

La pourriture brune des racines d'avocatier. Etude histologique de la pénétration et de l'infection des racines par *Phytophthora cinnamomi* RANDS.

G. ASSAS M'BILLAUT*

LA POURRITURE BRUNE DES RACINES D'AVOCATIER.
Etude histologique de la pénétration et de l'infection des racines
par *Phytophthora cinnamomi* RANDS.

G. ASSAS M'BILLAUT

Fruits, fev. 1978, vol. 33, n°2, p. 107-115.

RÉSUMÉ - On étudie les modalités du parasitisme de *Phytophthora cinnamomi* chez l'avocatier. Une méthode septique a été mise au point pour l'obtention massive de sporocystes et de zoospores. Les voies de pénétration des racines de l'avocatier par les zoospores de *P. cinnamomi* ont été étudiées. Il s'agit d'une pénétration intercellulaire au niveau de deux cellules épidermiques adjacentes. La localisation du champignon dans les tissus de l'hôte est intercellulaire. Les tissus envahis par le parasite sont ceux de l'écorce et non ceux du cylindre central.

INTRODUCTION

ZENTMYER et KLOTZ (17) ont montré que *Phytophthora cinnamomi* pouvait être le facteur biologique principal de la pourriture brune des racines d'avocatier. CRANDALL (6) a étudié et montré qu'effectivement, *P. cinnamomi* était impliqué dans le déclin rapide et la mortalité des jeunes avocatiers ; les symptômes décrits étaient : pourriture et mort des radicelles, flétrissement des feuilles, dessèchement de l'arbre à l'état avancé de la maladie.

Des études ont alors été conduites pour connaître les modalités du parasitisme des souches de *P. cinnamomi* sur l'avocatier (19, 20, 2, 3).

Dans toutes les études et publications, nous n'avons pas trouvé d'article traitant des voies possibles de pénétration et d'infection des racines d'avocatiers par *P. cinnamomi* ; il nous a donc semblé intéressant d'étudier la formation du

complexe *P. cinnamomi*-avocatier.

Des travaux de ce genre ont été effectués avec certaines Pythiacées. Ainsi, CUNNINGHAM et HAGEDORN (7) ont montré que les zoospores d'*Aphanomyces euteiches* pouvaient pénétrer dans la racine des pois, soit à travers les cellules adjacentes de l'épiderme, soit directement par la paroi cellulaire épidermique. BOHER (4, 5) a montré que *P. palmivora* et *P. parasitica* variété *nicotianae*, agents de la pourriture du coeur d'ananas, pénétraient activement par le trichome pour les organes aériens et par les cellules adjacentes épidermiques dans le cas des organes souterrains. Cet auteur a également montré que, fondamentalement, la zoospore était la propagule d'infection la plus efficace, MARX et BRYAN (14), au contraire, ont trouvé qu'en l'absence de bactéries induisant la sporocystogénèse et lorsque l'humidité et le drainage ne sont pas excessifs, l'hyphe végétative de *P. cinnamomi* est potentiellement infectieuse pour les racines de pin.

Dans ce travail, nous avons étudié l'aptitude des zoospores de *P. cinnamomi* à pénétrer et à infecter les racines d'avocatier.

* - Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, B.P. 181, Brazzaville, R.P. Congo.

22 DEC. 1978

88 Collection de Référence

17 n° 8501

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'inoculum.

P. cinnamomi est une espèce qui produit très difficilement et faiblement des sporocystes en condition axénique. Aussi, avons-nous trouvé utile de développer et d'améliorer les méthodes septiques (18, 1, 13) jusqu'alors employées pour l'obtention massive des sporocystes.

Cinq implants d'une culture de 5 jours sur pois gélosé sont mis dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, contenant 20 cc de pois liquide décocté (8 p. 100), puis incubés à l'obscurité à 26°C pendant 4 jours. La masse mycélienne résultante est trois fois lavée à l'eau permutée stérile et conservée à l'obscurité à 26°C pendant 2 jours dans les dernières eaux de lavage. Ces eaux sont ensuite retirées et remplacées par un extrait de terre non stérile à 1,5 p. 100, filtré au millipore 0,8 μ .

L'incubation dans l'extrait de terre dure 3 jours ; elle s'effectue indifféremment à la lumière ou à l'obscurité.

Les zoospores sont obtenues, après 3 lavages à l'eau stérile de la masse mycélienne contenant des milliers de sporocystes, par un traitement thermique (8) : transfert de 26°C à 8°C pendant 15 mn, puis de 8°C à 26°C pendant 30 mn au moins.

Les souches de *Phytophthora* inscrites dans le tableau 1 ont été utilisées.

L'hôte.

Nous avons utilisé comme hôte, le *Persea gratissima* var. Hall.

