

OBSERVATIONS SUR LA NUTRITION DE SOUCHES DE *PHYTOPHTHORA* DE BARY PARASITES DE CULTURES TROPICALES

par

André RAVISÉ

Directeur de Recherches (ORSTOM)

L'étude comparative de souches de *Phytophthora* de BARY, isolées de cultures tropicales a porté sur leur aptitude parasitaire à l'égard de divers hôtes cultivés (37) et sur divers aspects de leur biologie (35, 36, 39). Nous examinons maintenant l'incidence de la nutrition sur la réalisation du cycle biologique de ces agents pathogènes, c'est-à-dire sur la rapidité de l'élaboration d'un thalle, la formation d'organes de dissémination ou de conservation, leur reproduction sexuée, facteurs intervenant non seulement dans les modalités du parasitisme, mais aussi au cours des périodes de conservation en dehors des plantes-hôtes. Cette étude avait également pour objectif de rechercher s'il existe des différences de comportement en relation soit avec la position taxonomique des souches (11, 31), soit avec leur éventuelle spécialisation parasitaire (4, 44) ou encore avec les conditions écologiques particulières aux régions dont elles proviennent.

MATERIEL ET METHODES

1) LES SOUCHES TESTEES

Les expériences ont concerné vingt souches de *Phytophthora* provenant de dix hôtes cultivés dans des régions chaudes et représentant huit espèces : *P. heveae* THOMPSON, *P. boehmeriae* SAWADA, *P. palmivora* (BUTL.) BUTL., *P. parasitica* DASTUR, *P. citrophthora* (R.E. SMITH et E.H. SMITH) LEONIAN, *P. capsici* LEONIAN, *P. drechsleri* TUCKER, *P. cinnamomi* RANDS. Le tableau I indique les caractéristiques de ces souches.

TABLEAU I
LISTES DES SOUCHES DE *Phytophthora* UTILISÉES

Désignation	Espèce	Signe	Hôte	Origine géographique
29629	<i>P. heveae</i>	Homothallique	Hévéa	Ceylan
35752	<i>P. boehmeriae</i>	Homothallique	Fruit de citrus	Fournie par le C M I
A	<i>P. palmivora</i>	+	Cacaoyer	Côte-d'Ivoire
K	<i>P. palmivora</i>	—	Oranger	Côte-d'Ivoire
L	<i>P. palmivora</i>	+	Aubergine	Côte-d'Ivoire
350	<i>P. palmivora</i>	Stérile	Cacaoyer	Congo
570	<i>P. palmivora</i>	—	Oranger	Congo
571	<i>P. palmivora</i>	—	Oranger	Congo
1930	<i>P. parasitica</i>	—	Nigella damascina	Ile Maurice
567	<i>P. parasitica</i>	—	Oranger	Congo
573	<i>P. parasitica</i>	—	Oranger	Congo
866	<i>P. parasitica</i>	Stérile	Aubergine	Congo
1352	<i>P. citrophthora</i>	Stérile	Agrumes	Maroc
1388	<i>P. capsici</i>	+	Capsicum	Mexique
1474	<i>P. drechsleri</i>	—	Sol cultivé	Italie
721	<i>P. cinnamomi</i>	Stérile	Papayer	Congo
1470	<i>P. cinnamomi</i>	+	Cinnamomum	Sumatra
G	<i>P. cinnamomi</i>	+	Avocatier	Côte-d'Ivoire
163	<i>P. cinnamomi</i>	+	Avocatier	Congo
164	<i>P. cinnamomi</i>	+	Avocatier	Congo

Afin d'atténuer la variabilité des caractères, phénomène important dans le genre *Phytophthora* (13), des clones présumés monocaryotiques furent établis à partir des souches originelles par des germinations successives, soit de zoospores, soit de fragments d'hyphes dans le cas des souches de *P. cinnamomi*. En outre, avec ce matériel expérimental, chaque essai a comporté un nombre important de répétitions afin de définir les limites de la fluctuation.

2) TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Les essais ont été réalisés en milieu liquide dans des fioles constamment agitées, placées dans des conditions constantes de durée, d'éclairage et de température. De plus, comme la tension d'oxygène influe qualitativement et quantitativement sur la production des sporocystes, des chlamydozoospores et, dans une moindre mesure, sur celle des oospores, chaque série d'expériences a été reproduite en boîte de PÉTRI sur milieu gélosé, en employant de l'agar DIFCO à 20 g par litre. Tous les récipients étaient stérilisés au four PASTEUR à 180° C, l'eau était bi-distillée dans un appareil en quartz. La stérilisation des milieux de culture liquides était réalisée par filtration sur appareil « millipore », celle des séries gélosées par autoclavage à 105° C pendant 15 minutes. Dans les deux cas, l'efficacité de la stérilisation était contrôlée en conservant pendant la durée des expériences des récipients contenant du milieu de culture non ensemencé.

Le milieu de culture comportait, par litre :

MgSO ₄ : 0,2 g ;	FeSO ₄ : 0,5 mg ;
K ₂ SO ₄ : 0,5 g ;	ZnSO ₄ : 0,5 mg ;
CaCl ₂ : 0,2 mg ;	CuSO ₄ : 0,02 mg ;
K ₂ HPO ₄ : 0,2 g ;	MnCl ₂ : 0,02 mg ;
KH ₂ PO ₄ : 0,8 g ;	TiSO ₄ : 0,02 mg ;
thiamine : 1mg ;	Mo ₇ O ₂ (NH ₄) ₆ : 0,02 mg.

La source de glucide, à l'exception des essais sur l'utilisation des différentes sources de carbone, était du glucose incorporé à 10 g par litre. Les expériences sur l'utilisation de la cellulose purifiée et pulvérisée (mousse de cellulose DURIEUX) furent réalisées dans un milieu liquide ne contenant pas d'autre glucide et stérilisé à 105° C. Deux formes minérales d'azote, le nitrate de potassium et le nitrate d'ammonium, furent alternativement utilisées seules ou associées soit à des acides aminés, soit à de l'hydrolysat de caséine.

Après deux semaines d'incubation, les cultures sur milieu liquide étaient scindées en deux lots. L'un était transféré sur filtres tarés, lavé à l'eau bi-distillée puis séché en étuve à 105° C pendant 24 heures. L'autre, comme les séries de boîtes de PÉTRI, faisait l'objet d'un examen au microscope pour apprécier l'état du thalle, en particulier la morphologie des hyphes et l'autolyse du cytoplasme dans les cas défavorables, ainsi que l'importance de la production des chlamydo-spores, des sporocystes et éventuellement des oospores.

