

Détection de l'activité enzymatique pectinolytique et cellulolytique des champignons responsables de la pourriture des pommes en conservation

Karima Selmaoui, Amina Ouazzani Touhami, Afifa Mouria, Rachid Benkirane, and Allal Douira

Université Ibn Tofaïl, Faculté des Sciences, Laboratoire de Botanique, Biotechnologie et de Protection des Plantes, B.P. 133, Kenitra, Maroc

Copyright © 2017 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The aim of this study is to detect *in vitro* activity of pectinolytic enzymes (trans-eliminase polygalacturonase and pectin) and cellulolytic five fungal species responsible for rotting apples: *Alternaria alternata* (E and S), *Penicillium* sp. (P), *Trichoderma* sp. (Tr), *Trichothecium roseum* (Tc) and *Fusarium avenaceum* (F).

Lyase activity pectine of these fungi is low during the first days of pectin degradation process but increases with age of cultures. The most important activity was recorded in *Alternaria alternata* (0,146 U) and *Trichothecium roseum* (0,100 U) followed by *Trichoderma* sp. (0,078 U). The lowest activity was observed in *Penicillium* sp. and *Fusarium avenaceum*.

The estimated activity of polygalacturonase is important during the first days of pectin degradation by fungi and decreases during this process. *Alternaria* showed a very significant activity (0,1467U) compared to other fungi. However, the polygalacturonase activity is very low in *Trichothecium roseum* (0,0012U) and the important cellulolytic activity was detected in *Fusarium avenaceum* (0,0384 U).

KEYWORDS: Enzymatic activity, fungi, rot, apples, storage.

RÉSUMÉ: L'objectif de cette étude est de détecter, *in vitro*, l'activité des enzymes pectinolytiques (pectine trans-éliminase et polygalacturonase) et cellulolytiques de cinq espèces fongiques, responsables des pourritures des pommes: *Alternaria alternata* (deux isolats E et S), *Penicillium* sp. (P), *Trichoderma* sp. (Tr), *Trichothecium roseum* (Tc) et *Fusarium avenaceum* (F).

L'activité pectine lyase de tous ces champignons est faible durant les premiers jours du processus de dégradation de la pectine mais augmente avec l'âge des cultures. L'activité la plus importante a été enregistrée chez *Alternaria alternata* (0,146 U) et *Trichothecium roseum* (0,100U) suivie par *Trichoderma* sp. (0,078U). L'activité la plus faible a été observée chez *Penicillium* sp. et *Fusarium avenaceum*.

L'activité de la polygalacturonase estimée est importante durant les premiers jours de dégradation de la pectine par les champignons étudiés et diminue durant ce processus. C'est *Alternaria alternata* qui a montré une activité très importante par rapport aux autres champignons (0,1467U). Par contre, l'activité de la PG estimée chez *Trichothecium roseum* est très faible (0,0012U).

L'activité cellulolytique la plus importante a été détectée chez *Fusarium avenaceum* (0,0384U).

MOTS-CLEFS: activité enzymatique, champignons, pourriture, pommes, conservation.

1 INTRODUCTION

Il est facile de prouver la présence de toxines et des enzymes dans les filtrats de culture des champignons, mais il est difficile de lier cette constatation à l'étiologie de la maladie. L'isolement de composés biologiquement actifs au niveau des tissus des plantes malades est indispensable pour prouver l'implication de ces molécules dans la pathogénèse. Ainsi, par

exemple, les enzymes pectinolytiques (polygalacturonase et pectine trans-éliminase) sont fréquemment produites par les champignons et les bactéries dans les tissus malades de l'hôte [4].

Dans le cas de *Penicillium digitatum*, agent causal de la pourriture de citronnier, les parois des tissus sont altérées par des enzymes produites en même temps, telles que la polygalacturonase [5] et la pectine méthylesterase (PME) [6]. Ces derniers auteurs ont montré que ces enzymes n'agissent que lorsqu'elles se trouvent ensemble.

D'autres enzymes pectinolytiques sont également responsables de l'altération des tissus de l'hôte. La pectine méthylesterase a été signalée dans le cas des pourritures des fruits de citron causées par *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Glomerella cingulata* et *Alternaria citri* (Gorlenko et Ordzhonikidze, 1974). La dépolymérase et la polyméthylgalacturonase ont été rapportées respectivement dans les cas de la pourriture grise due à *Botrytis cinerea* [27] et la pourriture de la patate douce due à *Rhizoctonia stolonifer* [23] ; [24] ; [25].