La culture des noyaux d'avocatier a été faite en pot sur vermiculite arrosée avec du milieu SHIVE et ROBBINS (1942 a) pendant 3 mois. Les jeunes plants ont en moyenne 30 cm de haut et 0,5 cm de diamètre (figure 1B). Les racines sont pour la plupart parallèles à la surface du support (figure 2B).

Inoculation.

L'inoculation a été réalisée par trempage dans une suspension de zoospores.

- un pied d'un jeune avocatier est trempé dans la suspension de zoospores pendant 1 heure, puis remis dans la vermiculite.
- dans le cas d'étude histologique, on coupe soigneusement une radicelle de 5 cm de long. Le côté blessé est plongé dans la paraffine. La radicelle est lavée et stérilisée à l'alcool, puis est mise en contact par trempage avec les zoospores pendant 30 mn, puis transférée dans une boîte de Petri contenant le milieu SHIVE et ROBBINS. On pratique le transfert pour éviter une très forte accumulation de zoospores sur la racine.

Les racines ont été fixées après 2,8, 24, 48 et 72 h de contact avec les zoospores.

Techniques histologiques.

Fixation.

La fixation est faite dans le mélange FAA (formaline acétone-alcool), dans le rapport 9-0, 5-0, 5 pendant 24 h.

Déshydratation.

Elle est faite dans des bains d'alcool de 30 à 100° et dans du toluène absolu. Les bains durent 2 h.

Inclusion et coupes.

Les racines sont incluses dans la paraffine et coupées au microtome. L'épaisseur des coupes est de 7, 10 ou 12 μ . Les coupes pratiquées ont été longitudinales, légèrement tangentielles et transversales. Elles ont été collées à la lame avec de l'albumen d'oeuf et séchées sur une plaque chauffante à 30°C pendant une nuit.

Coloration.

Après déparaffinage des lames dans des bains de toluène, d'alcool absolu et d'alcool 95°, divers colorants ont été utilisés pour la mise en évidence du champignon dans les tissus de l'hôte :

- le noir chlorazol : durée de coloration 7 h ;
- double coloration à la safranine (30 mn) et au vert lumière (15 mn).
- double coloration au carbol-éosine (1 h) et à l'orange G (1 h).

Après coloration, les coupes sont déshydratées à l'alcool

TABLEAU 1 - Souches de *Phytophthora* utilisées.

Référence Brazzaville	Référence origine	Hôte	Organe	Date	Type de comptabilité
373	138 Californie	avocatier	sol	-	A 1
379	AV15 Cameroun	-	chancre	mars 75	A 2
421	461 Côte d'Ivoire	-	chancre	1975	A 2
438	A18 Congo	-	sol	nov. 75	A 2
439	A24 Congo	-	sol	nov. 75	A 2
440	A25 Congo	-	sol	nov. 75	A 2

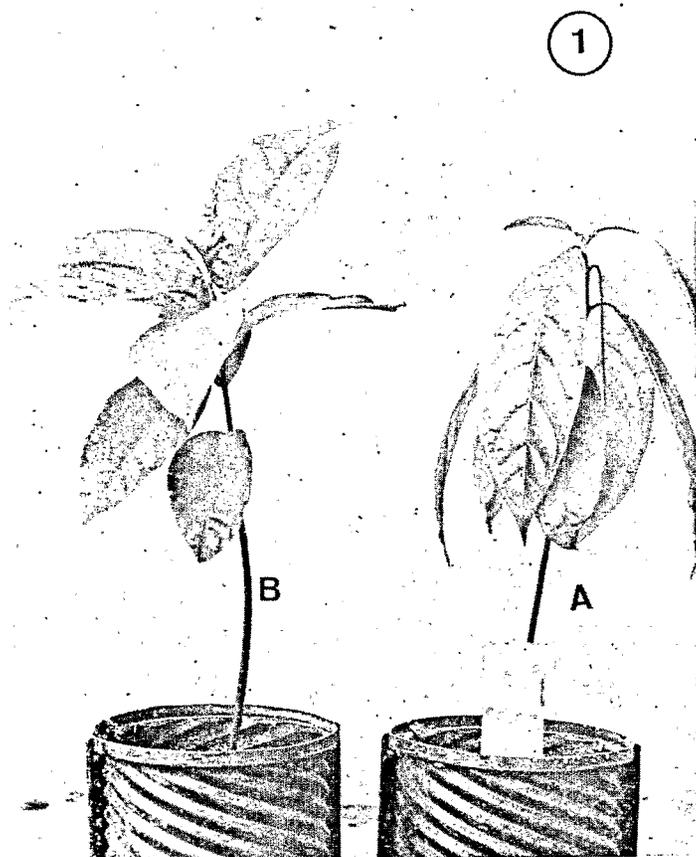
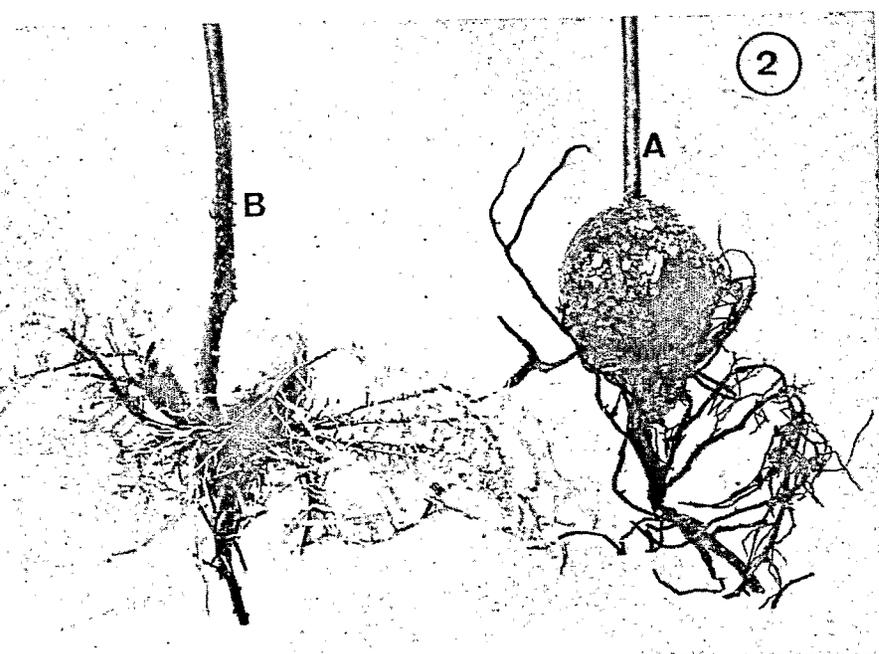