RESULTATS

1) UTILISATION DE DIVERSES SOURCES DE CARBONE

Celles-ci furent substituées au glucose dans le milieu de base décrit ci-dessus. L'utilisation des principaux glucides est quasi identique pour toutes les souches. Elles réalisent normalement leur cycle biologique en présence de saccharose, de lactose, de maltose ou de cellulose, la croissance étant équivalente à celle obtenue dans un milieu nutritif contenant du glucose. Par contre, en milieu liquide, les vingt souches croissent faiblement avec de l'inositol et toutes, sauf celle de *P. capsici*, ont une croissance infime en présence d'amidon ; aucune ne dégrade le sorbose ni une suspension de tanins extraits à l'éther (Rhône-Poulenc), quoique sa concentration soit inférieure au seuil toxique défini par MEIFFREN et TANGUY* pour certaines des souches éprouvées. Le tableau II indique les poids secs de mycélium obtenus après deux semaines de culture en milieu liquide agité, avec une partie des sources de carbone étudiées.

TABLEAU II

INFLUENCE DE QUELQUES SOURCES DE CARBONE SUR LA CROISSANCE
(exprimée en poids sec de mycélium pour 100 ml de milieu après 2 semaines de culture à 26° C)

Sources C Souches	Glucose	Saccharose	Amidon	Inositol	Sources C Souches	Glucose	Saccharose	Amidon	Inositol
29629	123 mg	200 mg	Traces	13 mg	573	55 mg	130 mg	Traces	Traces
35752	150 mg	235 mg	Traces	9 mg	866	61 mg	55 mg	1,5 mg	21 mg
A	131 mg	130 mg	Traces	Traces	1352	60 mg	71 mg	Traces	17 mg
K	73 mg	64 mg	2 mg	18 mg	1388	183 mg	183 mg	27 mg	45 mg
L	63 mg	70 mg	1 mg	21 mg	1474	7 mg	7 mg	0	0
350	81 mg	81 mg	2 mg	14 mg	721	161 mg	218 mg	0	19 mg
570	47 mg	70 mg	Traces	26 mg	1470	20 mg	133 mg	Traces	16 mg
571	50 mg	57 mg	Traces	24 mg	G	127 mg	200 mg	Traces	17 mg
1930	77 mg	95 mg	1 mg	25 mg	163	222 mg	103 mg	Traces	15 mg
567	61 mg	150 mg	Traces	13 mg	164	135 mg	140 mg	Traces	Traces

2) UTILISATION DES DIVERSES SOURCES D'AZOTE

Le comportement des souches a été étudié pour différentes formes d'azote organique utilisées seules ou associées à deux sources d'azote minéral en comparaison avec le comportement sur un milieu contenant seulement du nitrate de potassium.

L'apport d'azote sous forme organique modifie le mode de croissance des thalles. Sur milieu gélosé, les modifications quantitatives et qualitatives apparaissent plus nettement qu'en milieu liquide. Uniquement intramatriciel avec de l'azote minéral, en présence d'azote organique, le thalle comporte des hyphes aériennes, serrées, duveteuses, et un réseau dense d'hyphes dans le substrat. Ces différences sont plus marquées pour les souches de *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. heveae* et *P. parasitica* que pour celles de *P. cinnamomi* susceptibles de produire des touffes dispersées de mycélium aérien en présence de nitrate de potassium. En milieu liquide, l'augmentation du poids sec des thalles formés, variable suivant les souches, peut atteindre 40 %. Une partie de ces résultats est rassemblée dans le tableau III.

* Communication personnelle.

TABLEAU III

INFLUENCE DE TROIS SOURCES D'AZOTE SUR LA CROISSANCE
(exprimée en poids sec de mycélium pour 100 ml de milieu après 2 semaines de culture à 26° C)

Motifs Souches	NO ₃ K	NO ₃ K et 16 acides aminés	NO ₃ K et hydrolysât de caséine	Motifs Souches	NO ₃ K	NO ₃ K et 16 acides aminés	NO ₃ K et hydrolysât de caséine
29629	97 mg	217 mg	191 mg	573	154 mg	105 mg	
35752	129 mg	182 mg	106 mg	866	146 mg	189 mg	151 mg
A	124 mg	70 mg	180 mg	1352	98 mg	157 mg	125 mg
K	72 mg	155 mg	91 mg	1388	177 mg	358 mg	189 mg
L	113 mg	106 mg	149 mg	1474	10 mg	5 mg	7,5 mg
350	137 mg	135 mg	154 mg	721	206 mg	311 mg	251 mg
570	96 mg	96 mg	69 mg	1470	85 mg	196 mg	128 mg
571	78 mg	101 mg	99 mg	G	98 mg	120 mg	130 mg
1930	77 mg	94 mg	150 mg	163	79 mg	198 mg	125 mg
567	72 mg	85 mg	82 mg	164	61 mg	92 mg	113 mg

L'influence de seize acides aminés sur la réalisation du cycle a été recherchée : glycocolle, alanine, leucine, arginine, asparagine, glutamine, sérine, thréonine, cystine, cystéine, méthionine, phényl-alanine, tyrosine, histidine, tryptophane, proline. Onze d'entre eux, incorporés seuls ou associés, influent nettement sur la production de sporocystes et de chlamydo-spores par les souches de *P. heveae*, *P. boehmeriae*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. citrophthora*, *P. capsici*, *P. drechsleri*. En outre, une souche de *P. cinnamomi* (G) produit abondamment des chlamydo-spores sur un milieu synthétique contenant quatre acides aminés (glycocolle, proline, méthionine, phényl-alanine) comme sur les décoctions gélosées de farine d'avoine ou de pois. Ces caractéristiques se sont avérées stables dans le temps : des expériences réalisées à un an d'intervalle ont fourni des résultats identiques. Le tableau IV indique d'une façon schématique l'influence positive des acides aminés sur la production de sporocystes et celles des chlamydo-spores qui semblent dépendre des mêmes facteurs.

