

# Alkyl-bis-phényl éthers, nouvelles phytoalexines élaborées par *Arachis hypogaea* L. infectée par *Puccinia arachidis* Speg.

## *Alkyl bis phenyl ethers, new phytoalexins produced by Arachis hypogaea L. infected with Puccinia arachidis Speg.*

P.V. SUBBA RAO<sup>(1)</sup>, J. EINHORN<sup>(2)</sup>, J.P. GEIGER<sup>(3)</sup>, C. MALOSSE<sup>(2)</sup>, B. RIO<sup>(3)</sup> et A. RAVISE<sup>(4)</sup>

**Résumé.**— Des alkyl-bis-phényl éthers ont été isolés et caractérisés pour la première fois en tant que phytoalexines à partir de feuilles d'arachide infectées par *Puccinia arachidis*. L'extraction, la purification, la caractérisation et l'activité fongitoxique *in vitro* de ces composés sont décrits et leur rôle éventuel dans la résistance de l'hôte contre la rouille est discuté.

**Mots clés.** — Alkyl-bis-phényl éthers, arachide, *Arachis hypogaea*, interactions hôte-parasite, mécanismes de défense, *Puccinia arachidis*, phytoalexines, résistance, rouille.

**Summary.**— *Alkyl bis phenyl ethers* were isolated as phytoalexins for the first time from groundnut leaves infected with *Puccinia arachidis*. Extraction, purification, characterisation and *in vitro* antifungal activity of these compounds are described and their possible role in the host defence against rust infection is discussed.

**Key words.** — *Alkyl bis phenyl ethers*, *Arachis hypogaea*, defence mechanisms, groundnut, host-parasite interactions, peanut, phytoalexins, *Puccinia arachidis*, resistance, rust.

### INTRODUCTION

*Puccinia arachidis*, agent pathogène de la rouille de l'arachide (*Arachis hypogaea*), est prédominant dans de nombreuses régions arachidières du monde et peut causer 50 % de pertes de rendement dans les conditions de culture traditionnelles (Subrahmanyam et McDonald, 1983 ; Savary *et al.*, 1988), et jusqu'à 79 % de pertes en cas d'épidémie provoquée (Mayee et Baheti, 1983). Parmi les méthodes de lutte disponibles contre cette maladie, la lutte génétique apporte une solution efficace et constitue une formule particulièrement adaptée pour les pays en voie de développement. De nombreuses variétés résistantes à la rouille ont été caractérisées grâce aux efforts de plusieurs équipes de chercheurs dans le monde entier, mais les mécanismes de résistance restent, à ce jour, encore peu connus.

Les recherches réalisées depuis 15 ans ont permis de déceler des phytoalexines phénoliques - stilbènes (Aguamah *et al.*, 1981 ; Keen, 1975 ; Keen et Ingham, 1976) et ptéocarpanes (Strange *et al.*, 1985) - ou de nature lipidique (Subba Rao *et al.*, 1988, 1990). Dans cette note, nous présentons l'isolement, la purification, la caractérisation et l'activité fongitoxique *in vitro* d'une nouvelle famille de phytoalexines produites par

### INTRODUCTION

*Puccinia arachidis*, causal agent of rust disease of groundnut (*Arachis hypogaea*) is a major foliar pathogen in several groundnut producing regions in the world. Yield losses due to rust could attain up to 50 % in farmers' fields (Subrahmanyam and McDonald, 1983 ; Savary *et al.*, 1988) and up to 79 % in case of artificial epidemics (Mayee and Baheti, 1983). Among various disease control measures available, use of resistant varieties is an efficient and better adopted one particularly to the developing countries. Several rust-resistant genotypes have so far been identified, thanks to the efforts of various scientists around the world. On the other hand, information available on the host resistance mechanisms, even today, is very limited.

Research carried out during the past 15 years led to the identification of phenolic phytoalexins, namely stilbenes (Aguamah *et al.*, 1981 ; Keen, 1975 ; Keen and Ingham, 1976) and pterocarpanes (Strange *et al.*, 1985) or phytoalexins of lipid nature (Subba Rao *et al.*, 1988, 1990). In this paper, we describe isolation, purification, identification and the *in vitro* antifungal

(1) Legumes Pathology, ICRISAT, Patancheru P.O., Andhra Pradesh 502 324, Inde. Laboratoire de Phytopathologie, CIRAD-IRHO, B.P. 5035, 34032 Montpellier (France)

(2) Laboratoire INRA-CNRS des Médiateurs Chimiques, domaine de Brouessy, 78470 Saint-Rémy-lès-Chevreuse, (France)

(3) Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, 911 rue d'Agropolis, 34032 Montpellier, (France)

(4) ORSTOM, 213, rue La Fayette, 75480 Paris, (France)

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 36.500 ex 1

Cote : B

03 AOUT 1992

l'arachide en réponse à l'infection par *P. arachidis* : les alkyl-bis-phényl éthers.

activity of a new family of phytoalexins, the alkyl bis phenyl ethers produced in response to infection by *Puccinia arachidis*.

## MATERIEL ET METHODES

### • Matériel végétal

Toutes les extractions sont effectuées à partir de feuilles d'arachide d'une variété locale de type spanish - soit saines, soit infectées naturellement par *P. arachidis* - prélevées au champ dans une culture âgée de deux mois (parcelles paysannes proches d'Abidjan, en Côte-d'Ivoire).

