



Comportement différentiel en pathogénécité et en activités enzymatiques de souches de *Phytophthora katsurae* du cocotier en Côte d'Ivoire

[Differential behaviour in pathogenicity and enzymatic activities of *Phytophthora katsurae* strains from coconut trees in Côte d'Ivoire]

^{1*} Yao N. Rùth, ² N'Goran, B., ² Allou, K., ¹ Dogbo, D.O., ² Konan, K.J.L. et ³ Kouassi, P.

¹Université d' Abobo Adjamé. Laboratoire de Physiologie végétale. UFR Science de la Nature (Protection des végétaux). 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire; ²CNRA (Centre National Recherche Agronomique), Station de recherche Marc Delorme, Laboratoire de Défense des cultures sur le programme cocotier. 07 BP 13 Abidjan 07, Côte d'Ivoire; ³Université de Cocody-Laboratoire de Zoologie et de biologie Animale de l'UFR Biosciences. 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

* Corresponding author email: yaoahounoellie76@yahoo.fr,

Other authors: denezon0@yahoo.fr, kouaberanger@yahoo.fr, kouassi_allou@yahoo.fr, konankonanjeanlouis@yahoo.fr; kouassiphil@yahoo.fr

Published at www.biosciences.elewa.org on September 7, 2009

RÉSUMÉ

Objectif : Etudier la variation épidémiologique due à *Phytophthora katsurae* dans quatre zones de culture de cocotiers.

Methodologie et résultats : Une première partie, basée sur la caractérisation morphologique du pathogène a été faite. Les critères morphologiques basés sur la forme et l'aspect des sporocystes, des oospores, des chlamydozoozoides et des mycéliums n'ont pas permis de différencier les souches de Marc Delorme, de Robert Michaux, d'Assinie et de Fresco. Cependant, une différence a été dégagée au niveau de la croissance mycélienne de chaque souche *in vitro* sur milieux V₈, Carotte et Malt. Une seconde étude a été menée pour vérifier cette différence observée au cours des travaux précédents. Elle a porté sur les inoculations douces et brutales des noix de la variété Nain Vert de Guinée Equatoriale (NVE), sensibles au *Phytophthora katsurae* avec l'inoculation des quatre souches. Et une troisième partie a consisté en l'évaluation de l'activité enzymatique de la pectate lyase et de la laccase contenues dans chaque souche de *P. katsurae*. Ces enzymes dégradent la pectine et la lignine des parois cellulaires végétales. Il ressort de cette étude que contrairement à l'inoculation brutale, l'inoculation douce a permis d'évaluer le niveau d'agressivité de chaque souche. Les activités de la pectate lyase et de la laccase ont varié selon les souches. La synthèse de ces enzymes en corrélation avec la méthode d'inoculation douce a permis de classer les souches selon leur agressivité sur le végétal. Ainsi, les souches de Marc Delorme et d'Assinie sont moins agressives que la souche de Fresco qui est moins agressive que la souche de Robert Michaux. Les zoospores et les mycéliums constituent le pouvoir pathogène des quatre souches. Le β-sitostérol ajouté au milieu V₈ n'a pas influencé sur la croissance mycélienne des quatre souches; par contre, son apport a favorisé une production élevée de sporocystes.

Conclusion et application : La découverte de cette variabilité au sein de l'espèce sera d'un support notable dans les méthodes de lutte contre le *P. katsurae* du cocotier.

Mots clés: *Phytophthora katsurae*, souches, cocotier, inoculation, pectate lyase, laccase.



ABSTRACT

Objective: To study epidemiological variation of *Phytophthora katsurae* on coconut trees from four farming areas.

Methodology and results: isolates of the pathogenic agent were first characterized based on morphology of sporocysts, oospore, chlamydospore and mycelium, and this enabled detection of differences between the aggressiveness of strains. Differences were also detected when measuring the mycelium growth of each strain *in vitro* on different culture media (V₈, Malt and Carotte). A second study was conducted to confirm the observed differences based on inoculation (gentle or rough) of coconut plants cv. Equatoriale Guinea Green Dwarf (NVE), which is susceptible to *P. katsurae*, with each of four strains. Last, the enzymatic dosages of pectate lyase and laccase in pathogen were analysed. These enzymes degrade the pectin and lignin of the plant cell walls. Gentle inoculation enabled assessment of the level of aggressiveness of each strain. The activity of pectate lyase and laccase varied between the strains and the synthesis of these enzymes was correlated to pathogen aggressiveness on the plant. The results showed that the strains of Marc Delorme and Assinie are less aggressive than the strain of Fresco, which is less aggressive than the strain of Robert Michaux. The zoospores and the mycelia are considered as the primary inoculum of the four strains. The β -sitosterol added to V₈ medium had no influence on the mycelium growth of the four strains. However, its use as ingredient added to the media favoured an increased production of sporocysts. **Conclusion and application:** The discovery of this intra specific variability should be of considerable help in elaborating control methods against *P. katsurae* of coconut trees.

Key words: *Phytophthora katsurae*, strains, coconut trees, inoculation, pectate lyase, laccase.

INTRODUCTION

Le cocotier (*Cocos nucifera* L.) est la plante la plus utilisée au monde (Persley, 1992). En Côte-d'Ivoire, cette plante est essentiellement cultivée sur le littoral, le centre Ouest et Est du pays (Zakra, 1989). Elle n'occupe que 50000 ha dont 93% localisée sur le littoral et 7% en moyenne Côte d'Ivoire avec un rendement moyen de coprah de 1,3 t/ha/an contre 0,5 t/ha/an au niveau mondial (Anonyme, 2003). Cependant, l'enjeu économique que représente le cocotier est compromis par plusieurs maladies, parmi lesquelles, la pourriture du cœur et la chute précoce des noix immatures. Ces maladies sont causées par le champignon *Phytophthora katsurae* dont les dégâts entraînent rapidement la mort de l'arbre et des pertes de récoltes parfois supérieures à 30 % (De Franqueville et al., 1989). Pour lutter efficacement contre cet agent pathogène, plusieurs moyens ont été utilisés, à savoir d'une part la lutte chimique et d'autre part la lutte génétique (Allou et al., 2002). Sur les parcelles expérimentales des régions d'Abidjan, de Dabou, d'Assinie et de Fresco, les observations ont révélé que

les dégâts causés par ce champignon variaient d'une région de culture du cocotier à une autre. Pour déterminer les raisons de cette différence épidémiologique, des études menées sur la caractérisation morphologique des 4 souches de *Phytophthora katsurae* ont montré une différence significative pour la croissance mycélienne au niveau des souches provenant de la station Marc Delorme de Port-Bouët (Abidjan), de la station Robert Michaux de Dabou, d'Assinie et de Fresco (Yao, 2002). La différence simultanée observée sur le plan morphologique de ces 4 souches, nous a conduit à ce travail dont les objectifs sont axées autour de 3 points: l'évaluation du niveau d'agressivité de chaque souche; le comportement de chaque souche sur milieu de culture; la détermination de l'activité de deux enzymes : la pectate lyase et la laccase sécrétées par les souches. Ces deux enzymes sont des enzymes hydrolytiques qui interviennent dans la dégradation de la paroi pectocellulosique du végétal.