TABLEAU IV

ACTION D'ACIDES AMINÉS SUR LA PRODUCTION DE SPOROCYSTES ET DE CHLAMYDOSPORES
(+ : action positive; 0 : sans action; — : action dépressive)

Souches Acides aminés	26569	35752	A	K	L	350	570	571	1930	567	573	1352	1388	G
Glycocolle	+	0	+	0	0	0	0	—	0	0	+	0	0	+
Arginine	0	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0
Asparagine ...	0	0	+	0	0	0	0	0	—	0	0	0	0	0
Glutamine	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0
Cystine	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Méthionine ...	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+
Phényl alanine.	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0
Tyrosine	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0
Histidine	0	+	+	0	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0
Tryptophane ..	0	0	+	0	+	0	0	+	0	—	0	0	0	0
Proline	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0

(1) Action très faible.

(2) Chlamydo-spores rares, pas de sporocystes.

Ces expériences tendent à indiquer qu'il n'existe pas de réaction commune à l'ensemble des souches appartenant à une même espèce ou provenant soit d'un même hôte, soit d'une même zone géographique. Ainsi, pour quatre des six souches de *P. palmivora* (A, K, L, 350) l'apport d'acides aminés ne provoque qu'une faible augmentation de la densité de sporocystes ou de chlamydo-spores alors que pour les deux autres (570 et 571) l'accroissement est considérable. Les souches de *P. parasitica* peuvent être également scindées en deux groupes, tandis que celle de *P. citrophthora* et celle de *P. drechsleri* sont surtout aptes à former des sporocystes en présence des acides aminés souffrés. D'une façon générale, la cystine, et dans une moindre mesure la glutamine, ainsi que l'acide glutamique, puis la proline, influent souvent et fortement sur la reproduction asexuée et la formation d'organes de conservation.

L'apport groupé des seize acides aminés ou l'incorporation d'hydrolysate de caséine, pour des taux d'azote identiques, ont des conséquences analogues. En particulier, ils favorisent la production d'oospores pour la souche de *P. heveae*, celle de sporocystes par deux souches de *P. parasitica*, celle de chlamydo-spores par ces mêmes souches ainsi que celles de *P. citrophthora* et de *P. capsici*.

3) INFLUENCE DU RAPPORT C/N SUR LA REALISATION DU CYCLE

Cette étude a été réalisée en deux séries, l'une avec du nitrate de potassium, l'autre avec de l'hydrolysate de caséine comme sources d'azote afin de déterminer si la nature de celle-ci intervient en plus du rapport C/N dans le comportement des souches pour la sporogénèse, la formation des chlamydo-spores et la reproduction sexuée. Quatre valeurs du rapport C/N, 100/1, 50/1, 20/1 et 5/1, ont été testées pour une teneur constante en glucose de 10 g par litre. En outre, une série complémentaire comportant du β sito-stérol fut ajoutée au milieu contenant du nitrate de potassium de façon à placer les souches dans des conditions optimales pour la formation d'oospores. Les résultats obtenus sont pratiquement identiques dans toutes les séries d'essais, le tableau V regroupe les résultats concernant 12 souches produisant des chlamydo-spores et des sporocystes.

TABLEAU V
INFLUENCE DU RAPPORT C/N SUR LA FORMATION DES SPOROCYSTES ET DES CHLAMYDOSPORES
PAR 12 SOUCHES DE *Phytophthora*
(— : absence; + : rares; ++ : nombreux; +++ : très nombreux)

Sources d'azote	Nitrate de potassium								Hydrolysate de caséine							
	Sporocystes				Chlamydo-spores				Sporocystes				Chlamydo-spores			
	100/1	50/1	20/1	5/1	100/1	50/1	20/1	5/1	100/1	50/1	20/1	5/1	100/1	50/1	20/1	5/1
29629	—	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	±
35752	—	+	+	—	+	+	+	±	+	+	—	—	+	+	+	±
A	+	+	+	±	+	+	++	±	—	+	++	—	+	++	+	±
K	+	+	+	—	+	+	+	±	+	+	+	—	+	+	+	±
L	+	+	++	±	+	+	++	+	+	+	+++	—	+	+	++	—
570	+	+	+	—	+	+	+	±	—	+	+	—	+	+	+	±
571	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	++	—	+	+	+	—
1930	+	+	+	—	+	++	+	+	+	+++	—	—	+	++	+	—
567	+	+	+	—	+	+	+	+	+	++	—	—	+	++	+	±
573	+	++	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	±	—
1388	+	++	+	±	+	++	+	+	+	++	+++	—	+	++	+++	—
1474	—	—	—	—	±	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—

La densité des thalles augmente en fonction inverse du rapport C/N. Pour le rapport 20/1 commencent à apparaître des dérèglements de la croissance qui sont importants pour le rapport 5/1, les hyphes devenant toruleuses, irrégulières, fréquemment groupées en agrégats. A l'exception des cinq souches de *P. cinnamomi* stériles dans toutes les conditions, la production de chlamydo-spores est la fonction la plus stable. Souvent faible pour le rapport 100/1, elle présente suivant les souches un maximum pour les valeurs 50/1 ou 20/1 et devient exceptionnelle pour 5/1 avec des malformations des chlamydo-spores. La production de sporocystes est réduite pour le rapport 100/1 (11 souches avec du nitrate de potassium contre 7 avec de l'hydrolysate de caséine), l'optimum semble proche de celui régissant la formation de chlamydo-spores; à la concentration 5/1, seules trois souches produisent de rares sporocystes avec des anomalies morphologiques. Les souches homothaliques produisent des zygotes pour les valeurs C/N de 100/1 et de 50/1. Pour les souches hétérothaliques, la reproduction sexuée dépend à la fois de leur plasticité pour le rapport C/N et de leur affinité. L'adjonction de β sito-stérol au milieu de culture provoque seulement des modifications quantitatives. Les croisements entre souches de *P. palmivora* sont fertiles pour les rapports 100/1 et 50/1, plus faiblement pour celui de 20/1. Des résultats analogues sont obtenus pour des croisements de souches appartenant à des espèces affines : *P. palmivora* \times *P. parasitica*, *P. palmivora* \times *P. capsici* et *P. parasitica* \times *P. capsici*. Des confrontations entre la souche de *P. drechsleri* et celles de *P. cinnamomi*, une seule des trente combinaisons testées fut fertile.

