

Laboratoire de Biologie Végétale, Université de Bretagne Occidentale
(29 N — Brest),
et S. S. C. de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer
(93 — Bondy)

Etude des réactions phénoliques de plantules de *Nicotiana* inoculées par des souches de *Phytophthora* de Bary

Par

A. RAVISÉ et J. TANGUY

Reçu le 22 février 1972

Introduction

Les recherches sur les modalités du parasitisme de Pythiacées tropicales ont mis en évidence des différences de sensibilité entre espèces de *Nicotiana*, et entre variétés de tabac, à l'égard des fontes de semis provoquées par diverses espèces de *Pythium* Pringsheim et de *Phytophthora* de Bary (RAVISÉ et BOCCAS 1969, RAVISÉ 1970, 1972). La plupart des souches appartenant à ces deux genres de Siphomycètes peuvent causer, dans les régions chaudes et humides, des nécroses importantes tant en pépinières qu'après la transplantation des plantules. Ces symptômes sont reproductibles sur des cultures aseptiques réalisées *in vitro* et recevant des doses standardisées d'inoculum.

L'analyse des réactions différentielles de sensibilité a fait apparaître une constance certaine dans le temps (RAVISÉ 1972) des taux de survie pour un même hôte infecté expérimentalement avec une même souche de *Phytophthora*. Cette aptitude a été reconnue à divers degrés chez des espèces appartenant aux sous-genres *Rustica*, *Petunioides* et *Tabacum*. Elle semble comparable à celle précédemment décrite pour divers *Lycopersicum* (RAVISÉ et TANGUY 1971, RAVISÉ et TRIQUE 1972). C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer si, chez les *Nicotiana*, les réactions de défense des plantules étaient en relation avec des modifications biochimiques dans les tissus, en particulier des synthèses concernant les composés phénoliques.

Matériel et Techniques

1. La gamme d'hôtes

Parmi les *Nicotiana* possédant divers degrés de résistance au *Peronospora tabacina* Adam et aux *Phytophthora* (APPLE 1962, RAVISÉ 1972, ROGER 1951, SCHILTZ 1967, STOKES et LITTON

25 MAI 1973
O. R. S. I. O. M.

Collection de Référence

n° 6429 Phyto

1966), nous avons retenu des espèces ou variétés réparties dans différentes entités taxonomiques selon la terminologie de GOODSPEED (1954). Leurs caractéristiques sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1
Caractéristiques des *Nicotiana* utilisés pour les recherches de composés phénoliques

| espèces et variétés | sous genre et section | caractères de résistance |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>N. paniculata</i> | <i>Rustica, Paniculatae</i> | tolérant aux <i>Phytophthora</i> tropicaux et au <i>Peronospora tabacina</i> |
| <i>N. longiflora</i> | <i>Petunioides, Alatae</i> | résistant à la race O du <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> , tolérant au <i>P. tabacina</i> |
| <i>N. alata</i> | <i>Petunioides, Alatae</i> | tolérant à une partie des <i>Phytophthora</i> tropicaux et au <i>Peronospora tabacina</i> |
| <i>N. sylvestris</i> | <i>Petunioides, Alatae</i> | tolérant pour seulement deux espèces de <i>Phytophthora</i> , sensible au <i>Peronospora tabacina</i> |
| <i>N. T. Samsun</i> | <i>Tabacum, Genuinae</i> | sensible |
| <i>N. T. Samsun NN</i> | <i>Tabacum, Genuinae</i> | hypersensible au virus de la mosaïque du tabac (MTV) |

Les plantules sont cultivées aseptiquement dans des tubes contenant un milieu nutritif gélosé (RAVISÉ 1972). Elles sont inoculées après 3 à 4 semaines de croissance à 28 °C, avec un éclairage quotidien de 12 heures.

2. Les souches de *Phytophthora*

Nous avons employé deux souches appartenant à des espèces différentes et d'origines distinctes, utilisées notamment pour l'étude des enzymes pectinolytiques (TRIQUÉ et RAVISÉ 1971) et la recherche des réactions de défense des *Lycopersicon* (RAVISÉ et TANGUY 1971, RAVISÉ et TRIQUÉ 1972).

La souche I, de *P. palmivora* (Butl.) Butl., a été isolée sur aubergine en Côte d'Ivoire et provient de la mycothèque du centre O.R.S.T.O.M. d'Abidjan. Elle est fortement pathogène pour 12 hôtes. La souche II, de *P. parasitica* Dastur, isolée à l'Île Maurice sur *Nigella damascena* a été fournie par le laboratoire de phytopathologie de l'I.N.R.A. à Clermont-Ferrand. Elle est moins pathogène que la précédente sauf pour certaines variétés de coton et de tabac (RAVISÉ 1972).