MATERIEL ET METHODES

Site expérimental : L'étude a été faite à la station de recherche Marc Delorme (Abidjan). Cette station a été créée en 1949 par l'Institut de Recherche pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) et est devenue depuis 1998 une station du Centre National de Recherche

Agronomique (CNRA). Elle est située à 12 Km de l'axe routier Abidjan-Bassam. Les coordonnées géographiques sont de 5°14 et 5°15 latitude Nord et 3°54 et 3°55 longitude Ouest. Elle est en bordure d'une branche de la lagune Ebrié. La station de



recherche Marc Delorme est leader dans la recherche sur le cocotier au plan mondial. Elle dispose d'importants résultats sur le cocotier dans les domaines divers qu'elle couvre depuis plus de quarante ans. La station dispose de deux vergers de cocotiers. Le verger dit bloc 500 couvre 650 ha avec 80% dédié à la collection génétique et à l'expérimentation et 20% à l'exploitation pure. Puis le verger d'Assinie canal avec 190 ha également pour la recherche (Lekadou, 2002 et Anonyme, 2003). Elle est soumise à un climat Attiéen à quatre saisons dont la grande saison des pluies (Avril à mi- Juillet), la petite saison sèche (mi- Juillet à mi-Septembre), la petite saison des pluies (mi- Septembre à Novembre) et la grande saison sèche (Décembre- à Mars). La température moyenne annuelle s'élève à 26,1°C. Les précipitations moyennes annuelles atteignent quelque 2000 mm. Le sol de type ferrugineux hydromorphiques à dominance sableuse est propice à la culture du cocotier.

Végétal : Les noix de coco de 8 mois d'âge de la variété Nain Vert de Guinée Equatoriale (NVE) ont été utilisées pour les inoculations (douces et brutales). Cette variété a été choisie en raison de sa très grande sensibilité à *Phytophthora katsurae*. Elles ont été récoltées sur la parcelle 132 de la station de recherche Marc Delorme.

Fongique : Quatre souches de *Phytophthora katsurae* de quatre zones de culture du cocotier au Sud de la Côte d'Ivoire (Marc Delorme, Assinie, Fresco et Robert Michaux) ont été isolées des noix de coco infectées et utilisées au cours des travaux. Avant l'opération d'isolement, le scarpelle, le couteau et la pince ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 30 mn sous une pression de 1,5 bar. L'isolement de ces souches s'est fait à partir des fragments de mésocarpe prélevés sur les noix malades préalablement désinfectées à l'alcool à 90°C puis taillées avec un couteau. Le scarpelle a été ensuite utilisé pour rafraîchir les faces avant de découper la zone à prélever. A l'aide de la pince, les morceaux ont été ensemencés sur les différents milieux de culture déjà solidifiés dans les boîtes de pétri en verre auparavant stérilisées à l'étuve à 120°C pendant 30 mn. Ces boîtes ont été scotchées et étiquetées avant de les incuber à l'étuve à la température de 25°C. Cette opération d'isolement et d'ensemencement des souches s'est déroulée sous une hotte et en présence d'une flamme. Six jours après l'ensemencement, des purifications ont été faites afin d'isoler chaque souche. La méthode de purification consiste à repiquer plusieurs fois chaque souche sur de nouveaux milieux de culture dans les conditions stériles

de sorte à pouvoir isoler uniquement chacune des souches sans une contamination.

Préparation de l'inoculum : Le β -sitostérol ajouté aux milieux de culture, favorise précocement le développement et la production de sporocystes chez *P. katsurae* (Allou & De Franqueville, 2001 ; Yao, 2002). Après l'étape de purification, chaque souche obtenue a été encore repiquée sur milieux de culture et mise à l'incubateur à 25°C. Après 8 jours d'incubation, ces souches ont été retirées de l'incubateur puis inondées de 15 ml d'eau distillée et mises au froid à 4°C pendant 30 min puis à la température ambiante pendant 10 à 15 mn. Cette différence de température favorise la libération des zoospores (Ouattara, 2003). La solution obtenue à partir des souches de *P. katsurae* purifiées est appelée l'inoculum. Chaque inoculum est observé au microscope optique pour s'assurer de l'existence des zoospores avant l'inoculation.

Techniques d'inoculation et dispositif expérimental

Deux techniques d'inoculation ont été utilisées sur les noix de coco saines: l'une brutale et l'autre douce. Pour l'inoculation brutale, une ouverture dans le mésocarpe à l'aide d'un couteau stérilisé à l'autoclave a été faite dans la partie équatoriale de la noix. L'inoculation de la noix a été réalisée par le dépôt de 0,02 ml d'inoculum dans la blessure. Après cette opération, un ruban de scotch a été utilisé pour fermer le réceptacle d'inoculum. Quant à la technique d'inoculation douce, elle a consisté à découper un tuyau en plastique en morceaux (diamètre 0,8 cm et de longueur 0,5 cm). Chaque morceau a été collé sur la partie équatoriale de la noix afin de ménager un réceptacle à l'inoculum. Dans l'inoculation douce, l'inoculation des noix de coco s'est faite également par le dépôt de 0,02 ml d'inoculum à l'aide de pipettes pasteurs à travers le tuyau aménagé comme un réceptacle sans blesser la noix. Puis à l'aide d'un ruban de scotch, le réceptacle d'inoculum a été fermé pour éviter toute contamination externe. Cette dernière technique permet d'éviter un traumatisme à la noix.

Deux essais ont été réalisés. Le dispositif expérimental, en bloc complètement aléatoire et composé de 125 noix de coco saines par essai se présente comme suit: pour chaque type d'inoculation, 5 blocs ont été constitués. Et dans chaque bloc, 25 noix ont été soumises à 5 traitements, c'est à dire à dire 5 noix par traitement. Dans l'ensemble des 5 blocs, 25 noix ont été soumis à un même traitement et ainsi de suite jusqu'au 5 traitements. 5 répétitions ont été réalisées par essai. Ces traitements sont constitués d'inoculum des souches de Marc Delorme (MD), de Robert

Michaux (RM), d'Assinie (AS), de Fresco (FR) et d'eau distillée utilisée comme inoculum pour les noix témoins.

Mesure de l'évolution des symptômes : L'observation des noix s'est faite depuis le premier jour d'inoculation noté jour 0 (J_0) jusqu'au 15^{ème} jour (J_{15}). L'évolution des symptômes a été mesurée par la hauteur (h) et le diamètre (d) de la tâche sur chaque noix. Cette mesure a été faite quotidiennement et la détermination du diamètre moyen ($\bar{\varnothing}$) de la lésion sur chaque noix a été calculée comme suit:

$\bar{\varnothing} = (h + d) / 2$ (Allou, 1992 et Acho, 2002).

Ces mesures et observations ont permis d'exprimer : le taux d'infection des noix pour chaque méthode d'inoculation; la durée de la période d'incubation de chaque souche; l'apparition des symptômes et leur vitesse de propagation dans les tissus de l'hôte.

