

PRODUCTION DE PECTINEMETHYLESTERASE EXTRACELLULAIRE
PAR LE PHYTOPHTHORA PALMIVORA, AGENT DE LA POURRITURE
BRUNE DES CABOSSES DU CACAOYER

Michel TARJOT

A - INTRODUCTION.

Le production d'enzymes pectolytiques extracellulaires a été mise en évidence chez d'assez nombreux champignons phytopathogènes (voir références bibliographiques jointes).

SPENCE (21) signale en 1961 que le Phytophthora palmivora cultivé sur tranches de pommes de terre produit des enzymes pectolytiques, mais n'en met pas en évidence à partir de cabosses pourries.

Dans les essais réalisés au laboratoire de Phytopathologie de l'IFCC en Côte d'Ivoire, on s'est attaché à l'étude de la production de pectinéméthylestérase (PME) par le parasite, aux facteurs favorisant cette production ainsi qu'à la réaction enzymatique elle-même.

A noter cependant que des essais qualitatifs portant sur la production de polygalacturonase ont donné des résultats positifs.

B - METHODE DE DOSAGE.

On s'est inspiré de la méthode décrite par WINSTEAD et WALKER (26). On dose l'augmentation d'acidité provoquée par la libération des radicaux - C O O H, due à la déméthylation des chaînes d'acides pectiques estérifiés.

Comme substrat, on utilise une solution à 1 % de pectine pure très méthylée. Cette solution est tamponnée avec le tampon acide acétique-acétate de sodium pour amener le pH aux environs de 4,5 sauf pour des essais particuliers où des pH différents seront utilisés.

Comme source d'enzyme, on utilise des filtrats de culture du Phytophthora palmivora, cultivé en milieu liquide en boîtes de Roux ou en Erlenmeyers sur différents milieux de culture (voir plus loin). Tous les essais ont été effectués avec l'isolément B 2 du parasite, en provenance de la région de Bingerville.

Les filtrats de culture sont centrifugés 5 à 10 minutes à 5000 tours/minute de façon à débarasser le liquide de la majeure partie des sporanges et fragments de mycelium pouvant s'y trouver.

Le dosage de l'acidité est effectué avec de la soude N/10 soit directement au pH mètre soit avec le bleu de bromothymol comme indicateur de virage (il vire du jaune au bleu à pH 7).

Ce dosage est effectué au bout de 12 à 15 jours de culture sauf indications contraires.

L'action enzymatique est établie par différence entre l'action d'un filtrat de culture et l'action d'une partie équivalente du même filtrat, mais qui a été chauffé 15 minutes à 100° C de façon à flocculer les enzymes pouvant être présents.

Les résultats sont ramenés en milligrammes de méthanol libérés. Les réactions comme on le verra étant assez longues, on ajoute dans chaque fiole d'essai 1 cm³ de toluène comme antiseptique, de façon à éviter les infections secondaires qui fausseraient les résultats.

C - PRODUCTION ENZYMATIQUE.

I - Facteurs intrinsèques agissant sur la production.

a) différents milieux de culture.

... milieu pomme de terre.

On utilise une décoction de pomme de terre à raison de 200 grammes par litre de milieu.

200 cm³ de cette décoction sont placés dans chaque boîte de Roux ou Erlenmeyerensemencés.

L'envahissement du milieu de culture par le champignon est très rapide. Au bout de 3 à 4 jours dans les conditions du laboratoire, le liquide est entièrement rempli par du mycelium immergé. Ensuite les filaments aériens apparaissent ; au bout d'une semaine, toute la surface du milieu de culture est recouverte d'un abondant feutrage mycélien blanc.

Les dosages effectués ont montré la présence de PME. L'étude de la réaction enzymatique (voir plus loin) sera effectuée sur ce milieu.

... décoction de péricarpe de cabosse de cacaoyer.

On utilise des cabosses de Cacaoyer Amelonado. Le milieu de culture est composé de 150 grammes de fragments de péricarpe (poids frais) passés au mixer et de 20 grammes de glucose par litre de milieu. La croissance du champignon est assez lente mais on arrive à un bon remplissage du milieu de culture par les filaments mycéliens immergés. Le milieu est de couleur brun foncé ce qui est sans doute dû à l'oxydation des tannins de la cabosse au moment de la préparation.

Les dosages ont montré la présence de PME quoique en quantités moindres que dans l'essai précédent.

... milieu de Czapeck + solution d'oligoéléments de Berthelot + différents glucides.

----- avec 20 grammes par litre de glucose :
on note une croissance faible du champignon avec seulement du mycelium immergé.
Traces de PME.

----- avec 20 grammes par litre d'amidon :
comme précédemment on note une croissance lente avec du mycelium immergé et parfois de rares filaments aériens.
Traces de PME.

----- avec 20 grammes/litre de saccharose :
Croissance faible également avec mycelium immergé.
Traces de PME.

... apport de facteurs de croissance.

On a utilisé le milieu de Czapeck + solution de Berthelot

.../...

utilisé ci-dessus avec le glucose comme source de carbone

Les essais ont porté sur :

- le lait de coco à 20 %
- une solution commerciale de vitamines. La dose standard correspond à l'apport suivant :

Vitamine B I : 10^{-7}
Vitamine B 2 : $0,75 \cdot 10^{-7}$
Vitamine B 6 : 10^{-7}
Vitamine C : $2,5 \cdot 10^{-6}$
Vitamine E : 10^{-7}
Nicotineamide : $5 \cdot 10^{-7}$
Panthoténate de calcium : $2 \cdot 10^{-7}$
Vitamine A : 250 U.I.
Vitamine D 2 : 50 U.I.

Résultats :

- avec le lait de coco :

on note une bonne croissance du champignon ; après 5 à 6 jours le milieu de culture est entièrement rempli de mycelium immergé et les filaments aériens apparaissent.

