

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER
CENTRE D'ADIOPODOUME (Côte d'Ivoire)

Laboratoire de Phytopathologie

RAPPORT D'ÉLÈVE

Stage effectué au Laboratoire d'Etude et d'Exploitation
du Polymorphisme Végétal associé au C.N.R.S.

Bat. 400 - Faculté des Sciences
91405 - ORSAY CEDEX

**"ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE *SOLANUM TUBEROSUM*
ET *PHYTOPHTHORA INFESTANS*"**

par

Daniel NANDRIS

P L A N

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE *SOLANUM TUBEROSUM* ET *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

	Page
RESUME	3
I. INTRODUCTION	4
II. MATERIEL ET METHODES	4
A. <u>Le matériel végétal</u>	5
1) la pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	
2) <i>P. infestans</i>	
B. <u>Milieus de culture</u>	6
1) Milieu Knop modifié	
2) Milieu de culture et de sporulation de <i>P. infestans</i>	
3) Milieu de germination des grains de pollen de pomme de terre	
4) Milieu de culture et de sporulation de <i>Colletotrichum lagenarium</i>	
C. <u>Techniques</u>	7
1) Inoculation de plantules de pomme de terre par <i>P. infestans</i>	
2) Mode d'obtention d'exsudat de tige	
3) Mode d'obtention de filtrat de germination de zoospores de <i>P. infestans</i>	
4) Préparation d'extraits bruts de zoospores de <i>P. infestans</i>	
5) Caractérisation des phytoalexines de la pomme de terre.	
III. RESULTATS ET DISCUSSION	8
A. <u>Interactions plantules de pomme de terre - zoospores de <i>P. infestans</i></u>	8
1) Observation des confrontations hôte-parasite	
2) Variation dans l'intensité d'attaques compatibles en fonction du génotype de l'hôte	
3) Application du test à d'autres systèmes	
a). Feuilles de plantules de pomme de terre - zoospores de <i>P. infestans</i>	
b). Grains de pollen de pomme de terre - zoospores de <i>P. infestans</i>	
c). Extension à d'autres espèces de plante.	

B. <u>Etude des facteurs impliqués dans les interactions hôte-parasite</u>	11
1) Mise en évidence de substances, préformées par la plante, jouant un rôle dans ses systèmes de défense	
2) Rôle de ces substances dans la pathogénèse	
a). Action sur les sporocystes de <i>P. infestans</i>	
b). Action d'exsudats de tige de pomme de terre sur la colonisation de l'hôte par des zoospores compatibles.	
c). Action des exsudats de tige de pomme de terre sur un champignon non pathogène.	
3) Possibilités d'induction par la spore d'un mécanisme de défense de la plante.	
4) Essai de mise en évidence de facteurs émis par les zoospores impliqués dans les systèmes de reconnaissance entre l'hôte et son parasite.	
a). Filtrats de germination.	
b). Homogénats de spores.	
IV. CONCLUSIONS	19
BIBLIOGRAPHIE	21



RESUME

La confrontation de zoospores de *Phytophthora infestans* avec des portions de tiges de plants miniaturisés de pomme de terre obtenus *in vitro* permet l'observation des phases initiales des interactions entre la plante-hôte et le champignon parasite. La compatibilité ou l'incompatibilité du couple formé, déterminées par les interactions entre les gènes majeurs de résistance de la pomme de terre et les gènes de virulence du parasite, se traduisent respectivement par la colonisation ou la non colonisation des fragments de tige des variétés utilisées. Des observations effectuées dès le début de la confrontation montrent que la durée de motilité des zoospores, leurs positions d'encystement et leur aptitude à germer sont étroitement contrôlées par les interactions géniques précitées au sein du couple formé. La réaction quasi instantanée des zoospores à la présence de l'hôte indique une sensibilité à des substances formées par la plante avant la contamination. En situation d'incompatibilité, ces substances exsudées par une variété donnée de pomme de terre, agissent spécifiquement sur les zoospores en inhibant leur germination et perturbent la colonisation par des zoospores compatibles d'une variété différente de pomme de terre.

A ces interactions initiales succède un mécanisme de défense inductible qui s'installe 22 H après une surinfection par des zoospores de race incompatible ou un homogénat de spores. Il protège durablement la plante contre une nouvelle infection.

L'existence chez la pomme de terre de deux mécanismes de contrôle des interactions avec le *P. infestans* est discutée.