### • Extraction

L'extraction des composés recherchés est effectuée par broyage des feuilles dans du méthanol à 50 % à raison de 7,5 ml/g de tissus frais (broyeur Omnimixer, Sorvall). Les extraits méthanoliques sont mis à macérer à température ambiante et à l'obscurité pendant 48 heures puis filtrés sur verre fritté n°1. Les filtrats sont concentrés au quart de leur volume par évaporation sous vide à 40°C (évaporateur Büchi) et centrifugés (10 min. à 15.000 g ; centrifugeuse RC 2-B, Sorvall). Ce surnageant est soumis à une extraction différentielle par du n-hexane (cet extrait est appelé "phase Hx"). La phase aqueuse a été ensuite réextraite trois fois par l'acétate d'éthyle (phase EtOAc). Les alkyl-bis-phényl éthers ont été détectés après purification par chromatographie sur couche mince (CCM) de silice (60 F<sub>254</sub> ; 0,25 mm d'épaisseur, Merck, France) dans le système chloroforme : méthanol (Clf : MeOH) dans les proportions 50:02 (V/V). La révélation a été réalisée par pulvérisation d'une solution saturée de chlorure d'antimoine (SbCl<sub>3</sub>) dans du chloroforme puis par chauffage à 120°C pendant 10 min. A chaque étape de la purification, l'activité fongitoxique a été contrôlée par le "test *Cladosporium*" décrit précédemment (Subba Rao *et al.*, 1988).

### • Purification

Les tests "*Cladosporium*" ayant montré que les composés recherchés étaient extraits de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle, la purification a été poursuivie à partir de cette phase. Après concentration à environ 5 ml, celle-ci est déposée sur une colonne atmosphérique de silice [Longueur (L) = 60 cm; Diamètre (Dia) = 1,5 cm]. L'élution est faite en deux étapes : d'abord par le système Clf : MeOH 50:01 (V/V) puis par le même mélange dans les proportions 50:10 (V/V) (débit 1 ml/min). La Densité Optique (DO) des fractions recueillies est mesurée à 280 et à 311 nm. La fraction contenant l'activité fongitoxique est concentrée puis purifiée par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) sur une colonne de silice (5 $\mu$  ; L = 30 cm; Dia = 0,95 cm) ; la colonne est éluée par un gradient d'un mélange Hx:MeOH dont les proportions varient de 100:0 à 70:30 (V/V). La purification est poursuivie en CLHP sur colonne de silice greffée en C<sub>18</sub> (5 $\mu$  ; L = 30 cm; Dia = 0,95 cm) ; l'élution est effectuée par un gradient d'un mélange ternaire (MeOH : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH) allant de 50:50:01 à 99:0:01 (V/V). Dans les deux cas, le gradient est réalisé en 20 min. pour un débit de 1 ml/min.

### • Caractérisation

La fraction purifiée a été soumise à une chromatographie en phase gazeuse (CG, Carlo Erba Fractovap 2900); WC OT colonne capillaire, L = 25 m ; Dia = 0,22 mm ID; HP5 (Hewlett Packard); la température de la colonne variant entre 180 et 250°C à raison de 2°C par min. ou à une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM) (Nermag R10-10 C piloté par ordinateur; conditions de

## MATERIALS AND METHODS

### • Plant material

Groundnut leaves either healthy or infected by *P. arachidis*, used for phytoalexin extraction were collected from rust-infected plants of a two-month-old local Spanish variety grown in the farmers' fields near Abidjan, Côte-d'Ivoire.

### • Extraction

Phytoalexins were extracted by grinding (Sorvall Omnimixer 230, USA) the leaves in 50 % methanol (MeOH) (@ 7.5 ml/g fresh weight) in water (H<sub>2</sub>O) after a thorough wash in distilled water. Methanolic extracts were left to diffuse in dark at room-temperature for 48 hrs and filtered through glass filter No.1. Filtered extracts were concentrated to 1/4 volume at 40°C using a rotatory evaporator (Büchi, Switzerland) and were centrifuged for 10 min. at 15,000 g (RC 2-B, Sorvall, U.S.A). The supernatant was extracted thrice with n-hexane (the phase was called Hx-phase) and the aqueous phase was further extracted thrice with ethyl acetate (and this phase was called EtOAc-phase). Alkyl bis phenyl ethers were separated on TLC plates (Silica Gel, 0.25 mm thick, 60 F<sub>254</sub>, Merck, France) using a mixture of chloroform (Clf) and MeOH (50:02 V/V) as solvent system. Presence of these compounds was detected on TLC plates after separation, by spraying saturated solution of antimony chloride (SbCl<sub>3</sub>) in Clf and heating at 120°C for 10 min. At each step of the purification process, antifungal activity of the compounds separated was tested using "*Cladosporium* test" as previously described (Subba Rao *et al.*, 1988).

### • Purification

Following the indications by "*Cladosporium* tests" that the antifungal compounds under study were extracted by EtOAc from the aqueous phase, further purification was carried out on the EtOAc phase. EtOAc phase was concentrated to 5 ml and was separated on an atmospheric silica column [Length (L): 60 cm; Diameter (Dia): 1.5 cm]. Clf and MeOH were used as the solvent system in the proportions, 50:01 V/V followed by 50:10 V/V, with a flow rate of 1 ml/min. The Optical Density (OD) of the fractions collected was measured at 280 and 311 nm. The fraction containing the antifungal compound was concentrated and further chromatographed on a HPLC column (Silica gel 5 $\mu$ ; L : 30 cm; Dia : 0.95 cm) using a MeOH gradient in Hx at varying proportions from 100:0 to 70:30 V/V. The purification was continued further, by separating the compounds under study, on another HPLC column, Silica C<sub>18</sub> (5 $\mu$ ; L : 30 cm; Dia : 0.95 cm). The eluting system used was MeOH : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH in proportions varying from 50:50:01 to 99:0:01 V/V. In both the chromatographies, solvent gradient was established in 20 min. with a flow rate of 1 ml/min.

