



Caractérisation des isolats de *Phytophthora* spp du verger cacaoyers de Côte d'Ivoire

Klotioloma COULIBALY ^{1*}, Ismaël B. KEBE ¹, Nazaire Kouassi KOFFI ², Joseph MPIKA ³, Daouda KONE ⁴

1. Laboratoire de Phytopathologie, Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), BP 808 Divo, Côte d'Ivoire ;
2. Laboratoire Central de Biotechnologie, Centre National de Recherche Agronomique (CNRA),
3. Laboratoire de Phytopathologie, Station de Recherche de Bimbresso, CNRA, 01 BP 1536 Abidjan 01, Côte d'Ivoire
4. Laboratoire de pathologie et de Physiologie végétale, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

* Auteur pour la correspondance Email : coolklotiolo@yahoo.fr

Original submitted in on 6th September 2013 Published online at www.m.elewa.org on 31st October 2013.

RÉSUMÉ

Objectifs : La pourriture brune des cabosses due à *Phytophthora* spp. est l'affection la plus répandue et la plus importante dans la cacaoculture ivoirienne. Cette étude a été réalisée pour caractériser et identifier les isolats de *Phytophthora* spp à partir des caractères morphologiques et moléculaires.

Méthodologie et résultats : Cinquante isolats provenant des principales zones (Est, Centre-Ouest, et Sud-ouest) du verger cacaoyers de la Côte d'Ivoire ont été isolés à partir de cabosses immatures atteintes de pourriture brune. Les caractères phénotypiques asexués et moléculaires à savoir : la longueur, la largeur, le rapport longueur/largeur des sporocystes, la longueur du pédicelle, la forme et la caducité des sporocystes, le type de colonie et l'analyse des fragments de restriction de l'ADN des régions ITS (Espaceur Interne Transcrit) ont été évalués. Les sporocystes des isolats étudiés apparaissaient très variables dans leur forme d'un isolat à un autre. Ils étaient de forme ovoïde, ellipsoïde, obpyriforme, ovoïde-obpyriforme et arrondis à leur base. Les sporanges des isolats observés étaient caducs donc éparpillés avec un pédicelle court ($2,92 \pm 1,18 \mu\text{m}$). Les sporanges étaient également variables par leur taille, variant entre 33,25 à 55,00 μm en longueur et entre 21,99 à 34,37 μm en largeur avec un rapport longueur/largeur variant de 1,23 à 1,94. Les colonies sur culture carotte-agar brut étaient radiées, striés et/ou stellées, et pétaloïdes. L'amplification par ITS-PCR de l'ADN a généré un fragment spécifique de 900 bp. L'analyse des fragments de restriction obtenus après digestion par les endonucléases (*AluI* ; *PvuII* ; *HaeIII* ; *HinfI* et *MspI*) a montré que tous les isolats étudiés appartenaient à l'espèce *Phytophthora palmivora*.

Conclusion et application de résultats : Il ressort de notre étude que la technique PCR-RFLP a été plus discriminante par rapport aux méthodes traditionnelles pour caractériser et identifier les isolats de *Phytophthora* spp. Les résultats montrent également que la technique PCR-RFLP est un moyen rapide sélectif et fiable dans l'identification des *Phytophthora* spp. En outre, cette méthode peut être utilisée comme outil de prévention et de gestion dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses. Cette étude a confirmé la présence de *Phytophthora palmivora* comme l'espèce la plus prédominante bien que *Phytophthora megakarya* ait été récemment découverte dans l'Est du verger cacaoyers.

Mots clés : pourriture brune ; sporange ; pédicelle ; papille ; *Phytophthora* spp ; région ITS ; PCR-RFLP

Characterization of *Phytophthora* spp isolates from cocoa orchard of Côte d'Ivoire

Objectives: The cocoa black pod caused by *Phytophthora* spp. is the most widespread and the most important disease of cocoa in Côte d'Ivoire. The aim of this study was to identify and characterize prevailing strains of *Phytophthora* spp in the country using both morphological and molecular methods.

Methodology and Results: A total of fifty isolates of *Phytophthora* spp grown from immature pods suffering of cocoa black disease obtained in the main production areas of cocoa (East, Centre-West and South-West) of Côte d'Ivoire. The phenotypic asexual and molecular characteristics namely: the length, the width, the length /width ratio of sporocysts, the length of the stalk, the shape and the caducity of sporocyst, the type of colony and the analysis of ITS (Internal Transcribed Spacer) restriction fragment area of DNA were evaluated. Sporocysts appeared to be highly variable from one isolate to another with ovoid, ellipsoid, ovoid-obpyriform and obpyriform and rounded base shape. Sporangia were scattered with a short pedicel ($2.92 \pm 1.18 \mu\text{m}$), with variable size ranging from 33.25 to 55.00 μm for length, from 21.99 to 34.37 μm for width, from 1.23 to 1.94 for length / width ratio. On carrot agar, colonies appeared radiated, striated and / or stellate and petaloid. The ITS-PCR amplification of DNA generated a specific fragment of 900 bp. Analysis of restriction fragments obtained after digestion with endonucleases (*AluI*; *PvuII*; *HaeIII*; *HinfI* et *MspI*) identified all isolates as *Phytophthora palmivora*.

Conclusion and application of findings: It is clear from our study that the PCR-RFLP technique was discriminatory than traditional methods for characterization and identification of isolates of the genus *Phytophthora* spp. Our results also show that the PCR-RFLP technique is more selective, fast and reliable for identification of *Phytophthora* spp. This method could be used as a useful tool for prevention and management in the fight against the black pod. This study confirmed the presence of *Phytophthora palmivora* as the most predominant species in Ivorian cocoa orchard.

