

Les supports biochimiques de la sensibilité et de la résistance du Cacaoyer à *Phytophthora palmivora*.

Orientation des recherches au Cameroun

G. BLAHA

Phytopathologiste IFCC-Cameroun

Disposant de nombreuses variétés de cacaoyers et ayant déterminé pour la plupart d'entre elles à la fois leur vulnérabilité épidermique et leur sensibilité interne à *Phytophthora palmivora*, il nous a été possible d'entreprendre une analyse biochimique fine axée sur la recherche des supports de la sensibilité et de la résistance.

I. PROGRAMME DE TRAVAIL

Ce programme est établi en fonction des travaux déjà réalisés ou en cours [3], [4], [6]. Tous ces travaux faisant état du rôle possible des polyphénols dans la résistance à *P. palmivora*, notre programme prévoit donc :

1) Une détermination des polyphénols présents tant dans les cabosses sensibles que dans les cabosses de type résistant, ceci aussi bien à l'état sain qu'à l'état parasité ;

2) Un complément à cette étude de base par une étude des précurseurs des polyphénols en particulier au niveau acides organiques et acides aminés. Cette étude complémentaire implique, non plus l'étude de cabosses en voie de maladie comme le nécessite surtout la première phase mais essentiellement une étude des cabosses à l'état sain.

En définitive, nos analyses ont débuté par l'étude des cortex sains et ce n'est que dans un deuxième temps que nous prévoyons l'étude des cortex en voie de pourrissement.

II. TRAVAUX EN COURS : ÉTUDES ANALYTIQUES DES CORTEX SAINS

CHOIX DU MATÉRIEL CLONAL

En fonction de leur réaction propre à la maladie, les clones retenus ont été les suivants :

- résistants : SNK 32, ICS 84 et SNK 64
- moyennement sensible : SNL 37
- très sensibles : ICS 40, SNK 10 et SNK 344

Les cabosses sont de taille adulte mais encore immatures.

MODALITÉ DES PRÉLÈVEMENTS

Afin de tenir compte d'observations faites lors des tests de sensibilité [7] ou lors du processus de pénétration du champignon [8], les prélèvements intéressent trois zones distinctes du cortex et selon des quantités de matière fraîche toujours les mêmes quelque soit l'étude envisagée, polyphénols ou précurseurs :

Epiderme :	5 g
Sous-épiderme (ou épicarpe) :	10 g
Mésoderme (ou endocarpe) :	10 g

Les prélèvements d'épiderme se font soit à l'épluche légumes (cortex lisse) soit par grattage à l'aide d'une lame de rasoir (cortex verruqueux). Un prélèvement supplémentaire est chaque fois effectué pour permettre d'évaluer par poids secs, la teneur en eau des tissus au moment de leur prélèvement.

MÉTHODES UTILISÉES POUR L'ÉTUDE DES POLYPHÉNOLS

a. Fixation et extraction

La fixation et les extractions successives sont menées à froid dans des bains eau-glace et sous agitation magnétique. On a utilisé soit du *méthanol pur* (méthode classique) soit de l'*éthanol*. Avec ce dernier solvant, les fixations ont lieu dans l'éthanol à 95° G.L. et les épuisements successifs dans l'éthanol à 90° (2 fois) et à 80° G.L. (3 fois).

Que les opérations se fassent avec le méthanol ou avec l'éthanol, on filtre chaque fois et on réunit les alcoolatures d'un même échantillon que l'on stocke au congélateur à -10° C (durée des opérations : 8 heures).

b. Fractionnement de l'extrait hydroalcoolique

Les alcoolatures sont concentrées sous vide à l'évaporateur rotatif et à une température ne dépassant pas 32° C. On procède ensuite sur l'extrait hydroalcoolique à une délipidation par l'éther de pétrole puis on ajuste l'extrait à un volume connu (100 ml). On le fractionne alors en 4 lots de volume semblable (25 ml). Chaque lot est destiné à une étude bien précise :

