



Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer,  
Centre d'Adiopodoumé, BP V-51 Abidjan (Côte d'Ivoire)  
Laboratoire de Phytopathologie

**Interactions hôte-parasite entre *Hevea brasiliensis*  
et les agents de pourriture racinaire  
*Phellinus noxius* et *Rigidoporus lignosus*:  
Etude physio-pathologique comparée**

Par

M. NICOLE, J. P. GEIGER et D. NANDRIS

Avec 23 figures

Reçu le 13 mai 1982

Parmi les agents de pourritures racinaires sévissant en zone tropicale humide, *Phellinus noxius* (Corner) G. H. Cunn et *Rigidoporus lignosus* (Kl.) Imaz. se signalent en Côte d'Ivoire par les dégâts qu'ils occasionnent à l'Hévéa, plante industrielle dont l'importance économique ne cesse de croître. Présents dans les forêts ivoiriennes, où ils vivent en équilibre avec les différentes essences forestières, ces parasites connaissent un développement alarmant dès que cette forêt se trouve remplacée, à grande échelle, par une culture mono-spécifique sensible telle que l'Hévéa. L'ampleur des dégâts, et l'inexistence d'une prophylaxie chimique satisfaisante, ont conduit plusieurs phytopathologistes à entreprendre des recherches sur *R. lignosus*, dans le but d'approfondir la connaissance du processus pathogénique qui le caractérise (PERIES *et al.* 1973, GEIGER 1975, GEIGER *et al.* 1976, GEIGER *et al.* 1981, NANDRIS *et al.* 1981, NICOLE *et al.* 1981).

Si de telles démarches ont été entreprises par le passé pour *R. lignosus*, agent du pourridié blanc sévissant dans toutes les zones hévéicoles du monde, il n'en est pas de même pour *P. noxius* agent du pourridié brun dont l'extension géographique est plus limitée. En fait, les données relatives aux processus de dégradation des tissus du bois par ces agents de pourridiés, ne sont pas rares

(COWLING 1961, LIESE 1970, WILCOX 1970). Elles concernent cependant, dans leur grande majorité, des champignons agissant en tant que saprophytes sur des tissus morts et non en qualité de parasites.

Ceux-ci se caractérisent par une activité enzymatique qui s'exerce soit principalement au détriment des polysaccharides (LIESE et SCHMIDT 1962), provoquant alors une pourriture brune du bois, soit essentiellement à l'encontre des matériaux ligneux et aboutit de ce fait à une pourriture blanche.

En revanche, concernant *P. noxius*, plusieurs questions demeurent à ce jour en suspens: quelles sont les modalités d'attaque et de colonisation de l'hôte? Au plan de la pathogénie, *P. noxius* s'apparente-t-il réellement aux agents de pourriture brune tel que *Poria vaillantii* sur *Pinus sylvestris* (CHOU et LEVI 1971) ou plutôt au groupe des agents de pourriture blanche auquel se rattachent certaines espèces du genre *Phellinus* (BLANCHETTE 1980)?

Nous avons tenté de répondre à ces questions en étudiant, au moyen de l'observation cytologique et de l'analyse biochimique, les mécanismes mis en jeu par *P. noxius* pour attaquer les jeunes plantes d'Hévéa et en les comparant à ceux mis en place par *R. lignosus*, agent typique de la pourriture blanche des racines d'Hévéa.

## Matériel et Méthodes

### Le matériel végétal

#### L'hôte

Les graines d'*Hevea brasiliensis*, famille illégitime GT<sub>1</sub>, sont récoltées dans les plantations expérimentales de l'IRCA (Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique). Elles sont mises à germer sur sable humide et repiquées en bac de végétation (terre de forêt), 15 jours après la germination.

#### Les agents pathogènes

*R. lignosus* et *P. noxius* sont isolés de racines d'Hévéa infectées naturellement en plantation. Les mycelia sont cultivés sur malt gélosé (Cristomalt 2 % — gélose 2 %) à  $28 \pm 1$  °C.

#### Les inoculations

La technique d'inoculation artificielle utilisée est celle mise au point au laboratoire par NANDRIS *et al.* (1982).

Des bûchettes d'Hévéa infectées par l'un des deux parasites, sont appliquées contre le pivot de plants d'Hévéa âgés de 1 mois, à 20 cm de la surface du sol. L'âge de l'inoculum est de 5 mois pour *P. noxius* et 11 mois pour *R. lignosus*. L'humidité volumique du sol dans la zone de contact entre l'hôte et le parasite est maintenue à 14 % pour *P. noxius* et 21 % pour *R. lignosus*. Le contrôle de cette humidité est effectuée par le laboratoire des Radioisotopes au moyen d'une sonde à neutron (solo 20).

Des prélèvements sont réalisés à périodes régulières afin d'apprécier l'évolution de l'attaque parasitaire.

#### Observations microscopiques

Les racines infectées sont récoltées puis fixées au FAA, formol-acide acétique-alcool éthylique (50/30/90; v/v/v). Après deshydratation progressive à l'alcool, de petits fragments racinaires sont inclus dans la paraffine (P.F. 60°) (Merck). Des coupes sériées de 6 à 15 microns d'épaisseur sont réalisées au microtome de Minot. Après déparaffinage des coupes, le parasite

est localisé dans les tissus par coloration au bleu de picroaniline-safranine (CARTWRIGHT 1927) et en rouge après coloration au Pianese III B (VAUGHAN 1914). Les coupes sont examinées au microscope Leitz Orthoplan équipée d'une chambre photographique 24 × 36 mm.

Pour la microscopie électronique, les échantillons sont fixés au glutaraldéhyde (2,5 %) dans un tampon cacodylate de sodium (0,1 M, pH 7,2), puis post-fixés au tétraoxyde d'osmium (1 %) dans le même tampon. Après déshydratation dans des concentrations croissantes d'éthanol, les échantillons sont traités à l'oxyde de propylène, puis inclus dans l'Epon 812. Les coupes ultrafines sont colorées à l'acétate d'uranyl (5 %) et contrastées dans la solution de REYNOLDS (1963). Les observations sont réalisées sur un microscope électronique Siemens type Elmiskop 102.

Des coupes de matériel frais ont également été observées. Elles ont été réalisées au microtome à congélation ou au rasoir, puis soumises aux tests décrits ci-dessus pour la mise en évidence des constituants des parois:

- la réaction de MAÛLE (BRAUNS 1952) et celle de WIESNER (phloroglucine-HCl: JENSEN 1962) pour la visualisation de la lignine qui apparaît en rouge dans les deux cas.
- le rouge de ruthenium (1/5000) pour la révélation de la pectine (JENSEN 1962).
- la coloration au Soudan IV pour la mise en évidence du suber (SHERWOOD et VANCE 1976).
- le bleu d'aniline, en microscopie à fluorescence, permet la caractérisation de la callose et du liège (ESCHRICHT et CURRIER 1964).

