

# Mise en évidence de la présence des toxines dans le filtrat de culture du *Verticillium dahliae*, agent causal de la verticilliose de l'olivier

Sedra<sup>1</sup> My.H., Laouane H.<sup>1,2</sup> et Lazrek H.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Phytopathologie, Génétique et Lutte Microbiologique. Centre du Haouz Pré-Sahara INRA- Marrakech, Maroc

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Bio-organique Département de Chimie. Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, Maroc

## Résumé

*Cette étude vise d'une part, de trouver les conditions favorables à la multiplication du *Verticillium dahliae*, agent causal de la verticilliose de l'olivier, sur deux milieux de culture (Richard et Gzapeck) en fonction du pH, et à montrer d'autre part que le milieu Richard à,  $7 < \text{pH} < 8$ , est le milieu favorable pour le développement du parasite ainsi que la sécrétion des substances toxiques. De même, il a été constaté que l'extrait butanolique (E) est le plus toxique sur les jeunes rameaux de l'olivier.*

**Mots clés :** *Verticillium dahliae*, toxines, olivier, verticilliose

**Abstract :** Evaluation of the presence of filtrat toxin in the culture medium of *Verticillium dahliae* isolate from olive trees, the causal agent of *verticillium* wilt.

*This study consists on the evaluation of the conditions for multiplication of *Verticillium dahliae* isolate from olive trees. First, the effect of the pH on the growth of fungi is described in two culture media (Gzapeck and Richard). The Richard medium at  $7 < \text{pH} < 8$  appears to be the most favourable for multiplication and toxin production. Indeed, butanolic extract is the most toxic on the young olive tree branches.*

**Key words :** *Verticillium dahliae* (kleb), toxin, olive tree, *Verticillium* wilt

## ملخص : إبراز وجود المواد السامة في رشاحة الوسط الغذائي *verticillium Dahliae* الفطر المسبب لمرض ذبول الزيتون

سدرة م.ح.1، لعوان ح.2 و بيهي لزرق ح.2

1 مختبر أمراض النبات والدراسات الجينية و المكافحة البيولوجية، المركز الجهوي للدوز، ص.ب 533، مراكش، المغرب  
2 مختبر الكيمياء البيوعضوية، قسم الكيمياء، كلية العلوم، السملاية، مراكش، المغرب

تهدف هذه الدراسة إلى إيجاد الظروف الملائمة لنمو الفطر *Verticillium dahliae* المسبب لمرض ذبول الزيتون أولاً. تصف هذه الدراسة أثر pH على نمو هذا الفطر على وسطين غذائيين (كزاييك و ريشار). أسفرت النتائج على اختيار وسط غذائي ريشار مع  $pH < 8$  لنمو هذا الفطر لإفراز المواد السامة. وقد تبين أن المستخلص البيتانولي (butanolique) أظهر قدرته على إصابة أغصان الزيتون.

**الكلمات المفتاحية :** الفطر الفيرتسيليوم، المادة السامة الفطرية، الزيتون، مرض الذبول

## Introduction

La verticilliose de l'olivier dénommée dépérissement de l'olivier ou nécrose des pousses causée par *Verticillium dahliae* (Kleb.) est la maladie la plus redoutable dans les oliveraies des pays méditerranéens. Elle fait partie des maladies telluriques contre lesquelles, il est difficile de lutter. La lutte génétique par l'utilisation des variétés ou cultivars résistants à la verticilliose est le moyen adopté par l'Institut National de la Recherche Agronomique. La sélection pour le caractère de la résistance à la maladie nécessite la mise au point de tests simples, rapides et complémentaires qui permettent de trier le matériel génétique au stade plantule.

