

Masse mycélienne et activité laccase au sein des racines d'Hévéa infectées par *Rigidoporus lignosus*

MICHEL R. NICOLE

Laboratoire de Phytopathologie, O.R.S.T.O.M., Centre d'Adiopodoumé, B.P. V-51, Abidjan, Côte-d'Ivoire.

(Manuscrit reçu le 9 mars 1982; accepté le 23 avril 1982)

Résumé. Le dosage de la chitine des parois de *Rigidoporus lignosus* a permis d'apprécier la répartition de la biomasse de ce parasite au sein de pivots d'Hévéa (*Hevea brasiliensis*) infectés. La masse mycélienne, maximale dans les tissus anciennement parasités, décroît pour s'annuler dans les tissus sains du front de progression du champignon. L'activité laccase, mesurée conjointement, est maximale dans les tissus parasités du front pour une masse mycélienne peu élevée et faible dans les tissus très dégradés pour une masse mycélienne importante. Ces résultats suggèrent un contrôle de l'activité de cette enzyme par les produits de dégradation du bois. En effet, le pouvoir inducteur des tissus sains est le plus important, près de dix fois supérieur aux tissus anciennement parasités et trois fois supérieur aux tissus parasités et sains du front de progression du parasite. L'hypothèse d'une diffusion en avant du front d'inhibiteurs de l'activité laccase est discutée.

Mots clés : Pourridié blanc, chitine, laccase, *Rigidoporus lignosus*, *Hevea brasiliensis*.

Abstract. Chitin assay technique on *Rigidoporus lignosus* allowed us to clarify the biomass distribution pattern of this parasite in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) tap-root. It was shown that the fungus was distributed according to a decreasing gradient from the older to the freshly colonized tissues. Laccase activity was also measured. There was a high activity in infected tissues just near the parasite progress line, and a low activity in old colonized tissues. These results suggest a control of laccase activity by wood degradation products. Indeed, laccase activity induction by healthy tissues was ten times higher than that of old infected tissues and three times that of healthy and infected tissues near the fungus progress line. Hypothesis of laccase inhibitors diffusion ahead the fungus progress line is discussed.

Key words: white root rot, chitin, laccase, *Rigidoporus lignosus*, *Hevea brasiliensis*.

INTRODUCTION

Rigidoporus lignosus (Kl.) Imaz., ex *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim, polyporacée des régions intertropicales humides, est l'agent du pourridié blanc des racines d'Hévéa (*Hevea brasiliensis*). Connu de longue date en Côte-d'Ivoire en raison des dégâts qu'il occasionne en plantation, ce parasite fait l'objet de nombreux travaux en pathologie végétale.

Ainsi, après une étude *in vitro* de la morphogenèse de ce champignon (BOISSON, 1968, 1973), certains aspects physiologiques et biochimiques des relations hôte-parasite ont pu être précisés (GEIGER, 1973) notamment en ce qui concerne la production de laccases par le parasite et les modifications de spectre peroxydasique des tissus racinaires suite à l'infection. D'autre part, la mise au point d'une technique fondée sur la visualisation *in situ* de l'activité laccase (EC 1. 10. 3. 2) a permis de localiser le champignon dans les racines infectées et de montrer que cette activité est très importante au niveau du front de progression du parasite dans les tissus parasités, et faible, voire nulle, en arrière du même front (GEIGER *et al.*, 1976). Mais bien que rapide et d'utilisation commode, ce test laccase ne permet cependant pas

d'évaluer quantitativement la masse du parasite dans les tissus malades. C'est pourquoi l'attention a été portée sur les moyens mis en œuvre pour estimer la masse d'un parasite au sein d'organes infectés. Récemment SEITZ *et al.* (1979) ont apprécié la colonisation de plusieurs parasites de céréales par dosage chromatographique de l'ergostérol de ces champignons. Toutefois, la technique la plus utilisée, repose sur le dosage de la *N*-acétylglucosamine (WHIPPS et LEWIS, 1980), monomère constitutif de la chitine des parois de nombreux champignons (TRACEY, 1955). En effet, outre son utilisation pour l'étude de la croissance fongique (DONALD, 1974, LANGCAKE et DRYSDALE, 1975; LANGCAKE et WICKINS, 1975; TATAREAU et TOUZÉ, 1975), la présence de glucosamine constitue également un marqueur d'infection (RIDE et DRYSDALE, 1971, 1972; MAYAMA *et al.*, 1975; WU *et al.*, 1975; TOPPAN *et al.*, 1976).

Peu de travaux font état de l'estimation de la masse mycélienne de champignons lignivores dans des tissus parasités. HART et SHRIMPTON (1979), dans le but d'évaluer la dégradation du bois, ont néanmoins réalisé une telle approche sur du matériel ligneux stérilisé puis infecté par trois polyporacées. De son côté, SWIFT (1973) mesure la masse mycélienne de *Coriolus versicolor* sur la sciure de Châtaignier, afin d'apprécier la décomposition des débris végétaux à la surface du sol. De même, GURUSIDAIAM *et al.* (1978) ont déterminé la masse mycélienne de plusieurs basidiomycètes présents dans les débris ligneux en association avec certains microorganismes. Ces travaux ont tous été réalisés sur matériaux ligneux morts servant de substrats à des champignons croissant en saprophytes.

