

PRODUCTION, CARACTERISATION ET UTILISATION DES COMPOSES TOXIQUES DE *Phoma sabdariffae* SACC. DANS LA SELECTION DES CULTIVARS RESISTANTS DE ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*) AU GABON

A. N. LEPENGUE¹, B. M'BATCHI¹ et S. AKE²

¹Laboratoire de Phytopathologie, Unité de Recherche Agrobiologie ; Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM) B.P. 901 ; Franceville, Gabon. E-mail : lepengue_nicaise@yahoo.fr / brandtbertachi@hotmail.com

²Laboratoire de Physiologie végétale, Agrophysiologie, U.F.R. Biosciences ; Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire. E-mail : akes@ci.refer.org

RESUME

La roselle, l'une des principales plantes maraîchères alimentaire et médicinale du Gabon, est victime d'une sévère pourriture engendrée par *Phoma sabdariffae* Sacc., un Deutéromycète qui agit par excrétion de substances toxiques. La présente étude a été réalisée pour déterminer les conditions de production optimale de ces composés, afin de les caractériser, et les expérimenter comme outil de sélection des cultivars résistants de roselle. Les résultats ont révélé que les fortes toxicités étaient obtenues avec le milieu Richards modifié, après 20 jours, en condition de culture agitée, à la température de 28 °C et sous photopériode 12/24. La chromatographie a révélé l'existence de deux fractions actives, F1 et F4, avec des caractéristiques physico chimiques respectivement semblables à celles de la brefeldine A et à celles de la cytochalasine B. L'étude de la sensibilité des plantes a permis d'identifier 3 cultivars résistants, VV1, RV1 et RR1. Ces résultats pourraient être exploités en amélioration des plantes, pour la sélection rapide des cultivars de roselle résistants à *Phoma sabdariffae* Sacc.

Mots clés : Plantes maraîchères, Roselle, *Ph. sabdariffae* Sacc., toxines, cultivars résistants, Gabon.

ABSTRACT

PHOMA SABDARIFFAE SACC.'S TOXIC COMPOUNDS STUDY

Jamaican sorrel is one of the major nutritious and medicinal vegetable crop in Gabon. It's threatened by *Phoma sabdariffae* Sacc., a *Sphaerioidaceae* fungi imperfecti pathogenic agent. This study was undertaken in order to determine the optimal conditions for toxic compounds production, characterize the toxins, and evaluate them as a tool to screen Jamaican sorrel cultivars for resistance to *Phoma sabdariffae* Sacc. Highest toxic filtrates were obtained on modified Richards culture medium, after 20 days growth in shaken culture medium condition, at 28 °C and under photoperiod 12/24. *Phoma sabdariffae* Sacc.'s filtrate culture contains two chromatographic actives fractions F1 and F4, with brefeldin A and cytochalasin B physico chemical characteristics. Three cultivars VV1, RV1 and RR1 showed a resistance to these toxic compounds. These results are interesting for quick resistant plants selection.

Keys words : Vegetable crops, Jamaican sorrel, *Ph. sabdariffae* Sacc., toxins, resistant cultivars, Gabon.

INTRODUCTION

La roselle (*Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*, Malvaceae) est l'une des principales plantes maraîchères du Gabon. Elle est présente sous forme de plusieurs cultivars différents par la

couleur, la forme et la pilosité des feuilles et des tiges (Chenu *et al.*, 1986). C'est une plante d'intérêt alimentaire et médicinal, utilisée comme sauce de cuisine, boisson rafraîchissante, ou comme digestif, anti-scorbut, laxatif, anti-cholestérol et purgatif (Perry, 1980). Cette précieuse plante est l'objet d'une sévère attaque