### • Characterisation

The purified fractions were subjected to a Gas Chromatography (GC) [(Carlo Erba Fractovap 2900); WC OT capillary column; L : 25 m; Internal Dia : 0.32 mm; HP5 (Hewlett Packard); temperature of the column varied between 180 and 250°C at the rate of 2°C/min.] or a gas chromatography coupled with a Mass Spectrometer (MS) (Nermag RIO-10 C monitored by a computer). GC conditions: L : 25 m; Internal

CG : colonne capillaire, L = 25 m; Dia = 0,32 mm ID, CP Wax 57CB WC OT; température variant de 140 à 250°C à raison de 10°C par min.). Les études sont confortées par le couplage de deux spectromètres de masse (SM-SM) pour l'analyse des principaux ions. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un triple quadripole sur spectromètre Nermag R30-10 C. L'ion  $m/z = 94$  étant sélectionné par le premier analyseur conduit à un spectre de décomposition - sous collision en présence d'argon - identique à celui généré par l'ion moléculaire du phénol.

#### TEST IN VITRO DE L'ACTIVITE FONGITOXIQUE

##### • Test "Cladosporium"

Ce test est réalisé sur les plaques de silice après séparation par CCM selon les méthodes décrites antérieurement (Subba Rao *et al.*, 1988).

##### • Test d'inhibition de la germination et de la croissance du tube germinatif des urédospores de *P. arachidis*, in vitro

Les méthodes employées sont essentiellement celles décrites par Subba Rao *et al.*, (1988, 1990). Les observations ont été réalisées au microscope (Olympus) sur deux séries d'échantillons : d'une part, des spores en suspension dans les milieux comportant des concentrations croissantes de phytoalexines, d'autre part, une suspension de spores dans un milieu-témoin ne comportant pas d'extrait mais des volumes équivalents de solvant (de 0,25 à 15% d'éthanol absolu). Un "témoin général" est également réalisé dans lequel le solvant est remplacé par de l'eau afin d'évaluer l'aptitude germinative de chaque lot de spores et d'en déduire l'effet de l'éthanol. Pour chaque concentration et pour chacune des six répétitions, les observations ont concerné environ 400 spores pour l'inhibition de la germination et quatre répétitions à raison de 13 spores par répétition pour la croissance du tube germinatif. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport aux deux témoins.

#### RESULTATS

Parmi les substances inhibitrices élaborées contre le *Puccinia arachidis* après inoculation expérimentale, un groupe de produits, jusqu'alors inconnus, présente les caractéristiques chromatographiques ci-dessous :

- en CCM sur plaque de silice, avec le mélange Clf-MeOH (50:02) pour éluant,  $R_f = 0,22$  ;
- en CLHP sur colonne de silice (L = 30 cm ; Dia = 0,95 cm), éluée au débit de 1 ml/min. successivement par l'hexane puis par un gradient d'acétate d'éthyle - de 0 à 30% - dans l'hexane, le temps de rétention est de 55 min.

Ces substances sont colorées en jaune par le  $SbCl_3$  après chauffage à 120°C pendant 10 minutes.

D'après les études de spectrométrie de masse, leur structure est du type phényl-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-phényl, comportant une chaîne aliphatique de longueur variable. Ces substances se caractérisent, en impact électronique, par un pic de base à  $m/z = 94$ . Les ions les plus caractéristiques correspondent à  $m/z = 85, 83, 71, 69, 57, 55, 43, 41$ . Certains ions sont décelés sous forme de traces à  $m/z = 182$  et 196 ou 168, 210. Dans le mode d'ionisation de champ par l'ammoniac des pics de masse  $M + 18$  correspondent aux ions 358, 372 et 386. Les

Dia : 0.32 mm, CP Wax 57CB WC OT; temperature ranging from 140 to 250°C at the rate of 10°C/min.

Analysis of the principal ions was facilitated by coupling two Mass spectrometers (MS-MS) and was carried out with the help of a triple quadripole on the Mass spectrometer Nermag R30-10 C. The ion  $m/z = 94$  being selected on the first analyser, permitted to obtain, under collision in presence of argon, a decomposition spectrum, which was identical to the one generated by the phenol molecular ion.

#### IN VITRO TESTS FOR ANTIFUNGAL ACTIVITY

##### • "Cladosporium" test

The antifungal activity of the compounds was tested on TLC plates as described previously (Subba Rao *et al.*, 1988).

##### • In vitro inhibition of urediniospore germination and germ tube growth of *P. arachidis*

The testing procedure was similar to the one described by Subba Rao *et al.*, (1988, 1990). Observations were made using an Olympus microscope on two series of samples. In the first series, spore suspensions contained increasing concentrations of the phytoalexins (dissolved in absolute ethanol), while in the second one, the spore suspensions did not contain phytoalexins but, equivalent quantities of the solvent (0.25 to 15 % absolute ethanol). A "general control", in which the solvent was replaced by water was also included in the experimentation in order to estimate the effect of solvent (absolute ethanol) alone, on the spore germination and on germ tube growth. Around 400 spores per replication were observed for estimating the effect of each of the phytoalexin concentrations on the spore germination, which were replicated six times, while, 13 spores per replication and four replications per concentrations were considered for evaluating the phytoalexin effect on the germ tube growth. The results are expressed in percentage of inhibition calculated with reference to each of the controls, i.e., absolute ethanol and water.