## Essais enzymatiques

### 1. Préparation des extraits enzymatiques

Les tests d'activité enzymatique sont effectués sur des filtrats de culture des champignons (milieu: bouillon de sciure de bois d'Hévée, GEIGER 1975) et sur des extraits racinaires de plantules d'Hévée saines ou infectées artificiellement par *R. lignosus* ou *P. noxius*.

L'extrait est réalisé par broyage (Ultraturax) de fragments de racines dans une solution tamponnée (phosphate mono et disodique 0,0125 M, pH 6,0) à raison de 5 à 7,5 ml de tampon pour un gramme de matériel végétal frais. Après 15 heures de macération à 4°C, cette suspension est centrifugée (15 min à 20 000 g). Le surnageant constitue l'extrait brut.

### 2. Tests enzymatiques

L'activité des CM-cellulase (E.C. 3.2.1.4), pectinase, laccase (E.C. 1.10.3.2) et peroxydase (E.C. 1.11.1.7) est mesurée suivant les techniques décrites par GEIGER (1975) et GEIGER *et al.* (1976).

Concernant les pectinases, la distinction entre activité de type hydrolytique (polygalacturonase: E.C. 3.2.1.11.5) et transéliminasiq (pectate lyase: E.C. 4.2.2.2) est fondée sur le test à l'acide thiobarbiturique selon la méthode de SHERWOOD (1966).

Par ailleurs, aucune activité pectinolytique n'ayant pu être décelée par les méthodes analytiques, ni dans les extraits de tissus racinaires sains ou infectés par *R. lignosus*, ni dans les filtrats de culture du champignon, celui-ci a été cultivé sur bouillon de sciure d'Hévée enrichi en polypectate de sodium ou en pectine RB (Unipeptine) respectivement à 2 % et 1 % en concentration finale.

La chute de viscosité de ces milieux, appréciée au viscosimètre d'OSTWALD (GEIGER 1975), est mesurée (après filtration) en fonction du temps de culture et comparée à l'évolution de la viscosité de milieux de composition identique non inoculés.

La différenciation entre laccase et peroxydase n'étant pas toujours immédiate, notamment en raison de la faible spécificité de substrat de ces enzymes et de la présence toujours possible d'eau oxygénée endogène (KOENIGS 1972), nous avons procédé aux vérifications indispensables par électrophorèse en gel d'amidon suivi d'une révélation des activités peroxydasique et laccase.

Outre les enzymes déjà citées, nous avons recherché la présence, dans les filtrats de culture et les extraits tissulaires, d'une pectine méthylestérase (PME E.C. 3.1.1.11). Cette enzyme est mise en évidence par son action sur une pectine hautement méthylée (pectine RB, Unipectine) avec comme résultat l'hydrolyse des esters méthyliques. La libération des fonctions carboxyliques provoque une acidification du milieu réactionnel et constitue donc un marqueur de la réaction enzymatique. La composition du milieu réactionnel est la suivante: pectine RB: 25 mg; bleu de bromophénol (indicateur de pH): 0,125 mg; thiomersal: 0,5 mg; extrait enzymatique: 1 ml; volume final qsp.: 5 ml; pH initial: 7,0. Incubation: 24 heures à 30 °C. La modification du pH est appréciée par mesure au pH-mètre. Ce test PME n'a qu'une valeur qualitative: présence ou absence de l'activité enzymatique.

## Résultats

### Processus infectieux de *P. noxius*

#### 1. Pénétration et colonisation du cortex racinaire

Les racines attaquées par ce parasite sont recouvertes d'un épais manchon brun-noirâtre constitué de particules terreuses et de grains de sables agglutinés au mycélium par des substances mucilagineuses d'origine fongique. Les racines sont étroitement enserrées par cette masse qui renferme des filaments mycéliens bruns souvent associés en plage. Ce contact intime avec l'assise cellulaire la plus externe de la racine facilite la pénétration des hyphes dans les tissus corticaux (Pl. I, Fig. 2). Les cellules du périderme, perforées par les filaments, sont alors rapidement envahies (Pl. I, Fig. 1). Par la suite, le champignon traverse les jeunes tissus subérisés; à ce niveau le mycélium est très fin (0,5 à 1  $\mu$ ), faiblement ramifié et présente peu d'affinité pour les colorants sélectifs.

Le parenchyme cortical subit, par contre, un développement intense des hyphes; celles-ci atteignent souvent plusieurs microns d'épaisseur (Pl. I, Fig. 3) et se ramifient jusqu'à former, dans certains cas, des amas mycéliens emplissant toute la cellule (Pl. I, Fig. 4). La position intracellulaire du parasite exige de sa part qu'il soit capable de digérer, au moins localement, les parois cellulaires.

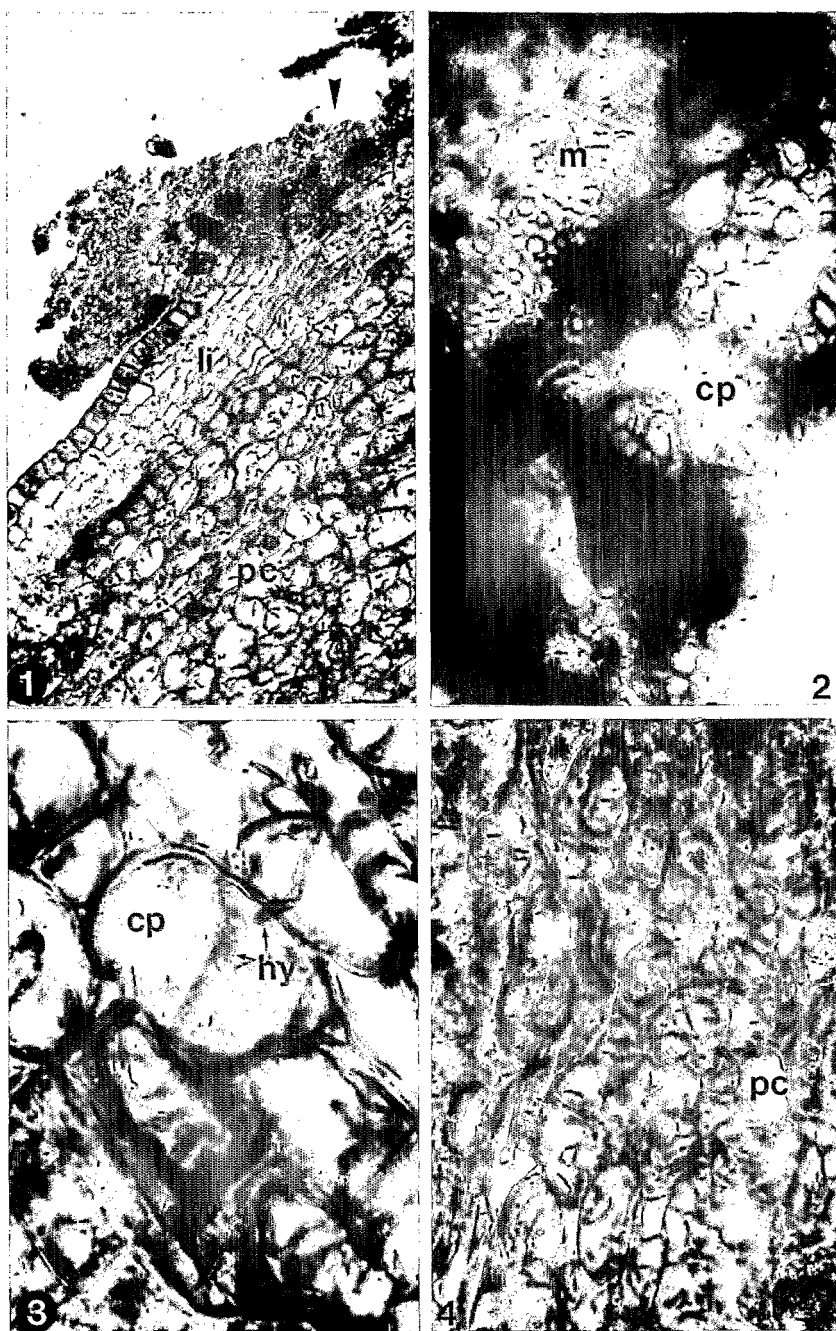
Ces diverses observations suggèrent que le parasite possède des armes enzymatiques lui conférant l'aptitude à dégrader les différentes structures de surface de l'hôte. De telles enzymes ont pu être détectées tant dans les extraits de tissus infectés (Tableaux 1 et 2) que dans les filtrats de culture du champignon (GEIGER 1975).