La croissance est cependant inférieure à celle obtenue sur milieu pomme de terre.

On a obtenu des résultats positifs en ce qui concerne la production de PME.

- avec apport de vitamines :

On a essayé les concentrations suivantes : 1,3 et 8 fois la dose standard. La croissance du parasite a lieu sur tous ces milieux, quoique là aussi inférieure à celle obtenue sur milieu pomme de terre.

On note des résultats positifs en ce qui concerne la présence de PME.

Conclusion sur ces différents essais.

Il semble donc que la production de PME ait lieu sur de nombreux milieux, son importance étant liée à la bonne croissance du champignon dans le milieu.

.../...

de culture. Ainsi sur milieu pomme de terre elle s'avère en général la meilleure de même que tous les milieux essayés, c'est celui où le développement du Phytophthora palmivora est le plus rapide et le plus abondant.

b) production enzymatique en fonction de l'âge des cultures.

Les essais ont été effectués sur milieu pomme de terre. Le dosage effectué au bout de 24 heures sur le mélange de 40 cm³ de filtrat et 50 cm³ de pectine à 1 %, à 28° C, a donné les résultats suivants (moyenne de 10 à 15 dosages) :

âge de la culture	milligrammes de méthanol libérés par les 40 cm ³ de filtrat.
3 jours	2,1
7 jours	3,2
13 jours	4,5
21 jours	4,8
1 mois	4,8
1 mois et demi	5,4

On a donc une augmentation assez rapide jusqu'à 13 jours, ensuite beaucoup plus lente.

c) surface de la culture.

On a constaté chez certains champignons que la surface de la culture jouait un rôle dans certaines productions enzymatiques, ce qui est sans doute lié à l'aération.

On a voulu voir si cette action avait lieu pour la production de PME. 3 milieux de culture ont été mis à l'épreuve :

- milieu pomme de terre
- milieu de Czapeck + lait de coco
- milieu de Czapeck + 8 doses standard de vitamines

On a comparé des séries réalisées en boîtes de Roux contenant 200 cm³ de milieu (surface approximative de la culture : 210 cm²) et en Erlenmeyers contenant la même quantité de milieu (surface approximative de la culture 80 cm²). On n'a pas noté de différences entre les 2 modes de culture.

2 - FACTEURS EXTRINSEQUES AGISSANT SUR LA PRODUCTION ENZYMATIQUE

a) température optima de production de PME

Les cultures sont faites en boîte de Roux sur milieu pomme de terre.

Les dosages sont effectués au bout de 3 semaines à 1 mois. Les températures suivantes ont été testées :

- 15 à 18°
- 23 à 25°
- 28°
- 30°
- 34°

Les résultats (moyenne d'une dizaine de séries) ont porté sur un mélange de 40 cm³ de filtrat et 50 cm³ de pectine I %.

Température	mg - de méthanol libérés par les 40 cc de filtrat
15 à 18°	2,4
23 à 25°	4,5
28°	4,7
30°	4,3
34°	2,3

Comparaison avec la vitesse de croissance en boîtes de Petri :

Des boîtes de Petri préparées avec le même milieu que ci-dessus, mais gélosé à 20 g/l, ont étéensemencées.

De façon à avoir un ensemencement standard, on utilise un emporte pièce découpant des petits cylindres inoculum d'environ 4 mm de diamètre et 6 mm de hauteur.

Le diamètre moyen de la colonie de Phytophthora palmivora est mesuré au bout de 3 jours.

Les résultats sont exprimés en millimètre (moyenne de 20 boîtes)

.../...

Les températures suivantes ont été testées :

- 24 à 26°
- 28°
- 30°
- 32°

Résultats :

Température	Diamètre moyen en mm.
24 à 26°	55
28°	62
30°	66
32°	59

Il semble donc que les optima de production enzymatique et de vitesse de croissance se situent approximativement dans les mêmes zones.

b) pH optimum de production de PME

La croissance du champignon sur des milieux tamponnés, en particulier ceux donnant un pH bas comme le mélange acide acétique acetate de sodium, s'est révélée assez mauvaise. A la lumière des essais, il semble cependant que l'optimum de production enzymatique se situerait entre les pH 5 et 7.