Les enzymes cellulolytiques sont produites par un nombre élevé de micro-organismes, dont un grand nombre de champignons [22] ; [7]. Ces enzymes peuvent être utilisées pour transformer et dégrader divers matériaux et molécules polluants et toxiques [8] mais n'ont qu'un rôle partiel dans la pathogénie dans le cas de la relation hôte-parasite [9] ; [14] ; [3] ; [26]. Cependant, il a été rapporté que la cellulase peut ne pas être importante dans l'étape précoce de développement de la maladie, mais il semble que cette enzyme a un effet considérable dans l'étape tardive du processus de la pathogénèse en s'attaquant à la cellulose microfibrillaire (Wood, 1970) [29].

L'objectif de cette étude est de détecter *in vitro* l'activité des enzymes pectinolytiques (pectine trans-éliminase et polygalacturonase) et cellulolytiques (C.M. cellulase) qui peuvent être impliquées dans la macération des tissus des pommes infectés par *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Trichothecium roseum* et *Fusarium avenaceum*.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 ISOLATS ET MILIEU DE CULTURE UTILISÉS

Cinq espèces fongiques, responsables des pourritures des pommes, ont fait l'Object d'une étude de l'activité des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques : *Alternaria alternata* (Deux isolats E et S), *Penicillium* sp. (P), *Trichoderma* sp. (Tr), *Trichothecium roseum* (Tc) et *Fusarium avenaceum* (F).

Des erlens meyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu Tanaka (milieu minéral additionné d'extrait de levure: 1g/1000 ml) sont ensemencés chacun avec quatre boutures mycéliennes provenant des cultures jeunes des champignons étudiés. La pectine ou la cellulose (1%) sont utilisées comme source unique de carbone. Les erlens meyers sont incubés à 25°C en agitation (60 oscillations par minute).

Après 4, 8, 12 et 18 jours d'incubation, le mycélium des champignons est récupéré par filtration sous vide. Le poids de la matière sèche, a été déterminé en portant le mycélium à l'étuve à 60°C pendant 24 heures. Les filtrats obtenus sont directement utilisés pour le dosage de l'activité enzymatique.

2.2 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ PECTINE LYASE (PECTINE TRANS-ÉLIMINASE)

L'activité pectine lyase a été déterminée selon la technique de Jerebzoff- Quintin et Jerebzoff (1980) [13]. Le mélange qui contient 1,5 ml de filtrat de culture, 2,5 ml de pectine (1%) (préparé dans le tampon tris HCL à 0,1M et à pH = 9) et 1 ml de CaCl₂ (0,005 M) est incubé à 30°C pendant 75 min. Après ce temps, un produit réactionnel, constitué de 0,67 ml de HCl (0,1M) et 1,33 ml de l'acide thiobarbiturique (0,04M), est ajouté à ce mélange. Après chauffage du mélange à 100°C pendant 30 min et centrifugation (10000 g pendant 12 min), le surnageant est utilisé pour la lecture de la densité optique à 550 nm. La valeur enregistrée donne directement l'activité enzymatique exprimée par micro mole de substrat par minute (Jerebzoff-Quintin et Jerebzoff, 1980; El Aissami, 1990) [13] ; [10].

Le témoin essai qui contient 1,5 ml du filtrat de culture et 1ml de CaCl₂ (0,005 M) et le témoin substrat qui contient 2,5ml de pectine (1%) (préparé dans le tampon Tris HCl à 0,1 M et à pH = 9) et 1ml de CaCl₂ (0,005M) sont réalisés dans les mêmes conditions que précédemment.

2.3 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ POLYGALACTURONASE ET DE LA C.M. CELLULASE (Cx)

La technique utilisée est celle décrite par [28] ; [17]. Les solutions sont préparées selon la composition suivante :

Solution A : 971 mg de disodium 2,2'-bicinchoninate sont dissous dans une solution de 450 ml d'eau distillée contenant 31,75 mg de Na₂CO₃, H₂O et 12,1 g de NaHCO₃. Ce mélange est ajusté à 500 ml. La solution peut rester stable durant 4 semaines si elle est conservée dans un endroit sombre et frais.

