

Caractères distinctifs de quelques souches de *Phytophthora palmivora* au Cameroun

G. BLAHA

Phytopathologiste IFCC-Cameroun

I. COMPARAISON DE LA VITESSE DE DÉVELOPPEMENT SUR MILIEU V₈

On a suivi sur milieu V₈, le développement mycélien de quelques souches camerounaises récoltées dans 5 écologies différentes. On a donné à ces souches le nom de la localité la plus importante de la zone écologique envisagée :

- Ebolowa : zone cacaoyère typique du Sud-Cameroun (600 m d'altitude) ;
- Yaoundé : zone cacaoyère limite du Centre-Sud (700 m) ;
- Tiko : zone cacaoyère du Littoral-Ouest (0 m) ;
- Mbangha : zone cacaoyère du Nord-Ouest (115 m) ;
- Barombi-Kang : zone Nord-Ouest (175 m).

Ces souches récoltées sur des cabosses en cours de maladie sont doncensemencées en boîtes de Roux

sur milieu V₈ gélosé (150 ml de milieu par récipient) puis incubées à 22-25 °C en éclairage continu. Les répétitions varient selon les souches (de 30 à 130 données).

Nous rappelons rapidement la préparation du milieu V₈ standard :

Boîte de V₈ de la Campbell's Soups Co :

Felegara (Parma) Italia . . .	175 ml
Carbonate de calcium	3 g
Gélose (Purified Agar)	20 g
Eau distillée q.s.p.	1 000 ml

On mesure alors journalièrement l'extension de chaque culture durant une dizaine de jours. La progression journalière moyenne calculée entre le 4^e et le 7^e jour de culture aboutit au classement suivant par ordre de vitesse décroissante :

Souche	Tiko	Ebolowa (Nkoemvone)	Barombi-Kang	Yaoundé (Nkolbisson)	Ebolowa
Progression journalière moyenne (en mm/24 h)	16,67	15,82	14,04	13,82	12,98

Une analyse statistique montre que les deux premières souches Tiko et Ebolowa ne sont pas significativement différentes entre elles mais le sont vis-à-vis des autres, ces dernières n'étant pas significativement différentes entre elles.

Tiko-Ebolowa

Barombi-Kang-Yaoundé-Ebolowa

Il apparaît que ces deux groupements statistiques des souches en fonction de leur vitesse de croissance ne sont pas en relation avec la distribution écologique des souches étudiées. Ils ne semblent pas non plus reliés à un phénotype donné : le groupe le plus rapide comporte une souche de type Sauvage (Tiko) et une souche de type Mayombé (Ébolowa). Ces constatations

confirmeraient en quelque sorte l'hétérogénéité des populations au point de vue physiologique.

La mise en évidence assez fréquente sur un grand espace géographique des deux types de compatibilité dans les cacaoyères camerounaises [4], [10], expliquerait irréfutablement l'existence de ces races physiologiquement distinctes. Un autre exemple est celui donné par la variabilité de la pathogénie des souches à l'égard des cabosses d'un même matériel végétal : nos tests de sensibilité menés simultanément dans deux écologies différentes, Yaoundé et Ebolowa, avec les souches correspondantes du parasite [2] ont révélé des pouvoirs pathogènes nettement différents entre souches se traduisant par une vulnérabilité plus grande du matériel végétal et des progressions dans les cortex plus rapides avec la souche de Yaoundé qu'avec celle d'Ebolowa.

II. ÉTUDE SUR MILIEU V_8 STANDARD DE LA SPOROGÉNÈSE EN FONCTION DE LA SOUCHE ET DE L'ÂGE DES CULTURES

Deux des cinq souches précédentes ont été utilisées dans cette étude : celle de Yaoundé et celle d'Ebolowa.

Ces souches se caractérisent comme nous venons de le voir par des vitesses d'extension mycélienne différente sur le même milieu, celle d'Ebolowa étant plus rapide que celle de Yaoundé. Ces souches, rappelons-le, sont aussi très distinctes morphologiquement :

Yaoundé a un mycélium uniformément ras et peu visible.

Ebolowa, au contraire, présente un mycélium abondant avec un faciès en étoile semblable au type Mayombé [4].

Les cultures sont menées en tubes à essais sur 8 ml de V_8 standard gélosé toujours en éclairage continu à 22-25 °C (10 répétitions par souche).