Fig. 1. Culture de jeunes avocats en pot ; le support est de la vermiculite.
A : avocatier infecté par une suspension de zoospores. Aspect du jeune plant 15 jours après infection.
B : avocatier sain - témoin(x 108).

Fig. 2. Noyaux d'avocatier ayant germé.
A : noyau infecté par des zoospores, 15 jours après.
B : témoin avec de nombreuses radicelles(x 108).



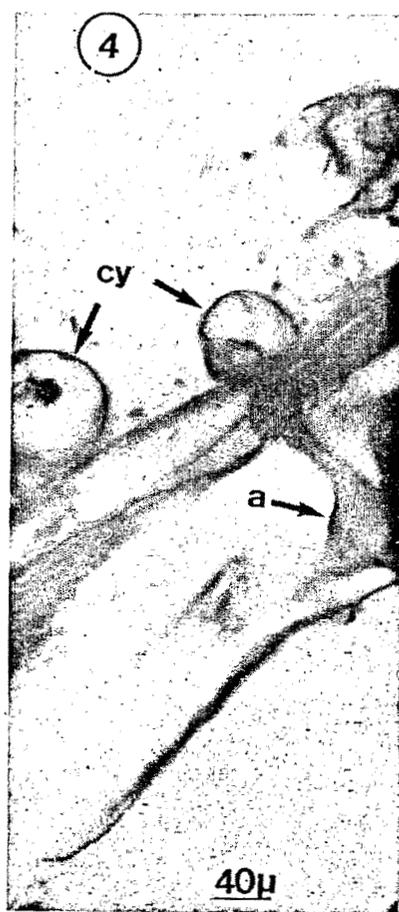
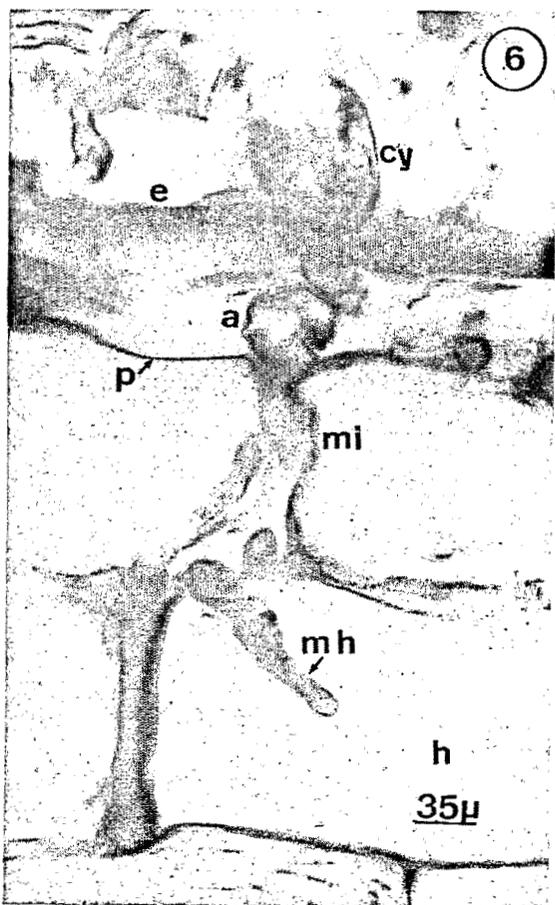
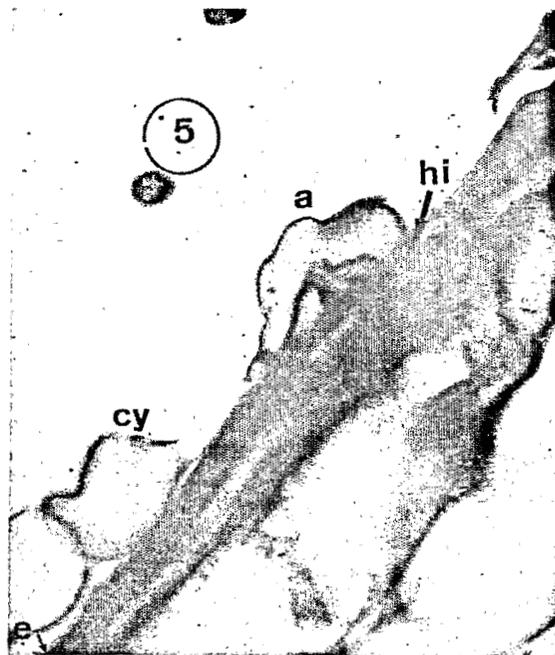


