

## Etude de la toxicité du filtrat de culture de *Botrytis cinerea* sur des vitroplants de vignes: II. Effet des différentes fractions isolées à partir du filtrat brut

par

D. VANNEL, M. BARBIER et R. BESSIS

Laboratoire des Sciences de la Vigne, Université de Bourgogne, Dijon, France

### Study of culture filtrate toxicity of *Botrytis cinerea* observed on grapevine vitroplants: II. Effect of various fractions isolated from the crude culture filtrate

**Summary:** Polysaccharides secreted by *Botrytis cinerea* were isolated from the crude culture filtrate and precipitated as two fractions: glucan and heteropolysaccharides. The fraction containing heteropolysaccharides was further separated into two sub-fractions. The phytotoxic activities of the various fractions were tested on vitroplants from several grapevines differing in their sensitivity to *B. cinerea*. With glucan, no toxic effects on the growth of vitroplants were observed. The heteropolysaccharides showed specific phytotoxic activities which were identical with the effects of the culture filtrate: plants susceptible to the pathogen were also susceptible to the heteropolysaccharides, and vice versa.

**Key words:** *Botrytis*, *Vitis*, variety of vine, tissue culture, fungal culture filtrate, glucan, heteropolysaccharides, toxicity, growth, resistance, test, method.

### Introduction

Dans une précédente publication (VANNEL *et al.* 1991), nous avons mis en évidence la toxicité des filtrats de cultures de *Botrytis cinerea* à l'égard des vitroplants de vignes sensibles à ce champignon. Ces filtrats n'ont, par ailleurs, aucun effet sur la croissance des vitroplants de vignes résistantes. Les travaux présentés ici constituent une étape de l'identification des composés responsables de cette toxicité spécifique.

*B. cinerea* est connu pour sécréter de nombreuses substances toxiques parmi lesquelles certaines joueraient un rôle dans la pathogenèse (VERHOEFF 1980). En particulier, deux types de sécrétions ont été isolés à partir du filtrat de culture du champignon (DUBOURDIEU 1982; KAMOEN *et al.* 1978; KAMOEN 1984). Elles ont également été mises en évidence dans les tissus infectés (DUBOURDIEU et KAMOEN 1978). Il s'agit:

- des enzymes pectinolytiques responsables de la macération des tissus; et
- des polysaccharides, qui peuvent être séparés en deux fractions. La première contient un glucane, appelé cinéréane, de poids moléculaire élevé ( $10^5$ — $10^6$ ). Il est constitué d'une chaîne principale d'unités glucose liées en  $\beta$ -(1—3); deux unités sur cinq portent des branches latérales formées d'unités de glucose liées en  $\beta$ -(1—6). La seconde fraction est composée d'un complexe d'hétéropolysaccharides dont le poids moléculaire est compris entre  $10^4$  et  $5 \cdot 10^4$ . Ce complexe est à base de mannose (60—70 %), de galactose (moins de 20 %), de glucose et de rhamnose. Une partie protéique thermostable lui est toujours associée. Ces polysaccharides sont toxiques sur les feuilles de laitue et de bégonia. Ils sont responsables d'une aug-

mentation de la perméabilité membranaire, d'une altération des chloroplastes et aussi de la chlorose et du brunissement des tissus.

D'après les résultats des travaux précédents (VANNEL *et al.* 1991), la toxicité observée sur les vitroplants ne peut résulter d'une activité enzymatique. Aussi, cette étude consistera essentiellement à évaluer l'activité toxique des composés de nature polysaccharidique à l'égard des vitroplants de vignes.

### Matériel et méthodes

L'origine du matériel végétal (diverses espèces et variétés de *Vitis* et *B. cinerea*) et les conditions de culture ont été décrites dans une précédente publication (VANNEL *et al.* 1991).

#### Plantes hôtes

Les vitroplants des vignes résistantes à *B. cinerea*: *V. riparia* L. cv. Gloire de Montpellier; moyennement sensibles: *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon clone 1565; très sensibles: *V. vinifera* L. cv. Chardonnay clone 95, Chardonnay clone 96, Pinot clone 113, sont multipliés par microbouturage.

#### Fractionnement des filtrats de cultures de *B. cinerea*

Les filtrats utilisés proviennent de cultures de l'isolat N âgées de 4 semaines.

