

## Effet de la salinité sur la croissance et l'agressivité *in vitro* de *Phytophthora citrophthora*

El Guilli M.<sup>1</sup>, Besri M.<sup>2</sup>, Ibriz M.<sup>4</sup> et Farih<sup>3</sup> A.

<sup>1</sup> Programme National de Recherches sur les Agrumes INRA BP. 293 El Menzeh Kénitra, Maroc

<sup>2</sup> Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II Rabat, Maroc

<sup>3</sup> Département de Phytologie, INRA Kénitra, Maroc

<sup>4</sup> Faculté des Sciences de Kénitra

### Résumé

*Dans une expérience préliminaire, le rôle de la salinité sur le développement de la gommosse due à *Phytophthora citrophthora* a été démontré. La présente étude a pour objectif de vérifier si cette stimulation du développement de cette maladie était dû à une action du sel sur l'agent pathogène. Différents sels et potentiels osmotiques ont été comparés. Les résultats obtenus ont montré que l'addition des sels au milieu de culture stimule la croissance de *P. citrophthora*. Celle-ci est plus importante entre -1,44 bar et -3,11 bar. La croissance varie également en fonction du type de sels. Par ailleurs, les sels contenant dans leur molécule un ion Cl<sup>-</sup> stimulent l'agressivité de *P. citrophthora* évaluée sur feuilles détachées du Clémentinier.*

**Mots clés :** Salinité, *Phytophthora citrophthora*, croissance mycélienne

### Abstract : Effect of salinity on growth and pathogenicity of *phytophthora citrophthora*

*In a preliminary experiment, the role of salinity on *Phytophthora gommosis* development was demonstrated. The present study was undertaken in order to see if this disease development was caused by a direct effect of salinity on the *P. citrophthora*.*

*Different salts at different osmotic potentials were compared. The results obtained show that the addition of salts to culture medium enhances *P. citrophthora* growth. This varies with the nature of the salt used. The *P. citrophthora* growth was higher between -1,44 bar and -3,11 bar.*

*Salts containing Chloride ion enhanced disease severity evaluated on detached Citrus leaves.*

**Key words :** Salinity, *Phytophthora citrophthora*, growth

## ملخص : تأثير الملوحة على نمو فطر الفيتوفتورا

- الكيلي م.1، البصري م.2، إبريز م.4، فاريح ع.3 ،  
 1 المعهد الوطني للبحث الزراعي، البرنامج الوطني للبحث على الحوامض  
 2 معهد الحسن الثاني للزراعة والبيطرة  
 3 المعهد الوطني للبحث الزراعي، قسم الصحة النباتية، المنزه، قنيطرة  
 4 كلية العلوم بالقنيطرة

في تجربة سابقة تبين ان الملوحة ماء السقي تأثير على مرض الفيتوفتورا *Phytophthora* عند الحوامض. في هذا البحث كان الهدف هو معرفة هل هذا التأثير كان نتيجة لتأثير الملوحة على الفطر نفسه. النتائج بينت ان زيادة نسبة الملوحة تساعد على نمو هذا الفطر. هذا النمو يختلف حسب نوع الملح المستعمل. من جهة أخرى تبين ان الأملاح التي تحتوي على درة (كلور)  $Cl^-$  تساعد أكثر على إصابة الأوراق بتعفن الفيتوفتورا.

**الكلمات المفتاحية :** الملوحة، الفيتوفتورا

## Introduction

Parmi les maladies cryptogamiques du verger agrumicole marocain, les maladies causées par *Phytophthora spp.* sont les plus importantes (Vanderweyen, 1982; Serrhini, 1986). Ces agents pathogènes peuvent attaquer tous les organes de l'arbre, racines, tronc, fruits, feuilles et peuvent être responsables d'énormes dégâts.

Les *Phytophthora spp.* vivent à la fois dans les tissus des plantes et dans le sol.

La sévérité de leur attaque est, par conséquent, constamment soumise aux grandes variabilités du milieu édaphique, plus particulièrement, celles concernant la salinité du sol et des eaux d'irrigation (Macdonald, 1984 ; Ristaino et al., 1988; Swiecki et Macdonal, 1988).

