

Etude des relations entre l'ananas et le *Phytophthora parasitica*:

Mise au point d'une technique d'inoculation, localisation des niveaux de la résistance.

D. LOUVEL *

ETUDE DES RELATIONS ENTRE L'ANANAS ET LE *PHYTOPHTHORA PARASITICA* :

Mise au point d'une technique d'inoculation, localisation des niveaux
de la résistance

D. LOUVEL

Fruits, nov. 1975, vol. 30, n°11, p. 669-680.

RÉSUMÉ - La recherche d'une méthode simple et sûre d'inoculation de l'ananas par *Phytophthora parasitica*, sur feuilles isolées et sur plante entière, a permis de déterminer à la fois la zone de la feuille la plus favorable à la pénétration et la feuille la plus représentative de la sensibilité d'une variété.

Cette méthode révèle en outre certains caractères de la résistance et peut donc être utilisée pour la sélection variétale et pour la recherche de nouveaux fongicides.

Devant la nécessité d'améliorer la lutte contre les pourritures du cœur de l'ananas dues à *Phytophthora parasitica*, soit par traitements chimiques à l'aide de nouveaux fongicides, soit par la sélection de variétés résistantes, il est indispensable, d'une part de posséder une méthode d'inoculation expérimentale simple et sûre et d'autre part de pouvoir déterminer et localiser les caractères de la résistance. C'est à ce travail que D. LOUVEL s'est attaché durant la préparation du D.E.A., Amélioration des plantes, option Phytopathologie, à l'Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, dans le laboratoire de M. le Professeur J. CHEVAUGEON.

E. LAVILLE

Service de Phytopathologie, IFAC.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les plants d'ananas ont été cultivés en serre, sur terreau, en pot individuel, à une température variant, selon la saison, entre 23 et 35°C, accompagnée d'une hygrométrie d'environ 90 p. cent. Ils recevaient régulièrement une solution nutritive dans l'eau d'arrosage.

Nous avons utilisé la variété Cayenne lisse avec trois clones originaires de Guadeloupe, de Côte d'Ivoire et de Saint Domingue, puis le cultivar Red Spanish (G 71) réputé pour son bon comportement au champ vis-à-vis de *Phytophthora*, et enfin le clone de Cayenne (G 32).

La souche de *Phytophthora parasitica* utilisée (n°132) avait été isolée récemment de plantes malades en Côte d'Ivoire et a été entretenue par inoculations et réisolements successifs.

* - Laboratoire de Biologie expérimentale, Université de Paris-Sud, 91 ORSAY.

Les zoospores nécessaires pour les inoculations ont été produites à partir de cultures en milieu solide ou liquide selon les deux méthodes suivantes :

- **en milieu solide** : on dépose quatre implants de mycélium dans chaque boîte de milieu gélosé pois ; les boîtes sont placées à la lumière et à 26°C. En dix jours les sporocystes ont atteint leur maturité. De l'eau stérile est versée dans les boîtes, aussitôt mises à 2°C pendant 45 minutes. Elles sont ensuite ramenées à la température ambiante et la libération des zoospores s'effectue au bout de 30 à 60 minutes.

- **en milieu liquide** : dans des fioles de ROUX contenant 50 ml de milieu pois cinq implants mycéliens sont introduits. Les fioles sont mises en chambre de culture à 26°C. En 7 à 10 jours le mycélium a atteint un développement optimal. Celui-ci est alors rincé dans une solution minérale dont la composition est la suivante : Ca NO₃ 0,01 M - K NO₃ 0,005 M - Mg SO₄ 0,004 M. Elle est stérilisée à l'autoclave. A un litre de cette solution est ajouté 1 ml d'une solution de fer chélaté, stérilisée par passage sur un filtre millipore de 0,22 µ, composé ainsi. Pour 100 ml : EDTA 1,305 g - K OH 0,75 g - Fe SO₄ 2,49 g.

Ce rinçage a donc deux effets, d'une part enlever tous les éléments nutritifs (induction de la reproduction végétative) et d'autre part accélérer la formation de ces sporocystes.

Le rinçage se fait quatre fois, avec 100 ml, toutes les 45 minutes. Après le dernier rinçage le mycélium est étalé dans une boîte de Pétri en verre de 15 cm de diamètre avec juste un peu d'eau pour l'humidifier et mis à la lumière. La source lumineuse est constituée de 4 tubes fluorescents CLAUDE, lumière du jour de 20 W dont le spectre ne présente pas d'insuffisance en bleu. Ils sont placés à 40 cm au-dessus des boîtes. En 3 jours la formation des sporocystes est maximale. La boîte de Pétri est alors remplie d'un peu d'eau distillée stérile et mise au froid (2°C) pendant 20 minutes. Ensuite elle est exposée à la lumière, du jour ou artificielle, suivant les possibilités. Au bout de 30 minutes la libération des zoospores est totale. La concentration atteinte varie de 100.000 à 500.000 zoospores par millilitre. La maturation des sporocystes peut être accélérée si l'incubation à la lumière est faite dans la solution de rinçage.

INOCULATIONS SUR FEUILLES DÉTACHÉES

On remarque, en décortiquant quelques pieds d'ananas, que les premiers organes à être infectés, après dépôt d'une suspension de zoospores dans la rosette, sont les feuilles et non la tige. D'autre part, les feuilles âgées et adultes «A», «B» et «C», suivant la classification «classique», et qui viennent de terminer leur croissance («D») ne sont jamais ou du moins que très rarement atteintes par la pourriture. De plus, même sur un pied fortement atteint, seule la partie basale des feuilles est détruite.

Celles-ci sont constituées dans leur partie basale par des tissus non chlorophylliens très tendres et dans la partie supérieure par des tissus très pigmentés et fibreux (figure 1). Le passage d'une partie à l'autre est progressif. Au polymorphisme foliaire de l'ananas correspond donc une hétérogénéité de réponses face à l'invasion par la pourriture.

DÉTERMINATION DE LA PARTIE LA PLUS PROPICE A LA PÉNÉTRATION

Le clone de Cayenne lisse G 32 et le cultivar Red Spanish G 71 sont utilisés. De chacun 5 feuilles de type «E» (immatures) sont prélevées. Trois points d'inoculation sur la feuille ont été choisis : un à la base de la feuille dans la partie blanche, le deuxième dans celle qui commence à être chlorophyllienne que nous appellerons par la suite partie verte, le troisième se situant dans la partie chlorophyllienne, vert-foncé. L'inoculation s'effectue à la face inférieure convexe de la feuille selon la méthode suivante : des anneaux de 10 mm de hauteur sont découpés dans un tube de plastique. Une de leur section est rendue concave pour s'adapter sur la feuille. L'étanchéité du joint feuille-plastique est réalisée par une pâte siliconée. La cellule est emplie avec 0,2 ml de la suspension de zoospores, on obtient ainsi une concentration minimale de 20.000 zoospores par cellule. Les feuilles sont immobilisées sur un châssis en bois (photo 1). Elles sont alors mises dans une enceinte où l'humidité est maintenue saturante par un humidificateur.

Les symptômes apparaissent au bout de 60 à 70 heures. Dans tous les cas seule l'inoculation réalisée à la base de la feuille, dans la partie blanche, a permis le développement d'un front de décoloration représentant l'avance de l'agent pathogène.

