PARASITOLOGIE VÉGÉTALE. — Aspects ultrastructuraux de la dégradation du phloème des racines d'Hevea brasiliensis parasités par Rigidoporus lignosus. Note (*) de Michel Nicole, Jean-Paul Geiger et Daniel Nandris, présentée par Roger Buvat.

L'examen ultrastructural du phloème des racines d'Hevea brasiliensis attaquées par Rigidoporus lignosus montre :

- une dégradation de la paroi des cellules constitutives du tissu débutant au niveau de la lamelle moyenne;
- une coagulation du latex dans les laticifères;
- une modification de la morphologie du contenu des cellules à tannins.

PLANT PARASITOLOGY. — Ultrastructural Studies of Phloem Degradation of Hevea brasiliensis Roots Infected with Rigidoporus lignosus.

Phloem ultrastructural observations of Rigidoporus lignosus infected roots of Hevea brasiliensis show:

- cell wall degradation of all kind of cells in this tissue, beginning at the level of the middle lamella;
- latex coagulation inside lattice vessels;
- morphological change of the cytoplasm of tannin cells.

Introduction. — Les agents de Pourridié sont les parasites majeurs d'Hevea brasiliensis en Afrique tropicale humide [1]. Parmi eux, Rigidoporus lignosus provoque une pourriture blanche du système racinaire de l'arbre conduisant à la mort de la plante [2]. Ce Champignon se caractérise par son action lignolytique drastique [3]. Toutefois, avant d'atteindre le bois, il traverse le phloème, tissu renfermant entre autres les laticifères producteurs de caoutchouc.

Si l'histologie du liber de la tige et du pivot est actuellement bien connue ([4], [5], [6]), peu de résultats ont été acquis sur la dégradation de ce tissu par un parasite fongique. Aussi ce travail met-il l'accent sur les différents aspects de l'altération du phloème par R. lignosus, tant au niveau pariétal que cellulaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les graines d'Hevea récoltées dans les plantations expérimentales de l'I.R.C.A., sont mises à germer sur sable humide. Après repiquage en terre, les plants sont infectés selon la technique suivante [7]:

Cinq buchettes de bois, calibrées, préinfectées par R. lignosus depuis 11 mois, sont appliquées au contact de la racine à 20 cm sous la surface du sol. Au niveau de l'horizon de contact hôte-parasite, la terre des bacs de végétation est maintenue à un taux d'humidité volumique de 21 %.

Les plantes infestées sont prélevées en début et fin d'infection, et plongées immédiatement dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % tamponnée à pH 7,2. Après fragmentation de la racine, des échantillons de 1 à 2 mm³, sont maintenus 4 h dans le même fixateur, puis rincés et postfixés au tétroxyde d'osmium à 1 % pendant 2 h.

La déshydratation et l'inclusion dans l'Épon 812 sont identiques à celles décrites par Dickenson [8]. Les coupes ultrafines colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb [9], sont examinées au microscope « Siemens Elmiskop 102 » (1).

Pour la détection de la callose, des coupes de jeunes racines parasitées, réalisées au rasoir, sont trempées 4 h dans une solution alcoolique de bleu d'aniline à $1^{\circ}/_{00}$, puis examinées en fluorescence sur un microscope Leitz Orthoplan.

RÉSULTATS. — L'organisation du phloème secondaire de la racine (pl. I, fig. 1), n'est pas différente de celle de la tige [4]. Les laticifères, au voisinage desquels peuvent être localisées des cellules à tannins [5], sont disposés en manteaux concentriques dont la grande majorité est située dans le phloème non conducteur [6]. Ce tissu contient également les tubes criblés et des cellules de type parenchymateux.