Il s'agit essentiellement de polyosidases: pectinases et cellulases, dont l'activité s'exerce au détriment de la lamelle moyenne et du squelette cellulosique. Concernant la dégradation des pectines, *P. noxius* excrète un complexe enzymatique extrêmement actif et efficace, constitué par une pectine méthylestérase (PME) et deux types de dépolymérases: polygalacturonase et pectate lyase (GEIGER *et al.* 1981).

---

Explication des planches. cc: cylindre central; cp: cellule parenchymateuse; hy: hyphe; li: liège; lb: liber; lm: lamelle moyenne; m: manchon mycélien; p: périderme; pa: paroi cellulosique; pc: parenchyme cortical; r: rhizomorphe; v: vaisseau

Planche I. Processus infectieux de *Phellinus noxius*. • Fig. 1. Pénétration du mycélium dans le cortex racinaire, sans déchirure notable des tissus (flèche) (G  $\times$  112,5) • Fig. 2. Contact intime



entre le manchon mycélien et le périderme dont les cellules sont totalement envahies par les hyphes (G  $\times$  75) • Fig. 3. Hyphe mycélienne, de 4  $\mu$ m de diamètre, en position intracellulaire dans le parenchyme cortical (G  $\times$  562,5) • Fig. 4. Intense colonisation du cortex par les filaments mycéliens (G  $\times$  300)

Tableau 1  
 Activités enzymatiques dans les tissus d'Hévéa sains et parasités (+ : traces)

|                                   | Laccase <sup>*)</sup> | Peroxydase <sup>*)</sup> | Pectinase <sup>**)</sup> | Carboxyl C<br>methyl M<br>cellulase C <sup>**)</sup> |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| Tissu sain                        | 0                     | 5000                     | 0                        | 0  |
| Tissu parasité <i>P. noxius</i>   | 60                    | 7800                     | 66                       | 3400   |
| Tissu parasité <i>R. lignosus</i> | 330                   | 52000                    | 0                        | +  |

\*)  $DO_{420} \times 1000$  par gramme de tissu (P. F.) par minute.

\*\*\*) Activité relative  $\frac{1}{T_{50}} \times 1000$  par gramme de tissu (poids frais) ( $T_{50}$  = temps [min] nécessaire pour que la viscosité du milieu réactionnel diminue de 50 %).

Tableau 2  
 Recherche d'une pectinase chez *R. lignosus* cultivé *in vitro*

| Milieu                          | Activité pectinolytique <sup>*)</sup> |                     |
|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
|                                 | culture de 5 jours                    | culture de 15 jours |
| Hévéa + polypectate de Na (2 %) | 22                                    | 75                  |
| Hévéa + pectine RB (1 %)        | 24                                    | 68                  |

\*) Exprimée en % de diminution de viscosité du filtrat de culture par rapport au témoin non inoculé.

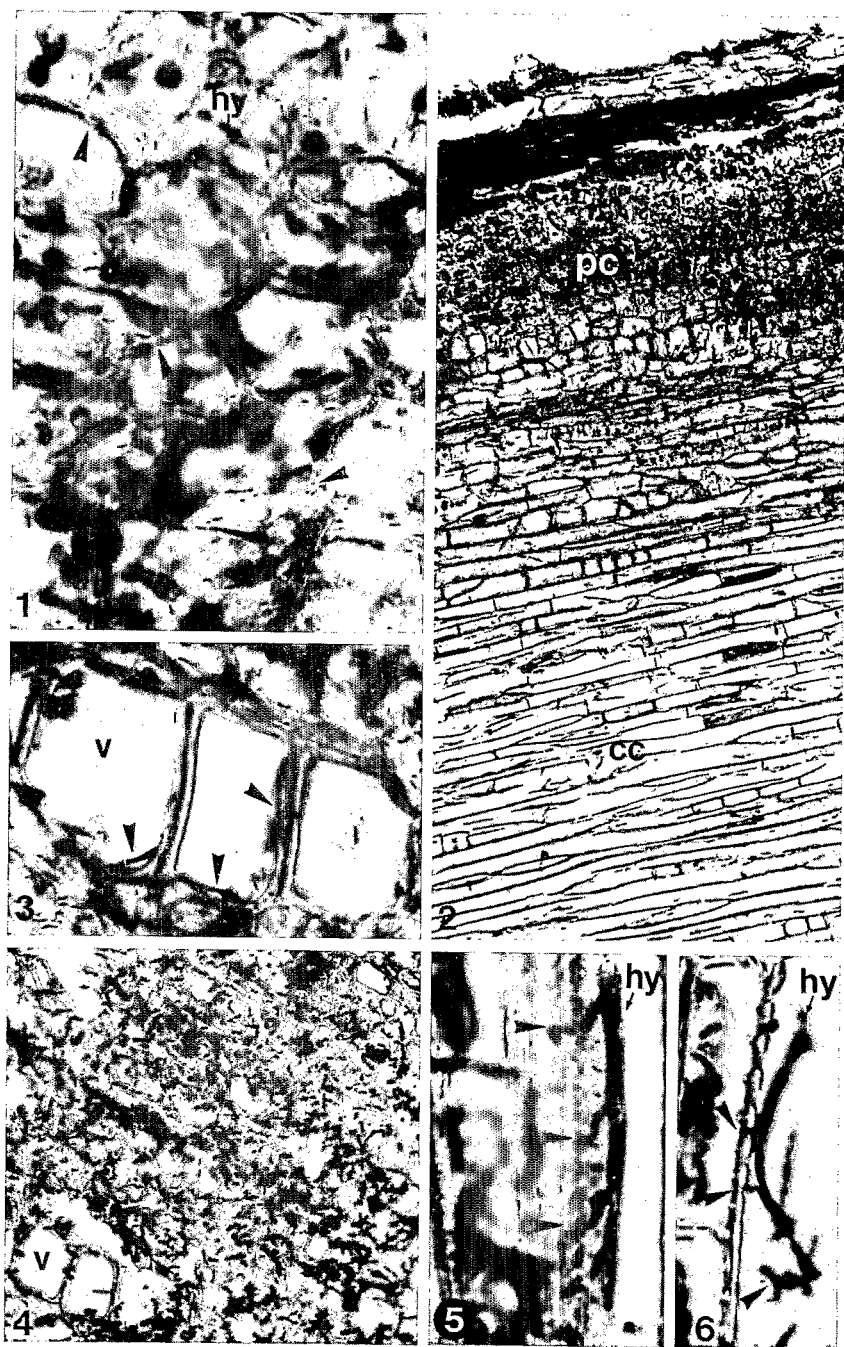
Ces enzymes sont présentes dans les tissus parasités et dans les filtrats de culture du champignon. La dégradation des polymères est parachevée par l'intervention de glycosidases; les monomères glucidiques qui en résultent pourront contribuer à l'alimentation carbonée du champignon.