L'inoculum est préparé dans des conditions standardisées (RAVISÉ 1968, 1970, 1972). Chaque plantule reçoit une suspension de thalle broyé dans de l'eau distillée stérile correspondant à environ 0,5 mg de mycélium sec.

3. Méthodes d'étude des composés phénoliques

Les méthodes générales d'étude des phénols ont été décrites dans les notes précédentes (TANGUY et GALLET 1969, TANGUY 1971). Les substances sont séparées par chromatographie à deux dimensions sur papier Whatman no. 2. Les mélanges suivants sont utilisés:

- phase organique: n-butanol—acide acétique—eau 4 : 1 : 5;
- acide acétique à 2 p 100;
- phase organique: n-butanol—ammoniaque 2 N 1 : 1;
- n-butanol—éthanol—eau 4 : 1 : 2.

L'identification des composés s'effectue par comparaison des RF dans les différents solvants et des fluorescences avec ceux des marqueurs. Lorsque ces derniers ne sont pas disponibles commercialement, il est nécessaire de les isoler des plantes où ils ont été signalés. Après avoir été isolées et purifiées par chromatographie sur papier, les substances sont identifiées grâce à leurs spectres d'absorption en milieu neutre et alcalin et par l'étude des produits résultant de leurs hydrolyses acide, alcaline et enzymatique (TANGUY et GALLET 1969, TANGUY 1971).

L'estimation quantitative des phénols repose sur leur grande oxydabilité et est réalisée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu.

4. Tests de toxicité en microculture

Les extraits phénoliques de plantules sont incorporés à la solution nutritive décrite ci-dessus après évaporation sous vide du solvant. Les concentrations sont exprimées par rapport au poids initial de tissus frais et par rapport aux teneurs en phénols totaux.

Les microcultures (RIOU et RAVISÉ 1970) sont préparées soit à partir de suspensions de zoospores soit à partir de fragments d'hyphes, de chlamydospores et de sporocystes séparés, transportés dans la solution nutritive, séchés après reprise de la croissance puis mis en contact avec les extraits à tester. L'incubation se déroule à 28 °C pendant 1 ou 2 semaines puis chaque microthalle est transféré en boîte de Petri sur un substrat nutritif gélosé afin de déterminer s'il a survécu au traitement.

5. Etude de l'influence des extraits sur les réactions enzymatiques

L'activité des lyases (TRIQUE et RAVISÉ 1971) secrétées par les *Phytophthora* est étudiée sur plusieurs substrats pectiques de différents degrés de méthylation. Les milieux réactionnels sont tamponnés à différentes valeurs soit avec du tampon tris-HCl soit avec du tampon citrate en présence de sels de calcium (MULLEN et BATEMAN 1971, RAVISÉ et TRIQUE 1972, TRIQUE 1971, TRIQUE et RAVISÉ 1971). Les solutions phénoliques sont diluées dans de l'eau distillée stérile puis incorporées à doses croissantes au milieu réactionnel contenant des extraits enzymatiques d'activité connue et où les concentrations finales sont: substrat 250 ppM, tampon 0,5 M, sel de calcium 1 mM.

Resultats

1. Evolution des teneurs en composés phénoliques après l'inoculation

Les substances phénoliques ont été identifiées et dosées dans les tissus de plantules survivant à l'infection, à divers stades entre trois jours et trois semaines après inoculation.

Les dosages comparatifs ont mis en évidence que les réactions phénoliques sont de même nature quelles que soient les souches inoculées; outre celles utilisées pour l'essentiel de l'expérimentation, six autres souches appartenant à cinq espèces de *Phytophthora* ont été éprouvées.

Les dosages ont concerné les variétés de tabac Samsun et Samsun NN, les espèces *N. paniculata* et *N. longiflora* appartenant à deux sous-genres distincts et possédant des caractères de résistance différents (tableau 2). Indépendamment de la position taxonomique de ces quatre hôtes, des réactions communes au parasitisme sont décelées.

L'infection des divers *Nicotiana* se traduit par une augmentation des teneurs en phénols totaux. Des dérivés d'acides hydroxycinnamiques s'accu-

Tableau 2

Teneurs en phénols totaux ($\mu\text{g/g}$ poids frais) et évolution des principaux phénols dans les plantules infectées des divers *Nicotiana* (A = plantules saines, B = plantules inoculées) après inoculation expérimentale par différentes souches de *Phytophthora*

