

Caractérisation morphologique, pathologique et moléculaire des isolats de *Phytophthora* sp responsable de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire

FOFANA Balakissa¹, CAMARA Braïma¹, TUO Seydou¹, SILUE Nakpalo¹, AMARI Ler-N'ogn Dadé Georges Elisée¹, KONE Daouda¹, ZOUZOU Michel¹

Abstract

Black pod rot, caused by the fungus *Phytophthora* sp. remains the most important and most damaging cocoa pod disease in Côte d'Ivoire with an estimated loss of production of between 30 and 40%. This work is part of the morphological and molecular characterization of strains of *Phytophthora* sp and the pathogenicity test of these strains. After purification and morphological characterization of the isolates, diagnostic and sequencing PCRs were performed with the primers *P. palmivora*, *P. megakarya*, ITS4 and ITS5 for the identification of the isolates. The sex sign of the isolates was identified. Finally, a pathogenicity test was performed with these identified isolates. The results of the PCR showed that the isolates from the south-eastern region of Côte d'Ivoire are *Phytophthora palmivora* mating type A2. Sequencing also showed that these isolates were 100% similar to the species *P. palmivora*. The pathogenicity of the *P. palmivora* strains tested on the leaves of cocoa clones showed a significant difference in the level of aggressiveness between the strains and the clones. Average aggressiveness scores ranged from 2.20 to 3.37 between strains of *P. palmivora* and from 2.03 to 3.87 in cocoa clones.

Keywords : Cocoa trees, PCR, *Phytophthora* spp, Black pod rot, pathogenicity, Sequencing

Résumé

La pourriture brune, causée par le champignon *Phytophthora* sp., demeure la maladie des cabosses de cacaoyers la plus importante et la plus dommageable en Côte d'Ivoire, avec une perte de production estimée entre 30 et 40 %. Des études pour la caractérisation morphologique et moléculaire des souches de *Phytophthora* sp et du test de leur pouvoir pathogène a été entreprise. Treize isolats ont été identifiés sur cinquante au cours de cette étude. Après purification et caractérisation morphologique des isolats, des PCR de diagnostic et de séquençage ont été réalisées avec les amorces *P. palmivora*, *P. megakarya*, ITS4 et ITS5 pour l'identification des isolats. Le test du pouvoir pathogène des souches de *P. palmivora* sur feuilles de clones de cacaoyers a montré une différence significative du niveau d'agressivité entre les souches et les clones, avec des notes moyennes d'agressivité variant de 2,20 à 3,37 entre les souches de *P. palmivora* et de 2,03 à 3,87 entre les clones de cacaoyers. Les résultats des PCR ont montré que les isolats issus de la région Sud-Est de la Côte d'Ivoire sont des *Phytophthora palmivora* de type sexuel A2. Le séquençage a montré que ces isolats étaient similaires à 100 % à l'espèce *P. palmivora*.

Mots clés : Cacaoyers, PCR, *Phytophthora* spp., pourriture brune, pouvoir pathogène, Séquençage

1 UPR d'Agrophysiologie et Pathologie Végétale, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët Boigny de Cocody, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire
Email auteur : balakisfof@yahoo.fr / +2250708633210

Introduction

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) appartient à la famille des Malvaceae. C'est une des plantes les plus importantes des systèmes agroforestiers tropicaux (Motamayor *et al.*, 2008). Il est cultivé pour ses fèves qui sont utilisées en chocolaterie, en cosmétique, en pharmacie etc (Barrel, 2009). La production mondiale est estimée à 4,726 millions de tonnes dont 76,1 % provenant de l'Afrique et la Côte d'Ivoire, premier producteur mondial depuis 1970, a fourni à elle seule 2,150 millions de tonnes en 2020/2021 (ICCO, 2021). Toutefois, la production de fève est menacée par les effets conjugués des facteurs biotiques et abiotiques (Jagoret, Bastide et Deheuvelds, 2014). Parmi les facteurs biotiques, la pourriture brune des cabosses est la maladie cryptogamique la plus importante, la plus répandue et la plus dommageable dans le monde avec une perte de production estimée à 30 voire 60 % (Akaza M *et al* 2009 ;Berry et Cilas, 1994 ; Kébé B.I., 1999 et Opoku *et al.*, 2000). En Côte d'Ivoire où la production est assurée majoritairement par les petits producteurs dont les exploitations familiales varient entre 1 et 15 ha, les rendements qui sont de l'ordre de 400 à 500 Kg/ha, tendent à baisser sous l'influence de la pourriture brune des cabosses. Les pertes de production estimées entre 20 et 45 %, peuvent atteindre 60 % en absence de protection phytosanitaire (Coulibaly *et al.*,

2017). Les espèces impliquées dans la pourriture des cabosses en Côte d'Ivoire, sont *Phytophthora palmivora* et de plus en plus *Phytophthora megakarya*. Toutefois, *P. megakarya* est l'espèce la plus agressive avec des pertes de production allant de 80 à 100 % (Nyassé *et al.*, 1995 ; Pohe, 2013). Face à cette menace, plusieurs stratégies de lutte ont été menées à savoir, la lutte génétique (utilisation de variétés résistantes à *P. palmivora* non durable en générale), les pratiques culturales (les récoltes sanitaires, la taille, etc.), la lutte chimique (utilisation de fongicides de synthèse) et la lutte biologique avec l'utilisation d'antagonistes naturels et des plantes à effets pesticides (Mpika *et al.*, 2009 ; Pohé *et al.*, 2013 ; Gadji *et al.*, 2015 ; Ngoh *et al.*, 2015). Cependant, l'utilisation des produits chimiques de synthèse demeure la plus pratiquée. Pendant des décennies en effet, les fongicides chimiques ont fait leur preuve à travers le contrôle de la pourriture brune des cabosses au champ et ont permis aux producteurs d'accroître leur revenu. Pour autant, ce moyen de lutte s'avère onéreux et néfaste sur l'environnement, la biodiversité et la santé de l'homme, d'où l'urgence de recherche de méthodes alternatives. Cette dernière pourrait être l'utilisation des plantes à effets pesticides, associée à la lutte intégrée. Il va donc sans dire que la maîtrise des doses d'application de ces biofongicides est primordiale et impose au préalable une connaissance parfaite de l'identité des espèces de *Phytophthora* spp. En Côte d'Ivoire, très peu d'études sur la