Par ailleurs, l'addition du  $NaCl$  à l'eau d'irrigation prédispose les tissus des porte-greffes d'agrumes à une attaque sévère par ces agents pathogènes (El Guilli et al., 2000), Ceci pourrait être dû soit à une altération des mécanismes de défense de la plante ou à une stimulation de l'agressivité de l'agent pathogène plus particulièrement par l'ion  $Cl^-$ .

La présente étude vise à vérifier cette deuxième hypothèse en déterminant l'action directe des sels sur la croissance et l'agressivité de *P. citrophthora*.

## Matériel et méthodes

### Effet de la salinité du milieu de culture sur la croissance diamétrale (CD) de *P. citrophthora*

La souche de *P. citrophthora* utilisée a été isolée d'un cas de gombose sur le tronc d'un arbre d'agrumes dans la région du Gharb. Sa culture a été effectuée sur le milieu gélosé à base de pomme de terre (PDA). L'incubation a été faite à 25°C en obscurité pendant 7 jours (Matheron et Matejka, 1991; 1992).

L'évaluation de la croissance diamétrale est faite sur le milieu de Sommer et al. (1970) qui présente un potentiel osmotique de base de -1.2 bar.

Différents sels : KCl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> ont été utilisés, séparément et à différentes concentrations. Afin d'ajuster le milieu de culture aux potentiels osmotiques suivants : -1.44, -2.32, -3.11, -5 et -10 bar. La formule utilisée est celle décrite par Swart et al. (1992).

$$QT = QM + QS \quad (1)$$

où

QT : Potentiel osmotique total

QM : Potentiel osmotique du milieu de base

QS : Potentiel osmotique généré par l'addition d'une quantité donnée d'un sel X.

Pour avoir le potentiel osmotique total QT désiré dans le milieu de culture on calcule la quantité (S) de sel à ajouter de la manière suivante :

D'après l'équation(1)  $QS = QT - QM$

comme,  $QS = (S) \cdot 1,452 \cdot K$  (Boulaine, 1978)

avec  $K = 0,36$  pour NaCl et KCl

$K = 0,30$  pour Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; MgCl<sub>2</sub>; CaCl<sub>2</sub>

$K = 0,28$  pour MgSO<sub>4</sub>

Le pH du milieu est ajusté à 6.5 par addition de solutions de NaOH ou de HCl à l'aide d'un pH-mètre, après addition des sels et juste avant la stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

Pour chaque sel et chaque potentiel osmotique, quatre boîtes de Pétri contenant le milieu sont ensemencées par un disque de gélose de 6mm de diamètre, contenant le mycélium, prélevé sur une culture de *Phytophthora* âgée de 6 jours sur le milieu de Sommers et al. (1970). L'incubation des boîtes est faite dans l'obscurité à une température de 25°C. L'évaluation de la croissance est faite en mesurant quotidiennement deux diamètres perpendiculaires de la colonie pendant 7 jours (Sulistyowati et Keane, 1992). La croissance diamétrale finale (Df) est la moyenne des deux diamètres au 7ème jour.

Les boîtes de Pétri sont arrangées selon un dispositif de split-plot à 4 répétitions avec les sels dans les grandes parcelles et les potentiels osmotiques dans les petites parcelles. Pour faire ressortir l'effet du sel, l'analyse de la variance a porté sur la croissance diamétrale finale.

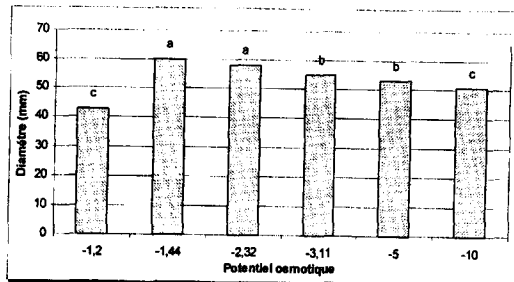
## Effet de la salinité sur l'agressivité de *P. citrophthora*