| composés | hôtes | | | | | | | |
|--------------------------------------------------|-----------|--------|--------------|------|---------------|-------|---------------|-----|
| | N. Samsun | | N. Samsun NN | | N. longiflora | | N. paniculata | |
| | A | B | A | B | A | B | A | B |
| phénols totaux ($\mu\text{g/g}$ poids frais) | 110 | 166 | 159 | 346 | 100 | 162,5 | 130 | 300 |
| A. caféyl-3 quinique | traces | + | + | +++ | + | ++ | + | ++ |
| A. caféyl-4 quinique | 0 | 0 | + | +++ | 0 | 0 | + | ++ |
| A. caféyl-5 quinique | 0 | 0 | + | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A. férulyl-3 quinique | 0 | 0 | traces | ++ | traces | + | + | ++ |
| A. p. coumaryl-3 quinique | traces | + | traces | ++ | traces | + | + | ++ |
| scopoline | 0 | traces | traces | ++++ | 0 | + | 0 | 0 |
| isoquercitrine | 0 | 0 | traces | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| substance X | 0 | 0 | 0 | ++ | 0 | 0 | 0 | ++ |
| chicoriine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ |

mulent après l'invasion des tissus. Les plantules infectées synthétisent également des hétérosides, la scopoline ou chez certaines espèces de l'isoquercitrine ou de la chicoriine.

Le phénomène est très accentué chez les *Nicotiana* Samsun NN et *paniculata*. Dans les plantules de *N. Samsun* NN, l'infection s'accompagne surtout d'une accumulation de tous les acides chlorogéniques (acide caféyl — 3 quinique, caféyl — 4 quinique, caféyl — 5 quinique), de l'acide férulyl — 3 quinique, de l'acide p — coumaryl — 3 quinique, de l'isoquercitrine — monoglucoside — 3 quercétine —, d'une production de scopoline — monoglucoside — 7 scopolétine — et d'un composé non encore identifié. Cette dernière substance appelée "X" dont les RF dans les mélanges butanol acétique et butanol éthanol sont respectivement de 0,57 et de 0,60, s'isomérise en deux formes trans et cis dans un solvant aqueux (RF = 0,58—0,80 dans l'acide acétique à 2 p 100). Elle présente une fluorescence bleue en ultra-violet après exposition aux vapeurs ammoniacales. Ce composé est également produit au cours de la réaction d'hypersensibilité du *N. xanthi* à l'égard du virus de la mosaïque du tabac, souche commune (TANGUY 1970). L'infection des plantules de *N. paniculata* se traduit par une augmentation des acides caféyl-, férulyl- et para-coumarique-quiniques et par une production de chicoriine (glucoside-7-esculétine) et du composé "X". Le tableau 2 indique les teneurs en phénols totaux et l'évolution subie par les principaux phénols dans les plantules infectées des divers *Nicotiana* éprouvés.

2. Etude de la toxicité des extraits phénoliques

Ces essais sont effectués avec les extraits préparés à partir des plantules des deux variétés de tabac et de deux espèces du sous-genre *Petunioides* manifestant

l'un, *N. alata*, une importante résistance, l'autre, *N. sylvestris*, une faible résistance à la plupart des souches inoculées (tableaux 3 et 4).

L'expérimentation est réalisée à partir de plantules saines et infectées, du même âge, soit en utilisant l'extrait global, soit en procédant à l'hydrolyse alcaline des esters des acides phénols. Tous les tests sont réalisés en microculture avec la souche I qui est la plus virulente. Ce procédé permet non seulement de limiter l'oxydation des extraits étudiés mais aussi de suivre, à tout moment, l'évolution de chaque élément des microthalles. Le tableau 3 récapitule une partie des résultats. Ceux-ci sont exprimés par rapport aux quantités de tissus frais nécessaires pour obtenir, dans les conditions de l'expérience, des concentrations provoquant soit l'inhibition de la croissance, soit la mort du thalle. D'importantes différences apparaissent ainsi entre la toxicité des extraits de Samsun, de Samsun NN et des deux espèces de *Nicotiana*. Cependant, les réactions des hyphes de la souche de *P. palmivora* sont identiques lorsque le seuil de toxicité est atteint dans les extraits.

Tableau 3

Détermination pour la souche de *P. palmivora* des seuils d'inhibition de croissance et de mortalité observés en microculture avec des extraits de plantules rapportés aux poids de tissus frais (n.d. = non déterminé)

| extraits | seuils | |
|--------------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| | dose fongistatique mg | dose létale mg |
| Samsun NN, plantules saines | 500 | n.d. |
| Samsun NN, plantules inoculées | 125 | 250 |
| Samsun, plantules inoculées | 530 | n.d. |
| <i>N. sylvestris</i> , plantules inoculées | 200 | 300 |
| <i>N. alata</i> , plantules inoculées | 100 | 200 |

Dans les microcultures témoins, les filaments garnissent la totalité de la microgoutte (de 1/10 à 1/15 de mm de diamètre) dans un délai de 4 à 6 jours, des sporocystes et des chlamydospores se forment après 10 et 14 jours d'incubation. Pendant cette période, pour les doses fongistatiques, l'élongation des hyphes encore en activité est de l'ordre de 40 à 100 microns. Parfois des chlamydospores, ou des zoospores libérées par déhiscence d'un sporocyste, émettent un tube germinatif grêle, long de 10 à 30 μ , toruleux, et dont le cytoplasme est anormalement vacuolisé. Certains filaments émettent soit latéralement, soit à leur extrémité, une hyphe grêle ayant le même aspect que les tubes germinatifs. L'introduction dans les microgouttes d'un petit fragment de culture sur substrat gélosé ne modifie ni la croissance, ni l'aspect des hyphes au contact de l'extrait de plantules: les phénomènes de toxicité ne semblent atténués, ni par l'accumulation de substances nutritives, ni par la présence d'un microthalle indemne en bordure de la zone expérimentale.