Les polysaccharides sont isolés du milieu suivant le protocole de DUBOURDIEU (1982). Ils sont précipités en deux fractions:

- la première fraction est précipitée par addition au filtrat de 0,5 volume d'éthanol à 95 %, puis rincée plusieurs fois avec de l'éthanol à 50 %; elle est appelée P0,5 et correspond au glucane;
- la deuxième fraction est obtenue après addition de 3,5 volumes d'éthanol au surnageant de la première précipitation. Le précipité est récupéré après 16 h à 4 °C et rincé plusieurs fois avec de l'éthanol à 80 %; cette fraction est appelée P4 et correspond aux hétéropolysaccharides.

Les précipités sont recueillis après centrifugation (20 min, 10<sup>4</sup> g, -10 °C). Ils sont ensuite redissous dans l'eau.

Le mélange de polysaccharides correspondant à la fraction P4 est ensuite fractionné sur une colonne échangeuse d'anions, composée d'un gel de diéthylaminoéthyle DEAE Sepharose CL6B (Pharmacia) (KAMOEN *et al.* 1980). La fraction non retenue, appelée D1, est éluée avec de l'eau. La fraction ionisée retenue sur la colonne, appelée D2, est récupérée après élution par une solution de 1M NaCl. Selon KAMOEN, la fraction D1 contient du mannose (58 %), du glucose (32 %), du galactose (9 %) et du rhamnose (moins de 3 %), alors que la fraction D2 est composée principalement de mannose (84 %), de glucose (7 %), de galactose (8 %) et de rhamnose (plus de 4 %). Une partie protéique est associée aux deux fractions.

Toutes les fractions sont dialysées avant d'être testées. La quantité de sucres est déterminée par la méthode phénol-sulfurique (DUBOIS *et al.* 1951).

#### Bioessai

Le filtrat et les différentes fractions isolées à partir du milieu de culture du champignon sont introduits dans le milieu de culture de vitroplants. Leur toxicité est évaluée par leur action inhibitrice sur la croissance de microboutures après 2 mois de culture.

Les essais sont réalisés en tubes (6—12 tubes) ou en bocaux (2) contenant 12 boutures. Chaque expérience est effectuée au moins deux fois. Sur les graphiques illustrant les résultats, la moyenne des différentes mesures est indiquée avec son intervalle de confiance à 5 % (IC sur les graphiques).

### Résultats

#### Effet des fractions P0,5 et P4 sur les vitroplants

L'analyse de la toxicité des différentes fractions isolées à partir du filtrat de culture de *B. cinerea* montre que le glucane (fraction P0,5) ne modifie pas la croissance