La plus part des formes spéciales de *Verticillium* produisent des toxines de nature diverse polysaccharidiques (Ralph et Green, 1954), lipopolysaccharidique (Keen et Long, 1972a ; Keen et al., 1972b ; Nachmias et al., 1982 ; Chaïb, 1987), glycopeptidiques (Buchner et al., 1982) et peptidiques (Nachmias et al., 1987). Les isolats produisant ces toxines sont des champignons pathogènes sur le coton, la tomate ou la pomme de terre.

Au Maroc, la verticilliose de l'olivier est signalée pour la première fois par Serrhini en 1992 dans la région de Meknès. Plusieurs études ont été réalisées sur cette maladie (Serrhini et Zerroual, 1995 ; Lachger et Sedra 1996 ; Lachger et al, 1997 ; Cherrab et al., 2000). Le présent travail vise à :

- chercher les conditions favorables pour la culture du *V. dahliae* sur milieu synthétique liquide pour l'extraction des toxines.
- apprécier l'effet toxique des filtrats de culture sur les milieux Gzapeck et Richard ainsi que l'effet de l'extrait butanolique sur les jeunes rameaux de l'olivier.

## Matériel et méthode

### Isolement du champignon

Le *V. dahliae* a été isolé à partir d'une branche d'un arbre atteint montrant les symptômes de la verticilliose selon la méthode préconisée par Lachger et Sedra (1996) pendant le printemps (1998) sur milieu PDA contenant de la Streptomycine (Potato Dextrose Agar). Ensuite le champignon a été purifié par repiquage sur le même milieu.

### Effet du pH sur la croissance du *V. dahliae* sur milieu solide

L'isolat utilisé (Vd18), isolé d'un arbre malade dans la région de Tamellalt (environ de Marrakech), a été choisi pour sa grande agressivité vis-à-vis de l'olivier (Lachger et al., 1996). Il est repiqué sur les deux milieux synthétiques Richard (10g de NaNO<sub>3</sub>; 0.02g de FeCl<sub>3</sub>; 4g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2.5g de MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O; 50g du saccharose; 15g d'Agar dans 1l d'eau distillée) et Gzapeck (2g de NaNO<sub>3</sub>; 0,5 de KCl; 1g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.5g de MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O; 0.01 de FeSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O; 30g du saccharose; 15g d'Agar dans 1l d'eau distillée) à des pH variant de 5 à 9. Le pH est ajusté par l'acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) et la soude (NaOH). Trois répétition de deux boîtes de Pétri chacune ont été faites par pH et par milieu de culture. Les repiquages sont effectués à partir d'une culture âgée de 10 jours maintenue sur milieu PDA.

Les boîtes du premier repiquage sont placées sous la lumière continue à une température de 25°C. Les notations de la croissance du parasite ont été effectuées par mesure des deux diamètres perpendiculaires de la colonie tous les deux jours pendant 16 jours. Les valeurs sont représentées par la moyenne qui est calculée à partir de Dm et les écart-types (figure 1).

$Dm = (D1 + D2)/2$  avec  $Di = (D \text{ vertical} + D \text{ horizontal})/2$   $i = 1$  et  $2$  pour chaque répétition.

### Etude de la sporulation et de la croissance pondérale du champignon en fonction du milieu liquide

Les deux milieux liquides Richard et Gzapeck ( $7 < \text{pH} < 8$ ) sont ensemencés par l'utilisation de 1ml d'une suspension de spores de *V. dahliae* (isolat Vd18) à raison de 15000 conidies/ml. Dix erlens de 250 ml contenant 150 ml du milieu ont été utilisés pour chaque répétition; la culture est placée sur table d'agitation à 80 t/min à la température 25°C. L'appréciation de la crois-

sance et de la sporulation a été faite respectivement par mesure de la masse mycélienne et par comptage du nombre de spores. Les prélèvements ont été effectués au 4<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jours. Le dénombrement des spores/ml est effectué à l'aide de la cellule de Malassez. Le culot de la culture est obtenu par centrifugation à 8000 tours par minute pendant 10 minutes, puis séché sur papier filtre à la température ambiante pendant 3 jours. Cette étude est répétée trois fois, les résultats obtenus sont analysés par comparaison des moyennes et des écarts-types (figure 2 et 3).

