

**MISE AU POINT DE METHODES DE TESTS DE SENSIBILITE AUX
PHYTOPHTHORA SUR SEMENCEAUX DE CACAOYERS ET SUR AUTRES
PLANTES DICOTYLEDONES A DEVELOPPEMENT EPIGE**

par

G. BLAHA ET R. A. MULLER

Laboratoire de Phytopathologie, IFCC, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cédex, France

RESUME

En vue d'évaluer l'agressivité respective de divers isolats géographiques de *Phytophthora* du cacaoyer, des tests de sensibilité sont effectués d'une part, sur de très jeunes plants d'Amelonado et d'autre part sur toute une gamme de plantes originaires soit de pays tempérés, soit de pays tropicaux.

En faisant apparaître des pathogénies différentes entre les isolats, les essais successifs qui sont décrits ici sur les très jeunes cacaoyers donnent la technique d'élevage en laboratoire et font état de l'amélioration de la méthode d'infection pour sa standardisation.

En soumettant toute une gamme de plantes diverses aux infections, il est possible de caractériser plusieurs souches entre elles vis-à-vis de la même plante mais aussi une même souche vis-à-vis de plusieurs plantes.

L'établissement d'une gamme d'hôtes différentiels et la connaissance de la pathogénie sur cacao permettraient surtout de discerner le niveau de spécialisation parasitaire atteint pour chaque isolat.

PERFECTING TEST METHODS FOR SENSITIVITY TO PHYTOPHTHORA FOR USE ON CACAO SEEDLINGS AND ON OTHER DICOTYLEDONOUS PLANTS WITH EPIGEAL DEVELOPMENT

SUMMARY

In order to assess the respective aggressivity of various geographical isolates of Cacao *Phytophthora*, sensitivity tests are made on very young Amelonado plants and also on a range of plants originating from either temperate or tropical countries.

The successive trials on very young Cacao seedlings described here show differences in pathogenesis between isolates and open the way to a breeding technique in the laboratory and lead to improvement of the infection method through its standardization.

If a whole range of different plants is subjected to infection, it is possible to characterize several strains in relation to the same plant and also a single strain in relation to several plants.

The establishment of a range of differential hosts and knowledge of pathogenesis in Cacao would, in particular, make it possible to determine the level of parasitic specialization for each isolate.

FORMULACION DE METODOS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS PHYTOPHTHORA EN PLANTULAS DE CACAO Y OTRAS PLANTAS DICOTILEDONEAS DE DESARROLLO EPIGEO

RESUMEN

Con el fin de evaluar la agresividad respectiva de las distintas cepas puras geográficas del *Phytophthora* del cacao se realizaron pruebas de sensibilidad por un lado sobre plantas muy jóvenes de Amelonado y por otro lado sobre toda una gama de plantas originarias de países templados y de países tropicales.

Al hacer aparecer patogenicias diferentes entre las cepas puras, los ensayos sucesivos con cacaoteros muy jóvenes que se describen aquí dan la técnica del cultivo en laboratorio y dan cuenta de la mejora del método de infección para su normalización.

Al someter a toda una gama de plantas diversas a las infecciones es posible caracterizar varias cepas entre ellas respecto a la misma planta y también de una misma cepa respecto a varias plantas.

Sobre todo el establecimiento de una gama de anfitriones diferenciales y el conocimiento de la patogenicia sobre el cacao permitiría el discernir el nivel de especialización parasitaria alcanzado por cada cepa pura.

INTRODUCTION

Le laboratoire de Phytopathologie de l'IFCC à Montpellier a constitué une collection mondiale de souches de *Phytophthora* du cacaoyer dans le but de contribuer à la clarification de la distinction de ces organismes en se fondant sur des critères autres que morphologiques. Les critères retenus pour cette dis-

tinction sont des critères cytologiques, physiologiques et pathogéniques.

On ne traite ici que de ces derniers au double point de vue de l'agressivité vis-à-vis du cacaoyer, sur organes autres que les cabosses, et, de la spécialisation parasitaire sur une gamme d'hôtes différentiels.

L'évaluation de l'agressivité vis-à-vis du cacaoyer de ces divers isolats géographiquement distincts et de

leur spécialisation parasitaire a nécessité la mise au point de tests d'infection d'une part sur de très jeunes plants Amelonado et d'autre part sur une gamme de plantes originaires soit de pays tempérés, soit de pays tropicaux.

ETUDE DE L'AGRESSIVITE DES *PHYTOPHTHORA*
VIS-A-VIS DU CACAOYER: INFECTIONS SUR
RACINES DE JEUNES SEMENCEAUX

L'adoption d'une méthode d'infection repose sur le choix de la nature et du mode d'application de l'inoculum.