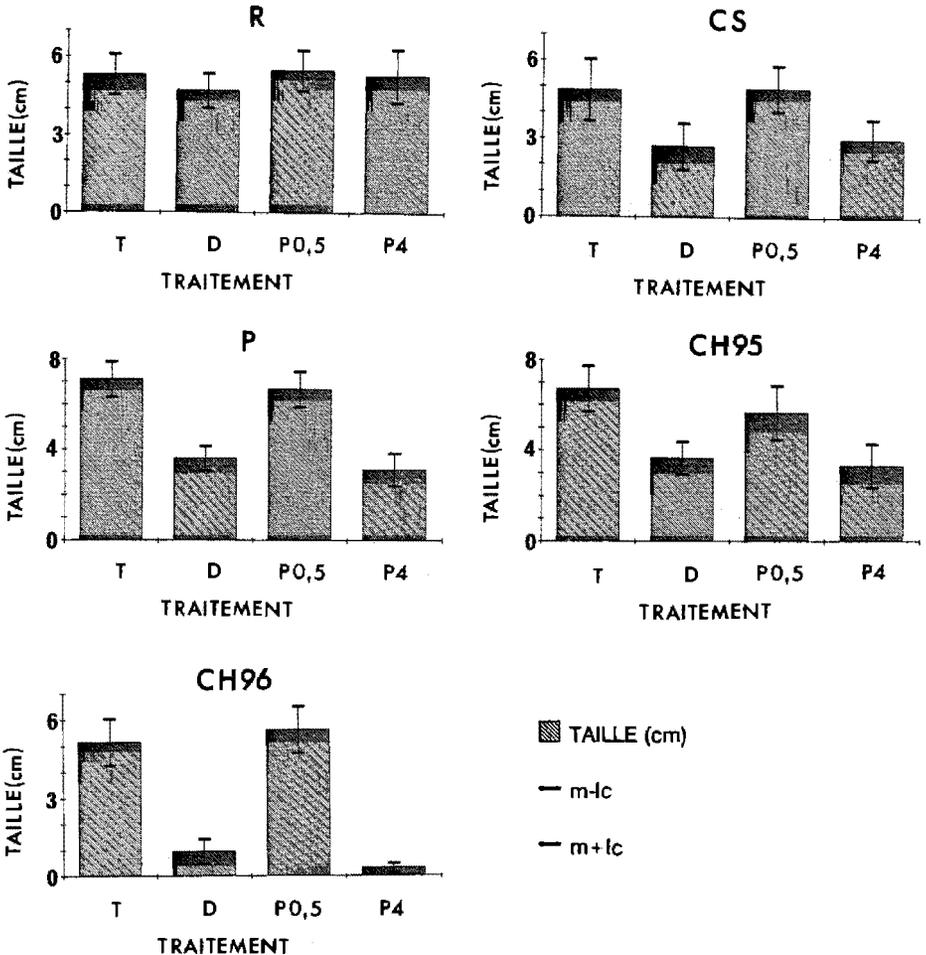


Fig. 1: Taille (en cm) des vitroplants de *V. riparia* (R) et de *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (CS), Pinot (P), Chardonnay clone 95 (CH95) et clone 96 (CH 96) après 2 mois de culture sur le milieu témoin (T) ou en présence du filtrat dialysé (D) ou des fractions correspondant au glucane (P0,5) et aux hétéropolysaccharides (P4).

Vitropplant height (in cm) of *V. riparia* (R) and *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (CS), Pinot (P), Chardonnay clone 95 (CH95) and clone 96 (CH96) after 2 months of culture on control medium (T) or on media containing dialysed filtrate (D) or glucan (P0,5) and heteropolysaccharides (P4).

des vitroplants (Fig. 1). Par contre, les hétéropolysaccharides (fraction P4) ont la même activité toxique que le filtrat: la croissance des vitroplants de vignes sensibles à *B. cinerea* est inhibée par la présence de ces composés dans le milieu de culture des

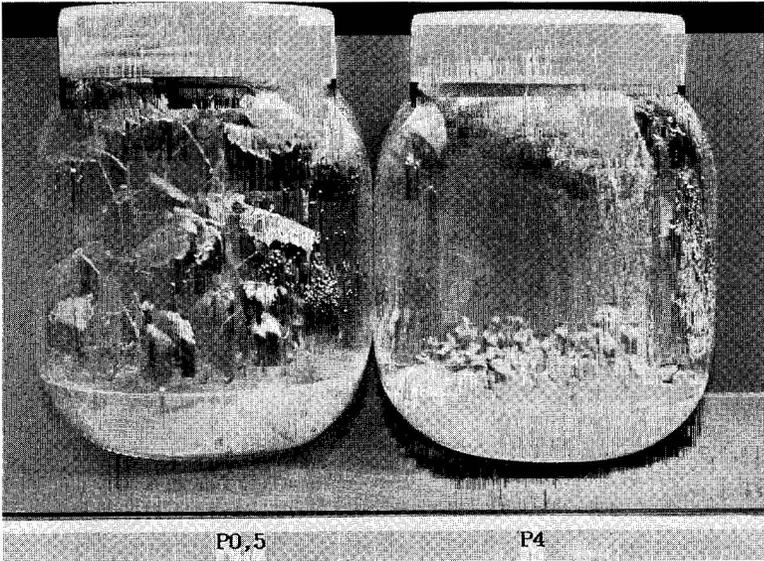


Fig. 2: Vitroplants de *V. vinifera* cv. Chardonnay clone 95 après 2 mois de culture en présence des fractions correspondant au glucane (P0,5) et aux hétéropolysaccharides (P4).

Vitroplants of *V. vinifera* cv. Chardonnay clone 95 after 2 months of culture on media containing glucan (P0,5) and heteropolysaccharides (P4).