La pénétration du tube germinatif de la zoospore est impossible dans la partie verte et vert-foncé de la feuille. Le fait que seules les parties les plus jeunes de la feuille permettent la pénétration du parasite a orienté nos recherches sur les modalités de celle-ci. C'est dans cette partie blanche que se trouvent les trichomes en activité.

KRAUSS a très bien décrit leur ontogénèse. Cet auteur distingue quatre stades : A, B, C et D (à ne pas confondre avec les «classes» de feuilles mentionnées plus haut) ; A étant le plus jeune situé à quelques millimètres de la base de la feuille. La position des autres stades n'est pas précisée mais ils correspondent à des tissus plus âgés. Toutefois, à un même niveau transversal peuvent se trouver plusieurs stades. C'est à la face inférieure que la densité des trichomes est la plus forte.

Certains auteurs ont mis en évidence des tactismes dans le déplacement des zoospores. Pour DUKES et APPLE ce déplacement ne se fait pas au hasard ; elles s'agglutinent au

Fig. 1 • Représentation schématique des différents types de feuilles (var. Cayenne lisse).
L'importance du noircissement est proportionnelle à la pigmentation chlorophyllienne.

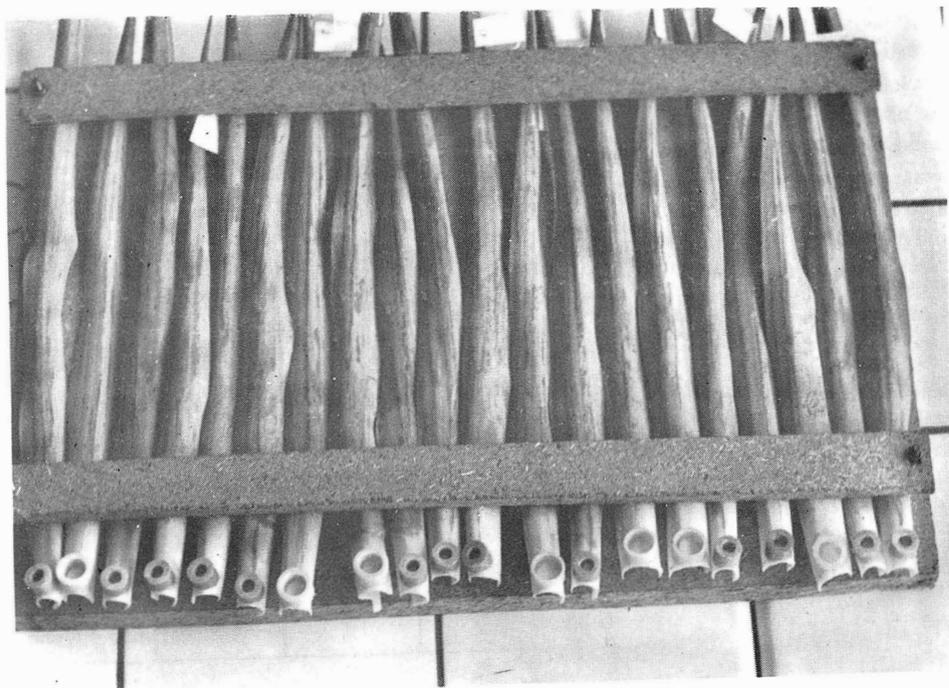
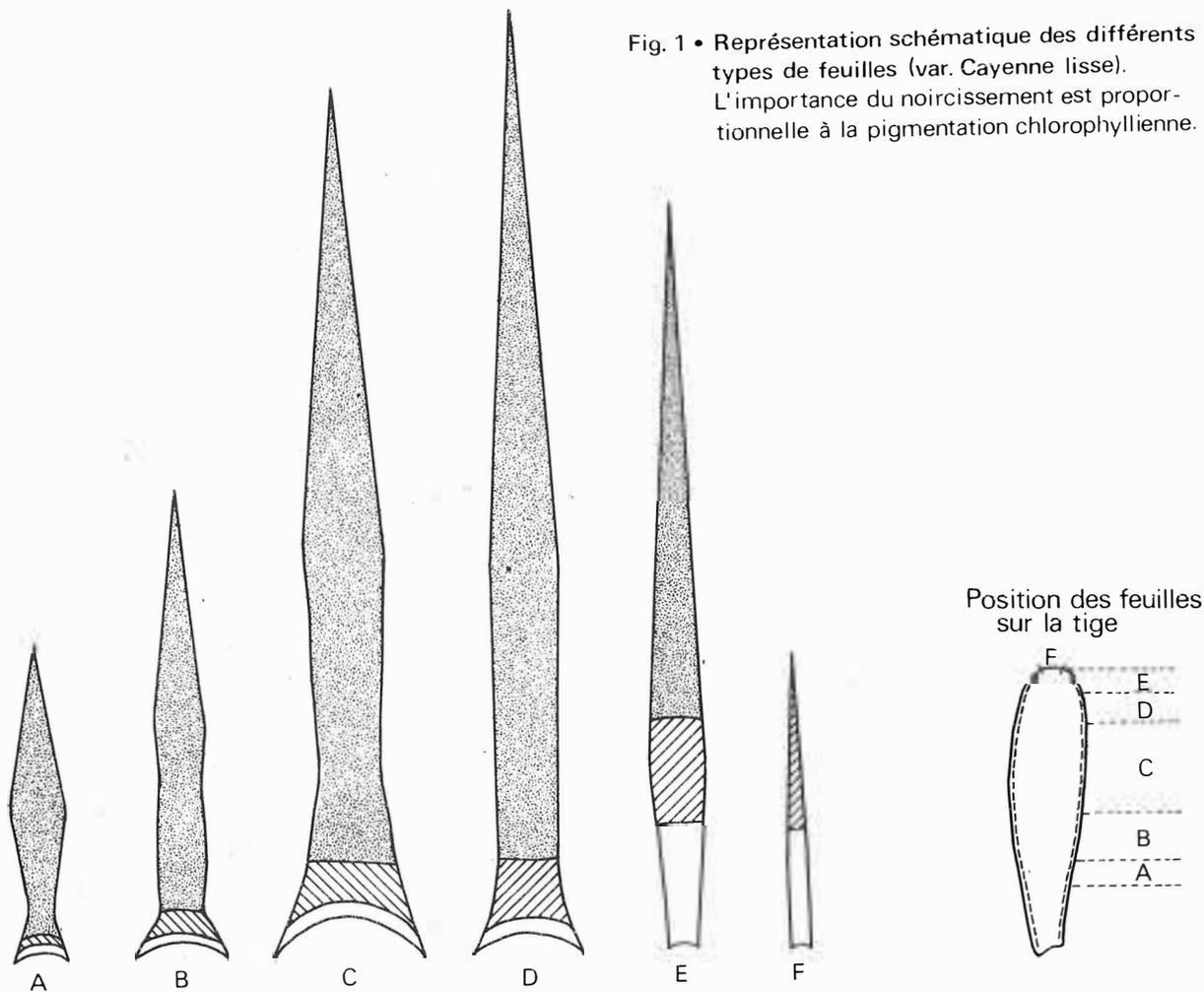


Photo 1 - Inoculation sur feuilles. Dispositif expérimental.

niveau des blessures des racines de la plante-hôte qu'elle soit d'une variété sensible ou résistante ; *in vitro* ils ont également mis en évidence l'effet attracteur du saccharose et du lactose. Pour HICKMAN une différence de potentiel peut aussi créer cette agglutination. Le travail récent de BOHER sur la pénétration active de *P. palmivora* dans les feuilles d'ananas apporte de sérieux éclaircissements. La pénétration se fait par les trichomes aux stades A, B ou C ; elle est impossible au stade D. Les zoospores montrent un tactisme très net vers ceux-ci, mais seuls les trichomes à un stade jeune B et C exercent ce tactisme. L'impossibilité de pénétration dans la partie verte s'explique : c'est dans cette zone que vraisemblablement les trichomes sont au stade D.