On réalise à intervalle réguliers, au 10^e, 15^e et 20^e jour d'âge, des suspensions de zoospores qui sont calibrées à l'hématimètre. La préparation de la suspension est effectuée suivant le processus habituel à l'IFCC dans ses tests de sensibilité sur cabosses [2], [8], [9] : les cultures sont immergées dans de l'eau distillée stérile et fraîche (18°), puis raclées avec une baguette de verre ce qui détache le mycélium du substrat et le dilacère augmentant la surface mycélienne en contact avec l'eau. En 1 h 30 le nombre de zoospores libérées peut être considéré comme maximum et la suspension est calibrée à l'hématimètre.

Les comptages à l'hématimètre ont donné les résultats suivants :

Âges des cultures	Concentration en zoospores (par mm ³)	
	Yaoundé	Ebolowa
10 jours	200	50
15 jours	300	250
20 jours	200	100

Des différences apparaissent :

- 1) pour la même souche prise à des âges différents ;
- 2) pour les deux souches comparées au même âge.

1) Ainsi, avec la souche d'Ebolowa la production maximum de zoospores semble nettement se situer au 15^e jour de culture alors qu'avec Yaoundé, la production en zoospores est beaucoup plus homogène car pratiquement constante entre le 10^e et le 20^e jour de culture.

2) Quelque soit l'âge, Yaoundé demeure supérieur à Ebolowa notamment au 10^e jour de développement.

Cette aptitude différente à sporuler sur V_8 nous a incité à rechercher pour Ebolowa d'autres milieux que le V_8 : notre impératif, dans les tests de sensibilité sur cabosses, étant de disposer d'un milieu de culture favorable à la souche de *P. palmivora* (à utiliser dans

la zone écologique correspondante) nous permettant de disposer d'une source d'inoculum importante à base de zoospores. Après essais, le milieu PDA (20 z/mm³) et le milieu petit pois (10 z/mm³) ont été abandonnés. Seul le milieu à base de cortex de clones sensibles (ICS 40) s'est montré supérieur au V_8 standard (400 z/mm³).

III. INFLUENCE DE QUELQUES ÉLÉMENTS TROPHIQUES SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE ET LA SPOROGÉNÈSE

Nous avons poursuivi notre étude des souches de Yaoundé et d'Ebolowa en incluant dans le milieu nutritif standard V_8 , quelques éléments trophiques susceptibles de modifier la croissance et la sporogénèse de ces souches.

I. CONSTITUTION DES « MILIEUX »

Le milieu V_8 standard pris en tant que milieu de base reçoit diverses substances supplémentaires. Il en résulte une série de « milieux », caractérisés par la substance ajoutée et dont la liste est portée dans le tableau I. Après stérilisation à 118 °C pendant 20 minutes, les milieux gélosés sont répartis en tubes à essais à raison de 8 ml par tube.

TABLEAU I
 V_8 MODIFIÉ

Milieu de base	T
V_8 standard (= témoin) bouilli et filtré avant addition de gélose	T
<i>Éléments trophiques supplémentaires</i>	
— Polyols :	
Mannitol à 1%	Ma1
Mannitol à 2%	Ma2
Glycol à 1,5%	Gly
Adonitol à 0,2%	Ado
— Substances azotées simples :	
Asparagine 0,0132% d'azote	Asp
Alanine	Ala
— Substances azotées complexes :	
Bactopeptone Difco (0,25% d'azote)	Pep
— Vitamines :	
Complexes vitamiques de type B (Yeast Extract Oxoid) 0,4%	Y
Thiamine (vit. B ₁) 0,01%	Th
Vit. D ₂ * 200 000 U + 0,5 ml éthanol à 90°/100 ml de milieu V_8	1D ₂ A
Vit. D ₂ * 400 000 U + 1 ml éthanol à 90°/100 ml	2D ₂ A
Vit. D ₂ ** 200 000 U + 0,5 ml excipient huileux/100 ml	1D ₁ H
Vit. D ₂ ** 400 000 U + 1 ml excipient huileux/100 ml	2D ₂ H
Vit. A + Vit. 1D ₃ *** respectivement 500 000 U et 5 mg + 1,5 ml excipient huileux/100 ml	D ₃ H
— Associations :	
Asparagine + Thiamine	Asp + Th
Alanine + Thiamine	Ala + Th
Asparagine + Aniline + Thiamine	Asp + Ala + Th

* Sterogyl 15 « A » de Roussel.