L'agressivité des souches qui se sont développées à différents niveaux de salinité du milieu de culture est évaluée en utilisant un test rapide sur feuilles uniformes de Clémentinier prises sur la dernière pousse d'un arbre situé dans le verger d'El Menzeh. Les feuilles sont lavées, séchées à l'air libre puis désinfectées à l'aide du coton imbibé d'ethanol. L'inoculation des feuilles est faite en utilisant les cultures de *Phytophthora* ayant servi pour l'évaluation de la croissance diamétrale. Ainsi, à l'aide d'une aiguille stérile des blessures sont effectuées au niveau du centre des feuilles. En suite, avec un emporte pièce de 6mm de diamètre, un disque de gélose issu d'une culture de *Phytophthora* est déposé sur la blessure. Pour chaque sel et chaque potentiel osmotique, trois feuilles sont inoculées. Elles sont ensuite déposées dans des boîtes de pétri contenant du papier filtre humide. Parallèlement, des feuilles témoins sont inoculées par des disques de gélose sans agent pathogène. L'incubation est faite à une température de 25°C et sous une photopériode de 12 heures. L'agressivité est évaluée par mesure de la surface nécrosée sur les feuilles après 3 jours d'incubation. Cette surface est exprimée en mm<sup>2</sup>.

## Résultats

### Effet de la salinité sur la croissance diamétrale de *P. citrophthora*

L'analyse de la variance de la croissance diamétrale (CD) montre que l'effet potentiel osmotique, l'effet sel et les interactions potentiel osmotique/sel sont hautement significatifs. Le comportement de *P. citrophthora* vis-à-vis du potentiel osmotique du milieu varie en fonction du sel. La comparaison des moyennes des croissances diamétrales montre que le CaCl<sub>2</sub> diffère significativement des autres sels utilisés (Figure 1). Ce sel a, en effet, favorisé une croissance diamétrale plus importante 62,75 mm pour tous les potentiels osmotiques.



**Figure 1.** Comparaison des moyennes des croissances diamétrales de *P. citrophthora* en fonction des différents sels.

les sels suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Duncan)

Le NaCl et le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , font partie du groupe de sels responsables d'une croissance diamétrale supérieure à celle enregistrée dans le milieu de culture témoin non additionné de sel qui est de 42.71 mm. Le KCl a donné une croissance de 47,02 mm qui ne diffère pas statistiquement du témoin.

Par ailleurs, la comparaison des moyennes des croissances diamétrales enregistrées sous différents potentiels osmotiques pour les 6 sels confondus (figure 2) permet de différencier trois groupes de potentiels osmotiques qui diffèrent significativement :

- Le premier groupe constitué de l'intervalle de -1.4 et -2.32 bar. Sous ces potentiels *P. citrophthora* a eu une croissance diamétrale importante.
- Le deuxième groupe est représenté par l'intervalle -3.11 et -5 bar avec une croissance diamétrale intermédiaire.
- Le troisième groupe constitué de -10 bar permet une croissance diamétrale semblable à celle du milieu de culture témoin dont le potentiel osmotique est de -1.2 bar.

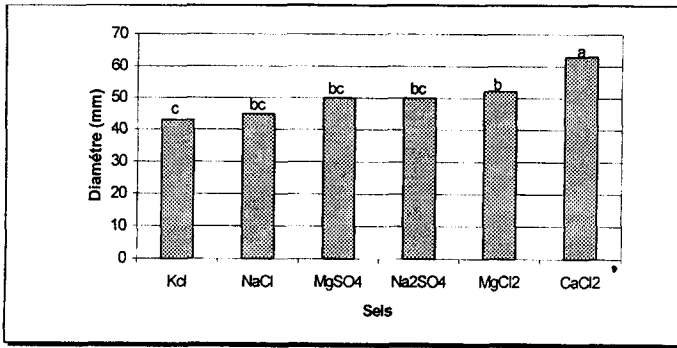


Figure 2. Comparaison des moyennes des croissances diamétrales de *P. citrophthora* en fonction des différents potentiels osmotiques

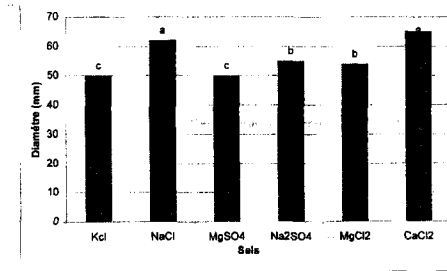
Les sels suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Duncan)

