

Effet du stress salin sur *Verticillium albo-atrum* : pathogénicité et production d'enzymes cellulolytiques *in vitro*

A. REGRAGUI, M. RAHOUTI et H. LAHLOU

Laboratoire de Botanique, Département de Biologie,
Faculté des Sciences de Rabat, B.P. 1014. Rabat, Maroc.
e-mail : regragua@fsr.ac.ma

Résumé – La tomate var Marmande est hautement sensible à l'infection par l'isolat P80 de *Verticillium albo-atrum* et peu sensible à l'isolat P₃A du même champignon. Les arrosages répétés avec une solution nutritive enrichie en NaCl (80mM) des plantes infectées entraînent une aggravation des symptômes causés par l'isolat pathogène et l'acquisition de nouvelles aptitudes pathogènes pour l'isolat peu agressif. En culture pure sur milieu CMC, l'effet de la salinité se manifeste chez les deux isolats par une légère réduction de la croissance mycélienne et une nette augmentation de l'activité carboxyméthylcellulase *in vitro*. La corrélation entre les performances de l'enzyme sous stress salin et la pathogénicité de *Verticillium* est discutée.

***Verticillium albo-atrum* / tomate / salinité / enzymes cellulolytiques**

Abstract – Tomato plants var Marmande are highly susceptible to infection by the Moroccan isolate P80 of *Verticillium albo-atrum*, yet it is slightly susceptible to the avirulent isolate P₃A of the same fungus. Repeated watering of the infected plants with saline solution enriched by NaCl (80mM) induced an aggravation of *Verticillium* symptoms caused by the aggressive isolate and a gain of new pathogenic aptitude for the non pathogenic isolate. The effect of the salinity on the fungus developed on CMC medium produced a light decrease of the mycelial growth and a significant increase in the carboxymethylcellulase activity *in vitro*. The correlation of the enzyme performance under salinity stress and the pathogenicity of *Verticillium* is discussed

***Verticillium albo-atrum* / tomato / salinity / cellulolytics enzymes.**

INTRODUCTION

De nombreux champignons phytopathogènes sont connus pour leur production d'enzymes capables de dégrader les polysaccharides des parois cellulaires de leurs plantes hôtes. Les cellulases et les pectinases seraient impliquées dans les maladies des plantes et dans le processus de la dégradation des parois des cellules durant la colonisation par l'agent pathogène (Wood, 1960 ; Cooper & Wood, 1975).

Verticillium albo-atrum produit une gamme d'enzymes cellulolytiques spécifiques de la dégradation des parois cellulaires dont les endopectinolyases capables de provoquer la macération des tissus vasculaires de la tomate (Cooper *et al.*, 1978 ; Cooper & Wood, 1980 ; Durrand & Cooper, 1988) et les cellulases

impliquées dans l'apparition des symptômes de verticilliose (Russel, 1975). Cette maladie touche les cultures de tomate au Maroc et cause d'importants dégâts principalement le long du littoral atlantique où les eaux d'irrigation enregistrent un taux de salinité allant de 0,2 à 5g/l (Besri, 1977). L'incidence de la maladie est étroitement liée au potentiel infectieux du sol et à l'environnement dans lequel se développe le champignon. En effet, la salinité des eaux d'arrosage et du sol entraîne une plus grande sensibilité de la tomate aux trachéomycoses (Besri, 1981). En outre, il a été rapporté que l'environnement où se développent certains champignons phytopathogènes influe sur le type et la quantité d'enzymes pecto-cellulolytiques qu'ils produisent (Bateman, 1969). En fonction de ces données, la sévérité de la verticilliose des tomates soumises au stress salin ne serait-elle pas le résultat d'une perturbation de l'activité enzymatique du pathogène sous l'effet de la salinité du milieu ? Dans cette voie, nous nous proposons d'étudier l'impact de la salinité sur la variabilité du pouvoir pathogène d'isolats de *Verticillium* et leur aptitude à produire les enzymes cellulolytiques *in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