** Sterogyl 15 « H » de Roussel.

*** Auxergyl de Roussel.

TABLEAU II

VITESSE D'EXTENSION SUR MILIEU V_8 MODIFIÉ DES DEUX SOUCHES CAMEROUNAISES, YAOUNDÉ ET ÉBOLOWA, ENTRE 4 ET 6 JOURS D'ÂGE (*)

Souche de Yaoundé.

1D ₃ H	1D ₃ H	2D ₂ H	Ado	Asp+Th	Y	Ala+Th	Asp+Ala+Th	Th	Gly	T	Ala	1D ₂ A	Asp	2D ₂ A	Pep
14,83	14,71	13,42	12,86	12,00	11,07	10,86	10,83	10,43	10,42	10,00	9,90	9,40	8,29	7,92	6,43

Souche d'Ebowa

1D ₃ H	2D ₂ H	1D ₂ H	Asp+Th	Ado	Ala+Thia	Th	T	Y	1D ₂ A	Asp+Ala+Th	Gly	Ala	Asp	2D ₂ A	Pep
16,21	14,50	13,58	12,75	12,64	11,88	11,64	11,62	11,50	11,05	10,64	10,42	9,81	8,56	8,56	7,35

Légende :

sens de progression journalière moyenne décroissante

fourchette de développements non significativement différents



(*) En collaboration avec la section biométrie de l'I.F.C.C. - Cameroun.

Après étalement et refroidissement, chaque tube est ensemencé en son centre par un disque mycélien de taille standard (5 mm de diamètre). Dix répétitions sont effectuées par milieu. Les cultures sont mises à incuber à 22-25 °C en éclairage continu.

2. MODIFICATION DE LA VITESSE DE DÉVELOPPEMENT

La progression journalière moyenne de chaque culture calculée entre le 4^e et le 6^e jour d'âge a permis de classer les milieux (cf. tabl. II).

Malgré les vitesses de progression qui varient selon la souche, les classements obtenus sont à peu près semblables, l'ordre de succession des milieux en fonction des vitesses d'extension des cultures est pratiquement le même. Le groupement statistique des vitesses qui ne sont pas significativement différentes entre elles fait ressortir cette ressemblance.

Les milieux se rapprochant le plus du témoin (V_8 standard) sont ceux comportant la thiamine.

Les milieux s'en distinguant le plus sont :

— ceux avec la « vitamine D₂H » qui accélèrent la croissance ;

— ceux avec la bactopectone, les acides aminés choisis et la « vitamine D₂A » qui freinent cette croissance.

L'influence de la vitamine D₂ est différente selon qu'elle est introduite dans le milieu V_8 sous forme de solution alcoolique (D₂A) ou de solution huileuse (D₂H), la solution alcoolique étant la plus défavorable. Cette action défavorable est peut-être due à l'alcool introduit en même temps que la vitamine. L'action stimulante enregistrée avec les solutions huileuses peut trouver son explication par la présence de vitamine D₂ alors assimilable mais aussi par celle de l'excipient huileux qui accompagne celle-ci.

3. MODIFICATION DE LA SPOROGENÈSE

Nous avons porté dans le tableau ci-dessous les concentrations en zoospores par millimètre cube présentées par les deux souches sur les « milieux » étudiés après 10, 15 et 20 jours de culture (le tableau est malheureusement incomplet).

Numéro des milieux	10 jours		15 jours		20 jours	
	Yaoundé	Ebolowa	Yaoundé	Ebolowa	Yaoundé	Ebolowa
T	200	50	300	250	200	100
Ma1					200	400
Ma2					200	500
Gly			300	100	25	0
Ado			200	100	10	0
Asp	0	0			0	0
Ala					0	0
Pep	0	0			0	0
Th			100	100	200	350
Y	0	0			0	0
Asp + Th			0	0	0	0
Ala + Th			1	0	0	0
Asp + Ala + Th			0	0	0	0
1D ₂ A	25	50	100	150	50	100
2D ₂ A	10	10	25	50	25	50
1D ₂ H	2 000	4 000	1 500	2 500	1 000	2 500
1D ₂ H	3 000	2 000	2 500	2 500	1 500	3 500
1D ₃ H	1 500	2 500	2 500	2 500	1 500	3 500

Les suspensions de zoospores sont obtenues selon le processus habituel et déjà mentionné plus haut (ici chaque tube reçoit 5 ml d'eau). Lorsque le nombre de zoospores libérés est beaucoup trop élevé, on dilue au 1/5^e en général puis on calibre à l'hématimètre en tenant compte de la dilution.