caractérisation moléculaire de *Phytophthora* spp ont été réalisées malgré l'existence de technique fiable. C'est pour ces raisons, que cette étude s'inscrit dans le cadre de la caractérisation morphologique et moléculaire des isolats de *Phytophthora* spp à partir de marqueurs moléculaires ITS4 et ITS5 et du test de leur pouvoir pathogène.

Matériel et Méthodes

L'objectif principal de cette étude réside essentiellement dans l'identification morphologique, pathologique et moléculaire des souches isolées sur les cabosses de cacaoyer. Telle que formulée, cette quête nous a donc logiquement conduit à faire des tests pathologiques, des extractions d'ADN, des PRC de diagnostic avec des amorces spécifiques *P. palmivora* et *P. megakarya* d'une part pour identifier l'espèce de *Phytophthora* spp collectée en Côte d'Ivoire et d'autre part, une PCR de séquençage avec des amorces ITS4 et ITS5 pour identifier les espèces de nos champignons pathogènes. À terme, l'identification des souches s'avèrera être une étape décisive dans la suite de nos travaux de thèse en l'occurrence pour le choix de produits biologiques formulés (mais aussi, les doses et la fréquence d'application adéquate) comme moyens de lutte alternative efficace et écologique contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer au champ.

Zone d'échantillonnage

Les échantillonnages ont été réalisés principalement dans sept localités de la région de l'Agnéby-Tiassa : Agboville, Grand Morié, Rubino, Céchi, Loviguié, Oress-Krobou et Azaguié. Cette région est située dans le Sud forestier de la Côte d'Ivoire (6°Nord - 4°Ouest). C'est une zone humide dont l'altitude varie entre 0 et 200 m avec une pluviométrie annuelle comprise entre 1400 et 2500 mm et une température moyenne de 29° C. Le sol est argileux et de type ferrallitique faiblement désaturé. Les plantations sont vieillissantes de tradition en plein soleil et caractérisées par une forte pression de la pourriture brune des cabosses (Halle et Bruzon en 2006).

Matériel végétal

Dans cette étude, le pouvoir pathogène a été testé sur 11 clones de cacaoyer qui présentent différents niveaux de résistance aux *Phytophthora* spp: (clone1), clone2 (serre expérimentale du Cirad), le ATP120 (Papouaisie Nouvelle Guinée), GU230 B, GU230 C (Guyanais), VEN4.4, VEN4.2 (Venezuela), EPL40 B, PINA, GF23 et GUI38 A (Guyanais Français).

Matériel fongique pathogène

Le matériel fongique pathogène était constitué de 14 isolats de *P. palmivora* isolés sur cabosses infectées dans les plantations villageoises en Côte d'Ivoire (Tableau 1).

Tableau 1 : Dosage de l'ADN

Numéro des souches	Quantité d'ADN (ng/μl)
AZAP34	350
AZAP40	429
RUBP3	329
LOVP47	249
AZAP46	492
LOVP30	313
CECP4	368
GRMP38	378
AGBP48	368
AZAP37	200
AGBP25	416
CECP7	418
AZAP32	358

Méthodologie

Echantillonnage, isolement et purification des isolats de *Phytophthora* spp.

Echantillonnage : Il a été fait en Juin-Juillet 2017 puis en Septembre-Octobre 2018 dans les sept localités de la région d'Agnéby-Tiassa. Dans chacune des sept localités, trois cabosses vertes immatures atteintes de pourriture brune ont été prélevées dans cinq champs, soit au total 210 échantillons. Les coordonnées géographiques de chaque site ont été relevées.

Isolement :

L'agent pathogène (*Phytophthora* spp.) a été isolé sur un milieu de culture eau gélosée à 11 %. La cabosse infectée est lavée à l'eau de robinet. La partie nécrosée est nettoyée avec l'alcool à 90 %. Ensuite, un fragment de forme cubique est prélevé au front de croissance de la pourriture c'est-à-dire entre la partie de cabosse infestée et la partie saine. Trois fragments ont été alors placés sur le milieu de culture, puis incubés à 26 °C à l'obscurité pendant 4 jours. Après la formation du thalle, un fragment mycélien est prélevé sur le front de croissance et placé sur le milieu de culture petit-pois gélosé (Huguenin et Boccas, 1971) pour la purification de la souche. Après isolement 50 isolats ont été transférés à Montpellier pour caractérisation moléculaire. Seulement 13 souches de *Phytophthora* spp ont été caractérisées à cause de la non spécificité du marqueur moléculaire.

Culture mono-zoospore des isolats de *Phytophthora* spp.