L'objectif de ce travail est, d'une part, d'estimer la masse mycélienne de *R. lignosus* dans les tissus racinaires parasités d'Hévéa vivants et, d'autre part, d'établir la nature de la relation entre les activités laccases mesurées dans les mêmes tissus et cette masse mycélienne.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels

Rigidoporus lignosus (Kl.) Imazeki est isolé à partir d'Hévéa *Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg. parasités provenant des plantations expérimentales de l'Institut de Recherche sur le Caoutchouc en Afrique (I.R.C.A.). Les deux formes mycéliennes, mises en évidence par BOISSON (1973) sont cultivées selon les techniques décrites ci-dessous.

La forme A, ou forme intramatrielle, est cultivée en erlenmeyers sur milieu liquide, constamment agité pour favoriser une immersion permanente du mycélium (GEIGER, 1973). Les ensemencements sont effectués à partir d'implants mycéliens de 5 mm de diamètre prélevés à la périphérie d'une préculture gélosée âgée de 5 j, à raison de 5 implants par erlenmeyer. L'expérimentation, menée sur 22 j, est réalisée en 3 répétitions; au temps 3, 9, 17 et 22 j, les implants de tous les erlenmeyers et de chaque répétition sont respectivement regroupés et soumis à l'analyse. Ce regroupement permet l'obtention suffisante de parois.

La forme B, ou forme superficielle, se développe à la surface d'un substrat gélosé; elle s'obtient en cultures linéaires (milieu malté 2% et gélosé 2%), réalisées en tubes de verre de 40 cm de longueur et 1,5 cm de diamètre. Un implant mycélien circulaire de 5 mm est déposé à une extrémité, la progression de la colonie est alors notée quotidiennement sur 30 cultures différentes. Au terme de la colonisation du milieu, les filaments, correspondants au pointage 3, 6, 9, 13, 16 et 21 j, sont regroupés et soumis à l'extraction des parois.

Les pivots d'Hévéa sains et parasités âgés de 8 ans sont prélevés dans les mêmes parcelles expérimentales où a été isolée la souche de *R. lignosus*.

Dosage de la glucosamine

L'isolement et l'hydrolyse des parois des formes A et B, ainsi que la purification de la glucosamine sont réalisées selon la technique décrite par TOPPAN *et al.* (1976). La glucosamine purifiée est dosée selon la méthode de ROSEMAN et DAFFNER (1956). Une courbe étalon a été établie à partir de chlorhydrate de glucosamine (Sigma). L'identification des oses neutres et aminés est effectuée par chromatographie de partage sur papier Wattman n° 1 dans le solvant propanol-butanol-pyridine-HCl 0,1 M (5/4/1/1; v/v/v/v) et chromatographie d'absorption sur plaque de silice dans le solvant propanol-eau (85/15; v/v). Les oses neutres sont révélés au phtalate d'aniline et les oses aminés à la ninhydrine, à 60°C, en atmosphère saturée de vapeur d'éthanol. Ils sont identifiés par référence à des oses témoins.

Estimation de la masse parasitaire

Les tissus ligneux sains et parasites analysés, proviennent de pivots fraîchement récoltés (*fig. 1*). Les échantillons, prélevés au ciseau à bois, sont réduits en sciure dans un broyeur à couteau Gondard.

Quatre sites de prélèvement ont été choisis dans les pivots infectés. Les tissus parasites (P), 10 cm en arrière du front de progression; tissus parasites au voisinage immédiat du front (P_F); tissus sains au voisinage immédiat du front (S_F); tissus sains, plusieurs centimètres en avant du front (S). L'expérimentation porte sur 5 pivots de même âge, en cours d'attaque, provenant de la même parcelle de plantation. Un témoin est réalisé à partir des tissus d'un pivot non infecté. Après hydrolyse de la sciure (HCl 6 N, 6 h à 110°C) il subsiste un résidu ligneux qui est éliminé par filtration sur verre fritté n° 5. Après évaporation, le résidu sec est repris par 6 ml d'eau distillée et centrifugé 10 min à 20000 g. Le surnageant est purifié sur colonne Amberlite IR (H⁺). Le dosage de la glucosamine est effectué comme précédemment décrit.

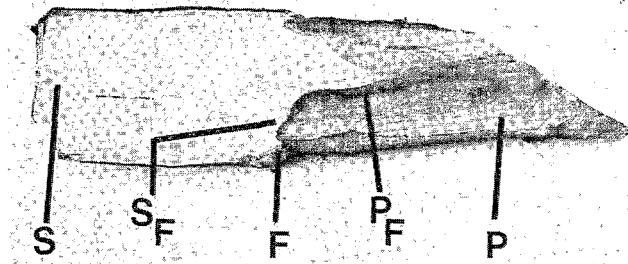


FIG. 1. — Coupe longitudinale dans un pivot d'Hévéa partiellement parasité par *R. lignosus*.