— Au 15^e jour, les polyols par rapport aux témoins, ne modifient pratiquement pas la sporogénèse de Yaoundé, mais freinent celle d'Ebolowa.

— Au 20^e jour, seul le mannitol semble exercer un effet stimulant sur Ebolowa (les zoospores y sont 4 à 5 fois plus nombreuses qu'avec le témoin), tandis qu'avec Yaoundé l'action reste nulle (identité avec le témoin).

— Avec les acides aminés utilisés et la peptone, les cultures, quelque soit leur âge, ne donnent aucune zoospore. Les sources azotées ou leurs concentrations ont donc ici une action inhibitrice aussi bien sur la sporogénèse de Yaoundé que sur celle d'Ebolowa.

— L'association des deux acides aminés avec la thiamine annule l'effet de celle-ci sur la sporogénèse. Au 20^e jour, la thiamine seule entraîne pour Ebolowa, la libération de 350 zoospores par millimètre cube (contre 100 pour le témoin). Les libérations étant plus faibles auparavant, il semblerait que l'on ait avec la thiamine un effet retardeur sur Ebolowa sans être totalement inhibiteur (Yaoundé semblable au témoin).

— L'action des vitamines D mérite une attention particulière. Avec les solutions alcooliques simple concentration quelque soit la souche et l'âge de celle-ci, le nombre de zoospores est toujours inférieur au témoin. (On note cependant une légère prédominance d'Ebolowa sur Yaoundé.)

Avec la solution alcoolique double concentration, le nombre de zoospores libérées est encore plus faible. Il y a donc une plus grande inhibition des solutions alcooliques double concentration sur la sporogénèse.

Avec les solutions huileuses simple concentration, quelque soit la souche et l'âge de celle-ci, le nombre de zoospores libérées est partout bien supérieur à celui des témoins correspondants :

- 10^e jour : Yaoundé 10 fois plus que le témoin
Ebolowa 80 fois plus
- 15^e jour : Yaoundé 5 fois plus
Ebolowa 10 fois plus
- 20^e jour : Yaoundé 5 fois plus
Ebolowa 25 fois plus

(On note ici aussi une supériorité d'Ebolowa sur Yaoundé.)

Avec les solutions huileuses double concentration, il n'y a pas inhibition comme avec les solutions alcooliques. Pour Ebolowa, le nombre de zoospores libérées aux 15^e et 20^e jours sont les mêmes qu'avec les simples concentrations. Pour Yaoundé, au contraire, ces nombres sont supérieurs, d'où une stimulation des doubles concentrations par rapport aux simples concentrations.

Avec les vitesses d'extension mycéliennes les solutions alcooliques avaient aussi un effet inhibiteur. La même question se pose donc ici également, à savoir les rôles exacts de la vitamine D₂ ou de l'alcool introduit en même temps que la vitamine.

Pour enlever toute ambiguïté sur le rôle de la vitamine D₂ et des concentrations utilisées (200 000 et 400 000 U), un essai est en cours qui comporte des tubes de V₈ avec 0,5 et 1% d'alcool éthylique à 90° G.L. et où sera suivie la sporogénèse des deux souches.

CONCLUSIONS

Le fait que nous ayons pu, au Cameroun, grouper statistiquement des souches écologiquement distinctes en fonction de leur vitesse de croissance sur un même milieu de culture, montre que ce caractère peut être utilisé comme caractère supplémentaire [4], [10], [7], pour distinguer, dans une certaine mesure, des souches entre elles. De plus, étant donné un milieu de culture, l'aptitude à sporuler peut varier d'une souche à l'autre ; c'est ce que nous avons vu avec la souche de Yaoundé et celle d'Ebolowa. Certaines substances peuvent modifier le milieu et permettre à la souche défavorisée d'avoir une sporogénèse normale ou supérieure. Nous avons vu que le mannitol et la thiamine modifient favorablement le milieu V_8 standard pour la souche d'Ebolowa sans affecter la sporogénèse de Yaoundé. Les réactions différentes de ces souches vis-à-vis de leurs substrat montre bien que nous avons deux souches physiologiquement distinctes.