Avec des concentrations de composés phénoliques plus importantes, la dégénérescence du microthalle intervient parfois en moins de 24 heures, le plus

souvent entre le 1er et le 5ème jour. Le cytoplasme des hyphes se vacuolise puis apparaissent de nombreuses gouttelettes lipidiques. Certains fragments de filaments émettent à partir d'une fausse cloison des proliférations internes. Celles-ci progressent dans les hyphes vidées de leur cytoplasme puis dégèrent à leur tour. La paroi des sporocystes et des chlamydo-spores s'épaissit progressivement mais le plus souvent la dégénérescence lipidique de leur cytoplasme n'intervient qu'après environ une semaine d'immersion dans l'extrait de plantule. Aucun de ces organes n'a germé après transfert en boîtes de Petri sur milieu nutritif gélosé en appliquant une technique mise au point précédemment (RIOU et RAVISÉ 1970).

Après 4 à 7 jours de contact avec des solutions peu toxiques, les microcultures transférées en boîtes de Petri peuvent engendrer un thalle d'aspect normal, identique à ceux provenant des microgouttes témoins. Par contre, au delà d'une semaine d'incubation aux doses fongistatiques, même lorsque des filaments ont été émis, toutes les microcultures sont mortes avant leur transfert sur milieu nutritif gélosé.

Les résultats sont analogues à ceux obtenus avec des extraits de plantules de cotonniers, de tomates appartenant à des variétés possédant différents génômes de résistance au *P. infestans*, au *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et aux *Verticillium* (RAVISÉ et TANGUY 1971, RAVISÉ et TRIQUE 1972).

3. Etude de l'action des extraits phénoliques sur les enzymes pectinolytiques

Nous avons vérifié si, comme les extraits de plantules de tomate (RAVISÉ et TRIQUE 1972), ceux des jeunes *Nicotiana* pouvaient agir comme effecteurs sur les exo-enzymes pectinolytiques synthétisés par les deux souches de *P. palmivora* et de *P. parasitica*.

Les expériences sont réalisées avec des extraits de *N. sylvestris*, de *N. alata* et de Samsun NN dont nous avons indiqué la capacité d'inhiber la croissance des thalles. Ces extraits sont inhibiteurs à des concentrations bien plus faibles que celle de la dose fongistatique (tableau 4). Les lyases des deux souches, tant endo-pectine lyase (endo PTE) qu'endo-pectate lyase (endo PATE) deviennent inactives en présence de doses sensiblement équivalentes, de l'ordre du microgramme pour un millilitre d'extrait enzymatique. Le tableau 4 met en évidence de faibles variations de seuils pour les deux groupes d'enzymes pectinolytiques suivant l'origine des extraits incorporés. Avec ceux de *N. sylvestris* et de Samsun NN, le seuil effecteur pour l'endo-PATE est légèrement plus élevé que celui de l'endo-PTE alors que la situation inverse est observée pour *N. alata*. Des différences ont été aussi observées avec les extraits phénoliques de plantules de tomate (RAVISÉ et TRIQUE 1972), il n'est pas actuellement possible de les interpréter.

Discussion

Les recherches de substances phénoliques effectuées sur les plantules de *Nicotiana* révèlent que l'infection par l'une ou l'autre des souches de *Phyto-*

Tableau 4

Détermination des seuils pour lesquels les extraits phénoliques de plantules de *Nicotiana* sont effecteurs des lyases des deux souches de *Phytophthora*.

souches: I = *P. palmivora*; II = *P. parasitica*.

lyases: α = endo-PTE; β = endo-PATE.