I. INTRODUCTION

Les relations entre la pomme de terre et le *Phytophthora infestans* sont déterminées par des interactions entre les gènes majeurs de résistance de la plante et les gènes de virulence du parasite (BLACK et al., 1953). Les confrontations, effectuées deux à deux, entre les variétés de pomme de terre issues des croisements entre *Solanum tuberosum* et *S. demissum* et des isolats de *P. infestans* conduisent à seulement deux situations. Le couple formé est appelé incompatible lorsque la plante reconnaît comme ennemi l'isolat qui lui est opposé ; les cellules de pomme de terre attaquées meurent et les tissus sains proximaux réagissent en produisant des substances fongitoxiques qui stoppent la progression du parasite. Lorsque la variété est envahie puis progressivement colonisée par le parasite, le couple formé est appelé compatible (KITAZAWA et TOMIYAMA, 1969).

La réaction d'incompatibilité est associée à l'accumulation de terpènes fongitoxiques (phytoalexines). Leur synthèse résulterait d'une perturbation du métabolisme de la plante à la suite d'une agression par une race incompatible de *P. infestans*, de blessures, de stimuli physiologiques ou chimiques, ou encore de la présence d'agents non pathogènes de la pomme de terre (KUC, 1972). Les concentrations optimales de ces phytoalexines ne sont atteintes que 24 à 48 heures après l'inoculation (SATO et TOMIYAMA, 1976). Cette accumulation tardive des phytoalexines confère à ces substances un rôle différé dans les interactions entre la pomme de terre et *P. infestans*. En revanche, les relations "gène pour gène" (FLOR, 1942) mises en évidence par l'analyse génétique et les tests de pathogénie, impliquent l'existence de signaux de reconnaissance fonctionnant dès le contact entre les deux partenaires. C'est la mise en évidence de ces signaux qui a retenu notre attention. Nous rejoignons là, les préoccupations de VARNIS et KUC (1971) qui considèrent que "l'évènement primaire dans la détermination d'une réaction compatible ou incompatible de la pomme de terre à *P. infestans* est la reconnaissance de la race du champignon par l'hôte et (ou) la reconnaissance de la plante par le parasite". Toutes les altérations métaboliques, y compris l'accumulation de phytoalexines résulteraient de cet évènement initial (KUC, 1972).

L'étude des interactions entre la pomme de terre et *P. infestans* a été, jusqu'à présent effectuée essentiellement sur des tranches de tubercules ou sur les pétioles et limbes de feuilles ; l'incompatibilité y est notée par le brunissement de la zone inoculée, le dénombrement des cellules nécrosées ou la caractérisation chimique des phytoalexines, c'est à dire par des manifestations tardives. La mise au point et l'utilisation d'un système de confrontations in vitro "zoospores de *P. infestans* - plant axénique de pomme de terre", nous ont permis de mettre en évidence des manifestations précoces, vraisemblablement en rapport plus direct avec les signaux de reconnaissance.

II. MATERIEL ET METHODES

A. LE MATERIEL VEGETAL

1) La pomme de terre.

L'origine, le génotype, le nom et le mode d'utilisation des diverses variétés de pomme de terre sont résumés dans le tableau I. Les plantules proviennent de repiquages in vitro de noeuds de plants néoformés, originellement issus de bouturage de germes de tubercules selon une technique (GRENAN, 1976) développée au laboratoire du

Professeur NOZERAN. Leur morphologie est miniature et homogène d'une culture à l'autre et les gènes majeurs de résistance s'expriment dans ces conditions de culture, d'une manière identique à ceux de la variété d'origine.

VARIETE	GENOTYPE	ORIGINE
BINTJE B.F. 15	r r	Etablissement CLAUSE 91 Brétigny sur Orge et Fédération des producteurs de plants de pomme de terre de LANDERNEAU
BLACK 1 BLACK 4	R ₁ R ₄	P. MADEC, C.N.R.A., LANDERNEAU
HOUMA KENNEBEC MERIMAC	r R ₁ R ₁	Dr R.M. ZACHARIUS; U.S.D.A. Pennsylvania, U.S.A.

Tableau 1 - Nom, génotype et origine des variétés de pomme de terre utilisées.