Test de pathogénicité

Deux isolats marocains de *Verticillium albo-atrum*, d'origine tomate (Lahlou & Boisson, 1981), P80 et P₃A respectivement pathogène et non pathogène sur tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) variété Marmande Claudia (Clause semences) ont été testés en absence et en présence de différentes concentrations de NaCl comprises entre 0 et 80 mM. Les cultures fongiques sont conduites sur milieu PDA (oxoïd) à l'obscurité et à 24 ± 1 °C. Une suspension de spores ajustée à 10⁶ spores/ml sert d'inoculum (Regragui *et al.*, 1989). L'inoculation des plantes (stades premières feuilles) est réalisée par trempage des racines dans l'inoculum durant 20 minutes. Les plantes sont ensuite repiquées sur du sable traité à l'HCl et lavé plusieurs fois avant d'être autoclavé. Elles sont maintenues dans une chambre de culture sous une photopériode de 14 heures à 24 ± 2 °C. Toutes les plantes sont arrosées régulièrement avec une solution nutritive complète enrichie en NaCl. L'incidence de la maladie est estimée par la taille de l'épicotyle et le poids frais des parties aériennes six semaines après inoculation. Les tests sont réalisés sur des lots de 15 plantes pour chaque traitement.

Activité carboxyméthylcellulase

– **Production de l'enzyme :** La carboxyméthylcellulase est la principale enzyme cellulolytique produite par les isolats de *Verticillium* d'origine tomate (El Aïssami *et al.*, 1998). Elle a été retenue pour nos tests sur l'effet de la salinité du milieu.

A partir d'une culture des deux isolats de *Verticillium* âgée de 15 jours menée sur milieu PDA, des rondelles de 3 mm de diamètre sont découpées sur le pourtour des thalles et déposées au centre de boîtes de Pétri (9 cm) contenant 25 ml de milieu (CMC) approprié à la production de l'enzyme, formé de (en g/l) : KH₂PO₄, 1 ; NaCO₃, 2 ; KCl, 0,5 ; MgSO₄, 0,5 ; Agar 20. La carboxyméthylcellulose (2%, p/v) est utilisée comme seule source de carbone ; le saccharose ou le glucose n'induisant pas de production optimale de cellulases chez *Verticillium*

(Bahkali, 1995; Gupta & Heale, 1971). Le sel est ajouté au milieu de culture aux concentrations de 0 ; 4 ; 8 ; 12 et 16 g/l. Le pH est de 5. Les cultures sont mises à incuber à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ à l'obscurité.

– **Révélation** : L'activité enzymatique est mise en évidence par un test quantitatif rapide inspiré de la méthode des cup-late (Mann, 1962). Il est basé sur la diffusion radiale de l'enzyme libérée par le champignon dans le substrat gélosé. La révélation est réalisée sur les cultures après 12 jours d'incubation. Les diamètres perpendiculaires de chaque colonie sont mesurés pour l'estimation de la croissance mycélienne des deux isolats sur milieu CMC. Les boîtes portant les cultures sont ensuite inondées d'une solution aqueuse de rouge Congo à 0,5 % pendant 30 minutes sous agitation à température ambiante. Elles sont ensuite rincées par trois bains successifs d'une solution de NaCl (1M) d'une durée de 15 minutes chacun. Un dernier et 4^e bain de NaCl dure une nuit. L'activité enzymatique est mise en évidence par la présence d'un halo clair qui apparaît autour de la culture fortement colorée en rouge. Elle est estimée par la mesure de la zone d'activité ; différence entre le diamètre de la zone claire et le diamètre de la colonie. Les valeurs obtenues sont la moyenne de huit répétitions. Les résultats sont comparés par l'analyse des variances au seuil de probabilité de 5 % selon le test de Student.