Toutes les confrontations réalisées avec des souches appartenant à des espèces éloignées, *P. cinnamomi* ou *P. drechsleri* par *P. palmivora*, *P. parasitica* ou *P. capsici*, soit 108 combinaisons étudiées, ont été stériles alors que des résultats positifs furent obtenus avec les mêmes combinaisons de souches complémentaires cultivées sur des décoctions gélosées de farines de pois ou d'avoine. Ces résultats semblent confirmer des observations antérieures : la reproduction sexuée, en particulier l'interfertilité de souches éloignées dépendrait en partie de facteurs nutritifs complexes (35).

4) INFLUENCE DU pH DU MILIEU DE CULTURE

Des expériences complémentaires furent effectuées en milieu liquide puis gélosé pour des valeurs de pH comprises entre 2,7 et 8,5. Aucune souche ne pousse à pH 2,7 ; la croissance est infime à pH 3. Par contre, entre pH 3,5 et pH 8,5, l'ensemble des souches a une croissance importante, exprimée en poids sec ou en croissance radiale (fig. 1). L'optimum semble se situer entre pH 5,5 et 6,5. Autant que la reproduction sexuée, la formation de chlamydo-spores et celle de sporocystes dépendent de la réaction du milieu, chez toutes les souches de *P. heveae*, *P. boehmeriae*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. capsici*, *P. drechsleri*, celles de *P. cinnamomi* et pratiquement celle de *P. citrophthora* restant stériles dans tous les cas.

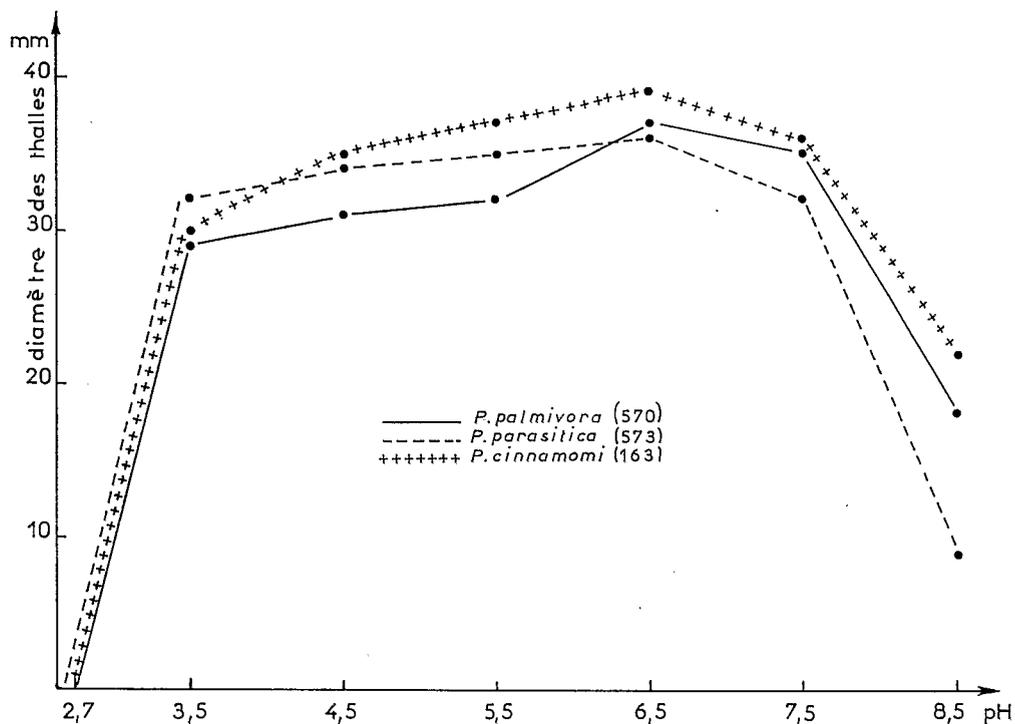


Fig. 1

A pH 3,5, les sporocystes sont très rares alors que se forment déjà des chlamydo-spores ; l'autolyse du cytoplasme dans les hyphes apparaît dès le quatrième jour. A pH 4,5, la densité des chlamydo-spores augmente légèrement, les sporocystes sont moins rares, pour devenir nombreux à pH 5,5. Pour toutes les souches, la plus grande densité de sporocystes correspond aux pH 6,5 et 7,5, valeurs pour lesquelles s'observe également une nette augmentation du nombre de chlamydo-spores. Très brusquement, dès que le pH atteint 8,5, diminuent à la fois le taux de croissance et l'aptitude à former des sporocystes et des chlamydo-spores.

5) INCIDENCE DE L'INCORPORATION D'ACIDES DICARBOXYLIQUES

Les acides dicarboxyliques intervenant dans le cycle de KREBS règlent le plus souvent l'assimilation de l'azote chez les champignons filamenteux et interviennent dans la croissance. Selon LEAL (22), chez plusieurs Saprolegniales et certaines souches de *Pythium* et de *Phytophthora*, la reproduction sexuée est stimulée par l'incorporation d'acides di-carboxyliques à un milieu synthétique contenant du sulfate

d'ammonium. Les acides citrique, malique et oxalo-acétique ont été incorporés séparément à raison de 100 mg par litre. En milieu liquide, les poids secs des thalles formés après deux semaines de culture à 26° C sont inférieurs, avec des écarts allant de quelques dixièmes à un demi, à ceux produits sur le milieu de référence. En présence d'acide citrique, la croissance est meilleure qu'avec les deux autres acides. Il existe des différences de comportement, d'une part entre les souches de *P. palmivora* et celles de *P. cinnamomi*, d'autre part entre des souches rattachées à une même espèce. Les expériences réalisées sur milieu gélosé, en particulier les confrontations de souches hétérothalliques n'ont pas fait apparaître de différences significatives par rapport aux résultats obtenus dans les conditions optimales définies ci-dessus concernant les sources d'azote organique et le rapport C/N, pour la production de sporocystes, de chlamydo-spores et d'oospores.

6) INFLUENCE DES FACTEURS DE CROISSANCE

Contrairement à la plupart des *Pythium*, la quasi-totalité des espèces rattachées au genre *Phytophthora* sont hétérotrophes pour la thiamine (27, 8, 35). Les vingt souches éprouvées ne peuvent pas élaborer un thalle sur un milieu synthétique contenant séparément ou ensemble les deux précurseurs de la thiamine, la pyrimidine et le thiazole, quelle que soit leur concentration. Par contre, elles réagissent positivement à l'apport de thiamine dès un seuil semblant se situer vers un centième de milligramme par litre, et réalisent normalement leur cycle pour une concentration d'un dixième de milligramme par litre.