Fig. 3. Zoospore encystée et ayant germé 2 h après contact avec la racine d'avocatier. Coloration noir chlorazol. (x 900).

Fig. 4 et 5. Pénétration caractéristique intercellulaire. On retrouve ici toutes les structures, à savoir : le cyste, le tube germinatif, l'appressorium et l'hyphe d'infection. Coloration noir chlorazol ; coupe tangentielle. (x 1000).

Fig. 6. Pénétration caractéristique. L'hyphe pénètre très profondément et se ramifie en mycélium intracellulaire. Coupe longitudinale : coloration safranine-vert-lumière. (x 1500).

Abréviations :

- mi : mycélium intercellulaire.
- S : haustorium (suçoir)
- mh : mycélium intracellulaire
- cy : cytopore : cyste : zoospore encystée
- t : tube germinatif
- e : epiderme
- a : appressorium
- hi : hyphe infectieuse
- p : paroi cellulaire
- h : cytoplasme cellulaire

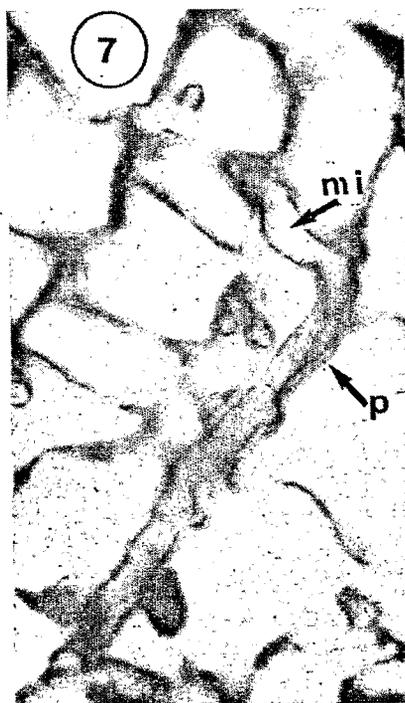
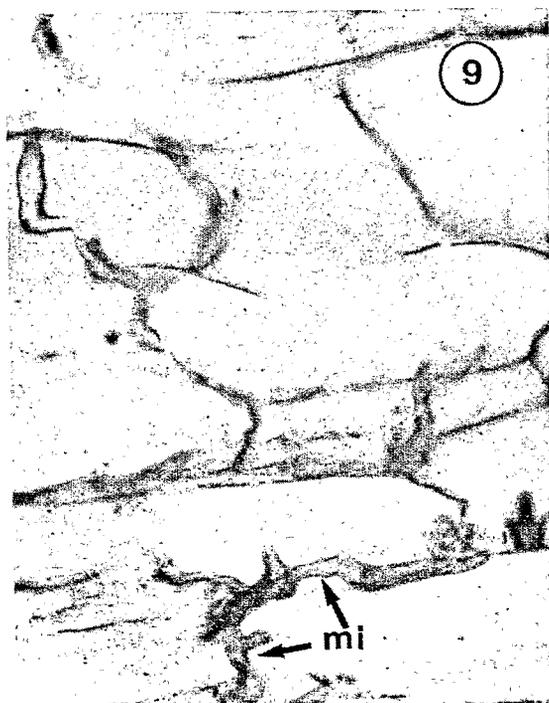
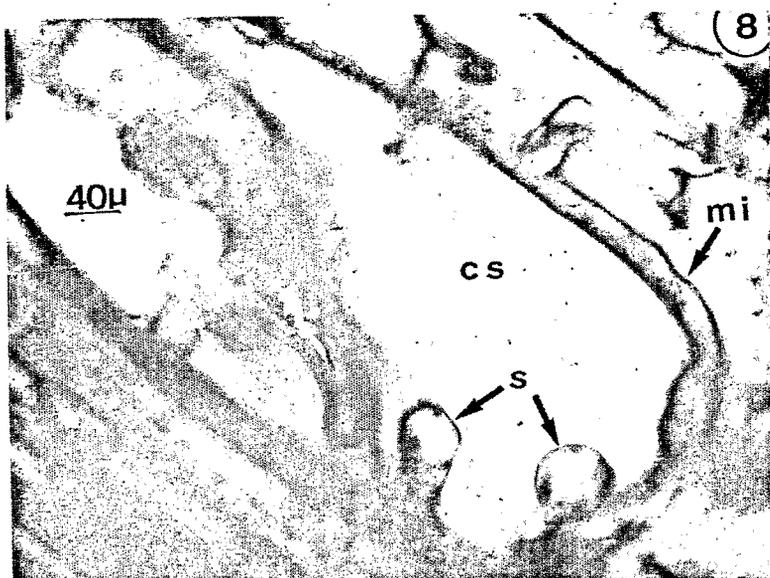