— le lot n° 1 constitue l'extrait brut et est surtout destiné à un dosage des polyphénols totaux ;

— le lot n° 2 est purifié par extractions successives par des solvants non miscibles ;

— le lot n° 3 subit une hydrolyse acide et est ensuite purifié comme le lot n° 2 ;

— le lot n° 4 subit une hydrolyse alcaline et est ensuite purifié comme les lots n° 2 et 3.

c. Opérations de purification

Les lots 2, 3 et 4 permettent une identification de polyphénols et de leurs aglycones. Les opérations de purification que l'on entreprend sur chacun d'eux et qui, rappelons-le, sont semblables, sont les suivantes :

- 1^{re} purification à l'éther éthylique
- 2^e purification à l'alcool isoamylique
- 3^e purification à l'acétate d'éthyle

Chaque phase qui en résulte : phase étherée, phase isoamylique, phase acétate et phase aqueuse restante fait ensuite l'objet de chromatographies sur papier Whatman n° 1 dans différents systèmes solvants :

- Butanolacétique
(butanol+acide acétique+eau dans les proportions 4.1.5.)
- Forestal
(acide acétique, eau, HCl 3.1.3.)
- Toluène
(toluène, acide acétique, eau 4.1.5.)
- Acétate d'éthyle
(acétate d'éthyle, acide formique, eau 10.2.3.)
- Acide acétique
(10% dans l'eau)

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES ORGANIQUES ET DES ACIDES AMINÉS

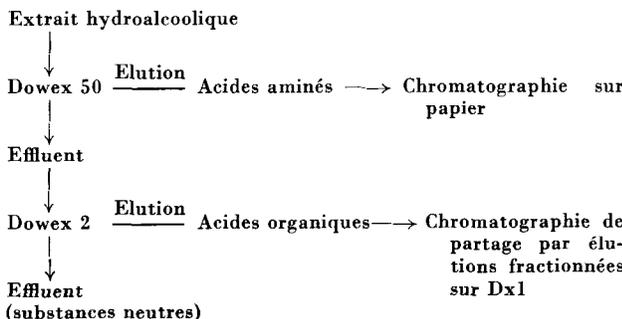
a. Fixation et extraction

La fixation et les extractions se font à froid dans des bains eau-glace et sous agitation magnétique. On utilise d'abord l'éthanol à 95° G.L. pour la fixation puis l'éthanol à 60° G.L. pour les épauements successifs.

Les alcoolatures d'un même échantillon sont réunies, concentrées sous vide, puis amenées à un volume connu.

b. Opérations de purification

Après délipidation de l'extrait par l'éther de pétrole on procède aux opérations de purification en utilisant des résines échangeuses d'ions telles la Dowex 50 fortement cationique et les Dowex 1 et 2 anioniques selon le schéma suivant :



III. ÉTAT ACTUEL DES RECHERCHES

Nous devons signaler qu'avec la phase isoamylique des lots n° 2 des 7 clones à l'étude, il apparaît et ceci seulement avec les extraits épidermiques éthanoli-ques, une substance dont la concentration semble reliée à la sensibilité du clone expérimenté : très peu visible après révélation avec les clones résistants SNK 32, ICS 84 et SNK 64, cette substance est beaucoup plus visible avec SNK 37 moyennement sensible, très visible ensuite avec ICS 40 et SNK 10. Elle atteint une coloration maximum avec SNK 344 (cf. figure).

Les solvants qui permettent sa séparation sont le butanol acétique et l'acétate d'éthyle.

Le rf moyen dans le butanol acétique est de 79,6 et dans l'acétate de 83,6.

Le révélateur utilisé a été le mélange vanilline-acide chlorhydrique et la coloration obtenue, jaune beige à brun.