RÉSULTATS

Effet du sel sur la pathogénéicité des isolats de *Verticillium*

Après six semaines d'observation, les plantes saines soumises au traitement par le sel montrent une réduction régulière de la croissance sous l'effet des concentrations croissantes de NaCl de la solution d'arrosage allant de 0 à 80 mM ; concentrations fréquentes dans les sols du littoral atlantique marocain. L'effet de la salinité se manifeste sur les deux paramètres de la croissance ; la taille des épicotyles (fig. 1) et le poids frais des parties aériennes (fig. 2). A 80 mM de NaCl, la réduction de la taille par rapport aux témoins cultivés sans sel est de 48 %, celle du poids frais est de 54 %.

Les plantes inoculées avec l'isolat pathogène P80 montrent des symptômes sévères de rabougrissement. La taille de l'épicotyle et le poids frais des parties aériennes sont significativement plus faibles que ceux des témoins sains respectifs, à toutes les concentrations salines de l'expérience.

Les plantes infectées avec l'isolat non pathogène montrent le même comportement vis-à-vis de la salinité que les témoins sains et ce, pour les faibles concentrations de NaCl. A partir de 60 mM, les deux paramètres de la croissance chutent brusquement pour rejoindre ceux des plantes infectées avec l'isolat agressif. A 80 mM de NaCl, l'isolat non pathogène P₃A provoque sur les tomates traitées les mêmes dégâts que ceux causés par l'isolat pathogène P80.

Effet de la salinité sur la croissance mycélienne de *Verticillium*

Les deux isolats de *Verticillium* P80 et P₃A, cultivés sur milieu CMC enrichi en sel, semblent tolérer des concentrations importantes de sel à en juger par les valeurs des diamètres des colonies à 16 g/l de NaCl (fig. 3). On note cependant une légère réduction de la croissance mycélienne avec l'augmentation de la salinité par rapport aux témoins cultivés sur le même milieu sans sel. Cette baisse

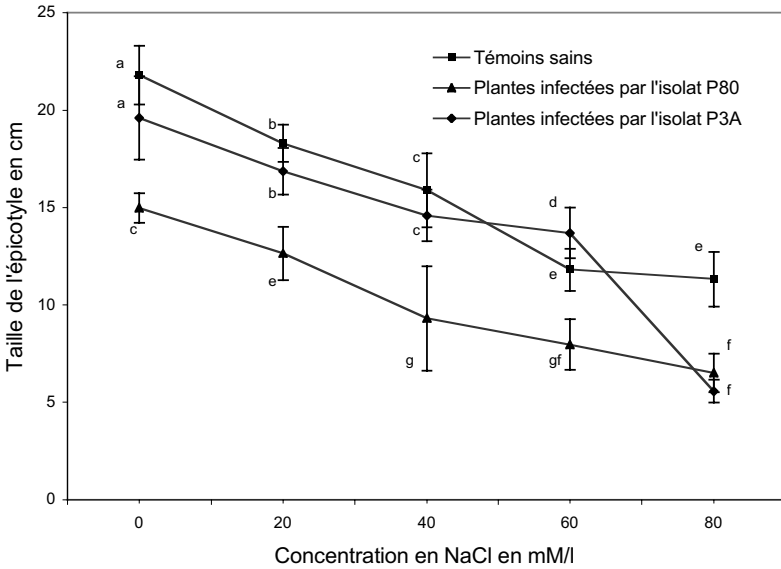


Fig. 1. Effet de la salinité de la solution d'arrosage sur la croissance des plantes de tomate infectées par *Verticillium* estimé par la taille des épicotyles six semaines après inoculation. Deux résultats sont significatifs au seuil de 5 % s'ils ne sont pas affectés de la même lettre.