Ces plants axéniques sont obtenus dans des tubes à essai de 2,5 cm de diamètre, longs de 25 cm et remplis de 4 à 5 cm d'une solution gélosée du milieu KNOP modifié. Les enceintes climatiques sont réglées à 20°C avec une photopériode de 12 h, l'éclairage étant fourni par des tubes de lumière blanche d'intensité lumineuse 3.500 lux. Dans ces conditions les plantules issues du semis d'un noeud mesurent une vingtaine de cm pour 10 à 15 entrenoeuds formés dans un délai moyen de 45 jours.

2) *P. infestans*.

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary est un Phycomycète hétérothallique. La propagation de cette espèce est assurée par les sporocystes caduques libérant des zoospores. Les races (pathotypes) 0, 1 et 4, obtenues du Dr. R.M. ZACHARIUS (USDA, Pennsylvanie, USA) sont du signe A₁.

Les cultures de *P. infestans* développées sur un milieu nutritif gélosé à base de petits pois sont incubées à l'obscurité dans une enceinte dont la température est réglée à 20°C et l'hygrométrie à 60%. Dans ces conditions, à partir du semis central d'une bouture découpée avec un emporte-pièce de 8 mm de diamètre, les boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre sont remplies en 8 jours d'un feutrage mycelien blanc. L'optimum de sporulation est atteint entre 7 et 15 jours pour les 3 pathotypes. La maturation des zoosporocystes caduques récoltés dans 5 ml d'eau distillée stérile s'accomplit en 2 h à 10°C. Après ce refroidissement l'expulsion des zoospores biflagellées est obtenue à 20°C. La durée de la phase motile varie de 30 à 120 mn dans l'eau distillée ; elle est suivie de l'encystement et enfin de la germination des cellules.

B. MILIEUX DE CULTURE

1) Milieu KNOP modifié.

- MACROELEMENTS

. Eau distillée	1.000 ml.
. Ca (NO ₃) ₂	500 mg.
. K H ₂ PO ₄	125 mg.
. Mg SO ₄	125 mg.
. K NO ₃	625 mg.

- MICROELEMENTS de solution de Berthelot

Solution A

. Mn SO ₄ , 7 H ₂ O	2 g.	} Pour 1.000ml. H ₂ O
. KI	0,5 g.	
. Ni Cl ₂ , 6 H ₂ O	0,05 g.	
. CO Cl ₂ , 6 H ₂ O	0,05 g.	
. Ti O ₂ SO ₃ , 5 H ₂ O	0,2 g.	
. Zn SO ₄ , 7 H ₂ O	0,1 g.	
. Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0,05 g.	
. Be SO ₄ , 4 H ₂ O	0,1 g.	
. H ₃ BO ₃	0,05 g.	
+ 0,5 ml. H ₂ SO ₄ à 66° Bé.			

Prendre 50 ml. de la solution A et compléter à 1.000 ml.
Puis prendre 10 ml. de cette nouvelle solution pour 1.000 ml.
de milieu.

Solution B

Fe₂ (SO₄)₃ , 9 H₂O 50 g.
dans 1.000 ml. H₂O + 0,5 ml. H₂ SO₄ à 66° Bé.

Prendre 50 ml. de la solution B et compléter à 1.000 ml.
Puis prendre 10 ml. de cette nouvelle solution pour 1.000 ml.
de milieu.

. Saccharose	20 g.
. Agar	8 g.

Le pH. est ajusté entre 6,1 et 6,3

2) Milieu de culture et de sporulation de *P. infestans*.

Ce milieu naturel est composé d'un mélange ($\frac{2}{3}$, $\frac{1}{3}$) de petits pois et de pois chiches, macérés dans l'eau à raison de 100 g/l. durant 2 heures à 80°C. Il est gélosé à 20 g/l puis autoclavé 2 fois 1 h à 120°C, à 24 h d'intervalle.

Les souches sont régulièrement purifiées de leurs contaminations bactériennes par un passage sur ce milieu enrichi en antibiotiques : 250 ppm de rifampicine, 200 ppm de sulfamide et 0,2 ml/l d'une préparation d'acides polyporéniques A et C et d'acide sulfurénique (extraits de *Polyporus betulinus* et *P. sulfurens* fournis par ARANDA, laboratoire de synthèse organique de l'École Polytechnique, Palaiseau).

Les cultures de *P. infestans* sont autoclavées avant d'être éliminées du laboratoire.

3) Milieu de germination des grains de pollen de pomme de terre.