Keywords: black pod disease; sporangia; pedicel; papilla *Phytophthora* spp, ITS region, PCR-RFLP

INTRODUCTION

La pourriture brune des cabosses causée par les espèces du genre *Phytophthora* est la maladie la plus grave de la production mondiale de cacao, en particulier en Afrique de l'Ouest et Centrale où 65 % de la production mondiale est produite par les petits planteurs (Assoumou, 1997 ; ICCO, 1998). Quatre principales espèces de *Phytophthora* sont connues comme responsables de la pourriture brune et celles-ci varient à la fois selon leur agressivité et leur niveau de perte de récoltes. En Afrique, deux espèces, *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* sont responsables de la pourriture brune des cabosses. *Phytophthora palmivora* est cosmopolite et sévit dans tous les pays producteurs alors que *P. megakarya* est endémique au Cameroun, Nigeria, Gabon et Ghana. Les deux espèces produisent des symptômes similaires lorsqu'elles infectent les cabosses. *Phytophthora megakarya* est la plus agressive et peut provoquer

entre 60 % et 100 % des pertes de récoltes (Luterbacher *et al.*, 1993, Berry and Cilas, 1994), Opoku *et al.*, 2000), quand les conditions favorisent le développement de la maladie. En revanche, *P. palmivora* est moins agressif et peut entraîner des pertes de rendement de 40 %. (Van der Vossen 1997). Cette maladie se traduit directement par des pertes de rendement car les cabosses atteintes produisent des fèves de cacao impropres à la consommation. La classification des espèces de *Phytophthora* spp s'est reposée historiquement sur les caractères morphologiques, cytologiques et biochimiques (Sansome *et al.*, 1975 ; Brasier et Griffin ; 1979 ; Kaosiri *et al.*, 1980 ; Hardham *et al.* ; 1986 ; Appiah, 2003). Cependant, la variation morphologique et le chevauchement des phénotypes chez certaines espèces rend cette classification difficile (Brasier, 1991, Erwin ; 1983 ; Hansen, 1987 ; Shaw, 1991 ; Appiah, 2001) et complique l'utilisation

des caractères morphologiques comme critères taxonomiques pour estimer la diversité interspécifique et intra spécifique. Dès lors, plusieurs approches moléculaires ont été utilisées pour étudier la variation entre les espèces de *Phytophthora* associées à la pourriture brune des cabosses de cacao. Les méthodes moléculaires sont souvent utilisées en complément des approches morphologiques car par leur grande sensibilité permettent la détection de variation entre les organismes à partir des séquences nucléotidiques (Schlick et al., 1994). Diverses techniques basées sur les gènes de l'ADN sont largement utilisées pour les études taxonomiques moléculaires car ces gènes

se composent de mosaïques régions présentant diverses zones d'évolution. Les marqueurs moléculaires RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de l'ADN mitochondrial et nucléaire basés sur des régions ITS de l'ADN ont été utilisés pour estimer la variation intra et interspécifique entre les espèces de *Phytophthora* (Forster et al., 1990 ; Forster et Coffey 1991; Mills et al., 1999) car ils varient généralement entre les espèces d'un même genre.

L'objectif de notre étude vise à caractériser et à identifier les isolats de *Phytophthora* spp du verger cacaoyers à partir de l'analyse de leurs caractères morphologiques asexués et moléculaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sites de collecte des échantillons de cabosses : Les isolats de *Phytophthora* spp, étudiés proviennent des cacaoyères ivoiriennes. Ils ont été isolés sur des cabosses malades obtenues à la suite d'une collecte systématique organisée à la suite d'une enquête phytosanitaire dans les principales zones de cacaoculture de Côte d'Ivoire. Ainsi, les localités de Divo, Soubré, Daloa, Duékoué, Abengourou, Aboisso ont été prospectées. Dans chaque localité, la collecte a été effectuée dans 10 plantations et 3 cabosses atteintes naturellement de pourriture brune ont été prélevées par parcelle. Les cabosses prélevées ont été conservées dans des sachets plastiques portant les coordonnées de prélèvement. Les cabosses ainsi récoltées sont ramenées au laboratoire pour l'isolement des endophytes.

Isolement et culture des isolats de *Phytophthora* spp : Les isolats sont prélevés sur des cabosses immatures atteintes de la pourriture brune dont les nécroses sont en cours d'évolution. Les nécroses sont lavées à l'alcool à 95 % et flambées pendant 30 secondes. La zone de prélèvement a été choisie et les tissus superficiels ont été décapés à l'aide d'un scalpel stérile. Trois fragments de forme cubique de 7 mm de côté ont été prélevés dans les tissus sous-corticaux avec un emporte pièce stérile au niveau du front de croissance de la nécrose. Des rondelles ont alors été déposées sur le milieu de culture eau gélosée à 1,5 % dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. L'incubation s'est faite à l'obscurité dans une étuve à 26°C pendant 7 jours. Après une semaine d'incubation, les isolats obtenus sont purifiés par repiquages successifs sur milieu de culture à

base de petit pois contenu dans des boîtes de Pétri de diamètre 90 mm. Le transfert des isolats s'est fait par prélèvement sur le front de croissance d'un fragment de gélose, contenant de très fins filaments mycéliens.

Clonage des isolats de *Phytophthora* spp par isolements monozoospores : Les isolats issus de cultures en masses ont été clonés par isolement monozoospores selon la technique de Babacauh (1980) et Ortiz-Garcia (1996). Les isolats cultivés sur milieu petit pois dans des fioles de Roux sont incubés pendant 05 jours à l'obscurité totale à 26°C. Les cultures sont ensuite exposées sous une photopériode de 12 heures pendant 5 jours pour induire la formation des sporocystes. En vue d'induire la libération des zoospores par les sporocystes mûrs, chaque culture a été inondée avec 40 ml d'eau distillée stérile et placée au réfrigérateur (4°C) pendant 15 minutes. Elles sont ensuite ramenées à la lumière d'une lampe à incandescence (60 W) pendant 45 minutes à la température ambiante du laboratoire (26°C). La suspension de zoospores ainsi obtenue dans les fioles de Roux est dénombrée à l'aide d'une cellule hématimétrique de Malassez à la concentration de 50 à 60 zoospores/ml par dilutions successives sur une partie aliquote dans laquelle, les zoospores ont été immobilisées par deux gouttes d'acide chlorhydrique. Avec une micropipette, 100 µl de la suspension calibrée sont déposés dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, A l'aide d'une tige en verre recourbée, préalablement flambée et refroidie dans l'eau distillée stérile, la suspension est étalée sur eau gélosée à 1,5 % par passages successifs. Après incubation, de 12 à 24 heures à l'obscurité à 26°C, les zoospores germées sont

prélevées individuellement sous loupe binoculaire avec une micro aiguille lancéolée stérile puis ensemencées sur milieu de culture carotte-agar en raison de 4 clones par isolat et l'isolat lui-même. Après 7 jours d'incubation à l'obscurité à 26°C, le clone à faciès parental est retenu pour les études ultérieures.