D - REACTION ENZYMATIQUE

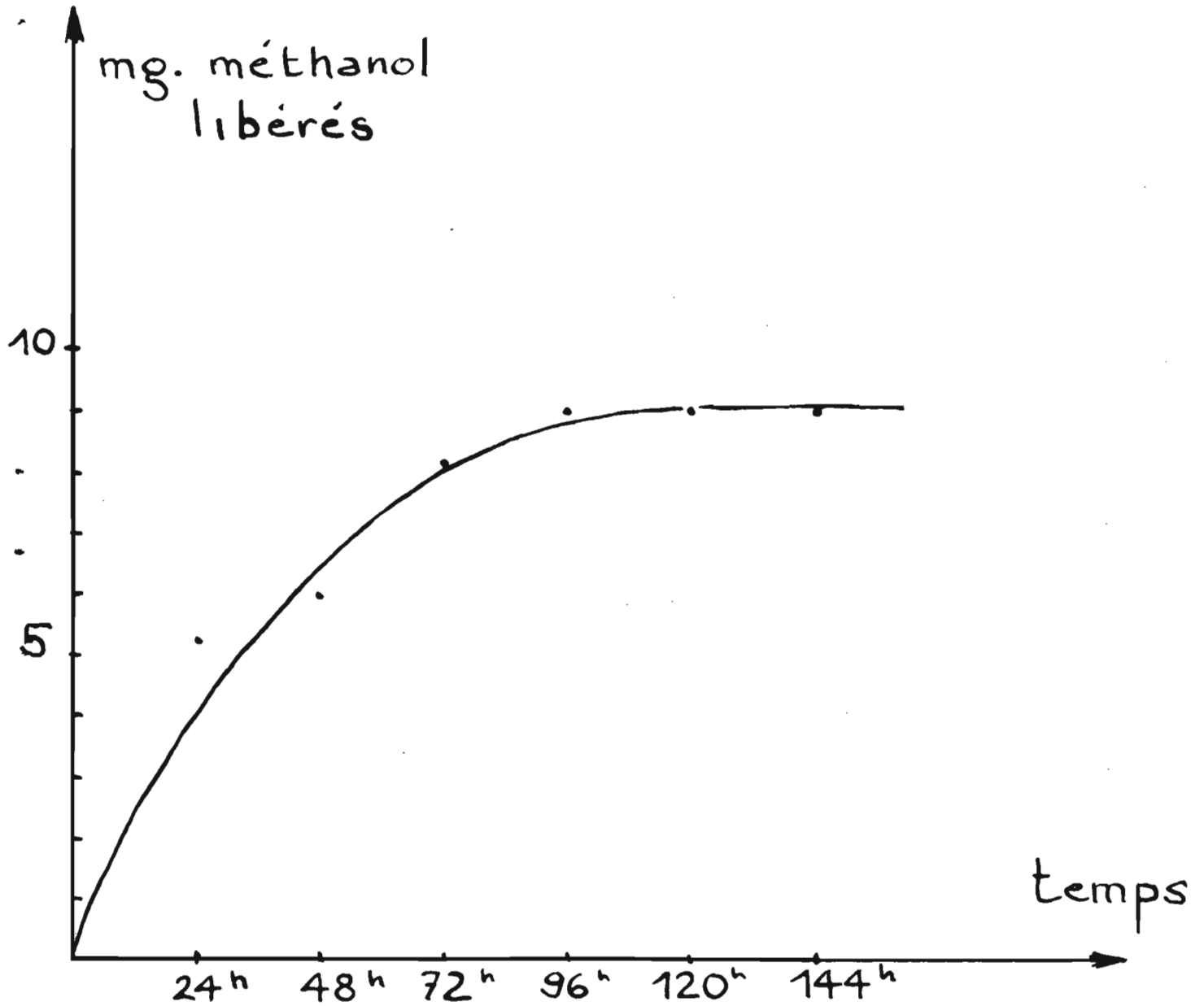
I - Vitesse de réaction.

Essai I

On a mélangé une quantité importante de filtrat (50 cm³) par rapport à une faible quantité de pectine (10 m³) à pH voisin de 6. Le tout est porté à l'étuve à 40° C. L'examen des résultats est effectué toutes les 24 h. La moyenne de 2 séries de dosages a donné les résultats suivants.

.../...

VITESSE DE REACTION



temps	milligrammes de méthanol libérés
24 h	5,3
48 h	6,0
72 h	8,2
96 h	9,0
120 h	9,0
144 h	9,0

(Voir graphique joint)

Essai 2

On a voulu voir si la réaction enzymatique était capable de se poursuivre pendant des temps plus longs.

On a mélangé une quantité importante de pectine à pH voisin de 4,5 (50 cm³) par rapport à une faible quantité de filtrat (5 cm³) à 28° C. La moyenne de 5 essais a donné les résultats suivants :

temps	milligrammes de méthanol libérés
24 h	0,8
90 h	1,9
120 h	2,2
144 h	2,5
168 h	2,8

Essai 3

On a voulu voir l'influence relative des quantités de filtrat et de pectine sur la vitesse de réaction.

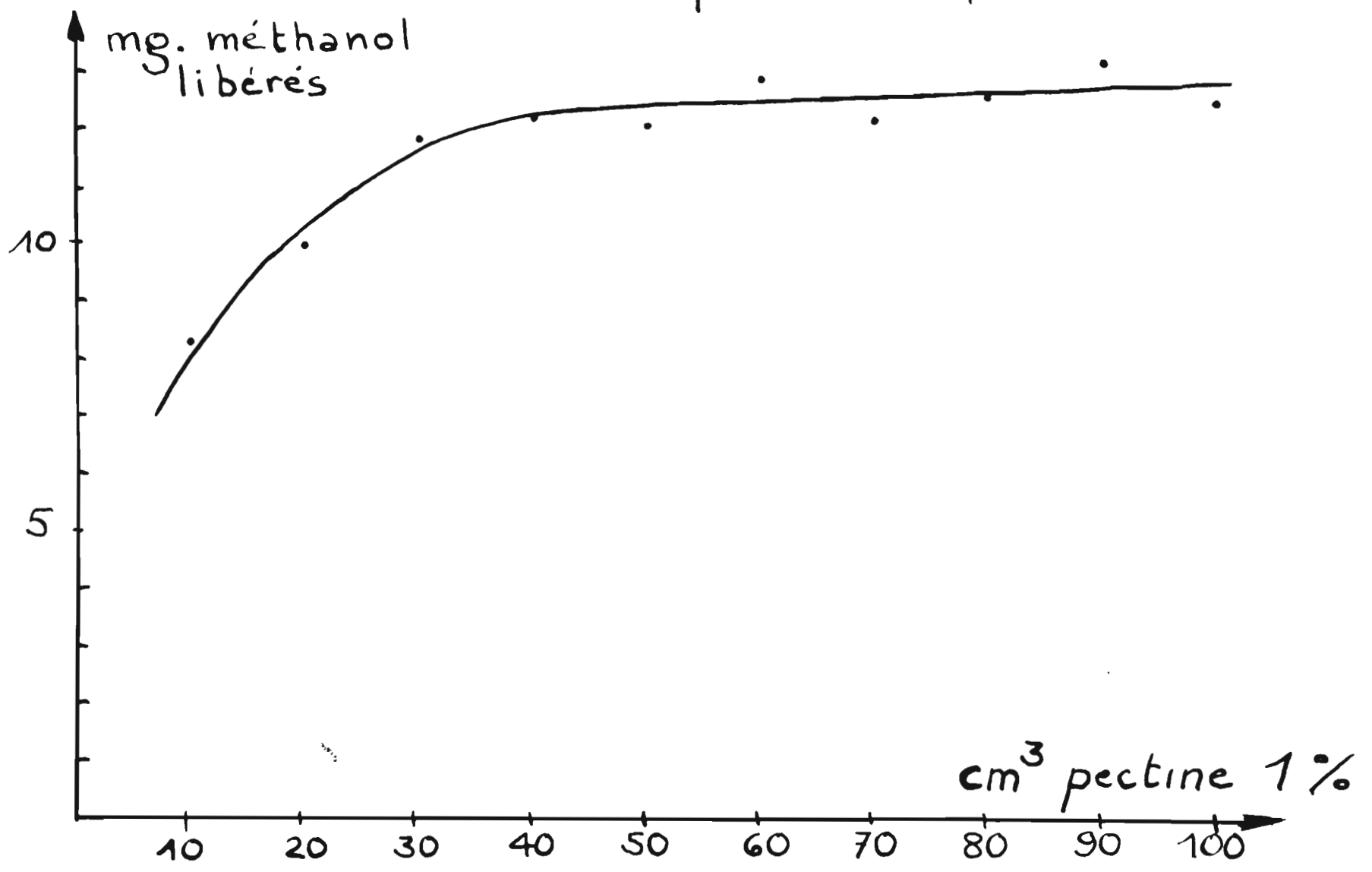
.. quantités croissantes de filtrat :