Par conséquent sur la feuille, la pénétration du *P. parasitica* ne peut se faire que dans une partie déterminée, la partie blanche. Celle-ci se fait par les trichomes vivants, qui ne le sont qu'au niveau de cette partie de la feuille.

DÉTERMINATION DE LA POSITION DE LA FEUILLE LA PLUS SENSIBLE

Les feuilles du clone G 32 sont utilisées.

Elles sont numérotées de la manière suivante : dans le centre de la rosette la première feuille visible est numérotée 2 ; en effet, si on écarte un peu la rosette, on distingue une feuille plus jeune dont l'extrémité est déjà chlorophyllienne. Ontogéniquement, cette feuille numéro 1 est la cinquième ou la sixième suivant les plants et les conditions de développement.

Nous avons choisi quatre âges différents de feuilles. Ce sont les feuilles F 3, F 7, F 11 et F D.

F D est la feuille «D» des agronomes, c'est-à-dire la feuille qui vient de terminer sa croissance (cf. plus haut), son numéro serait 17. Pour chaque âge nous avons utilisé 5 feuilles, l'inoculation est faite uniquement dans la partie blanche basale. La progression de la décoloration des tissus a été suivie pendant douze jours.

Quand l'agent pathogène envahit les tissus foliaires, la partie blanche devient translucide, puis dans la partie verte se produit une décoloration des tissus, sans doute liée à une destruction des pigments chlorophylliens.

Pour les feuilles «D» l'inoculation a été un échec, aucune pourriture n'est apparue. Pour les autres feuilles la pourriture s'est développée, mais différemment suivant l'âge de la feuille.

Pour les feuilles 11, dès le cinquième jour, on observe un blocage presque total de l'avance de la décoloration, lié à un front de brunissement très prononcé ; au-delà du septième jour l'avance est stoppée (figure 2). En ce qui

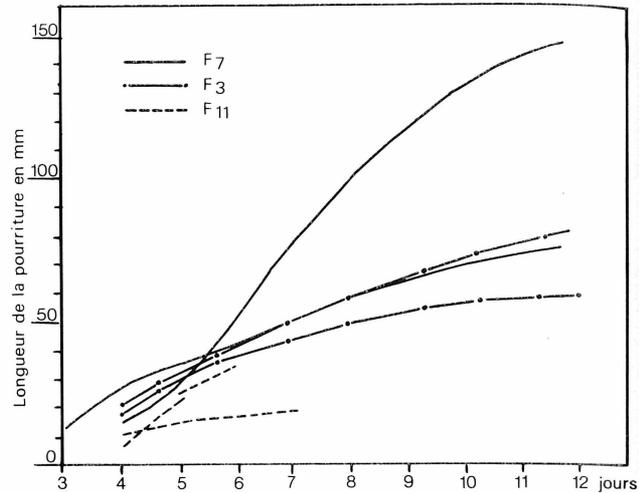


Fig. 2 • Cinétique de l'avance de la pourriture dans les feuilles du clone G.32.

concerne les feuilles 7 on observe une avance rapide et continue du champignon malgré un brunissement de la partie verte. Cette avance est bloquée, quoique tardivement, dans la partie vert-foncé. Les feuilles 3 ont un comportement plus distinct ; infectées elles ne présentent jamais de brunissement malgré l'envahissement total de celles-ci par le champignon.

D'autre part, l'examen de la cinétique de la maladie permet de mettre en évidence d'autres différences entre ces trois types de feuilles.

La figure 2 représente l'évolution de l'avance du champignon dans les différentes feuilles.

Tout d'abord, l'allure générale des courbes pour les feuilles 3 et surtout 7 est une forme sigmoïdale qui s'explique assez bien. Après un temps d'installation au cours duquel le champignon progresse peu, il envahit rapidement les tissus blancs et verts puis se trouve ralenti en arrivant dans des tissus plus fibreux et plus actifs physiologiquement (partie vert-foncé). L'existence de ce plateau de stabilisation est nette pour les feuilles 7. Pour les feuilles 3 il est moins visible ; ce qui tendrait peut-être à montrer que ce n'est pas la dégradation de l'état physiologique de la feuille qui limite la progression du *Phytophthora*, mais bien l'existence de barrières physiologiques. Le tableau 1 indique les vitesses moyennes de progression de la pourriture entre le cinquième et le sixième jour, calculées sur les courbes de la figure 2.

TABLEAU 1 - Vitesse de progression de la pourriture dans la feuille en mm/24 heures.

Feuilles Cultivar	F 11	F 7	F 3
	G 32	10	15,5

De cet essai deux observations peuvent être dégagées.

En premier, il apparaît clairement que la progression du parasite se fait d'autant plus facilement qu'il se trouve dans la partie non chlorophyllienne de la feuille ; son avance est bloquée lorsqu'il atteint la partie vert-foncé. Suivant l'âge de la feuille elle est plus ou moins vite atteinte. Ainsi pour F 11, dont la partie blanche est très réduite, cette progression est vite arrêtée, alors que pour F 7 cet arrêt ne se produit que 4 jours plus tard. F 3 ne possède pas de partie vert-foncé, l'envahissement de la feuille se fait à une vitesse sensiblement constante.

Le deuxième point, le plus intéressant, est l'existence de vitesses de progression différentes suivant l'âge de la feuille. Par ordre croissant de vitesse on trouve F 11, F 3, F 7 (tableau 1). Le classement des vitesses est donc différent de celui des âges foliaires et la feuille la plus jeune n'est ni la plus sensible ni la moins sensible. Une feuille semble particulièrement vulnérable, F 7.

IMPORTANCE DE LA TAILLE DE L'INOCULUM

Quarante feuilles F 7 de Red Spanish (G 71) et du clone Saint Domingue de Cayenne sont prélevées. A chaque concentration de zoospores, 10 feuilles sont inoculées suivant la méthode décrite précédemment. Quatre concentrations sont choisies. A partir de la suspension-mère à la concentration de 100.000 sp/ml, trois dilutions sont faites pour obtenir des suspensions à 5.000, 500, 50 sp/ml. 0,2 ml de ces quatre suspensions sont mis dans les cellules sur les feuilles. Le nombre final de zoospores par cellule est donc 20.000, 1.000, 100 et 10.

A la concentration de 10 zoospores par cellule les inoculations sont des échecs, alors qu'aux concentrations supérieures (100, 1.000, 20.000) toutes les feuilles présentent les symptômes classiques de la pourriture.

Dans la réponse à l'inoculation clone ou cultivar semblent ne jouer aucun rôle au niveau de la pénétration par les trichomes. Les résultats sont identiques pour les deux types génétiques.