Caractéristiques morphologiques des isolats de *Phytophthora* spp : Les fragments mycéliens de 6 mm de diamètre ont été prélevés au niveau du front de croissance d'une culture pure de *Phytophthora* spp âgée de 5 jours sur un milieu à base de petit pois. Ces fragments ont été repiqués sur un milieu carotte-agar. L'incubation est réalisée à l'obscurité à 26°C pendant 4 jours. Ensuite, les cultures ont été incubées à une photopériode de 12 heures à 26°C pendant 2 à 3 jours. Un fragment de thalle de chaque isolat est prélevé à l'aide d'une aiguille lancéolée et déposé sur lame recouverte d'une lamelle dans une goutte d'eau distillée stérile. La préparation est fixée avec de la glycérine pour éviter l'évaporation ainsi que son dessèchement sous l'effet de la chaleur émise par le microscope optique. Les observations ont porté sur les critères morphologiques de classification des espèces de *Phytophthora* spp proposés par Waterhouse (1963), Stamps et al. (1990) et Gallegly et al., (2008). Il s'agit notamment de la morphologie des sporanges (forme, longueur, largeur et rapport longueur/largeur (L/l)), la longueur du pédicelle sur le sporange, la caducité et la disposition des sporanges. La longueur, la largeur et la longueur du pédicelle de 30 sporocystes choisis arbitrairement ont été mesurés pour chaque isolat. Un microscope optique composé d'un micromètre a été utilisé pour mesurer longueur et largeur des sporanges ainsi que la longueur du pédicelle au grossissement x 400. Le rapport longueur/largeur (L/l) a été calculé pour chaque isolat (Duan et al., 2008)..

Caractérisation moléculaire des isolats de *Phytophthora* spp

Extraction de l'ADN : Les isolats de *Phytophthora* spp sont ensemencés sur un milieu de culture spécifique (V8 brut) contenu dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre et préalablement recouvert d'un disque de cellophane stérile. Après 7 jours d'incubation à l'obscurité dans une étuve à 26°C, le mycélium de chaque isolat est récolté par grattage de la feuille de cellophane à l'aide d'une spatule stérile. Le mycélium obtenu (\approx 150 mg) est transféré dans des microtubes d'Eppendorf stérile de 2 ml. L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant une solution New glucanex (18 ml H₂O, 42 ml NaCl à 1 M, 1,8 g New glucanex) ; ajustée à pH 6 avec une solution de NaOH 5 M (Lebot et al., 2003). La digestion des parois

cellulaires a été réalisée dans des tubes d'Eppendorf (2 ml) contenant 1,5 ml de la solution New glucanex. L'incubation s'est faite à la température ambiante du laboratoire pendant 2 heures. La précipitation est conduite dans 600 μ l d'isopropanol suivie d'une centrifugation pendant 7 minutes. Les précipités obtenus ont été lavés avec de l'éthanol à 70% et le culot d'ADN est repris dans 100 μ l de tampon d'extraction puis incubée dans un Bain-marie à 60°C pendant 5 à 10 minutes pour dissolution complète.

Amplification de l'ADN par PCR et digestion de la région ITS par des enzymes de restriction : La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de la région ITS des extraits d'ADN a été effectuée en utilisant les amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') comme décrites par White et al., (1990). La réaction d'amplification de l'ADN a été effectuée dans un thermocycleur de type Thermo Scientific Savant DNA 120. Elle a permis d'amplifier par 30 cycles successifs 2 μ l d'ADN dans un volume réactionnel de 10 μ l composé de 5,05 μ l d'eau déionisée, 1 μ l de tampon PCR, 0,8 μ l de DNTP à 5 mM chacun, 0,3 μ l de MgCl₂ à 25 mM, 0,4 μ l à 20 pmol de chacune des amorces ITS1 et ITS4, 0,05 μ l de Taq polymérase à 0,5 Unité puis une goutte d'huile minérale (SIGMA) a été déposée au-dessus de chaque mélange réactionnel avant le cycle d'amplification. L'amplification utilisée était une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 55°C pendant 45 s, et une élongation à 72°C pendant 2 min. Une élongation à 72°C pendant 6 min a été réalisée à la fin. Les produits PCR (amplicons) ont ensuite été digérés par cinq enzymes de restriction connues pour l'identification des espèces du genre *Phytophthora* (*AluI* ; *PvuII* ; *HaeIII* ; *HinfI* et *MspI*). Trois isolats de *Phytophthora palmivora* de séquences connues sont utilisés comme isolats de références (GenBank ITS accession, JX315271. JX315270. JX315267). La digestion par les enzymes de restriction a été conduite dans un volume total de 25 μ l composé de 11 μ l d'eau déionisée stérile, 3 μ l de tampon 10X fourni avec les enzymes, 1 μ l d'enzyme et de 10 μ l de produit PCR. Le milieu réactionnel contenu dans des microtubes d'Eppendorf stériles a été incubé au Bain- Marie à 37°C pendant toute la nuit. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1,4 % dans 0,5X du tampon TBE (0,045 M Tris-borate et 0,001 M EDTA, PH 8,0) à 50 V pendant 90 min. Les gels ont été colorés pendant 15 min dans du Bromure d'Ethidium (BET à 0,5

mg / ml) et décolorés pendant 15 min dans de l'eau distillée puis photographiés sous lumière UV. Les tailles des fragments de restriction générés ont été mesurées directement à partir des mêmes gels et comparés à une échelle standard (1 kb) de type Invitrogen utilisée comme marqueur de poids moléculaire.

RÉSULTATS

Caractérisation morphologique des isolats de *Phytophthora* spp : Les isolats de *Phytophthora* dans cette étude ont présenté un thalle à faciès radié strié et/ou stellé et pétaloïde avec un front de croissance régulier et festonné (figure 1). Observés au microscope,

Analyse des données : Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATISTICA version 7.1. Les isolats ont été soumis à l'analyse de variance. Chaque isolat a été considéré comme un facteur aléatoire dans l'analyse. Les variables étudiées étaient la longueur, la largeur, le rapport longueur/largeur ainsi que la longueur du pédicelle des sporanges.

les sporanges étaient caducs à papille proéminente et emportaient un pédicelle court de longueur variant de 2,24 à 3,72 μm (moyenne $2,92 \pm 1,18 \mu\text{m}$). La forme des sporanges était très variée allant d'ellipsoïde à ovoïde.