Les parois non lignifiées des cellules parenchymateuses et des cellules conductrices de la sève apparaissent comme la cible privilégiée du champignon dans ce tissu. La dégradation des polymères pariétaux débute au niveau de la lamelle moyenne (pl. I, fig. 2, 3). Celle-ci perd sa cohésion, prend un aspect granuleux très osmiophile (pl. I, fig. 3) et finit enfin par

17 OCT. 1983.

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentage

No: 3403ex1

Cote | B

B-3403 el

se lyser (pl. I, fig. 4). Au cours de la colonisation du tissu ces perforations s'étendent aux fractions primaire et secondaire de la paroi (pl. I, fig. 5) faisant place ainsi à un méat important. Dans les tubes criblés, les modifications de la paroi se traduisent en outre par un dépôt obstruant les pores (pl. I, fig. 6 et 7). Au microscope optique à fluorescence, certaines zones de la paroi de ces tubes répondent souvent de manière positive au test de mise en évidence de la callose.

Les cellules compagnes présentent dans les jeunes racines saines, un cytoplasme dense, riche en organites et garni d'un noyau volumineux (pl. II, fig. 1). Les nécroses causées par le champignon provoquent la vacuolisation de ce cytoplasme (pl. II, fig. 2) et entraînent sa dislocation (pl. II, fig. 3).

Au sein des laticifères de sérieuses perturbations sont également décelables. Le latex, défini selon son aspect physico-chimique comme un hydrosol [8], est constitué ([8], [11]) :

- de particules de caoutchouc;
- de lutoïdes, micro vacuoles à caractère lysosomal;
- de particules à double membrane : les particules de Frey-Wyssling.

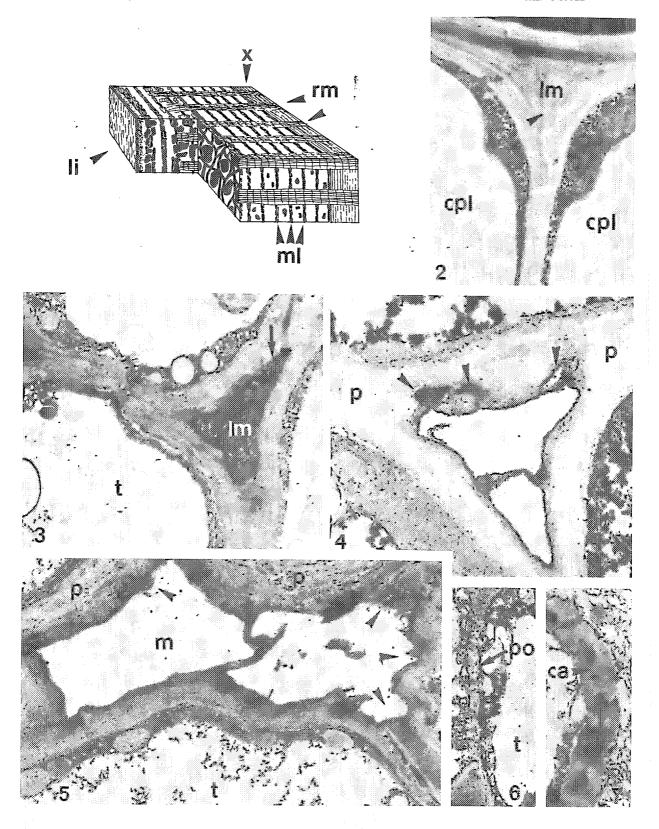
Chez une plante saine, ces particules, toutes chargées négativement, maintiennent la stabilité colloïdale du latex (pl. II, fig. 4). Toute rupture de cette stabilité aboutit à sa coagulation.

EXPLICATION DES PLANCHES

Abréviations. — ca, dépôt analogue à la callose; cc, particule de caoutchouc; cpl, cellule parenchymateuse libérienne; g, appareil de Golgi; li, liège; lu, lutoïde; lm, lamelle moyenne; m, méat; mc, microcoagulum; mi, mitochondrie; ml, manteaux laticifères; n, noyau; p, paroi cellulaire; po, pore; rc, réticulum endoplasmique; rm, rayons médullaires; t, tube criblé; tn, tannin; v, vacuole; x, xylème.