La diversité des enzymes libérées par *P. noxius* et le niveau élevé de leur activité catalytique permettent de rendre compte de la rapidité et de l'efficacité de l'attaque parasitaire au niveau des tissus corticaux. En effet, au stade ultime de l'infection, ces tissus sont totalement dégradés (Pl. II, Fig. 1) et cèdent la place à une trame mycélienne dense.

## 2. Colonisation des tissus ligneux

Dans les jeunes racines, la colonisation du cylindre central est beaucoup moins rapide que celle du cortex. Souvent très abondantes dans le parenchyme, les hyphes sont encore absentes des tissus ligneux (Pl. II, Fig. 2). Pour envahir

Planche II. Processus infectieux de *Phellinus noxius*. • Fig. 1. Dégradation des parois des cellules du parenchyme cortical (flèche) (G  $\times$  750) • Fig. 2. Distribution du mycélium en début d'attaque; abondant dans le parenchyme cortical et absent dans le cylindre central (G  $\times$  750) • Fig. 3. Colonisation des vaisseaux: le mycélium (flèches) est plaqué contre la paroi interne des



cellules du bois ( $G \times 562,5$ ) • Fig. 4. Intense développement du mycélium dans l'ensemble du xylème ( $G \times 225$ ) • Figs. 5 et 6. Propagation des hyphes, de vaisseau en vaisseau au travers des ponctuations (flèches) ( $G \times 562,5$ )

le xylème, le mycélium n'utilise pas de voies préférentielles. Il est présent tant dans les rayons parenchymateux que dans les vaisseaux (Pl. II, Fig. 4). Le passage de l'un à l'autre s'effectue par les ponctuations; les hyphes subissent, de ce fait, une constriction importante (Pl. II, Figs. 5 et 6). Dans les faisceaux ligneux, le mycélium repose sur la fraction la plus interne de la paroi sur laquelle il se déplace pour progresser dans la cellule (Pl. II, Fig. 3).

Les dégâts occasionnés au complexe ligneux paraissent beaucoup moins sévères que ceux décrit pour le cortex. Certaines perturbations sont toutefois décelables au microscope optique. En effet, le xylème infecté laisse apparaître des méats au niveau des espaces intercellulaires, qui n'ont pas été observés sur tissu sain. Par ailleurs, les tests spécifiques des lignines révèlent une variation progressive de la coloration du xylème au cours de l'infection, allant du rouge pour les tissus sains à l'orange pour les tissus dégradés. Cela traduit des modifications des structures ligneuses. Les vaisseaux en fin d'attaque, ont un aspect gonflé et fissuré. Il apparaît donc que *P. noxius* doit disposer d'un équipement enzymatique adéquat lui permettant de s'attaquer aux tissus ligneux.

On considère la laccase comme l'une des enzymes participant vraisemblablement à la dégradation de la lignine (KIRK 1971, GEIGER et HUGUENIN 1981, *inter alia*). Une telle enzyme est effectivement présente dans le filtrat de cultures de *P. noxius*, elle peut être détectée dans les tissus colonisés par le champignon (Tableau 1), et caractérisée par électrophorèse sur gel amidon (Pl. IV, Fig. 7). Son activité demeure cependant toujours à un niveau relativement modeste et pourrait expliquer, au moins partiellement, le peu d'efficacité de l'attaque au niveau du xylème et la lenteur de la colonisation de ce tissu, dans les jeunes racines.