Les isolats ont été cultivés sur un milieu V8 agar. L'incubation a été effectuée dans l'obscurité totale à 26 °C pendant 4 jours et les boîtes de Pétri ont ensuite été exposées à une photopériode de 12 heures pendant 7 jours pour induire la formation de sporocystes. Afin de provoquer la libération des zoospores par des sporocystes mûres, les cultures ont été inondées chacune de 10 ml d'eau distillée stérile et placées au réfrigérateur (4 °C) pendant 15 minutes. Les cultures ont ensuite été ramenées à la température ambiante du laboratoire (26 °C) pendant 2 heures. La suspension de zoospores obtenue a été comptée avec une cellule de Malassez. La concentration de 50 à 60 zoospores ml⁻¹ a été obtenue par dilution successive d'une partie aliquote dans laquelle les zoospores étaient immobilisées par deux gouttes d'acide chlorhydrique à 10 %. Cent microlitres de la suspension ont été étalés sur un milieu d'agar dilué à l'eau à 1,5 % à l'aide d'une tige de verre courbée, préalablement flammée et refroidie dans de l'eau distillée stérile. L'incubation a été effectuée à l'obscurité à 26 °C pendant 12 à 24 heures. Après incubation, les zoospores germées ont été collectées individuellement sous une loupe binoculaire avec une aiguille à micropointe stérile, puis ensemencées dans un milieu de culture de carotte gélosé à raison de trois mono-zoospores par isolat. Après 7 jours d'incubation dans l'obscurité à 26 °C, le faciès des fils identique au faciès parental a été sélectionné pour des études ultérieures.

Caractéristiques morphologiques de *Phytophthora* spp

Détermination du signe sexuel

La détermination du signe sexuel des isolats de *Phytophthora* spp., a été faite dans le but d'identifier la distribution des signes sexuels dans les différentes parcelles prospectées. Elle a été réalisée sur un milieu de culture carotte gélosé. Le procédé consistait à mettre en confrontation deux isolats de

Phytophthora spp purifiés dans une même boîte de Pétri. Les isolats ont été séparés de 6 cm. Les cultures ont ensuite été incubées à l'obscurité pendant 10 jours à 25 °C. L'un des isolats, de signe sexuel était inconnu provenant de la Côte d'Ivoire, est mis en confrontation avec l'un ou l'autre des deux isolats de la collection du CIRAD, NS269 qui est une souche de *P. megakarya* de type sexuel A1 provenant du Cameroun et Tri1 de type sexuel A2, provenant de Trinidad et Tobago. Les observations au microscope optique ont porté sur la présence ou l'absence d'oospores en rapport avec le type de signe sexuel.

Caractéristiques moléculaires de *Phytophthora* spp.

Mise en culture, extraction et dosage de l'ADN

Les isolats ont été transférés au laboratoire du CIRAD en France pour analyse. Les extractions d'ADN ont été menées en suivant les étapes fournies dans le protocole d'extraction d'ADN version CTAB (Cétyl triméthylammonium bromide) décrit par Murray & Thompson (1980), Chandellier (1995) et Vroh Bi *et al.* (1996). L'ADN génomique total obtenu a été dilué à l'eau distillée pour l'amplification par PCR. Les différentes étapes pour l'extraction sont les suivantes: la digestion de la paroi par le tampon de digestion, l'extralyse, la lyse des cellules par le cétyl triméthylammonium bromide (CTAB), la purification par le CIAA, la précipitation par l'isopropanol, le lavage avec l'éthanol et la récupération de l'ADN dans l'eau distillée. L'ADN obtenu a été dosé à l'aide d'un Nanodrop 2000.

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) de l'ADN

Après dosage, un volume V_x d'ADN de la solution mère a été prélevé dans chaque échantillon pour constituer des aliquotes concentrés à 20 ng/ μ l dans les tubes Eppendorf (par exemple préparer les solutions d'ADN de 20 ng/ μ l, une plaque = 100 échantillons, 3 μ l/PCR). Le volume V_x d'ADN à prélever dépend de la concentration obtenue après dosage.

Deux PCR ont été réalisées au cours de cette étude. La première avec les amorces ITS_5F GGAAGTAAAAGTAACAAGG ; MEG_651R CCATAGCAGGGAAAAACGCC ; et PALM_651R ACCACAGCTGAAGAAATATT pour le diagnostic de *P. palmivora* et *P. megakarya* et la seconde avec les amorces ITS5-F GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGG et ITS4-R TCCTCCGCTTATTGATATGC pour le séquençage des souches de *P. palmivora*, les amorces marquées (Forward), à 10 nmol et fournies sous forme lyophilisée ont été diluées comme décrit par White *et al.*, 1990, Cooke and Duncan, 1997; Cooke *et al.* 2000). Les PCR ont été réalisées dans un volume réactionnel de 40. Le même Mix a été réalisé pour le diagnostic de *P. palmivora* et *P. megakarya* avec cette fois un volume réactionnel de 25 μ l. L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur Eppendorf (Biometra, An Analytic Jena Company).

Le séquençage

Les séquences simples brins obtenues lors du séquençage avec les amorces ITS4 et ITS5 ont été corrigées à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel Codoncode Aligner afin de nettoyer les séquences. La recherche de similarité dans les régions ITS4 et ITS5 du génome a été réalisée en utilisant le logiciel BLAST dans la banque de gènes NCBI. Les isolats ont été comparés à ceux énumérés dans la banque de données GenBank du Centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les recherches

effectuées par BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) au NCBI fournissent la liste des résultats probables correspondant à notre séquence, avec les valeurs de similarités des séquences. Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées dans les banques internationales. BLAST détecte de courts segments qui sont localement homologues à la séquence inconnue (Altschul *et al.*, 1997). Les résultats des comparaisons de séquences sont présentés sous forme du ratio d'homologie entre les séquences obtenues et les séquences de référence les plus proches.