Planche I

- Fig. 1. Anatomie du phloème secondaire d'une racine d'Hévéa (d'après de Fay, 1980).
- Fig. 1. Anatomy of secondary phloem of Hevea root (de Fay, 1980).
- Fig. 2. Racine saine; espace intercellulaire (flèche) séparant deux cellules parenchymateuses libériennes $(G \times 10\,000)$.
- Fig. 2. Healthy root; intercellular space (arrow) separating two liberian parenchymatous cells ($G \times 10000$).
- Fig. 3. Racine parasitée par *R. lignosus*; altération de la paroi cellulaire, débutant par une augmentation de l'osmiophilie de la lamelle moyenne (flèche) (G × 16 000).
- Fig. 3. Root attacked by R. lignosus; alteration of cell wall, starting by an increase of osmiophilia of middle lamella (arrow) (G×16000).
- Fig. 4. Racine parasitée par R. lignosus; perforation de la lamelle moyenne et début de digestion des structures cellulosiques (flèches) (G × 15 000).
- Fig. 4. Root attacked by R. lignosus; perforation of middle lamella and start of digestion of cellulose structures (arrows) $(G \times 15000)$.
- Fig. 5. Racine parasitée par R. lignosus; dégradation importante de la paroi cellulaire (flèches) et formation d'un méat favorisant la dislocation des cellules (G × 12 000).
- Fig. 5. Root attacked by R. lignosus; grave damage of cell wall (arrows) and formation of a meatus likely to break the cells $(G \times 12000)$.
- Fig. 6. Racine saine; pore, non obstrué, d'un tube criblé (G × 20 000).
- Fig. 6. Healthy root; non-blocked pore of a pitted tube ($G \times 20000$).
- Fig. 7. Racine parasitée par R. lignosus; pore, d'un tube criblé, obstrué par un dépôt réagissant au test de la callose ($G \times 15000$).
- Fig. 7. Root attacked by R. lignosus; pore of a pitted tube blocked by a deposit reacting to a callus test $(G \times 15000)$.