## Etude de la toxicité du filtrat de culture sur les jeunes rameaux de l'olivier

Les filtrats de culture sont obtenus par centrifugation à partir des deux cultures du parasite âgées de 14 jours sur les deux milieux de culture Gzapeck et Richard. Les tests de toxicité ont été réalisés sur des jeunes rameaux issus d'un arbre d'olivier (*Picholine marocaine*) cultivé à l'INRA- Marrakech. Les jeunes rameaux sont détachés et trempés immédiatement dans des tubes contenant les filtrats. Cinq rameaux par tube et par filtrat ont été utilisés ; dans le cas des tubes témoins, les rameaux sont trempés dans l'eau stérile. Les tubes sont placés dans la chambre de culture climatisée (20-25°C) et photopériode (16h/8h). Les anomalies observées sur les rameaux sont notées régulièrement pendant 15 jours. Les symptômes observés sont:

- enroulement des feuilles.
- détachement ou défoliation des feuilles.
- dessèchement total des rameaux.

Les résultats sont représentés sous forme de taux de dessèchement et de mortalité après 15 jours.

## Extraction des substances toxiques à partir du filtrat de culture du *V. dahliae*

Pour l'extraction des substances toxiques, le filtrat de culture (5 litres) est concentré par évaporation sous vide à une température inférieure à 45°C jusqu'à l'obtention d'un volume égale au 1/20 du volume initial. Les macromolécules sont précipitées par le méthanol à 4°C pendant 48 heures. Le surnageant obtenu est évaporé sous vide pour l'élimination du méthanol. La solution obtenue est passée sur une colonne (3 x 50 cm) d'adsorption (Norite-Célite) à base de l'eau qui permet une filtration et une décoloration de la solution. Ensuite, cette solution est extraite successivement en utilisant des solvants organiques : n-héxane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et le n-butanol. Après évaporation, seul le butanol qui arrive à épuiser des solutés de masse importante alors qu'avec les autres solvants aucune soluté n'a été détecté. L'extrait butanolique obtenue après évaporation (E) a été pesé et conservé au réfrigérateur à 4°C pour être utilisé, plus tard, dans les tests biologiques.

## Etude de l'effet des extraits sur les jeunes rameaux de l'olivier

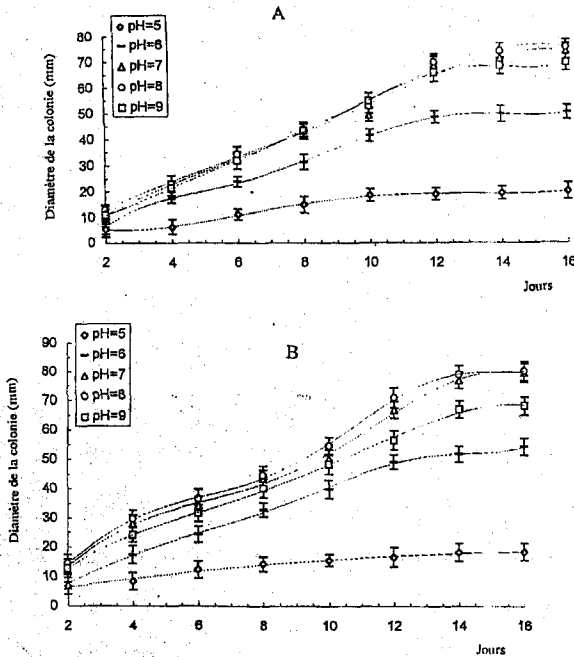
La méthode d'appréciation de la toxicité de l'extrait (E) consiste à tromper séparément les jeunes rameaux dans des solutions de concentrations 10(g/ml ; 20 (g/ml et 40(g/ml ; parallèlement d'autres rameaux sont trompés dans une solution contenant des spores en suspension à  $10^5$  spore/ml à titre de comparaison. Cinq répétitions, de trois rameaux chacune, ont été utilisées pour chaque concentration. Les rameaux témoins sont trompés dans de l'eau stérile. Les symptômes observés ont été notés tous les deux jours et pendant 15 jours.