Les recherches ont porté également sur l'influence de onze autres facteurs de croissance : biotine, nicotinamide, panthoténate de calcium, pyridoxine, acide ascorbique, riboflavine, cyanocobalamine, calciférol, α tocophérol, vitamine A, acide para-aminobenzoïque, incorporés isolément puis ensemble à raison d'un milligramme par litre dans un milieu contenant de la thiamine. Afin de vérifier les résultats obtenus, les expériences ont été répétées à un an d'intervalle.

Aucun de ces facteurs ne provoque, en présence de thiamine, de modification analogue chez toutes les souches étudiées. La biotine semble stimuler la formation d'oospores par la souche de *P. boehmeriae*, de chlamydo-spores et de sporocystes par cette même souche ainsi que par deux de *P. parasitica* (1930, 567) et trois de *P. palmivora* (A, K, L). La nicotinamide a une action équivalente pour une seule souche de *P. palmivora* (K) et la pyridoxine pour une souche de *P. parasitica* (1930). Une action dépressive sur certaines souches, d'ailleurs non constante, a été décelée avec le calciférol, la riboflavine, le tocophérol et la nicotinamide.

Par contre, l'incorporation simultanée de l'ensemble de ces facteurs de croissance provoque des modifications qualitatives et quantitatives tant en milieu liquide que sur substrat gélosé. Sur ce dernier, avec seulement du nitrate de potassium comme source d'azote, l'aspect des thalles est modifié : la trame intramatricielle est plus dense, avec de nombreuses hyphes coralloïdes, le mycélium aérien abondant, régulier, dense et fibreux. Ces cultures possèdent les mêmes caractères que celles croissant sur un milieu contenant une source d'azote organique. En outre, les cinq souches de *P. cinnamomi* forment, dans ces conditions, des thalles abondants, irréguliers, zonés ou plissés en surface, très denses, comportant exclusivement de nombreuses vésicules et dont l'aspect est proche de celui obtenu pour un rapport de C/N de 5/1. Dans ces mêmes conditions, les autres souches produisent davantage de chlamydo-spores et de sporocystes.

Par contre, si la densité des oospores formées tant par les souches homothalliques que dans les confrontations de souches de signes complémentaires est légèrement accrue, l'incorporation des facteurs de croissance ne modifie pas la répartition des combinaisons fertiles qui est analogue à celles indiquées ci-dessus pour les rapports C/N et pour les acides di-carboxyliques.

En milieu liquide, en présence de nitrate de potassium et d'hydrolysate de caséine, l'apport des facteurs de croissance provoque une augmentation du poids sec de mycélium formé par seize souches variant de 1,3 à 3,3 par rapport à celui obtenu sur milieu de référence contenant seulement de la thiamine. Deux souches, celle de *P. heveae* et une de *P. cinnamomi* (163) semblent ne pas réagir ; celle de *P. drechsleri* paraît fortement stimulée. Le tableau V résume ces résultats. Dans la mesure où il sera possible d'obtenir un taux satisfaisant de germination des oospores, la transmission de ces caractères apparemment stables pourra être étudiée puisque les deux dernières souches sont interfertiles. Comme sur milieu gélosé, il fut décelé une augmentation variable des densités de sporocystes et de chlamydo-spores sauf pour les souches de *P. cinnamomi* demeurées stériles.

DISCUSSION

Les vingt souches de *Phytophthora* que nous avons étudiées ont des besoins nutritifs analogues. Hétérotrophes pour la molécule entière de thiamine, elles peuvent utiliser des formes minérales de soufre et d'azote pour, en présence d'un glucide, réaliser leur cycle biologique (35). De même, elles manifestent une certaine plasticité quant aux rapports C/N, des perturbations de différentes fonctions apparaissant au-delà de valeurs assez constantes. Par contre, l'adjonction au milieu de culture de différentes substances glucidiques ou azotées, de divers facteurs de croissance, ne provoque pas de modifications analogues pour toutes les souches ou équivalentes pour certaines d'entre elles en relation soit avec leur position taxonomique, soit avec leur origine parasitaire ou géographique. Il semblerait exister, au-delà d'un degré d'évolution commun, des variations particulières à chacune des vingt souches éprouvées.

L'utilisation d'une gamme étendue de sources de carbone, y compris la cellulose, correspond à l'aptitude des *Phytophthora* à vivre en parasites dans les tissus végétaux ou en saprophytes dans le sol. Parmi les souches étudiées, à part celle de *P. capsici* qui assimile l'amidon en milieu liquide, il ne semble pas exister d'aptitude à dégrader certains sucres en relation avec une spécialisation parasitaire. Cette propriété de la souche de *P. capsici* pourrait, à l'aide de croisements avec d'autres souches (34), permettre d'étudier la transmission de ce caractère et l'éventuelle évolution des aptitudes parasitaires en résultant dans la descendance. Toutes les souches peuvent dégrader un hexo-alcool naturel, l'inositol. LEAL, LILLY et GALLEGLY (25 b) ont étudié l'utilisation de l'éthanol par une souche de *P. heveae*, espèce dont nous avons testé un clone ; les résultats sont convergents. Récemment, BORECKI, ROSS et MILLIKAN (6) ont décelé, dans des extraits de phloème et de cambium de plusieurs variétés de pommier, un alcool parmi les substances carbonées, la plupart glucidiques, stimulant la croissance du *P. cactorum*. Il est possible que chez beaucoup de plantes, en particulier l'hévéa, la localisation assez stricte du parasite dans certains tissus soit en relation avec la présence de substances carbonées encore mal connues (19). Les vingt souches ne dégradent pas les tanins en l'absence d'un glucide. Selon divers auteurs, cités notamment par MOLOT (28), plusieurs micromycètes parasites d'arbres peuvent utiliser les phénols ou leurs dérivés. Notre expérimentation à Brazzaville fut interrompue avant de pouvoir rechercher l'éventuelle utilisation des tanins des citrus, de l'hévéa et du cacaoyer par différentes espèces de *Phytophthora*.