Fig. 7. Mycélium intercellulaire dans la zone de division cellulaire 24 h après infection. Coloration noir chlorazol.(x 900).

Fig. 8. Mycélium intercellulaire autour d'une cellule sécrétrice. On note des structures ressemblant au suçoir. Coloration noir chlorazol, 48 h après infection; coupe longitudinale.(x 900).

Fig. 9. Invasion de la zone de division cellulaire par l'hyphe. Coloration safranine-vert lumière ; coupe longitudinale.(x 900).

(de 70 à 100°) et au toluène (ou au xylol), puis montées avec le DPX.

Les observations ont été faites au microscope photonique Carl Zeiss à l'immersion et au contraste de phase.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Le tactisme des zoospores.

La méthode d'obtention des sporocystes donne de très bons résultats.

Ces sporocystes, traités thermiquement, libèrent des milliers de zoospores dans les 30 mn qui suivent le transfert de la masse mycélienne de 8 à 26°C, ce qui permet d'avoir des zoospores vigoureuses libérées synchroniquement.

L'observation des racines trempées dans une suspension de zoospores à la loupe binoculaire Carl Zeiss montre une attraction des zoospores.

On constate que les zoospores s'agglutinent selon certaines zones de la racine comme il est montré sur la figure 11 ; l'accumulation des zoospores est plus dense dans les zones de multiplication cellulaire (mérésis), d'élongation (auxésis) et dans un degré moindre, à la zone de différenciation qu'à la coiffe. Ces différentes zones de l'apex racinaire sont représentées par la figure 10. On constate aussi que dans les conditions de milieu ne contenant pas d'organisme ou de substance attractive, les zoospores de *P. cinnamomi* peuvent nager plus de 2 h avant de s'encyster alors qu'en présence d'un tel organisme ou de telle substance, les zoospores ne nagent guère plus de 50 mn. Cette dernière constatation va dans le sens des études faites par HICKMAN et HO (10) ; ces auteurs ont calculé la distance que pouvait parcourir une zoospore «chimio-tactiquement» dirigée ; ils ont trouvé qu'elle était de 144 mn/h. Dans les conditions de notre travail, cette distance de 144 mn est très grande, ce qui explique que les zoospores atteignent assez vite la racine trempée et s'encystent (4 à 5").

S'agit-il d'un chimiotactisme ? Nombreux sont les auteurs (15, 9, 11) qui ont montré que les zoospores de *P. cinnamomi* étaient spécifiquement attirées par les exsudats de ses plantes-hôtes. L'analyse de ces exsudats a révélé la présence des substances suivantes : acides aminés, nucléotides, sucres simples, glycosides, éthylène ... Ce sont ces substances qui attirent donc les zoospores. Il n'est pas inutile de préciser que la densité de l'accumulation des zoospores selon les zones de la racine est en rapport avec les lieux d'exsudation de ces substances qui, d'après TURNER (16) stimulent la germination des zoospores, ou l'inhibent partiellement.

Études de la pénétration.

Les zoospores adhèrent aux cellules de l'épiderme. Avant de germer, elles s'encystent avec perte de flagelles.

2 h après l'inoculation, la plupart des zoospores germent en émettant un tube germinatif de diamètre moyen de 6,4 μ (figure 3).

Le tube germinatif peut courir le long de l'épiderme comme le montre la figure 5 ou pénétrer directement dans les cellules de l'hôte (figure 4).

8 h après l'inoculation, le tube germinatif s'enfle en un appressorium au niveau de deux cellules épidermiques adjacentes. De cet appressorium se forme une hyphe infectieuse qui pénètre entre deux cellules (figures 4 et 5).

Le champignon pénètre assez profondément dans les tissus de l'hôte 8 h après l'inoculation. La figure 6 montre une telle progression où l'hyphe se localise dans les quatre premières couches cellulaires du cortex.