En vue d'identifier cette substance, une trentaine de révélateurs ont été utilisés, 10 ont donné des réactions positives, dont :

- la vanilline à 1% dans l'éthanol à parties égales avec l'acide perchlorique aqueux à 3% → coloration bleue
- la vanilline à 1% dans PO₄H₃ aqueux à 50% → brun rouge
- le réactif de Dragendorff → marron
- le réactif de Mayer → jaune
- le réactif de Aciff → blanc sur fond rose violacé
- le nitrate d'argent ammoniacal → blanc sur fond brun

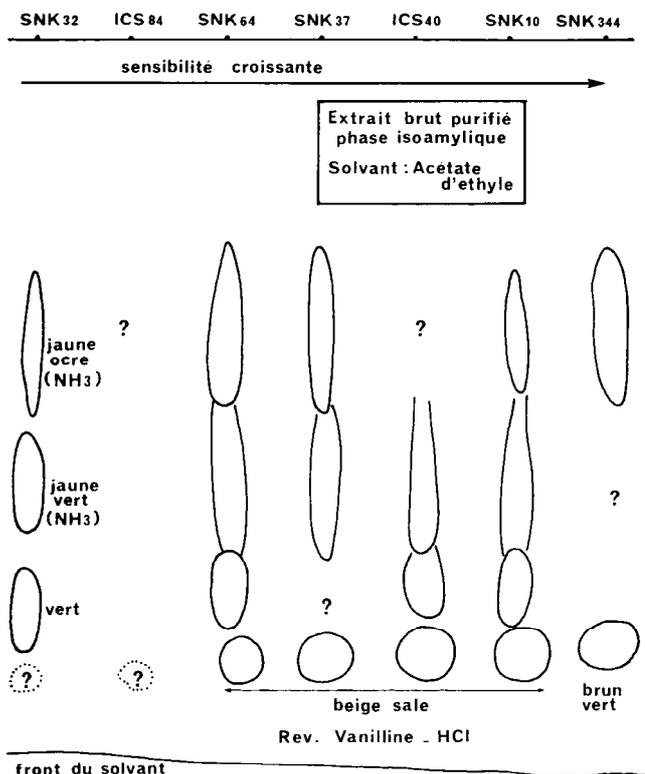
En fonction des révélateurs utilisés et de leurs spécificité, les seuls renseignements que l'on ait se résumant :

- 1) à la présence de liaisons insaturées types cétoniques ;
- 2) à la présence d'un groupement azoté.

Bien que, pour des raisons pratiques, nous ayons modifié quelque peu l'étude classique des polyphénols (en remplaçant notamment le méthanol par l'éthanol et en introduisant l'alcool isoamylique dans nos purifications [5], la phase isoamylique chromatographiée devait donner principalement des composés phénoliques du type anthocyanes et leucoanthocyanes peu polymérisés ressortant en rouge ou rose vif avec la vanilline chlorhydrique. La coloration différente beige à brune obtenue avec la substance en question nous fait exclure son appartenance à de tels phénols.

Les révélations positives obtenues par la suite en chromatographiant un des 7 clones seulement (ICS 40) assez bien fourni en cette substance nous a donné des couleurs spécifiques aux polyols, aux stérols, aux alcaloïdes, aux stéroïdes alcaloïdes et aux purines. Ce chevauchement outre des fonctions communes comme les groupements azotés laisserait supposer cependant un mélange de substances plutôt que la présence d'une substance pure. Ce qui est finalement presque certain les chromatographies ayant été réalisées dans une seule dimension. L'élu-tion des bandes de rf 83,6 de préparatives dans l'acétate d'éthyle et le tracé du spectre d'absorption aux U.V. de ces élu-tions ont fait

apparaître un pic important d'absorption à 220 m μ rappelant le λ maximum de l'acide β indol acétique mais les D.O. pour SNK 32, SNK 64, SNK 10 et SNK 344 font ressortir un classement différent de celui obtenu avec la vanilline chlorhydrique démontrant la non pureté des éluions des bandes de rf 83,6.