Étude du pouvoir pathogène des souches de *P. palmivora* sur feuilles détachées de cacaoyer

Préparation d'inoculum de *Phytophthora palmivora* et dispositif expérimental

Des cultures de *P. palmivora* âgées de 7 sept jours sont repiquées sur milieu V8 contenant du bétasistostérol pour la formation des zoospores. Après quatre jours d'incubation à l'obscurité, ces cultures sont exposées à la lumière continue pendant sept jours permettant ainsi au champignon de former les sporocystes. Les zoospores ont été obtenues après un choc thermique. En effet, les suspensions de zoospores ont été préparées par l'ajout de 10 ml d'eau distillée stérile dans chaque culture de *P. palmivora*. Les boîtes de Pétri ont été mises au réfrigérateur à 4°C pendant 15 minutes, puis laissées à la température ambiante du laboratoire pendant 2 heures. Les zoospores présentes dans l'inoculum ont été calibrées à 3. 10⁵ spores/ml à l'aide d'une cellule de Malassez.

Des mousses imbibées d'eau distillée stérile ont été disposées dans des plateaux pour maintenir l'humidité. Sur ces mousses six feuilles de chaque clone ont été disposées selon un sens bien défini. Il est à noter que chaque plateau contenait un clone de six feuilles en randomisation totale et sur chaque feuille 10 μ l d'inoculum de toutes les souches de *P. palmivora* ont été inoculés sur la face inférieure de la feuille à l'aide d'une micropipette calibrée à 10 μ l. L'inoculum d'une souche a été appliqué deux fois sur chaque feuille aux extrémités gauche et droite de la nervure principale de la feuille. Les inocula étaient disposés de part et d'autre de la nervure principale. Les plateaux ont été recouverts, scellés puis incubés à l'obscurité à 25 °C. Cette expérience a été répétée 3 fois dans le temps pour six souches de *P. palmivora* et pour les 8 autres souches une répétition a été réalisée.

Évaluation des lésions de pourriture brune sur feuilles détachées de cacaoyer au 3^e et 7^{ème} jour et analyse statistique

L'évaluation des taches de pourriture brune sur les feuilles inoculées par la suspension de zoospores a été réalisée aux, troisième et septième jour à l'aide de l'échelle 0-5 de notation développée par Nyassé *et al.*, 1995 : 0 (absence de symptôme), 1 (très petites taches nécrotiques), 2 (plus grand nombre et taille nécrotique ou taches brunes), 3 (coalescence de taches brunes en lésions de taille moyenne), 4 (grandes lésions brunes uniformes et 5 (très grosses lésions brunes).

Résultats

Caractérisation morphologique et moléculaire de *P. palmivora*

Les résultats sur gel d'électrophorèse sont le reflet de la bonne amplification des ADN par la PCR. La première PCR réalisée

avec les amorces ITS_5F GGAAGTAAAAGTAACAAGG ; MEG_651R CCATAGCAGGGAAAAACGCC ; et PALM_651R ACCACAGCTGAAGAAATATT pour le diagnostic de *P. palmivora* et *P. megakarya* a été positive avec l'amorce *P. palmivora* et négative avec celle de *P. megakarya*. En effet, sur les 15 échantillons déposés sur le gel, seul le gel 1 contenant l'amorce *P. megakarya* (témoin) a été amplifié et aucune amplification n'a été faite avec les autres échantillons de *Phytophthora*. Par contre, tous les échantillons ont été amplifiés avec l'amorce *P. palmivora* hormis l'échantillon P40. Les fragments générés par l'amorce ITS *palmivora* et les 12 échantillons de *Phytophthora* spp avaient une taille approximative de 850 paires de bases. Ce qui signifie que les 13 souches de *Phytophthora* sont des *palmivora* (Figure 1). L'analyse des produits PCR sur gel d'agarose des amorces ITS4-R TCCTCCGCTTATTGATATGC et ITS5-R GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG pour le séquençage des souches de *Phytophthora* spp, a montré que l'ADN de toutes ces souches a été amplifié comparativement au témoin négatif. Le gel a révélé des bandes de poids moléculaire de 850 paires de base pour le *Phytophthora* spp (Figures 2 et 3).

La comparaison des séquences d'ADN avec celles des banques de donnée GENBANK (tableau 2), montre une similarité de 100 % avec les séquences nucléotidiques étudiées et indiquent *Phytophthora palmivora* comme le plus similaire aux isolats.

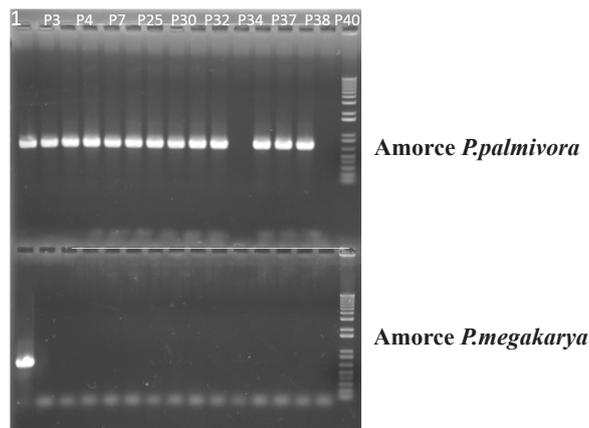


Figure 1 : Gel d'agarose contenant des échantillons pour le diagnostic de *Phytophthora* spp