Cette rapidité d'invasion des tissus de l'hôte est plus nette quand la pénétration se fait au niveau de la zone d'élongation cellulaire (figure 10, niveau 3).

On constate que lorsque l'hyphe passe d'une couche cellulaire à une autre, elle s'enfle en un appressorium ; ce passage est accompagné d'une dépression de la paroi cellulaire, ce qui témoigne de la résistance de la paroi et de la pression exercée par l'hyphe pour vaincre cette résistance (figure 6). La figure 6 montre également des ramifications intracellulaires de l'hyphe.

24 h après l'inoculation, le champignon se caractérise par une localisation intercellulaire et a atteint le parenchyme cortical interne (figure 7 et 10). L'hyphe progresse davantage vers la zone apicale de la racine. Les raisons de cette progression vers l'apex n'ont pas été étudiées, mais on peut penser que l'inexistence des formations de la paroi secondaire des cellules de cette région facilite la croissance du champignon vers l'apex de la racine.

Les figures 8 et 9 montrent des coupes pratiquées à 48 et 72 heures après l'inoculation. Il y a invasion totale de la zone de division cellulaire et des cellules de la coiffe dans le cas des racines sensibles. La figure 8 montre particulièrement une cellule sécrétrice, caractéristique des Lauracées, entourée d'une hyphe et dans laquelle on peut voir des structures comme des haustoriums (suçoirs).

La pénétration du champignon dans les racines d'avocatier intéresse le cortex, c'est-à-dire l'écorce. Il n'a pas été observé d'hyphe dans le cylindre central.

La double coloration à la safranine-vert lumière nous a permis de mettre en évidence des tissus lignifiés et subérifiés, respectivement le cylindre central et l'endoderme. Il est plausible que ce dépôt de lignine et de cutine sur les parois des cellules empêche la progression du champignon en direction du liber et du xylène. Comme cela a déjà été démontré par BOHER (4, 5) dans le cas de l'infestation de l'ananas par *P. palmivora* le parasite se localise ici au niveau de l'écorce et ne va pas au-delà, pour les raisons évoquées plus haut. La figure 12 illustre cette affirmation.

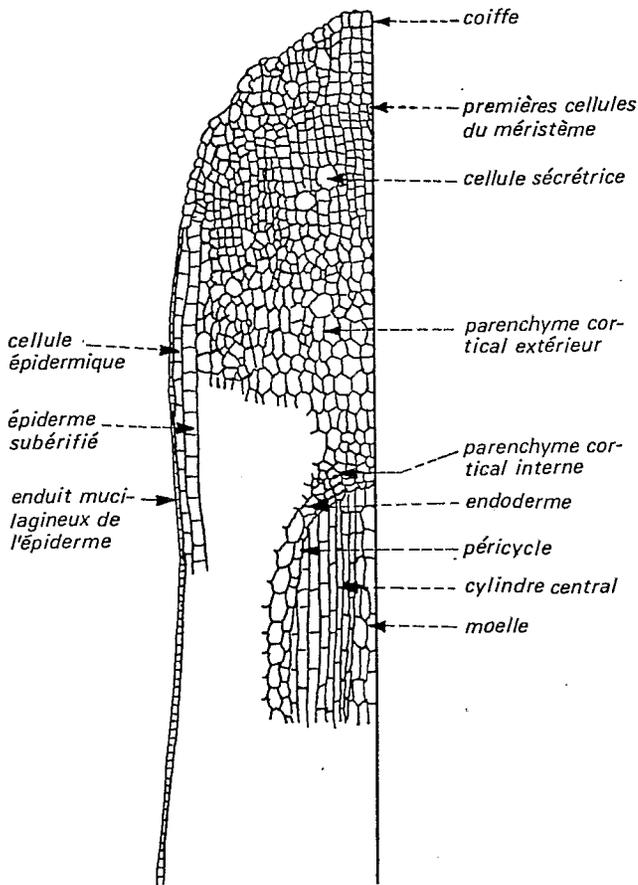


FIGURE 10 • DETAIL DE L'APEX D'UNE RACINE D'AVOCATIER (x 12).