Extraction et dosage de la Pectate lyase et de la Laccase : Les différentes souches de champignons cultivés dans les milieux de culture V_8 liquides avec ou sans β -sitostérol ont été utilisées. Après 8 jours de croissance, les récipients contenant les champignons ont été mis au réfrigérateur à 4°C pendant 30 min. Les souches ainsi traitées ont été récoltées, filtrées au moyen d'une toile de 50 μ m de mailles. Cinq grammes de champignon ont été broyés dans 15 ml de tampons Tris-HCl 75mM, pH 7,5 et phosphate de sodium 200 mM, pH 5,7 respectivement pour la pectate lyase et la laccase. L'extrait filtré au moyen de la même toile a été centrifugé à 5000 tours.min⁻¹ pendant 15 min. Le surnageant obtenu a constitué l'extrait enzymatique brut. Le dosage de la pectate lyase a été faite selon la méthode décrite par Rombouts et Pilnik (1980) et Raoundha (2001). Le mélange réactionnel contient 5

mM d'acide polygalacturonique, 5 mM de Chlorure de Calcium et 0,5 ml de chaque extrait enzymatique. Le volume final a été ajusté à 3 ml à l'aide de tampon d'extraction. L'incubation a été faite à 37°C pendant 30 min. Le dosage de la laccase a été réalisé selon la méthode de Farnet *et al.* (1999 et 2002). Le mélange réactionnel contient 5 mM de Syringaldazine et 0,5 ml d'extrait enzymatique. Le volume final a été ajusté à 3 ml au moyen du tampon d'extraction. Le milieu réactionnel a été incubé à 30°C pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 525 nm contre un témoin sans substrat respectivement pour la pectate lyase et la laccase. L'activité des enzymes a été exprimée en unités par minute et par milligramme de protéines. Le dosage des protéines a été fait selon la méthode de Bradford (1976) également utilisée par Tahiri *et al.*, (2000) pour étudier les teneurs en protéines chez l'algue verte. La quantité de protéines a été déterminée selon la courbe d'étalon établie à partir des concentrations connues de protéine standard de Sérum Albumine Bovine (SAB).

Analyses statistiques : Le logiciel Minitab 12.0 version Windows (1998) a été utilisé pour les analyses statistiques. Les données relatives à l'évolution des lésions sur une quinzaine de jours ont été soumises à une analyse de variance à deux facteurs: souches et blocs (ANOVA). La comparaison des moyennes s'est faite par le test PPDS (Plus Petite Différence Significative). Le test binomial a été utilisé pour comparer les activités enzymatiques de chaque souche. Pour toutes ces analyses statistiques effectuées, les différences sont significatives au seuil de probabilité $P < 5 \%$.

RESULTATS

Expressions de symptômes de *P. katsurae* : Les symptômes causés par les quatre souches de *P. katsurae* ont été les mêmes sur les noix de coco inoculées. Sur l'épicarpe, les symptômes externes se sont présentés sous la forme de marbrures aux contours irréguliers. La coloration des taches a varié de brun clair à brune au centre et jaunâtre à la périphérie. Les bordures ont été translucides et plus ou moins nettes. Les symptômes internes ont présenté une bourre huileuse à coloration brune et noire. L'albumen est devenu translucide et brun avec une odeur

nauséabonde. **Sur des noix après inoculation douce :** La durée d'incubation a varié selon les souches (figure 1). D'abord, elle a été de 4 jours pour la souche de Robert Michaux, puis de 5 jours pour les souches de Fresco et Marc Delorme et enfin de 6 jours pour la souche d'Assinie. De même, le nombre de noix infectées a été important au 6^{ème} jour (la souche de Robert Michaux), au 7^{ème} jour (la souche de Fresco) et au 8^{ème} jour (les souches de Marc Delorme et d'Assinie) (figure 1).

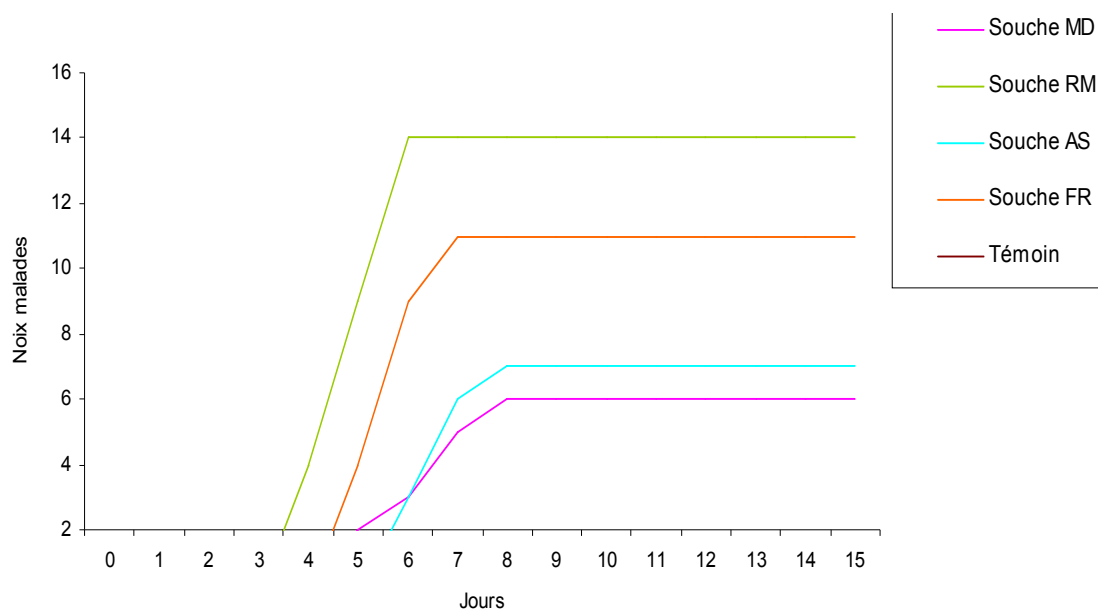


Figure 1: Nombre de noix malades par les souches de *Phytophthora katsurae* a près inoculation douce. MD : Souche de Marc Delorme; AS : Souche d'Assinie; RM : Souche de Robert Michaux; FR : Souche de Fresco.

Sur des noix après inoculation brutale : Le 3^{ème} jour a constitué la période d'incubation des 4 souches. Le maximum de noix malades a été atteint entre le 6^{ème} jour (la souche de Fresco), le 7^{ème} jour (la souche d'Assinie) et le 9^{ème} jour (les souches de Marc Delorme et de Robert Michaux) (figure 2).