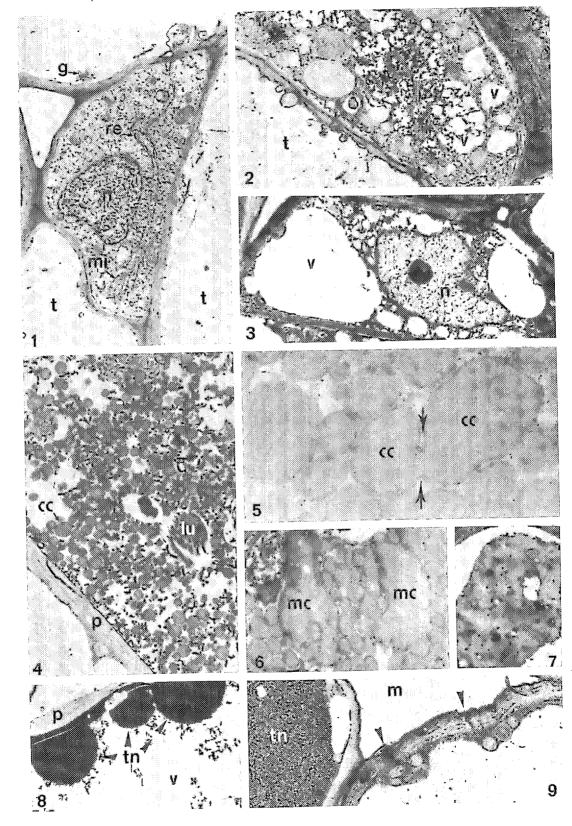


Planche II

- Fig. 1. Racine saine; cellule parenchymateuse compagne, le cytoplasme dense renferme un noyau volumineux et de nombreux organites (G × 7 500).
- Fig. 2. Healthy root; companion parenchymatous cell, the thick cytoplasm surrounds a large nucleus and many organites ($G \times 7500$).
- Fig. 2. Racine parasitée par *R. lignosus*; début de vacuolisation du cytoplasme d'une cellule parenchymateuse compagne (G × 12 000).
- Fig. 2. Root attacked by R. lignosus; beginning of vacuolisation of cytoplasm of companion parenchymatous cell $(G \times 12000)$.
- Fig. 3. Racine parasitée par R. lignosus; après l'attaque le cytoplasme des cellules parenchymateuses compagnes, quasi-dégradé, cède la place à de grandes vacuoles (G × 4500).
- Fig. 3. Ditto; after the attack the partly-degraded companion cells give way to large vacuoles ($G \times 4500$).
- Fig. 4. Racine saine; laticifère d'une jeune plante, on y remarque de nombreuses particules de caoutchouc ainsi qu'un lutoïde (G × 9 000).
- Fig. 4. Healthy root; lattice of young plant, many particles of rubber can be seen as well as a lutoid.
- Fig. 5. Racine parasitée par R. lignosus; début de coagulation : fusion de deux particules de caoutchouc (flèches) $(G \times 100\,000)$.
- Fig. 5. Root attacked by R. lignosus; beginning of coagulation: fusion of two particles of rubber (arrows) $(G \times 100000)$.
- Fig. 6. Racine parasitée par R. lignosus; coagulation du latex : formation de microcoagula (G x 19 000).
- Fig. 6. Root attacked by R. lignosus; coagulation of latex: formation of microcoagula (G × 19000).
- Fig. 7. Racine parasitée par R. lignosus; stade ultime de la coagulation du latex; prise en masse du caoutchouc (G×15000).
- Fig. 7. Ditto, last stage of latex coagulation; shot of clump of rubber ($G \times 15000$).
- Fig. 8. Racine saine; cellule à tannins : ceux-ci (flèches) sont produits par la vacuole et se répartissent à la périphérie du cytoplasme (G x 12000).
- Fig. 8. Healthy root; tannin cell: these (arrows) are produced by the vacuole and distributed around the periphery of the cytoplasm ($G \times 12000$).
- Fig. 9. Racine parasitée par R. lignosus; les tannins occupent la totalité de la vacuole. Remarquer, par ailleurs, l'altération des parois cellulaires (flèches) (G×16000).
- Fig. 9. Root attacked by R. lignosus; tannins occupy all the vacuole. Notice, however, the alteration of cell walls (arrows) ($G \times 16\,000$).

Dès que le mycélium atteint les tissus corticaux, avant même l'invasion totale du liber, des particules de caoutchouc s'anastomosent pour former des microcoagulats (pl. II, fig. 5). Par la suite ce phénomène s'accompagne d'une vacuolisation du cytoplasme et de la dislocation des lutoïdes; la phase de déstabilisation du latex est atteinte. L'accumulation progressive des coagula (pl. II, fig. 6) précède la prise en masse totale du caoutchouc (pl. II, fig. 7), stade ultime de la coagulation. Aucune structure cellulaire n'est alors reconnaissable.

Enfin il est à noter que le contenu des cellules à tannins se modifie également. Produits par le système vacuolaire et distribués à la périphérie des cellules tannifères dans une jeune racine saine (pl. II, fig. 8), les tannins occupent le plus souvent la totalité du cytoplasme chez une racine parasitée du même âge (pl. II, fig. 9).

Discussion. — En préalable à la colonisation du xylème où s'exprime son pouvoir lignivore, R. lignosus doit traverser le cortex et le phloème. La dégradation de la lamelle moyenne et du squelette cellulosique des cellules libériennes résulte de l'intervention, déjà évoquée ([2], [12]) d'enzymes pectiques et cellulolytiques impliquées dans le déroulement du processus infectieux. L'action de ces hydrolases rend accessible les éléments carbonés

de la paroi, qui de ce fait constituent pour le champignon une source trophique indispensable.

L'altération totale des parois et la vacuolisation du cytoplasme des cellules compagnes sont caractéristiques d'une dégénérescence cellulaire typique et de la nécrose des tissus.