Pour 1 l d'eau distillée, Saccharose 100 g, Agar 10 g, Acide borique 10^{-5} g/l, pH ajusté à 7,5.

4) Milieu de culture et de sporulation de *Colletotrichum lagenarium*.

Le bouillon à 20 g/l de farine d'avoine, gélosé à 12 g/l est un bon milieu de culture et de sporulation pour *C. lagenarium*. Il est stérilisé à 120°C pendant 40 minutes.

C. TECHNIQUES

1) Inoculation de plantules de pomme de terre par *P. infestans*.

Les confrontations sont effectuées dans des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre contenant une solution de KNOP gélosée. Des fragments longs de 10 à 15 mm de tiges de plants miniaturisés sont déposés sur le milieu et reçoivent chacun 0,05 ml d'une suspension à 10^5 zoospores par ml. Ces confrontations sont incubées à 20°C et à l'obscurité.

2) Mode d'obtention d'exsudat de tige.

Des fragments calibrés de tiges issus de la segmentation de 2 plantules sont incubés 24 h à 20°C dans 2 ml d'eau stérile. Après avoir récupéré les portions de tige, les diffusats des différentes variétés "r" R1, R4 etc, sont utilisés à l'état brut, sans filtration ni centrifugation.

3) Mode d'obtention de filtrat de germination de zoospores de *P. infestans*.

Après leur expulsion des sporocystes, les zoospores (10^5 /ml) sont conservées dans 10 ml d'eau stérile durant 12 heures à 20°C. Ce délai autorise l'émission des tubes germinatifs. Le filtrat est obtenu par passage de la suspension sur verre fritté n° 4.

4) Préparation des extraits bruts des zoospores de *P. infestans*.

Les extraits bruts sont obtenus à l'aide d'un broyeur à billes de verre (BRAUN type 2876) réfrigéré par un dégagement de gaz carbonique. Après agitation au VORTEX durant 90 secondes pour induire l'encystement, 20 ml d'une suspension titrée à 10^6 zoospores/ml sont introduits dans un flacon contenant 20 g de billes de verre de diamètre 0,5 mm. Le flacon câfé dans l'appareil, subi un prérefroidissement de 2 s puis est agité à la petite vitesse de l'appareil pendant 20 s, il est une nouvelle fois refroidi 2 s puis agité 60 s à la grande vitesse de l'appareil avec un refroidissement de 2 s toutes les 10 s. L'homogénat brut obtenu est utilisé extemporanément.

5) Caractérisation des phytoalexines de la pomme de terre.

Nous avons utilisé la méthode d'extraction mise au point au laboratoire par Claude de VALLAVIEILLE (1976).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

A. INTERACTIONS PLANTULES DE POMME DE TERRE - ZOOSPORES DE *P. INFESTANS*

1) Observations des confrontations hôte-parasite.

L'observation microscopique effectuée immédiatement après la mise en contact des deux partenaires révèle un comportement différent des zoospores selon que l'on s'adresse à un couple compatible ou à un couple incompatible. Ces différences portent sur la durée de la motilité des zoospores, les positions où elles s'encystent et leur aptitude à germer. Elles sont résumées dans le tableau II. Elles concernent les couples compatible Merimac (R_1) et la race 1 et incompatible Merimac (R_1) et la race 4, mais les résultats qui vont être énoncés ont également été vérifiés dans différentes combinaisons effectuées entre les variétés et les pathotypes qui étaient à notre disposition (voir tableau I).

	Durée de la phase mobile	Lieu d'encystement	Aptitude à la germination des cellules encystées	Colonisation de l'hôte
Témoin	de 30 à 120 mn	aléatoire	bonne	-
Couple compatible	15 minutes	formation d'une frange autour de l'hôte	bonne	effective
Couple incompatible	5 minutes	Les zoospores s'encystent loin du fragment végétal	altérée	pas de colonisation

Tableau II - Résumé d'observations effectuées lors d'interactions compatibles et incompatibles sur le comportement des zoospores.

Interactions compatibles : (gène R- gène de virulence correspondant et gène "r" - toutes races de zoospores).