cryptogamique, provoquant la pourriture de l'ensemble des organes atteints (feuilles, tiges, calices et graines) et conduisant à la mort de la plante. L'agent pathogène identifié est *Phoma sabdariffae* Sacc., champignon Deutéromycète de la famille des Sphaerioidacées, de l'ordre des phomales (Mouaragadja et M'batchi, 1998). Pour comprendre les mécanismes d'action de ce champignon, Lépengué *et al.* (2004) ont étudié la phytotoxicité du filtrat de son milieu de croissance, à l'aide des tests biologiques de germination de graines, de flétrissement foliaire, de perte de pigments chlorophylliens et de libération d'électrolytes. Les résultats ont montré que le filtrat du milieu de croissance de cet agent pathogène pouvait, à lui seul, reproduire les symptômes de la maladie, attribués au champignon. Ces auteurs ont alors conclu que l'action pathogène de *P. sabdariffae* sur la roselle repose sur l'excrétion d'une ou de plusieurs substances toxiques à la plante hôte. La nature de telles substances n'a jamais été rapportée à ce jour. En vue de contribuer à la connaissance de ces composés, notre laboratoire a initié une série d'études sur :

- les conditions culturales de *P. sabdariffae*, pour une production optimale des composés toxiques ;
- l'utilisation du filtrat toxique des milieux de culture de *P. sabdariffae* comme outil de criblage des plantes résistantes ;
- la spécificité des substances toxiques produites par *P. sabdariffae* ;
- la biototoxicité des substances toxiques de *P. sabdariffae* sur divers agents pathogènes, fréquemment rencontrés en pathologie végétale, animale ou humaine ;
- le nombre et la structure moléculaire des composés toxiques produits par *P. sabdariffae*.

Le travail présenté dans cet article a pour objectif de déterminer les conditions de production optimale des composés toxiques sécrétés par *P. sabdariffae*, en vue de les caractériser et les expérimenter comme crible de sélection des plantes de roselle résistant au champignon.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Matériel végétal

Treize cultivars de roselle, codifiés sur la base de leurs colorations ont été utilisés. Ce sont : VV1, VV2, VV3, VV4, VV5, VR, RV1, RV2, RV3, RV4, RV5, RR1 et RR2.

Matériel fongique

Le champignon *Phoma sabdariffae* Sacc. provient de la mycothèque de l'Institut National Supérieur d'Agronomie et de Biotechnologies (INSAB) de Franceville, au Gabon.

METHODES

Conditions de production optimale des composés toxiques de *Phoma sabdariffae* Sacc.

Pour déterminer les conditions optimales de production des composés toxiques de *P. sabdariffae*, plusieurs paramètres culturaux ont été expérimentés, à savoir les milieux de culture (Fries, Maltea, Pomme de terre, Richards), les durées d'incubation (5, 10, 15, 20 et 25 jours), les températures d'incubation (20 °C, 24 °C, 28 °C, 32 °C), la photopériode (lumière, obscurité, alternance de lumière) et les conditions d'aération (aérobiose, anaérobiose) et d'agitation (agitation ou statisme) (Lépengué *et al.*, 2004). Ces différents paramètres culturaux ont été étudiés deux à deux, suivant l'ordre chronologique donné ci-dessus. Les paramètres sélectionnés à une étape ont permis de déterminer ceux de l'étape suivante. La culture de *P. sabdariffae* a été réalisée selon les techniques décrites par Lépengué *et al.* (2004). Deux ml de suspension sporale de ce champignon, calibrée à 10⁶ spores/ml après purification et culture monospore sur milieu PDA

ont été inoculés à 400 ml de chaque milieu nutritif liquide, contenu dans un flacon de culture Nunclon. Après incubation dans chacune des conditions précitées, les milieux de culture ont successivement été filtrés sur papier filtre et sur membrane millipore (0,22 µm). Des filtrats témoins ont également été préparés à partir des milieux vierges (non inoculés) et incubés dans les mêmes conditions que les milieux inoculés. La toxicité de ces filtrats a été mesurée par le test biologique de libération d'électrolytes (Lépengué *et al.*, 2004). Trente (30) rondelles foliaires (15 essais et 15 témoins) de 5 mm de diamètre, prélevées à l'aide d'un emporte-pièce sur le cultivar RV2 ont été placées dans des fioles jaugées contenant 10 ml de filtrat vierge (témoin) ou fongique (essai). Après 2 h d'incubation, les solutions ont été filtrées sur une membrane millipore de 0,22 µm de diamètre. Les conductivités des filtrats essai (Ce) et témoin (Ct) ont été mesurées à l'aide d'un conductimètre (modèle Jenway 1034), et le pourcentage d'électrolytes libérés (% Le) calculé selon la relation suivante :

$$\% \text{ Le} = \frac{\text{Ce}}{\text{Ct}} \times 100$$

Sélection des cultivars résistants de roselle

La sensibilité de différents cultivars de roselle a été mesurée par le biotest de libération d'électrolytes, en utilisant les filtrats de meilleures toxicités, obtenus par les techniques décrites précédemment (2.2.1).