Des nitrates ou de l'ammonium, dans ces expériences, ont pu être utilisés comme seules sources d'azote. Les souches étudiées se distinguent en cela de nombreux phycomycètes aquatiques qui sont déficients pour la cystéine et pour la méthionine (9). Ces résultats diffèrent légèrement de ceux obtenus par ERWIN et CHRISTIE, ce dernier ayant observé une relation entre l'assimilation de certaines formes d'azote et la nature des glucides adjoints au milieu de culture. Selon NEWTON, le *P. parasitica* utilise efficacement la L-alanine. Cet acide aminé est assimilé par toutes les souches éprouvées mais, dans aucun cas, il n'a d'incidence prépondérante sur la formation des sporocystes et des chlamydo-spores, en particulier pour les quatre souches considérées comme appartenant au *P. parasitica*. AKINREFON (1) indique aussi que la D-L-alanine est l'une des meilleures sources d'azote organique pour la croissance du *P. palmivora*. Il nous a semblé que la phényl-alanine (cf. tableau III), plus que l'alanine, a une incidence marquante sur la réalisation du cycle biologique de quatre des six souches de *P. palmivora*, de deux souches affines à cette espèce *P. heveae* et *P. boehmeriae* ainsi que de deux des quatre souches de *P. parasitica* étudiées. La souche de *P. capsici* réagit individuellement à cinq des acides aminés, mais quantitativement et qualitativement à tous les apports de plusieurs d'entre eux. Il semble également que la formation des chlamydo-spores pour l'une des souches de *P. cinnamomi* et celle de sporocystes pour la souche de *P. citrophthora* dépendent en partie de la nutrition azotée, en particulier de l'association des trois acides aminés soufrés.

D'une façon générale, la présence de formes organiques de l'azote stimule la croissance et modifie plusieurs fonctions, ce qui se traduit macroscopiquement par la formation de mycélium aérien et par une plus grande densité du thalle. Cette étude ne rend pas compte des modifications intervenant en présence d'acides aminés dans la production d'endo- ou d'exoenzymes par les souches de *Phytophthora*. Or, peut-être plus que l'accroissement du thalle, donc du potentiel infectieux, les modifications des sécrétions enzymatiques seraient susceptibles d'infléchir les relations entre hôte et parasite. On sait également que la résistance des champignons pathogènes à l'égard des substances toxiques contenues dans les plantes, en particulier les phénols (28, 29), est en relation étroite avec la nature et le taux d'azote se trouvant sous une forme organique. C'est pourquoi, il conviendrait certainement de poursuivre les investigations afin de préciser les conditions dans lesquelles, d'une part, l'ensemble des aptitudes parasitaires des souches sont maximales et, d'autre part, les facteurs de résistance de l'hôte (30) s'opposent le plus efficacement à l'invasion. Il semble, de surcroît, que la nutrition azotée régit directement la formation de sporocystes, c'est-à-dire les possibilités de dissémination de l'agent pathogène, et celle des chlamydo-spores,

organes de conservation assurant la pérennité du parasite. Enfin, dans la phase saprophyte, les conditions de la nutrition azotée, différentes de celles réalisées dans l'hôte, pourraient être assez précaires pour que les perturbations résultant d'une modification du pH du sol (16) limitent les risques d'infection. Des problèmes de même ordre se posent à propos de l'influence du rapport C/N sur le cycle et sur les aptitudes parasitaires des *Phytophthora*.

Aucun des facteurs de croissance n'a d'incidence sur la réalisation du cycle de l'ensemble des souches ou d'une partie d'entre elles définie par sa position systématique. En particulier, les vitamines appartenant au groupe B ne semblent pas affecter la vitesse de croissance ni l'utilisation de certaines sources de carbone comme cela fut observé avec d'autres souches (9). Toutefois, de même que pour la nutrition azotée, il conviendrait de vérifier si les réactions dispersées mentionnées ci-dessus ne sont pas l'indice d'une influence beaucoup plus importante, soit sur la production d'enzymes lysantes, soit sur la résistance aux composés phénoliques, voire même aux phytoalexines de l'hôte.

La réaction du milieu intervient directement sur la croissance et le pouvoir pathogène *in vitro* et dans la nature. Nous avons indiqué qu'en dessous de pH 4 et surtout au-delà de pH 8, la croissance est ralentie, surtout en milieu alcalin, la formation de chlamydo-spores et de sporocystes considérablement réduite. Des résultats analogues ont été obtenus, notamment pour le parasitisme du *P. palmivora* à l'égard du *Piper nigrum* (43) et celui du *P. cinnamomi* sur l'avocatier (15). Selon AKINREFON (2), il existe dans les tissus de tomate infectés par le *P. palmivora* une corrélation négative entre le pH et la sécrétion d'endopolygalacturonase par le parasite. Reliant ces observations aux expériences effectuées *in vitro*, il semble que non seulement la nutrition, mais aussi d'autres fonctions régissant le pouvoir pathogène soient sous la dépendance de ce facteur.

Les essais ont mis en évidence une importante variabilité morphologique, en particulier l'apparition de zonations et de gaufrages chez des souches de *P. cinnamomi*, de nombreuses modifications de la densité des sporocystes et des chlamydo-spores pour la plupart des souches, des limitations de l'aptitude à la reproduction sexuée. Toutes ces modifications, qu'il s'agisse d'un changement de densité du thalle avec l'apparition d'hyphes corolloïdes ou de nombreux agrégats ou d'une transformation de l'une des fonctions essentielles, semblent sous la dépendance directe des facteurs nutritifs. Or, simultanément et pour la plupart des souches employées (39), des repiquages pluri-hebdomadaires furent réalisés sur des bouillons glucosés et gélosés de pomme de terre et de pois sans qu'apparaissent de différences morphologiques chez les clones subissant ces transferts successifs. C'est pourquoi, il semble qu'une partie de la variabilité des *Phytophthora* (13) dépende des facteurs externes, en particulier de l'hygrométrie et de la température (36) ou des éléments nutritifs (9, 35), sans pouvoir, dans l'état actuel des connaissances, présumer du ou des niveaux auxquels s'exerce leur action.

CONCLUSION

Les vingt souches étudiées semblent avoir atteint le même degré d'évolution dans l'hétérotrophie. Elles réagissent de la même façon aux substances azotées, aux diverses sources carbonées, aux variations du rapport C/N et à l'adjonction de facteurs de croissance. Le plus souvent, les différences de comportement entre souches appartenant à la même espèce sont plus importantes que celles existant entre souches morphologiquement distinctes, comme celles de *P. palmivora* et de *P. cinnamomi*. Les différences d'origine géographique, la nature des plantes qu'elles parasitaient ne paraissent pas intervenir directement sur les exigences nutritives.