Vitesse de croissance

Cas d'inoculation douce : Pour l'inoculation douce (figure 3), les souches de Marc Delorme et d'Assinie ont atteint leur maximum respectif de 2,10 cm.j⁻¹ et de 3,9 cm.j⁻¹ dès l'apparition des symptômes le 6^{ème} jour. La souche de Fresco a atteint le maximum de 3,36 cm.j⁻¹ le 6^{ème} jour. La souche de Robert Michaux a accéléré sa vitesse pour atteindre la croissance maximale de 4,5 cm.j⁻¹ le 6^{ème} jour après l'apparition des symptômes le 4^{ème} jour. Au-delà de leur croissance maximale, chaque souche a eu une vitesse décroissante en dents de scie.

Une différence très hautement significative ($P=0,000$) a été notée entre les vitesses moyennes des lésions chez les 4 souches. De même l'interaction souches et blocs a été très hautement significative ($P=0,000$). Mais aucune différence significative n'a été observée entre

les blocs ($P=0,086$). Les témoins n'ont pas exprimé de symptômes.

Cas d'inoculation brutale : L'inoculation brutale (figure 4), les souches d'Assinie et de Fresco ont atteint leur maximum de croissance le 4^{ème} jour avec respectivement 3,18 et 3,51 cm.j⁻¹. Les souches de Marc Delorme et de Robert Michaux ont atteint leur maximum respectif de 3,49 cm.j⁻¹ et de 3,83 cm.j⁻¹ le 5^{ème} jour. A partir du 6^{ème} jour, la vitesse des lésions de chaque souche décroît en forme de dents de scie jusqu'au 15^{ème}. Les analyses statistiques ont montré une différence non significative ($P=0,325$) entre les vitesses moyennes des lésions des 4 souches.

Caractéristiques microscopiques des 4 souches de *P. katsurae* : L'observation macroscopique sur milieu de culture des 4 souches a révélé dans l'ensemble un contour régulier, une coloration hyaline et un aspect lisse. L'observation microscopique a montré une ramification non cloisonnée des mycéliums. Les sporocystes et oospores, de forme ovale, aux contours irréguliers avec une papille apicale et les chlamydospores, de forme arrondie sont identiques chez les 4 souches (figure 5).

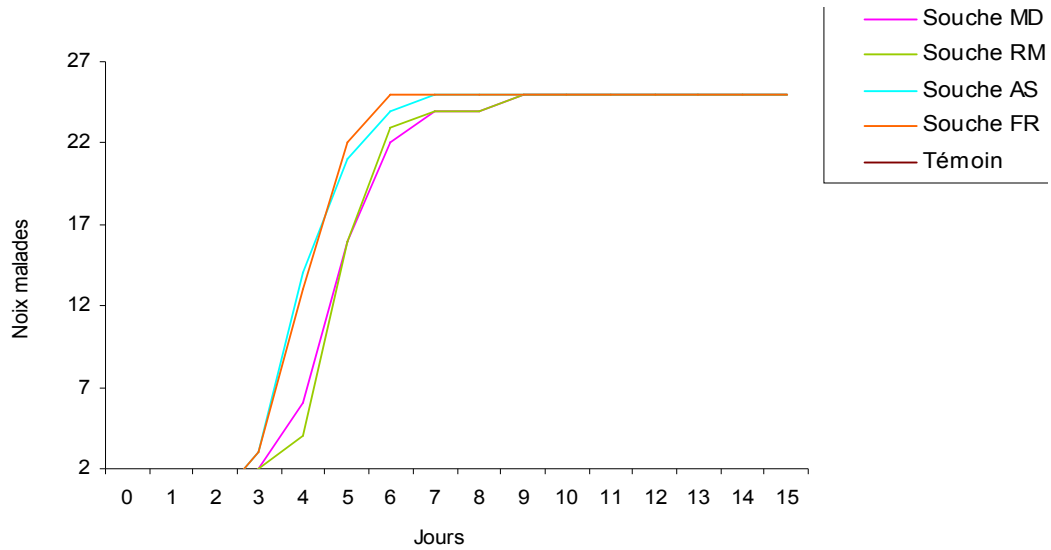


Figure 2: Nombre de noix malades par les souches de *Phytophthora katsurae* après inoculation brutale. MD : Souche de Marc Delorme; AS : Souche d'Assinie; RM : Souche de Robert Michaux; FR : Souche de Fresco.

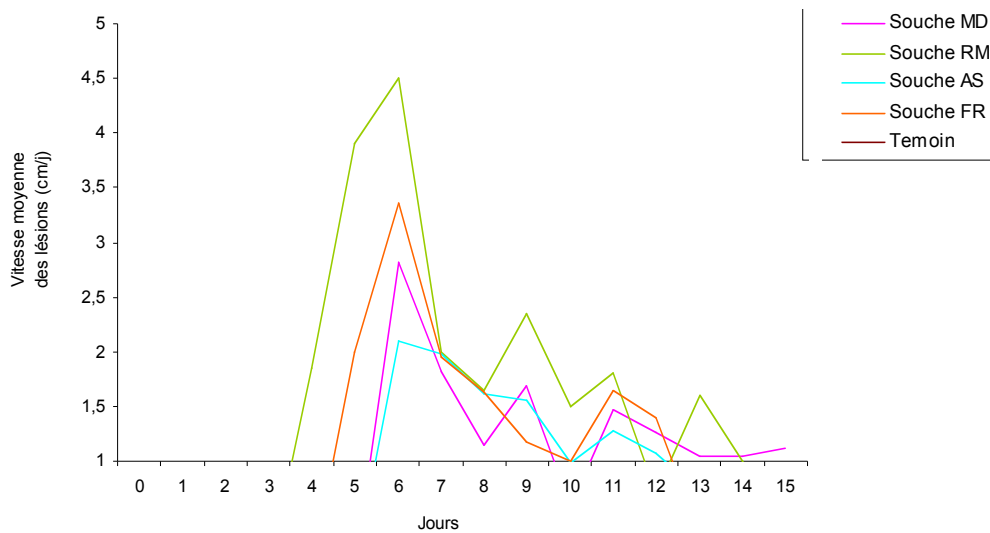


Figure 3 : Vitesse moyenne journalière des lésions des souches de *Phytophthora katsurae* après inoculation douce. MD : Souche de Marc Delorme; AS : Souche d'Assinie; RM : Souche de Robert Michaux; FR : Souche de Fresco.