Avec cet essai limité et dans les conditions de l'expérimentation, le nombre de zoospores nécessaires pour surmonter l'ensemble des résistances de la feuille à la pénétration et permettant un développement de la pourriture, se situe entre 10 et 100 spores. Les zoosporocystes contenant une vingtaine de zoospores, théoriquement, quelques-uns doivent suffire pour atteindre l'inoculum minimal, permettant le développement de la maladie. Il serait intéressant de relier ceci, à la quantité de sporocystes présents dans les couches superficielles du sol et au nombre de zoospores ou de sporocystes projetés, au cours d'une pluie par exemple, sur un pied d'ananas.

VARIATION DU DÉVELOPPEMENT DE LA MALADIE SUIVANT LE MATÉRIEL GÉNÉTIQUE

Les feuilles du cultivar G 71 sont comparées à celle du clone G 32. Le protocole expérimental est le même que celui décrit précédemment.

Les symptômes apparaissent nettement sur toutes les feuilles 66 heures après l'inoculation. Dans tous les cas seule l'inoculation réalisée dans la partie blanche de la feuille s'est traduite par une décoloration des tissus, traduisant leur envahissement par le *P. parasitica*.

Dans cet essai on trouve donc les mêmes résultats que ceux obtenus avec le clone G 32. Le cultivar G 71 est connu pour avoir une bonne tenue aux champs, face à la maladie ; G 32 est au contraire très vulnérable. Dans les deux types la zone de pénétration se situe au même endroit de la feuille, mais la recherche de cette partie favorable à l'inoculation n'a pas été faite avec suffisamment de finesse pour que nous puissions dire, du fait de la différence de sensibilité aux champs entre G 32 et G 71, que ce n'est pas à ce niveau que se situe la résistance du cultivar G 71.

Position de la feuille la plus sensible.

Le cultivar G 71 et le type de Cayenne lisse cultivé en Côte d'Ivoire (dit type local) sont utilisés. Sur chacun, 20 feuilles de trois âges différents (F 3, F 7 et F 11) sont arrachées et numérotées de 1 à 20. L'inoculation est faite à la base de la feuille. Pour les feuilles de Cayenne lisse local, deux types de mesures ont été faites, une mesure de la longueur de la pourriture et une mesure de la longueur de la feuille. Pour les feuilles de G 71, seule une mesure de l'avance de la pourriture a été effectuée. Après avoir vérifié la normalité des distributions des mesures par le test de la droite de HENRY, la variance puis l'intervalle de confiance de la moyenne des mesures de l'avance de la pourriture, ont été calculés. Le tableau 2 présente l'ensemble de ces mesures.

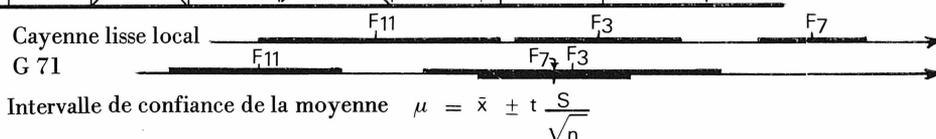
D'autre part, nous avons tracé la courbe représentant les variations du logarithme népérien de la longueur de la feuille en fonction de l'importance de la pourriture pour les feuilles F 7 et F 3 (figures 3 et 4).

Les mesures ont été faites 66 heures après inoculation pour F 7 et F 11, et pour F 3, 67 heures après.

Le tableau 2 montre que les trois groupes de feuilles F 3, F 7, F 11, de chaque type génétique, sont différents quant à leur réaction face au développement du *P. parasitica* dans leurs tissus. En fonction de la vitesse de progression du mycélium ils se classent dans l'ordre suivant, par ordre croissant de vitesse : F 11, F 3, F 7. Toutefois, pour les feuilles du cultivar G 71 les résultats sont moins nets, F 3 et F 7 ne peuvent être différenciés, mais F 11 s'individualise bien par sa résistance à l'avance de la pourriture. Par contre,

TABLEAU 2 - l = longueur de la partie pourrie, L = longueur de la feuille.

Cayenne lisse local					G 71			
F 3		F 7		F 11	F 3	F 7	F 11	
l	L	l	L	l	l	l	l	
15	9,6	25	42,5	5	30	26	0	
25	11,2	29	40,5	0	0	17	18	
20	9,1	28	41,6	10	2	14	10	
22	10	21	51,3	20	22	17	11	
9	8,6	27	40	0	30	0	24	
2	9,2	29	28,4	18	30	25	15	
23	10	20	28,7	25	30	24	20	
21	10,2	28	33	9	11	22	12	
28	12,1	31	44,5	20	23	10	16	
20	10,2	26	53,6	0	20	28	24	
10	10,2	32	32,7	22	3	15	14	
25	8,8	18	33,5	5	24	20	14	
26	12,7	20	54,2	7	20	10	12	
25	11,2	28	50,7	24	12	15	5	
3	9,2	26	60,5	21	24	15	15	
20	9,2	28	33	35	7	30	8	
15	12,1	25	49,7	8	22	20	25	
25	9,2	26	46,5	18	27	9	18	
24	11,2	31	45,7	10	7	15	5	
24	10,2	30	37,6	25	25	16	14	
\bar{X}	19,6	X	26,4	X	12,4	18,4	17,9	11,1
V (x)	36,4	X	12,8	X	79,3	98,5	32,4	37,3



la comparaison des F 7 des deux types génétiques est intéressante. La vitesse de progression pour G 71 est de 35 p. cent inférieure à celle du Cayenne lisse local. Au niveau des feuilles F 11 et F 3 aucune différence significative entre les cultivars ne peut être mise en évidence.

Suivant le critère de la vitesse de progression, les feuilles se classent dans l'ordre : F 11, F 3 et F 7.