A une même quantité de pectine à pH 4,5 (50 cm³), on ajoute des quantités variables de filtrat de culture. Avec du tampon acide acétique-acétate de sodium, chaque fiole d'essai à un volume constant de façon à opérer dans les mêmes conditions. L'examen des résultats a lieu au bout de 24 h à 28° C.

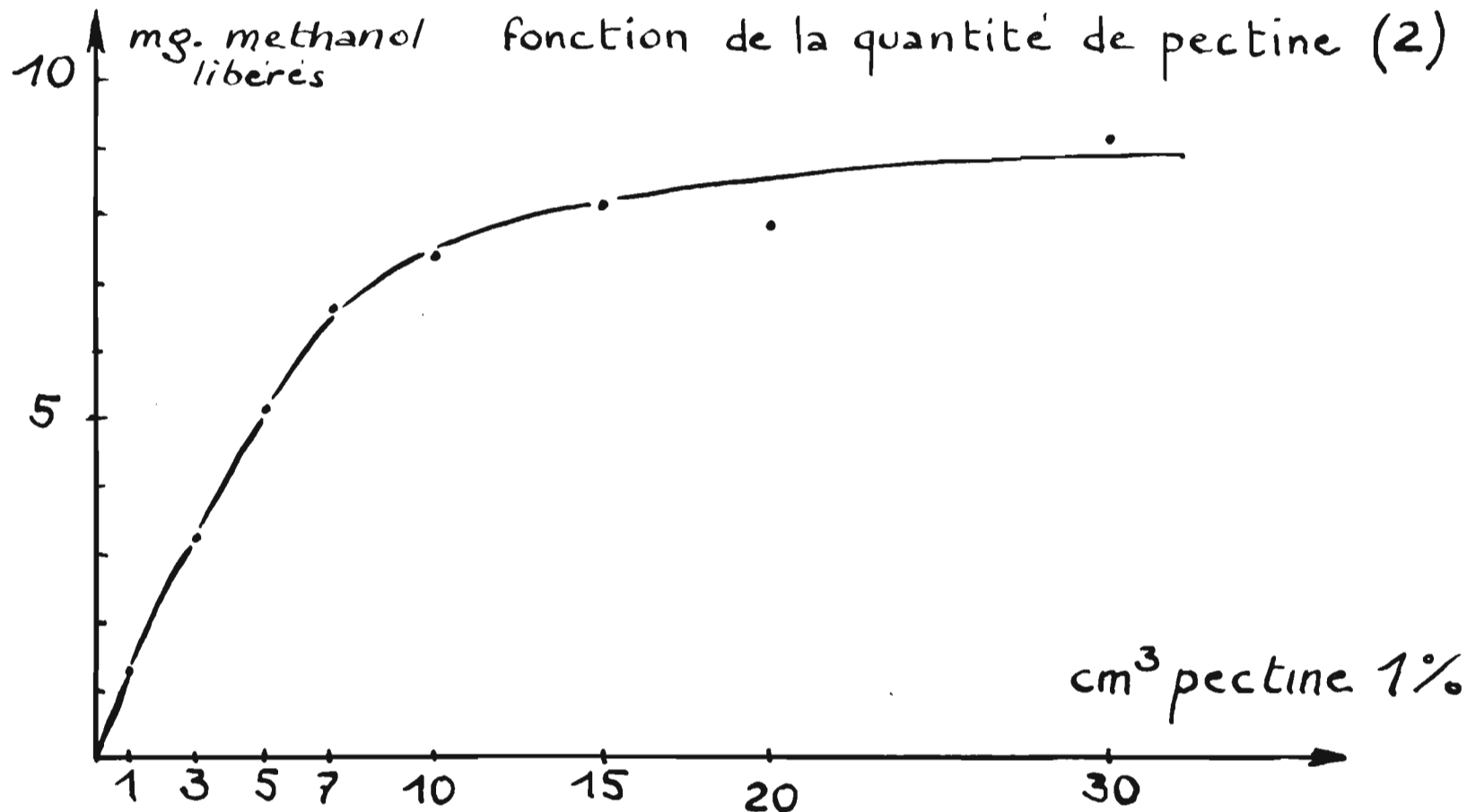
..../....