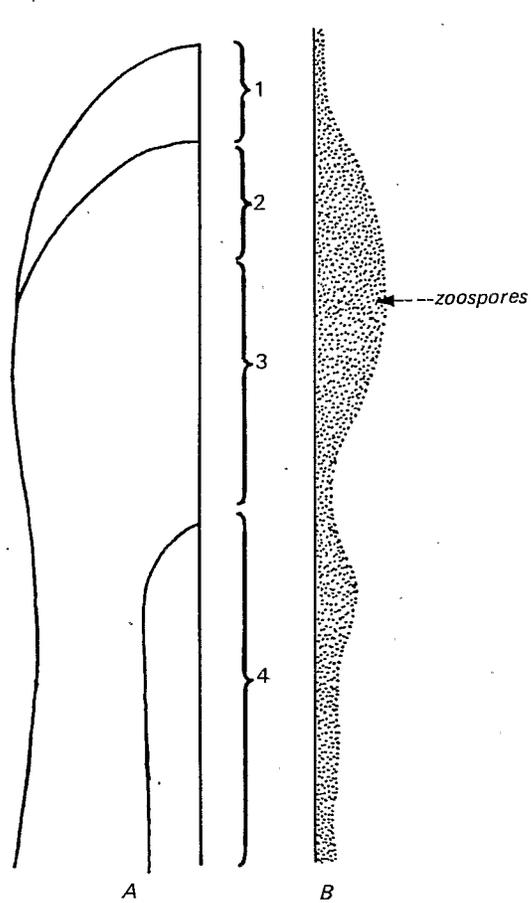


FIGURE 11 • REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ACCUMULATION DES ZOOSPORES DE *P. cinnamomi* SUR UNE RACINE D'AVOCATIER.

A - SCHEMA D UNE RACINE.

1. Coiffe
2. Mérésis
3. Auxésis
4. Différenciation

B - DIAGRAMME D'AGGLUTINATION DES ZOOSPORES.

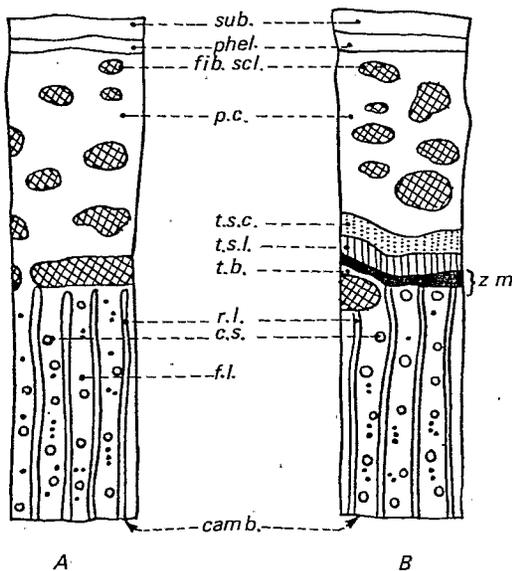


FIGURE 12 • COUPE TRANSVERSALE SCHEMATIQUE DE LA ZONE CORTICO-LIBERIENNE DE L'AVOCATIER.

A - COUPE DANS UNE ECORCE SAINÉ.

B - COUPE DANS UNE ECORCE PRELEVÉE AU NIVEAU D'UN CHANCRE A *Phytophthora cinnamomi*.

- sub. = suber
- phel. = phelloderme
- fib. scl. = faisceaux de fibres sclérifiées
- p.c. = parenchyme cortical primaire
- t.s.c. = tissus secondaires celluloseux réactionnels
- t.b. = zone de tissus brunifiés
- r.l. = rayons libériens
- c.s. = cellules sclérifiées (mucilages)
- f.l. = fibres libériennes
- camb. = assise cambiale libéro-ligneuse
- z.m. = zone de l'écorce envahie par le mycélium du champignon.

D'autres voies de pénétration sont également possibles. Outre la pénétration active que nous venons de décrire, il existe une pénétration passive par les blessures naturelles (sortie d'une radicelle d'origine péricyclique) ou artificielle. Cette voie passive de pénétration n'a pas été étudiée systématiquement.

Importance du point de pénétration sur la colonisation de la racine et l'apparition des symptômes.

Les observations sur la pénétration du champignon dans les racines du jeune avocatier montrent que ce sont les zones méristématiques et de différenciation qui sont préférentiellement attaquées. Ce sont ces zones qui assurent non seulement la croissance indéfinie de la racine mais encore la différenciation des radicelles et des poils absorbants. Il s'ensuit la formation d'un nombre réduit de radicelles et une mauvaise alimentation de l'appareil végétatif aérien de l'arbre qui tend à perdre ses feuilles.

Les figures 1A et 2A illustrent très bien les symptômes dus à une inoculation de jeune avocatier par *P. cinnamomi*. Les figures correspondent à un temps de 15 jours, après trempage du plant dans une suspension de zoospores. La figure 2A montre particulièrement par rapport au témoin 2B, un nombre réduit de racines qui sont noires et courtes.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nombreuses ont les études qui ont été faites sur *P. cinnamomi*. MARX et BRYAN (14) ont montré chez le pin une pénétration intercellulaire par la zoospore de *P. cinnamomi*.

L'étude que nous venons de faire est analogue à celle de MARX et BRYAN (14).

Les résultats de toutes les études effectuées sur les voies de pénétration de certaines Pythiacées parasites dans les organes souterrains de leurs hôtes respectifs (5, 7, 11, 12) sont identiques aux nôtres, à savoir une pénétration active du parasite à travers deux cellules adjacentes de l'épiderme. Les résultats de ces études montrent également que la localisation du champignon est principalement intercellulaire et que quelquefois le parasite émet des suçoirs intracellulaires.