En présence de l'hôte, les zoospores nagent sur le milieu KNOP durant environ 15 min. On peut noter dans leurs mouvements, un tropisme vers la tige qui se traduit, lors de l'encystement par la formation d'une frange de spores tout autour du fragment végétal (figure 1). Les filaments germinatifs sont alors émis. Quatre jours après le début de l'infection, les hyphes mycéliennes ont différencié à partir de l'hôte de nombreux zoosporocystes (figure 2). Au bout de 8 à 10 jours de contact entre l'hôte et le parasite compatible on observe macroscopiquement un feutrage mycélien blanc sur toute la portion de tige, celui-ci traduisant sans ambiguïté la colonisation de la variété-hôte par la race de *P. infestans* (figure 4).

Interactions incompatibles : (gène de résistance - gène d'avirulence). Au contact d'un hôte incompatible la durée de motilité des zoospores n'excède pas 5 min. Celles-ci s'encystent à distance de l'hôte, leur aptitude à germer est d'autant moins bonne qu'elles en sont proches (figure 3). Dix jours après le début de l'infection, le champignon n'a pas proliféré et la tige ne présente aucune altération (figure 4).

En absence de l'hôte (témoin), les zoospores nagent de 45 à 60 minutes sans tropisme apparent. Leur position d'encystement est homogène sur le milieu. Les spores initient un filament germinatif dont la croissance s'arrête très rapidement.

Le positionnement particulier des zoospores n'est pas fonction de la forme du support végétal. En effet si l'on remplace la tige par un tube de verre de même taille, les zoospores s'encystent de façon tout à fait homogène.

Confrontées à des fragments de plantes bouillies, les zoospores de *P. infestans*, quelle que soit leur race, vont coloniser les tiges. Ceci indique que la spécificité des interactions que nous venons de décrire est bien le fait d'un mécanisme biologique nécessitant l'intégrité de l'hôte.

En résumé, ce système expérimental n'autorise la croissance du champignon que dans le cas d'une compatibilité génique avec l'hôte. En absence d'hôte ou en cas d'incompatibilité, les spores de *P. infestans* ne peuvent se développer et former un thalle.

2) Variation dans de l'intensité d'attaques compatibles en fonction du génotype de l'hôte.

Nous venons de voir qu'en fonction de la compatibilité ou non entre les génotypes de l'hôte et du parasite, le devenir des confrontations formées se traduit par la colonisation de l'hôte ou la non-prolifération du champignon. L'observation d'un grand nombre de confrontations nous a permis de noter pour les couples compatibles des différences dans l'intensité des attaques (figure 5). En effet lorsque la variété de pomme de terre possède un gène de résistance verticale, l'attaque bien que nette et sans ambiguïté se traduit par une masse d'hyphes et de sporocystes formés inférieure à celle obtenue lors de la colonisation d'une variété "r". Cette observation qui se reproduit pour les différentes variétés "r" et R utilisées est confortée par les résultats de MARTIN et ELLINGBOE (1976). En effet

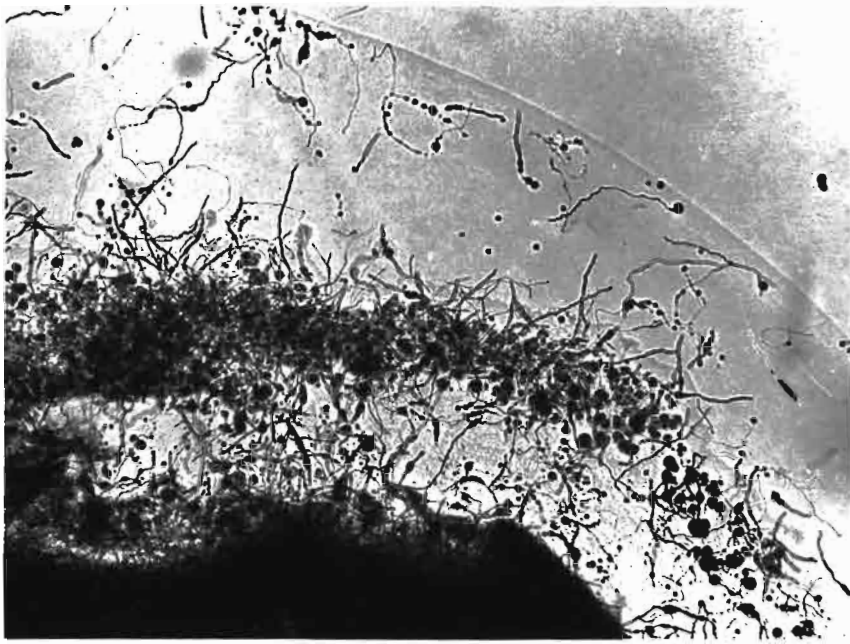


Figure 1 - Observation d'une confrontation compatible après 24 heures d'incubation (x 50).