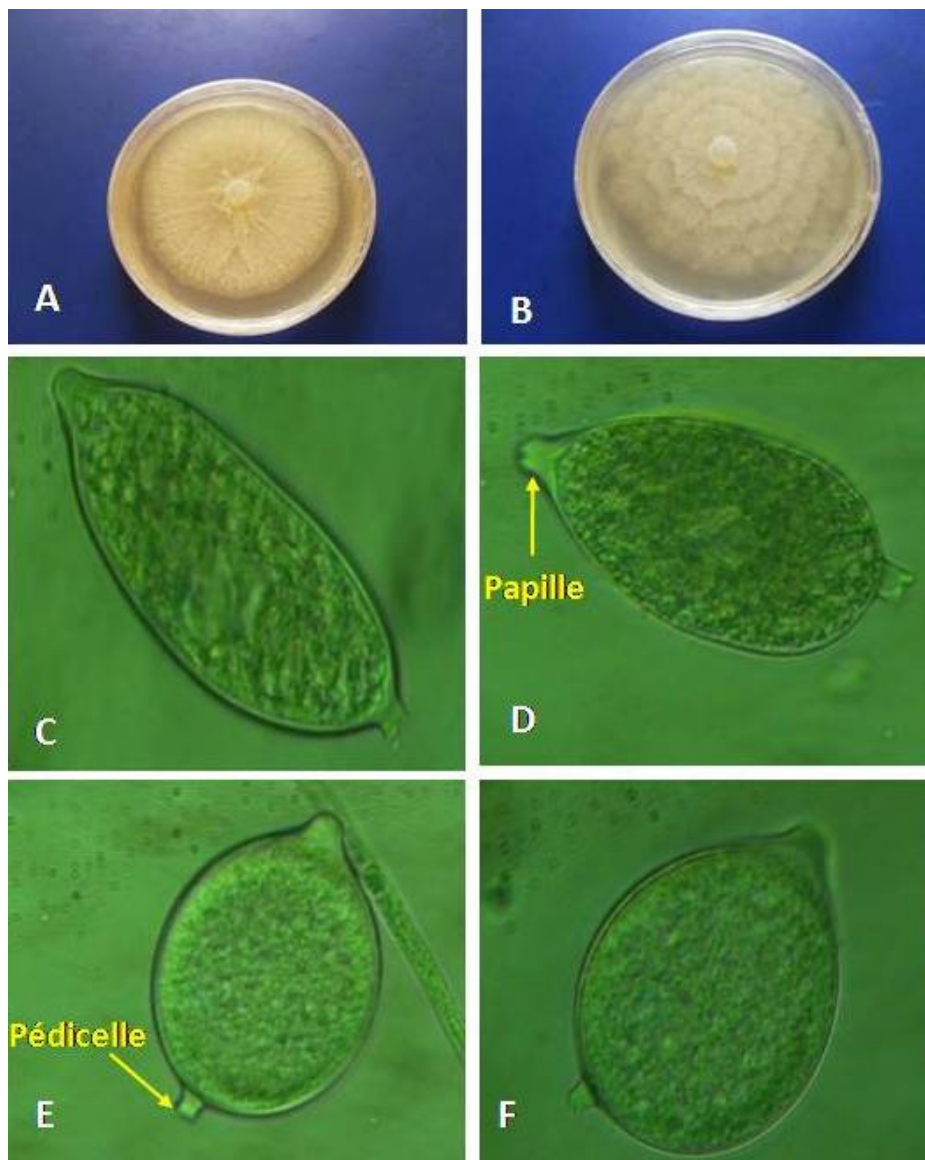


Figure 1 : Caractéristiques morphologiques des isolats de *Phytophthora* du verger cacaoyers de Côte d'Ivoire (grossissement X 400)

A- Colonie à faciès radié, strié et stellé à front de croissance régulier, B- Colonie à faciès radié, strié et pétaloïde à front de croissance festonné, Forme des sporanges : C- ellipsoïde ; D- obpyriforme ; E- ovoïde ; F- ovoïde-obpyriforme

La longueur et la largeur moyenne des sporanges des isolats de *Phytophthora* variaient de 33,25 à 55,00 μm de long et de 21,99 à 34,37 μm de large. La longueur totale moyenne pour tous les isolats de *Phytophthora* était de

49,81 \pm 6,60 μm de long et la largeur totale était de 29,36 \pm 3,82 μm . Le rapport L/l de l'ensemble des isolats de *Phytophthora* étudiés se situait entre 1,23 et 1,94 avec un rapport moyen de 1,72 \pm 0,25 (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractères morphométriques des sporanges des isolats de *Phytophthora* spp étudiés