— Longitudinal section in a rubber tree root partly infected by *R. lignosus*.

S, tissu sain; S_F, tissu sain au voisinage immédiat du front; F, front de progression du parasite; P_F, tissu parasite au voisinage immédiat du front; P, tissu parasite.

Mesure des activités laccases

Des mesures des activités laccases (EC 1.10.3.2) sont réalisées sur une partie aliquote des tissus ayant servi à l'estimation de la masse parasitaire. Dans ce but, une quantité connue de chaque échantillon de sciure est mise à macérer 15 h dans une solution tamponnée Tris-HCl 0,025 M (pH 8,5) à raison de 2 ml de solution par gramme de tissu. Après filtration sur verre fritté n° 1 et centrifugation (20 min à 20000 g), l'enzyme est révélée par son action sur le gaïacol en solution à 0,2% dans un milieu Tris-maléate 0,05 M (pH 6) (KIRK *et al.*, 1968; JOHANSSON et HAGERBY, 1974; GEIGER *et al.*, 1976; NOGUCHI *et al.*, 1980 et HAARS *et al.*, 1981). Le volume final du milieu réactionnel est de 5,5 ml. L'activité enzymatique de la solution est exprimée en $\Delta\text{DO}_{420} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Induction de l'activité laccase

Les quatre types de tissus, S, S_F, P_F et P sont réduits en une sciure de 40 mesh environ. Cinq grammes de sciure fraîche de chaque tissu sont déposés dans un erlenmeyer de 100 ml, puis stérilisés dans un volume d'eau de 30 ml. Chacun des erlenmeyers est ensuite ensemencé par un implant mycélien prélevé à la périphérie d'une préculture en milieu gelosé âgée de 5 j. L'activité laccase, mesurée tous les deux jours à compter du temps zéro, est exprimée en $\Delta DO_{420} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Chaque lecture porte sur un échantillonnage de 3 erlenmeyers par tissu testé.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dosage de la glucosamine pariétale de *R. Lignosus*

L'estimation de la masse de champignon dans un pivot parasité nécessite, au préalable, l'évaluation du taux de glucosamine de ses parois; elle a été faite à partir de mycéliums cultivés *in vitro*. L'existence chez *R. lignosus* de deux formes mycéliennes a conduit à évaluer ce taux pour les deux types mycéliens.

Des essais préliminaires ont ainsi montré, sans ambiguïté, une relation linéaire entre la quantité de glucosamine dosée et la quantité de parois mises en œuvre au cours de l'expérience, tant pour le mycélium A que pour le mycélium B (fig. 2). Par la suite, la variation de la teneur en glucosamine des parois des deux types d'hyphes en fonction de l'âge des filaments est étudiée.

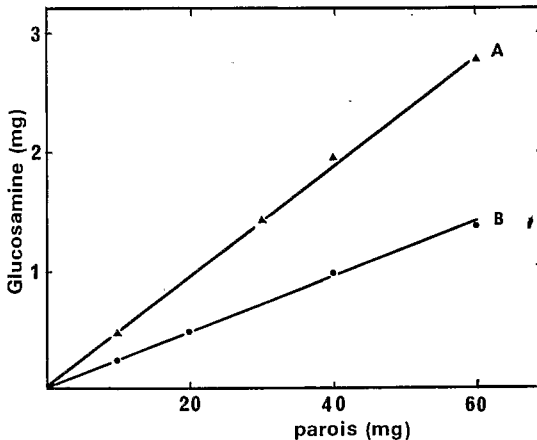


FIG. 2. — Variation du taux de glucosamine des mycéliums A et B en fonction de la quantité de parois hydrolysées.

— Relation between glucosamine level of mycelium A and mycelium B and the quantity of hydrolysed wall.

Dans le cas du mycélium B, les résultats, regroupés sur la figure 3, traduisent une évolution sensible de cet ose aminé au cours du temps. En effet, importante au niveau des parois du mycélium jeune, dont les apex sont le siège privilégié de l'élaboration de la chitine (GALUN, 1972; DARGENT, 1977), la teneur en glucosamine pariétale peut être considérée comme constante jusqu'au 13^e jour. A partir de cet âge, elle décroît progressivement pour atteindre $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de parois sèches en fin de culture. Cette diminution pourrait être mise au compte d'une activité chitinase élevée, favorisant la dégradation des polymères de nature glucosaminidique en fin de croissance, observée chez certains parasites en culture (VESSEY et PEGG, 1973).

Pour le mycélium A, le taux de glucosamine enregistré reste constant tout au long des cultures. Ce taux atteint une valeur moyenne de $43,7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de parois sèches. Cette teneur est toutefois faible puisque dans des conditions de culture similaires, CHET et HUTTERMANN (1980) ont enregistré 16,4% de chitine dans les parois de *Fomes annosus*, espèce très voisine de *R. lignosus*.