VITESSE de REACTION

fonction de la quantité de pectine (1)



VITESSE DE REACTION



Moyenne de 3 séries

cm ³ filtrat	cm ³ tampon à pH 4,5	mg méthanol libérés
100	0	9,8
75	25	9,0
60	40	8,3
50	50	8,0
40	60	6,4
30	70	5,1
20	80	3,8
10	90	1,6

Moyenne de 3 séries

cm ³ filtrat	cm ³ tampon à pH 4,5	mg méthanol libérés
200	0	10,3
150	50	10,8
100	100	8,9
50	150	5,0
25	175	2,9

(voir graphiques joints)

... quantités croissantes de substrat

A une même quantité de filtrat (50 cm³) on ajoute des quantités croissantes d'une solution de pectine à pH 4,5 en complétant à volume constant et en opérant dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Moyenne de 5 séries

cm ³ pectine I %	cm ³ tampon à pH 4,5	mg méthanol libérés
100	0	12,5
90	10	13,2
80	20	12,6
70	30	12,2
60	40	12,9
50	50	12,1
40	60	12,2
30	70	11,9
20	80	10,0
10	90	8,3

Moyenne de 8 séries

cm ³ pectine I %	cm ³ tampon à pH 4,5	mg méthanol libérés
30	0	9,1
20	10	7,8
15	15	8,1
10	20	7,4
7	23	6,6
5	25	5,1
3	27	3,2
1	29	1,3

(Voir graphiques joints)

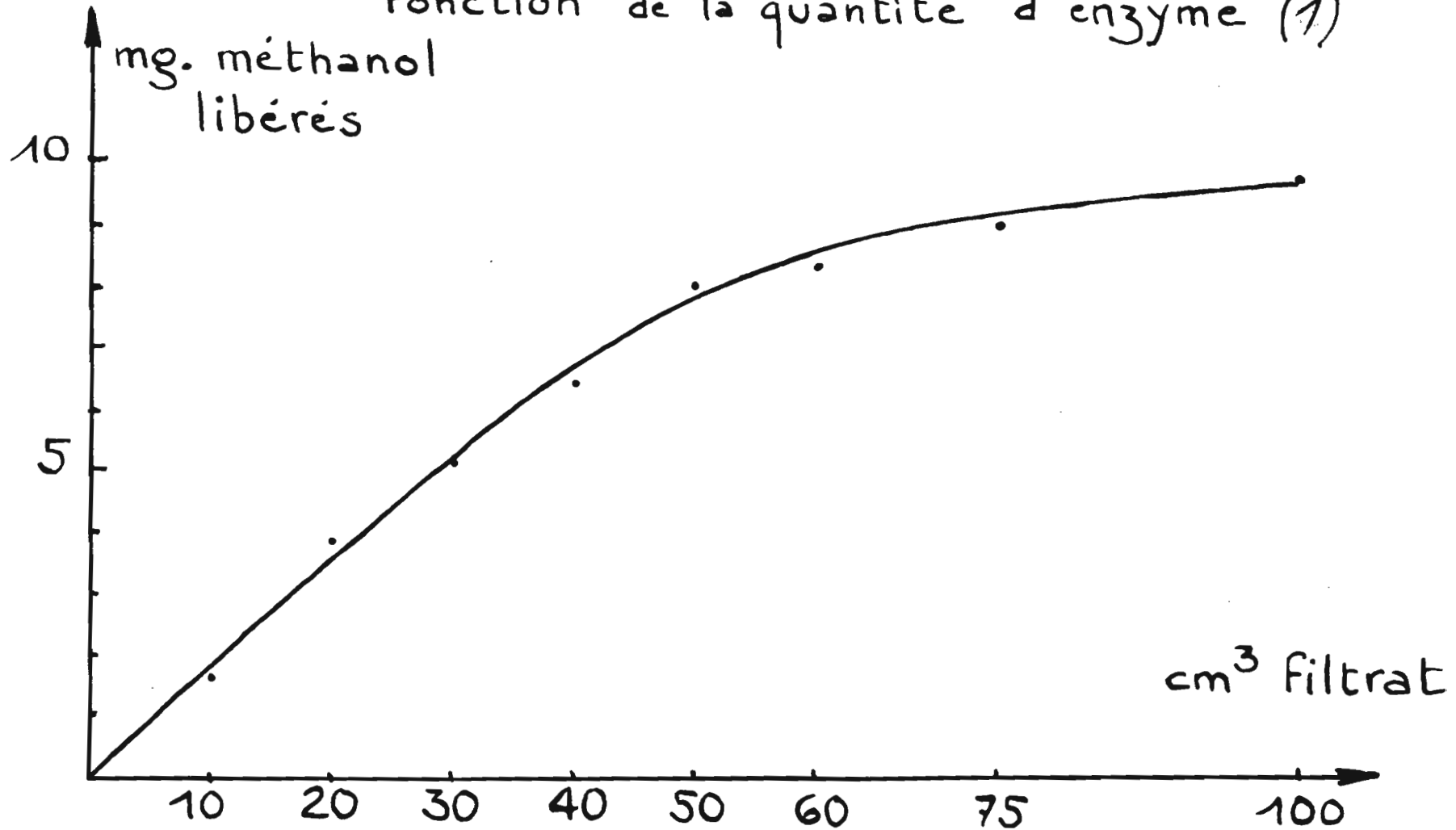
Conclusion sur ces essais :

L'examen des résultats des 3 séries d'essais montre que l'on a affaire à une réaction enzymatique lente. L'obtention de l'asymptote de la courbe relative à la vitesse de réaction dépend évidemment des proportions relatives d'enzyme et de substrat en présence comme le montre l'essai 3, mais en présence de peu de filtrat de culture par rapport à une quantité importante de substrat, la réaction

.../...