#### RESULTS

Among the antifungal compounds produced by groundnut plants following artificial inoculations with *P. arachidis*, a group of compounds, so far not reported, possess the following chromatographic characters:

- $R_f = 0.22$  in Clf:MeOH (50:02 V/V) as eluting system;
- retention time was 55 min. on a HPLC column (Silica gel; L = 30 cm; Dia : 0.95 cm) when eluted by hexane followed by a gradient of ethyl acetate in hexane, from 0 to 30 %, with a flow rate of 1 ml/min.

These compounds turn yellow by  $SbCl_3$  after heating at 120°C for 10 min.

Mass spectrometric studies show that the structure of these compounds is of the type, phényl-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-phényl, with an aliphatic chain of varying lengths. Under electronic impact, the base peak was observed at  $m/z = 94$  and the characteristic ions at  $m/z = 85, 83, 71, 69, 57, 55, 43, 41$  while, certain ions were found in traces at  $m/z = 182$  and 196 or 168, 210. In the chemical ionization by ammonia, the mass peaks  $M + 18$  correspond to the ions 358, 372 and 386. The molecular weights were further confirmed using nitro-

masses moléculaires sont confirmées par des spectres établis en ionisation de champ avec le monoxyde d'azote qui interagit avec les éthers et les noyaux phénoliques.

Les produits d'hydrogénation catalytique, à température ambiante et en présence d'oxyde de platine dans le méthanol, ne sont pas détectables. Ceci exclut l'hypothèse de la présence d'une substance très polaire. De même, l'existence d'une chaîne linéaire polyinsaturée n'est pas compatible avec les résultats des réactions d'époxydation et d'ozonolyse.

La présence du pic de base à  $m/z = 94$  correspond à la formation en phase gazeuse d'un ion phénol dans la source, démontrée par couplage SM-SM. L'ion  $m/z = 94$ , sélectionné par le premier analyseur, conduit à un spectre de décomposition, sous collision en présence d'argon, caractérisé par les ions  $m/z$  66, 65, 55, 39, 38, 27 identique à celui généré par l'ion moléculaire du phénol (Fig. 1).

D'autre part, en SM - SM, les spectres de collision des ions pseudomoléculaires  $m/z$  358 et 372 en ionisation de champ par l'ammoniac confirment la présence d'une chaîne hydrocarbonée. La figure 2 représente le spectre de collision de l'ion  $m/z$  372 avec des ions intenses à  $m/z$  57, 71, 85 caractéristiques d'un maillon hydrocarboné à longue chaîne.

La structure la plus compatible avec les masses moléculaires de  $M^+ = 340, 354, \text{ et } 368$  du type phényl-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-phényl (Fig. 3) correspond à une chaîne aliphatique comportant respectivement 11, 12 ou 13 atomes de carbone. Enfin, les analyses en CG-SM indiquent la présence de plusieurs isomères pour une même masse moléculaire. Ceux-ci peuvent correspondre à la présence d'une ou de plusieurs ramifications du maillon hydrocarboné.

### Propriétés biologiques

Les tests d'inhibition *in vitro* de la germination et de la croissance du tube germinatif des urédospores de *P. arachidis* ont été réalisés pour des concentrations variant entre 5 et 300 µg/ml, soit de  $1,4 \times 10^{-2}$  à  $86 \times 10^{-2}$  mM. L'éthanol aux concentrations de 2,5 à 150 µl/ml influe différemment sur la germination des spores et sur la croissance des tubes germinatifs (Fig. 4 et Tabl. I).

La figure 4 récapitule l'inhibition de la germination de spores de *P. arachidis* pour une incubation de 3 heures à l'obscurité et à la température de 25°C. Cette inhibition n'est pas proportionnelle à la concentration d'alkyl-bis-phényl éthers. La dose létale (DL) 50 pour la germination des spores est de l'ordre de 40 µg/ml ( $12 \times 10^{-2}$  mM), la dose létale 90 correspondant à 200 µg/ml ( $6 \times 10^{-1}$  mM). L'élongation des tubes germinatifs de spores de *P. arachidis* apparaît plus sensible à l'action de la phytoalexine. En effet, dès la concentration de 10 µg/ml s'observe une réduction de croissance de l'ordre de 47 % (Tabl. I). Paradoxalement, l'augmentation des concentrations de l'inhibiteur influe peu sur l'évolution des tubes germinatifs au cours d'une période de 3 heures à 25°C. La répétition des expériences tend à indiquer qu'il ne s'agit pas d'un artefact. L'incidence de la concentration en inhibiteur sur ce second processus pourrait être limitée, soit par l'encombrement stérique des alkyl-bis-phényl éthers limitant l'accès à leur cible, soit par une modification de perméabilité membranaire chez le parasite semblable à celle décrite chez le *Nectria haematococca* pour le pisatine (Denny et Van Etten, 1983).

## DISCUSSION ET CONCLUSION

De nombreuses études antérieures réalisées sur la capacité de l'arachide à produire des phytoalexines, en réponse à l'infection parasitaire, avaient conduit à l'identification de deux familles de composés : les stilbènes et les pterocarpanes (Aguamah *et al.*, 1981 ; Ingham, 1976 ; Keen, 1975 ; Keen

*gen monoxide which reacts with ethers and the phenolic nuclei.*

*The compounds of catalytic hydrogenation were not detected at room temperatures in presence of platinum oxide. These results ruled out the existence of highly polar compounds. Similarly, presence of a polyunsaturated linear chain was also ruled out based on the epoxidation and ozonolysis reactions.*

*The presence of a base peak at  $m/z = 94$  correspond to the formation of a phenol ion in gaseous phase in the source as shown by the MS-MS coupling. The ion  $m/z = 94$  being selected on the first analyser, permitted to obtain, under collision in presence of argon, a decomposition spectrum (characterized by the ions at  $m/z$  66, 65, 55, 39, 38, 27), which was identical to the one generated by the phenolic molecular ion (Fig. 1).*