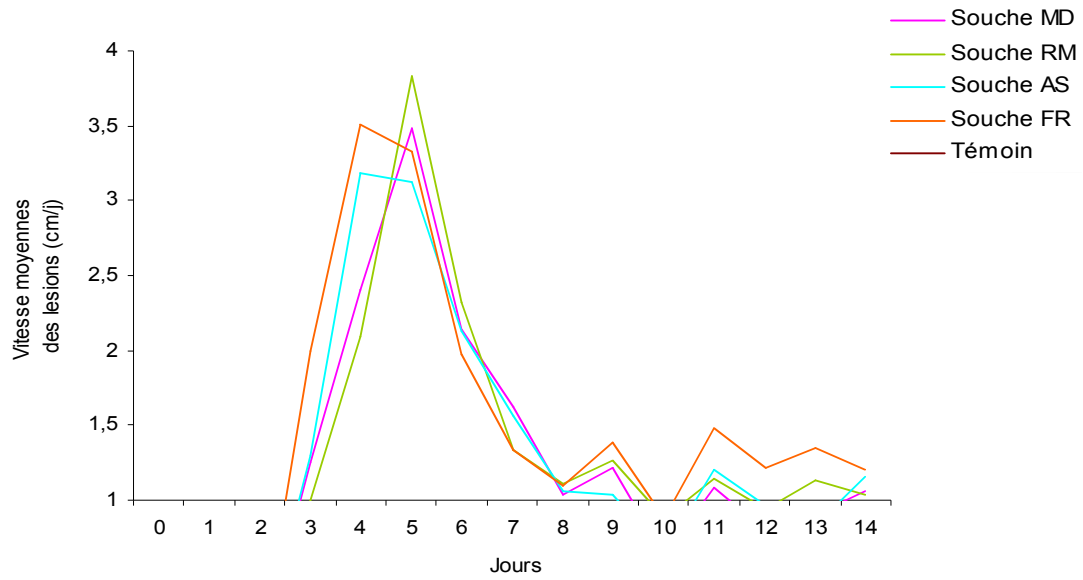


Figure 4 : Vitesse moyenne journalière des lésions des souches de *Phytophthora katsuræ* après inoculation brutale. MD : Souche de Marc Delorme; AS : Souche d'Assinie; RM : Souche de Robert Michaux; FR : Souche de Fresco.

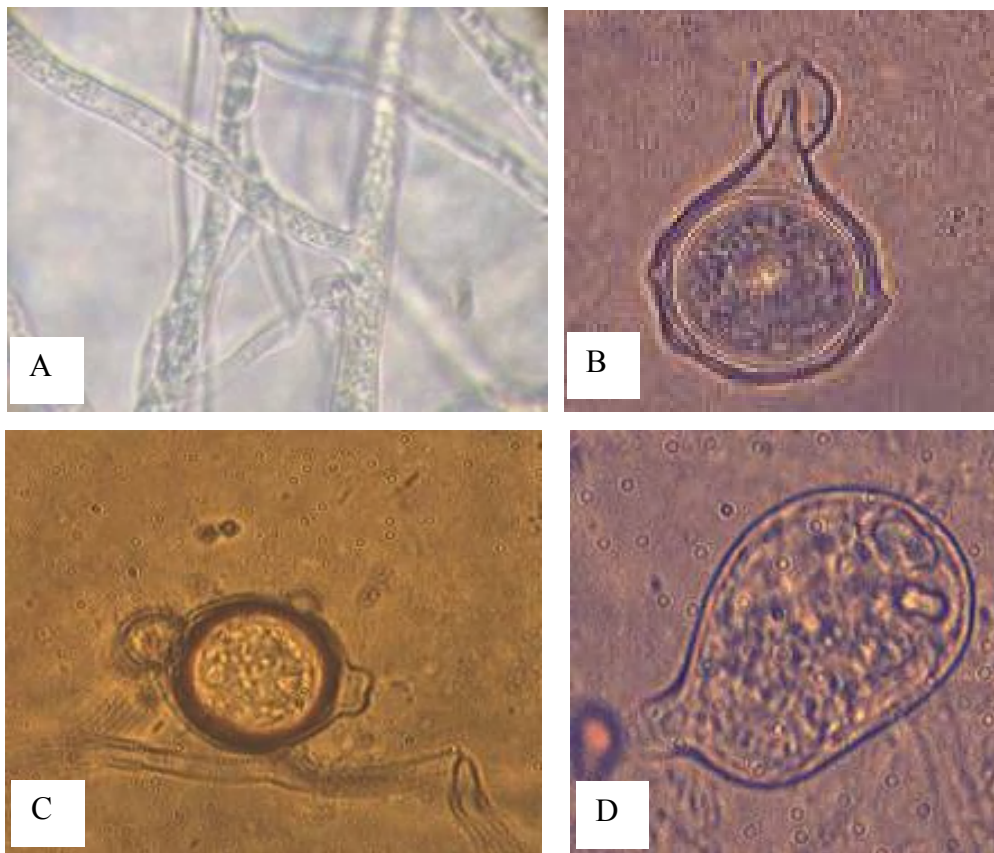


Figure 5 : Caractéristiques microscopiques des souches de *Phytophthora katsuræ* : A :Mycélium ; B : Oospore ; C : Chlamydospore ; D : Sporocyste).

Activité enzymatique de la pectate lyase : Hormis la souche de Robert Michaux avec une activité enzymatique constante de $18,33 \cdot 10^{-3}$ unités / min / mg de protéine, celle des autres souches a varié du milieu avec β -sitostérol au milieu sans β -sitostérol (figure 6). Ces activités sur milieu sans β -sitostérol varient entre $2,5 \cdot 10^{-3}$ (la souche d'Assinie) à $18,33 \cdot 10^{-3}$ unités / min / mg de protéine (la souche de Robert Michaux). La souche de Robert Michaux a eu une activité enzymatique d'environ 4 fois supérieure à celle de la souche de Marc Delorme et 7 fois supérieure à celle de la souche d'Assinie. La souche de Fresco a eu une activité enzymatique 2 fois supérieure à celle de la souche de Marc Delorme et 4 fois supérieure à celle de la souche d'Assinie. Sur milieu avec β -sitostérol, elles sont estimées à $11 \cdot 10^{-3}$ (la souche d'Assinie) à

$25,25 \cdot 10^{-3}$ unités / min / mg de protéine (la souche Marc Delorme). Suite aux analyses statistiques, trois groupes homogènes se sont dégagés. Sur milieu sans β -sitostérol, la différence entre les souches de Marc Delorme et d'Assinie représentant le groupe A n'a pas été significatif à 5 %. La souche de Fresco a été significatif à 5 % avec le groupe A*. Puis la souche de Robert Michaux avec le groupe A** a été hautement significatif à 5 % (figure 6). Sur milieu V_8 avec β -sitostérol, la souche de Marc Delorme constituant le groupe A*** a été très hautement significatif à 5 %, celle de Robert Michaux formant le groupe A** a été hautement significatif à 5 %. Puis les souches d'Assinie et de Fresco ont constitué le groupe A* avec une différence significatif à 5 % (figure 6).