Solution B : 624 mg de CuSO₄, 5H₂O et 631 mg de la L-serine sont dissous dans 450 ml d'eau distillée et le mélange est ajusté à 500 ml. Ensuite, la solution est stockée dans un flacon sombre au réfrigérateur pendant 4 semaines

2.4 PROCÉDURE STANDARD D'ESSAI

0,2 ml de substrat (0,2% de pectine ou de CMC préparée dans le tampon citrate phosphate (PCA)) auquel est ajouté 0,2 ml de filtrat de culture et 0,4 ml du tampon PCA (à 50 mM et à pH = 5,2). Ce mélange est incubé à 30°C pendant 5 heures. Par la suite, 0,2ml est prélevé et mélangé à 0,8 ml d'eau distillée, 0,5 ml de la solution A et 0,5 ml de la solution B. Après 15 min à 100°C, le mélange est lacé pendant 20 min dans les conditions ambiantes. La lecture de la densité optique s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

2.5 TÉMOIN ESSAI

L'activité enzymatique est mesurée dans un mélange, contenant 0,2 ml de filtrat de culture et 0,4 ml du tampon PCA, incubé à 30°C pendant 5 heures. 0,2 ml est prélevée et mélangé avec 0,8 ml d'eau distillée, 0,5 ml de la solution A et 0,5 ml de la solution B. Ce mélange est incubé à 100°C pendant 15 min puis dans les conditions ambiantes pendant 20 min. La densité optique est déterminée comme précédemment.

Pour le Témoin substrat qui contient 0,2 ml de substrat et 0,4 ml du tampon PCA et le témoin blanc qui renferme 1 ml de l'eau distillé, 0,5 ml de la solution A et 0,5 ml de la solution B, on a suivi la même procédure que celle établit auparavant pour le témoin essai.

2.6 GAMME ÉTALON

La gamme étalon du dosage des sucres réducteurs a été préparée avec le glucose et l'acide galacturonique (0- 5- 10- 20- 25- 35- et 55 nmol) respectivement pour les activités C.M. cellulase et polygalacturonase. L'unité de l'activité enzymatique (U) est exprimée en nmol par minute à 30°C [17].

3 RÉSULTATS

3.1 ESTIMATION DU POIDS SEC DU MYCÉLIUM DES DIFFÉRENTS CHAMPIGNONS

Le poids sec du mycélium (exprimé en mg/50 ml du milieu de culture) a été estimé 4, 8, 12 et 16 jours après incubation des cultures en milieu liquide additionnée de pectine ou de CMC. Cette estimation du poids sec en fonction de la source de carbone représente un moyen préliminaire de détection des activités de certaines enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.

Les tableaux 1 et 4 illustrent la variation du poids sec du mycélium en fonction de l'âge des différentes cultures. Tous les champignons testés ont montré une croissance mycélienne de plus en plus importante en fonction de l'âge. En effet, les valeurs du poids sec enregistrées augmentent au fur et à mesure que l'âge des cultures est important pour atteindre une valeur maximale au 16^{ème} jour et ceci pour tous les champignons testés en présence de la pectine ou de la CMC.

Sur milieu additionnée de pectine, et après 16 jours d'incubation, la valeur la plus élevée du poids sec a été enregistrée pour les isolats E et S d'*Alternaria alternata* suivi de *Penicillium* sp. , *Trichothecium roseum* et *Trichoderma* sp. La plus faible valeur a été observée pour *Fusarium avenaceum*.

Sur milieu additionné de cellulose et au 16^{ème} jour, les valeurs du poids sec les plus élevées ont été enregistrées pour *Fusarium avenaceum* et l'isolat E d'*Alternaria alternata* suivis par l'isolat S d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium* sp., alors que les valeurs les plus faibles ont été obtenues pour *Trichoderma* spp. et *Trichothecium roseum* (tableau 3).

Tableau 1 : Comparaison du poids sec des différents champignons développés sur la pectine en fonction de l'âge des cultures pour un même niveau de traitement de champignon.

Champignons	Age de la culture			
	4 jours	8 jours	12 jours	16jours
E	0,085 ^a	0,106 ^a	0,122 ^a	0,287 ^a
S	0,035 ^d	0,088 ^b	0,121 ^a	0,160 ^b
P	0,066 ^b	0,084 ^c	0,085 ^b	0,100 ^c
Tc	0,037 ^c	0,056 ^d	0,080 ^b	0,090 ^{cd}
Tr	0,025 ^e	0,025 ^f	0,037 ^d	0,078 ^d
F	0,019 ^f	0,044 ^e	0,044 ^c	0,052 ^e

Tableau 2 : Comparaison du poids sec des différents champignons développés sur la pectine en fonction de l'âge des cultures pour un même niveau de traitement âge.