Plusieurs méthodes d'infection ont été expérimentées sur de très jeunes semenceaux. Inspirées de la méthode utilisée au Ghana^{1,2,3,4} et en Côte d'Ivoire⁵ sur fèves prégermées, elles en diffèrent cependant essentiellement du fait que les cotylédons sont préservés de tout contact avec l'inoculum et que le système racinaire, seul soumis à l'agression, est à un stade déjà bien différencié.

Pour définir le pouvoir pathogène d'une souche, le critère d'appréciation le plus évident et le plus facile à observer est le taux de mortalité: c'est celui qui apparaît le plus souvent dans cette communication. L'état végétatif des survivants permet aussi une appréciation de cette agressivité: par exemple, ralentissement de la croissance se traduisant par la diminution de la hauteur totale du plant, la réduction de la

longueur des entre-nœuds, la réduction du nombre de feuilles, et, d'une façon générale, la réduction du poids sec des parties aériennes par rapport aux témoins non infectés.

1 — Matériel végétal

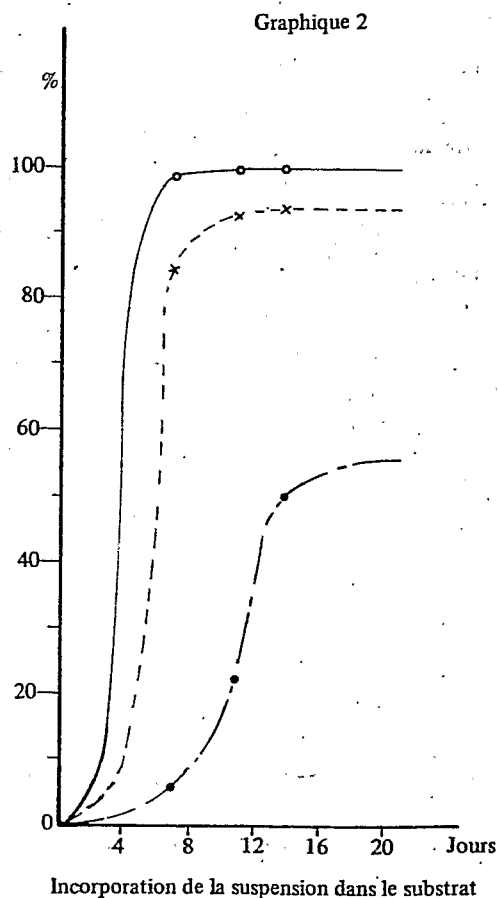
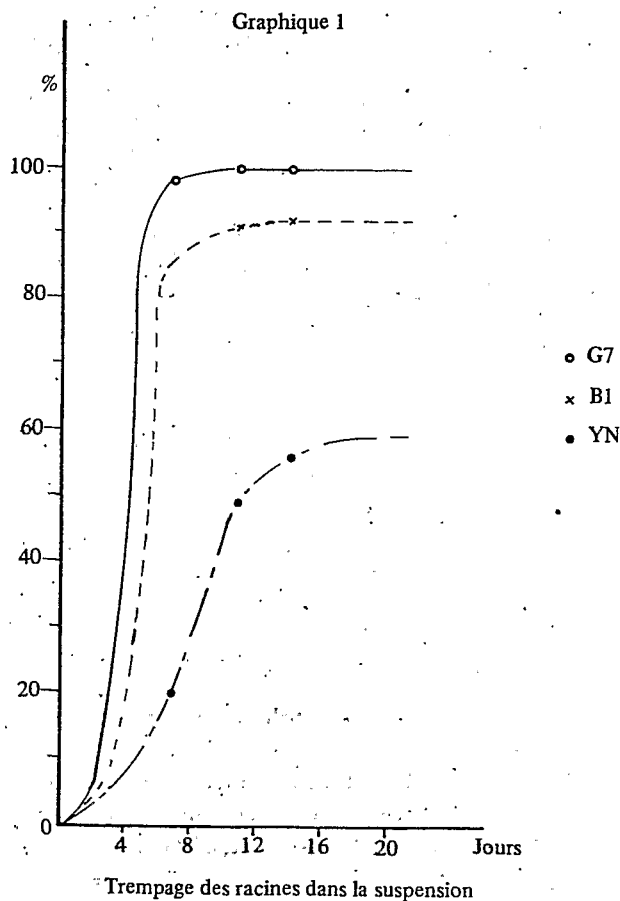
Les cacaoyers utilisés sont des "Amelonado" provenant de Bingerville (Côte d'Ivoire) que l'on peut considérer comme relativement homogènes au plan génétique et dont la sensibilité aux *Phytophthora* locaux a été reconnue en plantation par infections artificielles sur les cabosses.