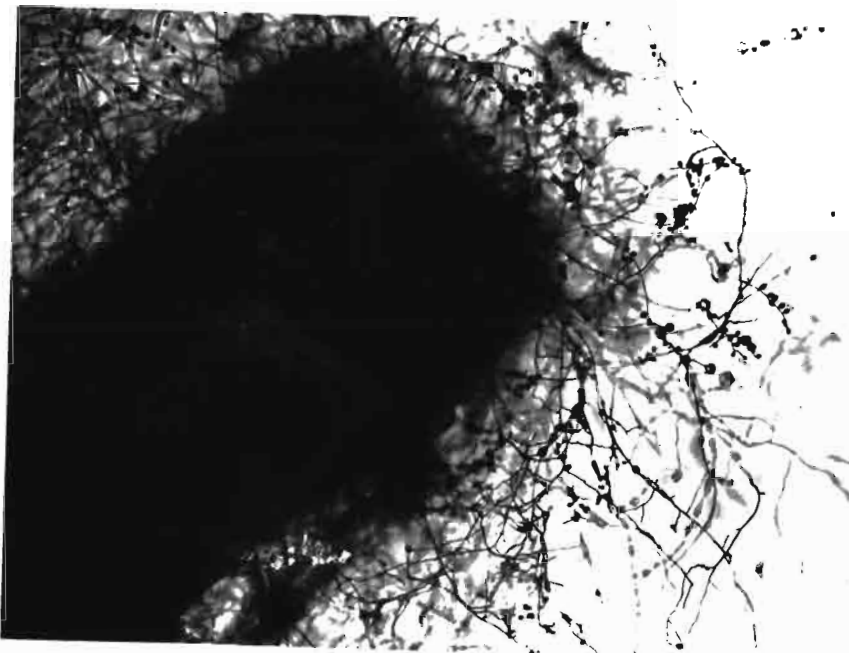


Figure 2 - Colonisation d'une tige compatible et différenciation de zoosporocystes après 8 jours d'incubation (x 50).

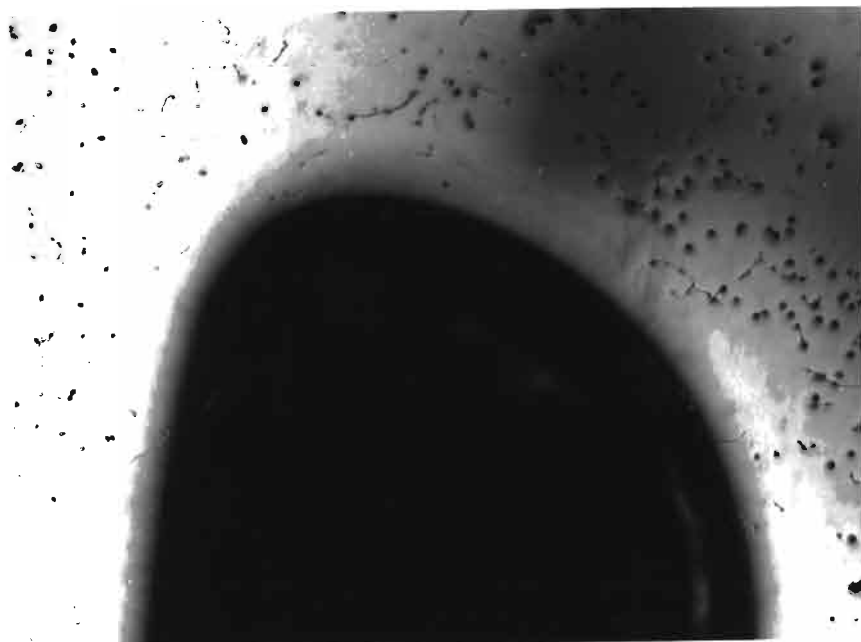


Figure 3 - Observation d'une confrontation incompatible après 24 heures d'incubation (x 40).