## Résultats et disucssion

### Effet du pH sur la croissance du champignon sur milieu solide

La figure 1 montre que la croissance du champignon varie en fonction du pH du milieu. En effet pour les deux milieux, le champignon se développe à des pH allant de 6 à 9 mais pas de la même vitesse. Sur les deux milieux, la croissance mycélienne est significativement optimale à partir du 12<sup>ème</sup> jour de culture. La croissance à pH=6 est faible, inhibée à pH=5 et globalement meilleure à pH=7 , 8 et 9. Pour le milieu Richard, à pH=7 - 8, cette croissance est statistiquement maximale à partir de 12<sup>ème</sup> jour de culture.

Wilhelm et Taylor (1965) a étudié l'évolution de la maladie en fonction du pH du sol et a conclu que la gravité de la maladie diminue lorsque le pH du sol est compris entre 4,2 et 4,8. Elle s'accroît quand le pH passe de 4,6 à 6,2. De même, Jones et Woltz (1972) notent que les sols basiques sont favorables au développement de la verticilliose. Lahlou (1974) étudiant l'effet du pH sur la croissance du *V. dahliae* isolé de la tomate a montré que le pH optimum est 7,2. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par ces auteurs et peuvent expliquer la gravité de la maladie observée dans les sols basiques marocains.



**Figure 1.** Variation de la croissance du *V.dahliae* sur milieu de culture gélosé en fonction du pH : A : milieu Gzapeck ; B : milieu Richard

## Appréciation de la sporulation et la croissance pondérale du parasite sur les deux milieux liquides

Les résultats sont représentés dans la figure 2 et 3 sous forme de courbes avec les valeurs moyennes et les écart-types on fonction du temps.

Sur les deux milieux, la sporulation et la croissance pondérale sont significativement optimales à partir du 10<sup>ème</sup> jour de culture. En effet, la sporulation est meilleure sur le milieu Richard, elle est estimée à 10<sup>8</sup> spores/ml après 10 jours d'incubation, alors qu'elle ne dépasse pas 10<sup>7</sup> spores/ml pour le milieu Gzapeck. Sur le milieu Richard la masse mycélienne est de 170mg/l du milieu tandis qu'avec le milieu Gzapeck cette masse ne dépasse pas 70 mg/l du milieu.

A la lumière de ces résultats nous constatons qu'une meilleure croissance du parasite nécessite un milieu assez riche en carbone et en azote. Le champignon a besoin d'une quantité assez élevée de source de carbone (50g/l) et d'une quantité élevé de la source d'azote (10g/l). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Lahlou (1974) qui a constaté que la croissance optimale du *V.dahliae* isolé de la tomate se situe à une concentration du sucre entre 20 et 100g/l. Le milieu Richard est donc le plus favorable à la croissance du *V. dahliae* à cause de sa richesse en saccharose et en Azote à 7<pH<8.