Caractérisation chromatographique du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc.

Cinq (5) litres de filtrat toxique de *P. sabdariffae* ont été concentrés au 1/100^e (soit 50 ml) par lyophilisation, au Lyophilisateur Virtis Sentry, et les composés organiques extraits à l'aide d'un volume équivalent d'acétate d'éthyle pur, dans une ampoule à décanter de 200 ml. La phase organique a été évaporée (au rotavapor Büchi R-205) et le résidu sec repris dans 25 ml de méthanol pur. Après homogénéisation, la

solution méthanolique a été transvasée dans un ballon Pyrex de 50 ml et à nouveau évaporé comme précédemment. L'extrait sec obtenu a été repris dans 1 ml de méthanol, homogénéisé et déposé sur une ligne horizontale, située à 3 cm du bord inférieur d'une plaque de silicagel fluorescente F254. La chromatographie a été réalisée en phase ascendante, dans une cuve contenant un mélange de solvants composés d'acétate d'éthyle et de méthanol (9 : 1). Après migration, les plaques ont été séchées, les bandes identifiées sous une lumière UV, et leur mobilité calculée et exprimée en rapports frontaux (R_f), selon les méthodes décrites par Bousquet et Barbier (1972). Chaque bande chromatographique a été découpée aux ciseaux, éluée dans 20 ml de méthanol, et évaporée au rotavapor, comme décrit plus haut. Les résidus secs obtenus ont été cristallisés à la suite d'un refroidissement brutal du ballon, dans un bac à glace. Après séchage, les cristaux ont été pesés, et leurs points de fusion déterminés à l'aide d'un banc chauffant Köfler Heizbank (Bousquet et Barbier, 1972).

Toutes les expériences de cette étude ont été répétées 4 fois.

Analyse statistique

Les données ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA). En cas de différence significative, le test F de Fisher a été utilisé au seuil de 5 % (Logiciel Statistica 6.0).

RESULTATS

INFLUENCE DU MILIEU ET DU TEMPS DE CULTURE SUR LA LIBERATION D'ELECTROLYTES

Les meilleurs taux de toxicité ont été enregistrés sur le milieu Richards modifié, après 20 jours d'incubation (Figure 1). Le pourcentage de libération d'électrolytes relevé à cette période est de 137,64 % (Figure 1). Les taux de toxines produites par les filtrats de 20 jours, issus du milieu Richards modifié, ont significativement été les plus élevés, au seuil de 5 % (Tableau 1).