La différence entre les valeurs de chitine, observée pour le mycélium A et B après 20 j de culture (fig. 3), peut provenir du mode de prélèvement; en effet, la culture linéaire sur milieu gélosé (mycélium B), permet d'avoir des filaments d'âge voisin, mesuré par le pointage décrit précédemment, alors qu'en culture liquide agitée (mycélium A), chaque prise d'essai regroupe filaments jeunes et âgés.

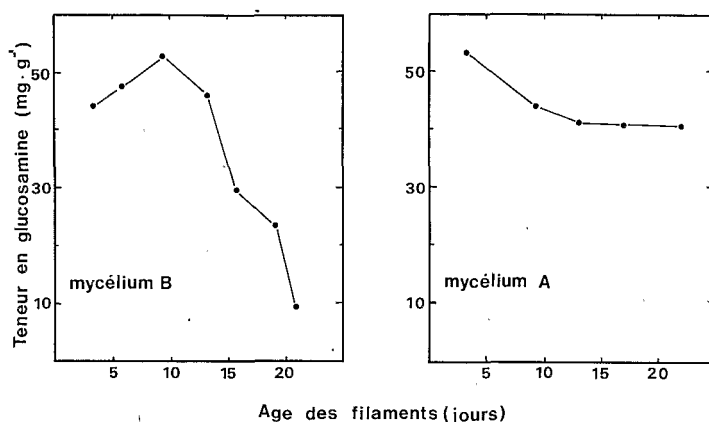


FIG. 3. — Évolution du taux de glucosamine au cours de la croissance *in vitro* des deux formes mycéliennes A et B de *R. lignosus*.

— Glucosamine level evolution during growth of the *R. lignosus* mycelial types.

Quoi qu'il en soit, ne sont prises en considération pour l'estimation de la masse mycélienne dans les tissus infectés, que les valeurs obtenues sur les hyphes de types A. Celles-ci sont considérées comme seules infectieuses (GEIGER, 1973); la transformation de la forme non infectieuse en forme infectieuse s'opère au moment de la pénétration du champignon dans la racine. Lorsqu'il la quitte, la forme A redevient forme B, avant de s'agréger en rhizomorphes (BOISSON, 1968, 1973). Cette transformation morphologique s'accompagne de modifications biochimiques notamment au niveau du métabolisme respiratoire (BAREYRE et BOISSON, 1969).

Estimation de la masse parasitaire dans les pivots d'Hévéa

L'estimation de la masse mycélienne des tissus ligneux parasités a été réalisée dans les mêmes conditions que celle du champignon en culture. La correspondance teneur en glucosamine-masse mycélienne peut être réalisée de plusieurs manières. TATAREAU et TOUZÉ (1975) et SHARMA *et al.* (1977) tiennent compte de la variation de la teneur en glucosamine avec l'âge du mycélium et ARIMA et UOZUMI (1967), ainsi que SWIFT (1973), se réfèrent au rapport glucosamine *in vivo/in vitro*. Pour le couple *R. lignosus*-*H. brasiliensis*, à l'exemple de RIDE et DRYSDALE (1971) chez le couple *Fusarium*-Tomate, une valeur standard moyenne est établie pour le mycélium A

(43,7 mg de glucosamine . g⁻¹ de parois sèches). Compte tenu du rendement de l'extraction des parois du mycélium frais ($6,5 \pm 0,3\%$), il est possible, à partir de ces données, de faire une estimation de la masse de *R. lignosus* dans le bois infecté.

L'analyse a porté sur les 4 types de tissus (fig. 4) de 5 pivots parasités différents. Les résultats, regroupés dans le tableau I, montrent que pour chacun des pivots considérés, la masse mycélienne se répartit selon un gradient caractérisé par un taux décroissant de P vers P_F. La teneur en glucosamine est nulle dans les tissus sains (S_F et S).