Les fèves sont mises à germer dans de la vermiculite stérile et humidifiée à l'eau distillée stérile. La germination se fait à la température ambiante qui oscille entre 25 et 30°C. Les infections sont effectuées en cours de levée c'est-à-dire 8 à 10 jours après la germination. A ce stade de développement, le système racinaire bien différencié présente un pivot et un chevelu de racelles latérales.

2 — Nature de l'inoculum et mode d'application

Trois souches de *Phytophthora* bien distinctes par leur origine géographique et leur caractère morphologique nous permettront d'illustrer l'influence de la nature de l'inoculum: une souche de Brésil (B₁), une souche du Ghana (G₁) et une souche du Cameroun (YN).

Pour ces trois souches, le pouvoir pathogène d'une



suspension de zoospores a été comparé à celui du broyat mycélien.

(a) Infection par zoospores

La suspension de zoospores est préparée à partir d'une culture sur V_8 gélosé à 1,5% et calibrée à 300-400 z/ml. Le système racinaire est soit trempé entièrement dans cette suspension pendant une minute environ, soit introduit dans de la vermicule humide à laquelle a été incorporée la suspension de zoospores. Le repiquage du semenceau se fait dans les deux cas dans un godet en plastique dont la base trempe dans de l'eau distillée. Onze jours après, les mortalités les plus élevées sont données par G_7 et B_1 , la moins forte par YN.

Tableau non disponible

(b) Infection par broyat mycélien

Les souches de *Phytophthora* sont conduites sur V_8 liquide à raison de 80 ml par flacon, à l'obscurité et à 25°C pendant 20 jours. Ces conditions de cultures offrent l'avantage de fournir un mycelium presque exclusivement végétatif; le développement en milieu liquide et à l'obscurité réduit fortement la formation des sporocystes et l'agitation des cultures tous les deux jours évite la libération de zoospores au moment du broyage. Le jour de l'infection, les cultures sont

lavées à l'eau distillée stérile et essorées sur des filtres en verre fritté. Le mycelium retenu est pesé après réimbibition jusqu'à refus, puis broyé pendant une minute à raison de 10 g pour 100 ml d'eau distillée stérile. Le broyat est dilué 5 fois au moment de l'infection.

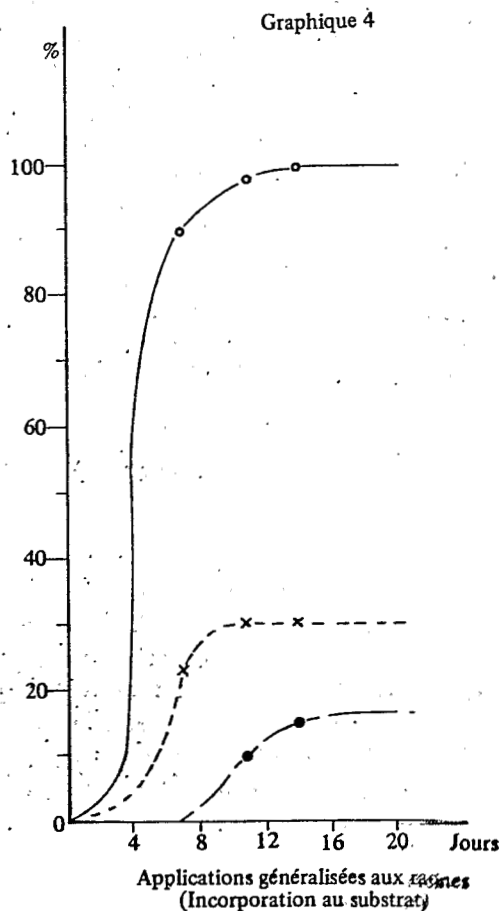
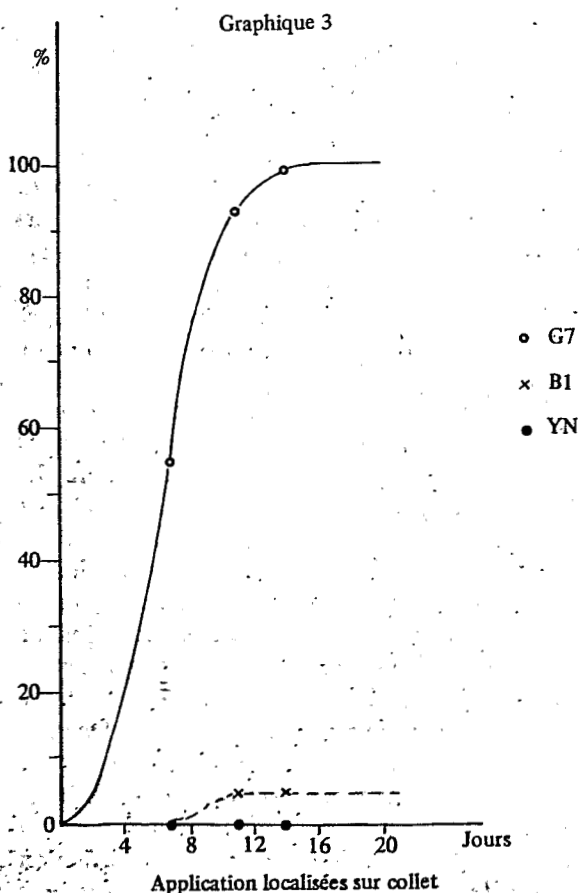
L'application du broyat peut se faire de deux façons: soit en versant directement 10 ml de la suspension à l'aide d'une pipette au niveau des racelles supérieures, soit indirectement en le mélangeant à la vermiculite dans laquelle on repique le jeune semenceau: 120 ml de broyat et 30 ml de vermiculite stérile et sèche, soigneusement mélangés, permettent de remplir un godet en plastique de 9 x 9 cm de côté sur 10 cm de profondeur dans lequel seront repiquées 4 plantules d'Amelonado. 5 godets (soit 20 plantules) sont ainsi préparés par souche pour un essai.