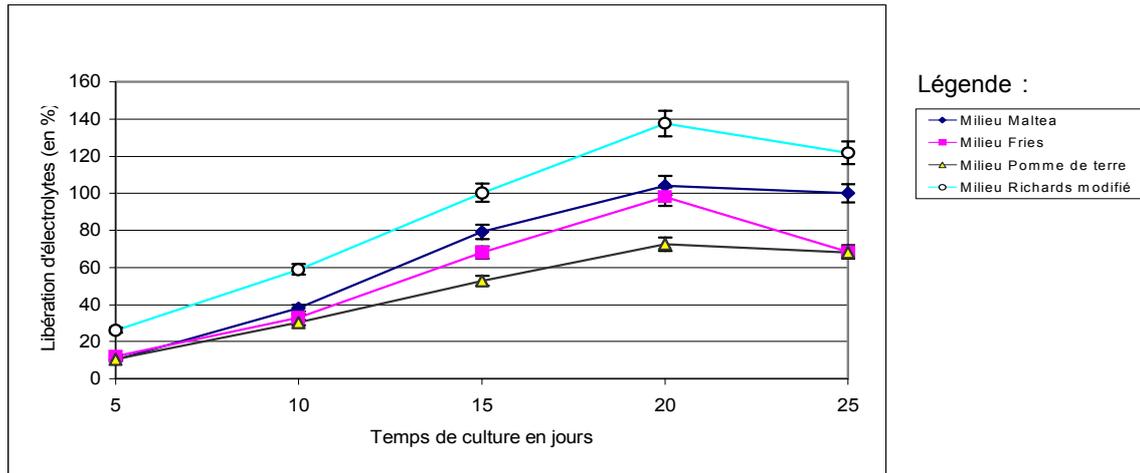


Figure 1 : Milieux de cultures et périodes d'incubation convenable à la production de composé toxiques par *Phoma sabdariffae* Sacc. à 25 °C.

Phoma sabdariffae Sacc.'s time incubation and culture media requierements for optimal toxic metabolites production at 25 °C.

Tableau 1 : Temps d'incubation et milieux nutritifs convenables à la production optimale de composés toxiques par *Phoma sabdariffae* Sacc.

Phoma sabdariffae Sacc.'s culture media and incubation time requierements for optimal toxic metabolites production.

Milieux de culture	Temps	Libération d'électrolytes	
Pomme	T5	14,0000	i
Maltea	T5	15,2500	i
Fries	T5	20,5000	i
Richards	T5	21,5000	i
Fries	T10	21,7500	i
Pomme	T10	31,0000	h
Maltea	T10	36,0000	h
Pomme	T15	50,2500	g
Richards	T10	61,0000	f
Pomme	T25	64,0000	ef
Fries	T25	64,0000	ef
Maltea	T25	65,0000	ef
Fries	T15	68,2500	ef
Pomme	T20	69,7500	e
Maltea	T15	78,0000	d
Maltea	T20	98,0000	c
Fries	T20	101,0000	c
Richards	T15	102,0000	c
Richards	T25	131,0000	b
Richards	T20	142,0000	a

Les valeurs de libération d'électrolytes suivies de la même lettre ne sont significativement pas différentes à 5 %.

For each column electrolytes uptake's means followed by common letter are not significantly different at 0.05 level.

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA PHOTOPERIODE DE CULTURE SUR LA LIBERATION D'ELECTROLYTES

La production maximale des composés toxiques par *P. sabdariffae* a été obtenue à 28 °C sous un éclairage intermittent de périodicité 12 h (Figure 2). Les taux de libération d'électrolytes (145 %) relevés sous ces conditions ont été supérieurs à ceux notés dans toutes les autres conditions expérimentées. Les taux de toxicité des filtrats obtenus à 28 °C et en lumière alternée, étaient significativement les plus élevés au seuil de 5 % (Tableau 2).

INFLUENCE DES CONDITIONS D'AGITATION ET D'AERATION DES MILIEUX DE CULTURE SUR LA LIBERATION D'ELECTROLYTES

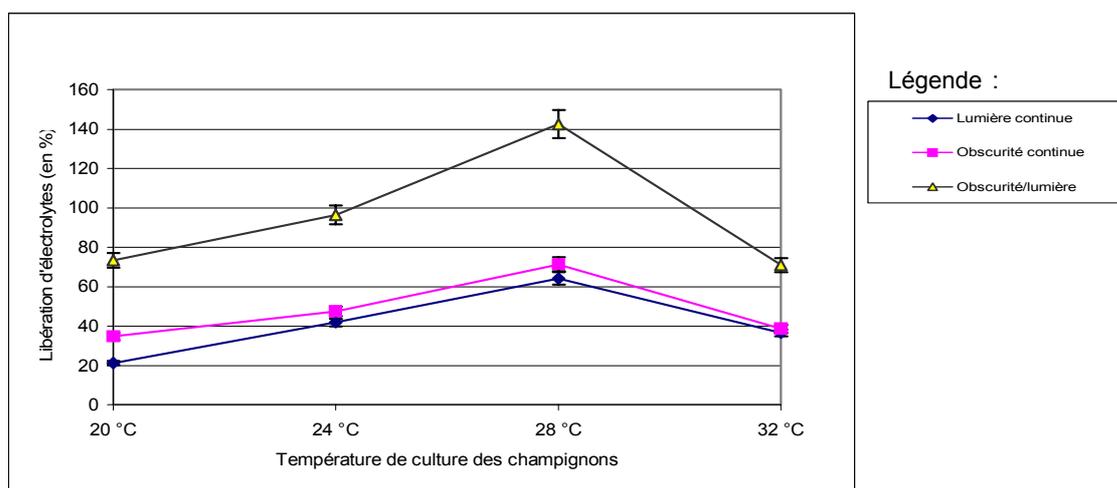
Les filtrats de culture de *P. sabdariffae* provenant des milieux agités étaient environ deux fois plus toxiques que ceux issus des milieux statiques (Figure 3). En revanche, l'aération des milieux n'a montré aucune incidence sur la toxicité des filtrats obtenus. Ce qui, se traduit par l'absence de différence significative entre les taux de toxicité des filtrats provenant des milieux aérés et ceux issus des milieux non aérés (Tableau 3).