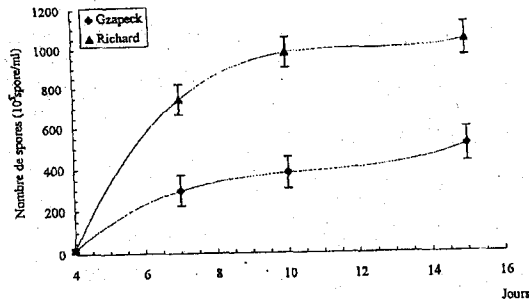


Figure 2. Sporulation du *V. dahliae* dans les deux milieux Gzapeck et Richard

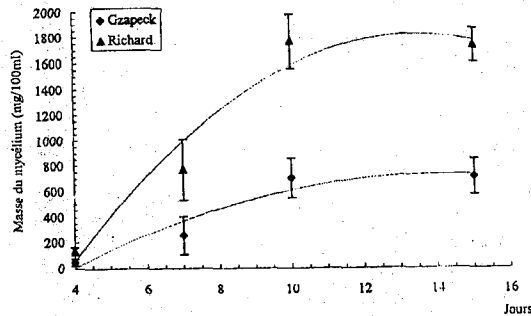


Figure 3. Croissance mycélienne du *V. dahliae* sur les deux milieux Gzapeck et Richard. L'intervalle de confiance au seuil de 5% est représenté par le trait vertical

### Etude de l'activité toxique du filtrat de culture sur les rameaux d'olivier

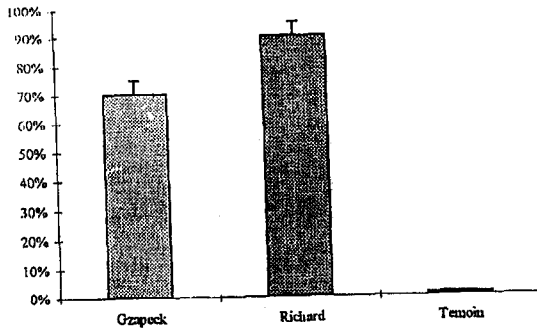
Les résultats sont représentés sous forme de pourcentage de mortalité. Le filtrat provoque un brunissement au niveau de la partie émergée de la tige. Ce brunissement s'accroît et se développe pendant les premiers jours. Cependant, après 10 jours le pourcentage de mortalité est de 90% avec le filtrat du milieu Richard alors qu'il n'est que de 70% avec le filtrat du milieu Gzapeck. Aucun symptôme de dessèchement n'a été noté sur les rameaux témoins trempés dans de l'eau stérile sans filtrat. La toxicité des deux filtrats a été observée préférentiellement sur les jeunes rameaux. Ceci est en accord avec le travail de Irland (1987) qui a utilisé le filtrat de culture de *V. albo-atrum* pour l'évaluation de la résistance de la luzerne contre la verticilliose.

## Effet de l'extrait butanolique sur les rameaux de l'olivier

La quantité extraite par le n-butanol à partir du filtrat du milieu Richard est de 380mg/l contre 200mg/l pour le filtrat du milieu Gzapeck . Les résultats du test de toxicité de ces extraits butanoliques, pour les deux concentrations 20 et 40 g/ml, indiquent que les symptômes apparaissent dès le 6<sup>ème</sup> jour. Le pourcentage de mortalité atteint 86% pour les deux concentrations après 15 jours. A faible concentration (10(g/ml) aucune anomalie n'a été observée. Les symptômes (enroulement des feuilles) sont semblables à ceux observés sur les rameaux trompés dans une suspension de spores.

La technique que nous avons adoptée pour l'extraction des toxines suggère que le parasite sécrète des toxines peut être de nature différente de celles sécrété par le *V.dahliae* isolé de la tomate, du coton ou de la pomme de terre. Ceci peut être expliquer à la différence de la méthode d'extraction pratiqué par les autres auteurs (Ralph et Green, 1954 ; Nachmias et al, 1982 ; Mohan et al, 1990). La vérification de ces résultats nécessite la purification des toxines, la détermination de leurs structures ainsi que leur toxicité vis-à-vis l'olivier.

Taux de mortalité de jeunes plants



**Figure 4.** Pourcentage de mortalité des jeunes rameaux de l'olivier sous l'effet des deux filtrats de culture du champignon cultivé sur les deux milieux Gzapeck et Richard.

## Conclusion

Les résultats présentés dans cette étude montrent d'une part que le milieu Richard est très favorable pour la croissance du champignon dans les 10 premiers jours d'incubation et d'autre part la présence des toxines dans le filtrat de culture du parasite.