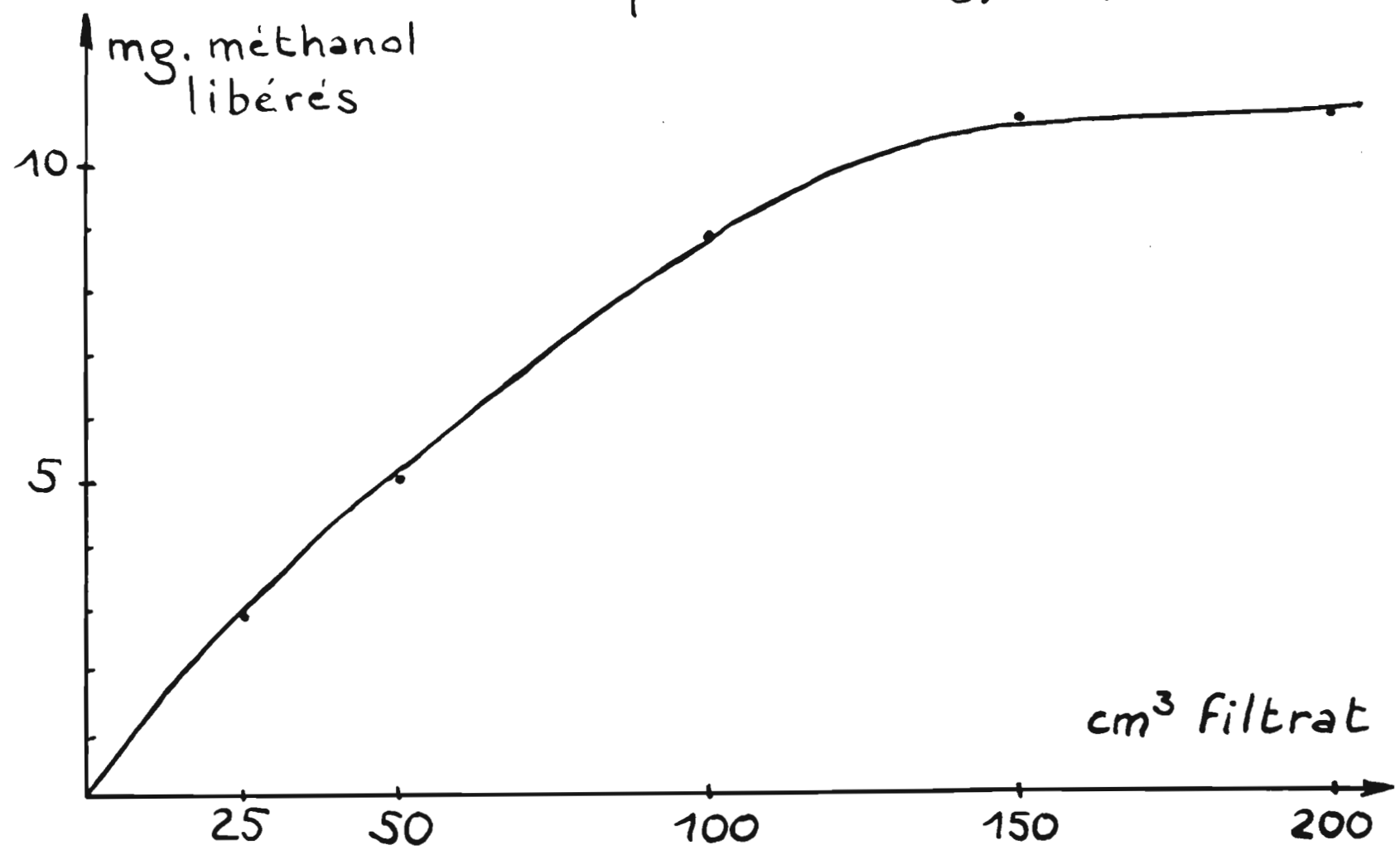
VITESSE DE REACTION

Fonction de la quantité d'enzyme (1)



VITESSE DE REACTION

fonction de la quantité d'enzyme (2)



peut se poursuivre très longtemps comme le montre l'essai 2. Par contre l'essai I montre qu'en opérant dans de bonnes conditions de température et de pH (voir plus loin) et avec des quantités importantes de filtrat par rapport à la pectine, on arrive à l'asymptote de la courbe représentant la vitesse de réaction au bout de 72 à 96 h.

2 - Température optima de réaction.

Les essais ont porté sur 4 températures : 25° - 40° - 60° - 80° - L'examen des résultats effectué au bout de 24 h sur le mélange 40 cm³ de filtrat et 50 cm³ de solution de pectine à pH 4,5 a donné :

(moyenne de 3 séries d'essais)