SELECTION DES PLANTES RESISTANTES

Les tests de sensibilité des cultivars de roselle au filtrat du milieu de croissance de *P. sabdariffae* ont montré qu'aucune des 13 plantes testées n'était statistiquement immune (Figure 4). Les cultivars VV1, RV1 et RR1 ont cependant présenté une moindre sensibilité à ce filtrat toxique. Leurs pourcentages de libération d'électrolytes ont tous été inférieurs à 43 %. Les autres cultivars ont présenté de fortes sensibilités à ce filtrat toxique, avec dans l'ensemble, des taux de libération d'électrolytes supérieurs à 140 %. Le cultivar RV2 s'est révélé être la plante la plus sensible, avec un taux de libération d'électrolytes de 170 % (Tableau 4).

CARACTERISATION DU FILTRAT TOXIQUE

Le filtrat de culture de *P. sabdariffae* renfermait 4 fractions chromatographiques, F1, F2, F3 et F4, avec des rapports frontaux moyens respectifs de 0,19 ; 0,47 ; 0,58 et 0,63. Les fractions F1 et F4 se sont révélées toxiques, à l'opposé de F2 et F3, qui n'ont présenté aucune activité biologique. Les valeurs moyennes des points de fusion des fractions F1 et F4 ont respectivement été évaluées à 204 °C et 223 °C, et leurs concentrations estimées à 2,16 mg/l et 1,89 mg/l de filtrat fongique.



Milieu utilisé : Richards modifié ; Temps de culture : 20 jours.

Medium: Modified Richards ; Incubation time: 20 days.

Figure 2 : Photopériode et température convenables à la production de composés toxiques par *Phoma sabdariffae* Sacc. sur milieu Richards, modifié après 20 jours de cultures.

Phoma sabdariffae Sacc.'s photoperiod and temperature requirements for optimal toxic metabolites on Richard modified medium after 20 days.

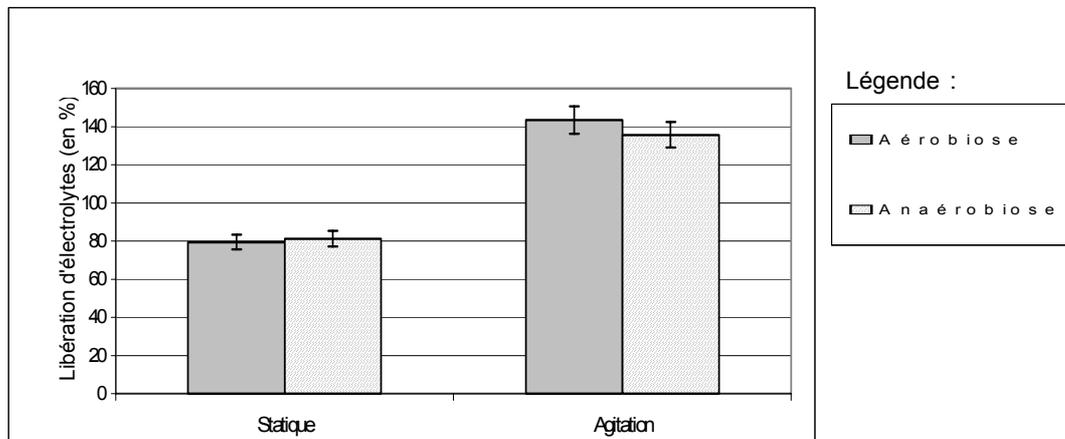
Tableau 2 : Températures et photopériodes convenables à la production de composés toxiques par *Phoma sabdariffae* Sacc.