La coagulation du latex apparaît plutôt comme un phénomène secondaire de l'infection, en effet bien qu'existant spontanément mais à un faible niveau dans les tissus sains, la coagulation tend à se généraliser dans les tissus infectés. Aucun écoulement ne se produit en effet après une saignée des manteaux laticifères d'un pivot d'Hevea à proximité (5 à 10 cm) de la zone infectée. Les observations microscopiques du liber parasité n'ont jamais permis de déceler la présence de filaments mycéliens dans les laticifères, et ce quel que soit le stade de l'infection. Dans la mesure où le cytoplasme de la cellule laticifère contient entre autres les particules de caoutchouc, polymère isoprénique [13] non biodégradable, on peut supposer que leur abondance constitue un milieu impropre au développement du parasite. La coagulation du caoutchouc, sans intervention directe du Champignon, s'effectue cependant dans le liber infecté. Parmi les facteurs agissant sur la coagulation, les diminutions de pH, les cations divalents, les polyphénol-oxydases et les protéases, sont les plus actifs ([14], [15]). Les enzymes excrétées par les hyphes mycéliennes ([2], [12]) et les produits de dégradation des structures cellulaires hôtes renferment certainement l'un ou plusieurs de ces composés. Or l'organisation fonctionnelle du phloème, interconnection des rayons libériens et des laticifères, favorise un transport radial et vertical des éléments nutritifs [16] et vraisemblablement des produits de dégradation libérés dans les cellules voisines des laticifères. Dans cette optique la coagulation du latex à « courte distance » est concevable.

Les causes de la modification du contenu des cellules à tannins, à notre sens, sont doubles. Elle résulte soit d'une dégradation provoquée par l'agent pathogène, soit d'une mobilisation du pool phénolique en réponse à l'agression fongique. Les polyphénols sont en effet connus comme intervenant dans les mécanismes de défense chez les plantes [17]. Aussi, le contenu des cellules spécialisées, laticifères et cellules à tannins, constitue-t-il un obstacle conséquent pour le parasite. Celui-ci le contourne en développant ses hyphes dans les rayons parenchymateux [12] pour envahir le bois, son substrat de prédilection.

- 1) Les observations de microscopie électronique ont été réalisées au G.E.R.M.E., Groupe d'étude et de Recherche en Microscopie électronique, Abidjan.
- (*) Remise le 22 mars 1982, acceptée après révision le 20 septembre 1982.
 [1] J. R. Pichel, I.N.E.A.C., 49, 1956, 480 p.
 [2] J. P. Geiger, D. Nandris, M. Nicole et B. Huguenin, Abs. Cong. Int. Prot. cult. trop., Lyon, section 1 B, 43, 1981.
 - [3] J. P. Geiger et B. Huguenin, Abs. Cong. Int. Prot. cult. trop., Lyon, section 1 B, 43, 1981.
 [4] W. Bobilioff, Art. Inst. Orell Füssli, Zurich, 1923, 91 p.

 - [5] J. TRANCARD, Rev. Cytol. Biol. végét. Bot., 2, 1976, p. 1-6.
 - [6] E. DE FAY, Thèse 3e cycle, Montpellier, 1981.
 - [7] D. NANDRIS et M. NICOLE, Abs. Cong. Int. Prot. cult. trop., Lyon, section 1 B, 43, 1981.
 - [8] P. B. DICKENSON, J. Rubb. Res. Inst. Mal., 21, (4), 1969, p. 543-559.
 - [9] E. S. REYNOLDS, *J. cell. biol.*, 17, 1963, p. 208-212. [10] C. HEBANT, *Can. J. Bot.*, 59, 1981, p. 974-985.

 - [11] D. RIBAILLER, J. L. JACOB et J. d'AUZAC, Physiol. vég., 9, 1971, p. 423-437.
 - [12] M. NICOLE, J. P. GEIGER et D. NANDRIS (à paraître dans Phytopathologische Z., 1983).
 - [13] W. W. Bowler, Ind. Emg. Chem., 45, (8), 1953, p. 1790.
 - [14] P. HANOWER, J. BRZOZOWSKA et C. LIORET, Physiol. vég., 14, (14), 1976, p. 677-693.
 - [15] J. Brzozowska-Hanower, P. Hanower et C. Lioret, Physiol. vég., 16, (2), 1978, p. 231-254.
- [16] C. HEBANT et E. DE FAY, Z. Planzenphysiol. Bd, 97, 1980, p. 391-398. [17] E. SCHLOSSER, in Plant disease, V, J. G. HORSEFALL and E. B. COWLING, éds., Acad. Press., New York,