*Further, the collision spectra of the pseudomolecular ions  $m/z$  358 and 372 in ionization by ammonia, confirmed the presence of a hydrocarbon chain. Figure 2 presents the collision spectra of the ion  $m/z$  372 with high intensity ions at  $m/z$  57, 71, 85 characteristic of hydrocarbon side chain.*

*The most appropriate structure for the molecular weights of  $M^+ = 340, 354 \text{ and } 368$  is of the type phenyl-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-phenyl (Fig. 3), an aliphatic chain corresponding to 11, 12 and 13 carbon atoms respectively. The GC-MS analyses indicate the presence of several isomers for the same molecular weight which implies that the aliphatic chain could have one or more ramifications of the hydrocarbon link.*

### Antifungal activity

*The tests for in vitro inhibition of the urediniospore germination and germ tube growth included phytoalexin concentrations ranging from 5 to 300 µg/ml ( $1.4 \times 10^{-2}$  to  $86 \times 10^{-2}$  mM). Figure 4 and table I indicate differential effect of ethanol concentrations ranging from 2.5 to 150 µl/ml on spore germination and germ tube growth of *P. arachidis*.*

*Figure 4 summarises the inhibition of *P. arachidis* spore germination after a 3 hour incubation in dark at 25°C. Clearly, inhibition of spore germination is not proportional to the increasing concentrations of alkyl bis phenyl ethers (Fig. 4). The LD 50 and LD 90 values for the spore germination were approximately 40 µg/ml ( $12 \times 10^{-2}$  mM) and 200 µg/ml ( $6 \times 10^{-1}$ ) respectively, while, germ tube growth of *P. arachidis* appears to be more sensitive to the phytoalexin concentrations. In fact, at 10 µg/ml, a 47 % reduction in the germ tube growth was observed (Table I). But, further increase in phytoalexin concentration had little effect on the germ tube growth for a 3 hour incubation at 25°C. Repetition of experiments confirmed that this was not due to an artifact. Reasons for the limited influence of phytoalexins observed on the germ tube growth could be either steric configuration of alkyl bis phenyl ethers limiting their access to the target, or modification of the membrane permeability of the parasite similar to the one described in *Nectria haematococca* for pisatin (Denny and Van Etten, 1983).*

## DISCUSSION AND CONCLUSION

*Research carried out previously on the phytoalexin producing capacity of groundnut plant in response to pathogenic infections, led to the identification of two major families of phytoalexins, namely stilbenes and pterocarpanes (Aguamah *et al.*, 1981 ; Ingham, 1976 ; Keen, 1975 ; Keen and*

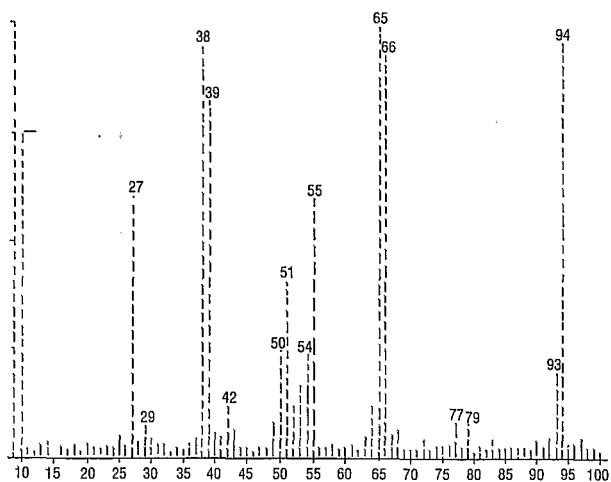


FIG. 1. — Analyse par couplage SM-SM (en impact électronique), en atmosphère d'argon, de la décomposition de l'ion  $m/z = 94$  sélectionné par le premier analyseur. On observe la formation d'ions caractéristiques à  $m/z$  66, 65, 55, 39, 38 et 27. — (Decomposition spectrum of the ion  $m/z = 94$  obtained by coupled Mass spectrometers (MS-MS) under electronic impact in presence of argon, the ion  $m/z = 94$  being selected on the first analyser. Note formation of characteristic ions at  $m/z$  66, 65, 55, 39, 38 and 27)

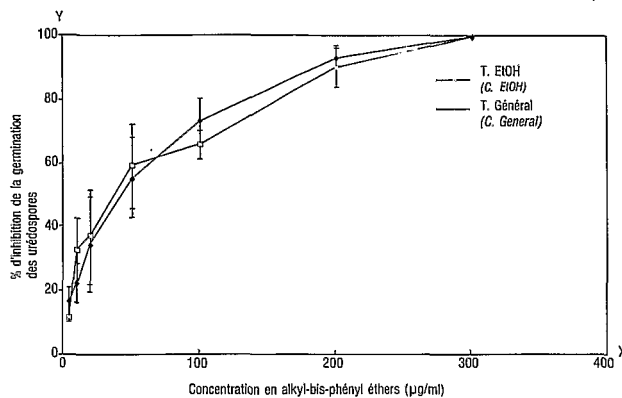


FIG. 4. — % d'inhibition *in vitro* de la germination des urédospores de *Puccinia arachidis* en fonction de concentrations croissantes d'alkyl-bis-phényl éthers, calculé par rapport au témoin éthanol (T. EtOH) et au témoin général (T. Général). — [In vitro inhibition (%) of urediniospore germination of *Puccinia arachidis* at increasing concentrations of alkyl bis phenyl ethers compared to ethanol control (C. EtOH) and to General control (C. General)]