Résultats correspondant à l'inhibition de l'activité d'1 ml de solution enzymatique

| | souche I | | souche II | |
|--------------------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | α | β | α | β |
| | μg | μg | μg | μg |
| <i>N. sylvestris</i> plantules inoculées | 0,8 | 1,3 | 0,8 | 1,3 |
| <i>N. alata</i> plantules inoculées | 1,2 | 0,8 | 1,2 | 0,8 |
| Samsun NN extrait global de plantules inoculées | 1 | n.d. | 1 | n.d. |
| Samsun NN extrait hydrolysé (NaOH) de plantules inoculées | n.d. | n.d. | 1 | < 1 |
| Samsun NN extrait global des plantules saines | 1 | < 1 | 1 | < 1 |
| Samsun NN extrait hydrolysé (NaOH) de plantules saines | 1 | 1 | 1 | 1 |

n.d. = non dosé.

phthora s'accompagne de l'augmentation de tous ces composés. En outre, il apparaît dans les tissus des substances nouvelles-coumarines et composé "X" —. Ce phénomène d'accumulation et de production de phénols a été observé chez de nombreuses plantes, en particulier divers *Nicotiana* en réponse à différents troubles provoqués, soit par des agents pathogènes — virus et champignons (ANDREAE 1948, BECKMAN 1971, MARTIN 1958, TANGUY et MARTIN 1971, TANGUY 1971, YU et HAMPTON 1969) — soit par des chocs mécaniques ou nutritionnels (LOCHE 1966). Ces processus concernent aussi bien les plantules que les feuilles de plants âgés.

Les modifications des teneurs en composés phénoliques ne sont pas les seules réactions au parasitisme décelées chez les *Nicotiana*. D'importants changements dans les activités enzymatiques, notamment des peroxydases (VEECH 1968) accompagnent la progression du parasite. Chez le Samsun NN (SIMONS et ROSS 1971), après l'infection virale, la réaction de la plante est décelable sur tous les verticilles foliaires. Elle consiste en une augmentation généralisée du métabolisme oxydatif et de la synthèse des enzymes y participant. SIMONS et ROSS (1971) considèrent que la réaction du Samsun NN n'est pas spécifique d'un seul parasite; nos dosages des composés phénoliques, en corrélation avec les caractères de résistance connus, tendent à confirmer cette impression. De même, STHOLASUTA et al. (1971) ont observé que la synthèse de la phaséoline chez le pois peut-être

déclenchée non seulement par une infection fongique mais aussi par des bactéries, *Pseudomonas phaseolicola* et *Pseudomonas mors-prunorum*, seule la première provoquant des réactions d'hypersensibilité. PIERRE (1971) considère également que les phytoalexines synthétisées par des variétés de haricot résistantes ne sont pas spécifiques d'un parasite mais que les teneurs décelées dans les tissus correspondent à un caractère variétal. Les résultats regroupés dans le tableau 2 vont dans le même sens.

Chez la pomme de terre, DEAHL et GALLEGLY (1970) ont constaté une corrélation entre les teneurs en composés phénoliques dans les feuilles et celles des tubercules chez les variétés résistantes aux races physiologiques 1, 2, 3, et 4 du *P. infestans*. Il est établi pour la luzerne (OLAH et SHERWOOD 1971) que les teneurs en flavonoïdes augmentent après l'infection et qu'une partie des hétérosides sont synthétisés dans les feuilles nécrosées. L'accumulation de scopoline, d'isoquercitrine, de chicoriine dans les tissus de plantules de certaines espèces de *Nicotiana* pourrait présenter des analogies avec les réactions observées chez la pomme de terre et la luzerne.

Si la synthèse des composés phénoliques semble accrue ou initiée par l'intrusion d'un parasite, leur mode d'action sur l'agent pathogène est mal connu. PIERRE (1971) constate que les substances phénoliques du haricot ne sont pas également toxiques pour les *Fusarium* et pour les *Thielaviopsis*. Chez le soja (BIEHN et al. 1968) des dérivés des flavones formés après l'inoculation par l'*Helminthosporium carbonum* ou par des *Alternaria* sont toxiques, à des concentrations variables, pour ces micromycètes et pour des champignons appartenant à trois autres genres. MAHADEVAN et al. (1968) aboutissent à des conclusions analogues pour l'action fongistatique de divers phénols à l'égard du *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*.

Nous avons recherché l'action toxique des extraits de plantules dont nous connaissions la teneur totale en orthodiphénols et les principaux constituants. A ce stade des investigations, il semble que chez les espèces de *Nicotiana* éprouvées (tableau 3), l'évolution des seuils de toxicité corresponde à des modifications qualitatives. Ainsi, pour la variété Samsun NN, les doses fongistatiques des extraits de plantules saines et infectées ne varient pas proportionnellement aux teneurs en phénols totaux. Ces différences apparaissent dans les tests effectués en microcultures. Elles pourraient présenter des analogies avec le blocage des nécroses à la base des plantules qui survivent à l'infection. Nous avons indiqué qu'à la limite des zones altérées, les filaments sont exclusivement intercellulaires et qu'aucune modification anatomique n'est décelable au cours des premiers jours. Des situations analogues ont été observées avec des plants de tomates, notamment de la variété 'X 389' possédant les gènes "Ph et S" de résistance au *P. infestans* et avec plusieurs variétés de coton.