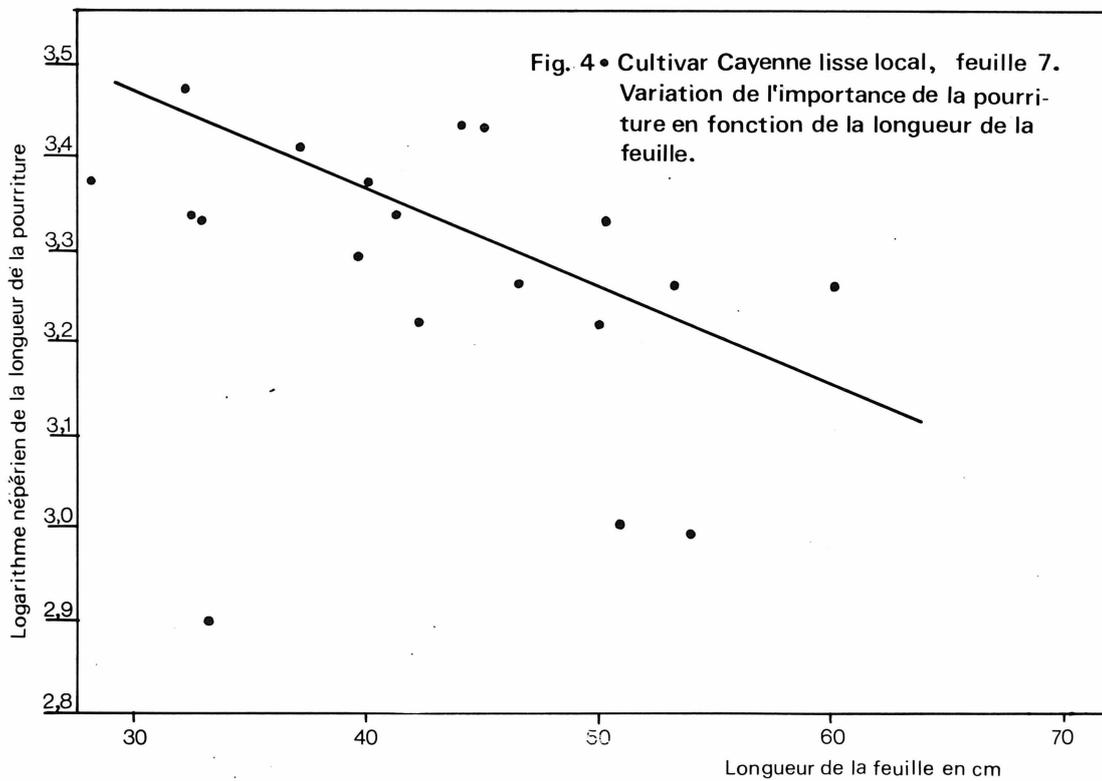
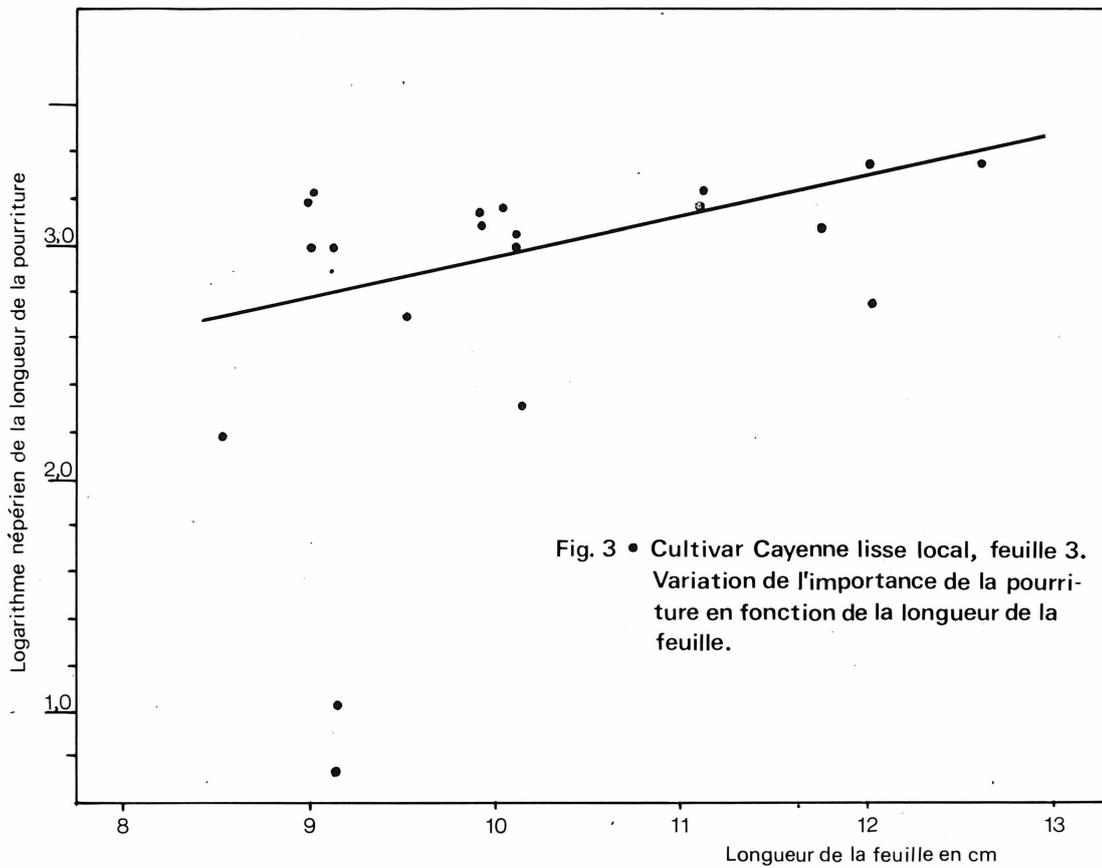
De prime abord, on pourrait penser que le champignon progressant plus vite dans les tissus blancs, sans rencontrer de résistance, aurait été plus loin dans les feuilles F 7 que dans les F 11, mais cette idée est infirmée par le fait que les feuilles F 3 qui ne sont chlorophylliennes qu'à leurs extrémités et sont moins fibreuses que F 7 n'ont pas permis un développement aussi rapide du parasite. D'autre part, en disséquant des ananas fortement atteints de pourriture et en dégagant le méristème apical des tissus en déliquescence des feuilles pourries, les 2 ou 3 plus jeunes feuilles étaient indemnes et des tentatives d'isolement à partir de celles-ci ont toujours été négatives. Cette observa-

tion est en accord avec ce qu'on sait de la sensibilité des tissus méristématiques face aux agents pathogènes : très souvent ces zones ne sont envahies que très tardivement à la mort de la plante, et la plupart du temps ces tissus sont indemnes du parasite sur une plante vivante.

Par ailleurs, FROSSARD, en Côte d'Ivoire, a mesuré sur trois types génétiques (G 32, G 71, G 85) en fonction du rang de la feuille et de sa longueur, l'importance de la partie pourrie corrélativement à la longueur de la partie blanche. Il apparaît nettement que ces variables sont liées : avec un numéro d'ordre croissant, la longueur de la feuille augmente avec un maximum pour F D. La longueur de la partie blanche est maximale pour les feuilles 6 à 9 suivant le type génétique considéré et à ce maximum correspond une longueur plus importante de tissus pourris. L'allure générale des courbes est une cloche.

Un deuxième point est à développer.

Les mesures sur F 11 présentait une très grande



hétérogénéité. En fait elle correspondait à une hétérogénéité des feuilles ; nous nous sommes aperçus que toutes n'étaient pas des feuilles 11. Cinq d'entre elles présentaient des caractéristiques de feuille 7. Nous les avons éliminées des mesures. Ceci est justifié pour deux raisons. Après plantation des rejets, nous avons effectué des marquages de couleur sur la première feuille visible, tous les mois. A l'observation, il est apparu de façon nette qu'à un même numéro de feuille correspondaient des feuilles de type différent ; sur la base d'une initiation de feuille par mois, un certain nombre de pieds présentait un retard de croissance. D'autre part, PY et LACOEUILHE ont montré que le rythme des apparitions ne suit pas obligatoirement celui des initiations car la croissance peut être ralentie pour diverses raisons. Les figures 3 et 4 traduisent l'hétérogénéité foliaire entre plants ; à même numéro de feuille ne correspond pas toujours physiologiquement et anatomiquement une feuille identique. De plus, elles confirment la variation de sensibilité des feuilles en fonction de leur âge. En effet l'importance de la partie pourrie des feuilles F 3 augmente avec leur longueur, alors que pour les feuilles F7 ce phénomène est inverse. Cette constatation illustre l'augmentation de sensibilité quand on se déplace vers les jeunes feuilles et la diminution de sensibilité quand on passe de ces dernières feuilles aux feuilles adultes.