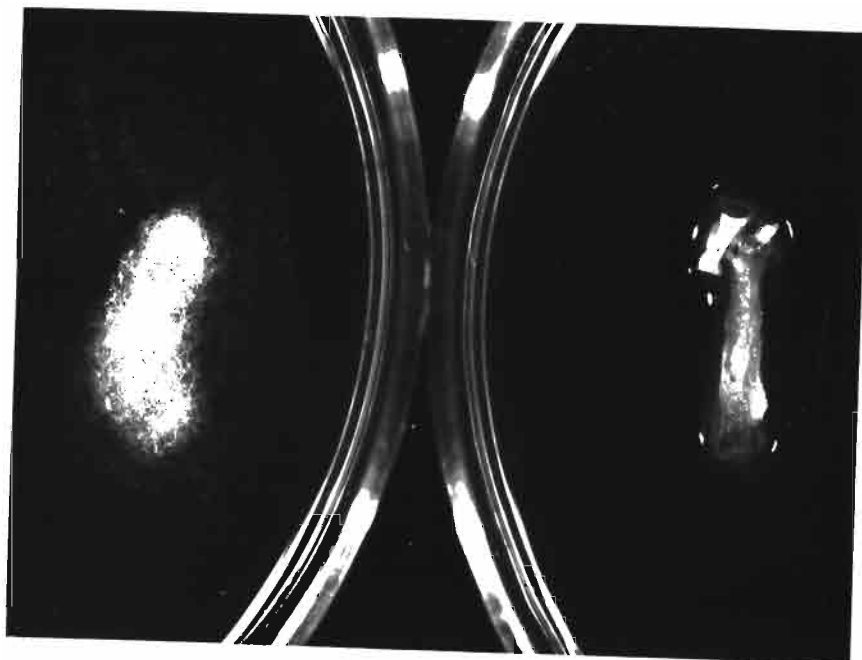


Figure 4 - Observation macroscopique de confrontations compatible et incompatible après 8 jours d'incubation (x 3).

à gauche : plantule Merimac R₁ et race 1.

à droite : plantule Merimac R₁ et race 4.

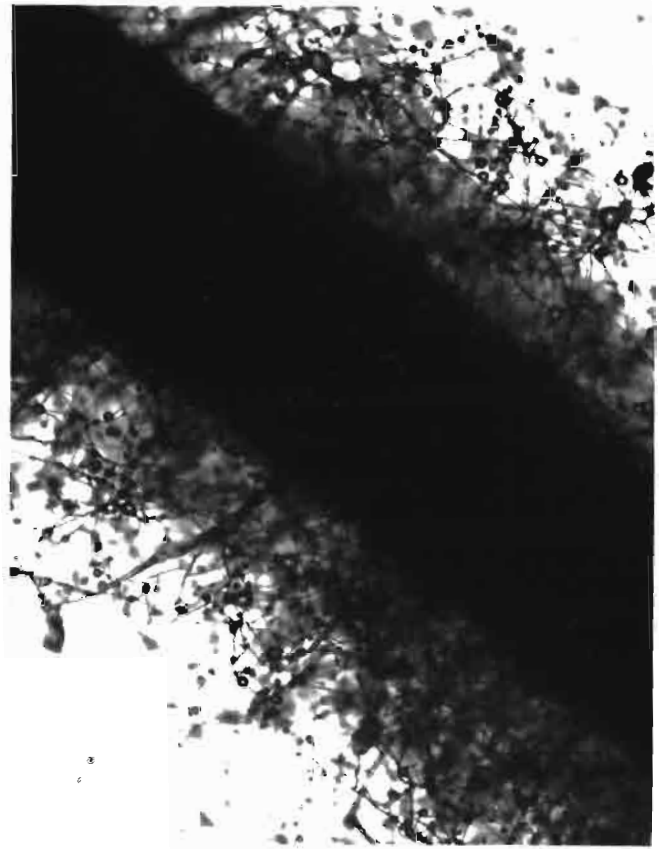
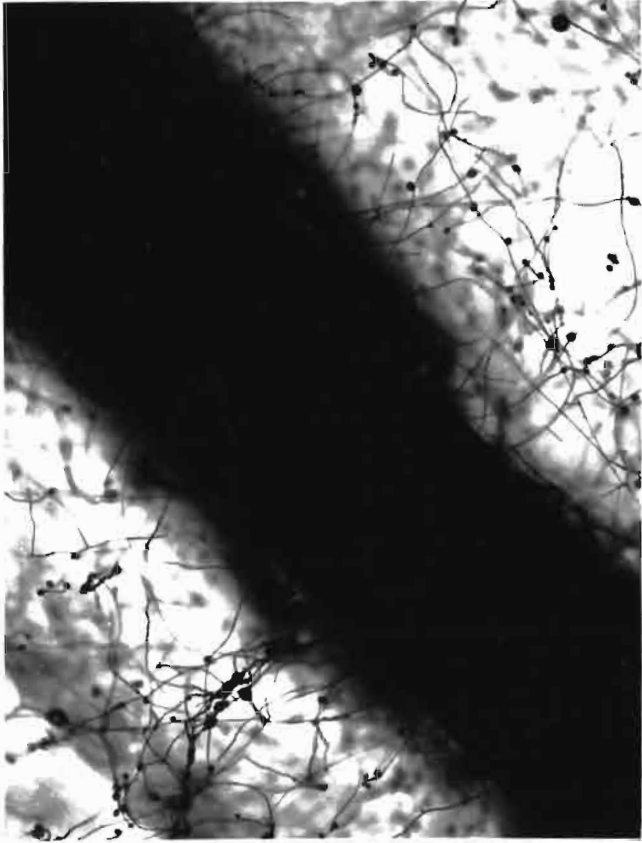