D'après la figure 2 on constate, en outre, que l'évolution de la croissance diamétrale de *P. citrophthora* en fonction du potentiel osmotique du milieu est ascendante, entre -1.2 et -2.32 bar, et qu'elle a une phase descendante, entre -2.32 et -10 bar (Figure 2). L'analyse de la variance de la croissance diamétrale au potentiel osmotique de -1.44 bar où la croissance diamétrale est importante (Figure 3) et à -5 bar où débute la phase descendante révèle qu'au niveau de ces deux potentiels, l'effet sel est significatif.

La comparaison des moyennes des croissances diamétrales des différents sels (Figure 3) montre que le NaCl et le  $\text{CaCl}_2$  forment un groupe homogène, distinct des autres sels. Ces deux sels semblent stimuler fortement la croissance diamétrale à -1.44 bar.

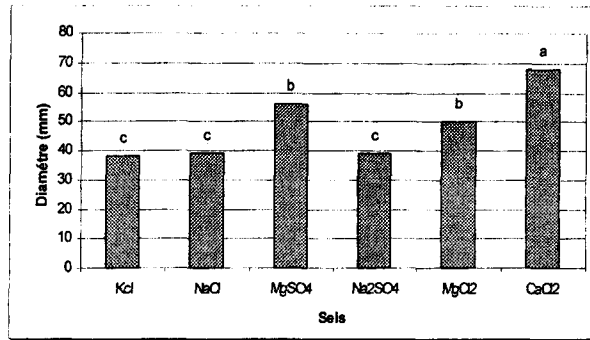
La comparaison des moyennes des croissances diamétrales correspondant aux différents sels au potentiel osmotique de -5 bar (Figure 4) révèle que le NaCl et le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  permettent une croissance diamétrale de 42.75 mm et 42.62 mm respectivement. Les deux sels montrent une

action similaire sur la croissance diamétrale. Par contre le  $\text{CaCl}_2$  favorise toujours une croissance importante.



**Figure 3.** Comparaison des moyennes des croissances diamétrales des différents sels à un potentiel osmotique de -1,4 bar.

Les sels suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Duncan)



**Figure 4.** Comparaison des moyennes des croissances diamétrales des différents sels à un potentiel osmotique de -5 bar.

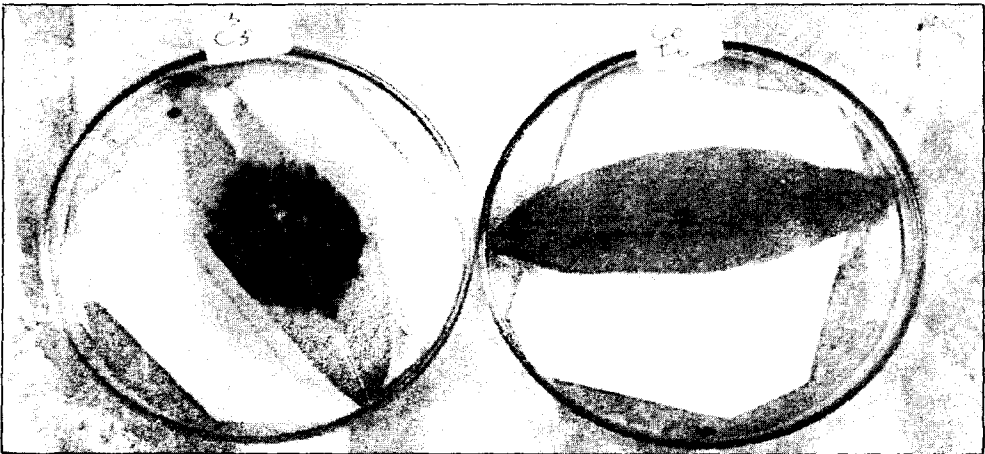
Les sels suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Duncan)