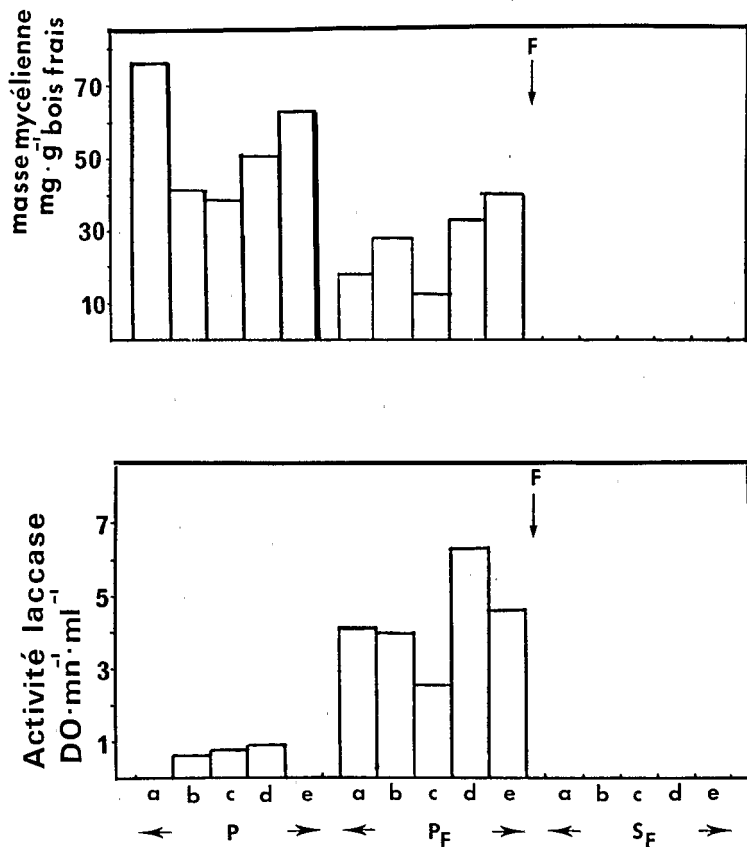


FIG. 4. — Comparaison masse mycélienne-activité laccase dans cinq pivots (a-e) d'Hévéa partiellement parasités.

— Comparison of mycelial biomass and laccase activity in five roots (a-e) of partly infected rubber tree.

Il convient cependant de signaler que dans le cas du témoin, le dosage s'est révélé faiblement positif; cette réaction est vraisemblablement due à une substance interférante. BOAS (1953) propose une série d'oses capables d'interférer lors du dosage colorimétrique, l'hydrolyse acide ne détruisant que partiellement les propriétés chromogènes de certains d'entre eux.

Pour notre part, la nature de cette substance n'a pu être précisée par chromatographie et la valeur obtenue au spectrophotomètre a été retranchée de celle des densités optiques enregistrées pour les différents types de tissus.

TABLEAU I

Glucosamine fongique et masse mycélienne dans les tissus de pivots d'Hévéa parasité.

Fungal glucosamine and mycelial biomass in the tissues of Hevea infected root.

Glc-N, taux de glucosamine en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ bois frais; masse mycélienne, mg mycélium $\cdot \text{g}^{-1}$ bois frais; /, résultat non significatif.

Pivot	Tissu							
	P		P _F		S _F		S	
	Glc-N	Masse myc.	Glc-N	Masse myc.	Glc-N	Masse myc.	Glc-N	Masse myc.
a.	216	75,7	53	17,3	0	0	0	0
b.	128	41,8	84	27,4	/	0	0	0
c.	119	38,9	38	12,4	0	0	0	0
d.	156	51	98	32	0	0	0	0
e.	194	63,4	121	39,5	/	0	0	0

Par ailleurs, dans deux cas sur cinq, les tissus sains au voisinage du front (S_F) ont révélé, après correction du témoin, une réaction légèrement positive au dosage. Les valeurs enregistrées ne sont cependant pas significatives et ne sont pas prises en considération. En effet, les nombreux essais d'isolement du parasite, tentés à partir de ces tissus sont toujours demeurés vains. De plus aucune activité laccase n'a pu être détectée. Ce dernier résultat pourrait toutefois être mis au compte soit d'une absence de cette enzyme dans ce tissu, soit d'une présence, mais en quantité inférieure au seuil de sensibilité de la méthode de dosage.

En ce qui concerne les tissus parasités P, dans le but de préciser si la glucosamine mesurée était représentative du champignon vivant, des prélèvements ont été effectués dans des zones où le bois ne présentait pas encore les symptômes d'une pourriture avancée; tous les isollements ont été positifs, aussi pouvons-nous considérer que la glucosamine dosée dans les tissus P provient en grande majorité de mycélium non dégénéré.

Comparaison entre masse parasitaire et activités laccases

L'étude réalisée par GEIGER *et al.* (1976) a porté, sur la répartition des laccases au sein d'un pivot parasité. Ces auteurs n'ont cependant pas cherché à établir une corrélation entre l'intensité de ces activités et l'importance de la colonisation des tissus, estimée par la mesure de la masse mycélienne. Aussi a été effectuée, conjointement au dosage de la glucosamine et sur les mêmes tissus, une mesure des activités laccases. Celles-ci étant effectuées sur un extrait brut, il n'est pas possible de distinguer l'activité L₁ de celle de L₂; la majeure partie de l'activité mesurée (70 à 80%) est toutefois due à L₁ (GEIGER *et al.*, 1976).

Les résultats enregistrés sur la figure 4 traduisent clairement une relation inverse entre la masse mycélienne et l'activité enzymatique. Ainsi, celle-ci est maximale au niveau des tissus P_F alors que la masse mycélienne est moins importante; elle est au contraire faible, voire indosable (pivots a et e), au sein des

tissus P qui contiennent néanmoins une forte teneur en glucosamine fongique. Par ailleurs, aucune activité laccase n'a été décelée dans les tissus S_F et S.

A la lumière de ces données, on observe que l'activité laccase n'est pas en corrélation avec l'importance de la masse mycélienne. Il est au contraire possible que l'activité des laccases, ou leur production, induite chez le champignon au moment de l'infection (GEIGER *et al.* 1976), soit contrôlée par les tissus hôtes et ses produits de dégradation. A cet égard LEONOWICZ et TROJANOWSKI (1975) suggèrent même l'induction, chez *Polyporus ostreatus*, d'une nouvelle isoenzyme de la laccase par l'acide férulique. Si tel était le cas chez *R. lignosus*, particulièrement dans les tissus P, cette nouvelle isoenzyme n'oxyderait pas le gaïacol.