Age de la culture	Champignons					
	E	S	P	Tc	Tr	F
4 jours	0,085 ^d	0,035 ^d	0,066 ^c	0,025 ^c	0,037 ^c	0,019 ^c
8 jours	0,106 ^c	0,088 ^c	0,084 ^b	0,025 ^c	0,056 ^b	0,044 ^b
12 jours	0,122 ^b	0,121 ^b	0,085 ^a	0,037 ^b	0,080 ^a	0,045 ^b
16jours	0,287 ^a	0,160 ^a	0,100 ^a	0,078 ^a	0,090 ^a	0,052 ^a

Sur la même colonne, deux résultats suivis par la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test L.S.D).

E et S : isolats d'*Alternaria alternata*

P: *Penicillium* sp.

Tr: *Trichoderma* sp.

Tc: *Trichothecium roseum*

F: *Fusarium avenaceum*

Tableau 3 : Comparaison du poids sec des différents champignons développés sur la CMC en fonction de l'âge des cultures pour un même niveau de traitement de champignon.

Champignons	Age de la culture			
	4 jours	8 jours	12 jours	16jours
E	0,025 ^b	0,033 ^b	0,044 ^a	0,252 ^a
S	0,023 ^c	0,027 ^c	0,036 ^b	0,147 ^b
P	0,007 ^f	0,012 ^e	0,034 ^c	0,043 ^c
Tc	0,014 ^d	0,025 ^d	0,025 ^d	0,037 ^e
Tr	0,011 ^e	0,013 ^e	0,034 ^c	0,0041 ^d
F	0,035 ^a	0,039 ^a	0,043 ^a	0,052 ^a

Tableau 4 : Comparaison du poids sec des différents champignons développés sur la CMC en fonction de l'âge des cultures pour un même niveau de traitement âge.

Age de la culture	Champignons					
	E	S	P	Tc	Tr	F
4 jours	0,025 ^c	0,023 ^d	0,007 ^d	0,011 ^d	0,014 ^c	0,035 ^d
8 jours	0,033 ^b	0,027 ^c	0,012 ^c	0,013 ^c	0,025 ^b	0,039 ^c
12 jours	0,044 ^b	0,036 ^b	0,034 ^b	0,034 ^b	0,025 ^b	0,043 ^b
16jours	0,052 ^a	0,047 ^a	0,043 ^a	0,041 ^a	0,037 ^a	0,052 ^a

Sur la même colonne, deux résultats suivis par la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test L.S.D).

E et S : isolats d'*Alternaria alternata*

P : *Penicillium* sp.

Tr: *Trichoderma* sp.

Tc: *Trichothecium roseum*

F : *Fusarium avenaceum*

3.2 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ PECTINE LYASE (PECTINE TRANS-ÉLIMINASE)

Le dosage de l'activité pectine lyase par la mesure de la densité optique a enregistré des valeurs faibles durant les premiers jours du processus de dégradation de la pectine mais augmente avec l'âge des cultures et ceci pour tous les champignons testés (tableau 6).

Au 16^{ème} jour, l'activité de la PTE la plus importante a été enregistrée chez l'isolat E d'*Alternaria alternata* et *Trichothecium* sp. Les valeurs les plus faibles ont été obtenues pour *Penicillium* sp. et *Fusarium avenaceum* (tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison de l'activité pectine lyase (trans-éliminase) des différents champignons testés pour un même niveau de traitement âge.

Champignons	Age de la culture			
	4 jours	8 jours	12 jours	16jours
E	0,066 ^b	0,072 ^c	0,076 ^b	0,146 ^a
S	0,065 ^b	0,074 ^b	0,077 ^b	0,087 ^c
P	0,058 ^c	0,062 ^e	0,066 ^c	0,067 ^e
Tc	0,051 ^e	0,065 ^d	0,067 ^c	0,078 ^d
Tr	0,094 ^a	0,096 ^a	0,096 ^a	0,100 ^b
F	0,056 ^d	0,059 ^f	0,063 ^d	0,072 ^{de}

Tableau 6 : Comparaison de l'activité pectine lyase (trans-éliminase) des différents champignons testés pour un même niveau de traitement champignon.

Age de la culture	Champignons					
	E	S	P	Tc	Tr	F
4 jours	0,066 ^d	0,065 ^d	0,058 ^d	0,094 ^a	0,051 ^d	0,056 ^d
8 jours	0,072 ^c	0,074 ^c	0,062 ^c	0,096 ^a	0,065 ^c	0,059 ^c
12 jours	0,076 ^b	0,077 ^b	0,066 ^b	0,096 ^a	0,067 ^b	0,063 ^b
16jours	0,146 ^a	0,087 ^a	0,067 ^a	0,100 ^a	0,078 ^a	0,072 ^a

Sur la même colonne, deux résultats suivis par la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test L.S.D).