### Processus infectieux de *R. lignosus*

#### 1. Pénétration et colonisation du cortex

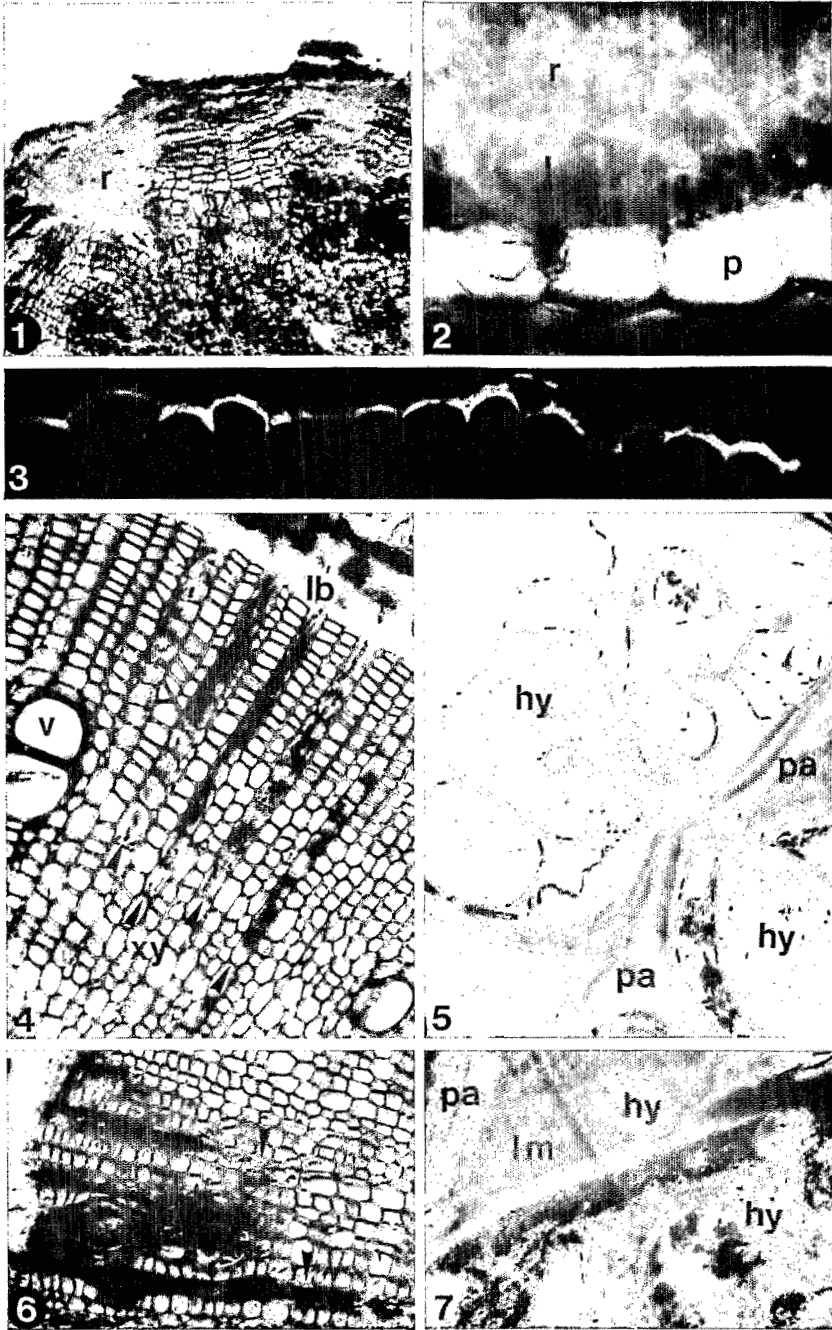
Contrairement à *P. noxius*, *R. lignosus* forme des cordons rhizomorphiques se propageant à la surface de la racine. Plusieurs possibilités sont offertes au parasite pour pénétrer dans l'hôte; soit par les ouvertures naturelles (les lenticelles), soit directement au travers des parois du périoderme.

Dans le premier cas, le rhizomorphe s'incruste dans l'ouverture et exerce une pression sur les couches cellulaires sous-jacentes. Cette action provoque le déchirement du parenchyme cortical (Pl. III, Fig. 1), et favorise la pénétration des filaments dans le cortex. Les cellules, alors en contact avec le rhizomorphe, sont obstruées par des masses compactes de filaments.

---

Planche III. Processus infectieux de *Rigidoporus lignosus*. • Fig. 1. Pénétration du parasite par une ouverture naturelle; pression du rhizomorphe exercée sur les tissus corticaux (flèche) (G × 187,5) • Fig. 2. Pénétration du parasite au niveau de la lamelle moyenne, entre deux cellules du périoderme (flèche) (G × 187,5) • Fig. 3. Microscopie en fluorescence; les zones de moindre fluorescence traduisent une perturbation des parois après pénétration directe de filaments dans l'assise périodermique (G × 75) • Figs. 4 et 6. Utilisation des rayons parenchymateux (flèches) par les filaments mycéliens pour coloniser le xylème • Fig. 5. Microscopie électronique: localisation intracellulaire du mycélium dans le cortex racinaire. Le passage d'une





cellule à l'autre s'effectue après perforation des parois celluloseuses ( $G \times 3750$ ) • Fig.7. Microscopie électronique: localisation intracellulaire, et intercellulaire du mycélium au niveau de la lamelle moyenne ( $G \times 3000$ )

Dans le second cas, le mycélium pénètre directement dans le cortex (Pl. III, Fig. 3) en perforant les parois des cellules externes, ou en s'insérant au niveau de la lamelle moyenne entre deux cellules (Pl. III, Fig. 2). L'envahissement des assises cellulaires proches est alors plus lent.

Dans le parenchyme cortical, le mycélium adopte deux positions:

- l'une intracellulaire: le passage d'une cellule à l'autre s'effectue de ce fait au travers des parois (Pl. III, Fig. 5),
- l'autre intercellulaire: les hyphes se déplacent dans la lamelle moyenne (Pl. III, Fig. 7) et leur diamètre est 3 à 5 fois plus petit qu'en position intracellulaire.

Tout comme chez *P. noxius*, cette colonisation implique de la part de *R. lignosus* l'intervention d'un pool enzymatique assurant la digestion de la lamelle moyenne et des parois cellulaires. En fait, si une activité cellulolytique a pu être mise en évidence sans ambiguïté, à la fois dans les filtrats de culture du champignon et dans les tissus infectés, aucune activité pectinolytique n'a en revanche été décelée. C'est pourquoi des cultures du parasite ont été réalisées sur un milieu contenant de la pectine et l'effet de la croissance mycélienne sur ce substrat a été étudié (Tableaux 1 et 2). Cette technique a permis de démontrer la capacité de *R. lignosus* à dégrader les matières pectiques, quoiqu'elle soit très lente. Il est probable qu'*in vivo*, cette activité enzymatique ne s'exerce qu'au détriment de molécules directement en contact avec les hyphes.