Nombre isolats	Code isolats	Longueur moyenne (L) sporocyste (μm)	Largeur moyenne (l) sporocyste (μm)	Longueur moyenne pédicelle (μm)	Rapport (L/l)
1	MAF 12.8	55,00 \pm 6,2	30,21 \pm 2,47	3,36 \pm 1,31	1,82 \pm 0,17
2	DIV 39.4	33,25 \pm 4,67	21,99 \pm 3,09	3,12 \pm 0,92	1,53 \pm 0,22
3	DIV 39.7	50,41 \pm 7,59	27,04 \pm 3,73	2,32 \pm 1,04	1,88 \pm 0,27
4	DIV 43.3	50,99 \pm 6,22	28,35 \pm 3,27	2,43 \pm 0,96	1,81 \pm 0,21
5	DIV 39.5	51,86 \pm 7,16	28,66 \pm 4,53	2,69 \pm 1,13	1,84 \pm 0,30
6	DIV 41.1	52,01 \pm 8,90	26,92 \pm 3,80	2,59 \pm 1,36	1,94 \pm 0,27
7	MAF 17.3	50,27 \pm 7,53	26,97 \pm 2,95	2,80 \pm 1,33	1,87 \pm 0,22
8	MAF 16.1	49,30 \pm 5,57	32,14 \pm 5,67	3,17 \pm 1,55	1,57 \pm 0,29
9	AGB 53.1	49,81 \pm 7,88	29,68 \pm 4,05	2,89 \pm 1,15	1,70 \pm 0,31
10	AGB 54.1	50,99 \pm 5,72	30,31 \pm 3,85	2,68 \pm 1,03	1,70 \pm 0,23
11	AGB 53.3	52,44 \pm 7,45	31,51 \pm 3,82	3,10 \pm 1,46	1,68 \pm 0,27
12	AGB 49.2	46,79 \pm 6,01	27,50 \pm 3,69	2,52 \pm 0,8	1,71 \pm 0,18
13	AGB 48.8	49,45 \pm 7,38	28,90 \pm 6,03	3,43 \pm 1,27	1,75 \pm 0,31
14	AGB 48.1	45,92 \pm 5,22	33,40 \pm 3,68	3,72 \pm 1,28	1,39 \pm 0,20
15	AGB 50.3	43,36 \pm 5,77	31,78 \pm 4,13	2,70 \pm 1,07	1,37 \pm 0,14
16	AGB 51.1	46,79 \pm 6,18	28,11 \pm 3,28	3,33 \pm 1,47	1,69 \pm 0,31
17	DUK 23.1	50,61 \pm 5,50	29,82 \pm 2,51	2,61 \pm 1,08	1,70 \pm 0,19
18	DUK 20.1	52,20 \pm 8,26	30,50 \pm 4,64	3,34 \pm 1,49	1,74 \pm 0,32
19	DUK 20.3	53,96 \pm 7,28	28,20 \pm 2,62	2,87 \pm 1,3	1,92 \pm 0,26
20	DUK 21.2	52,30 \pm 6,07	29,24 \pm 3,21	3,68 \pm 1,39	1,80 \pm 0,24
21	DUK 19.4	48,53 \pm 7,20	27,99 \pm 4,20	2,95 \pm 1,52	1,76 \pm 0,30
22	DUK 16.2	49,93 \pm 6,61	29,53 \pm 3,13	3,05 \pm 1,19	1,70 \pm 0,23
23	DUK 19.3	46,50 \pm 6,86	27,33 \pm 4,49	3,36 \pm 1,47	1,73 \pm 0,29
24	DUK 14.1	52,37 \pm 5,36	27,84 \pm 1,91	3,16 \pm 1,61	1,88 \pm 0,17
25	SBR 113.7	52,35 \pm 7,67	31,34 \pm 3,63	3,19 \pm 1,33	1,68 \pm 0,24
26	SBR112.6	51,33 \pm 8,08	29,80 \pm 4,03	3,03 \pm 1,39	1,74 \pm 0,27
27	SBR 114.1	39,01 \pm 6,17	32,34 \pm 5,50	3,24 \pm 1,27	1,23 \pm 0,21
28	SP 103.1	51,28 \pm 3,62	28,28 \pm 3,66	2,61 \pm 0,86	1,83 \pm 0,20
29	SP102.1	51,72 \pm 4,54	29,56 \pm 2,48	2,47 \pm 0,96	1,76 \pm 0,14
30	SP 103.3	40,60 \pm 8,28	24,51 \pm 4,47	3,02 \pm 1,05	1,67 \pm 0,29
31	SBR 88.1	48,87 \pm 5,42	28,76 \pm 5,03	2,80 \pm 1,14	1,73 \pm 0,27
32	MEA 95.4	53,55 \pm 7,80	30,18 \pm 3,35	3,20 \pm 1,14	1,80 \pm 0,32
33	SBR 112.9	51,23 \pm 10,53	29,07 \pm 6,09	2,91 \pm 1,13	1,78 \pm 0,38
34	AKR 10.2	52,20 \pm 6,07	30,74 \pm 4,98	2,85 \pm 1,3	1,75 \pm 0,39
35	BON 2.6	51,74 \pm 5,56	30,16 \pm 3,53	3,20 \pm 1,33	1,73 \pm 0,23
36	ABS 11.4	50,27 \pm 8,49	32,58 \pm 4,84	2,78 \pm 0,94	1,55 \pm 0,25
37	BON 2.1	52,93 \pm 7,75	30,04 \pm 3,74	2,64 \pm 1,18	1,78 \pm 0,26
38	AYA 5.7	54,28 \pm 7,60	28,47 \pm 2,75	3,44 \pm 1,38	1,92 \pm 0,33
39	AKR 7.4	49,69 \pm 6,09	28,81 \pm 4,53	2,80 \pm 1,32	1,75 \pm 0,28
40	AYA 5.4	49,69 \pm 6,17	29,53 \pm 4,05	2,49 \pm 1,34	1,70 \pm 0,24

Tableau 1 : Caractères morphométriques des sporanges des isolats de *Phytophthora* spp étudiés (suite)

Nombre isolats	Code isolats	Longueur moyenne (L) sporocyste (µm)	Largeur moyenne (l) sporocyste (µm)	Longueur moyenne pédicelle (µm)	Rapport (L/l)
41	BON 2.5	43,07 ± 4,69	27,43 ± 3,24	2,35 ± 1,08	1,58 ± 0,19
42	ISS 11.3	54,71 ± 8,82	28,41 ± 3,36	3,12 ± 0,99	1,94 ± 0,31
43	ZOU 3.1	49,13 ± 6,00	34,37 ± 6,02	3,09 ± 1,37	1,46 ± 0,21
44	BOU 26.1	49,98 ± 7,18	30,26 ± 4,96	2,79 ± 1,42	1,67 ± 0,21
45	ISS 12.1	52,64 ± 6,17	31,42 ± 3,61	2,24 ± 1,09	1,69 ± 0,21
46	SAI 83.1	51,19 ± 6,39	28,03 ± 2,35	2,41 ± 0,95	1,83 ± 0,21
47	BOU 26.3	52,73 ± 6,72	30,55 ± 3,93	2,76 ± 1,09	1,75 ± 0,27
48	SAI 85.1	48,82 ± 4,47	27,26 ± 3,75	2,71 ± 0,87	1,81 ± 0,24
49	ISS 13.3	48,67 ± 6,82	31,51 ± 4,29	3,12 ± 1,21	1,56 ± 0,22
50	BOU 26.4	53,94 ± 4,46	30,64 ± 0,25	2,99 ± 1,18	1,78 ± 0,25
Moyenne		49,81 ± 6,60	29,36 ± 3,82	2,92 ± 1,18	1,72 ± 0,25