Pour vérifier l'hypothèse d'un contrôle de l'activité des laccases, des essais d'induction de ces enzymes, sont réalisés en cultivant le parasite sur une sciure préparée à partir de chacun des quatre tissus considérés.

Induction *in vitro* des activités laccases

Parmi les quatre types de tissus, le tissu sain S est celui qui induit le plus l'augmentation des activités des laccases. Elles s'avèrent maximales après 19 j de culture (*fig. 5*). Ce tissu contient un (ou plusieurs) composé capable d'initier efficacement l'activité de cette enzyme. A cet égard, de nombreux auteurs rapportent le pouvoir inducteur de lignines (GOTTLIEB *et al.*, 1950; HUTTERMAN *et al.*, 1980) sous des formes variées telles que la lignine thioglycolique (KIRK, 1971), la lignine (de Kraft (SELIN et SUNDMANN, 1971) et le ligno-sulfonate (HUTTERMAN *et al.*, 1977; ANDER et ERIKSSON, 1978; KAUFMANN et WELLENDORF, 1980). De même, des composés phénoliques solubles sont des inducteurs possibles; l'acide férulique (LEONOWICZ et TROJANOWSKI, 1975; ANDER et ERIKSSON, 1978) et le pyrocatechol (JOHANSSON et HAGERBYE, 1974) ont été respectivement utilisés pour stimuler l'activité laccase du genre *Polyporus* (*versicolor* et *ostreatus*) et de *Fomes annosus*.

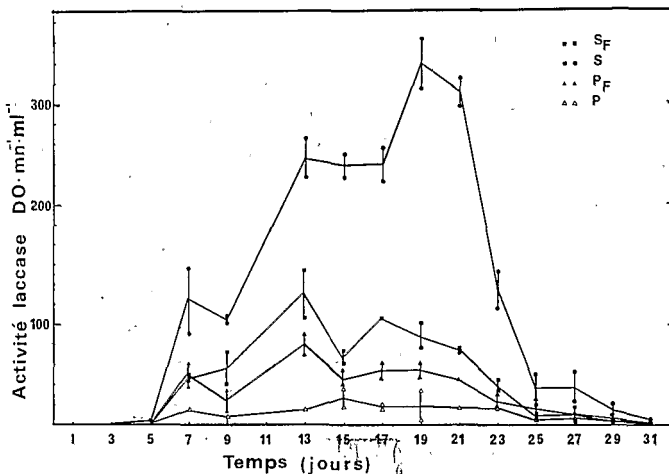


FIG. 5. — Induction *in vitro* de l'activité laccase : variation, au cours du temps, de l'activité enzymatique du parasite cultivé sur 4 milieux renfermant différents types de tissus d'Hévéa.

— *In vitro* laccase activity induction. Variation, according to the tissue, of parasite enzymatic activity, cultivated on 4 media containing different rubber tissues types.

Après 21 j, on observe une chute brutale de l'activité enzymatique qui pourrait résulter soit de l'action repressive de métabolites fongiques excrétés par *R. lignosus* dans le milieu, soit de l'action inhibitrice de certains composés solubles résultant de la dégradation des parois de l'hôte, celle-ci favorisant également une perte de la valeur nutritionnelle du bois.

Les tissus parasités P stimulent faiblement les activités laccases. En début de culture, les parois des cellules, déjà fortement altérées, contiennent de nombreux produits de dégradation des lignines dont l'action inhibitrice, également rapportée par GRABBE *et al.* (1968) sur *Polystictus versicolor*, serait prépondérante.

La zone du front de progression (S_F et P_F) apporte cependant les résultats les plus intéressants. Les laccases produites en culture sur chacun des deux types de tissus, présentent une activité 3 à 4 fois inférieure à celle enregistrée avec le tissu sain S. Elle suit sensiblement la même évolution au cours du temps pour les deux cultures, quoique d'intensité plus faible pour le tissu parasité du front P_F . Cette observation mérite une attention particulière. En effet, S et S_F ne sont macroscopiquement pas différenciables et la différence d'aptitude des deux tissus sains à induire l'activité laccase peut s'expliquer par la proximité de P_F . A ce niveau, une diminution du potentiel trophique du bois demeure vraisemblablement encore très faible. Aussi peut-on penser que l'influence de P_F sur S_F , traduite par une baisse du pouvoir inducteur de ce dernier, s'exerce par la diffusion, de l'un vers l'autre, de composés de type phénolique résultant de la décomposition du bois par les laccases. En effet, celles-ci, très actives dans ce tissu, assurent une dégradation oxydative de la lignine (GEIGER et HUGUENIN, 1981); elle libèrent des composés phénoliques dont certains, d'après KIRK et CHANG (1971), ont un pouvoir fongitoxique non négligeable.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'apprécier la répartition de *R. lignosus* dans un pivot d'Hévéa infecté. Elle montre, grâce au dosage de la glucosamine des parois de ce champignon, que la masse parasitaire, importante dans les tissus anciennement colonisés, diminue à mesure que l'on s'approche du front de progression du parasite, pour s'annuler dans les tissus sains.