Il existe différents niveaux d'utilisation de l'azote organique, des substances carbonées, des variations de réponse certes faibles aux changements du rapport C/N. Actuellement, ces observations n'ont pas été rattachées à des aptitudes parasitaires particulières à chacune des vingt souches éprouvées (37) ni à des différences entre races physiologiques analogues à celles décelées chez le *P. infestans* ou chez le *P. fragariae* (17). Cependant, la poursuite des investigations pourrait permettre de mieux connaître les facteurs régissant l'invasion des tissus de l'hôte et ceux provoquant une inhibition partielle des enzymes du parasite (30), ou bien des réactions de protection plus radicales de même nature que celles reconnues pour le carthame (20, 42), le soja (10, 14) ou le maïs (26). La connaissance approfondie des mécanismes de la nutrition (16, 17) associée à celle des formes de résistance (39) devrait également accroître les possibilités de lutte contre les *Phytophthora* au cours de la phase saprophytique de vie en dehors des plantes-hôtes.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) AKINREFON (O.A.), 1968. Phenolic fungitoxicity and the possible role of phenolase of *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL.
Phytopath. Z., 63, 153-64.
- (2) —, 1969. Biochemical studies on plant tissues infected by *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL.
Ann. Appl. Biol., 63, 303-13.
- (3) —, 1969. Factors affecting the production of extracellular pectolytic enzymes by *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL.
Ann. Bot., 33, 439-50.
- (4) ASHBY (S.F.), 1929. Strains and taxonomy of *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL.
Trans. Brit. Myc. Soc., 14, 18-33.
- (5) BARASH (I.), KLISIEWICZ (J.M.), KOSUGE (T.), 1965. Utilization of carbon compounds by zoospores of *Phytophthora dreschleri* and their effect on mobility and germination.
Phytopathology, 55, 1257-61.
- (6) BORECKI (Z.), ROSS (J.A.), MILLIKAN (D.F.), 1970. Endogenous factors in apple bark which stimulates and inhibits the growth of *Phytophthora cactorum*.
Phytopathology, 60, 173-4.
- (7) CALDERONE (R.A.), 1968. The utilization of D and L forms of leucine and aspartic acid by species of *Pythium* and *Phytophthora*.
Proc. W. Va. Acad. Sci., 40, 55-60.
- (8) CAMERON (H.R.), 1966. Variability in the genus *Phytophthora*. II. Effects of vitamins on growth.
Phytopathology, 56, 7, 812-5.
- (9) CANTINO (E.C.), 1965. In G.C. Ainsworth and Sussmann, the fungi II, chap. 10, 283-337.
- (10) CHAMBERLIN (D.W.), PAXTON (J.D.), 1968. Protection of soybean plants by phytoalexin.
Phytopathology, 58, 1349-50.
- (11) CHEE (K.H.), 1969. Variability of *Phytophthora* species from *Hevea brasiliensis*.
Trans. Brit. Myc. Soc., 52, 425-36.
- (12) COCHRANE (V.W.), 1963. Physiology of fungi.
J. Wiley and sons édit.
- (13) ERWIN (D.C.), ZENTMEYER (G.A.), GALINDO (J.), NIEDERHAUSER (J.S.), 1963. Variation in the genus *Phytophthora*
Ann. Rev. of Phytopath., 1, 375-96.
- (14) FRANCK (J.A.), PAXTON (J.D.), 1969. The time sequence for phytoalexin production in Harosoy and Harosoy 63 soybeans.
Phytopathology, 59, 6.
- (15) GILPATRICK (J.D.), 1969. Role of ammonia in the control of avocado root rot with alfa-alfa meal soil amendment.
Phytopathology, 59, 973-78.
- (16) —, 1969. Effect of soil amendments upon inoculum survival and function in *Phytophthora* root rot of avocado.
Phytopathology, 59, 979-85.
- (17) GILL (H.S.), POWELL (D.), 1968. The effect of different carbon and nitrogen sources upon the growth of races A₁, A₂, A₃, and A₄, of *Phytophthora fragariae* HICKMANN.
Mycopath. Mycol. Appl., 34, 234-40.
- (18) HENDRIX (J.W.), 1967. Light cholesterol relationships in morphogenesis of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* sporangia.
Mycologia, 59, 1107-11.
- (19) IMHOFF (V.), 1970. Identification d'inositol et de galactinol dans les chloroplastes de *Lolium italicum*.
C.R. Acad. Sci., Paris, 270, sér. D, 2441-3.
- (20) KLISIEWICZ (J.M.), JOHNSON (L.B.), 1968. Host parasite relationship in safflower resistant and susceptible to a *Phytophthora* root rot.
Phytopathology, 58, 1022-5.