Analyse moléculaire des isolats de *Phytophthora* spp

L'amplification des extraits d'ADN des 50 isolats de *Phytophthora* spp avec la paire d'amorces universelles ITS1 et ITS4 a produit des fragments d'ADN dont la taille approximative était de 900 pb (Figure 2A). Cette valeur a été confirmée par le calcul de la somme des différents fragments de restriction générés par les enzymes de restriction utilisées. Les régions ITS de tous les isolats ont été digérées par les enzymes de restriction (*AluI*, *MspI*, *HinfI* et *PvuII*) ce qui indique que les régions ITS des isolats de *Phytophthora* spp étudiés contiennent des sites de reconnaissance pour ces enzymes. Dans l'analyse des profils de restriction, seule l'enzyme *HaeIII* a généré un fragment de restriction (900 pb) qui était équivalent à la taille approximative du fragment non digéré des régions ITS des isolats de *Phytophthora* spp. L'analyse des profils de restriction obtenus a permis de déterminer le nombre et la taille des fragments générés par chaque enzyme. Ainsi, après digestion, les enzymes

MspI et *PvuII* ont reconnu un seul site de restriction sur le génome de l'ADN en générant deux fragments de restriction de tailles respectivement estimées à 600 ; 300 pb et 700 ; 200 pb (Tableau 2). La digestion des régions ITS avec l'enzyme *AluI* a produit trois fragments dont la somme des fragments digérés était inférieure à la taille des fragments de produit PCR- RFLP (tableau 2). Les profils de restriction générés par les enzymes de restriction sur la base du nombre et des tailles de restriction ont permis d'identifier avec succès les isolats de *Phytophthora* spp étudiés. Dans notre étude, chaque enzyme de restriction a généré des profils qui étaient fortement similaires pour tous les isolats étudiés ce qui indique une relation génétique très étroite entre les isolats éprouvés. Les résultats de l'analyse morphologique et moléculaire ont confirmé la présence de *Phytophthora palmivora* comme l'espèce la plus dominante du verger cacaoyers ivoirien bien que *P. megakarya* ait été récemment découverte dans l'Est du verger cacaoyers.

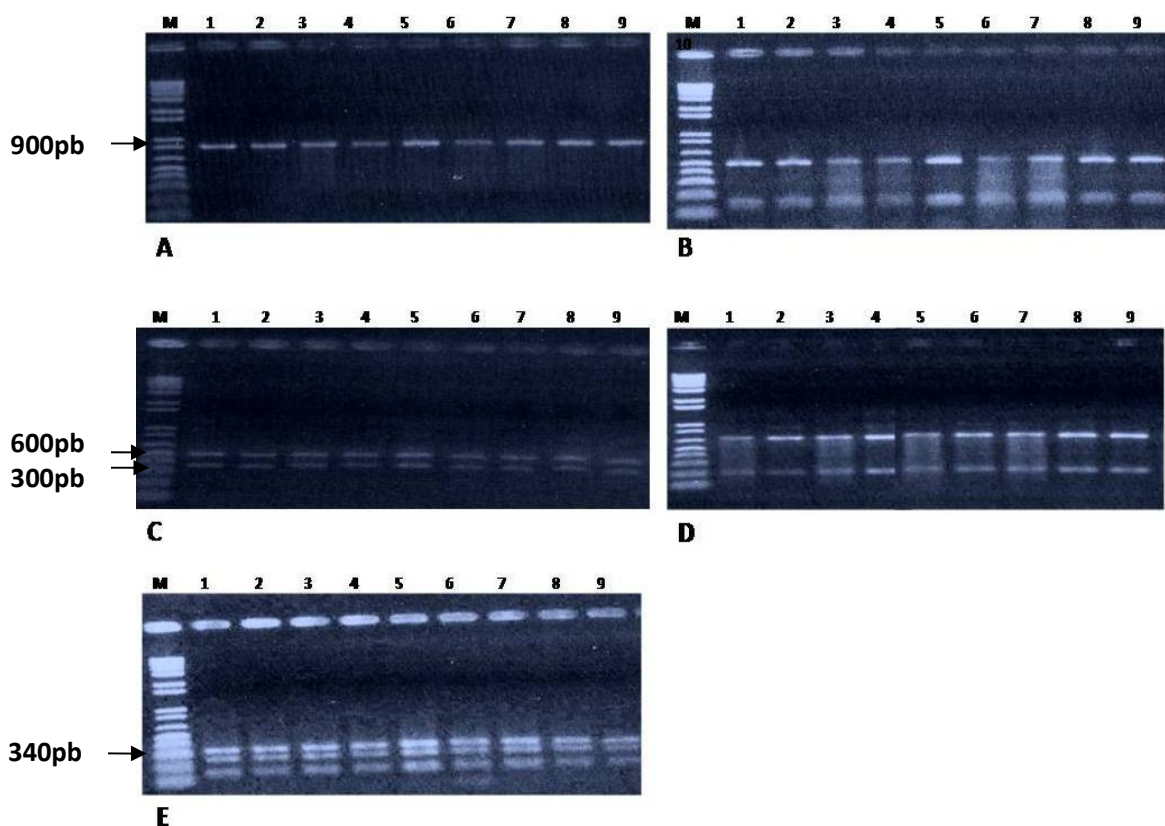


Figure 2 : Profils PCR-RFLP des isolats de *Phytophthora* spp après digestion par les enzymes de restriction *HaeIII* (A) ; *AluI* (B) ; *MspI* (C) ; *PvuII* (D), *HinfI* (E).

Tableau 2 : Tailles estimées des fragments de restriction PCR-RFLP des isolats de *Phytophthora* spp

Enzymes	Taille approximative (pb) produits ITS-PCR	Taille des fragments (pb) PCR-RFLP obtenus avec les enzymes de restriction
<i>HaeIII</i>	≈ 900	900
<i>MspI</i>	≈ 900	600 ; 300
<i>PvuII</i>	≈ 900	700 ; 200
<i>AluI</i>	≈ 900	520 ; 170 ; 150
<i>HinfI</i>	≈ 900	340 ; 260 ; 170 ; 130

DISCUSSION

Les résultats des descripteurs morphocultureux et morphométriques, des isolats de *Phytophthora* spp ont montré une variation significative au niveau des caractères morphologiques asexués. Les isolats étudiés ont présenté sur milieu de culture des faciès culturaux caractéristiques avec un thalle à faciès variant de radié et stellé à pétaloïde, à mycélium aérien moyennement abondant et à front de croissance régulier ou festonné.