Fig. 1. *Effect of the watering solution salinity on the growth of tomato plants infected by Verticillium, estimated by the epicotyl length increase six weeks after inoculation. For each element, means are significantly different (5 %) when they are not accompanied by the same letter.*

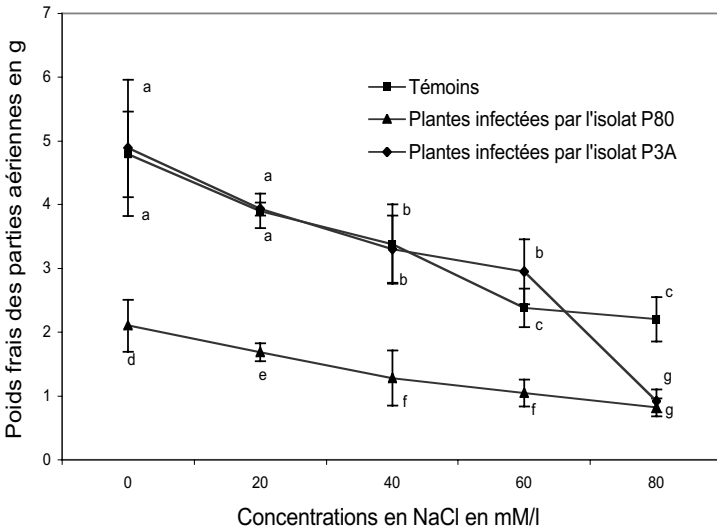


Fig. 2. Effet de la salinité de la solution d'arrosage sur le poids frais des parties aériennes des plantes de tomate infectées par *Verticillium* six semaines après inoculation. Deux résultats sont significatifs au seuil de 5% s'ils ne sont pas affectés de la même lettre.

Fig. 2. *Effect of the watering solution salinity on the weight of aerial parts of the tomato plants infected by Verticillium estimated six weeks after inoculation. For each element, means are significantly different (5%) when they are not accompanied by the same letter.*

du développement ne dépasse guère 30% et 24% respectivement pour les isolats pathogène P80 et non pathogène P₃A à la concentration de 16 g/l de NaCl.

Effet de la salinité sur l'activité carboxyméthylcellulase

L'activité de l'enzyme est révélée sur les mêmes boîtes ayant servi à l'estimation de la croissance mycélienne.

En absence de sel, les deux isolats du champignon présentent une activité carboxyméthylcellulase similaire. Avec l'augmentation de la salinité du milieu, l'activité de l'enzyme croît progressivement (fig. 4). Pour les concentrations comprises entre 4 et 12 g/l, l'isolat P₃A montre une activité carboxyméthylcellulase nettement plus élevée que celle de l'isolat P80. Sous ces conditions salines, P₃A semble plus efficace pour la production de l'enzyme *in vitro*. A 16 g/l, l'activité cellulase se stabilise pour l'isolat P₃A et continue d'augmenter pour l'isolat pathogène P80 pour atteindre celle de P₃A ; les deux valeurs de l'activité sont statistiquement semblables et dépassent de 4 fois celles de l'activité de l'enzyme en absence de sel.

DISCUSSION

Le rôle des enzymes cellulolytiques dans la détermination de l'agressivité des isolats de *Verticillium* a fait l'objet de plusieurs études (Mussel, 1973 ; Russel, 1975 ; Balandina *et al.*, 1976 ; El Aissami *et al.*, 1998). Nos résultats sur l'activité