Quel que soit le type génétique, les tissus très jeunes ne permettent pas une avance rapide de *Phytophthora*, sans doute par un manque d'activités physiologiques ; les feuilles adultes se comportent de la même manière mais cette fois grâce à une très forte activité physiologique.

Entre ces deux extrêmes se situent des feuilles à partie blanche importante (F 7) dans lesquelles le champignon progresse rapidement mais dans ce cas l'origine génétique influe sur cette vitesse. L'importance de la pourriture sur feuille est liée à un âge précis et pour celui-ci, elle varie avec le type génétique.

Influence sur le développement de la nécrose dans toute la feuille.

Les feuilles du cultivar G 71 sont comparées à celles de G 32, le dispositif expérimental est le même que celui décrit antérieurement.

Les résultats sont rassemblés sur la figure 5. Ils sont en tous points semblables à ceux obtenus avec le clone G 32, figure 2. La seule différence observée est quantitative, le brunissement est plus important, lié comme nous l'avons déjà vu à un ralentissement plus grand de l'avance de la pourriture.

CONCLUSIONS

Nous avons mis au point une technique d'inoculation sur

feuille. Elle nous a permis de déterminer la partie de la feuille d'ananas la plus sensible à l'inoculation, puis de déterminer l'âge de la feuille la plus réceptive. Elle met en évidence, au niveau foliaire, des résistances morphologiques (trichomes inactifs) et physiologiques (vitesse d'envahissement des tissus par la pourriture). Dans un plan de sélection ces points seraient à considérer utilement.

INOCULATION SUR PIEDS

Nous avons montré comment les feuilles isolées se comportaient vis-à-vis de la pénétration du parasite et du développement de la pourriture. L'importance de la partie blanche a été mise en évidence : c'est par les trichomes que se fait la pénétration de l'agent pathogène. Nous savons également que suivant l'âge de la feuille, l'importance de cette partie blanche varie. D'autre part, à l'observation des pieds, cette partie n'est pas visible, en effet elle n'est pas à l'air libre mais au contraire enfoncée et protégée par l'imbrication très serrée des feuilles. Il semble donc que les zoospores atteignent la base des feuilles non pas directement mais par écoulement entre les feuilles.

A l'arrosage on s'aperçoit que l'eau s'accumule dans le cœur même, submergeant les plus jeunes feuilles, alors qu'elle s'écoule en partie de l'aisselle des autres. Les tentati-

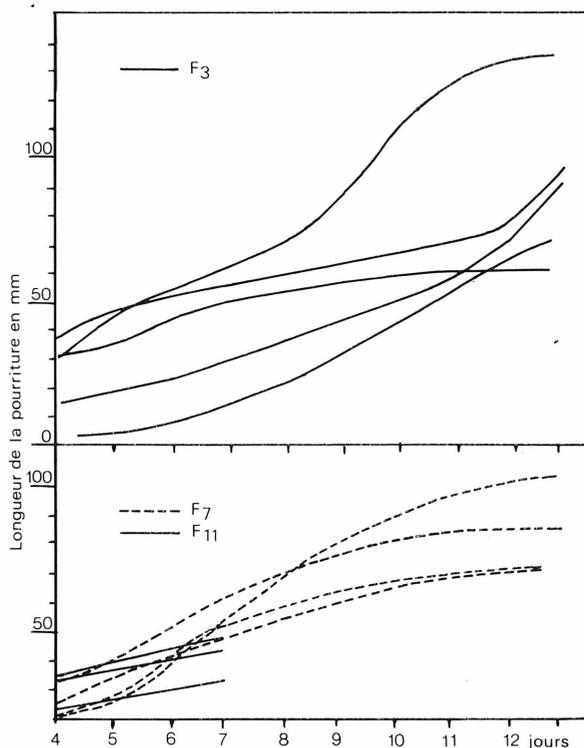


Fig. 5 • Cinétique de l'avance de la pourriture dans les feuilles du cultivar G.71.

ves d'inoculation sur pied par dépôt d'une suspension de zoospores au niveau des feuilles F et E sont peu couronnées de succès. DICK a montré qu'un écartement des feuilles favorise le démarrage de l'infection. En agissant ainsi on permet sans doute l'écoulement de l'eau vers les zones de pénétration. D'autre part, la réussite de l'inoculation dépend aussi de la nature génétique du matériel végétal : G 71 s'individualise par sa quasi-immunité. A cette qualité correspond une morphologie particulière, les feuilles de G 71 sont plus dressées que celles des autres cultivars, ce qui se traduit par un serrement plus important de la rosette, rendant l'écoulement de l'eau vers la tige encore plus difficile.

Ainsi la progression des zoospores vers les parties de la feuille où les trichomes sont actifs, est arrêtée par le serrement de la rosette, celle-ci devient alors un facteur limitant dans le processus d'infection. Nous allons préciser suivant l'âge des feuilles et la nature du cultivar quelles parties de la feuille sont normalement atteintes par les eaux.

PÉNÉTRATION DE L'EAU DANS LA ROSETTE

Nous avons utilisé une solution à 1.000 ppm de fluorescéine, 20 ml de cette solution sont versés dans la rosette de trois pieds de chacun des cultivars G 71 et Cayenne lisse. Trois jours après, les ananas sont soigneusement effeuillés. Les feuilles ainsi que des coupes transversales du sommet de la tige sont observées en lumière ultra-violette.

Influence de l'âge de la feuille.

Quel que soit le cultivar, la fluorescéine est limitée dans sa progression au niveau de la partie vert-foncé pour les feuilles A, B, C, D, et les plus vieilles des feuilles E. Ce résultat ne nous surprend pas puisque sur ces feuilles la partie blanche est extrêmement réduite, au bénéfice de la partie verte. Au niveau des feuilles E «adultes» la progression du colorant se limite à la zone de transition entre partie verte et blanche. En ce qui concerne les feuilles F, les résultats sont plus inattendus. Les cinq plus jeunes feuilles ontogéniquement ne sont pas fluorescentes, par contre, l'extrémité de la sixième l'est. L'examen du sommet de la tige où l'arrachement des feuilles a laissé l'extrême base de celle-ci, formant un enchevêtrement concentrique, révèle l'existence d'une zone circulaire indemne de colorant, correspondant aux cinq plus jeunes feuilles, entourée d'une rondelle fluorescente de 2 à 3 mm de large, correspondant à l'insertion des feuilles dont seule l'extrémité a fixé le colorant.

Influence du cultivar.

Les différences dues au cultivar se manifestent pour les feuilles E. Chez le Cayenne lisse local, la pénétration de la fluorescéine est importante, la partie blanche est atteinte

alors que chez G 71 la descente est limitée à la base de la partie verte, zone où les trichomes sont inactifs.

La technique utilisée pour mettre en évidence l'écoulement d'une solution aqueuse dans la rosette, est assez rudimentaire. Elle est liée à l'appréciation subjective d'une intensité de fluorescence. D'autre part, elle s'est réduite à une observation statique d'un phénomène dynamique. Il en est ainsi au niveau des plus jeunes feuilles dont seules l'extrémité et la base sont fluorescentes. Cette constatation est difficilement explicable, toutefois on peut émettre l'hypothèse que le colorant a coulé le long de ces jeunes feuilles pour s'accumuler à leur base sans se fixer sur leurs tissus, alors qu'il l'aurait fait aux extrémités supérieures de ces mêmes feuilles. Une autre idée vient alors : si le colorant n'a pas été retenu, c'est que la surface de la feuille était parfaitement lisse, dépourvue de trichomes par exemple.