Y : % d'inhibition de la germination des urédospores — [Inhibition (%) of urediniospore germination]  
 X : Concentration en alkyl-bis-phényl éthers (µg/ml) — [Concentration of alkyl bis phenyl ethers (µg/ml)]

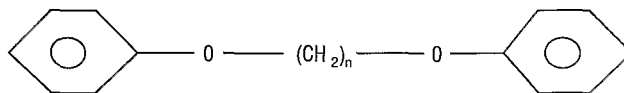


FIG. 3. — Structure des alkyl-bis-phényl éthers. — (Structure of alkyl bis phenyl ethers)

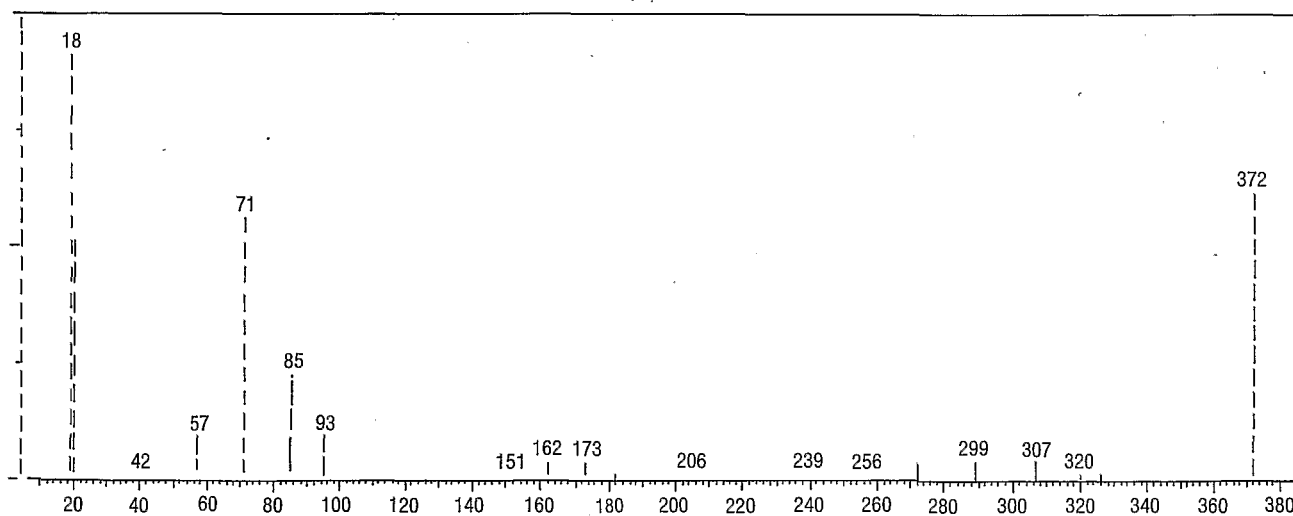


FIG. 2. — Analyse par couplage SM-SM, dans le mode ionisation de champ par l'ammoniac, de la fragmentation de l'ion  $m/z = 372$  sélectionné par le premier analyseur. La présence d'ions intenses à  $m/z$  57, 71 et 85 indique la présence d'un maillon hydrocarboné à longue chaîne. — (Fragmentation spectrum of the ion  $m/z = 372$  obtained by coupled Mass spectrometers (MS-MS) in chemical ionization by ammonia, the ion  $m/z = 372$  being selected on the first analyser. Intense ions at  $m/z$  57, 71 and 85 indicate the presence of a long chain hydrocarbon link.)

TABLEAU I. — % inhibition, *in vitro* de la croissance du tube germinatif des urédospores de *Puccinia arachidis* en fonction de quatre concentrations d'alkyl-bis-phényl éthers. — (In vitro inhibition (%) of urediniospore germ tube growth of *Puccinia arachidis* at four alkyl bis phenyl ethers concentrations.)

Concentration en alkyl-bis-phényl éthers ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Concentration of alkyl bis phenyl ethers - $\mu\text{g/ml}$ )	Nombre de répétitions (Number of replications)	% d'inhibition <sup>(1)</sup> de la croissance des tubes germinatifs par rapport au : (Inhibition % <sup>(1)</sup> of germ tube growth as compared to:)	
		Témoin éthanol (Control - ethanol)	Témoin général (eau) (Control - water)
5	4	13,42 ( $\pm$ 16,12) <sup>(2)</sup>	11,29 ( $\pm$ 18,77)
10	3	47,07 ( $\pm$ 20,55)	60,88 ( $\pm$ 8,74)
100	3	52,90 ( $\pm$ 7,42)	67,56 ( $\pm$ 3,37)
200	3	63,40 ( $\pm$ 3,57)	85,88 ( $\pm$ 1,54)

(1) Calculé à partir de 13 spores par répétition — (Based on 13 observations per replication)

(2) Ecart-types — (Standard deviations)

et Ingham, 1976 ; Strange *et al.*, 1985). Dans le cadre de nos études sur les interactions entre *P. arachidis* et *A. hypogaea*, nous avons décrit récemment deux nouveaux composés, le linoléate de méthyle et deux diénols, notamment l'ester méthylique de l'acide 9-hydroxy 10, 12 octadécadiénoïque et l'ester méthylique de l'acide 13-hydroxy 9,11 octadécadiénoïque (Subba Rao *et al.*, 1988 et 1990). Nous présentons ici la mise en évidence et la caractérisation d'une autre famille de composés chimiques, les alkyl-bis-phényl éthers qui, à notre connaissance, ont été identifiés pour la première fois en tant que phytoalexines produites par l'arachide.