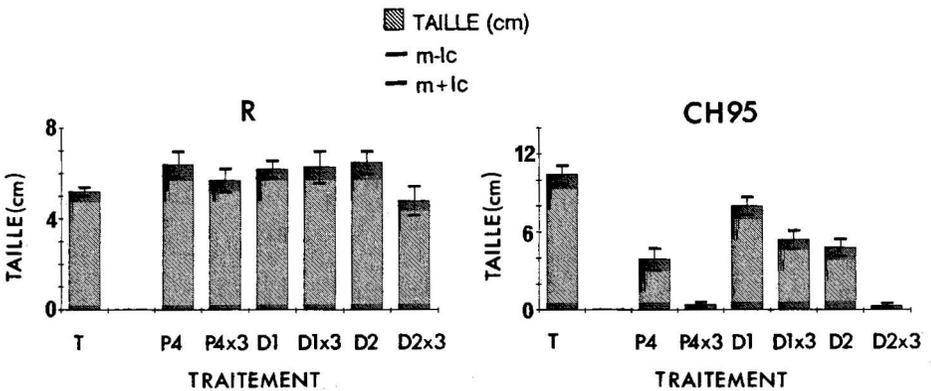


Fig. 3: Taille (en cm) des vitroplants de *V. riparia* (R) et de *V. vinifera* cv. Chardonnay clone 95 (CH95) après 2 mois de culture sur le milieu témoin (T) ou en présence de la fraction contenant les hétéropolysaccharides (P4), concentrée trois fois (P4 × 3) ou des sous-fractions D1 et D2 (hétéropolysaccharides riches en mannose), concentrées trois fois (D1 × 3 et D2 × 3).

Vitroplant height (in cm) of *V. riparia* (R) and *V. vinifera* cv. Chardonnay clone 95 (CH95) after 2 months of culture on control medium (T) or on media containing heteropolysaccharides (P4), concentrated three times (P4 × 3) or subfractions D1 and D2 (with heteropolysaccharides containing chiefly mannose), concentrated three times (D1 × 3 and D2 × 3).

vitroplants. La taille des vitroplants et de leurs feuilles se trouve réduite. De plus, cette réduction s'accompagne d'une inhibition du développement racinaire et d'un jaunissement des feuilles allant jusqu'au dessèchement complet de la plantule (Fig. 2). Ces effets sont moins prononcés sur les vignes moyennement sensibles (*V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) que sur les vignes très sensibles (*V. vinifera* L. cv. Chardonnay clones 95 et 96 et Pinot). Par contre, la croissance des vignes résistantes (*V. riparia*) n'est pas affectée (Fig. 1).

#### Effet des fractions D1 et D2 sur les vitroplants

Les deux sous-fractions (D1 et D2) isolées à partir de la fraction P4 ont également un effet sur la croissance des vitroplants de vignes sensibles (Fig. 3). La réduction de la taille de ces vitroplants est d'autant plus prononcée que la concentration de ces éléments dans le milieu de culture est élevée. La fraction correspondant aux hétéropolysaccharides riches en mannose (D2) est cependant la plus toxique. Sa toxicité est équivalente à celle de la fraction P4. La fraction D1, quant à elle, doit être concentrée trois fois pour que sa toxicité soit équivalente à celle de la fraction D2.

#### Discussion et conclusion

Parmi les composés de nature polysaccharidique, isolés à partir du filtrat de culture liquide de *B. cinerea*, certains semblent responsables des symptômes phytopathologiques observés sur les vitroplants.

Le glucane n'a aucun effet toxique sur les vitroplants. Il ne semble pas présenter d'intérêt en phytopathologie. En effet, il forme un gel entourant les hyphes mycéliennes et son taux de diffusion dans les tissus végétaux est faible (KAMOEN 1984).

Par contre, le complexe phytotoxique composé d'hétéropolysaccharides, en particulier ceux qui sont riches en mannose, provoque les mêmes symptômes que le filtrat. D'autres auteurs (KAMOEN *et al.* 1978; KAMOEN *et al.* 1985) avaient déjà signalé l'importance probable du rôle de ces composés dans la maladie. En effet, d'après ces derniers, leur taux de diffusion dans les espaces intercellulaires et le xylème des tissus foliaire est non seulement élevé, mais aussi supérieur à celui des enzymes pectinolytiques. Leur activité pourrait donc constituer la première étape de l'action biochimique du champignon au cours du développement de la maladie. Sur les vitroplants, ces hétéropolysaccharides ont une activité toxique systémique. Cette observation conforte l'idée du rôle important joué par ces composés en raison de leur mobilité dans les tissus vasculaires.

Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en évidence le caractère spécifique de ces hétéropolysaccharides qui sont toxiques uniquement sur les vitroplants de vignes sensibles. Ce résultat permet d'envisager leur utilisation comme agent sélectif dans un programme de sélection de somaclones résistants ou tolérants à *B. cinerea*. Rappelons à ce propos que la sélection peut se faire non seulement en exerçant une pression de sélection dans le milieu de régénération des somaclones, mais aussi en criblant les plantes régénérées. Dans ce dernier cas, le bioessai réalisé avec les vitroplants permet de gagner plusieurs années par rapport aux autres méthodes qui utilisent du matériel végétal provenant du vignoble. Cependant, préalablement à cette utilisation, l'étude de ces hétéropolysaccharides devra être approfondie dans le but de montrer que leur rôle est déterminant dans la pathogenèse. Sinon, il se pourrait que les plantes résistantes à ces hétéropolysaccharides ne le soient pas à la maladie. Dans cette optique, il est important de souligner que l'étude présentée ici a été réalisée à partir d'un filtrat pro-

venant d'une culture âgée de 4 semaines. Par conséquent, il sera intéressant de suivre la cinétique de production de ces hétéropolysaccharides dans les milieux de cultures de *B. cinerea* et de vérifier si elle est corrélée à la toxicité des filtrats bruts.

### Résumé

A partir du filtrat de culture brut, les polysaccharides sécrétés par *Botrytis cinerea* ont été isolés et précipités en deux fractions: glucane et hétéropolysaccharides. La fraction contenant les hétéropolysaccharides a elle-même été fractionnée. L'activité toxique de ces différentes fractions a été étudiée et comparée sur les vitroplants de plusieurs vignes, présentant différents niveaux de sensibilité à l'égard de *B. cinerea*. Avec le glucane, aucun effet toxique sur la croissance des vitroplants n'a été observé. Les hétéropolysaccharides ont une activité toxique spécifique identique à celle du filtrat de culture: les plantes sensibles à l'agent pathogène sont aussi sensibles aux hétéropolysaccharides et réciproquement.

### Références

- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F.; 1951: A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**, 167.
- DUBOURDIEU, D.; 1982: Recherche sur les polysaccharides sécrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Thèse Doctorat d'Etat, Bordeaux II.
- — ; KAMOEN, O.; 1978: Phytotoxic polysaccharides from *Botrytis cinerea* in infected grapes. 3rd Intern. Congr. Plant Pathol., München, 16—23 August; 241.
- KAMOEN, O.; 1984: Secretions from *Botrytis cinerea* as elicitors of necrosis and defence. *Rev. Cytol. Biol. Vég. Bot.* **7**, 241—248.
- — ; JAMART, G.; MOERMANS, R.; VANDEPUTTE, L.; DUBOURDIEU, D.; 1978: Comparative study of phytotoxic secretions of *Botrytis cinerea* PERS. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent* **43**, 847—857.
- — ; — — ; VANVAERENBERGH, J.; GOUWY, P.; 1985: *Botrytis cinerea* infections on petals and green leaves. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent* **50**, 1053—1059.
- VANNEL, D.; BARBIER, M.; BESSIS, R.; 1991: Etude de la toxicité du filtrat de culture de *Botrytis cinerea* sur des vitroplants de vignes: I. Effet du filtrat brut. *Vitis* **30**, 167—175.
- VERHOEFF, K.; 1980: The infection process and host-pathogen interactions. In: COLEY-SMITH, J. R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W. R. (Eds.): *The Biology of Botrytis*, 153—180. Academic Press, London.

Reçu le 19 juin 1991

Correspondance à:

D. VANNEL ou M. BARBIER  
 Laboratoire des Sciences de la Vigne  
 Faculté des Sciences Mirande  
 Université de Bourgogne  
 B.P. 138  
 F-21004 Dijon Cedex  
 France