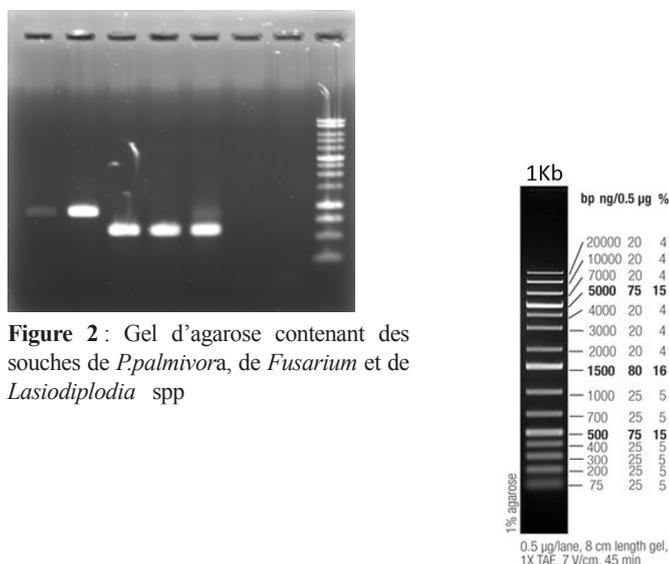


Figure 2 : Gel d'agarose contenant des souches de *P.palmivora*, de *Fusarium* et de *Lasiodiplodia* spp

Figure 3 : Marqueur de poids moléculaire Promega (1kb)

Tableau 2 : Séquences d'ADN de *Phytophthora palmivora*, issues des vergers de cacao

Localités	Codes isolats	Séquences	Espèces	Référence GENBANK
Azaguié	AZAP34	Seq1	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 1
Azaguié	AZAP40	Seq2	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 2
Rubino	RUBP3	Seq3	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 3
Loviguié1	LOVP47	Seq4	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 4
Azaguié	AZAP46	Seq5	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 5
Loviguié1	LOVP30	Seq6	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 6
Céchi	CECP4	Seq7	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 7
Grand-Morié	GRMP38	Seq8	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 8
Agboville	AGBP48	Seq9	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 9
Azaguié	AZAP37	Seq10	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 10
Agboville	AGBP25	Seq11	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 11
Céchi	CECP7	Seq12	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 12
Azaguié	AZAP32	Seq13	<i>Phytophthora palmivora</i>	KU308392 13

Test du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de 13 souches de *P. palmivora* testé sur feuilles de 12 clones de cacaoyer au laboratoire a montré une différence significative du niveau d'agressivité entre les souches et les clones pour six souches testées (Tableau 3). En effet, les feuilles inoculées avec les suspensions de zoospores de *P. palmivora* ont présenté des taches brunes, symptômes provoqués par *Phytophthora palmivora*. Les notes moyennes d'agressivité ont varié de 2,20 à 3,37 entre les souches de *P. palmivora* et de 2,03 à 3,87 dans les clones de cacaoyers. La souche P47 s'est montrée la plus agressive et le clone GU230C est le plus sensible (Figures 4 et 5). Pour les huit autres souches, aucune différence significative n'a été observée entre elles et entre les clones et les notes moyennes ont variées de 1,82 à 2,85 pour les souches et de 0,24 à 3,61 pour les clones (Tableau 4).

Tableau 3 : Notes moyennes d'agressivité de 6 souches de *P. palmivora* en fonction de 7 clones de cacaoyer

Clones de cacaoyer	Souches de <i>P. palmivora</i>						Moyenne clones
	P3	P4	P32	P37	P46	P47	
clone1	2.47±0.38ab	3.3 ±0.43ab	2.83±0.58ab	3.60±0.56ab	2.50±0.50ab	3.40±0.53ab	3.01
clone 2	2.11±0.40ab	2.19±0.37ab	2.27±0.50ab	3.55±0.43ab	1.97±0.47ab	2.91±0.46ab	2.50
GU230B	1.87±0.31ab	2.64±0.25ab	2.50±0.10ab	2.72±0.22ab	2.20±0.28ab	3.25±0.29ab	2.53
GU230C	3.22±0.41ab	3.58±0.44ab	4.33±0.24b	3.9 ±0.16ab	3.70±0.27ab	4.45±0.18ab	3.87
VEN42	1.08±0.27a	1.97±0.37ab	2.12±0.34ab	2.50±0.35ab	1.83±0.35ab	2.70±0.46ab	2.03
VEN44	2.9 ±0.39ab	3.91±0.34ab	3.37±0.42ab	3.56±0.33ab	3.43±0.41ab	4.14±0.42ab	3.56
ATP20	1.7±0.26ab	2.12±0.35ab	2.21±0.31ab	2.72±0.42ab	2.12±0.34ab	2.77±0.43ab	2.27
Moyenne souches	2.20	2.81	2.80	3.23	2.53	3.37	
P<0,005	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

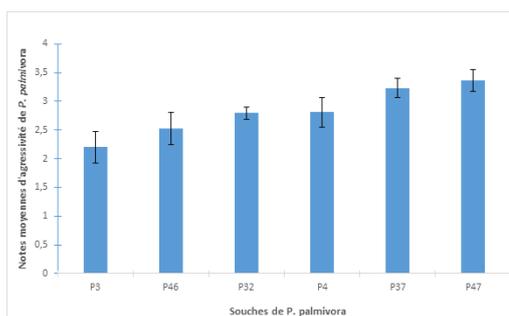


Figure 4 : Sensibilité foliaire de 7 clones de cacaoyers vis-à-vis de 6 souches de *P. palmivora*