De ces résultats trois points peuvent être soulignés, encore une fois du fait de la position de la feuille sur la tige et de la nature du cultivar.

Le premier point est que : les très jeunes feuilles et la zone apicale de la tige sont protégées et isolées du milieu extérieur par l'engainement très étroit des feuilles. Ces observations sont corroborées par celles de FROSSARD en Côte d'Ivoire.

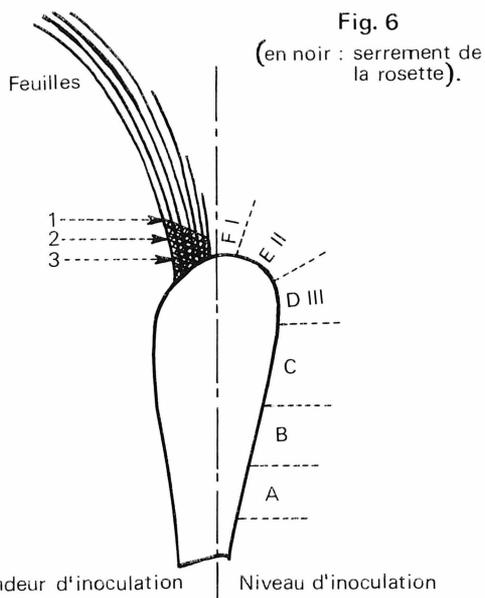
Ensuite, pour un même cultivar, les différences entre feuilles sont dues à leur position sur la tige.

Et troisième point, pour une même position sur la tige la nature du cultivar introduit encore une différence, c'est le cas pour les feuilles E et F. Ainsi, dans la mise au point d'une technique d'inoculation sur pieds, il apparaît indispensable d'atteindre à coup sûr la partie basale blanche des feuilles.

DÉTERMINATION SPATIALE DE LA PARTIE LA PLUS FAVORABLE A L'INOCULATION

Nous avons utilisé 30 pieds de Cayenne lisse de type local. Les inoculations sont effectuées à l'aide de pipettes Pasteur introduites à l'aisselle des feuilles, à des profondeurs variables. Nous avons choisi trois niveaux d'inoculation le long de la tige, numérotés I, II, III ; le premier situé au centre de la rosette correspond aux feuilles F3, le deuxième aux F 7, et le troisième au F D. A ces trois niveaux d'inoculation sont combinées trois profondeurs de pénétration de la pipette, numérotés 1, 2, 3 (suivant la figure 6).

Le numéro 1 correspond à l'aisselle même de la feuille, le 2 à un enfoncement de 2 cm à partir de cette aisselle et la dernière à une pénétration de 3,5 cm. Au niveau I, dans la rosette, une seule profondeur est possible pour ne pas atteindre la tige.



L'inoculum est constitué par 2 ml d'une suspension de zoospores à la concentration de 100.000/ml. Les témoins sont réalisés en déposant 5 ml de la suspension de zoospores à l'aisselle des feuilles aux trois niveaux choisis. Au total, cela fait dix essais, avec cinq pieds par essai. Les pipettes sont laissées en place.

Cinq jours après l'inoculation, les pieds sont disséqués et examinés un à un. Les débuts de pourriture d'une feuille sont notés +, l'absence de pourriture 0.

a) partie de la plante la plus réceptive à l'inoculation.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

Remarquons d'abord que dans tous les témoins, l'inoculation est un échec.

Au niveau I, une réponse positive est obtenue, les feuilles 3 et 4 présentent un début de pourriture. Cette réussite peut s'expliquer par le fait que la pipette a écarté les feuilles du coeur et a permis à l'eau de s'écouler vers la base de ces jeunes feuilles.

Au niveau II, on observe un gradient d'intensité dans la réponse à l'inoculation. A la profondeur 1, l'inoculation n'a pas réussi, à la profondeur 2, dans un cas, elle a réussi. Notons qu'à cette profondeur les feuilles n'ont pas été blessées par l'introduction forcée de la pipette. A la dernière profondeur, les trois pieds sont nettement attaqués et les pipettes ont blessé les feuilles dans leurs parties blanches, mais aucun brunissement ni nécrose ne sont observés.

Au niveau III, la réponse à l'inoculation est instructive. A la profondeur 1, aucun symptôme n'est visible, par contre aux profondeurs 2 et 3, l'enfoncement très forcé de la pipette a occasionné des blessures assez importantes dans la

TABLEAU 3

P ↓	N →			III
	essais			
I	a	+	0	0
	b	0	0	0
	c	0	0	0
2	a	X	+	nécrose et blocage
	b		0	nécrose et blocage
	c		0	nécrose et blocage
3	a	X	+	nécrose et blocage
	b		+	nécrose et blocage
	c		+	nécrose et blocage
T	a	0	0	0
	b	0	0	0
	c	0	0	0

T - témoin

N - niveau de l'inoculation sur la tige

P - profondeur de l'inoculation

partie verte de la feuille qui ont permis le développement de la pourriture sur 1 ou 2 mm, autour de la blessure, mais qui a été vite bloquée par un dessèchement prononcé des tissus de la feuille à ce niveau.

b) détermination séquentielle de la progression de la pourriture.

En disséquant des ananas infectés à des degrés différents à la suite de diverses inoculations, nous nous sommes fait une idée assez précise de la manière dont se développe la pourriture due au *P. parasitica*. A partir de la partie blanche d'une jeune feuille, par exemple F 6, l'agent pathogène envahit celle-ci en descendant dans des tissus de plus en plus tendres. La montée est beaucoup plus lente et de toute façon très réduite puisqu'elle doit s'effectuer dans la partie verte. La pourriture atteint ensuite la tige dont elle envahit d'abord l'écorce, selon le terme de KRAUSS pour remonter alors dans les autres feuilles. A un stade plus avancé de l'infection, l'agent pathogène a gagné le cylindre central et descend lentement vers le bas de la tige sans toutefois l'envahir en totalité, alors que la remontée de la pourriture s'est faite dans toutes les feuilles E et F, en laissant toutefois la zone méristématique apicale indemne.

Bien qu'effectuée sur un petit échantillon, cette expérimentation est qualitativement instructive, même si quantitativement les résultats paraissent insuffisants. Nous avons fait atteindre aux zoospores différentes parties de la feuille sur le pied d'ananas. L'ensemble des réponses obtenues coïncide bien avec les résultats des inoculations sur feuilles isolées, à savoir qu'il existe un type de feuille (E) et une partie de cette feuille (blanche) où les chances de pénétration du tube germinatif de la zoospore sont maximales.

On s'aperçoit aussi qu'une inoculation par blessure dans une partie de la feuille où les trichomes sont inactifs, ce qui,

nous l'avons vu, bloque l'avance du champignon en inoculation sur feuille, est vouée à l'échec. Il s'agit donc bien d'une réaction physiologique de cette partie de la feuille. Réaction inexistante dans la partie blanche où les trichomes sont actifs.