température	mg de méthanol libérés
25°	3,2
40°	4,4
60°	traces
80°	0

3 - pH optimum de réaction

a) pH de 3,2 à 6,0

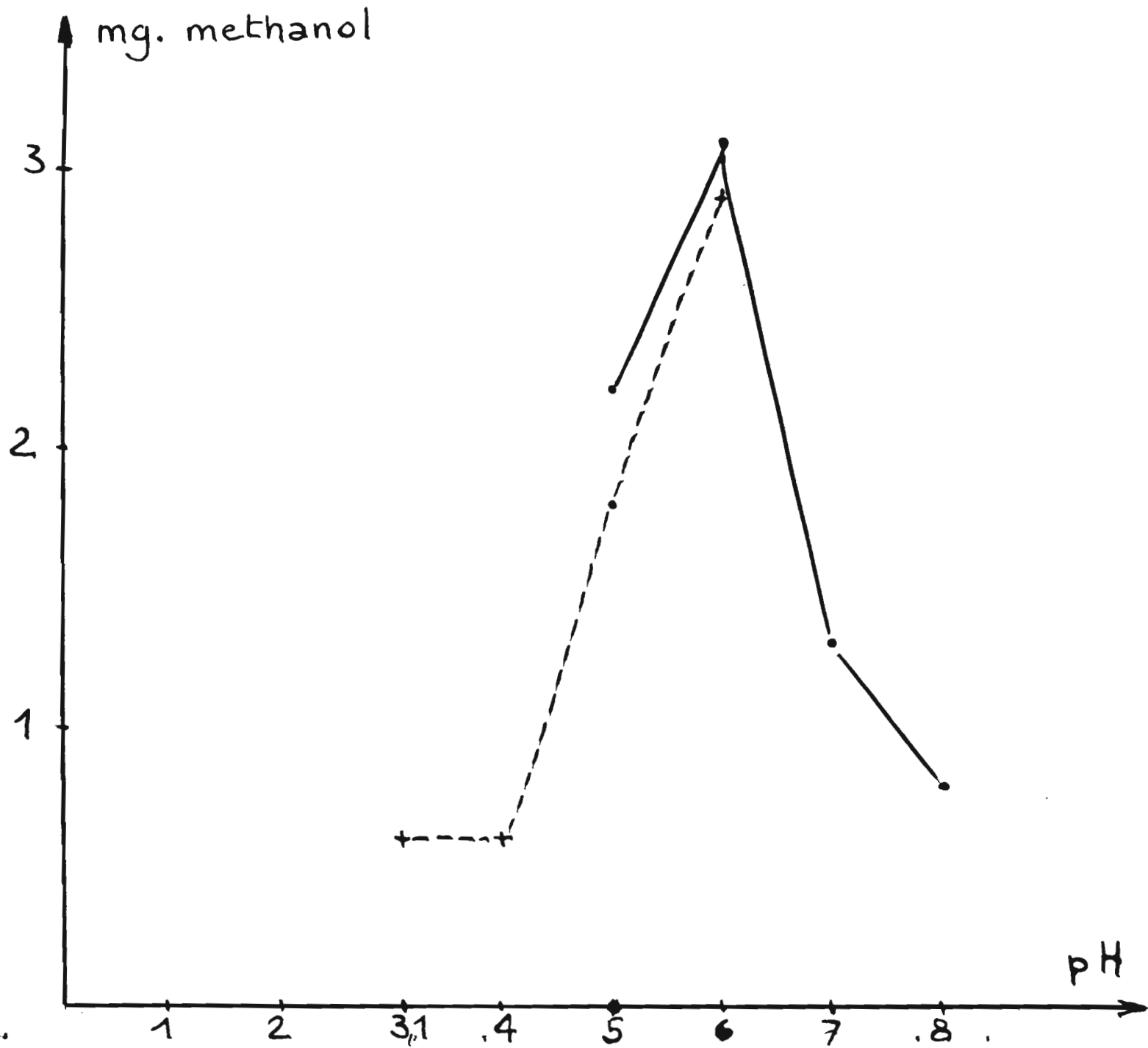
On a utilisé des solutions de pectine à 1 % tamponnées avec le tampon acide acétique acétate de sodium de façon à avoir les pH suivants : 3,2 - 4,0 - 5,0 - 6,0 -

On a utilisé 5 cm³ de filtrat et 50 cm³ de pectine ; examen des résultats au bout de 24 h.

(moyenne de 4 séries)

pH	mg de méthanol libérés
3,2	0,6
4,0	0,6
5,0	1,8
6,0	2,9

.../...



b) pH de 5,0 à 8,0

On a utilisé des solutions de pectine tamponnées avec le tampon phosphate monopotassique-phosphate disodique de façon à obtenir la gamme suivante :

5,0 - 6,0 - 7,0 - 8,0 -

même protocole que ci-dessus

(moyenne de 4 séries)

pH	mg de méthanol libérés
5,0	2,2
6,0	3,1
7,0	1,4
8,0	0,8

Il semble donc que l'optimum de réaction se situe aux environs de pH 6 (voir graphique joint).

E - ESSAI DE MISE EN EVIDENCE DE PME DANS LA CABOSSE ATTEINTE

Des fragments de péricarpe de cabosses de cacaoyer atteints de pourriture brune, prélevés au niveau de la zone de progression du parasite ont été broyés dans l'eau distillée et mélangés à des solutions de pectine.

Le dosage est effectué comme de coutume au bout de 24 heures n'a pas permis de mettre en évidence l'activité enzymatique.

F - ACTION DES FILTRATS DE CULTURE SUR LA CABOSSE

Des fragments de péricarpe de cabosses de cacaoyer Amélonado ont été broyés ou mixer dans de l'eau distillée. On filtre grossièrement à travers de la gaze et ces broyats sont mélangés avec des filtrats de culture du champignon.

On a pu obtenir des résultats positifs, quoique l'acidification obtenue soit très faible avec des broyats concentrés (50 à 100 g de poids frais pour 500 cm³ d'eau distillée) et avec des quantités de filtrats de l'ordre de 70 à 100 cm³.

.../...

C - CONCLUSION GENERALE

Ces essais montrent la présence et les propriétés de la PME exocellulaire produite par le Phytophthora palmivora "In vitro". Comme on l'a vu, il n'a pas été possible d'en mettre en évidence "In vivo" dans les cabosses de cacaoyer atteintes de pourriture brune. Cependant il est très probable que la PME joue cependant un rôle dans les processus d'infection comme cela se passe chez de nombreux autres parasites. Des essais qualitatifs ont également montré la présence de polygalacturonase. (Cette question est étudiée actuellement par le laboratoire spécialisé de l'O R S T O M). Le Phytophthora palmivora semble donc bien équipé pour assurer la désagrégation des membranes cellulaires des tissus de la cabosse dans la composition desquelles les substances pectiques jouent un rôle important. La présence éventuelle d'autres enzymes chez le champignon devra être étudiée, car la connaissance des moyens d'action du parasite est nécessaire pour les études sur la résistance des cacaoyers à la pourriture brune études qui sont actuellement en cours au laboratoire de Phytopathologie de l'I F C C en Côte d'Ivoire.