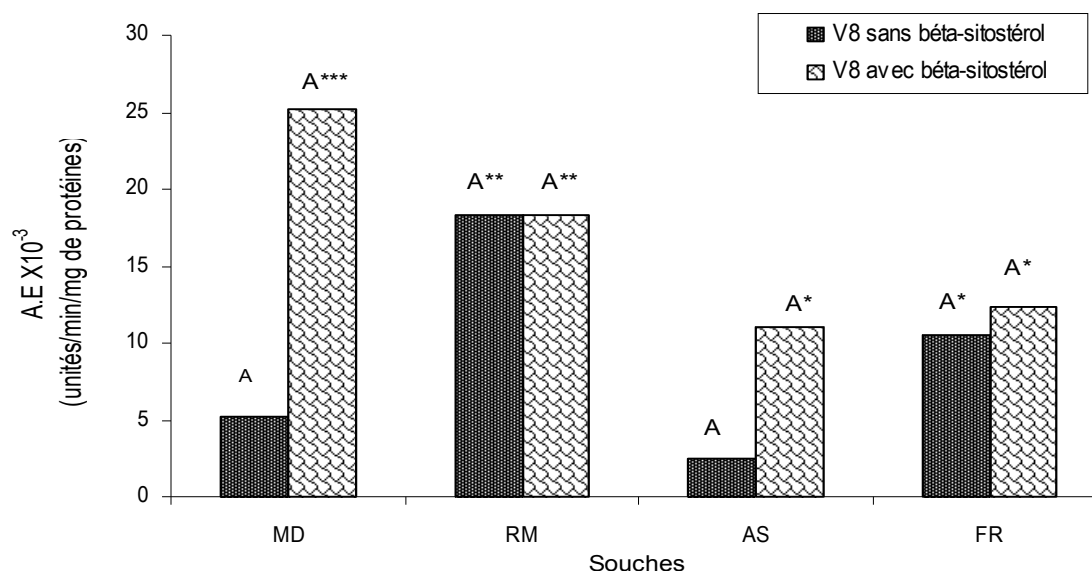


Figure 6 : Activités enzymatique de la pectate lyase de quatre souches de *Phytophthora katsuræ* cultivées sur milieux V_8 avec et sans β -sitostérol. $P > 0,05$: non significatif à 5 % (même lettre); $P < 0,01$: hautement significatif à 5 % (**); $0,01 < P \leq 0,05$: significatif à 5 % (*); $P < 0,001$: très hautement significatif à 5 % (***) ; MD : Souche de Marc Delorme; AS : Souche d'Assinie; RM : Souche de Robert Michaux; FR : Souche de Fresco

Activités enzymatiques de la laccase : L'activité de la laccase sur les deux milieux de culture est sensiblement la même au niveau de chaque souche (figure 7). Ces activités sur milieu V_8 sans β -sitostérol varient entre 3,90 unités/min/mg de protéines (la souche de Marc Delorme) à 10,26 unités/min/mg de protéines (la souche de Robert Michaux). Les activités enzymatiques des souches de Robert Michaux, d'Assinie et de Fresco ont été environ 3 fois supérieures à celle de la souche de Marc Delorme. Sur milieu V_8 avec β -sitostérol, elles sont estimées à 3,63 unités/min/mg de protéines (la souche de Marc

Delorme) à 9,74 unités /min/mg de protéines (la souche de Robert Michaux). L'analyse statistique effectuée sur ces deux milieux a permis de constituer deux groupes homogènes. Sur milieu V_8 sans β -sitostérol, la souche de Marc Delorme représentant le groupe A n'a pas été significatif à 5%. Les souches Robert Michaux, Assinie, Fresco constituant le groupe A* ont été significatifs à 5% (figure 7). Sur milieu V_8 avec β -sitostérol, la souche de Marc Delorme constituant le groupe A n'a pas été significatif à 5%. Les souches de Robert Michaux, d'Assinie, de Fresco ont constitué le groupe A* avec une différence significative à 5% (figure 7).

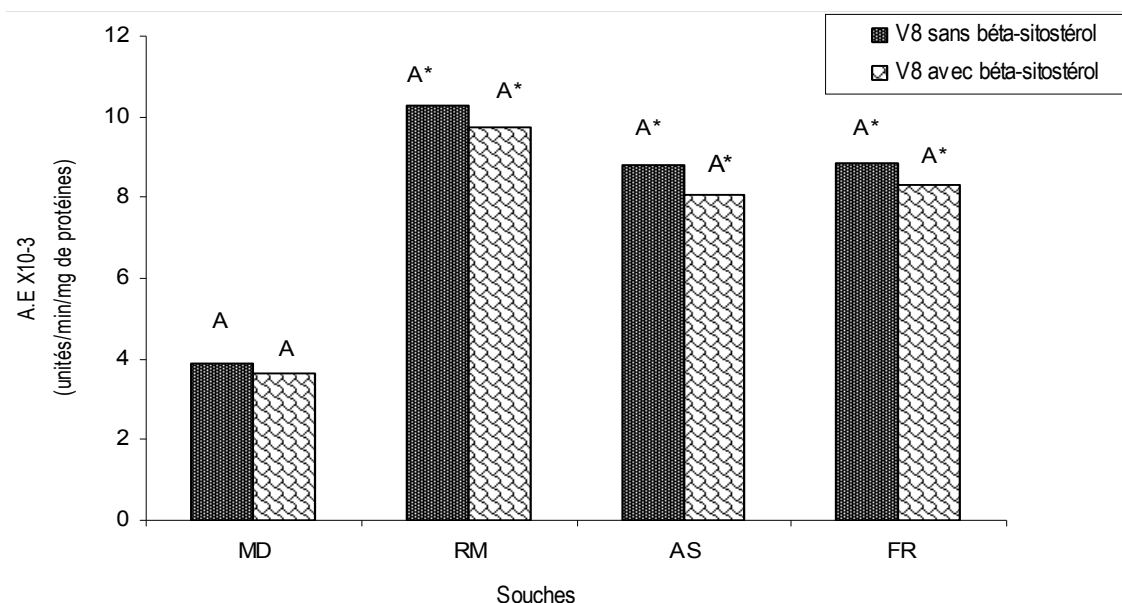


Figure 7: Activité enzymatique de la laccase de quatre souches de *Phytophthora katsurae* cultivées sur milieu V8 avec et sans bêta-sitostérol. $P > 0,05$: non significatif à 5 % (même lettre) ; $0,01 < P \leq 0,05$: significatif à 5 % (*) ; MD : Souche de Marc Delorme; AS : Souche d'Assinie; RM : Souche de Robert Michaux; FR : Souche de Fresco.

DISCUSSION

Expressions de symptômes de *P. katsurae* sur noix de coco après l'inoculations : Toutes les noix inoculées ont présenté les mêmes symptômes quelle que soit la souche utilisée. Ces symptômes sont identiques à ceux décrites par Thevenin (1990). Les observations macroscopiques et microscopiques n'ont pas permis de différencier les souches. Ces résultats montrent que l'éventuelle différence observée entre les quatre souches dans les travaux précédents de Yao (2002) ne se trouverait ni dans l'expression des symptômes ni dans la morphologie des souches. Mais, cette différence serait liée d'une part, à l'agressivité de chaque souche sur les noix et d'autre part, à la capacité de synthèse des enzymes hydrolytiques des parois cellulaires du végétal. La technique d'inoculation a beaucoup influencé l'apparition et l'évolution des symptômes. En effet, la durée d'incubation des 4 souches dans l'inoculation brutale est de 3 jours. Par contre, en inoculation douce, cette durée est de 4 à 6 jours. Cette différence d'apparition des premiers symptômes au niveau des deux types d'inoculations est due aux barrières physiques. En effet, la disparition de ces barrières par la blessure des noix favorise un bref temps de latence des souches. Mais lorsque celles-ci ne sont pas détruites, leur présence retarde l'apparition des symptômes. Pohé (1992) a affirmé que la longue