E et S : isolats d'*Alternaria alternata*

P : *Penicillium* sp.

Tr: *Trichoderma* sp.

Tc: *Trichothecium roseum*

F : *Fusarium avenaceum*

3.3 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA POLYGALACTURONASE

L'activité de la polygalacturonase (PG) des différents champignons a été détectée en fonction de l'âge. En effet, l'activité de la PG estimée est importante durant les premiers jours de dégradation de la pectine (4 jours) et diminue durant ce processus. Les valeurs enregistrées montrent que les isolats d'*A. alternata* ont une activité très importante par rapport aux autres champignons testés (tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison de l'activité polygalacturonase (U) des différents champignons testés pour un même niveau de traitement âge.

Champignons	Age de la culture			
	4 jours	8 jours	12 jours	16 jours
E	0,2830 ^a	0,2410 ^a	0,2300 ^a	0,1467 ^a
S	0,2440 ^b	0,2195 ^b	0,1950 ^b	0,1466 ^a
P	0,1260 ^c	0,1020 ^c	0,0831 ^c	0,0806 ^b
Tc	0,1051 ^d	0,0874 ^d	0,08029 ^c	0,0224 ^c
Tr	0,0208 ^e	0,0159 ^e	0,0110 ^d	0,0012 ^d
F	0,0022 ^f	0,0012 ^f	0,0008 ^e	0,0003 ^e

Sur milieu liquide riche en pectine, l'activité PG est maximale après 4 jours de développement de *Penicillium* sp., avec une valeur de 0,1260 (U), et diminue en fonction de l'âge pour atteindre, au 16^{ème} jour une valeur de 0,0806 (U). Cette activité enregistrée pour ce champignon est légèrement inférieure à celle enregistrée pour les isolats d'*A. alternata*.

De même, pour *Trichoderma* sp., l'activité de la PG est importante durant les premiers jours du processus de dégradation de la pectine et diminue avec l'âge. Les valeurs enregistrées pour *Trichoderma* sp. sont moyennes en comparaison à celles obtenues pour *A. alternata* et *Penicillium* sp.

La pectine n'a pas été bien dégradée par *Trichothecium roseum* et *F. avenaceum*, puisque l'activité de la PG estimée de ces deux champignons est faible.

3.4 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA C.M. CELLULASE (Cx)

Tous les champignons étudiés ont montré l'aptitude à produire l'enzyme cellulolytique Cx. Ainsi, l'estimation du taux du glucose dans le milieu de culture liquide a révélé que *F. avenaceum* est plus apte à dégrader la CMC soluble par rapport aux autres champignons étudiés. L'activité cellulolytique de la Cx obtenue est très faible pendant les premiers jours de dégradation de la CMC et augmente en fonction de l'âge pour atteindre un maximum au 16^{ème} jour (tableau 9).

Les valeurs obtenues de l'activité cellulolytique de *Penicillium* sp. et d'*A. alternata* sont moins importantes que celles enregistrées pour *Fusarium avenaceum*. Par ailleurs, l'activité cellulolytique la plus faible a été notée chez *Trichothecium roseum* et *Trichoderma* sp.

De ces résultats, on peut conclure que certains champignons (*A. alternata*, *Penicillium* sp. et *Trichoderma* sp.) ont une activité pectique importante alors que chez d'autres champignons tel que *Fusarium avenaceum*, c'est l'activité cellulolytique qui est la plus dominante.

Tableau 8 : Comparaison de l'activité polygalacturonase (U) des différents champignons en fonction de l'âge des cultures pour un même niveau de traitement champignon.

Age de la culture	Champignons					
	E	S	P	Tc	Tr	F
4 jours	0,2830 ^a	0,2440 ^a	0,1260 ^a	0,0208 ^a	0,1051 ^a	0,0022 ^a
8 jours	0,2401 ^b	0,2195 ^b	0,1020 ^b	0,0159 ^b	0,0874 ^b	0,0012 ^b
12 jours	0,2300 ^c	0,1950 ^c	0,0831 ^c	0,0110 ^c	0,0110 ^b	0,0008 ^c
16 jours	0,1467 ^d	0,1466 ^d	0,0806 ^d	0,0012 ^d	0,0224 ^d	0,0003 ^d

Sur la même colonne, deux résultats suivis par la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test L.S.D).

E et S : isolats d'*Alternaria alternata*

P : *Penicillium* sp.

Tr: *Trichoderma* sp.