En définitive, les dosages et les identifications tant pour les phénols que pour les précurseurs du type acides organiques et acides aminés se poursuivent mais le Laboratoire de Phytopathologie de l'IFCC-Cameroun met l'accent sur les recherches concernant la substance mise en évidence. Des essais comparatifs entre clones de sensibilités distinctes sont en cours et des prélèvements importants d'épiderme ont été réalisés et sont en voie de purification afin de pouvoir disposer de quantité importante de matière.

Jusqu'à présent, en effet, les hypothèses concernant les supports biochimiques de la résistance reposaient sur l'existence de substances de nature phénolique inhibitrices donc présentes uniquement chez les résistants et induites semble-t-il au moment de la pénétration et de la toute première extension du parasite à l'intérieur de l'hôte [3]. La substance mise en évidence dans nos chromatographies repose le problème :

la sensibilité est-elle conférée dans la cabosse encore saine par une substance sensibilisante en quantité de plus en plus forte chez les clones de plus en plus sensibles à la pourriture brune ? S'agit-il d'une substance stimulante ou nécessaire au champignon pour sa croissance ? d'une substance favorisant les systèmes enzymatiques du champignon ? ou au contraire d'un précurseur de polyphénols élaborés en réponse à l'infection devenant toxiques pour la plante elle-même ?

ROCHA et JIMMENEZ au Brésil [78] ont bien montré par des dosages quantitatifs que ICS 40 sensible, une fois nécrosé avait beaucoup plus de phénols que les cabosses saines et SCA 6 résistant ne présentait lui, aucune différence entre saine et parasitée.

Quoi qu'il en soit la mise en évidence d'une telle substance dans 7 clones distincts en relation semble-t-il avec leur degré de sensibilité mérite une attention toute particulière : cette substance pourrait, en effet, servir de marqueur dans la recherche des cultivars résistants à la pourriture brune au Cameroun.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLAHA (G.) - 1971 - Etat d'avancement de la recherche de cacaoyers résistants au Cameroun. Première Réunion du sous-groupe de Travail Afrique sur *Phytophthora palmivora* à Yaoundé.
- [2] BLAHA (G.) - 1971 - Première approche de l'étude des facteurs de sensibilité par l'analyse biochimique du cortex. Première Réunion du sous-groupe de Travail Afrique sur *P. palmivora* à Yaoundé.
- [3] MEIFFREN (M.), TANGUY (J.) - 1967 - Sur le rôle des composés phénoliques au cours de l'infection des cabosses de *Theobroma cacao* L. par *P. palmivora* Butl. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 265, pp. 1131-1133, 16 octobre.
- [4] PRENDERGAST (W.N.E.) - 1965 - Studies in the resistance of *Theobroma cacao* L. to *P. palmivora* (Butl.) Butl. Thesis University of West Indies. Trinidad.
- [5] RIBEREAU-GAYON (P.) - 1968 - Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Ed. Paris.
- [6] ROCHA (H.M.), JIMENEZ (S.) - 1961 - Importancia de las sustancias polifenolicas en el mecanismo fisiologico de la resistencia de cacao (*Theobroma cacao* L.) a *P. palmivora* (Butl.) Butl. Turrialba 16 (4) : 319.
- [7] ROCHA (H.M.), MARIANO (A.H.) - 1967 - Selecao de cultivares de cacau resistentes a *P. palmivora* (Butl.) Butl. II^e Conférence Internationale sur les Recherches cacaoyères. Salvador-Itabuna-Bahia (Brésil), 9-25 nov.
- [8] TARJOT (M.) - 1971 - Etude anatomique de la cabosse de cacaoyer en relation avec l'attaque du *P. palmivora*. Communication n° 1. Première Réunion du sous-groupe de Travail Afrique sur *P. palmivora*, Yaoundé, 18-22 oct.