durée du temps d'incubation en inoculation douce dépend en grande partie de l'anatomie du fruit. Ainsi, le péricarpe apparaît-il comme une barrière physique à l'entrée des souches et à l'expression des premiers symptômes. Les présents résultats confirment ceux obtenus au cours des études antérieures menées par Bujung (1990), Allou (1992) et Ouattara (2003).. Hormis les témoins, toutes les noix ont été malades avec la technique d'inoculation brutale contrairement à l'inoculation douce. Cela s'expliquerait par le fait que, l'inoculation brutale nécessite une blessure de la noix. Cette destruction du péricarpe et du mésocarpe qui constitue les premières structures de défenses des noix, faciliterait la pénétration du champignon dans les tissus de la noix. Cette assertion a été confirmée Les présents résultats confirment ceux obtenus au cours des travaux antérieurs réalisés par Bujung (1990) sur la meilleure technique d'inoculation avec l'emporte-pièce. De même, Agrios (1997) a affirmé que les blessures constituent des portes d'entrée du champignon. En revanche, l'inoculation douce ne cause pas un traumatisme de la noix. Les noix disposent de leurs barrières externes et pour franchir celles-ci, le pathogène doit être capable de sécréter les enzymes hydrolytiques capables de dégrader les parois des cellules des tissus facilitant ainsi sa pénétration et son

invasion dans les noix. Contrairement à l'inoculation brutale, l'inoculation douce a permis de montrer une différence au niveau de l'agressivité des souches sur les noix. Cette méthode a permis d'apprécier la différence observée au niveau de ces quatre souches cultivées in vitro dans les précédents travaux de Yao (2002).

Activités de la pectate lyase et de la laccase des 4 souches : L'évaluation de l'activité de la pectate lyase et celle de la laccase ont mis en exergue la capacité de chaque souche à synthétiser ces enzymes. Cependant, cette synthèse est fonction de chaque souche. Sur milieu sans β -sitostérol, l'activité de la pectate lyase de la souche de Robert Michaux et celle de la souche de Fresco ont été plus élevées que celles des souches de Marc Delorme et d'Assinie. Ces différents résultats montrent l'existence d'une variabilité au niveau des quatre souches. Cette variabilité serait liée à des gènes. En effet, dans le génome des souches de Robert Michaux et de Fresco, les gènes impliqués dans la synthèse de la pectate lyase et de la laccase seraient activés. Ainsi, cette possibilité d'activation de ces enzymes aurait permis leur synthèse en quantité nécessaire pour dégrader rapidement la pectine et la lignine qui sont des éléments constitutifs de la paroi cellulaire végétale (Reverchon et al., 2002). Cette dégradation a conduit à une dislocation des éléments de cette paroi. Ce qui a entraîné le ramollissement du péricarpe, l'invasion des tissus de la bourre et donc la pourriture des noix. Ces faits expliquent la réduction du temps d'incubation en inoculation douce des souches de Robert Michaux et de Fresco et aussi, le taux élevé de noix malades par rapport aux souches de Marc Delorme et d'Assinie. En effet, les souches de Robert Michaux et de Fresco auraient la capacité de produire dans un laps de temps ces enzymes pour une destruction massive des noix de coco contrairement aux souches de Marc Delorme et d'Assinie. Cela est confirmé par l'activité de la pectate lyase des souches sur milieu sans β -sitostérol.

Au niveau de l'inoculation brutale, l'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre les vitesses moyennes des lésions des quatre souches. Ces résultats viennent encore confirmer la destruction des barrières physiques des noix causée par la blessure qui devient une voie très facile à la pénétration des souches. Ici, les bases de compétition à savoir la rapidité avec laquelle chaque souche doit être capable de synthétiser les enzymes hydrolytiques pour la destruction des constituants de la paroi cellulaire végétale ont été exclues. Se trouvant toute les quatre

dans les mêmes conditions d'attaque du végétal, leur dégâts causés ont évolué de la même manière et donc très difficile d'émettre une éventuelle différence d'agressivité entre les souches. En revanche, dans l'inoculation douce, l'analyse statistique des vitesses moyennes des lésions a montré une différence très hautement significative entre les souches. Cette différence observée serait liée à l'agressivité de chaque souche sur le matériel végétal. Autrement dit, la différence entre les souches serait liée à la rapidité avec laquelle leurs enzymes sont synthétisés et aussi leur capacité à dégrader rapidement les parois cellulaires. L'apport de β -sitostérol au milieu de culture a induit non seulement la production de sporocystes, résultats confirmant ceux précédemment obtenus par Allou (1992) et Yao (2002) mais aurait eu aussi une influence sur l'activité de la pectate lyase. En effet, chez toutes les souches étudiées à l'exception de la souche de Robert Michaux, le milieu V_8 avec β -sitostérol a permis d'obtenir un taux de sporocystes très élevé et une activité importante de la pectate lyase. La corrélation entre la forte activité de la pectate lyase et la production des sporocystes démontre que le pouvoir pathogène des souches se trouve dans les zoospores. Ce résultat est en accord avec ceux de Mariau (1999) qui ont montré que les zoospores sont aussi des agents responsables de la contamination. La stimulation de l'activité de la pectate lyase en présence de la β -sitostérol, chez les souches de Marc Delorme et d'Assinie a montré que la production de cette enzyme a été induite par l'hormone. La comparaison de l'activité de la laccase sur les deux milieux de culture n'a pas présenté de différence. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la synthèse de la laccase ne serait pas effectuée dans les sporocystes mais au sein du mycélium. Aussi, en plus des sporocystes, les mycéliums joueraient un rôle dans l'infection. De même, la faible activité de la laccase par rapport à celle de la pectate lyase chez les souches pourrait s'expliquer par la faible densité mycélienne des souches sur milieu V_8 due à une faible source de carbone de ce milieu. Des travaux entrepris par Bocas et Laville (1976) ont indiqué que chez les espèces du genre *Phytophthora*, les sources de carbone assurent une croissance mycélienne harmonieuse. Si la laccase est susceptible de dégrader la lignine, son action serait précédée de celle de la pectate lyase. En effet, la pectate lyase permettrait le ramollissement de l'épicerpe en disloquant les cellules et de ce fait faciliterait la pénétration des souches dans les noix. Son action serait secondée par celle de la laccase qui en



dégradant les lignines permet l'invasion des noix par les souches. Les différentes activités enzymatiques, le taux d'infection des noix et les vitesses de propagations de la maladie dans les tissus des noix ont permis de trouver une différence entre les souches selon leur niveau d'agressivité. Si l'inoculation douce semble être

plus proche de la voie naturelle de contamination des noix par le champignon, les observations faites sur les parcelles expérimentales au sujet de la variation des dégâts causés par le champignon d'une région à une autre seraient liées à une variabilité au sein de l'espèce.