Le champignon se localise dans le cortex et ne pénètre pas dans les tissus du cylindre central.

La formation des tissus secondaires, de la lamelle mitoyenne et le dépôt des lignines dans les parois des cellules du cylindre central permettent de comprendre que le champignon ne se localise que dans le cambium et ne se poursuit pas jusqu'au cylindre central qui est ainsi protégé.

Cette étude sur les voies de pénétration de *P. cinnamomi* nous amène à penser également que la pathogénicité du champignon est d'autant plus grande que la partie infectée concerne les zones méristématiques, plus précisément la zone de l'allongement cellulaire.

Bien que la zoospore soit la propagule infectieuse la plus efficace, il serait intéressant de savoir quelles seraient les modalités d'infection par un broyat mycélien. Cette étude est déjà commencée et nous pensons donner les résultats prochainement.

BIBLIOGRAPHIE

1. AYERS (W.A.) et ZENTMYER (G.A.). 1971.
Effect of soil solution and two soil pseudomonads on sporangium production by *Phytophthora cinnamomi*.
Phytopathol., 61, 1188-1193.
2. BINGHAM (F.T.) et ZENTMYER (G.A.). 1954.
Relation of hydrogen ion concentration of nutrient solution to *Phytophthora* root-rot of Avocado seedlings.
Phytopath., 44, 611-614.
3. BINHGAM (F.T.) et ZENTMYER (G.A.). 1958.
Host nutrition in relation to *Phytophthora* root rot of Avocado seedlings.
Phytopath., 48, 144-148.
4. BOHER (B.). 1974.
La pourriture du coeur de l'ananas. Etude histologique de l'infection par *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL. Pénétration active du parasite dans les organes aériens.
Fruits, 29, 11, 721-726.
5. BOHER (B.). 1976.
La pourriture du coeur de l'ananas. Etude de l'infection par le *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* WATERHOUSE et le *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL. Pénétration dans les organes souterrains.
Fruits, 31, 6, 365-371.
6. CRANDALL (B.S.). 1948.
Phytophthora cinnamomi root rot of Avocado under tropical conditions.
Phytopath., 38, 123-130.
7. CUNNINGHAM (J.L.) et HAGEDORN (D.J.). 1962.
Penetration and infection of pea roots by zoospores of *Aphanomyces euteiches*.
Phytopath., 52, 827-834.
8. FAWCETT (H.A.) et KLOTZ (L.J.). 1934.
A procedure for inducing the production of the sporangial and swarm stages in certain species of *Phytophthora*.
Phytopath., 24, 693-694.
9. HICKMAN (C.J.). 1970.
Biology of *Phytophthora* zoospores.
Phytopath., 60, 1128-1135.
10. HICKMAN (C.J.) et HO (H.H.). 1966.
Behaviour of zoospores in plant pathogenin Phycomycetes.
Ann. Rev. Phytopath., 4, 195-220.
11. KHEW (K.L.) et ZENTMYER (G.A.). 1973.
Chemotactic response of zoospores of five species of *Phytophthora*.
Phytopath., 63, 12, 1511-1517.

12. KIM (S.H.), KANTZES (J.G.) et WEAVER (L.O.). 1974.
Infection of aboveground parts of Bean by *Pythium aphanidermatum*.
Phytopath., 64, 3, 373-380.
13. MANNING (W.J.) et CROSSAN (D.F.). 1966.
Effects of particular soil bacterium on sporangial production in *Phytophthora cinnamomi* in liquid culture.
Phytopath., 56, 235-237.
14. MARX (D.H.) et BRYAN (W.C.). 1969.
Effect of soil bacteria on the mode of infection of pine roots by *Phytophthora cinnamomi*.
Phytopath., 59, 614-619.
15. SCHROTH (M.N.) et HILDEBRAND (D.C.). 1964.
Influence of plant exsudates of root-infecting fungi.
Ann. Rev. Phytopath., 2, 101-132.
16. TURNER (P.D.), 1963.
Influence of root exsudates of cacao and other plants on spore development of *Phytophthora palmivora*.
Phytopath., 53, 1337-1339.
17. ZENTMYER (G.A.) et KLOTZ (L.J.). 1947.
Phytophthora cinnamomi in relation to Avocado decline.
Phytopath., 37, 25 (abstract).
18. ZENTMYER (G.A.) et MARSHALL (L.A.). 1959.
Factors affecting sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*.
Phytopath., 49, 556 (abstract).
19. ZENTMYER (G.A.) et MIRCETICH (S.M.). 1965.
Testing for resistance of Avocado to *Phytophthora* in nutrient solution.
Phytopath., 55, 487-489.
20. ZENTMYER (G.A.) et RICHARDS (S.J.). 1952.
Pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi* to Avocado trees and the effect of irrigation on disease development.
Phytopath., 42, 35-37.