Phoma sabdariffae Sacc.'s photoperiod and temperature culture requirements for optimal toxic metabolites production.

Photopériode	Température (°C)	Libération d'électrolytes	
Lumière	20	18,0000	h
Obscurité	20	34,0000	g
Lumière	32	35,7500	g
Obscurité	32	36,0000	g
Lumière	24	39,5000	f
Obscurité	24	40,5000	f
Lumière	28	61,7500	e
Obscurité	28	64,2500	d
Alternance	32	64,2500	d
Alternance	20	74,5000	c
Alternance	24	95,5000	b
Alternance	28	142,5000	a

Les valeurs de libération d'électrolytes suivies de la même lettre ne sont significativement pas différentes à 5 %.

For each column electrolytes uptake's means followed by common letter are not significantly different at 0.05 level.



Milieu utilisé : Richards modifié ; Temps de culture : 20 jours ; Température : 28 °C ; Photopériode : lumière intermittente 12/24.

Medium : Modified Richards ; Incubation time : 20 days ; Temperature : 28 °C ; Photoperiod : 12/24 alternated light.

Figure 3 : Conditions d'agitation et d'aération des milieux de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc. convenables à la production de composés toxiques sur le milieu Richards modifié à 28 °C.

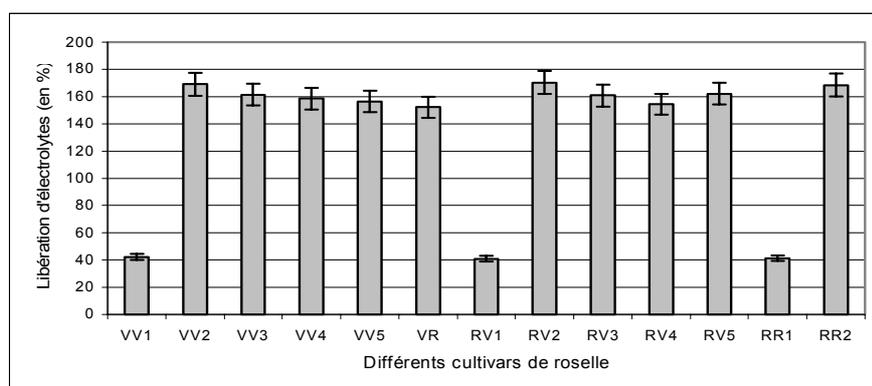
Phoma sabdariffae Sacc.'s airing and shaking culture media requirements for optimal toxic metabolites on Richard modified medium at 28 °C.

Tableau 3 : Conditions d'aération et d'agitation des milieux de culture, convenables à la production de composés toxiques par *Phoma sabdariffae* Sacc.

Phoma sabdariffae Sacc.'s airing and shaking culture media requirements for optimal toxic metabolites production

Aération	Agitation	Libération d'électrolytes	
Fermé	Statique	31,25000	b
Aéré	Statique	33,50000	b
Aéré	Agité	80,00000	a
Fermé	Agité	80,75000	a

Les valeurs de libération d'électrolytes suivies de la même lettre ne sont significativement pas différentes à 5 %.
For each column electrolytes uptake's means followed by common letter are not significantly different at 0.05 level.

**Figure 4** : Sensibilité (en % de libération d'électrolytes) de différents cultivars de roselle aux filtrats du milieu de croissance de *Phoma sabdariffae* Sacc., à 25 °C.

Sensitivity of jamaican sorrel cultivars on Phoma sabdariffae Sacc.'s filtrate medium culture at 25 °C.

Tableau 4 : Sensibilité des cultivars de roselle à *Phoma sabdariffae* Sacc.