### Effet de la salinité sur l'agressivité de *P. citrophthora*

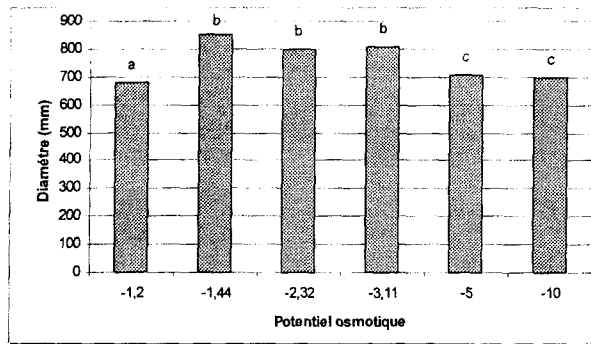
Les feuilles détachées et inoculées ont montré toute une pourriture brune apparente au bout de 72 heures d'incubation quels que soient le sel utilisé et le potentiel osmotique du milieu (Photo 1).

Les symptômes sont observés même lorsque les feuilles sont inoculées avec des souches ayant poussé à un potentiel osmotique de -10 et -1.2 bar. La figure 5 montre que l'agressivité de

*P.citrophthora*, quels que soit le sel utilisé pour l'ajustement du potentiel osmotique du milieu, est stimulée par des potentiels osmotiques variant de -1.44 à -3.11bar. Au-delà de ces valeurs, la sévérité de l'attaque diminue. En effet, l'analyse de la variance des sévérités révèle que l'effet potentiel osmotique et l'effet sel sont significatifs. Par contre l'effet interaction potentiel osmotique/sel ne l'est pas. La comparaison des moyennes des sévérités reliées aux différents sels (Figure 6) montre que le NaCl et le KCl diffèrent significativement des autres sels. En effet, ils favorisent une agressivité intense de *P. citrophthora* pour les différents potentiels osmotiques. Le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  fait partie du groupe de sels responsables d'une agressivité intermédiaire. Le  $\text{CaCl}_2$  a permis une agressivité significativement moindre par rapport aux autres sels utilisés.

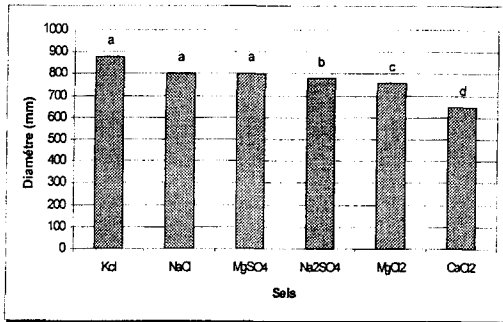


**Photo1.** Pourriture sur feuilles du Clémentinier après inoculation par à *Phytophthora citrophthora*



**Figure 5.** Comparaison des moyennes des sévérités de *P. citrophthora* sur feuilles détachées des différents potentiels osmotiques

Les sels suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test Duncan)



**Figure 6.** Comparaison des moyennes des sévérités de *P. citrophthora* sur feuilles détachées des différents sels

Les sels suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Duncan)

## Discussion

L'addition de sel dans le milieu de culture stimule la croissance diamétrale de *P. citrophthora* particulièrement entre -1.44 et -3.11 bar. Au de là de cet intervalle, toute augmentation du potentiel osmotique du milieu se traduit par un affaiblissement de la croissance qui reste, malgré tout, supérieure à celle du témoin. La grande croissance mycélienne diamétrale observée entre -1.44 et -2.32 bar montre que ce champignon est capable de persister dans les sols salés car les conductivités électriques correspondantes à ces deux potentiels sont 4 et 6.3 dS/m respectivement. Comparé à d'autres espèces du même genre, *P. citrophthora* a un comportement différent vis-à-vis des différentes valeurs du potentiel osmotique du milieu. En effet, Sommer et al. (1970) rapportent que la croissance optimale de *P. cinnamomi* est comprise entre -10 et -15 bar. Pour *P. megasperma* var *sojae*, la croissance radiale diminue avec la diminution du potentiel osmotique pour s'annuler à -30 bar. Cependant, pour *P. parasitica*, la croissance persiste jusqu'à -50 bar.