Avec le premier type d'infection, l'inoculum se trouve plus ou moins concentré à la base de l'hypocotyle et une partie du système racinaire peut échapper à l'agression, notamment le pivot. On peut dire qu'avec ce type d'infection, l'agression est localisée.

Avec la seconde méthode, l'infection est moins localisée, l'ensemble des racines étant au contact de l'inoculum de façon homogène. On peut dire qu'avec ce type d'infection, l'agression est généralisée.

3 — Résultats et conclusions

Onze jours après l'infection, les taux de mortalité font apparaître une meilleure distinction de l'agressi-



tivité des souches lorsque le broyat mycélien est appliqué selon la seconde technique.

Tableau non disponible

— Les résultats obtenus avec les différents types d'infection font ressortir le même classement des souches en ce qui concerne leur agressivité vis-à-vis des racines du cacaoyer:

$$G_7 > B_1 > YN$$

— Cependant la distinction des souches G_7 et B_1 lorsque les infections sont réalisées avec les zoospores est difficile: ces deux souches semblent présenter une agressivité très voisine et forte par rapport à YN.

— De même B_1 et YN semblent avoir une agressivité très voisine et faible lorsque le broyat mycélien est localisé à la base de l'hypocotyle.

— Par contre, une meilleure différenciation des souches apparaît lorsque tout le système racinaire est soumis à l'agression d'un broyat mycélien uniformément réparti dans le substrat. Signalons de plus, qu'il est toujours possible de réisoler le champignon à partir du mélange broyat-vermiculite même un mois après avoir réalisé l'expérience.

Nous en concluons que la méthode d'infection du système racinaire par un broyat mycélien incorporé au substrat, semble être la plus satisfaisante pour la réalisation de tests systématiques d'agressivité. Cette méthode est de plus facile à standardiser.

ETUDE DE LA SPECIALISATION PARASITAIRE DES
PHYTOPHTHORA: INFECTIONS SUR DIFFERENTES
PLANTES DICOTYLEDONES A DEVELOPPEMENT EPIGE

Le degré de spécialisation parasitaire des *Phytophthora* du cacaoyer peut s'apprécier par l'étude de leurs possibilités d'infection d'une gamme de plantes différentielles qu'il convient de définir. Nous nous sommes inspirés des travaux déjà réalisés dans ce domaine par Babacauh Koffi Dongo en Côte d'Ivoire⁵ et par Kohler de l'équipe Orstom de Brazzaville.⁷

1 — Matériel végétal

Un premier inventaire (cf. annexe) a permis de retenir: l'aubergine, le melon, la roselle et le cotonnier comme plantes réceptrices de façon évidente mais à des degrés divers à la plupart de nos souches de *Phytophthora*.¹ Ces plantes sont cultivées à partir de graines sur de la vermiculite stérile humectée d'eau distillée stérile. On échelonne les semis pour que les différentes espèces aient atteint un stade convenable au moment de l'infection.

¹ Nous remercions le docteur Azaré Nyako pour sa collaboration dans la réalisation de cette partie de notre programme.