Des alkyl phényl éthers sont décelés également chez des agrumes et des avocatiers parmi les substances élaborées en réaction à l'infection (Vernenghi et Ravisé, communication personnelle) et inhibent *in vitro* la croissance de *Phytophthora* spp.

L'identification de ce nouveau groupe de phytoalexines confirme la complexité des réactions de défense de l'arachide contre une agression parasitaire. Au plan physiologique, la biosynthèse des alkyl-bis-phényl éthers semble, comme les stilbènes déjà décrits chez cette plante, une conséquence de la stimulation des voies métaboliques de l'acide shikimique et de l'acétyl CoA. Ce processus apparaît comme l'un des mécanismes de défenses communs aux plantes cultivées (Stoessel, 1982; Ebel, 1986; Ravisé, 1990).

La toxicité des alkyl-bis-phényl éthers *in vitro* pour les spores de *P. arachidis* est comparable à celle du linoléate de méthyle (Subba Rao *et al.*, 1988). Nous observons une inhibition différentielle de la germination et de l'élongation des tubes germinatifs avec, dans ce cas, une action significative dès la concentration de  $1,5 \times 10^{-2}$  mM/ml. Des différences d'absorption sélective des -O et C-glycosides ont été décrites en relation avec leur toxicité pour le *Phytophthora parasitica* (Ravisé et Chopin, 1981). Des différences de potentialités inhibitrices des alkyl-bis-phényl éthers peuvent être liées à une absorption sélective, selon l'état des membranes des spores ou des hyphes du parasite, favorisée soit par la chaîne hydrocarbonée et son éventuelle ramification, soit par les noyaux aromatiques.

D'autre part, un important effet de synergie a été mis en évidence entre phytoalexines de nature phénolique et de nature lipidique, notamment dans le cas des diénols (Vernenghi *et al.*, 1987). Chez l'arachide sont élaborés des facteurs de résistance appartenant à ces deux catégories ou dérivant des deux voies métaboliques. Cette synergie *in vivo* semble probable étant donné la complémentarité des cibles métaboliques connues (Taquet, 1985). Au stade actuel des investigations, il existe une relation entre la teneur globale en phytoalexines des tissus foliaires et la résistance ou la sensibilité des différents génotypes d'arachide au *P. arachidis* (Subba Rao, 1987).

Ingham, 1976 ; Strange *et al.*, 1985). As part of research conducted on the interactions between *P. arachidis* and *A. hypogaea*, we described recently two new compounds, namely methyl linolenate and two dienols, 9-hydroxy 10,12 octadecadienoic methyl ester and 13-hydroxy 9,11 octadecadienoic methyl ester (Subba Rao *et al.*, 1988, 1990). We now report the isolation and characterisation of another family of chemical compounds, alkyl bis phenyl ethers, which, to our knowledge, are identified for the first time as phytoalexins produced by groundnut plant.

Alkyl phenyl ethers were also isolated from citrus and avocados in reaction to pathogenic infections and found to inhibit growth of *Phytophthora* spp. *in vitro* (Vernenghi and Ravisé, personal communication).

Identification of this new group of compounds confirm the complex nature of the defence reactions of groundnut put forward against pathogenic infections. From the physiological point of view, the biosynthesis of these compounds, like that of stilbenes (already described in groundnuts), corresponds to two metabolic pathways (shikimic acid and acetyl CoA) of groundnut. Further, these processes appear to be some of the defence mechanisms common to cultivated plants (Stoessel, 1982; Ebel, 1986; Ravisé, 1990).

The *in vitro* toxicity level of alkyl bis phenyl ethers to *P. arachidis* was comparable to that of methyl linolenate (Subba Rao *et al.*, 1988). In case of alkyl bis phenyl ethers, we observe a differential effect on the spore germination and germ tube growth as is evident at increasing concentrations starting from  $1.5 \times 10^{-2}$  mM/ml. Differences in selective absorption of O- and C-flavone glycosides were reported in connection to their toxicity to *Phytophthora parasitica* (Ravisé and Chopin, 1981). Differential inhibition by alkyl bis phenyl ethers could be due to selective absorption depending on the condition of walls/membranes of spores and germ tubes of the parasite favoured either by the hydrocarbon chain and its ramifications or by the aromatic nuclei.

An important synergistic effect has been found between the phytoalexins of phenolic and lipid nature, particularly in case of dienols (Vernenghi *et al.*, 1987). Phytoalexins belonging to both these categories are known to be produced by groundnuts. Given the complementary nature of the metabolic targets known, synergy between these two types of phytoalexins appears to be existing *in vivo* as well (Taquet, 1985). According to the information already available, there is a correlation between the total phytoalexin concentration of leaf tissue and the level of resistance of groundnut genotypes to *P. arachidis* (Subba Rao, 1987).

Afin d'améliorer les connaissances sur les mécanismes impliqués, il conviendrait de suivre l'évolution de la production des différentes substances, ceci en fonction du temps d'infection et du niveau de sensibilité des génotypes. De telles recherches permettraient de mettre en évidence les relations spatio-temporelles entre les phytoalexines et l'agent pathogène dans les tissus foliaires. Elles permettraient, également, de conforter l'hypothèse de l'intervention de ces substances dans la résistance de l'arachide selon le génotype à l'encontre d'une attaque parasitaire, notamment par *P. arachidis*.

**Remerciements.** — P.V. Subba Rao remercie le gouvernement français pour l'attribution d'une bourse de recherche ainsi que l'ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), Patancheru P.O., Andhra Pradesh 502 324, Inde, pour l'accord d'un congé d'études en vue de la préparation d'une thèse de doctorat.