CONCLUSION

Au terme de cette étude, on retient que la technique d'inoculation douce a permis d'évaluer le niveau d'agressivité de chaque souche bien qu'on ait un faible taux de noix malades; contrairement à l'inoculation brutale. La réussite de l'inoculation douce nécessite une précaution afin de ne pas obstruer le réceptacle de l'inoculum. Les critères morphologiques à savoir la forme, la couleur et l'aspect des organes n'ont pas permis de distinguer les souches. Cependant, l'activité de la pectate lyase et celle de la laccase ont mis en exergue l'existence d'une variabilité au sein de l'espèce *Phytophthora katsurae*. Cette variabilité serait liée aux gènes impliqués dans la synthèse de la pectate lyase et de la laccase. La méthode d'inoculation douce en corrélation avec les activités enzymatiques de la pectate lyase et de la laccase sur milieu sans β -sitostérol ont permis de classer les souches selon l'ampleur des dégâts causés sur les noix. Ainsi, les souches de Marc Delorme et d'Assinie seraient moins agressives que la souche de Fresco qui serait moins agressive que la souche de Robert Michaux. Aussi,

l'étude enzymatique a-t-elle révélé que le pouvoir pathogène de chaque souche provient non seulement des zoospores mais également du mycélium. Mais que l'action du dernier est précédée de celle du premier.

L'apport de β -sitostérol n'a pas influencé la croissance mycélienne des souches. Néanmoins, l'addition de β -sitostérol au milieu a favorisé la production de sporocystes, ce qui a influencé de façon positive l'activité de la pectate lyase. Notre recherche a permis de caractériser les différentes souches de *Phytophthora katsurae*, l'une des maladies la plus grave du cocotier en Côte d'Ivoire au niveau de leur pathogénécité. Ces résultats montrent bien que la virulence est liée aux génomes de la souche et non seulement aux conditions environnementales avancées auparavant. Avec la détermination de cette souche la plus virulente, elle pourrait être utilisée pour les différents tests de recherche de tolérance variétale au niveau du cocotier et aussi à la recherche de la rémanence de l'acide phosphoreux dans le cadre de la lutte chimique contre ce pathogène.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acho NF, 2002. Comportement de six variétés de cocotier (*cocos nucifera L.*): NRC, NJM, NVE, GRL, PB 121 et PB 113 vis-à-vis du *Phytophthora katsurae* à partir des inoculations artificielles. Mémoire de Maîtrise en Protection des Végétaux et de l'Environnement, Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan), 33 p.
- Agrios GN, 1997. Plant Pathology. Academic Press, 4th edition, San Diego, California: 635 pp.
- Allou K, 1992. Comportement des noix de coco de différentes variétés vis-à-vis du *Phytophthora katsurae*. Diplôme d'Etude Approfondie, Université d'Abidjan, 62p.
- Allou K, Bourdeix R, Aké S, Konan J-L, Zakra N, 2002. *Phytophthora katsurae* (Pythiaceae) du cocotier en Côte d'Ivoire: Tolérances variétales de 53 hybrides et données épidémiologiques de base. Agronomie Africaine XIV (2): 79-125.
- Allou K. et De Franqueville H, 2001. Efficacité comparée du Phosétyl-Al et de l'acide phosphoreux dans la lutte contre *Phytophthora katsurae* du cocotier. *Agronomie Africaine*, XIII (3): 95-139.
- Anonyme, 2003. Le CNRA en 2003. Rapport d'activité annuelle. Direction des Programmes de recherche et de l'appui au développement: 71p.
- Bocas B. et Laville E, 1976. Les maladies à *Phytophthora* des agrumes. IRFA: 162 pp.
- Bradford MM, 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding: *An. Biochem.* 72: 248-154
- Bujung A, 1990. Comportement des noix de coco de différentes variétés vis-à-vis du *Phytophthora heveae*. Diplôme d'Agronomie Tropicale, Ecole Supérieure d'Agronomie Tropicale (ESAT): 81p.



- De Franqueville H, De Taffin G, Sangaré A, Saint JP, Pommier M et Renard J L, 1989. Mise en évidence de caractère de tolérance au *Phytophthora heveae* chez le cocotier en Côte d'Ivoire. *Oléagineux* 44 (2): 93-99.
- Farnet AM, Tagger S, Le Petit J, 1999. Effets du cuivre et de composés aromatiques sur les laccases du champignon de la pourriture blanche *Marasmius quercophilus*. Laboratoire de microbiologie, Upressa CNRS 6116, Institut méditerranéen d'écologie et de paléoécologie, faculté des sciences et techniques de Saint-Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France: 499-503.
- Farnet AM, Criquet S, Pocachard E, 2002. Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter (*Quercus suber* L.). *Mycologia* 94 (5): 735-740.
- Lekadou TT, 2002. Etude de l'évolution minérale de la bourre et du tourteau de coprah et de leurs effets sur les plants de cocotier (*Cocos nucifera* L.) en pépinière. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Cocody (Abidjan): 64 p.
- Mariau D, 1999. Les maladies des cultures pérennes tropicales. CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement): 287pp.
- Ouattara S, 2003. Comportement de six variétés de noix de cocotier (*Cocos nucifera* L.) vis-à-vis du *Phytophthora katsurae* à partir d'inoculations artificielles. Mémoire de Maîtrise en Protection des Végétaux et de l'Environnement, Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan), 24p.
- Persley GJ, 1992. In replanting tree of life. CAB Int. UK. ISBN 0851988156: 156p.
- Pohé J, 1992. Behavior of coconut susceptibility to *Phytophthora heveae* attacks in Côte d'Ivoire. *Coconut Phytophthora workshop in Manado (Indonesia)*, October 26-30: 111-115.
- Raoundha MK, 2001. Effet de la Pectolyase Y-23 et de la Cellulase RS sur le rendement en protoplastes viables de *Prunus cerasus* L. "Montmorency". Ecole supérieure d'horticulture de Chott-Meriem. 4042 Sousse (Tunisie). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (2): 99-104.
- Reverchon S, Rouanet C, Expert D, Nasser W, 2002. Characterization of Indigoidine biosynthetic Genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 3 (184): 654-665.
- Rombouts FM. and Pilnik W, 1980. Pectic enzymes. In *Rose Att. Economic Microbiology 5, microbiology enzymes and bioconversions*. London: Academic Press, 227-282.
- Tahiri M, Benider A, Belkoura M, Dauta A, 2000. Caractérisation biochimique de l'algue verte *Scenedesmus abundans*: influence des conditions de culture. DOI : 10.1051/limn/2000004. *Annales de Limnologie* 36 (1) : 3-12
- Thevenin JM, 1990. Les maladies à *Phytophthora* du cocotier. Rapport d'activité. IRHO / CIRAD, 3-9.
- Yao AN, 2002. Caractérisation morphologique de différents isolats de *Phytophthora katsurae* de quatre zones de la Côte d'Ivoire (Assinie- Port Bouët-Dabou et Fresco). Mémoire de Maîtrise, Université d'Abobo-Adjamé (Abidjan): 39p.
- Zakra AN, 1989. La culture du cocotier en moyenne Côte d'Ivoire. IRHO-CIRAD, station Marc Delorme: 35p.