Une mesure conjointe des activités laccases du champignon dans ces mêmes tissus met en évidence une relation inverse entre la masse parasitaire et cette activité enzymatique, suggérant une possibilité de contrôle de la production des laccases par des produits de dégradation du bois.

En effet la culture du parasite sur les quatre types de tissus révèle sans ambiguïté, le pouvoir inducteur considérable des tissus sains S par opposition à celui, beaucoup plus faible, des tissus parasités P. La situation au niveau du front de progression est semblable pour les deux tissus S_F et P_F . Le tissu sain, bien qu'étant dépourvu de mycélium et ne présentant aucune activité laccase, possède un pouvoir inducteur voisin de celui du tissu parasité, mais très inférieur aux potentialités inductrices des tissus sains éloignés du front. De ce fait, la diffusion d'un ou plusieurs produits de dégradation des lignines, contrôlant l'activité laccase, est une hypothèse à prendre en considération lors d'une prochaine expérimentation.

Cette étude conforte l'idée selon laquelle les laccases excrétées par *R. lignosus* jouent un rôle important dans la pathogenèse de la pourriture blanche des racines d'Hévéa. Elle laisse entrevoir par ailleurs l'existence d'un mécanisme de régulation de cette enzyme par les sous-produits de l'activité métabolique du parasite sur les tissus de l'hôte. Ce contrôle apparaît cependant très complexe, puisque des composés de même nature sont à la fois inducteur et inhibiteur.

BIBLIOGRAPHIE

- ARIMA K. et UOZUMI T., 1967. — A new method for estimation of the mycelial weight in Koji. *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 119-123.
- ANDER P. et ERIKSSON K. E., 1978. — Lignin degradation and utilization by microorganisms. *Prog. Ind. Microbiol.*, **14**, 1-58.
- BAREYRE M. J. et BOISSON C., 1969. — Relations entre la morphogenèse de l'appareil végétatif non agrégé de *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim et le métabolisme respiratoire des filaments caractéristiques des deux phases de développement. *C. R. Acad. Sc.*, **268**, série D, 2256-2259.
- BOAS N. F., 1953. — Methods for the determination of hexosamines in tissue. *J. Biol. Chem.*, **204**, 553-563.
- BOISSON C., 1968. — Mise en évidence de deux phases mycéliennes successives au cours du développement de *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. *C. R. Acad. Sc.*, **266**, série D, 1112-1115.
- BOISSON C., 1973. — De la basidiospore au rhizomorphe, déterminisme de l'agrégation chez le basidiomycète *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. *Thèse Doct. Etat.*, Université Paris-Sud, Paris.
- CHET B. I. et HUTTERMANN A., 1980. — Chemical composition of hyphal walls of *Fomes annosus*. *Eur. J. For. Pathol.*, **10**, 65-70.
- DARGENT R., 1977. — Cytodifférenciation et croissance apicale chez les champignons filamenteux *Achlya bisexualis* Coker, *Mucor mucedo*. Linné, *Hypomyces chlorinus* Tulasne), *Thèse Doct. Etat.*, Université P. Sabatier, Toulouse.
- DONALD W. W., 1974. — Chitin: a quantitative measure of fungal growth in stored corn and soybean seeds. *Proc. Amer. Soc.*, **1**, 105.
- GALUN E., 1972. — Morphogenesis of *Trichoderma*, Autoradiography of intact colonies labeled by ^3H N-acetylglucosamine as a marker of new cell wall biosynthesis. *Arch. Mikrobiol.*, **86**, 305-314.
- GEIGER J. P., 1973. — Aspects physiologiques et biochimiques de la spécialisation parasitaire. Cas particulier des *Corticium rolfii* (Sacc.) Curzi et *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. Étude *in vitro*. *Thèse Doct. 3^e Cycle*, Université Paris-Sud. Paris.
- GEIGER J. P. et HUGUENIN B., 1981. — Action *in vitro* d'une laccase purifiée de *Rigidoporus lignosus* (Kl.) Imazeki sur la lignine d'*Hevea brasiliensis*. *Coll. Int. Prot. Cult. Trop.*, section 1 B, 46, Lyon.
- GEIGER J. P., NANDRIS D. et GOUJON M., 1976. — Activité des laccases et des peroxydases au sein de racines d'Hévéa attaquées par le pourridié blanc (*Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim.) *Physiol. Vég.*, **14**, 271-282.
- GOTTLIEB S., DAY W. G. et PELLZAR M. J., 1950. — The biological degradation of lignin. II. The adaptation of white-rot fungi to growth on lignin media. *Phytopathology*, **40**, 926-935.
- GRABBE K., KOENIG R. et HAIDER K., 1968. — Die Bildung der Phenoloxydase und die Stoffwechselbeeinflussung durch Phenole bei *Polystictus versicolor*. *Arch. Mikrobiol.*, **63**, 133-153.
- GURUSIDDARAM S., BLANCHETTE R. A. et SHAW C., 1978. — A modified technique for the determination of fungal mass in decayed wood. *Can. J. For. Res.*, **8**, 486-490.
- HAARS A., CHET I. et HUTTERMANN A., 1981. — Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur. J. For. Pathol.*, **11**, 67-76.
- HART J. H. et SHRIMPTON D. M., 1979. — Role of stilbenes in resistance of wood to decay. *Phytopathology*, **69**, 1138-1143.
- HUTTERMANN A., GEBAUER M., VOLGER C. et ROSGER C., 1977. — Polymerisation und Abbau von Natrium-ligninsulfonate durch *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. *Holzforschung*, **31**, 83-89.
- HUTTERMANN A., HERCHE C. et HAARS A., 1980. — Polymerisation of water insoluble lignins by *Fomes annosus*. *Holzforschung*, **34**, 64-66.