Le comportement de *P. citrophthora* vis-a-vis du potentiel osmotique du milieu varie également en fonction du sel utilisé. On note une stimulation importante de la croissance en présence de NaCl, du CaCl<sub>2</sub> et du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sulistyowati et Keane (1992) ont montré, par contre, que le NaCl exerçait un effet inhibiteur sur la croissance de *P. citrophthora*. Or, dans leur étude, ces auteurs ont utilisé un potentiel osmotique de -6 bar. D'après nos résultats, en se référant à la Figure 5, on peut constater que -6 bar se trouve dans la phase descendante de la croissance de *P. citrophthora*. La comparaison des différents sels révélerait automatiquement un effet inhibiteur de NaCl sur la croissance.

Par comparaison au NaCl, le CaCl<sub>2</sub>, quelque soit le potentiel osmotique du milieu de culture, a permis une croissance importante, ce qui est donc dû à l'effet spécifique des ions Ca<sup>++</sup>. Su-



listiyowati et keane (1992), ont trouvé que les fortes concentrations de NaCl inhibaient la croissance mycélienne sur le milieu V8 gélosé. Cependant par addition du calcium dans le milieu, la croissance du champignon persiste même avec des concentrations de 200 mM de NaCl. Ainsi, le  $\text{CaCl}_2$  exerce un effet stimulateur dû principalement à l'ion  $\text{Ca}^{++}$ . La comparaison de l'action de NaCl et de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  à -1.4 et -5 bar montre que les deux sels ont une action similaire. Les agrumes tolèrent des niveaux de salinité relativement bas (inférieurs à 1,4 dS/m). Au-delà de ce seuil, alors que les arbres commencent à souffrir, la croissance de *P. citrophthora* se trouve favorisée.

Concernant l'effet de la salinité sur l'agressivité de *P. citrophthora*, il a été démontré que la salinité, et plus particulièrement le NaCl, le KCl,  $\text{MgSO}_4$ , augmentaient l'agressivité de *P. citrophthora* entre -1.44 et -3.11 bar. Il est donc certain que la salinité du milieu n'a pas uniquement un effet stimulant de la croissance de *P. citrophthora*, mais elle a également un effet sur son pouvoir pathogène. Dans des expériences similaires la sévérité d'attaque a été estimée sur des plants d'agrumes complets (Blacker et MacDonald, 1986; Sulistyowati et Keane, 1992 ; 1993). Ces auteurs expliquent que l'augmentation de la sévérité d'attaques qu'ils ont notée sur les plants sous des conditions de salinité par une réduction dans la production et l'accumulation des phytoalexines notamment le 6-7 methoxycoumarin (DMC). Notre test a été réalisé sur des feuilles détachées, ce qui nous laisse penser qu'il s'agit plutôt d'une action directe du sel sur la pathogénicité de l'agent pathogène.

Ces résultats concordent avec des travaux menés sur d'autres couples plante-agent pathogène. Ainsi chez *Macrophomina phaseolina*, Mahjoub et al. (1979), ont trouvé une augmentation de l'agressivité du champignon en présence de doses élevées du chlorure de sodium. Raggazi et al. (1994) ont souligné une augmentation de l'agressivité d'un isolat de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* après culture sur un milieu riche en sels. Afaïlal (1987) a rapporté que la race 2 de *Verticillium dahliae* était capable de tolérer des concentrations élevées de chlorure de sodium, chose qui se traduit sur les terrains salés par une pathogénie accrue de l'agent pathogène en question.

En fin notons que le  $\text{CaCl}_2$  stimule la croissance, mais favorise une faible agressivité. La corrélation entre la croissance radiale et l'agressivité est donc relative car le sel qui inhibe fortement la croissance diamétrale (KCl) a permis une agressivité très importante de *P. citrophthora*.

La comparaison des effets de NaCl et de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  montrent que ces deux sels ont des effets similaires sur l'agent pathogène du point de vue croissance mycélienne. Cependant le NaCl a entraîné une agressivité plus importante que le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Figure 6). Ce qui montre que le Cl a un effet stimulateur sur l'agressivité de *P. citrophthora*.