L'incidence des composés phénoliques sur l'activité des enzymes pectinolytiques a été le plus souvent étudiée sur substrat gélosé et en milieu liquide (AKINREFON 1968, MAHADEVAN et REDDY 1968, MOLOT 1970). Nous avons procédé à des essais en milieu liquide (RAVISÉ et TRIQUE 1972) avec des extraits de plantules de tomate pour les 2 souches de *Phytophthora*. Suivant le stade de culture où l'extrait est incorporé, soit la synthèse, soit l'activité des lyases sont inhibées

avec des concentrations environ dix fois plus faibles que celles réduisant la croissance du thalle. Les extraits de plantules de *Nicotiana*, comme ceux de tomate, incorporés aux substrats contenant les substances pectiques et les enzymes à doser, se comportent comme des effecteurs à de très faibles concentrations (tableau 4).

Alors que pour les seuils de toxicité, la nature des composés phénoliques semble intervenir (tableau 3), l'activité des deux groupes de lyases est bloquée avec des concentrations très voisines d'extraits de *N. alata*, *N. sylvestris* ou de Samsun NN. Il se pourrait que dans les tissus de plantules résistantes ou tolérantes, les substances phénoliques contribuent à entraver l'activité des enzymes pectinolytiques avant même d'arrêter la progression des hyphes de l'agent pathogène, limitant ainsi les symptômes. Dans le cas de la verticilliose du cotonnier, MUSSEL et GREEN (1970) indiquent que, chez les variétés résistantes, le parasite peut être retrouvé dans les tissus sans extériorisation des symptômes, l'endopolygalacturonase du parasite n'étant pas décelée. GARBER et PRESLEY (1971), pour le même couple hôte-parasite, rapportent des situations analogues sans toutefois rechercher les enzymes pectinolytiques.

Nous avons observé (RAVISÉ et TRIQUE 1972) dans les tissus de plantules de tomate appartenant à la variété super-marmande, sensibles à la souche IV de *P. parasitica*, qu'une réduction des activités enzymatiques du parasite intervient entre 36 et 48 heures après l'infection, en relation avec un accroissement des teneurs en phénols et de l'activité polyphénoloxydasique. Cette réaction est surmontée par l'agent pathogène. Par contre, dans des plantules de *Lycopersicum pimpinellifolium* hautement résistantes, le blocage de l'activité des enzymes pectinolytiques des 2 souches de *Phytophthora* est associé à la survie. Les dimensions réduites des plantules de tabac ne permettent pas de procéder à de tels essais peu après la levée, stade où elles sont le plus sensibles à ces parasites.

Conclusion

Les analogies observées entre les *Lycopersicum* et les *Nicotiana*, les résultats des tests *in vitro* laissent présumer que les mécanismes de défense des plantules, dans un premier stade, inhiberaient l'activité des enzymes pectinolytiques puis éventuellement la prolifération des hyphes de *Phytophthora*.

Ces hypothèses impliquent que la vitesse de réaction de la plantule, où interviennent probablement les synthèses des substances phénoliques, puisse être, dans de brefs délais, plus importante que la capacité des *Phytophthora* à décomposer ces substances et à progresser dans les tissus. Nous avons constaté qu'après l'inoculation, les plantules de *N. longiflora* et celles de tabac de la variété Samsun ont des teneurs en orthodiphénols peu différentes, mais qualitativement distinctes. Or 85 pour cent des plantules de la variété Samsun succombent en une semaine à l'inoculation par la souche I tandis que 85 pour 100 de celles de *N. longiflora* y survivent.

Les réactions physiologiques semblent correspondre à des différences décelables à la fois par des modifications biochimiques dans les extraits et leur

incidence sur la biologie des *Phytophthora* — croissance, sporogenèse, synthèse d'enzymes pectinolytiques —. Le métabolisme des composés phénoliques, stimulé et modifié par l'intrusion de l'agent pathogène, intervient-il dans les processus complexes qui peuvent aboutir à une rémission ou à la guérison? Il se peut, comme le notent plusieurs auteurs dont RATHMELL et BENDALL à propos de la formation des phytoalexines du haricot, que malgré la stimulation générale des synthèses de substances phénoliques, ce soit une voie séparée ou seulement l'une des chaînes qui contribue à la protection active de la plante.

D'après les analyses effectuées, les modifications sont spécifiques de chaque *Nicotiana* et indépendantes du stade de développement.

Résumé

Chez plusieurs *Nicotiana* ont été décelées, au stade de plantule, des réactions de résistance aux infections expérimentales réalisées avec des souches appartenant à plusieurs espèces de *Phytophthora* de Bary. La survie des plantules est associée à une augmentation importante dans les tissus des teneurs en composés phénoliques, principalement des dérivés de l'acide cinnamique. Plusieurs substances, en particulier des coumarines, sont synthétisées après l'inoculation. Les extraits phénoliques sont toxiques pour les souches de *Phytophthora* éprouvées. L'activité des enzymes pectinolytiques secrétées par ces parasites est inhibée par des concentrations en extraits phénoliques de l'ordre du microgramme par millilitre.