- JOHANSSON M. et HÄGERBY E., 1974. — Influence of growth conditions metabolic inhibitors and phenolic compounds on the ATP pool in *Fomes annosus*. *Physiol. Plant.*, **32**, 23-32.
- KAUFMANN U. et WELLENDRE H., 1980. — Mycelial growth and extracellular laccase activity of *Fomes annosus* in response to cellobiose and sodium ligninsulfonate. *Eur. J. For. Pathol.*, **10**, 90-95.
- KIRK T. K., 1971. — Effect of microorganisms on lignin *Annu. Rev. Phytopathol.*, **9**, 185-210.
- KIRK T. K., HARKIN J. M. et COWLING E. B., 1968. — Degradation of the lignin model compound syringylglycol-B-guaiacyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 145-163.
- KIRK T. K. et CHANG H. M., 1971. — Decomposition of lignin by white-rot fungi. I. Isolation of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforschung*, **28**, 217-222.
- LANGCAKE P. et DRYSDALE R. B., 1975. — The role of pectic enzyme production in the resistance of tomato to *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.*, **6**, 247-258.
- LANGCANKE P. et WICKINS S. G. A., 1975. — Studies on the action of the dichlorocyclopropanes on the host parasite relationship in the rice plant disease. *Physiol. Plant. Pathol.*, **7**, 113-126.
- LEONOWICZ A. et TROJANOWSKI, 1975. — Induction of a new laccase form in the fungus *Pleurotus ostreatus* by ferulic acid. *Microbios*, **13**, 167-174.
- MAYAMA S., REHFELD D. W. et DALY J. M., 1975. — A comparison of the development of *Puccinia graminis tritici* in resistant and susceptible wheat based on glucosamine content. *Physiol. Plant Pathol.*, **7**, 243-257.
- NOGUCHI A., SHIMADA M. et HIGUCHI T., 1980. — Studies on lignin biodegradation I. Possible role of non-specific oxydation of lignin by laccase. *Holzforschung*, **34**, 86-89.
- RIDE J. P. et DRYSDALE R. B., 1971. — A chemical method for estimating *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* in infected tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.*, **1**, 409-420.
- RIDE J. P. et DRYSDALE R. B., 1972. — A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi of plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.*, **2**, 7-15.
- ROSEMAN S. et DAFFNER I., 1956. — Colorimetric method for determination of glucosamine and galactosamine. *Ann. Chem.*, **28**, 1743-1746.
- SEITZ L. M., SAUER D. B., BURROUGHS R., MOHR H. E. et HUBBARD J. D., 1979. — Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology*, **69**, 1202-1203.
- SELIN J. F. et SUNDMAN V., 1971. — Microbial action on lignosulfonates. *Finska Kemisto. Medd.*, **80**, 11-19.
- SHARMA P. D., FISHER P. J. et WEBSTER J., 1977. — Critique of the chitin assay technique of estimation of fungal biomass. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **69**, 479-483.
- SWIFT M. J., 1973. — The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi. *Soil Biol. Biochem.*, **5**, 321-332.
- TATAREAU J. C. et TOUZÉ A., 1975. — Growth estimation of *Colletotrichum lagenarium* on an heterogeneous medium. *Mycopathologia*, **56**, 35-37.
- TOPPAN A., ESQUERRÉ-TUGAYE M. T. et TOUZÉ A., 1976. — An improved approach for the accurate determination of fungal pathogens in diseased plants. *Physiol. Plant Pathol.*, **9**, 241-251.
- TRACEY M. V., 1955. — Chitin. Dans *Modern Methods of Plant Analysis*, II, K. PEACH et M. V. TRACEY, éd., Springer-Verlag, Berlin, 264-274.
- VESSEY J. C. et PEGG G. F., 1973. — Autolysis and chitinase production in cultures of *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **60**, 133-143.
- WHIPPS J. M. et LEWIS D. H., 1980. — Methodology of a chitin assay. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **74**, 416-418.
- WU L. C. et STAHMANN M. A., 1975. — Chromatographic estimation of fungal mass in plant materials. *Phytopathology*, **65**, 1032-1034.