2 — Mode d'infection et interprétation des symptômes

Les cultures des souches de *Phytophthora* sont menées sur V_8 liquide (80 ml par flacon maintenu à l'obscurité à 25°C pendant 20 jours). L'inoculum est un broyat mycélien obtenu en passant au broyeur à 10.000 tours pendant 1 mn, 10 g de mycelium frais dans 100 ml d'eau distillée stérile. 1 ml de ce broyat non dilué est déposé au collet de chaque plantule. La vermiculite est buttée ensuite à la base de la tige pour éviter le dessèchement de l'inoculum.⁷

Plusieurs critères d'appréciation du pouvoir pathogène ont été retenus:

— le taux de mortalité (ou le taux de survivants)

— le taux de plants présentant des nécroses (on notera à ce sujet que le "test alcool" qui fait apparaître une zone brune signe de réaction, permet de déceler les zones de pénétration)

— la longueur de la tige (hypocotyle et épicotyle)

— le poids sec des racines formées

— le poids sec des parties aériennes.

Selon la réaction de la plante, un, deux ou plusieurs de ces critères peuvent être exploités.

3 — Résultats et conclusions

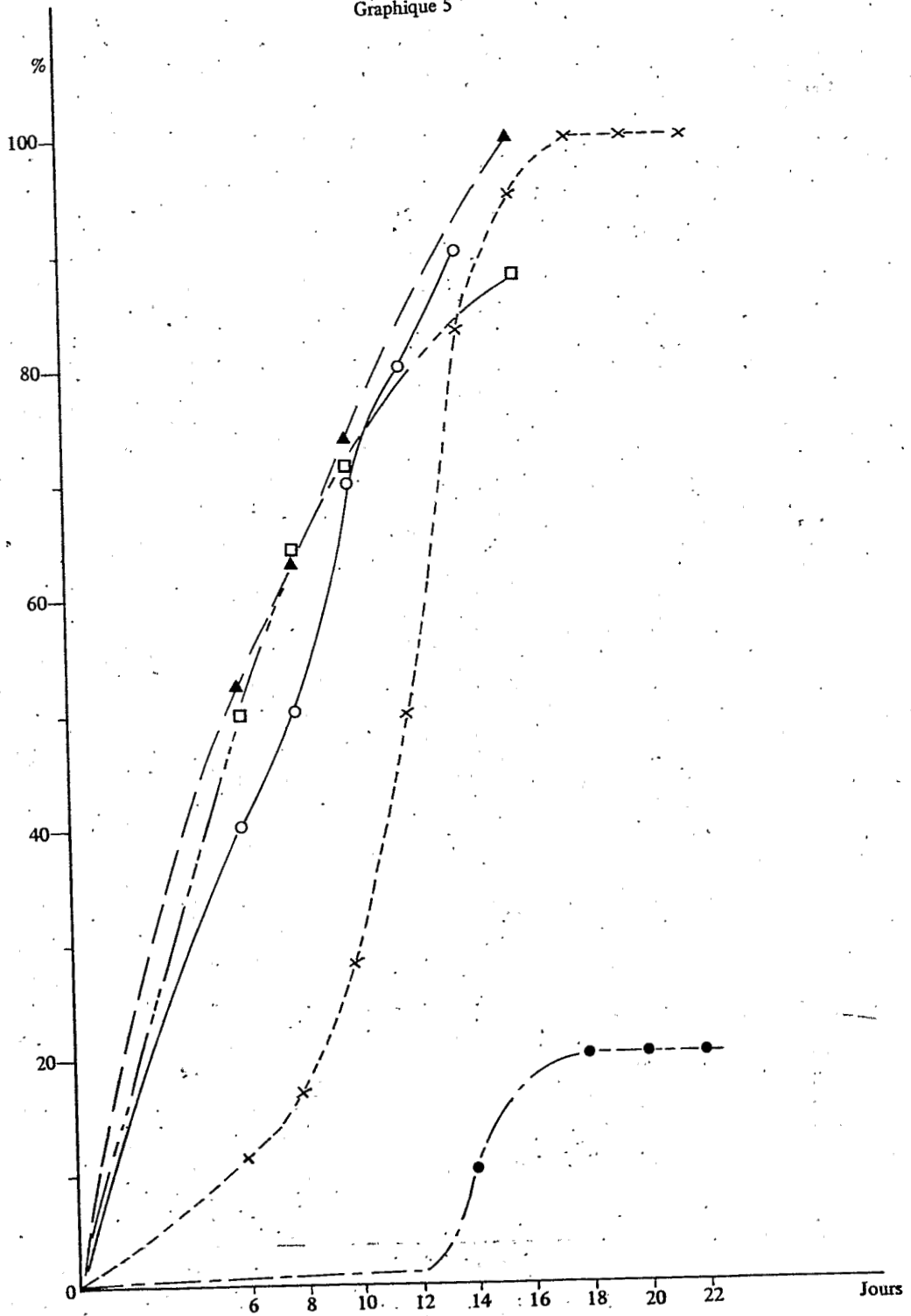
Les résultats sont donnés dans le tableau 3 en ce qui concerne le taux de mortalité. Les trois souches, brésilienne, ghanéenne et camerounaise se comportent très différemment vis-à-vis des diverses espèces: G_7 est très agressive vis-à-vis de toutes les plantes alors que YN ne les attaque que faiblement.