Zusammenfassung

Untersuchungen über phenolische Abwehrreaktionen junger *Nicotiana*-Pflanzen nach Infektion mit *Phytophthora*-Arten

Bei jungen Pflanzen verschiedener *Nicotiana*-Arten wurden Abwehrreaktionen gegenüber verschiedenen *Phytophthora*-Arten festgestellt. In Pflanzen, welche die Infektion überleben, nimmt der Gehalt an phenolischen Verbindungen (vor allem Zimtsäurederivaten) zu. Nach der Infektion werden Cumarine und andere Verbindungen gebildet. Die phenolhaltigen Extrakte sind für die geprüften *Phytophthora*-Stämme toxisch. Die Aktivität der von den Parasiten ausgeschiedenen pektinspaltenden Enzyme wird durch die Phenolextrakte in einer Konzentration von etwa 1 $\mu\text{g/ml}$ gehemmt.

Summary

Study on Phenolic Reactions of *Nicotiana* Plantlets after Inoculation by Strains of *Phytophthora* de Bary

Among several species of *Nicotiana*, as they are still small plantlets, we have detected some reactions showing a resistance against experimental infections with strains belonging to many species of *Phytophthora* de Bary. The fact that

plantlets can survive is connected with an important increase of phenolic compounds within the tissues, mainly issued from cinnamic acid. Several substances, particularly coumarins, are elaborated after inoculation. The phenolic extracts are toxic for the tested strains of *Phytophthora*. The pectinolytic activities of the enzymes elaborated by those parasites, are inhibited by about one microgram of phenolic extract in a millilitre of solution.

Bibliographie

- AKINREFON, O. A., 1968: Phenolic toxicity and the possible role of phenolase of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. *Phytopath. Z.* 63, 153—164.
- ANDREAE, W. A., 1948: The isolation of a blue fluorescent compound from green mountain potato tubers infected with leaf roll virus. *Canad. J. Res.* 26, 31—34.
- APPLE, J. L., 1962: Physiological specialization within *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 52, 351—354.
- BECKMAN, C. H., 1971: The plasticizing of plant cell walls and tylose formation, a model. *Physiol. Plant Path.* 1, 1—10.
- BIHN, W. L., J. KUČ, and E. B. WILLIAMS, 1968: Accumulation of phenols in resistant plant-fungi interactions. *Phytopathology* 58, 1255—1260.
- —, E. B. WILLIAMS, and J. KUČ, 1968: Fungitoxicity of phenols accumulating in *Glycine* max-fungi interactions. *Phytopathology* 58, 1261—1264.
- DEAHL, K. L., and M. E. GALLEGLY, 1970: Laboratory testing of potato tubers for multigenic resistance to late blight. *Phytopathology* 60, 1289.
- GARBER, R. H., and J. T. PRESLEY, 1971: Relation of air temperature to development of *Verticillium* wilt on cotton in the field. *Phytopathology* 61, 204—207.
- GOODSPEED, T. H., 1954: The genus *Nicotiana*. Waltham, Mass., U.S.A. édr.
- LOCHE, J., 1966: Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac. SEITA — Ann. de la direction des études et de l'équipement 3, 15—107.
- MAHADEVAN, A., and M. K. REDDY, 1968: The effect of phenolic compounds on growth, polygalacturonase production and activity of *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*. *Netherl. J. Plant Path.* 74, 87—90.
- MARTIN, C., 1958: Etude de quelques déviations du métabolisme chez les plantes atteintes de maladies à virus. Thèse de doctorat d'état, Faculté des Sciences de Paris, 173 p.
- MOLOT, P. M., 1970: Influence de l'acide p. coumarique sur l'activité des pectinases et des cellulases et sur leur sécrétion par le *Fusarium roseum* var. *graminearum*. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, 270, 2097—2100.
- MULLEN, J. M., and D. F. BATEMAN, 1971: Production of an endopolygalacturonate trans-eliminase by a potato dry rot pathogen, *Fusarium roseum avenaceum*, in culture and in diseased tissues. *Physiol. Plant Path.* 1, 363—373.
- MUSSEL, H. W., and R. J. GREEN, 1970: Host colonization and polygalacturonase production by two tracheomycotic fungi. *Phytopathology* 60, 192—195.
- OLAH, A. F., and R. T. SHERWOOD, 1971: Flavones, isoflavones and coumestans in Alfalfa infected by *Ascochyta imperfecta*. *Phytopathology* 61, 65—69.
- PIERRE, R. E., 1971: Phytoalexin induction in beans resistant or susceptible to *Fusarium* and *Thielaviopsis*. *Phytopathology* 61, 322—327.
- RATHMELL, W. G., and D. S. BENDALL, 1971: Phenolic compounds in relation to phytoalexin biosynthesis in hypocotyls of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant Path.* 1, 351—362.
- RAVISÉ, A., 1968: Etude expérimentale de l'incidence de la nutrition sur l'accomplissement du cycle de Pythiacées parasites de cultures tropicales. *C. R. Acad. Sci.*, 267, ser. D, 1821—1824.
- —, 1970: Etude comparative des aptitudes parasitaires de souches de *Phytophthora* parasites de cultures tropicales. *Agron. Trop.* 25, 1015—1031.