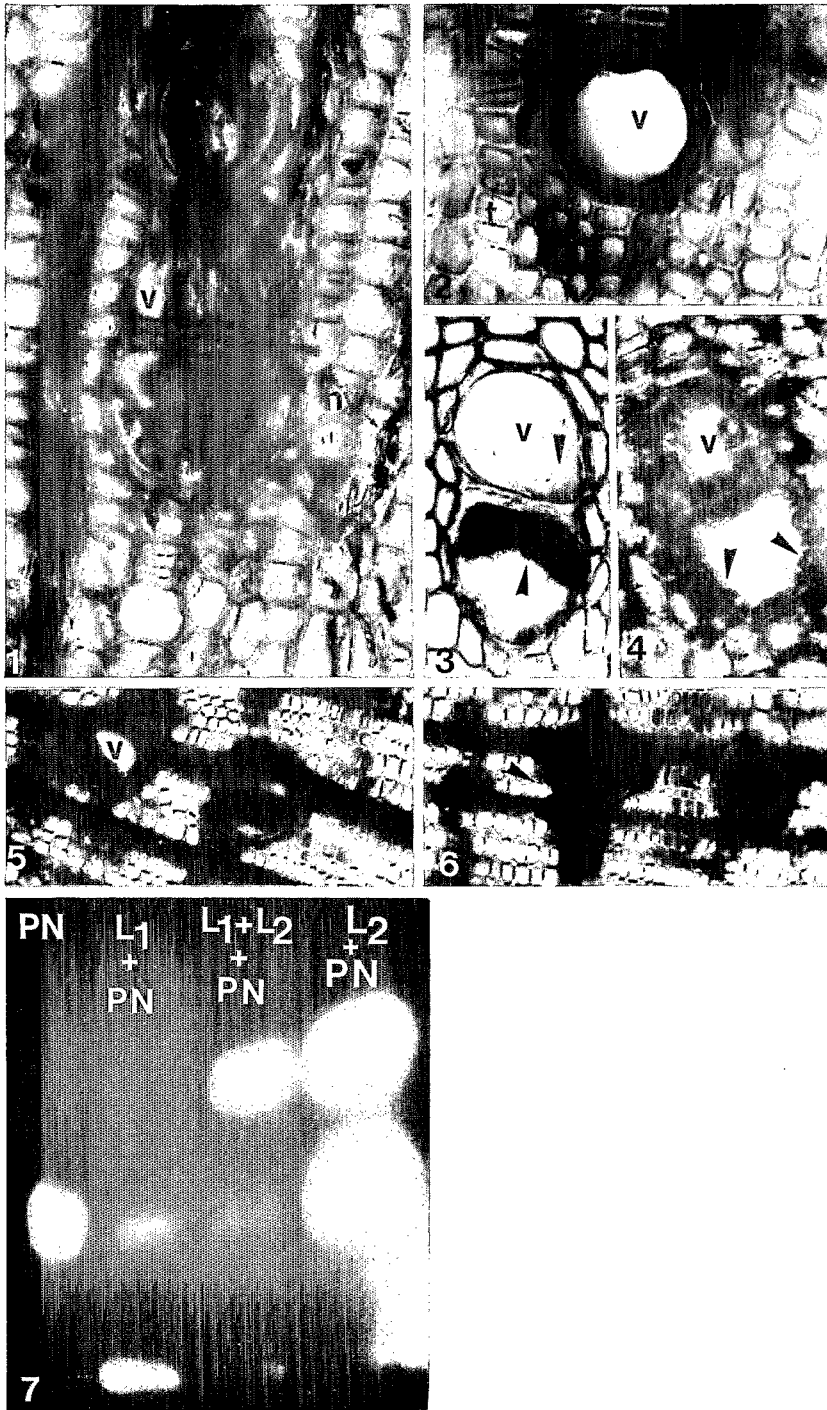
## 2. Colonisation des tissus ligneux

Le site privilégié de l'action parasitaire du champignon au cours de l'infection est le xylème. L'envahissement des tissus ligneux s'effectue préférentiellement par les rayons parenchymateux (Pl. III, Fig. 4). La formation de nombreuses ramifications des hyphes facilite la colonisation des vaisseaux. Ceux-ci peuvent être rapidement envahis dès le début de l'attaque (Pl. III, Fig. 6 et Pl. IV, Fig. 1). Dès les premiers contacts avec le mycélium, le bois, après coloration des lignines, perd sa teinte vineuse. L'hétérogénéité de la coloration traduit une multitude de points d'attaque.

Au niveau cellulaire, les vaisseaux subissent d'importants dégâts. Les parois, festonnées dès le début de l'attaque (Pl. IV, Figs. 2 et 4), sont, en cours d'infection, incrustées de dépôts denses (Pl. IV, Fig. 3). Au stade voisin de la pourriture, ceux-ci obstruent totalement la lumière des vaisseaux (Pl. IV, Figs. 5 et 6). Ces dépôts, quoique biochimiquement non définis, s'apparentent toutefois aux polymères ligneux. Dans la majorité des cas, en effet, ils réagis-

---

Planche IV. Processus infectieux de *Rigidiporus lignosus*. • Fig. 1. Colonisation des vaisseaux; le mycélium occupe la totalité de la cellule (Pl. II Fig. 3) (G × 187,5) • Figs. 2 à 6. Dégradation des structures ligneuses. Figs. 2 et 3: Début d'altération des vaisseaux: épaissement des parois, formation de tyllés dans les cellules avoisinantes, et dépôt dense dans la lumière des vaisseaux (flèche) (G × 187,5). Fig. 4: Importante altération des vaisseaux dont les parois apparaissent fortement dégradées (flèche) (G × 187,5). Figs. 5 et 6: Obturation quasi-totale des vaisseaux par des dépôts de nature ligneuse ou phénolique (flèche) (G × 75) • Fig. 7. Electrophorèse sur gel d'amidon, révélation des activités laccase. L1: Laccase L1 de *R. lignosus* après purification partielle; L2: Laccase L2 de *R. lignosus* après purification partielle; PN: Filtrat de culture de *P. noxius*



sent au test de la phloroglucine et à celui de Maüle. Le bois décomposé, prend un aspect fibreux desséché.

Au plan biochimique la caractéristique majeure des tissus parasités est la présence d'une activité laccase, absente dans les tissus sains (GEIGER *et al.* 1976). L'évaluation quantitative des activités enzymatiques traduit une disproportion considérable entre les polyosidases et la laccase et ce, en faveur de cette dernière. Ce fait pourrait expliquer que *R. lignosus* dans les jeunes plantes d'Hévéa, colonise préférentiellement le cylindre central fortement lignifié. Enfin, compte tenu de la dislocation du xylème en fin d'attaque, il est vraisemblable que la laccase agisse conjointement avec une cellulase malgré le faible niveau d'activité de cette dernière (Tableau 1).

### Discussion et Conclusion

Au cours du processus infectieux, l'intense colonisation des tissus parenchymateux par *P. noxius*, ainsi que leur décomposition, est étayée par une forte activité cellulolytique et pectinolytique. Ce résultat confirme ceux de COWLING (1961) qui spécifie, de plus, que la sécrétion d'enzymes extracellulaires par ces parasites est localisée tant à l'apex que sur les surface latérales des hyphes.

La cellulase mise en évidence, joue également un rôle important dans la dégradation des tissus lignifiés. WILCOX (1968) précise que cette action sur les structures cellulosesiques se localise non seulement sur la fraction  $S_3$  de la paroi secondaire des vaisseaux mais aussi sur les fractions internes  $S_2$  et  $S_1$ . A cet égard, plusieurs auteurs montrent que certains agents de Pourridié sont capables de différencier des microhyphes agissant en profondeur sur les parois (LIESE et SCHMIDT 1962). Une digestion enzymatique des composants pariétaux au voisinage immédiat de ces hyphes est fréquemment observable (CHOU et LEVI 1971). Pour notre part, l'observation au microscope optique n'a pas révélé l'existence de microhyphes chez *P. noxius*, mais montre nettement une altération des parois secondaires.

