional factors on the formation of naphthazarin derivatives by *Fusarium martii* var *psi*. *Phytopathol. Z.* **74**, 272-280.
- Korpinen E.L. et Ylimak A. (1972). *Annals agricultures Fenniae*. **11**, 308.
- Lemaire J.M. ; Glandard A. ; Laterrat H.; Connus M. et Blanchard D. (1984). Mise en évidence d'une toxine chez *Pyrenochaeta lycopersici* Scheneider et Gerlach, agent des racines liègeuses ou Corky-root de la tomate et du melon. *Rev. Cytol. Véget. bot.* **7**, 193-204.
- Mokhlisse N. (1987). Contribution à l'identification et à l'étude de la toxicité des différents constituants de la toxine sécrétée par le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Thèse de 3^{ème} cycle . (Marrakech-Maroc).
- Petitprez M. ; Gelie B. ; Albertini L. et Barrault G. (1984). Actions biologiques des phytotoxines de *exs-rohilum turcicum*. *Rev. Cytol. Véget. bot.* **7**, 261-270.
- Scheffer R.B. et Briggs S.P. (1981). Introduction : a perspective of toxin studies in plant pathology. In Durbin (R.D) : *Toxins in plant disease*. P. 1-20. Academic Press édit., New york et Londres.
- Schipper A. L. Jr. (1978). A *hypoxylon mamatum* toxin responsible for canker formation in quaking aspen. *Phytopathology* **68**, 868-872.
- Sedra MY.H. ; El Fakhouri R. et Lazrek H.B. (1993). Recherche d'une méthode fiable pour l'évaluation de l'effet des toxines du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* sur le palmier dattier. *Al Awamia* **82**, 89-103.
- Surico G. et Graniti A. (1977). Prodizione di tossine da *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Phytopathology* **16**, 30-33.