- RAVISÉ, A., 1972: Observations sur la nutrition de souches de *Phytophthora* de Bary parasites de cultures tropicales. *Agron. Trop.* 27, 309—320.
- , 1972: Etude de la sensibilité de plantules de *Nicotiana* au parasitisme de souches tropicales de *Phytophthora* de Bary. *Cahiers de la Maboké* (sous presse).
- , et B. BOCCAS, 1969: Première liste annotée des Pythiacées parasites des plantes cultivées au Congo. *Cahiers de la Maboké* 7, 41—69.
- , et J. TANGUY, 1971: Relations entre les constituants phénoliques de divers *Lycopersicum* Mill. et leur résistance à plusieurs espèces de *Phytophthora* de Bary. *C. R. Acad. Sci.* 272, ser. D, 1252—1255.
- , et B. TRIQUE, 1972: Détermination des enzymes pectinolytiques des 2 souches de *Phytophthora* de Bary. — Variations d'activité dans les tissus de plantules de tomate en relation avec les génomes du résistance. *Agron. trop.* 27, 751—762.
- RIOU, S., et A. RAVISÉ, 1970: Etude des chlamydospores chez quelques espèces de *Phytophthora* de Bary. *Cahiers de la Maboké* 8, 93—106.
- ROGER, L., 1951: *Phytopathologie des pays chauds*. Tomes I et III. Lechevalier Editr., Paris.
- SCHILTZ, P., 1967: Création de *Nicotiana tabacum* résistants à *Peronospora tabacina* Adam. Analyse histologique et biologique de la résistance. Thèse de doctorat d'état, Faculté des Sciences, Bordeaux, No. 203.
- SIMONS, T. J., and A. F. ROSS, 1971: Metabolic changes associated with systemic induced resistance to tobacco mosaic virus in samsun NN tobacco. *Phytopathology* 61, 293—300.
- STHOLASUTA, P., J. A. BAILEY, V. SEVERIN, and B. J. DEVERALL, 1971: Effect of bacterial inoculation of bean and pea leaves on the accumulation of phaseolin and pisatin. *Physiol. Plant Path.* 1, 177—183.
- STOKES, G. W., and C. C. LITTON, 1966: Sources of black shank resistance in tobacco and host reaction to races 0 and 1 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 56, 678—680.
- TANGUY, J., 1970: Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac, souche commune. Thèse de doctorat d'état, Faculté des Sciences, Paris, 136 p.
- , 1971: Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac souche commune (VMT). *Physiol. Vég.* 2, 169—187.
- , et M. GALLET, 1969: Evolution qualitative de certains composés phénoliques lors du déclenchement du phénomène d'hypersensibilité au virus de la mosaïque du tabac. *C. R. Acad. Sci.*, 269, ser. D, 589—592.
- , et —, 1969: Evolution quantitative en fonction du temps des composés phénoliques chez le *Nicotiana xanthi* n.c. infecté à 20 °C. *C. R. Acad. Sci.*, 269, ser. D, 773—776.
- , et C. MARTIN, 1971: Evolution quantitative en fonction du temps des composés phénoliques chez le *N. sylvestris* infecté à 20 °C par le virus de la mosaïque du tabac souche commune et la souche *Aucuba* thermosensible du VMT. *C. R. Acad. Sci.*, 273, Sér. D, 364—367.
- TRIQUE, B., 1971: Pectinases et acide fusarique du *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis* en relation avec la fusariose du palmier à huile. *Oléagineux* 26, 163—168.
- , et A. RAVISÉ, 1971: Enzymes pectinolytiques de souches de *Phytophthora* de Bary parasites de cultures tropicales. *C. R. Acad. Sci.* 273, Sér. D, 1805—1808.
- VEECH, J. A., 1968: The peroxidase enzyme in black shank infected tobacco. *Phytopathology* 58, 888.
- YU, L. M., and R. E. HAMPTON, 1969: Biochemical changes in tobacco infected with *Colletotrichum destructivum* and some associated enzymes. *Phytochemistry* 3, 269—272.

Adresses des auteurs: A. RAVISÉ, Laboratoire de Biologie végétale, 6 Avenue Victor le Gorgeu, 29 N — Brest, et Mlle J. TANGUY, O.R.S.T.O.M., route d'Aulnay, 93 — Bondy (France).