L'intervention d'enzymes pectiques est par contre moins évoquée dans la bibliographie. Dans les jeunes plants d'Hévéa parasités, une pectinase semble être responsable d'une certaine discontinuité de la lamelle moyenne entre les cellules des tissus corticaux infectés. Ces enzymes sont également fonctionnelles dans les tissus parasités lignifiés des pivots adultes. Il s'agit, en fait, d'un complexe enzymatique comportant une (ou plusieurs) polygalacturonase(s), pectate lyase(s) et pectine méthylesterase(s) (GEIGER *et al.* 1981). A cet égard le comportement de *P. noxius* se rapproche de celui de *P. isabellinus* qui dégrade spécifiquement la lamelle moyenne du bois de Pin (ANDER et ERIKSSON 1978).

Ce pool enzymatique apparaît par contre moins diversifié et possède des niveaux d'activité inférieurs chez *R. lignosus*. Au sein du cortex des jeunes racines infectées, cela se traduit par une plus faible colonisation des tissus. Le champignon est toutefois présent tant en position intracellulaire qu'intercellu-

laire. La cellulase, associée à une  $\beta$ -glucosidase (GEIGER *et al.* 1981) s'avère de ce fait indispensable à l'expression du pouvoir pathogène. Des observations récentes au microscope électronique (NICOLE: résultats non publiés) montrent sans ambiguïté une désorganisation de la lamelle moyenne, certainement attribuable à une action enzymatique. Une telle activité pectinolytique n'a pu être mise en évidence qu'indirectement, par culture du champignon sur un milieu avec pectine. L'enzyme pourrait être localisée sur les parois des hyphes, assurant de ce fait une digestion dite de contact.

Bien que des polyosidases soient habituellement excrétées par les parasites causant une pourriture blanche du bois (white rot) (KIRK et KELMAN 1965, WILCOX 1970, PEEK *et al.* 1972 a et b, SCHMIDT et LIESE 1980), ces agents pathogènes sont toutefois plus connus pour excréter des phénoloxydases. Parmi elles, la laccase est la plus répandue (GRABBE *et al.* 1968, KIRK 1971, ANDER et ERIKSSON 1978). Elle participe à la dépolymérisation oxydative de la lignine (GEIGER et HUGUENIN 1981). Les produits, plus ou moins dégradés, s'accumulent vraisemblablement dans les vaisseaux et de ce fait peuvent bloquer la circulation de l'eau et des éléments minéraux.

Appliqué aux tissus parasités par *P. noxius*, le test laccase (GEIGER *et al.* 1976) s'avère positif; différentes vérifications ont montré que l'activité révélée ne peut être attribuée aux peroxydases, également présentes dans les tissus racinaires sains et parasités (Pl. IV, Fig. 7). Ainsi le développement de *P. noxius* dans les racines d'Hévéa, s'accompagne de l'excretion d'une laccase par le parasite.

Sa mise en évidence pose ou repose néanmoins le problème du type de pourriture engendré par *P. noxius*. Répertoire comme responsable d'une pourriture brune sèche (PICHEL 1956), on lui attribuait habituellement une action négligeable sur les structures ligneuses; d'après KIRK (1971) les seules modifications causées par ce type de parasite consistent en une diminution des radicaux méthyl de la lignine. Or au microscope optique, des modifications du xylème necrosé apparaissent sans ambiguïté; ANDER et ERIKSSON (1978) et BLANCHETTE (1980) confirment le fait que certaines espèces appartenant au genre *Phellinus* assurent une dégradation sélective de la lignine. Aussi, l'ensemble des résultats acquis tant par voie cytologique que par voie biochimique, conduit à classer *P. noxius* parmi les agents de pourriture blanche, de type alvéolaire ou nodulaire au sens défini par ROGER (1954).

### Résumé

La pénétration et la colonisation des tissus racinaires d'*Hevea brasiliensis* par deux agents de Pourridié ont été étudiées sur des jeunes plantes infectées artificiellement.

L'approche microscopique montre que *Phellinus noxius*, agent du Pourridé brun, cause d'importants dégâts aux tissus non lignifiés et altère par contre beaucoup moins le xylème. L'étude biochimique révèle que ce parasite

secrète des pectinases et des cellulases, ainsi qu'une polyphénoloxydase (la laccase) enzymes impliquées dans le processus infectieux.

*Rigidoporus lignosus*, agent du Pourridié blanc, excrète les mêmes enzymes. L'activité des hydrolases est en revanche plus faible, ce qui se traduit par une dégradation moindre des tissus corticaux. L'activité des laccases est, par contre, très forte, surtout dans le xylème, qui est profondément perturbé à la suite de l'attaque fongique.

L'analyse comparée des résultats nous a conduit à classer *P. noxius* comme l'agent d'une pourriture blanche, au même titre que *R. lignosus*, alors qu'il était connu, dans la littérature, comme provoquant une pourriture brune.

### Summary

#### Host-parasite interactions between *Hevea brasiliensis* and the root-rotting fungi, *Phellinus noxius* and *Rigidoporus lignosus*: Comparative physio-pathological study

The penetration and colonization of *Hevea brasiliensis* root tissues by two root-rotting fungi were studied on inoculated seedlings. Microscopic observations showed that *Phellinus noxius*, the agent of the brown root rot, caused major degradations of non lignified tissues and light alterations of xylem. Biochemical studies revealed that this parasite secreted high levels of pectinases and cellulases, and a polyphenoloxydase, the laccase. These enzymes are involved in the infection process.

*Rigidoporus lignosus*, the agent of the white root rot, secreted the same enzymes. But, the hydrolytic activities are much lower than the laccase activity. These results may be related to the fact that cortical tissues are less degraded than the xylem.

The present comparative analysis allows to classify *P. noxius* among the Polyporaceae causing white rot.

### Zusammenfassung

#### Wirt-Parasit-Wechselwirkung zwischen *Hevea brasiliensis* und den Wurzelfäulepilzen *Phellinus noxius* und *Rigidoporus lignosus*: Vergleichende physio-pathologische Untersuchung

Es wurde das Eindringen und die Besiedlung des Wurzelgewebes von *Hevea brasiliensis* durch zwei Fäulepilze an künstlich infizierten jungen Pflanzen studiert.

Die mikroskopische Untersuchung zeigt, daß *Phellinus noxius*, der Erreger der braunen Wurzelfäule, bedeutende Schäden an den nicht verholzten Geweben verursacht, das Xylem dagegen viel weniger verändert. Die biochemische Untersuchung zeigt, daß dieser Parasit Pektinasen und Cellulasen ausscheidet, ebenso wie eine Phenoloxydase (Laccase), Enzyme, die am Infektionsprozeß beteiligt sind.