Ces isolats de *Phytophthora* étaient caractérisés par des sporanges caducs de forme ellipsoïde à ovoïde avec une papille proéminente. La longueur et la largeur moyenne des sporanges se situaient entre 33,25 - 55,00 µm de long et 21,99 à 34,37 µm de large et emportaient un pédicelle court (longueur <5 µm) avec un rapport longueur/largeur variant de 1,23 à 1,94. L'ensemble des valeurs morphométriques obtenues sont corroborées avec

des études antérieures qui ont montré que les sporanges des isolats de *Phytophthora palmivora* sont caducs avec un pédicelle (< 5 µm) et varient considérablement en taille dont la longueur et la largeur moyenne sont comprises respectivement entre 40 – 60 X 20 - 35 µm avec un rapport L/l variant de 1,4 à 2 (Ho, 1990 ; Erwin et al., 1996 ; Pongpisutta , 2004). Semangun (2000), a rapporté que les sporanges de *Phytophthora palmivora* de forme ellipsoïde à ovoïde avaient une taille qui variait de 30 - 60 µm de long et de 20 - 40 µm de large dont le rapport longueur/largeur variait de 1,6 à 2,0. Ces variations de tailles moyennes observées entre ces résultats seraient dues à l'hôte, à l'âge de la culture, et aux conditions environnementales (Waterhouse, 1974 ; Holliday, 1980, Erwin et al., 1996 ; Drenth et al., 2001). Tous les isolats de *Phytophthora* dont les caractères morphologiques sont évalués ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Phytophthora palmivora* selon la clé taxonomique de Waterhouse. Selon certains auteurs (Drenth et al., (2001), Martin et al., (2004), Ivors et al., (2004)) ; les caractères phénotypiques asexués sont des indicateurs d'identification des *Phytophthora* du fait de leur variation phénotypique et du chevauchement de certains caractères morphologiques. Dès lors, la technique moléculaire PCR-RFLP développée au cours des 10 dernières années (Cooke & Duncan, 1997, Appiah et al., 2003, Bowman et al., 2007,) a été utilisée pour une identification fiable des isolats. Dans nos expériences, pour tous les isolats étudiés, des fragments d'ADN d'environ 900 pb ont été amplifiés avec les amorces universelles ITS1/ITS4 et aucune variation de longueur n'a été observée pour les régions ITS amplifiées ce qui signifie qu'aucun événement (délétion/insertion) majeur ne semble avoir intervenu dans les régions intergéniques amplifiées. La taille des brins d'ADN obtenue correspondait à celle attendue des régions ITS de

CONCLUSION

Il ressort de notre étude que la technique PCR-RFLP a été plus discriminante par rapport aux méthodes traditionnelles pour caractériser et identifier les isolats de *Phytophthora* spp. En effet, l'évaluation des caractères morphologiques repose sur des valeurs moyennes. De nombreux chevauchements, dus aux écarts des mesures de ces caractères morphologiques peuvent conduire à des erreurs d'identification ou à des identifications imprécises. De plus, la majorité des caractères morphologiques sont variables selon l'environnement et

Phytophthora palmivora tel que rapporté par Umayá (2004). Dans notre étude, l'analyse de restriction des régions ITS avec les enzymes de restriction a montré que les isolats étudiés étaient génétiquement identiques indépendamment de leur origine géographique. Dans l'analyse de restriction seule l'enzyme *HaeIII* a généré un fragment de restriction qui était équivalent à la taille approximative du fragment non digéré des régions ITS. Ce résultat est corroboré par les travaux de Ristaino et al., (1998) ; dans lesquels l'analyse du profil de restriction révélé par l'enzyme *HaeIII* a permis d'identifier *P. palmivora* parmi neuf autres espèces de *Phytophthora*. L'enzyme de restriction *AluI*, a généré des fragments dont la somme des fragments de restriction était inférieure (520 ; 170 ; 150 pb) à la taille des fragments des produits PCR (900 pb), ceci pourrait être attribué à la difficulté de visualiser les fragments de moins de 50 pb ou à la migration des fragments de même taille sur le gel. La seconde raison possible pourrait être due à la perte de petits fragments pendant l'électrophorèse sur le gel. Des résultats analogues ont été obtenus par Appiah et al., (2003) et Ernesto (2009). Les profils de bandes générés par la PCR-RFLP sur la base des fragments et des tailles de restriction ont permis d'identifier *Phytophthora palmivora* à partir des isolats étudiés. Cependant, aucun polymorphisme n'a été observé au niveau des profils de restriction ; ceci ; reflète la forte conservation de la structure nucléotidique des régions ITS entre les populations de cette espèce. Des résultats similaires ont été obtenus par Steven et al., (1992) ; Ristaino, et al., (1998) et Martin et al., (2004) dans lesquels, l'analyse de l'ADN nucléaire par la technique PCR-RFLP a montré une forte variation interspécifique entre différentes espèces de *Phytophthora* due au faible ou à l'absence de polymorphisme au sein de chaque espèce.