Jamaican sorrel cultivars 's sensibility to Phoma sabdariffae Sacc.

Cultivars	Libération d'électrolytes	
RV1	37,2500	i
VV1	40,0000	hi
RR1	40,5000	h
VR	150,5000	g
RV4	150,5000	g
VV5	153,5000	fg
RV5	155,2500	ef
VV3	155,7500	ef
VV4	157,0000	de
RV3	159,0000	cd
VV2	161,7500	c
RR2	165,0000	b
RV2	170,0000	a

Les valeurs de libération d'électrolytes suivies de la même lettre ne sont significativement pas différentes à 5 %.

For each column electrolytes uptake's means followed by common letter are not significantly different at 0.05 level.

DISCUSSION

Des 4 milieux nutritifs étudiés, le milieu Richards modifié s'est révélé le plus toxique. Cela pourrait être dû à son amendement en infusion de roselle. En effet, l'ajout d'infusions de la plante hôte pourrait, simuler les conditions naturelles d'infection et contribuer à stimuler chez le champignon, la synthèse efficace des composés toxiques (Bashan *et al.*, 1995). La baisse de la production des composés toxiques, au delà du 20^e jour pourrait être liée à un appauvrissement des milieux de culture, ou à une autolyse des mycéliums du champignon, comme cela a été rapporté par Ahoussou (1989) sur *Colletotrichum gloesporioides* Penz, agent pathogène de l'igname.

La température de 28 °C, favorable à la production des composés toxiques, confirme la température idéale de croissance du champignon déterminée par Mouaragadja et M'batchi (1998). Le champignon *Phoma sabdariffae* Sacc. présenterait donc la même température optimale de croissance et de production des composés toxiques. Cette concordance d'évènements concourt vraisemblablement au renforcement de l'agressivité de l'agent pathogène (Meulemans, 1993). La forte toxicité des milieux de croissance agités semble en rapport avec une meilleure utilisation des composants nutritifs de ces milieux par le champignon. En effet, plusieurs d'éléments organiques et minéraux des milieux de culture incubés en conditions statiques ne sont généralement pas accessibles au champignon cultivé (Daly et Knoche, 1982), conduisant à l'obtention des filtrats de faibles activités toxiques. Au regard des valeurs de phytotoxicité, l'agent pathogène *P. sabdariffae*, comme la majorité des champignons de cette espèce, serait capable de réaliser alternativement la fermentation et la respiration en absence ou en présence d'oxygène. Cette aptitude expliquerait la relative constance de ses activités toxiques en conditions aérobie ou anaérobie.

Les études de sélection des différents cultivars de roselle ont permis d'identifier VV1, RV1 et RR1 comme statistiquement résistants à l'action toxique du filtrat du milieu de croissance de *P. sabdariffae*. Ceci indique que 10 des 13 cultivars étudiés ont été sensibles à ce filtrat fongique. Ces résultats confirment ceux obtenus avec l'agent pathogène lui-même (Lépengué *et al.*, 2004). L'explication des mécanismes de

sensibilité ou de résistance des cultivars de roselle au filtrat de culture de *P. sabdariffae* passe par diverses études génétiques et biochimiques parmi lesquelles, l'identification et la caractérisation moléculaire des composés toxiques contenus dans ce filtrat. Mais de façon générale, les actions pathogènes d'un composé toxique sont d'ordre physique ou biochimique, induisant chez la plante hôte, des réactions de résistance physique ou chimique telles que : la mise en place des dépôts de protection, la suppression des sites hôtes, l'inactivation de la toxine, ou la sécrétion de composés de défenses, les phytoalexines (Heller *et al.*, 2002). La résistance de certains cultivars de roselle à *P. sabdariffae* obéirait à l'activation d'un ou de plusieurs de ces procédés de défense.