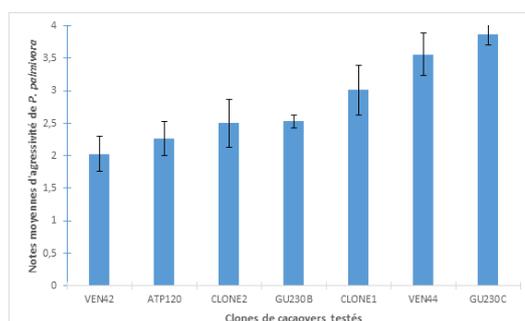


Figure 5 : Sensibilité foliaire de sept clones de cacaoyers vis-à-vis de *P. palmivora*

Tableau 4 : Notes moyennes d'agressivité de 8 souches de *P. palmivora* en fonction de 7 clones de cacaoyer

Clones	Souches de <i>Phytophthora palmivora</i>									Moyenne clone
	P7	P25	P30	P33	P34	P35	P38	P46		
GU138A	3± 0,56	2,66 ± 0,54	2,58 ± 0,61	3,5 ± 0,53	3,5 ± 0,68	1,66 ± 0,52	1,75 ± 0,68	2,75 ± 0,72		3,05
GF23	1,66 ± 0,58	2,08 ± 0,8	2,08 ± 0,66	3,33 ± 0,6	2,16 ± 0,27	2,33 ± 0,72	2,25 ± 0,33	3,25 ± 0,49		2,39
PINA	2,75 ± 0,7	2,91 ± 0,67	3,25 ± 0,66	4 ± 0,36	4,08 ± 0,35	3,5 ± 0,63	2,91 ± 0,62	3,916 ± 0,41		3,41
EPL40B	2 ± 0,53	1,91 ± 0,45	2,91 ± 0,62	3,6 ± 0,44	3,25 ± 0,57	2,75 ± 0,51	2,58 ± 0,32	3,66 ± 0,49		2,83
ATP120	0,5 ± 0,12	0,25 ± 0,17	0,5 ± 0,18	0,16 ± 0,10	0,08 ± 0,0	0,08 ± 0,8	0 ± 0	0,41 ± 0,15		0,24
VEN42	2 ± 0,73	3,58 ± 0,71	3,58 ± 0,53	4,5 ± 0,4	4,33 ± 0,49	3,4 ± 0,53	3,75 ± 0,79	3,75 ± 0,62		3,61
GU230C	0,83 ± 0,27	1,91 ± 0,66	1,5 ± 0,25	3 ± 0,31	2,25 ± 0,25	2,5 ± 0,4	1,7 ± 0,31	2,75 ± 0,21		2,05
Moyenne souche	1,82	2,18	2,34	3,15	2,8	2,31	2,13	2,95		

Discussion

Le dosage des ADN avec le NANODROP 2000 a montré qu'ils étaient purs et en quantité suffisante pour l'étude moléculaire. Cela confirme la pureté des cultures de champignon et confirme de ce fait la bonne qualité de la méthode d'extraction. Il est à noter que la pureté et la quantité de l'ADN extrait dépend non seulement de la pureté de la culture du champignon mais également de la méthode d'extraction utilisée. La pureté de l'ADN a été mise en évidence par SUONG Malina en 2011. En effet, cet auteur a montré que les carpophores des champignons trop anciens n'étaient pas purs et en quantité insuffisante pour l'analyse moléculaire contrairement aux carpophores des champignons jeunes.

L'amplification des produits PCR sur gel d'agarose avec les amorces ITS4 et ITS5 a montré des amplifiats de 850 paires de base pour *Phytophthora* spp avec le marqueur de poids moléculaire 1kb Promega. Ce qui signifie que les 13 souches de *Phytophthora* sont des *palmivora*. La PCR de contrôle réalisée avec les amorces *P. palmivora* et *P. megakarya* a révélé que les souches provenant de la Côte d'Ivoire étaient toutes des *P. palmivora*. Cette hypothèse a été confirmée par le séquençage des séquences ITS de ces souches. La comparaison a montré que les souches P3 et P4 sont similaires à 100% à *P. palmivora* isolée sur cacaoyer en Taiwan par Ann *et al.*, 2009 (WWW.NCBI). Nos résultats corroborent ceux de Inès Nelly Moussavou, 2021. Cet auteur a utilisé les marqueurs moléculaires ITS spécifiques aux basidiomycètes pour identifier les champignons responsables de la carie des arbres au Gabon. En effet les séquences d'ADN correspondaient aux espèces de champignons polypores appartenant aux ordres des Hymenochaetales et Polyporales associées aux polypores responsables de la carie des arbres sur pied. Aussi, Coulibaly *et al.* (2018), ont montré que les séquences des souches provenant de la Côte d'Ivoire étaient similaires avec un taux de 97% comparées à celles présentes dans les banques de données. Les résultats des travaux de recherche menés par Appiah *et al.* (2003) ont confirmé un degré de similitude élevé dans la région ITS1 entre les différentes espèces étudiées. Par exemple, les régions ITS1 de *P. capsici* et *P. citrophthora* ne différaient que de 21 bases. Les séquences des deux souches de *P. palmivora* P3 et P4 sont identiques. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'il n'existe pas de variabilité interspécifique ou très peu entre les espèces pour les amorces ITS. Le marqueur de poids moléculaire a généré 850 paires de base alors qu'on s'attendait à 900 paires de base pour *P. palmivora*. Cette différence serait probablement liée à une délétion ou à une perte des fragments. Des résultats similaires ont été trouvés par Ristaino *et al.* (1998). En effet, l'identification des espèces du genre *Phytophthora* sp par PCR des ADN ribosomique, a permis d'identifier *P. palmivora* parmi neuf autres espèces de *Phytophthora*