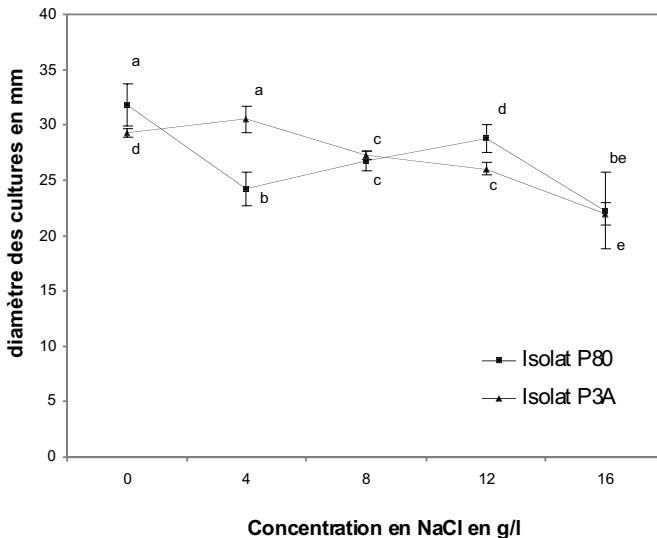


Fig. 3. Effet de la salinité sur la croissance mycélienne de deux isolats de *Verticillium* développés sur milieu CMC estimé après 12 jours d'incubation. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%.

Fig. 3. Effect of salinity on mycelial growth of two isolates of *Verticillium* developed on CMC medium estimated after 12 days of incubation. Two results are significant (5%) if they are not affected by any common letter.

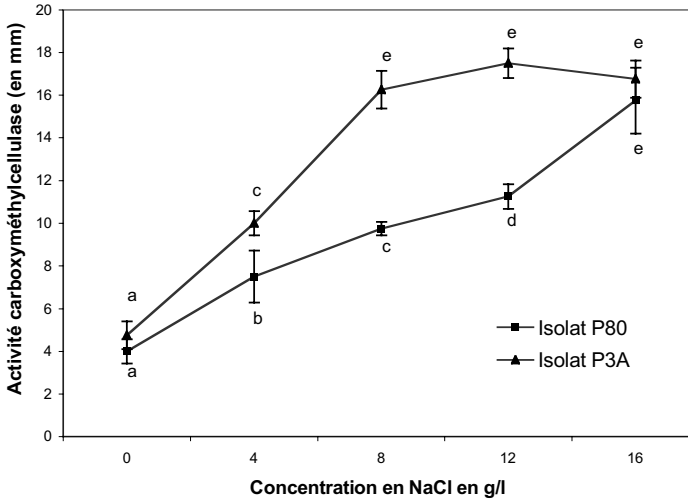


Fig. 4. Effet de la salinité sur l'activité carboxyméthylcellulase estimée par la mesure de la zone d'activité* (en mm) de deux isolats de *Verticillium* développés sur milieu CMC. Pour un élément donné, les moyennes non accompagnées de la même lettre diffèrent au seuil statistique de 5 %.
* Différence entre le diamètre du halo clair et le diamètre de la colonie

Fig. 4. Effect of salinity on carboxymethylcellulase activity estimated by measuring the activity zone* (mm) of two isolates of *Verticillium* developed on CMC medium. For each element, means are significantly different (5 %) when they are not accompanied by the same letter.
* Difference between the diameter of clear halo and the diameter of the colony.

cellulolytique du *Verticillium* montrent qu'en absence de stress salin, les isolats P80 et P₃A respectivement pathogène et non pathogène sur tomate sont capables de produire *in vitro* la carboxyméthylcellulase dans le milieu de culture CMC contenant la carboxyméthylcellulose comme seule source de carbone. Sous stress salin, une augmentation nette de l'activité carboxyméthylcellulase est enregistrée avec les concentrations croissantes de sel du milieu avec un maximum à 16 g/l. Notons toutefois que l'activité enzymatique de l'isolat non pathogène P₃A est supérieure à celle de l'isolat pathogène P80 pour les concentrations moyennes de NaCl.

La salinité du milieu de culture semble donc stimuler la production de carboxyméthylcellulases *in vitro* chez les isolats de *Verticillium*. L'isolat P₃A semble plus efficace pour la production de l'enzyme dans nos conditions expérimentales.

