

## **ETUDE DE L'ACTIVITE PHYTOTOXIQUE DE *PHOMA MACDONALDII*, AGENT PATHOGENE RESPONSABLE DE LA MALADIE DES TACHES NOIRES**

**Anne Chaillou, Carine Larfeil, Claudia Pelage, Ali Roustae, Grégory Déchamp-Guillaume et Gérard Barrault**

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, avenue de l'Agrobiopôle, BP 107, F-31326 Auzeville-Tolosane cedex, France

Fax : +33 (0)5 62 19 39 17 - e-mail : barrault@ensat.fr

**Résumé** : En quelques années, les attaques de *Phoma* se sont généralisées à toutes les zones de culture du tournesol. Cette maladie est responsable de dégâts quantitatifs et qualitatifs, entraînant des pertes de rendement de l'ordre de 10 à 30%, voire 60% quand l'agent pathogène détermine une sénescence prématurée de la plante. Le champignon responsable de la maladie des taches noires (black stem disease) est *Phoma macdonaldii* Boerema dont la forme parfaite a été décrite sous le nom de *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi. 17 souches monospores de *Phoma macdonaldii* provenant de symptômes sur tige ont été isolées. La mise au point d'un test précoce de contamination sur pétiole de cotylédon a permis de caractériser l'agressivité de ces souches sur la base d'une échelle de notation de 0 à 9. Ce test permet également d'évaluer la tolérance à la maladie de génotypes de tournesol. L'activité phytotoxique du filtrat brut de culture de *Phoma macdonaldii* a été évaluée grâce à un bioessai sur plantules. Les résultats obtenus montrent que cette activité est : photo-indépendante, hôte-dépendante, thermostable et concomitante avec la croissance du champignon. Des résultats préliminaires semblent indiquer que la biosynthèse du zinniol, phytotoxine produite par *Phoma macdonaldii*, serait photo-dépendante, ce qui suggère l'existence d'autres toxines. A terme, cette étude devrait permettre d'appréhender le rôle du zinniol dans l'interaction *Phoma macdonaldii* - tournesol, notamment sur la base de la corrélation agressivité - biosynthèse du zinniol *in vitro* et *in planta*.

**Summary** : Over the last few years, *Phoma* attacks have extended to all sunflower areas. The disease results in qualitative and quantitative damage, with yield losses of 10 to 30%, or even 60% when the pathogen induces early plant senescence. The fungal pathogen, which is the causal agent of the black stem disease, is *Phoma macdonaldii* Boerema, whose teleomorph was described as *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi. Seventeen monosporal strains of *Phoma macdonaldii* were isolated from diseased stems. The development of an early contamination test on cotyledon petiole led to the characterization of strain aggressivity on a 0-9 scale. The test was also used for the assessment of sunflower genotype resistance to the disease. The phytotoxic activity of the raw filtrate of *Phoma macdonaldii* cultures was assessed using a seedling bioassay. The phytotoxic activity was shown to be photo-independent, host-dependent, thermostable and concomitant to fungal growth. As zinniol biosynthesis appears to be photo-dependent, the results obtained so far suggest the possible occurrence of other toxins. The investigations carried out should lead to a better understanding of the rôle of zinniol in the *Phoma macdonaldii*-sunflower interaction, particularly in terms of the aggressivity-zinniol biosynthesis correlation *in vitro* and *in planta*.

Dix-sept souches monospores de *Phoma macdonaldii* d'origine géographique différente ont été purifiées. Il est essentiel que les caractéristiques pathologiques et physiologiques des souches puissent être constantes dans le temps. Une méthode de conservation a donc été mise au point.

#### Effets de la température sur la croissance de *Phoma macdonaldii* :

Les résultats obtenus montrent qu'il y a un effet significatif de la température sur la croissance des souches. On note de plus une interaction souches-températures signifiant que les souches ne réagissent pas toutes de la même manière à la température. Pour toutes les souches, la température minimum est 5°C et la température maximum est 35°C. Les températures optimum sont comprises entre 20 et 30°C selon la souche considérée.

#### Pycnidogénèse et taille des pycnides de *Phoma macdonaldii* :

Le nombre de pycnides est variable selon la souche considérée. Les souches ayant une faible sporulation produisent 15 à 20 pycnides par mm<sup>2</sup>, tandis que pour les souches ayant une forte sporulation la densité de pycnides est comprise entre 45 et 50 par mm<sup>2</sup>. Il n'y a pas de corrélation entre le nombre et la taille des pycnides.