*In order to supplement our knowledge on the rust resistance mechanisms of groundnut, it would be desirable to study the kinetics of each of the phytoalexin produced by this plant across genotypes with varying levels of resistance to rust. Such type of investigations would permit to correlate the phytoalexin production and the pathogen development in the tissues of groundnut foliage. This would also permit to define the role of these compounds in the resistance mechanisms of groundnut against infection by P. arachidis.*

**Acknowledgements.** — P.V. Subba Rao is thankful to Government of France for a fellowship grant and to the International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru 502 324, India, for granting study leave.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] AGUAMAH G.E., LANGCAKE P., LEWORTHY D.P., PRYCE J.A. and STRANGE R.N. (1981). — Two novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, **20**, 1381-1383.
- [2] DENNY T.P. and VAN ETEN H.D. (1983). — Tolerance of *Nectria haematococca* MP VI to the phytoalexin pisatin in the absence of detoxification. *Journal of General Microbiology*, **129**, 2893-2901.
- [3] EBEL, J. (1986). — Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **24**, 235-264.
- [4] INGHAM J.L. (1976). — 3, 5, 4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry*, **15**, 1791-1793.
- [5] KEEN N.T. (1975). — The isolation of phytoalexins from germinating seeds of *Cicer arietinum*, *Vigna sinensis*, *Arachis hypogaea*, and other plants. *Phytopathology*, **65**, 91-92.
- [6] KEEN N.T. and INGHAM J.L. (1976). — New stilbene phytoalexins from american cultivars of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, **15**, 1794-1795.
- [7] MAYEE C.D. and BAHETI K.G. (1983). — Influence of tridemorph of epidemic development of rust and yield of groundnut. *Trop. Plant Sci. Res.*, **1**, (4), 319-324.
- [8] RAVISE, A. (1990). — Phytoalexines et réactions de défense. *Comm. au 2e Colloque de la Société Française de Phytopathologie*, 28 - 30 novembre, 1990.
- [9] RAVISE, A. et CHOPIN, J. (1981). — Influence de la structure des composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires. V - Flavones, -O et -C-glycosides. *Phytopath. Z.* **100**, 257-269.
- [10] SAVARY S., BOSCH J.P., NOIROT M. and ZADOKS J.C. (1988). — Peanut rust in West Africa: A new component in a multiple pathosystem. *Plant Disease*, **72**, 1001-1009.
- [11] STOESSL, A. (1983). — Secondary plant metabolites in preinfectious and postinfectious resistance. In: *The Dynamics of Host Defence*, J.A. Bailey and B.J. Devrall (Eds.), Academic Press, Australia, 71-122.
- [12] STRANGE R.N., INGHAM J.L., COLE D.L., CAVILL M.E., EDWARDS C., COOKSEY C.J. and GARATT P.J. (1985). — Isolation of the phytoalexin medicarpin from leaflets of *Arachis hypogaea* and related species of the tribe Aeschynomeneae. *Z. Naturforsch.*, **40c**, 313-316.
- [13] SUBBA RAO P.V. (1987). — La rouille de l'arachide : étude de quelques mécanismes de défense de l'hôte. Thèse de Docteur en Science de la vie, Univ. de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 195 p.
- [14] SUBBA RAO P.V., GEIGER J.P., EINHORN J., MALOSSE C., RIO B., NICOLE M., SAVARY S. et RAVISE A. (1988). — Isolement de linoléate de méthyle, un nouveau composé fongitoxique des feuilles d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) infectées par *Puccinia arachidis* Speg. *Oléagineux*, **43**, (4), 173-177.
- [15] SUBBA RAO P.V., EINHORN J., MALOSSE C., GEIGER J.P., RIO B. and RAVISE A. (1990). — New dienol phytoalexins isolated from *Arachis hypogaea* leaves infected with *Puccinia arachidis* Speg. *Oléagineux*, **45**, (5), 225-227.
- [16] SUBRAHMANYAM P. and MCDONALD D. (1983). — Rust disease of groundnut. *Information Bulletin No. 13*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru P.O., Andhra Pradesh 502 324 (India).
- [17] TAQUET, B. (1985). — Les mécanismes physiologiques de la réaction de défense du palmier à huile (*Elaeis guineensis*) contre la fusariose vasculaire. Application à la recherche de nouveaux moyens de lutte. Thèse de doctorat de 3e Cycle, Université de Paris VI.
- [18] VERNENGHI A., TAQUET, B., RENARD, J.L. et RAVISE, A. (1987). — Détection chez le palmier à huile de dérivés oxygénés d'acides gras polyéniques toxiques pour le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*. Variation de leur accumulation selon les croisements et les modalités de traitements. *Oléagineux*, **42**, (1), 1-10.

## RESUMEN

### Alkil-bis-fenil éteres, nuevas fitoalexinas elaboradas por *Arachis hypogaea* L. infectada por *Puccinia arachidis* Speg.

P.V. SUBBA RAO, J. EINHORN, J.P. GEIGER, C. MALOSSE, B. RIO y A. RAVISE, *Oléagineux*, 1991, **46**, N°12, p 501-507

Alkil-bis-fenil éteres se aislaron y caracterizaron por primera vez como fitoalexinas a partir de hojas de maní infectadas por *Puccinia arachidis*. La extracción, la purificación, la caracterización y la actividad fungitóxica *in vitro* de estos compuestos se describen, discutiéndose su posible papel en la resistencia del hospedero a la roya.

**Palabras-clave.** - Alkil-bis-fenil éteres, maní, *Arachis hypogaea*. Interacciones hospedero parásito, mecanismo de defensa, *Puccinia arachidis*, fitoalexinas, resistencia, roya.