Tc: *Trichothecium roseum*

F : *Fusarium avenaceum*

Tableau 9 : Comparaison de l'activité cellulolytique (Cx) des différents champignons testés pour un même niveau de traitement âge

Champignons	Age de la culture			
	4 jours	8 jours	12 jours	16jours
E	0,0046 ^d	0,0063 ^e	0,0382 ^b	0,0703 ^c
S	0,0010 ^e	0,0075 ^b	0,0204 ^d	0,0543 ^d
P	0,0062 ^b	0,0062 ^e	0,0139 ^e	0,0822 ^b
Tc	0,0064 ^b	0,029 ^b	0,0327 ^c	0,0453 ^e
Tr	0,0051 ^c	0,0088 ^c	0,0138 ^f	0,0425 ^f
F	0,0384 ^a	0,0399 ^a	0,0562 ^a	0,1649 ^a

Tableau 10 : Comparaison de l'activité cellulolytique (Cx) des différents champignons en fonction de l'âge des cultures pour un même niveau de traitement champignon

Age de la culture	Champignons					
	E	S	P	Tc	Tr	F
4 jours	0,0046 ^d	0,0010 ^d	0,0062 ^c	0,0064 ^d	0,0051 ^d	0,0384 ^d
8 jours	0,0063 ^c	0,0075 ^c	0,0062 ^c	0,029 ^c	0,0088 ^c	0,0399 ^c
12 jours	0,0382 ^b	0,0204 ^b	0,0139 ^b	0,0327 ^b	0,0138 ^b	0,0562 ^b
16jours	0,0703 ^a	0,0543 ^a	0,0822 ^a	0,0425 ^a	0,0453 ^a	0,1649 ^a

Sur la même colonne, deux résultats suivis par la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test L.S.D).

E et S : isolats d'*Alternaria alternata*

P: *Penicillium* sp.

Tr: *Trichoderma* sp.

Tc: *Trichothecium roseum*

F: *Fusarium avenaceum*

4 DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans cette étude, il a été observé que les champignons responsables de la pourriture des pommes sont capables de produire *in vitro* les enzymes pectinolytiques: la polygalacturonase et la pectine lysase. Cette production dépend de l'espèce fongique. En effet, la pectine lysase est importante chez l'isolat E d'*Alternaria alternata* et *Trichothecium roseum*, moyenne chez l'isolat S d'*Alternaria alternata* et *Trichoderma* sp. et faible chez *Penicillium* sp. et *Fusarium avenaceum*. La polygalacturonase est importante chez *A. alternata* et *Penicillium* sp. , moyenne chez *Trichoderma* sp., et très faible chez *Trichothecium roseum* et *Fusarium avenaceum*.

L'activité de la polygalacturonase est très importante durant les premiers jours de dégradation par contre, celle de la pectine trans-éliminase a augmenté avec l'âge des cultures. Ce résultat est identique à celui signalé par [18] qui ont travaillé sur les enzymes pectiques produites par *Botrytis cinerea*.

Plusieurs champignons sont capables de produire *in vitro* les enzymes pectinolytiques. La pectine méthyl-estérase et la polygalacturonase sont produites *in vitro* par les champignons responsables de la pourriture des fruits du citronnier, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Colletotrichum* et *Alternaria citri* [12] et sont détectées également dans les filtrats de culture de *Botryodiplodia theobromae* et *Aspergillus aculeatus* [2].

La polygalacturonase produite par *Penicillium italicum* et *P. digitatum* facilite la pénétration des hyphes dans la paroi cellulaire des fruits du citronnier durant le processus de dégradation [6]. Ces auteurs ont signalé que les tissus infectés par *P. italicum* présentent une deméthylation importante de la pectine, un gonflement de la paroi cellulaire et une plasmolyse des cellules. Il a été observé également que la dissolution de la paroi cellulaire n'a eu lieu que lors de la pénétration des hyphes de *P. digitatum* dans les tissus de l'hôte.

Le rôle que peuvent jouer les enzymes pectiques dans la pathogénèse d'*Aspergillus aculeatus* et *Botryodiplodia theobromae* a été montré par Adisa et Fajola [2]. Ainsi, l'application de la PTE et la PG aux oranges provoquent une

macération rapide des tissus. D'autres travaux ont montré que l'altération des tissus de la patate douce est due aux enzymes pectinolytiques et cellulolytiques produites par *Rhizopus stolonifer* [24].