## Références bibliographiques

Afaïlal, A. (1987). Manifestation de la verticilliose sur les tomates sensibles et résistantes: Effet de la salinité sur le développement des deux races de *Verticillium dahliae* Kleb. et sur la réaction des plantes à l'agent pathogène. Thèse de 3ème cycle, Faculté des sciences de Rabat, 127 pp.

- Blaker, N. S., and MacDonald, J. D. (1986). The role of salinity in development of *Phytophthora* root rot of *Citrus*. *Phytopathology* 76: 970-975.
- Boulaine, J. 1978. Cours d'hydrologie. Institut national agronomique. 192pp.
- Brusca, J.N. and Hass, A.R.C. (1958). Chlorine absorption. Calif. Agric. March 1958, pp 9 and 11-12.
- El Guilli M, Ben Yahia H., Jriji A. et Besri M. (2000). Effet de la salinité de l'eau d'irrigation sur la sévérité de la gommose du tronc d'agrumes due à *Phytophthora citrophthora*. *Fruits*, vol. 55, p.181-186.
- MacDonald, J.D. (1984). Salinity effects on the susceptibility of *Chrysanthemum* root rot to *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathology* 74: 621-624.
- MacDonald, J. D. (1991). Heat stress enhances *Phytophthora* root rot severity in container-grown chrysanthemums. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(1) : 36-41.
- Matheron, M. E., and Metjka, J.C. (1991). Effect of sodium tetrathio carbonate metalaxyl, and fosetyl-Al on development and control of *Phytophthora* root rot of *Citrus*. *Plant Dis.* 75: 264 -268.
- Mahjoub, M., Bouzaidi, A., Jouhri, A., Hamrouni, A., et El Beji. (1979). Influence de la salinité des eaux d'irrigation sur la sensibilité du tournesol au *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Ann. *Phytopathol.*, 11(1), 61-67.
- Matheron, M. E., and Matejka, J.C. (1992). Effects of temperature on sporulation and growth of *Phytophthora citrophthora* and *P.parasitica* and development of foot and root rot on *Citrus* *Plant Dis.* 76 : 1103 - 1109.
- Ragazzi, A. and Vecchio, V. (1992). Behaviour of chlamydospore of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in substrates containing sodium chloride. *Phytopath. Mediterranea.* 31, 85-87.
- Ragazzi, A. Vecchio, V. Ivane Dellavel, Alexandra Cucchi, *Francesca Mencini*. (1994). Variations in the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in relation to the salinity of the nutrient medium. *Journal of Plant Disease and protection* 101(3), 263-266.
- Ristaino, J. B., Hord, M. J., and Gumpertz, M. L. (1992). Population densities of *Phytophthora capsici* in field soils in relation to drip irrigation, rainfall, and disease incidence. *Plant Dis.* 76 : 1017-1024.
- Serrhini, M. N., (1986). La résistance de *Phytophthora citrophthora* au metalaxyl. Thèse de doctorat. Université catholique de Louvain Belgique. 150pp.
- Sommers, L. E., Harris., R. F., Dalton, F. N., and Gardner, W. R.(1970). Water potential relations of three root-infecting *Phytophthora species*. *Phytopathology* 60: 932-934.
- Sulistyowati, L. and Keane, P. J. (1992). effect of soil salinity and water content on stem rot caused by *Phytophthora citrophthora* and accumulation of phytoalexins in *Citrus* rootstocks. *Phytopathology* 82 : 771-777.
- Sulistyowati, L. (1993). Effect of salinity on development of root infections caused by *Phytophthora citrophthora* in *Citrus* rootstocks growing in hydroponics. *Agrivita*, VOL.16, No.1:13-19.
- Swiecki, T. J. et MacDonald, J. D.(1988). Histology of *Crysanthemum* roots exposed to salinity and *Phytophthora cryptogea*. *Can. J. Bot.* 66:280-288
- Vanderweyen, A. (1982). Contribution à l'étude de la gommose à *Phytophthora* des Agrumes au Maroc. Thèse de docteur-Ingénieur, Nancy, 160p.
- Whiteside, F.O, Garsnay, S.M. and Timmer, L. W. (1989). Compendium of *Citrus* Diseases. The American Phytopathological Society.