les milieux de culture employés. Les résultats montrent que la technique PCR-RFLP est un moyen rapide sélectif et fiable dans l'identification des *Phytophthora* spp. En outre, cette méthode peut être utilisée comme outil de prévention et de gestion dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses. Cependant, d'autres études complémentaires telles que le séquençage de l'ADN doivent être menées afin de révéler une éventuelle variation génétique au sein de l'espèce.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Appiah A A, 2001. Variability of *Phytophthora* Species Causing Black Pod Disease of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) and Implications for Assessment of Host Resistance. London, UK: University of London, PhD thesis
- Appiah AA, Flood J, Archer A, & Bridge PD. 2003. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. *Plant Pathol.* 53:209-219.
- Assoumou J, 1997. *L'économie du Cacao*. Paris, France : Delarge
- Babacauh K.D., 1980. Structure et dynamique des populations de *Phytophthora* sp. Parasite du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Paris –Sud, centre d'Orsay, 153 p.
- Berry, D., Cilas, C., 1994. Etude génétique de la réaction à la pourriture brune des cabosses chez des cacaoyers (*Theobroma cacao* L.) issus d'un plan de croisement diallèle. *Agronomie* 14, 599–609.
- Bowman K.D, Albrecht U, Graham JH & Bright DB 2007 Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora* in citrus roots using PCR-RFLP in comparison with other methods. *Eur J Plant Pathol* 119: 143–158
- Brasier C.M, Griffin M.J, 1979. Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. *Transactions of the British Mycological Society* 72, 111–43.
- Brasier, C. M. 1991. Current questions in *Phytophthora* systematics: The role of the population approach. In *Phytophthora* (J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw, and L. R. Cooke, Eds.), pp. 104–128. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Brasier, C. M., Cooke, D. E. L., and Duncan, J. M. 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5878–5883
- Cooke, D. E. L., and Duncan, J. M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 101: 667–677
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM, 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30,17–32.
- Dakwa JT, Danqua O.A, Opoku I.Y, Attafuah D.O 1988. Frequency of application trial. *Rep.Cocoa Res. Inst., Ghana, 1987/88*, pp. 98-99.
- Duan, C.H., Riley, M.B. and Jeffers, S.N. 2008. Characterization of *Phytophthora cinnamomi* populations from ornamental plants in South Carolina, USA. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41(1):14-30.
- Drenth, A. and B. Sendall 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia. 41 pp
- Ernesto R. C. 2009. Diseases of floriculture crops in South Carolina: evaluation of a pre-plant sanitation treatment and identification of species of *phytophthora* Graduate School of Clemson University Thesis 119 p.
- Ersek T., Schoelz J.F., English J.T., 1994: PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2616-2621.
- Erwin, D.C. and Ribiero, O.K. 1996. *Phytophthora* diseases world-wide. American Phytopathological Society. St Paul. 562p.
- Förster H, Kinscherf TG, Leong SA, Maxwell DP, 1989. Restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial DNA of *Phytophthora megasperma* isolated from soyabean, alfalfa and fruit trees. *Canadian Journal of Botany* 67, 529–37.
- Förster H, Cummings MP, Coffey MD, 2000. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS1 DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse group V and VI. *Mycological Research* 104, 1055–61.
- Gallegly, M. E., and Hong, C. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press, St. Paul, MN.
- Hansen, E. M., and Maxwell, D. P. 1991. Species of the *Phytophthora megasperma* complex. *Mycologia* 83: 376–381.
- Hardham AR, Suzaki E, Perkin JL, 1986. Monoclonal antibodies to isolate species, and genus specific components on the surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi*. *Canadian Journal of Botany* 64, 311–21.
- Ho, H. H. 1990. Taiwan *Phytophthora*. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 31, 89-106.
- Holliday, P. 1980. *Fungus Diseases of Tropical Crops*. London, Cambridge Univ. Press., 607p.

- ICCO, 1998. *ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, Vol. XXIV, No. 3. London, UK: International Cocoa Organization
- Islam, S. Z., Babadoost, M., Lambert, K. N., Ndeme, A., and Fouly, H. M. 2004. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. *Plant Dis.* 89:191- 197.
- Ivors K.L., Hayden K.J., Bonants P.J.M., Rizzo D.M., Garbelotto M., 2004. AFLP and phylogenetic analyses of North American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Mycol Res* 108, 378-392
- Kaosiri T, Zentmyer GA, 1980. Protein, esterase, and peroxidase patterns in the *Phytophthora palmivora* complex from cacao. *Mycologia* 72, 988-1000
- Lee, S. B., and Taylor, J. W. 1992. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *J. Mol. Evol.* 9:636-653.
- Lebot V., Herail C., Gunua T., Pardales J., Prana M., Thongjiem M. and Viet N. 2003. Isozyme and RAPD variation among *Phytophthora colocasiae* isolates from South-east Asia and the Pacific. *Plant Pathology* 52, 303-313
- Luterbacher ML, Akrofi AY 1993. The current status and distribution of *Phytophthora megakarya* in Ghana. In: Proceedings of the 11th International Cocoa Research Conference, Yamoussoukro, Cote D'Ivoire, pp. 57-58.
- Martin, F. N. and P. W. Tooley. 2004. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of a polymerase chain reaction amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology* 94:983-991
- Mills, S. D., Forster, H., and Coffey, M. D. 1991. Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analysis. *Mycol. Res.* 95: 31-48.
- Mpika J. 2010. Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères et mises en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) en Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Cocody-Abidjan, 259 p.
- Opoku IY, Appiah A.A, Akrofi AY, Owusu GK 2000. *Phytophthora megakarya*: a potential threat to the cocoa industry in Ghana. *J. Agri. Sci.* 33: 237-248.
- Ortiz Garcia C. F. 1996. Etude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogens du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L). Thèse de Doctorat de l'université Paul Sabatier, 85 p.
- Oudemans, P., and Coffey, M. D. 1991. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 95: 1025-1046.
- Pongpisutta, R. and Sangchote, S. 2004. Morphological and Host Range Variability in *Phytophthora palmivora* from Durian in Thailand in :Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia ACIAR Monograph 114.
- Ristaino, Jean B. Michael Madritch, Carol L. Trout, and Gregory Parra 1998. PCR Amplification of Ribosomal DNA for Species Identification in the Plant Pathogen Genus *Phytophthora* *American Society for Microbiology.*, Vol. 64, No. 3: 948-954
- Sansome E, Brasier CM, Griffin MJ, 1975. Chromosome size differences in *Phytophthora*, a pathogen of cocoa. *Nature* 225, 704-5.
- Schlick A, Kuhls K, Meyer W, Lieckfeld E, Borner T, Messner K, 1994. Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in fungal DNA, implications for the identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 26, 74-8.
- Semangun, H. 2000. Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia. Yogyakarta, Gadjah Mada University Press.
- Shaw, D.S, 1991. Genetics. In: Ingram, DS, Williams, PH, eds. *Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato*. London: Academic Press, 131-70.
- Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. and Hall, G. S., 1990. Revised tabular key to the species of the *Phytophthora*, *Mycological papers* 162, CAB International Mycological Institute, Kew, London, p. 28
- Steven B. Lee and John W. Taylor 1992 Phylogeny of Five Fungus-like Protist *Phytophthora* Species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA' *Biol. Ewl.* 9(4):636-653. 1992

- Umaya A. 2004. Keragaman Genetik *P. palmivora* pada Kakao di Indonesia Berdasarkan Pendekatan Molekuler. Disertasi. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor. *Menara Perkebunan*, 74(2), 75-85
- Van D. V. H. 1997. Strategies of variety improvement in cocoa with emphasis on durable disease resistance. International Crop for Genetic Improvement of Cocoa, pp.9-18.
- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. *Mycological Papers* 92: 1-22
- Waterhouse, G.M. 1974. *Phytophthora palmivora* and some related species. In Gregory P.H. (ed.). *Phytophthora* Disease of Cocoa. London, Longman p. 51-70.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J.W. Taylor 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.) PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications. New York, Academic Press Inc. p. 315-322.