D'autre part, la progression séquentielle de la pourriture montre que c'est avant tout une pourriture qui atteint les jeunes feuilles parmi lesquelles les plus jeunes sont le plus souvent indemnes (zone apicale). Le terme de pourriture du coeur employé par LEWCOK peut sembler donc impropre puisque à ce stade d'observation, c'est toute la plante qui est envahie, feuille et tige à la fois. Initialement, c'est une pourriture des feuilles.

CONCLUSIONS

Nous nous étions proposés de mettre au point une méthode d'inoculation sûre.

Pour cela nous avons tout d'abord amélioré les techniques de culture *in vitro* du parasite, afin de disposer de suspensions à fortes concentrations de zoospores.

Nous avons ensuite vérifié l'existence d'une zone « privilégiée » des feuilles, la zone blanche riche en trichomes fonctionnels, où l'inoculation, réalisée avec un inoculum réduit, conduit inévitablement au développement de la pourriture.

Puis, parmi toutes les feuilles de la couronne, la feuille de rang 7 (en comptant à partir du centre de la rosette) s'est révélée être la plus sensible.

Enfin, sur plante entière, nous avons montré où et comment effectuer l'inoculation.

Ces résultats peuvent être utilisés dans la mise au point de traitements chimiques de protection, tant au point de vue de la méthode d'application que pour l'estimation de l'activité fongicide de nouvelles formulations. Ils indiquent aussi où se situent les différents niveaux de résistance, importance relative des zones blanches, réactions à l'envahissement secondaire des tissus, resserrement de la rosette foliaire. Ils peuvent donc être utilisés pour estimer, d'une manière simple et rapide, dans un programme de sélection, le comportement de différentes variétés d'ananas vis-à-vis de *Phytophthora parasitica*.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALABAN (C.). 1964.
Influence of soil temperature on root and heart rot pineapple caused by *P. cinnamomi* and *P. parasitica*.
Phytopathology, 54, p. 1187.
2. APPLE (J.L.) et DUCKES (P.D.). 1965.
Chemotaxis of zoospores of *Phytophthora parasitica* by plants roots and certain chemicals solutions.
Phytopathology, 51, p. 195-197.
3. APPLE (J.L.) et DUCKES (P.D.). 1965.
Effect of oxygen and carbon dioxide on growth and inoculum potential of *P. parasitica*.
Phytopathology, 55, p. 666.
4. ANDERSON (E.J.). 1951.
The *Phytophthora cinnamomi* problem in pineapple field in Hawaii.
Phytopathology, 41, p. 1.
5. ARAGAKI (M.) et HINE (R.B.). 1963.
Pathogenicity, vitamin nutrition and cultural characteristics of *P. parasitica* from carnation and other hosts in Hawaii.
Phytopathology, 53, p. 1194.
6. ARAGAKI (M.) et HINE (R.B.). 1962.
Effect of radiations on sporangial production by *Phytophthora parasitica* on artificial media and detached papaya fruit.
Phytopathology, 52, p. 855.
7. BARBIER (M.). 1964.
Observation sur la pourriture des rejets d'ananas en Martinique.
Fruits, 19, p. 405.
8. BOHER (B.). 1974.
Pourriture du coeur de l'ananas : pénétration active du parasite dans les organes aériens.
Fruits, 29, p. 721.
9. BRASIER (C.M.). 1969.
Effect of light and temperature on reproduction *in vitro* in two species of *Phytophthora*.
Trans. British. Mycol. Soc., 52, p. 105.
10. BRICKER (J.L.) et TSAO (P.H.). 1964.
Soil fungistasis in relation to zoospore germination of *Phytophthora parasitica*.
Phytopathology, 54, p. 910.
11. BRIDGE (W.M.) et TABAK (H.H.). 1970.
The effects of gaseous environments on the growth and metabolism of fungi.
Bot. Review, 35, p. 126-229.
12. CAMERON (H.R.). 1962.
Effects of hydrogen ion concentration on growth rate of *Phytophthora* sp.
Phytopathology, 52, p. 727.
13. COLLINS (J.L.). 1960.
Pineapple.
Leonard Hill. London.
14. FROSSARD (P.). 1967.
Lutte contre la pourriture des plants d'ananas en Côte d'Ivoire.
Fruits, 22, p. 535.
15. GUEROUT (R.). 1971.
Importance relative des champignons du sol et des nématodes sur la croissance des ananas.
Fruits, 26, p. 287.
16. GOODING (G.V.) et LUCAS (G.B.). 1959. Effect of inoculum level on the severity of tobacco black shank.
Phytopathology, 49, p. 274-276.
17. GOODING (G.V.) et LUCAS (G.B.). 1959.
Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in *Phytophthora parasitica*.
Phytopathology, 49, p. 277.
18. GRIFFIN (D.M.) et MACAULEY (B.J.). 1969.
Effects of carbon dioxide and oxygen on the activity of some soil fungi.
Trans. British. Mycol. Soc., 53, p. 53-62.
19. HARNISH (W.H.). 1965.
Effect of light on production of oospores and sporangia in species of *Phytophthora*.
Mycologia, 57, p. 85-90.
20. HUGUENIN (B.) et JACQUES (R.). 1973.
Établissement du spectre d'action de la lumière sur la sporogénèse et l'oogénèse des souches du *Phytophthora palmivora* BUTL.
C.R.A.S. Paris, 276, série D, p. 725-728.

21. KADOOKA (J.Y.) et KO (W.H.). 1973.
Production of chlamydospores by *Phytophthora palmivora* in culture media.
Phytopathology, 63, p. 559-562.
22. LEWCOK. 1935.
Top rot of pineapple and its control.
Queensland Agric. Jour., 43, p. 9.
23. LILLY (V.G.). 1966.
Effects of sterols and light on the production and germination of *Phytophthora* spores.
Colston papers n°18, London. Butterworths.
24. MENYONGA (J.M.) et TSAO (P.H.). 1966.
Production of zoospores suspension of *Phytophthora parasitica*.
Phytopathology, 56, p. 369.
25. MERLICH, 1934.
Control of *Phytophthora* heart rot of pineapple plants.
Phytopathology, 24, p. 173.
26. MERNY (G.). 1949.
Les maladies de l'ananas.
Fruits, 4, p. 132.
27. OXENAAM, 1957.
Diseases of the pineapple.
Queensland Agr. Jour., 83, p. 19.
28. PATIL (S.S.) et YOUNG (R.A.). 1960.
The influence of temperature on development of *Phytophthora parasitica* root rot of fushia.
Phytopathology, 50, p. 386.
29. PY (C.). 1965.
L'ananas.
Maisonneuve et Larose, Paris.
30. PY (C.) et LACOEUILHE (J.J.). 1974.
La croissance de la feuille d'ananas en Côte d'Ivoire.
Fruits, 29, p. 709-715.
31. SIDERIS, 1929.
Stem rot of pineapple.
Phytopathology, 19, p. 1146.
32. TROUTMAN (J.L.) et WILLS (W.H.). 1964.
Electrotaxis of *P. parasitica* zoospores and its possible role in infection of tobacco by the fungus.
Phytopathology, 54, p. 225-228.
33. ZENTMYER (G.A.) et MITCHELL (D.J.). 1971.
Effects of oxygen and dioxid carbon tensions on sporangium and oospores formation by *Phytophthora* sp.
Phytopathology, 61, p. 807-812.
34. ZENTMYER (G.A.) et DAH WU (C.). 1972.
Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture.
Mycologia, 62, p. 397.