- (21) KUMAR (M.), GROVER (R.K.), 1967. Effect of carbone source on the growth of *Pythium aphanidermatum* (EDSON) FITZ.
Indian Phytopath., 20, 189-95.
- (22) LEAL (J.A.), 1965. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*, *Pythium* and *Saprolegnia*.
Ph. D. thesis, Univ. Hull.
- (23) LEAL (J.A.), GALLEGLY (M.E.), LILLY (V.G.), 1967. The relation of the carbon-nitrogen ratio in the basal medium to sexual reproduction in species of *Phytophthora*.
Mycologia, 59, 953-64.
- (24) —, —, —, 1968. The utilization of L-asparagine by two species of *Phytophthora*.
Proc. W. Va. Acad. Sci., 39, 95-101.
- (25) —, —, —, 1968. a) Growth of *P. heveae* on media containing L-glutamine and urea. b) The utilization of ethanol as a carbone source by *P. heveae*.
Proc. W. Va. Acad. Sci., 40, a) 47-53 ; b) 73-6.
- (26) LIM (D.), HOOKER (J.), PAXTON (J.D.), 1970. Isolation of phytoalexin from corn with monogenic resistant to *Helminthosporium turcicum*.
Phytopathology, 60, 1071-5.
- (27) LWOW (A.), 1943. L'évolution physiologique.
Hermann et C^e édit.
- (28) MOLOT (P.M.), 1969. Recherches sur la résistance du maïs à l'helminthosporiose et aux fusarioses. I. Rôle de la composition chimique de la plante. II. Facteurs de résistance. III. Mode d'action des composés phénoliques.
Ann. Phytopath., 1, 55-74, 353-66, 367-83.
- (29) —, 1970. Influence de l'acide p-coumarique sur l'activité des pectinases et des cellulases et sur leur sécrétion par le *Fusarium roseum* var. *graminearum*.
C.R. Acad. Sci., Paris, 270, sér. D, 2097-100.
- (30) MUSSEL (H.W.), GREEN (R.V. Jr.), 1970. Host colonization and polygalacturonase production by two tracheomycotic fungi.
Phytopathology, 60, 192-5.
- (31) ORELLANA (R.G.), 1959. Variation in *Phytophthora palmivora* isolated from cacao and rubber.
Phytopathology, 49, 210-3.
- (32) RAO (V.G.), DESAI (M.K.), KULKARNI (N.B.), 1966. Cultural and physiological studies of *Phytophthora parasitica* DAST. var. *macrospora* ASHBY causing fruit rot of *Anona squamosa* L.
Mycopath. Mycol. Appl., 28, 248-56.
- (33) —, —, —, 1967. An account of some physiological studies in two species of *Phytophthora*.
Mycopath. Mycol. Appl., 30, 121-8.
- (34) RAVISÉ (A.), 1966. Observations sur la reproduction sexuée de souches du *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL. parasites de cultures tropicales.
Cah. ORSTOM, sér. Biol., 2, 91-101.
- (35) —, 1968. Etude expérimentale de l'incidence de la nutrition sur l'accomplissement du cycle de Pythiacées, parasites de cultures tropicales.
C.R. Acad. Sci., Paris, 267, sér. D., 1821-4.
- (36) —, BOCCAS (B.), 1969. Première liste annotée des Pythiacées, parasites des plantes cultivées au Congo.
Cah. de la Maboké, VII, 41-69.
- (37) —, 1970. Etude comparative des aptitudes parasitaires de souches de *Phytophthora*, parasites de cultures tropicales.
L'Agron. Trop., vol. 25, 1015-31.
- (38) RIDINGS (W.H.), GALLEGLY (M.E.), LILLY (V.G.), 1969. Thiamine requirements helpful in distinguishing isolates of *Pythium* from those of *Phytophthora*.
Phytopathology, 59, 737-42.
- (39) RIOU (S.), RAVISÉ (A.), 1970. Etude des chlamydospores chez quelques espèces de *Phytophthora* de BY.
Cah. de la Maboké, VIII (sous presse).
- (40) ROGER (L.), 1951. Phytopathologie des pays chauds.
Tomes 1 et 3, Lechevalier édit.

- (41) ROYLE (D.J.), HICKMAN (C.J.), 1964. Analysis of factors governing *in vitro* accumulation of zoospores of *Pythium aphanidermatum* on roots. II. Substances causing response. *Can. J. Microbiol.*, 10, 201-19.
- (42) THOMAS (C.A.), ALLEN (E.H.), 1970. An antifungal polyacetylene compound from *Phytophthora* infected safflower. *Phytopathology*, 60, 261-3.
- (43) TURNER (C.G.), 1969. a) *Phytophthora palmivora* from Piper betle in Sarawak. b) Effect of hydrogen ion concentration on *Phytophthora palmivora* from *Piper nigrum*. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 52, a) 411-8 ; b) 419-23.
- (44) TURNER (P.D.), 1961. Complementary isolates of *Phytophthora palmivora* from Cacao and Rubber, and their taxonomy. *Phytopathology*, 51, 161-4.
- (45) ZENTMEYER (G.A.), 1966. Role of aminoacids in chemotaxis of zoospores of three species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 56, 907.

(Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, laboratoires de phytopathologie de Brazzaville et des services scientifiques centraux.)

RESUME. — La présente étude concerne les aptitudes de vingt souches de *Phytophthora tropicaux* à dégrader différentes sources de carbone et d'azote pour réaliser leur cycle biologique. Plusieurs acides aminés, ainsi que le rapport C/N, influent qualitativement et quantitativement sur la formation de sporocystes, celle de chlamydo-spores et sur la reproduction sexuée. De même, des facteurs de croissance peuvent modifier l'aspect végétatif des thalles et agir sur certaines fonctions. Cependant, il n'a pas été décelé de relations entre les exigences nutritives et la position taxonomique, l'hôte dont provenait ces souches ou mêmes leurs caractéristiques parasitaires.

SUMMARY.—OBSERVATIONS ON THE NUTRITION OF STRAINS OF PHYTOPHTHORA OF BARY, A TROPICAL CROP PEST.

The present paper deals with the ability of twenty tropical strains of *Phytophthora* to degrade different sources of carbon and nitrogen to achieve their biological cycle. Several amino acids together with the C/N ratio have a qualitative and quantitative effect on the formation of sporocystes, chlamydo-spores and the sexual reproduction. Likewise growth factors can modify the vegetative aspect of the thallus and influence some functions. Nevertheless, no correlation has been found between the nutritive requirements and the taxonomic position and the host from which these strains were originated or even their parasitic characteristics.

RESUMEN. — OBSERVACIONES SOBRE LA NUTRICION DE ESTIRPES DE PHYTOPHTHORA DE BARY, PARASITO DE LOS CULTIVOS TROPICALES.

Se han estudiado las aptitudes de veinte estirpes de *Phytophthora tropicales*, en lo que se refiere a la degradación de varias fuentes de carbono y de nitrógeno, y por lo tanto, a la realización del ciclo biológico de dichos elementos. Varios aminoácidos, y también la relación C/N, influyen cualitativa y cantitativamente en la formación de esporocistos y clamidosporos, y en la reproducción por vía sexual. Asimismo, los factores del crecimiento pueden cambiar el aspecto vegetativo de los talos, e influir en ciertas funciones. Sin embargo, no se ha observado ninguna relación entre las exigencias nutritivas y la posición taxonómica, el hacedero de las cepas estudiadas o las características parasitarias.

4

L'AGRONOMIE TROPICALE

Extrait du Vol. XXVII, n° 3
MARS 1972

OBSERVATIONS SUR LA NUTRITION DE SOUCHES DE *PHYTOPHTHORA DE BARY* PARASITES DE CULTURES TROPICALES

par
André RAVISÉ
Directeur de Recherches (ORSTOM)

11 AOUT 1972

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 5643 Phy f