#### Germination des pycniospores de *Phoma macdonaldii* :

L'effet de facteurs abiotiques (température, pH, humidité relative et lumière) et biotique (concentration de pycniospores) a été recherché afin d'optimiser la germination des pycniospores en vue de leur utilisation pour la contamination artificielle du tournesol. La température optimum de germination des pycniospores est comprise entre 15 et 30°C. Une température de 5°C peut être considérée comme minimum puisque qu'elle entraîne une germination très faible comprise entre 1.3 et 5%. La température maximum semble être de 35°C avec des variations entre les souches. Pour toutes les souches, les valeurs optimum et maximum de pH sont comprises respectivement entre 5 et 7. La germination des pycniospores est optimum pour 10<sup>6</sup> pycniospores par ml. Une concentration de 10<sup>7</sup> pycniospores par ml abaisse le rendement de la germination de 20 à 30%. Aux optima de concentration (entre 10 et 10<sup>6</sup> spores/ml) la germination des pycniospores est proche de 100% pour la majorité des souches. En ce qui concerne l'humidité relative, l'optimum et le minimum sont respectivement de 100 et 90%. La germination des pycniospores est photo-indépendante, en illumination continue ou alternée.

#### Mise au point de la méthode de contamination :

Sur la base des résultats obtenus lors de l'étude de caractérisation, la souche MP6 a été retenue pour la mise au point de la méthode de contamination en conditions contrôlées. Cette souche produit en effet rapidement un inoculum suffisamment abondant et dont le comportement en fonction des paramètres abiotiques et biotiques retenus sont satisfaisants par rapport aux critères connus de développement de la maladie. L'inoculation est réalisée sur des plantes au stade plantule. Une goutte de 20 µl de suspension à 10<sup>6</sup> pycniospores/ml est déposée à l'insertion du pétiole du cotylédon sur la tige. Pour une plante, les deux cotylédons

sont ainsi inoculés. Les plantes sont ensuite placées en atmosphère saturée en humidité pendant 48 heures dans un sac en plastique.

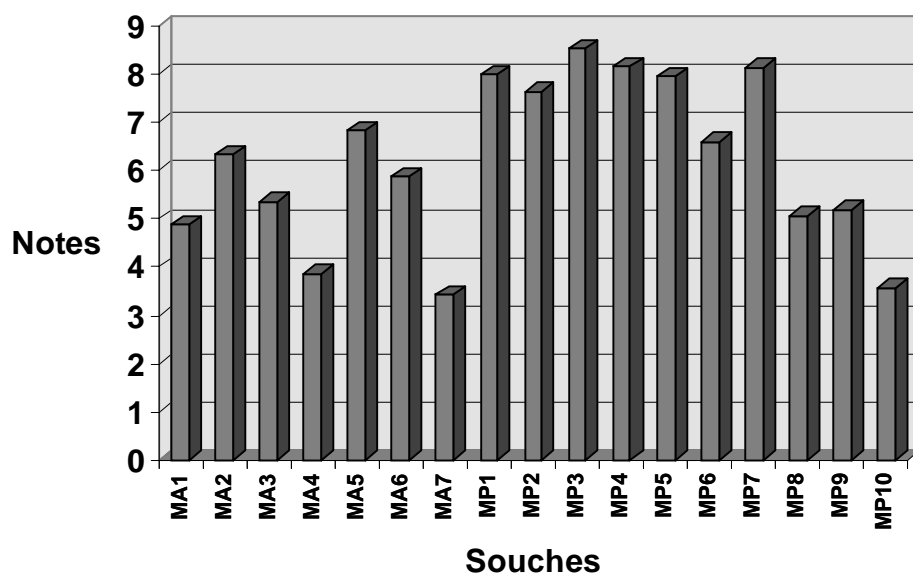
#### Échelle de notation :

Au phytotron et en serre, l'évolution de la maladie est notée 5 jours après contamination en utilisant une échelle (de 0 à 9) mise au point au laboratoire. Cette échelle est basée sur la surface de pétiole de cotylédon nécrosé.

L'échelle de notation mise au point a permis de mettre en évidence la variabilité génétique du tournesol pour son comportement vis-à-vis de la maladie. Des groupes de différentes sensibilités génotypiques peuvent donc être définis sur la base de cette méthodologie.