Tableau non disponible

L'aubergine semble une bonne plante différentielle permettant un classement net de ces trois souches. Le melon malgré une forte sensibilité aux deux souches B_1 et G_7 dès la première semaine, permet cependant de distinguer des différences d'agressivité entre ces deux souches. Les deux variétés de cotonnier réagissent de façon identique à G_7 (ou YN) mais différemment à B_1 .

Les résultats obtenus à partir d'une gamme d'hôtes différentiels doivent apporter des informations sur la plus ou moins grande spécialisation parasitaire des souches de *Phytophthora* mais aussi sur les modalités et sur les effets de l'agression. Une corrélation semble en effet exister entre taux de mortalité et réduction de croissance en poids et en volume des parties aériennes (exemple donné par le melon). Cette réduction de croissance est donc un critère à ne pas négliger surtout chez les plantes qui ne présentent aucune mortalité (exemple donné par la tomate et les piments). De plus, le test alcool serait à appliquer systématiquement sur tous les survivants de façon à déceler avec certitude ceux qui, ayant été agressés, ont réagi à l'agression (exemple donné avec la Roselle): s'il y a eu réaction de défense, le site d'inoculation présente un anneau brun très visible lorsqu'on le plonge dans l'éthanol à 95° gl.

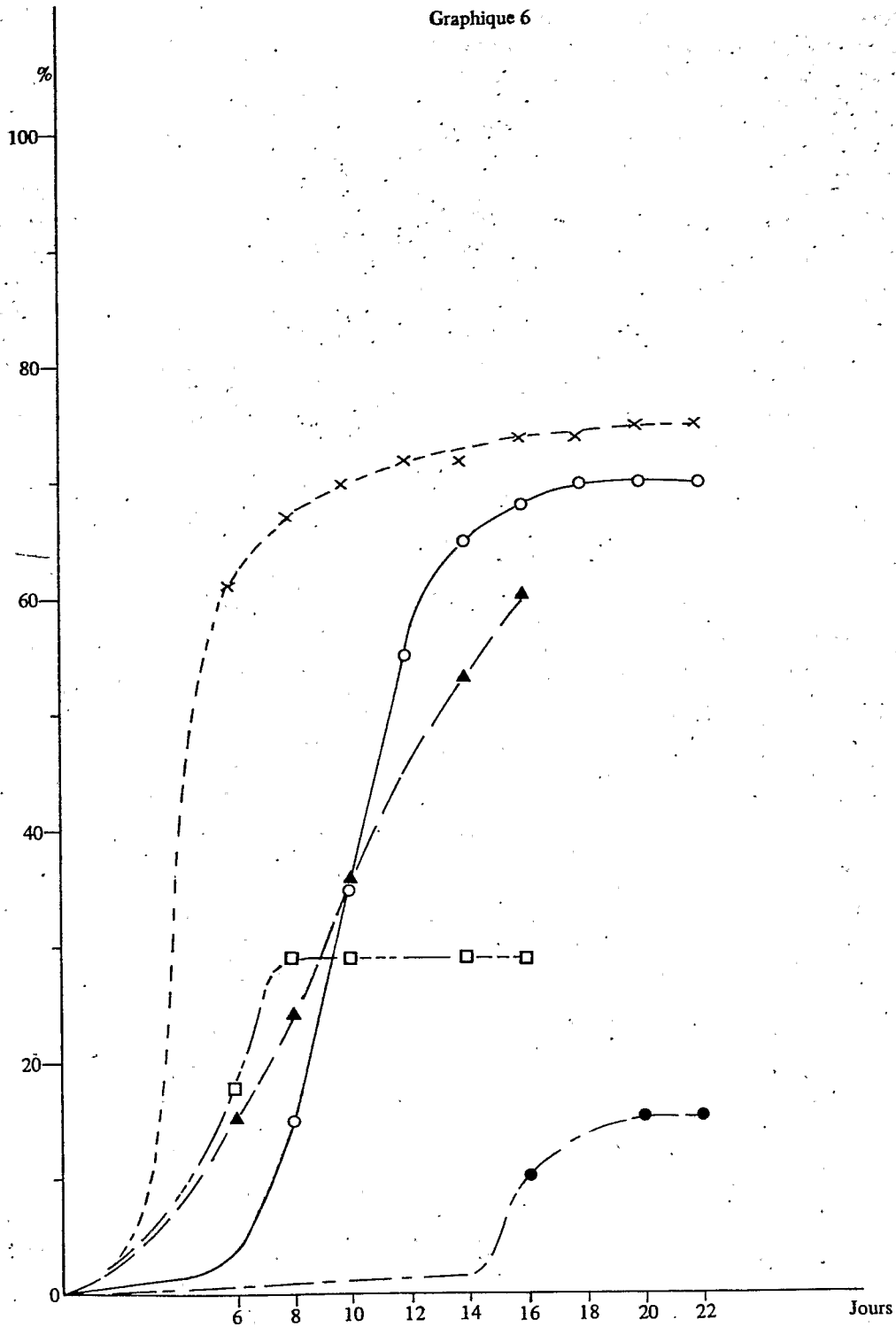
Graphique 5



- Aubergine
- × Melon
- Roselle
- ▲ Coton SR1
- Coton glandless

TAUX DE MORTALITE EN FONCTION DE LA SOUCHE : G7

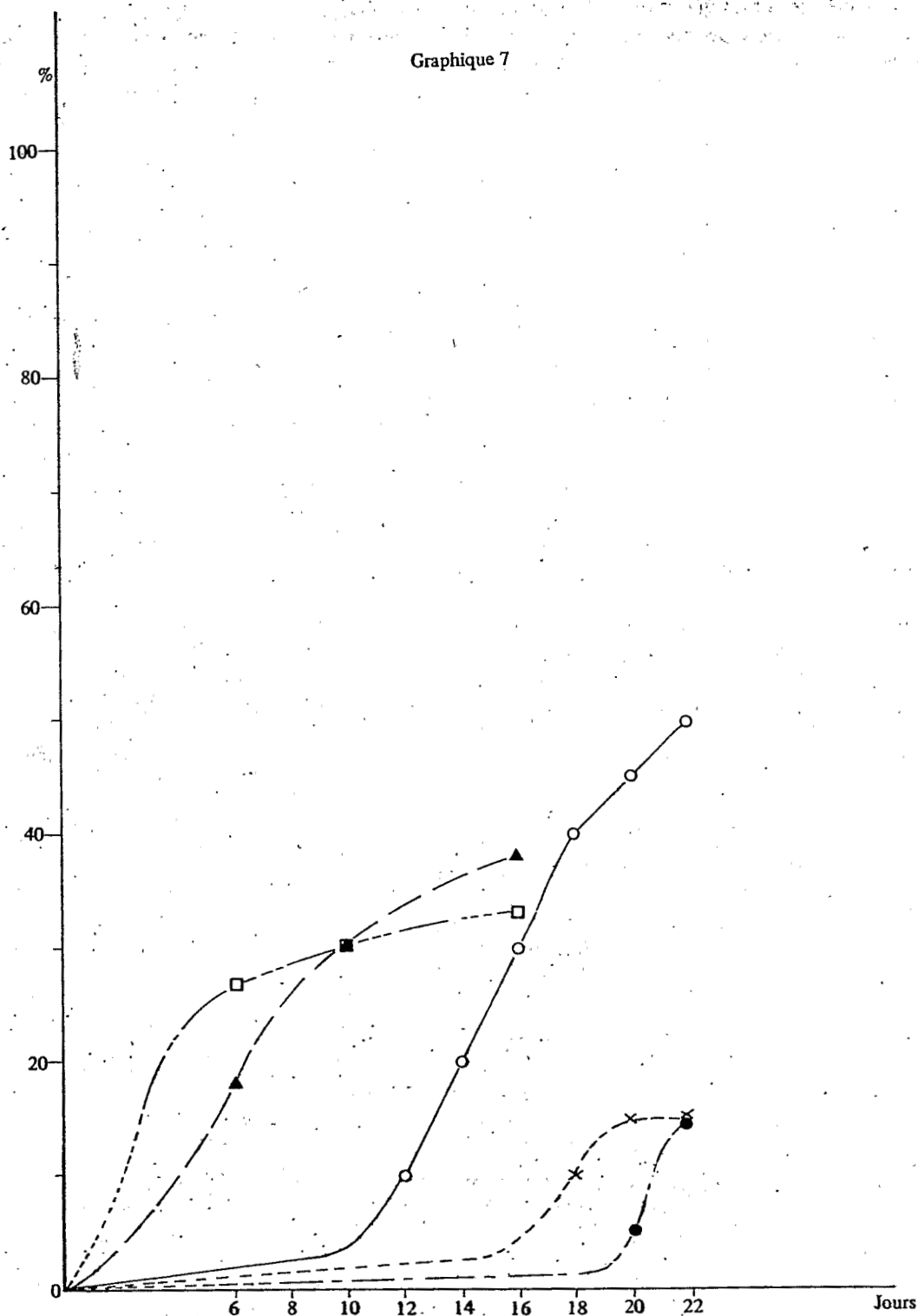
Graphique 6



- Aubergine
- × Melon
- Roselle
- ▲ Coton SR1
- Coton glandless

TAUX DE MORTALITE EN FONCTION DE LA SOUCHE : B1

Graphique 7



- Aubergine
- × Mefon
- Roselle
- ▲ Coton SR1
- Coton glandless