La production en sporanges actifs tout en dépendant du patrimoine génétique du champignon n'en demeure pas moins étroitement liée à l'environnement et en particulier au substrat [1]. Nos observations faites au Cameroun en ce qui concerne les souches de type Mayombé entraînent quelques prudences quant à l'utilisation exclusive du V_8 . Le choix de la nature du milieu de culture le plus approprié doit donc se poser et faire l'objet d'essais préliminaires dans chaque région où l'on se propose d'effectuer des tests de sensibilité à base de zoospores. Il semble toujours possible d'y remédier en modifiant ou en complétant le milieu V_8 standard en fonction de la souche.

Enfin, nous retiendrons surtout de cette comparaison entre ces quelques éléments trophiques, que l'apport de vitamines du type D avec l'excipient huileux hydrodispersible du type Roussel, semble déclencher et maintenir une sporogénèse abondante quelle que soit la souche.

L'action stimulante des lipides sur le développement mycélien a été signalé [5] mais plus précisément encore le rôle des stérols sur l'induction des organes de la reproduction sexuée a été confirmé à plusieurs reprises [11], [12], [6].

L'essai sur la vitamine D_2 et sur son excipient huileux sera donc repris afin de vérifier le rôle exact de cette vitamine sinon de rechercher le facteur (stérol voisin ou autre de l'excipient), responsable de l'effet stimulant mis en évidence ici sur la reproduction asexuée de *Phytophthora palmivora*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLAHA (G.) - 1967 - *P. palmivora* (Butl.) Butl. Variation de la pathogénie en fonction de la source de l'inoculum. *Café-Cacao-Thé*, XI (4), pp. 331-336.
- [2] BLAHA (G.) - 1969 - Contribution à l'étude de la sensibilité du Cacaoyer à *P. palmivora* au Cameroun. III^e Conférence Internationale sur les Recherches Cacaoyères Accra (Ghana).
- [3] FRÈREJACQUES (1939). Le mannitol chez les champignons. *Revue mycologique* IV, n° 3-4, p. 89-97.
- [4] HUGUENIN (B.), BOCCAS (B.) - 1971 - Distribution des signes de compatibilité du *P. palmivora* (Butl.) Butl. parasite du Cacaoyer en République Fédérale du Cameroun. Rapport de mission ORSTOM, 1971.
- [5] KLEMMER (H.W.), LENNEY (J.F.) - 1965 - Lipids stimulating reproduction and growth in Pythiaceus fungi.
- [6] LACOSTE (L.) - 1965 - Biologie naturelle et culturelle des *Leptosphaeria* Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. Thèse Toulouse.
- [7] TARJOT (M.) - 1965 - Comparaison des différents isolements de *P. palmivora* en Côte d'Ivoire. Conf. Int. sur les Recherches Agro. Cacaoyères Abidjan, p. 174-177.
- [8] TARJOT (M.) - 1965 - Quelques données sur la biologie du *P. palmivora* agent de la pourriture brune des cabosses du Cacaoyer. Conf. Int. sur les Recherches Agro. Cacaoyères, Abidjan, p. 178-183.
- [9] TARJOT (M.) - 1967 - Etude de la résistance des cacaoyers à la pourriture brune des cabosses due à *P. Palmivora* (Butl.) Butl. en Côte d'Ivoire. II^e partie : inoculation expérimentale au laboratoire par dépôt d'une goutte de suspension de zoospores sur la cabosse sans blessure. *Café-Cacao-Thé*, XI (1), 3-13.
- [10] ZENTMYER (G.A.), BLAHA (G.), NJOMOU (S.E.), MULLER (R.A.), CARNES (D.) - 1972 - Mating types of *P. palmivora* in Cameroon. *Plant Disease Reporter*.
- [11] HENDRIX (J.W.) - 1965 - Influence of sterols on growth and reproduction of *Pythium* and *Phytophthora* spp. *Phytopath.*, 55, pp. 790-797.
- [12] LEAL (J.A.), FRIEND (J.), HOLLIDAY (P.) - A factor controlling sexual reproduction in *Phytophthora*. *Nature*, 203, pp. 545-46.