#### Agressivité des souches monospores de *Phoma* :

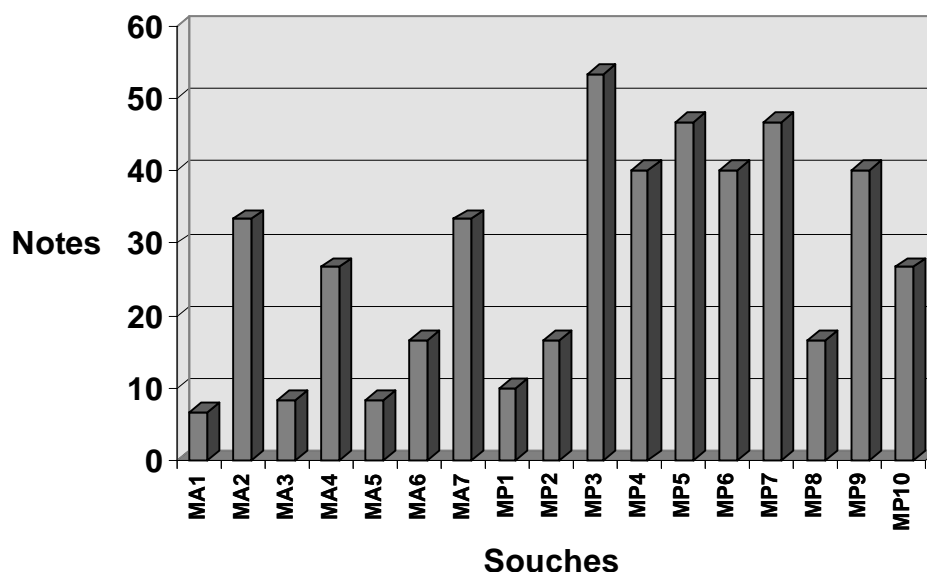
L'agressivité des souches a été mesurée grâce à l'échelle de notation. Les souches présentent un niveau d'agressivité variable. Aucune corrélation n'a pu être établie entre l'agressivité des souches et la croissance ou le nombre et la taille des pycnides.



#### Production de toxine *in vitro* par *Phoma macdonaldii* :

Les souches de *Phoma macdonaldii* ont été cultivées en milieu liquide Czapek-Dox contenant 10% d'extrait de tournesol, à 25°C sous agitation et en lumière continue pendant 21 jours. La culture est ensuite filtrée. Le filtrat de culture brut, ajusté à pH 6.0 et stérilisé, est utilisé pour des bioessais réalisés sur des plantules de tournesol dont les racines ont été excisées. Chaque plantule est placée dans un tube stérile contenant 5 ml de filtrat de culture brut pur (N) ou dilué (N/5, N/10, N/20, N/40, N/60, N/80). L'apparition des symptômes de phytotoxicité (flétrissement de la plantule et apparition de nécroses sur les bords des folioles et des cotylédons) est ensuite suivie dans le temps. La plus grande dilution de chaque filtrat

permettant d'observer des nécroses sur feuilles correspond à la note obtenue et permet de déterminer de pouvoir toxigène de la souche.



Des essais réalisés en modifiant les conditions de culture du champignon (lumière continue, héméropériode de 12h ou obscurité totale), avec ou sans extrait de tournesol, ont montré que l'activité phytotoxique du filtrat de culture de *Phoma macdonaldii* est photo-indépendante et hôte-dépendante. Par ailleurs, le traitement par la chaleur du filtrat brut de culture n'altère pas de façon significative son pouvoir toxigène.

Les travaux de Sugarawa et Strobel en 1986 montrent que l'agent pathogène biosynthétise du zinniol *in vitro*. Cette phytotoxine, non spécifique, pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse dans la mesure où elle est susceptible de reproduire la quasi totalité des symptômes de la maladie chez le tournesol.

Après avoir dosé le zinniol par HPLC, une étude préliminaire réalisée au laboratoire semble montrer que sa biosynthèse *in vitro* serait photo-indépendante, ce qui suggère l'existence de plusieurs toxines dans le filtrat de culture de *Phoma macdonaldii*.

#### Bibliographie :

- Roustae A., Costes S., Déchamp-Guillaume G. and Barrault G., 2000. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi (anamorph : *Phoma macdonaldii* Boerema L.), a fungal pathogen of sunflower. Plant Pathology (sous presse)
- Sugarawa, F. and Strobel G. (1986). Zinniol, a phytotoxin, is produced by *Phoma macdonaldii*. Plant Science 43 : 19-23.