Les *Phytophthora* spp notamment *P. palmivora* et *P. megakarya* sont des organismes diploïdes, hétérothalliques pouvant se multiplier par voie sexuée ou asexuée (Attard *et al.*, 2008). La formation de oospores après le test de croisement entre les 14 souches de *Phytophthora* spp et la souche de référence NS269 de type sexuel A1 megakarya a révélé que les 14 souches sont de type A2 et sont de ce fait des *P. palmivora*. Nos résultats sont similaires à ceux de AMANI en 2017 dont l'étude a révélé l'existence de deux types sexuels (A1 et A2) au sein de la population étudiée. Les travaux de Campbell et Carter (2006) et de Harutyunyan *et al.* (2008) ont montré que les hétérothalliques produisent des gamétanges mâles (anthéridie) et femelles (oogone). Ces derniers fusionnent et produisent des oospores qui sont des structures à parois épaisses, capables dans la nature, de résister aux conditions extrêmes et à l'absence prolongée d'hôte.

Le pouvoir pathogène des 14 souches de *P. palmivora* testé au laboratoire sur feuilles de 12 clones de cacaoyer, a montré une différence significative (seuil de 5 %) du niveau d'agressivité entre les souches et entre les clones pour 6 souches de *P. palmivora*. Pour les huit autres souches, aucune différence significative (seuil de 5 %) n'a été observée entre les souches et entre les clones.

Cette étude a montré trois groupes de souches ayant un niveau d'agressivité différent selon les clones. Le premier groupe présente une note moyenne d'agressivité entre 1,08 et 1,5 (pas agressif), le deuxième entre 1,5 et 4,14 (agressif) et le troisième entre 4,33 et 4,45 (très agressif). Cette variation d'agressivité a été remarquée parmi les souches isolées sur cabosses dans les parcelles et/ou localités différentes ou identiques. Ces résultats sont en concordance avec les travaux antérieurs (Nyassé *et al.*, 1995 ; Iwaro *et al.*, 1998 ; Coulibaly *et al.*, 2018) qui ont montré que des groupes de niveau d'agressivité différents pouvaient être observés chez *P. palmivora*.

Conclusion

Cette étude a permis de connaître l'identité des souches et leur niveau d'agressivité vis-à-vis des clones de cacaoyers. Elle vient confirmer la présence de *P. palmivora* dans la région Sud-Est de la Côte d'Ivoire. Les résultats ont permis de mettre en évidence des souches de *Phytophthora palmivora* de type sexuel A2. Par ailleurs, les tests de pathogénicité ont montré que les souches de *P. palmivora* sont agressives ou très agressives selon les clones.

Remerciements

Cette étude a été financée par la banque mondiale à travers le Centre d'excellence Africain en Changement climatique, Biodiversité et Agriculture Durable (CEA-CCBAD) et aussi par l'Agence Universitaire de la Francophonie (L'AUF) et l'Institut de la Recherche pour le Développement (L'IRD) à travers le projet PARFAO (Promouvoir l'agroécologie à partir de la Recherche et la Formation en Afrique de l'Ouest). Nous leur remercions toute notre gratitude.

Références bibliographiques

- Akaza M.J., N'goran J.A. K., N'guetta S. P. A., Kébé B. I., Thai G. M. and Sangare A. (2009). Resistance to *P. palmivora* (Butler) Butler assessed on Leaf Discs of cocoa (*Theobroma cacao* L) hybrid trees. *Asian Journal of Plant Pathology*: 3(4) : 106-118.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and

- PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25,3389-402.
- AMANI Y. F. C. (2017). Distribution géographique des espèces de *Phytophthora* spp. agents de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) dans cinq départements de l'ouest de la Côte d'Ivoire. Mémoire de Master de Biotechnologie – Biosécurité – Bioressources, UFR Biosciences, université Félix Houphouët – Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 63 p.
- Appiah A. A., Flood J., Archer A., and Bridge P.D. (2003). Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. *Plant Pathol.* 53, 209-219.
- Attard A., Gourgues M., Galiana E., Panabieres F., Ponchet M. and Keller H. (2008). Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *J Plant Physiol*, 165, 83-94.
- Barrel M. (2009). Le cacaoyer. [auteur du livre] Collectif. *Le memento de l'agronome*. p 1617.
- Berry D. and 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 diallele. *Agronomie* 14, 599–609.
- Blaha G., Eskes A. B., Kebe B. I., Tahi G. M. and Nyasse S. (2000). Early screening of resistance to *Phytophthora* spp. by means of disc inoculation. In: Eskes A.B and Efron Y., Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI Project workshop on working procedures for cocoa germplasm evaluation and selection. 1-6 February 1998. Montpellier (France), 103-107.
- Campbell L. T. and Carter D. A. (2006). Looking for sex in the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Fems Yeast Research*, 6:588-598.
- Chandellier A. (1995). Structure du génome mitochondrial de l'épicéa commun (*Picea abies* L. Karst) lors de l'embryogenèse somatique in vitro. Thèse Doct. Sci. agron. Gembloux, Fac. univ. Sci. agron. 240 p.
- Cooke D. E. L. and Duncan J. M. (1997). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycol. Res.* 101:667-677.
- Coulibaly K., Kébé B.I., Aka A.R., Kouakou K., N'Guessan W.P., Tahi G.M., Kassin K.E., Guiraud S.B., Assi M.E., Koné B., N'Guessan K.F. (2017). Bien lutter contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer en Côte d'Ivoire. Fiche technique cacaoyer n° 6. Centre National de Recherche Agronomique, 2p.
- Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M., Wagels G. and Brasier C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genet Biol.*30: 17-32.
- Coulibaly K., Aka R. A., Camara B., Kassin E., Kouakou K., Kebe B. I., Koffi N. K., Tahi M. G., Walet N. P., Guiraud S. B., Assi M. E., Kone B., N'guessan K. F. and Kone D. (2018). Molecular Identification of *Phytophthora palmivora* in the Cocoa Tree Orchard of Côte d'Ivoire and Assessment of the Quantitative Component of Pathogenicity, *International Journal of sciences*. 7: 2305-3925.
- Dabo S.M., Mitchel E.D. and Melcher U. (1993). A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. *Ann. Biochem.*210, p. 34–38.
- Gadji A. A. G., Yapo O. B., Abo K., Coulibaly K., Kebe B. I., Gnepe J. R. and Tyagi R. D. (2015). In vitro assessment of biopesticide bacillus thuringiensis var. Kurstaki hd- 1 effectiveness on *Phytophthora palmivora*, agent of cocoa black pod rot in Côte d'Ivoire. *European Scientific*,11 (21):1857- 7431.
- Harutyunyan S. R., Zhao Z., Den Hartog T., Bouwmeester K., Minnaard A. J., Feringa B. L. and Govers F. (2008). Biologically active *Phytophthora* mating hormone prepared by catalytic asymmetric total synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8507-8512.
- Halle B. and Bruzon V. (2006). Profil Environnemental de la Côte d'Ivoire. Rapport final. Commission Européenne, offre de service dans le secteur de la coopération relatif au : Contrat Cadre EuropeAid/119860/C/SV/Multi Lot 6 : Environnement Pays Bénéficiaire : Côte d'Ivoire Lettre de Contrat N°2006/119741/1.
- Huguenin B. and Boccas B. (1971). Rôle de quelques facteurs dans la formation et la germination des zoospores chez le *Phytophthora palmivora* Butl. *Annales de Phytopathologie* 3,353–71.
- ICCO. (2021). ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLXII, No. 1, Cocoa Year 2020/21 London, UK: International Cocoa Organization, 1p.
- Inès N. M. (2021). Les champignons endophytes et ceux associés aux caries des arbres et du bois mort de *Julbernardia bifoliolata*, *Desbordesia glaucescens* et *Scyphocephalium ochococa* dans les forêts du Sud-est du Gabon. Thèse de Doctorat en sciences forestières de l'université LAVAL Québec, Canada, 341 p.
- Iwaro A. D., Sreenivasan T. N. and Umaharan P. (1998). Cacao resistance to *Phytophthora*: effect of pathogen species, inoculation and pod maturity. *European Journal of Plant Pathology*,104 : 11-15.
- Kebe B. I. (1999). Rapport Annuel d'Activité 1998, Programme Café- Cacao- Cola, CNRA, Côte d'Ivoire, 39 p.
- Motamayor J. C., Lachenaud P., Da Silva e Mota J. W., Loor R., Kuhn D. N., Brown S.J. and Schnell R.J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3 (10): e3311. doi: 10.1371/journal.pone.0003311.
- Murray M. and Thompson W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.*8, p. 4321–4325.
- Mpika J., Kebe I.B., Druzhinina I. S., Komon-Zélazowska M., Kubicek C.P. and Aké S. (2009). Inhibition de *Phytophthora palmivora*, agent de pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire, par *Trichoderma* sp. *Sciences & Nature*, 6. (1) : 49-62.
- Ngho Dooh J.P., Ambang Z.B., Ndongo W.N., Kuete Tueguem A.H. and Ntsomboh N. G. (2015). Development of Cocoa Black Pod Disease (Caused by *Phytophthora megakarya*) in Cameroon when Treated with Extracts of *Thevetia peruviana* or Ridomil. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 2 (3) : 47-59.
- Nyassé S., Cilas C., Hérail C. and Blaha G. (1995). Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma*

cacao L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. *Crop Protection*, 14 (8) : 657-663.

PATRICK J., PHILIPPE B. AND OLIVIER D. (2014). PRODUCTION DURABLE DE CACAO. S'INSPIRER DE L'AGROFORESTERIE. PERSPECTIVE, CIRAD 42, RUE SCHEFFER 75116 PARIS. FRANCE, P 5.

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.

Pohe J., Koula J., Rabe G. R., Dezai L R. (2013). Agressivité de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer dans le sud-est de la Cote d'Ivoire. *Journal of Animal et Plant Sciences.* 20:(2): 3126-3136.

Pohe J. (2013). Sources d'inoculum primaire de *Phytophthora katusurae* (Ko et Chang) agent de la pourriture du coeur et des noix immatures du cocotier en Côte d'Ivoire. *Journal of Animal et Plant Sciences.* 16 : (3). 11 p.

Ristaino J.B., Madritch M., Truot C.L. and Parra G. (1998). PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 : 948-954.

SUONG M. (2011). Caractérisation moléculaire des ITS des champignons dégradant les bois de Guyane. Rapport de stage CIRAD,34398, Montpellier Cedex 5- France, 47 p.

Vroh Bi I., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai G. and Du Jardin P. (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant. Breed.*115, p. 205–206.

White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Dans : PCR protocols: a Guide to Methods and Applications, (eds.) Innis M.A., Gelfand D. H., Sninsky J.J. et White T.J. Academic Press Inc., San Diego, Californie, 315-322.