*Rigidoporus lignosus*, Erreger der weißen Wurzelfäule, scheidet die gleichen Enzyme aus. Dagegen ist die Aktivität der Hydrolasen schwächer, was sich durch eine geringere Veränderung der Rindengewebe auswirkt. Andererseits ist die Aktivität der Laccasen sehr stark, besonders im Xylem, das nach der Pilzinfektion tiefgreifend gestört ist.

Die vergleichende Analyse der Ergebnisse führt uns dazu, *P. noxius*, gleich wie *R. lignosus*, als einen Erreger von weißer Wurzelfäule zu klassieren, während er in der Literatur als Erreger von Braunfäule bekannt war.

### Bibliographie

- ANDER, P., and K. E. ERIKSSON, 1978: Lignin degradation and utilization by microorganisms. *Progr. Ind. Microbiol.* 14, 1—58.
- BLANCHETTE, R. A., 1980: Wood decomposition by *Phellinus (Fomes) pini*: a scanning electron microscopy study. *Can. J. Bot.* 58 (13), 1496—1503.
- BRAUNS, F. E., and D. A. BRAUNS, 1952: *The Chemistry of Lignin*, 808 pp. Academic Press, New York.
- CARTWRIGHT, K. ST. G., 1927: A satisfactory method of staining fungal mycelium in wood sections. *Ann. Bot.* 43, 412—413.
- CHOU, C. K., and M. LEVI, 1971: An electron microscopical study of the penetration and decomposition of tracheid walls of *Pinus sylvestris* by *Poria vallantii*. *Holzforschung* 25, 107—112.
- COWLING, E. B., 1961: Comparative biochemistry of the decay of Sweetgum Sapwood by white rot and brown rot fungi. U.S.D.A., Techn. Bull. 1258, 79 pp.
- ESCHRICH, W., and H. B. CURRIER, 1964: Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain Techn.* 39, 303—307.
- GEIGER, J. P., 1975: Aspects physiologiques et biochimiques de la spécialisation parasitaire. Cas particulier des *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi et *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. *Physiol. vég.* 13 (2), 307—330.
- , D. NANDRIS, et M. GOUJON, 1976: Activité des laccases et des peroxydases au sein des racines d'Hévéa attaquées par le pourridié blanc (*Leptoporus lignosus* Kl. Heim). *Physiol. vég.* 14 (2), 271—282.
- , et B. HUGUENIN, 1981: La peroxydase des tissus racinaires d'Hévéa parasités par *R. lignosus*, origine et rôle physiologique potentiel. *Abstr. Congr. Protection des cultures tropicales*, sect. 1B, 46. Lyon, France.
- , D. NANDRIS, M. NICOLE, et B. HUGUENIN, 1981: Les pourridiés de l'Hévéa. II. Etude de l'agression du système racinaire de l'Hévéa par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. *Abstr. Congr. Protection des cultures tropicales*, sect. 1B, 43. Lyon, France.
- GRABBE, K., R. KOENIG und K. HAIDER, 1968: Die Bildung der Phenoloxydase und die Stoffwechselbeeinflussung durch Phenole bei *Polystictus versicolor*. *Arch. Mikrobiol.* 63, 133—153.
- JENSEN, W. A., 1962: *Botanical Histochemistry*, 407 pp. F. W. H. Freeman and Co, San Francisco—London.
- KIRK, T. K., 1971: Effect of microorganisms on lignin. *Ann. Rev. Phytopath.* 9, 185—210.
- , and A. KELMAN, 1965: Lignin degradation as related to the phenoloxydases of selected wood decaying Basidiomycetes. *Phytopathology* 55, 739—745.
- KOENIGS, J. W., 1972: Production of extracellular hydrogen peroxyde and peroxydase by wood-rotting fungi. *Phytopathology* 62, 100—110.
- LIESE, W., 1970: Ultrastructural aspects of woody tissues desintegration. *Ann. Rev. Phytopath.* 8, 231—258.
- , und O. SCHMIDT, 1962: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Abbau des Holzes durch Pilze. *Angew. Bot.* 36, 291—298.

- NANDRIS, D., M. NICOLE, J. P. GEIGER, B. HUGUENIN, et M. GOUJON, 1981: Les pourridiés de l'Hévéa. I. Incidence des facteurs édaphiques sur le pouvoir pathogène de *R. lignosus*. Abstr. Congr. Protection des cultures tropicales, sect. 1B, 43. Lyon, France.
- , —, et —, 1982: Infections artificielles de jeunes plants d'Hévéa par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. Accepté pour publ. à Eur. J. For. Path.
- NICOLE, M., J. P. GEIGER, D. NANDRIS, et B. HUGUENIN, 1981: Les pourridiés de l'Hévéa. III. Réactions de l'Hévéa à l'infection par *R. lignosus* et *P. noxius*. Abstr. Congr. Protection des cultures tropicales, sect. 1B, 43. Lyon, France.
- PEEK, R. D., W. LIESE und N. PARAMESWARAN, 1972a: Infektion und Abbau der Wurzelrinde von Fichte durch *Fomes annosus*. Eur. J. For. Path. 2, 104—115.
- , —, und —, 1972b: Infektion und Abbau des Wurzelholzes von Fichte durch *Fomes annosus*. Eur. J. For. Path. 2, 237—248.
- PERIES, O. S., and Z. E. IRUGALBANDARA, 1973: Histology of *Hevea* roots infected by *Fomes lignosus*. Ann. appl. Biol. 73, 1—7.
- PICHEL, R. J., 1956: Les pourridiés de l'Hévéa dans la cuvette congolaise. INEAC, Ser. Techn. 49, 480 pp.
- REYNOLDS, E. S., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. cell. Biol. 7, 208—212.
- ROGER, L., 1954: Phytopathologie des pays chauds. Tome III. P. Lechevalier, Paris.
- SCHMIDT, O., and W. LIESE, 1980: Variability of wood degrading enzymes of *Schizophyllum commune*. Holzforschung 34 (2), 67—72.
- SHERWOOD, R. T., 1966: Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. Phytopathology 56, 279—281.
- , and C. P. VANCE, 1976: Histochemistry of papillae formed in reed canarygrass leaves in response to non infecting pathogenic fungi. Phytopathology 66, 503—510.
- VAUGHAN, R. E., 1914: A method for the differential staining of fungus and host cells. Ann. Mi. Bot. Gard. 1, 241—242.
- WILCOX, W., 1968: Changes in wood microstructure through progressive stages of decay. U. S. For. Serv. Res. Pap. FPL 70, 1—46.
- , 1970: Anatomical changes in wood cell walls attacked by fungi and bacteria. Bot. Rev. 36 (1), 1—28.

Adresse des auteurs: M. NICOLE, J. P. GEIGER, D. NANDRIS, Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Centre d'Adipodoumé, BP, V-51 Abidjan (Côte d'Ivoire).