La salinité peut affecter différemment l'aptitude des champignons phytopathogènes à produire les enzymes cellulolytiques *in vitro* (El Abyad *et al.*, 1992). Ainsi *Sclerotium rolfii* et *Rhizoctonia solani*, deux champignons du sol pathogènes sur la betterave, voient leur aptitude à solubiliser les parois des cellules de leur hôte perturbée par le sel *in vitro*. Chez *S. rolfii*, l'activité enzymatique augmente avec l'augmentation de la salinité du milieu, ce qui concorde avec nos résultats sur *Verticillium*, alors que celle de *R. solani* diminue.

L'activité enzymatique de *Verticillium* peut être également perturbée à la suite d'un stress autre que la salinité. Ainsi, l'activité caseine kinase de *Verticillium dahliae* peut disparaître sous l'effet d'un choc thermique (Vasiliev *et al.*, 1992).

L'effet de la salinité se manifeste aussi sur la pathogénécité des isolats de *Verticillium* vis-à-vis des tomates (Marmande). Ainsi, les plantes infectées et soumises au stress salin montrent :

– une aggravation des symptômes de verticilliose causés par l'isolat pathogène P80 due probablement à l'effet synergique de la salinité et de l'infection par l'isolat agressif ;

– l'acquisition de nouvelles aptitudes pathogènes pour l'isolat P₃A connu pour sa faible virulence. Ainsi, les plantes de tomate peu sensibles à cet isolat se trouvent attaquées par ce dernier sous l'effet de la salinité alors qu'elles maintiennent leur caractère de résistance en absence de sel.

Cette augmentation de l'agressivité semble être due d'une part, à la tolérance de l'agent pathogène à la salinité du milieu puisqu'il maintient un bon développement mycélien aux concentrations salines tolérées par la plante et d'autre part, à une augmentation de l'activité cellulolytique des enzymes produites par le champignon en milieu salé. Ces conditions favoriseraient la pénétration et la colonisation des cellules hôtes par le parasite. La relation entre l'importance de l'activité enzymatique de certains isolats de *Verticillium* et leur agressivité vis-à-vis du coton a été démontrée par Mussel, (1973). Dans le même sens, Witney *et al.* (1972) ont déduit que la carboxyméthylcellulase est d'autant produite par *Verticillium albo-atrum* que l'infection de la luzerne est forte.

Enfin, chez le couple tomate-*Verticillium*, la salinité constitue un stress environnemental important qui agirait sur la plante en perturbant son métabolisme nutritionnel et ses moyens de défense (Standaert, 1978) et sur l'agent pathogène en maintenant sa croissance et en améliorant ses performances cellulolytiques. La salinité semble stimuler certaines armes pathogéniques du champignon et perturber les interactions hôte-parasite pour l'expression de la résistance des tomates vis-à-vis des souches non agressives. Par conséquent, les tests du pouvoir pathogène de *Verticillium* sur tomate doivent inclure le sel dans les programmes de sélection des variétés sensibles et résistantes.

Remerciements. Les auteurs remercient M^{me} V. Grimault, responsable du laboratoire de pathologie de « Clause semences » de Brétigny pour nous avoir gracieusement fournies les semences de tomate.

RÉFÉRENCES

- BAHKALI A.H., 1995 – Production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Verticillium tricorpus* on different substrates. *Bioresource Technology* 51(2-3): 171-174.
- BALANDINA I.D., SHVETSOVA L.P. & MIRYAKUBOVA M., 1976 – Role of certain enzymes of *Verticillium dahliae* in pathogenesis of *Verticillium* wilt of cotton. *Fiziologija Rastenii* 23: 155-159.
- BATEMAN D.F., 1969 – Some characteristics of the cellulase system produced by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Phytopathology* 59: 37-42.
- BESRI M., 1977 – *Étude de quelques aspects de l'écologie de Fusarium oxysporum (Schl) f.sp. lycopersici (Sacc) Snyder. et Hans. et de Verticillium dahliae Kleb. le long du littoral atlantique marocain.* Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences. Université de Nancy. 199 p.
- BESRI M., 1981 – Qualité des sols et des eaux d'irrigation et manifestation des trachéomycoses de la tomate au Maroc. *Phytopath. Medit.* 20: 107-111.