En plus de l'activité pectinolytique observée, la plupart des champignons testés ont présenté une activité cellulolytique. Cependant, l'aptitude à dégrader la cellulose varie d'une espèce fongique à une autre. En effet, c'est *Fusarium avenaceum* qui s'est montré le plus apte à dégrader la CMC suivi de *Penicillium* sp. et d'*Alternaria alternata*. Par contre, l'activité cellulolytique la plus faible a été observée chez *Trichothecium roseum* et *Trichoderma* sp.

Cette variation dans l'activité cellulolytique a été observée également chez les espèces fongiques du même genre. Ainsi, cette activité est très importante chez *Penicillium corylophilum* et elle est faible chez *P. commune*, *P. funiculosum*, *P. italicum* et *P. rubrum* [19].

D'après Abdel-Hafez [1], les espèces du genre *Penicillium* sp. et *Alternaria alternata* sont des grands décomposeurs de la cellulose. Ce résultat rejoint celui déjà signalé par Flannigan [11]. Cet auteur a rapporté que *Alternaria alternata* possède une grande activité cellulolytique, mais ce résultat a été critiqué par Mazen [19], ce qui est en accord avec nos résultats.

L'activité enzymatique observée chez *Trichoderma* spp. est très faible pendant les premiers jours de culture en présence de CMC mais augmente avec le temps. Ce résultat concorde avec celui signalé par Yeoh *et al.* [30]. En effet, l'activité cellulolytique n'a été détectée chez *Trichoderma harzianum* et *T. konnigii* qu'après développement du mycélium dans le milieu de culture contenant la cellulose. D'après certains auteurs [7] ; [31], ces champignons sont capables de dégrader la cellulose insoluble en sucre soluble. De même, Rubridge [21] a signalé que la présence de la cellobiose dans milieu de culture peut induire la synthèse de la cellulase chez *Trichoderma viride*.

L'utilisation de la cellulose par les champignons dépend de leur habilité à produire deux types d'enzymes C1 et Cx [15] ; [16]. Les résultats obtenus au cours de nos essais montrent que tous les champignons testés produisent l'enzyme Cx capable de dégrader la CMC. Il en est de même pour *Fusarium oxysporum* et *F. moniliforme* [20].

D'autres champignons tels que *Aspergillus aculeatus* et *Botryodiplodia theobromae* sont capables de dégrader la cellulose en affectant d'une façon importante l'hydrolyse de la CMC, ce qui montre que ces deux champignons produisent les deux types de cellulase C1 et Cx dont les activités ont été détectées dans les filtrats de culture contenant la CMC [2].

Au cours de cette étude, une activité pectinolytique et cellulolytique a été observée chez les champignons responsables des pourritures des pommes provoquées par *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp., *Trichothecium roseum*, *Trichoderma* sp. et sont fonction de l'espèce fongique étudiée. Ces enzymes pourraient être impliquées dans la macération des parois cellulaires des pommes comme l'ont suggéré les différents travaux réalisés dans ce domaine.

RÉFÉRENCES

- [1] Abdel-Hafez S.I.I., 1982. Cellulose-decomposing fungi of desert soils in Saudia Arabia. *Mycopathologia*, 78: 73-78.
- [2] Adisa V.A. et Fajola A.O., 1982. Pectinolytic enzymes associated with the soft rots of *Citrus sinensis* caused by *Aspergillus aculeatus* and *Botryodiplodia theobromae*. *Mycopathologia*, 77: 47-50.
- [3] Alabi R.O. et Naqvi S.H.Z., 1977. Production of cellulolytic and proteolytic enzymes by *Cercospora arachidicola*. *Trans. Brit.Mycol. Soc.*, 68: 296- 298.
- [4] Bateman D.F et Millar R.I., 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Annu. Rev. Phytopathology*, 4: 119-146.
- [5] Barash I. et Angel E., 1970. Isolation and properties of an exopolysaccharide produced by *Penicillium digitatum* during infection lemons fruits. *Israel J. Bot.* 19: 599-608.
- [6] Barmore C.R. et Brown G.E., 1980. Polygalacturonase from Citrus fruit infected with *Penicillium italicum*. *Phytopathology*, 71: 328-331.
- [7] Bisaria V.S. et Ghose T.K., 1981: Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzymes Microbiological Technology*, 3: 90 -104.
- [8] Botton B., Burton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H. , Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J , Vayssier Y. et. Veau P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. Edition Masson, 511 p.
- [9] Chahal D.C et Gray D., 1968. The growth of selected cellulolytic fungi on wood pulp. In: Walters A.H et Elphick J.S. (Ed.). *Biodeterioration Symposium* . Elsevier Publishing, London : 584-593.
- [10] El Aissami A. 1990. Contribution à l'étude de la verticilliose de la luzerne : variabilité de la spécificité parasitaire et analyse de quelques mécanismes d'action du parasite. Thèse de docteur de troisième cycle. Université Mohamed V, Faculté des Sciences, Rabat : 187p.
- [11] Flannigan B., 1970. Degredation of arabinoxylan and carboxymethyl cellulose by fungi from barley kernels. *Trans. Br. Myc. Soc.*, 55: 277-281;