Les résultats de ce travail ont également montré que le filtrat de culture de *P. sabdariffae* renfermait 2 fractions actives, F1 et F4. La caractérisation formelle de ces 2 composés passe nécessairement par l'emploi des techniques approfondies de chromatographie liquide haute performance (HPLC), de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou d'infra rouge (IR). En attendant l'exécution de ces travaux, les résultats actuels appellent à quelques suggestions. En effet, les valeurs des rapports frontaux et celles des points de fusion des fractions F1 et F4 coïncident statistiquement avec celles de la brefeldine A et de la cytochalasine B, 2 composés polyphénoliques à action cytostatique, également rencontrés chez quelques souches de cette même famille fongique (Suzuki *et al.*, 1970). Les travaux de Lépengué *et al.* (2007), ont par ailleurs révélé que l'agressivité de *P. sabdariffae* reposait sur l'excrétion de substances toxiques de nature polyphénolique, photosensibles et non hôte-spécifiques. Cette description correspond bien au caractère général de brefeldine A et de la cytochalasine B. Au vu de ces analyses, la pathogénicité de ce champignon de même que la toxicité des filtrats de son milieu de croissance pourraient résulter d'une action antimototique de ces deux substances sur les cellules des plantes hôtes.

CONCLUSION

Les toxicités optimales des filtrats des milieux de croissance de *P. sabdariffae* ont été obtenues après culture du champignon sur le milieu

Richards modifié, pendant 20 jours, à 28 °C, en conditions agitées et sous photopériode 12/24. Ces filtrats renferment 4 fractions, dont 2 actives F1 et F4, avec des caractéristiques physico chimiques proches de celles de la brefeldine A et de la cytochalasine B. La sensibilité des différents cultivars de roselle au filtrat de culture de *P. sabdariffae* a montré que 3 cultivars, VV1, RV1 et RR1 pouvaient être considérés comme résistants. De tels résultats laissent entrevoir, dans le domaine de la sélection des plantes, la possibilité de substituer les techniques traditionnelles et complexes de sélection au champ, par des méthodes au laboratoire plus simples et plus rapides. Cette démarche constituerait une économie d'espace, de matériel et un gain de temps.

REFERENCES

- Ahoussou N. 1989. Etude de l'antracnose de l'igname (*Dioscorea alata*) provoquée par *Colletotrichum gloeosporioides*. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences naturelles, spécialité Biologie végétale, Univ. de Provence, Aix-Marseille I, 100 p.
- Bashan B., Levy R. S. et L. Levy. 1995. Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47 : 225 - 235.
- Bousquets J. F. et M. Barbier. 1972. Activité phytotoxique de trois souches de *Phoma exigua* et présence de Cytochalasine B dans leurs milieux de culture. *Phytopath. Z.* 75, 365 - 367.
- Chenu J., Ouvry P. et R. Lavergne. 1986. Les plantes médicinales tropicales, tome 5, Dareni (Eds.), Libreville, Gabon, 192 p.
- Daly J. M. et H. W. Knoche. 1982. The chemistry and biology of pathotoxins exhibiting host-selectivity. *Plant Pathol.* 1 : 83 - 138.
- Heller R., Esnault R. et C. Lance. 2002. Physiologie végétale. Développement. 6^e édition de l'Abrégé ; édition Dunod, Paris. pp 144 - 145.
- Lépengué A. N., M'batchi B. et S. Aké. 2007. Caractérisation biochimique du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc., agent pathogène de la roselle au Gabon. Sous presse à Sciences et Nature, Abidjan Côte d'Ivoire.
- Lépengué A. N., Mouaragadja I., M'batchi B. et S. Aké. 2004. Mise en évidence d'une production toxique par *Phoma sabdariffae* Sacc., agent pathogène de la roselle au Gabon. Sous presse à Tropicultura, Belgique.
- Meulemans L. M. 1993. Les champignons phytopathogènes. Traité de Pathologie Végétale. Les presses agronomiques de Gembloux. pp 179 - 234.
- Mouaragadja I. et B. M'batchi. 1998. Etude et identification de la pourriture de l'oseille de Guinée au Gabon. *Fruits* 53 (1) : 57 - 68.
- Perry L. 1980. Medicinal plants of East southeast Asia. Mit Press, Cambridge, 96 p.
- Suzuki H., Tanaka H., Aoki et T. Tamura. 1970. Ascotoxin a metabolite of *Ascochyta imperfecta* Peck. *Agric. Biol. Chem.* 34 : 395 - 413.