TAUX DE MORTALITE EN FONCTION DE LA SOUCHE : YN

Enfin la technique d'infection doit être simple. Si le dépôt au niveau des collets semble valable, on peut envisager aussi l'incorporation du broyat au substrat ou l'infection directe sur les divers organes de la plante afin de distinguer le degré de spécialisation parasitaire des souches au niveau des différents tissus de la plante-test.

CONCLUSIONS GENERALES

Les résultats obtenus nous conduisent à penser que l'inoculum le plus recommandable pour des études systématiques de l'agressivité des *Phytophthora* du cacaoyer sur organes autres que les cabosses ou sur d'autres plantes que le cacaoyer est un broyat mycélien que l'on peut obtenir et employer dans des conditions bien standardisées.

Les travaux réalisés pour la mise au point de tests d'infection ont apporté des informations très importantes quant aux possibilités de distinction des *Phytophthora* du cacaoyer au niveau de leur pouvoir pathogène. Il apparaît que les trois souches *Phytophthora* du cacaoyer étudiées ici et provenant l'une du Brésil (B₁), l'autre du Ghana (G₇) et la troisième du Cameroun (YN) se distinguent nettement par leur pouvoir d'agression vis-à-vis des diverses plantes auxquelles elles ont été confrontées, ce qui peut traduire une spécialisation parasitaire très différente de ces trois organismes. En particulier, on peut dire que la

souche camerounaise, peu agressive vis-à-vis des diverses espèces végétales étudiées ici, est un parasite plus spécifique du cacaoyer que les deux autres souches.

Nos investigations en cours portant sur un plus grand nombre d'isolats tendent à montrer que les *Phytophthora* prélevés en Afrique de l'Ouest sont peu spécialisés alors que ceux provenant du Cameroun et d'Amérique seraient plus diversifiés, les uns étant très spécialisés, les autres plus polyphages.