## Références bibliographiques

- Buchner V., A. Nachmias, and Burstein (1982). Isolation and characterization of a phytotoxic glycopeptide from a protein-lipopolysaccharide complex produced by potato isolate of the *Verticillium dahliae*. FEBS lett. 138 : 261-264.
- Chaib N. (1987). Contribution à l'étude des relations entre les variations morphologiques et le pouvoir pathogène du *Verticillium albo-atrum*, forme à microsclérotés. Analyse des substances phytotoxiques. Diplôme de spécialité de 3ème cycle. Université Mohammed V.
- Cherrab M., M.N. Serrhini et P.M. Charest (2000). Characterization of Moroccan isolates of *Verticillium dahliae* Kleb. using the RAPD markers. Journal of phytopathology 148 (4) : 243-249.
- Jones J.P. et S.S. Woltz (1972). Effet of soil, pH and micronitriens of *Verticillium* and *Fausarium* wilt of tomato; plants Dis.Rept.56 : 39-53.
- Keen N.T. et M. Long (1972). Isolation of protein-lipopolysaccharide complex produced from *Verticillium Albo-atrum*. Physiological plant pathology 2 (4) : 307-315.
- Keen N.T., M. Long et D.C. Erwin (1972). Possi ble involvement of a pathogèn-produced protien-lipopolysaccharide complex in *verticillium* wilt. Physiological plant pathology 2 (4) : 317-331.
- Lachger K. et My H. Sedra (1996). Importance de la verticilliose dans la région du Haouz au Maroc: Répartition et caractérisation des isolats du *Verticillium dahliae* (Kleb). IVème congrés 19-22 Novembre 1996. Parc Phenix-Nice. France.
- Lachger K., My. H. Sedra et A. Tantaoui (1997). Vegetatif compatibility of strains of *Verticillium dahliae* (Kleb) from olive tree in Morocco. 10th congres of the Medeterranean Phytopathological, Union, Montpellier. 1-5/6/1997. France.
- Lahlou H. (1974). Etude des caractéristiques morphologiques et biologiques du champignon parasite des genres *Verticillium* et leur valeur taxonomique pour identifier les souches isolées au Maroc, Alawamia, 50.
- Mohan S.K., J.R. Davis, D.L. Corsoni, L.H. Sorenseh et J.J. Pavek (1990). Reaction of potato clones and accessions of *Solanum* spp. to *Verticillium dahliae* Kleb. and its toxin
- Nachmias A., V. Buchner, et J. Krikun (1982). Comparison of protein-lipopolysaccharide complexe produced by pathogenic and non-pathogenic strains of *Verticillium dahliae* Kleb. from potato. Physiol. Plant pathol. 20 : 213-221.
- Nachmias A., Buchner V., L. Tsrer, Y. Burstien et N. Keen (1987). Differential phytotoxicity of peptides from culture fluids of *Verticillium dahliae* races I and II their relationship to pathogenicity of the fungi on tomato. Phytopathology. 77 : 506-510.
- Ralph J. et Jr. Green (1954). A preliminary investigation of toxins produced in vitro by *Verticillium Albo-atrum*. Phytopathology 44 : 433-437.
- Serrhini M.N. (1992). Les maladies cryptogamiques importantes sur l'olivier au Maroc. Séminaire sur le controle des maladies de l'olivier. DPVCTRF Rabat.
- Serrhini, M.N. et A. Zeroual (1995). La verticilliose de l'olivier au Maroc. Oliv : N° 58. 58-61.
- Irland, K. F. et K.T. Leath (1987). Potential of using culture filtrat from *Verticillium albo-atrum* to evaluate alfalfa germplasm for resistance to *Verticillium* wilt. Plant Disease 71 : 900-903.
- Wilhelm S. et J.B. Taylor (1965). Controle of *Verticillium* wilt of olive Through natural covery and resistance. Phytopathology 55 : 310-316.