- [12] Gorlenko M.V et Ordzhonikidze B.G., 1974. Pectinolytic enzymes of fungi pathogen to citrus fruits. Soobhcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SRP, 73: 201-203. Summary in rev. Plant Patho. 50: 536.
- [13] Jerebzooff- Quintin S. et Jerebzooff S. ,1980. Métabolisme de l'asparagine et rythme endogène de sporulation chez *Leptosiphoria michotii* (west) Sacc. *Physiol. Vég.* 18: 147-156.
- [14] Lloyd A.O, 1968. The evaluation of resistance of cellulolytic textiles. In: Walters A.H. & J.S. Elpick (Ed.). *Biodeterioration of materials. Proceedings of the 1st International Biodeterioration Symposium.* Elsevier Publishing. London: 170-177.
- [15] Mandels M. et Reese E.T. , 1965 . Inhibition of cellulase. *A. Rev. Phytopathology*, 3 : 85-102.
- [16] Mandels M. et Steinberg D., 1976. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* Osaka, 54 : 267-286.
- [17] Mateos P.F. , Jimenez- Zurdo J. I., Chen J., Squartinin A.S., Haack S. K., Martinez- Molina E., Hubbel D. H. et Dazzo F.B., 1922. Cell-Associated Pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applad Environmental Microbiology*, 58: 1816-1822.
- [18] Martinez M.J., Martinez R. et Reyes F., 1988. Effect of pectin on pectinases in autolysis of *Botrytis cinerea*. *Mycopathologia*, 102: 37- 43.
- [19] Mazen M.B., 1973. Ecological studies on cellulose decomposing fungi in Egypt. Ph.D. Thesis, Bot. Dept., Faculty of science, Assiut University , Egypt.
- [20] Mehta A., Chopra S. et Mehta P., 1993. Antibiotic inhibition of pectolytic and cellulolytic enzyme activity in two *Fusarium* species. *Mycopathologia*, 124:185-188.
- [21] Rubridge T., 1984. Extracellular cellulose activity from *Trichoderma viride* grow in the presence of glucose. *Trans. Br. Myc. Soc.*, 83: 522-524.
- [22] Ryu D. D.Y. et Mandels M., 1980. Cellulase biosynthesis and applications. *Enz. Microb. Technol.*, 2: 91- 102.
- [23] Srivastava D.N., Ehandi E. et Walker J.C., 1959. Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Rhizopus Stolonifer* . *Phytopathology*, 49: 145-148
- [24] Srivastava D.N., et Walker J.C., 1959. Mechanisms of infection of sweet potato rots by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology*, 49: 400-406.
- [25] Spalding D.H., 1963. Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology*, 49: 145-148.
- [26] Singh N., et Kunmene I.S., 1980. Cellulose decomposition by the four isolates of *Pyricularia oryzae*. *Mycologia*, 72: 182-190.
- [27] Tribe H.T., 1955. Studies in the physiology of parasitism. XIX. On the killing of plant cells by enzymes from *Botrytis cinerea* and *Bacterium aroideae*. *Ann. Bot.* XIX: 351-368.
- [28] Wafeenschmidt S. et Jaenike L., 1987. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2'-Bicinchoninate. *Analytical Biochemistry*, 165: 337-340.
- [29] Wood R.S.K, 1970. The killing of plants cells by the soft rot parasites. In: *Phytotoxines in plant diseases* (Ed.) Wood R.K.S., A. Ballo et Graniti A. Acad. Press. New York And London : 273.
- [30] Yeoh H.H., T.K. Tan et Tian K. E., 1984. Cellulolytic enzymes of fungi isolated from wood materials. *Mycopathologia*, 87:51-55.
- [31] Zhu Y .S., Wu Y.Q., CHEN W., Tan C., Gao J.H., Fei J.X. et Shih C.N., 1982. Induction and regulation of cellulase synthesis in *Trichoderma Pseudokoningii* mutants EA3-867 and N2-78. *Enz. Microb. Technol.*, 4: 3-12.