Mais l'étude va plus loin, elle permet en effet de penser que la souche camerounaise très agressive dans les conditions naturelles vis-à-vis des cabosses du cacaoyer est très étroitement spécialisée à ces seules cabosses et non aux autres organes de la plante, racines en particulier, qu'elle agresse dans des proportions moindres que les deux autres souches. Faut-il conclure que la spécialisation très poussée d'un *Phytophthora* non seulement sur cacaoyer, mais aussi au niveau de la cabosse, est un bon critère de distinction spécifique permettant de prévoir la gravité potentielle des attaques au champ? C'est ce que la suite de notre étude se proposera d'éclaircir, en rattachant en particulier pouvoir pathogène vis-à-vis du cacaoyer et spécialisation parasitaire, à d'autres critères morphologiques, physiologiques et tout particulièrement cytologiques comme le nombre et la taille des chromosomes⁶ et qui sont parmi les critères les plus importants de distinction des espèces.

ANNEXES

<i>Solanacées</i>	Aubergine violette longue	(Tezier)
	Tomate de Marmande	(Tezier)
	Piment doux	(Tezier)
	Piment de Cayenne	(Tezier)
<i>Cucurbitacées</i>	Melon cantaloup charentais	(Tezier)
<i>Papilionacées</i>	Haricot nain mangetout coco blanc précoce	(Tezier)
	Haricot nain mangetout noire la victoire	(Sanrival)
	Pois nain douce Provenance	(Sanrival)
	Soja—Kent—Groupé IV	(IRAT — Montpellier)
<i>Malvacées</i>	Cotonnier SR ₁ F ₄	(IRCT — Montpellier)
	Glandless 280	(IRCT — Montpellier)
	Roselle THS 22	(IRCT — Montpellier)
	Kenaf 129	(IRCT — Montpellier)

Composition du milieu V8

V8 de la Campbell Soup Cie (1 boîte)	355 ml
Carbonate de calcium	6,0 g
Agar agar	30 g
Eau distillée	2000,0 ml