- COOPER R. M., RANKING B. & WOOD R.K.S., 1978 – Cell wall degrading enzymes of vascular wilt fungi. II. Properties and modes of actions of polysaccharidases of *Verticillium* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Physiological Plant Pathology* 13: 101-134
- COOPER R.M. & WOOD R.K.S., 1975 – Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological Plant Pathology* 5: 135-156.
- COOPER R.M. & WOOD R.K.S., 1980 – Cell wall degrading enzymes of vascular fungi. III. Possible involvement of endopectin lyase in *Verticillium* wilt of tomato. *Physiological Plant Pathology* 16: 285-300.
- DURRAND & COOPER R.M., 1988 – The role of pectinases in vascular wilt disease as determined by defined mutants of *Verticillium albo-atrum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 363-371.
- EL-ABYAD M.S., AMIRA M., ABU-TALEB & MARY S. KHALIL., 1992 – Impact of salinity stress on soil-borne fungi of sugarbeet. III. Plant cell wall-degrading enzymes by *Rhizoctonia solani* Kühn and *Sclerotium rolfsii* Sacc. *in vitro* and *in vivo*. *Plant and Soil* 143: 75-83.
- EL AISSAMI A., BRHADA F. & LAHLOU H., 1998 – Effet de l'adaptation progressive à la luzerne d'un isolat de *Verticillium dahliae* (d'origine tomate) sur la synthèse *in vitro* de ses enzymes pectocellulytiques. *Cryptogamie, Mycologie* 19 (3): 227-234.
- GUPTA D.B. & HEALE J.B., 1971 – Induction of cellulase (Cx) in *Verticillium albo-atrum*. *Journal of General Microbiology* 63: 163-173
- LAHLOU H. & BOISSON C., 1981 – *Pathogenicity variation in one tomato isolate of Verticillium albo-atrum (microsclerotia form)* C.R. du 3^e Symposium International sur les *Verticillium*. BARI.
- MANN B., 1962 - Role of pectic enzymes in *Fusarium-wilt* syndrome. *Transactions of the British Mycological Society* 45: 169-178.
- MUSSEL H.W., 1973 - Endopolygalacturonase ; evidence for involvement in *Verticillium* wilt of cotton. *Phytopathology* 63: 62-70.
- REGRAGUI A., LAHLOU H. & ZAID H., 1989 – La prémunition de la tomate contre la verticilliose causée par *Verticillium albo-atrum*, forme à microsclérotos. Conséquences physiologiques du phénomène. *Cryptogamie, Mycologie* 10 (3): 243-256
- RUSSEL S., 1975 – The role of cellulase produced by *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium* wilt of tomatoes. *Phytopath. Z.* 82: 35-48.
- STANDAERT J.Y., MARAÏTE H. MYTTENAERE C. & MEYER J.A., 1978 – Étude de l'influence de la concentration saline et du rapport Na/Ca du milieu nutritif sur la sensibilité de la tomate à la fusariose vasculaire. *Plant and soil* 50: 269-286.
- VASILIEV A.O., KAPKOV D.V., KANDROR K.V. & STEPPANOV A.S., 1992 – Expression and regulation of casein kinase 2 during heat shock in *Verticillium dahliae*. *Molecular reproduction and development* 31: 42-47
- WHITNEY P.J., HEALE J.B. & VAUGHAN J.G., 1972 – Protein changes in vascular wilt diseases of Lucerne caused by *Verticillium albo-atrum* R & B. *Journal of experimental botany* 23 (75): 400-414.
- WOOD R.K.S., 1960 – Pectic and cellulytic enzymes in plant diseases (2-3). *Abstract. Annual Revue of Physiology* 11: 299-322.