BIBLIOGRAPHIE

I - BATEMAN D.F.

Pectolytic activities of culture filtrates of Rhizoctonia solani and extracts of Rhizonia infected tissues of bean

Phytopath. 53 2 p. 197-204 fev. 1963

2 - BARKER K. R.. WALKER J.C.

Relationship of pectolytic and cellulytic enzyme production by strains of Pellicularia filamentosa

Phytopath. 52 II p. III9-25 nov. 1962

3 - BROWN. WILLIAM

Studies in the physiology of parasitism

I - the action of Botrytis cinerea

Ann. Bot. 29 p. 313-48 1915

4 - DEESE D.C..STAHMANN M.A.

Formation of pectic enzymes by Verticillium albo-atrum on susceptible and resistant tomato stem tissues on wheat bran

Phytopath. Z. 46 I p. 53-70 1962

5 - DEESE D.C..STAHMANN M.A.

Pectic enzymes in Fusarium infected susceptible and resistant tomato plants

Phytopath. 52 3 p. 255-60 1962

6 - DEESE D.C..STAHMANN M.A.

Pectic enzymes and cellulase formation by Fusarium oxysporum f. cubense on stem tissues from susceptible and resistant banana plants

Phytopath. 52 p. 247-55 1962

7 - DEESE D.C..STAHMANN M.A.

Wilt resistance in Tomatoes. Pectic enzyme formation by Fusarium oxysporum f. lycopersici on susceptible and resistant tomato stems.

J. Agric. food chem. USA 10 2 p. 145-50 1962

8 - EICHANDI E..WALKER J.C.

Pectolytic enzymes produced by Sclerotinia sclerotiorum

Phytopath. 47 p. 303-306 1957

.../...

- 9 - HANCOCK J.G.MILLAR R.L..LORBEER J.W.
pectic and cellulolytic enzymes involved in Botrytis leaf spot of onion
Abstr. in Phytopath. 52 8 p. 735 1962
- 10 - HANCOCK J.G..MILLAR R.L..LORBEER J.W.
Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by Botrytis allii, Botrytis cinerea and Botrytis squamosa in vitro and in vivo
Phytopath. 54 8 p. 928-31 Août 1964
- 11 - HANCOCK J.G..MILLAR R.L..LORBEER J.W.
Role of pectolytic and cellulolytic enzymes in Botrytis leaf blight of onion
Phytopath. 54 8 p. 932-35 1964
- 12 - HANCOCK J G.MILLAR R.L.
Pectolytic and cellulolytic enzyme production by Colletotrichum trifolii
Abstr in Phytopath. 53 8 p. 877 Août 1963
- 13 - LEAL J.A..VILLANUEVA J.R.
Lack of pectic enzyme production by non pathogenic species of Verticillium
Nature Lond. 195 4848 P 1328-29 1962
- 14 - MAC DONNELL K.
Relationship of pectic enzymes and pathogenicity in the Fusarium wilt of tomatoes
Trans. Brit. Mycol. Soc. 45 1 p. 55-62 1962
- 15 - MATTA A..DIMMOND A.E.
Symptoms of Fusarium wilt in relation to quantity of fungus and enzyme activity in tomato stems
Phytopath. 52 5 p. 574-78 1953
- 16 - MANN Brenda
Role of pectic enzymes in the Fusarium wilt syndrome of tomato
Trans. Brit. Mycol. Soc. 45 2 p. 169-78 1962
- 17 - SINGH G.P..AKHTAR H.
Relation of hydrolytic enzyme activity with the virulence of strains of Colletotrichum falcatum
Phytopath. 54 9 p. 1100-1101 Sept 1964
- 18 - SINGH G.P..AKHTAR H
Production of pectic and cellulolytic enzymes by arhar wilt fungus
Curr. Sci. India 31 3 p. 110-112 1962

.../...

- 19 - SINGH K.K..WOOD R.K.S.
 Studies in the physiology of parasitism.
 XXI . the production and properties of pectic enzymes secreted by
Fusarium moniliforme
 Ann. Bot. N S 20 p. 89-103 1956
- 20 - SPALDING D.H.
 Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by Rhizopus stolonifer
 Phytopath. 53 8 p. 929-31 1963
- 21 - SPENCE J.A.
 Probable mechanism of resistance of varieties of cocoa to black pod disease
 caused by Phytophthora palmivora
 Nature Lond. 192 4799 P. 278 1961
- 22 - WAGGONER P. E. DIMMOND A.E.
 Production and role of extracellular pectic enzymes of Fusarium oxysporum
f. lycopersici
 Phytopath. 45 p. 79-87 1955
- 23 - WALLACE J..KUC J..WILLIAMS E.B.
 Production of extracellular enzymes by four pathogens of apple fruit
 Phytopath. 52 10 p. 1004-1009 1962
- 24 - WINSTEAD N.N..MAC COMBS C.L.
 Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by cucurbit
 anthracnose fungi.
 Phytopath. 53 8 p. 961-64 1963
- 25 - WINSTEAD N.N..MAC COMBS C.L.
 Pectinolytic and cellulolytic enzymes production by Pythium aphanidermatum
 Phytopath. 51 5 p. 270-73 1961
- 26 - WINSTEAD N.N..WALKER J.C.
 Production of vascular browning by metabolites from several pathogens
 Phytopath. 44 3 p. 153 1954

.../...

27 - WOOD ; GUPTA

Studies in the physiology of parasitism

XXVI : properties of the pectic enzymes secreted by Pythium de Baryanum

Ann. Bot. N S 22 p. 399

28 - YOUSSEF Y.A.

The production of pectic and cellulolytic enzymes and their role in the development of myrothecium root rot of kidney bean

Phytopath. Z. 46 I p. II-16 1962