Figure 5 - Différences entre attaques génétiquement compatibles
(t = 4 jours) x 50.

à droite : Houma/zoospores de race 1

à gauche : Kennebec/zoospores de race 1.

sur le couple *Erysiphe graminis* f. sp. tritici/blé, ils constatent qu'une souche du parasite a un développement inférieur sur une variété hôte possédant le gène majeur pm4 par rapport à celui qu'a la même souche sur une variété possédant l'allèle Pm4 du même gène. Ce qui semble être le fait de degrés différents dans la résistance horizontale des variétés-hôte "r" ou R, pourrait être dû à l'action spécifique du gène R sur la race compatible. La nature de ce phénomène demeure pour l'instant inexpliquée.

3) Application du test à d'autres systèmes.

a). Feuilles de plants axéniques de pomme de terre - zoospores de *P. infestans*.

L'expression spécifique de la résistance ou de la sensibilité des tiges de pomme de terre au *P. infestans* se fait aussi au niveau des feuilles. Dans les essais préliminaires, nous les avons utilisées pour des confrontations. Les résultats confirment ceux obtenus avec des tiges. Cependant la lecture des expériences étant relativement moins nette, nous avons abandonné les manipulations avec ce type de matériel.

b). Grains de pollen de pomme de terre - zoospores de *P. infestans*.

Nous avons confronté sur un milieu de germination, des grains de pollen issus des différentes variétés de pomme de terre, et des zoospores. Comme précédemment nous avons observé la durée de motilité des zoospores et leur germination.

Les spores seules sur le milieu de germination nagent durant environ 30 min. Les zoospores compatibles (Pollen R4/zoospores de race 4 - Pollen R1/zoospores de race 1) s'encystent en 15 minutes. Elles initient des tubes germinatifs qui se dirigent vers le pollen ; au contact du tube germinatif du pollen les spores différencient un appressorium à partir duquel s'effectue la pénétration (figure 6). Les zoospores incompatibles (Black R4 - race 1 et Kennebec - race 4) s'encystent presque immédiatement après leur dépôt sur le milieu gélosé. Les spores germent également mais les tubes germinatifs ne présentent dans leur croissance aucun tropisme vers les grains de pollen (figure 7). Il faut signaler que cette sélectivité de la réponse des zoospores au génotype de l'hôte ne s'exprime pas pour des grains de pollen non germés.

Nous rapportons ici les premiers résultats obtenus sur des confrontations pollen-zoospores. Une étude plus approfondie s'avère intéressante, mais pour l'instant, du fait de la difficulté d'obtention de grains de pollen germant en dehors des conditions écologiques naturelles, nous n'avons pu mener à bien d'autres expériences.

c). Extension à d'autres espèces de plantes.

Il nous a paru intéressant de savoir, au vu des résultats obtenus sur la pomme de terre, si notre système expérimental pouvait s'appliquer à d'autres espèces de plantes. En préalable à cette étude nous avons réalisé en tubes à partir de graines, des plants axéniques de tomate (hôte potentiel du *P. infestans*) et de melon (hôte non potentiel du *P. infestans*). Techniquement les confrontations ont été effectuées suivant le protocole décrit au paragraphe C1.

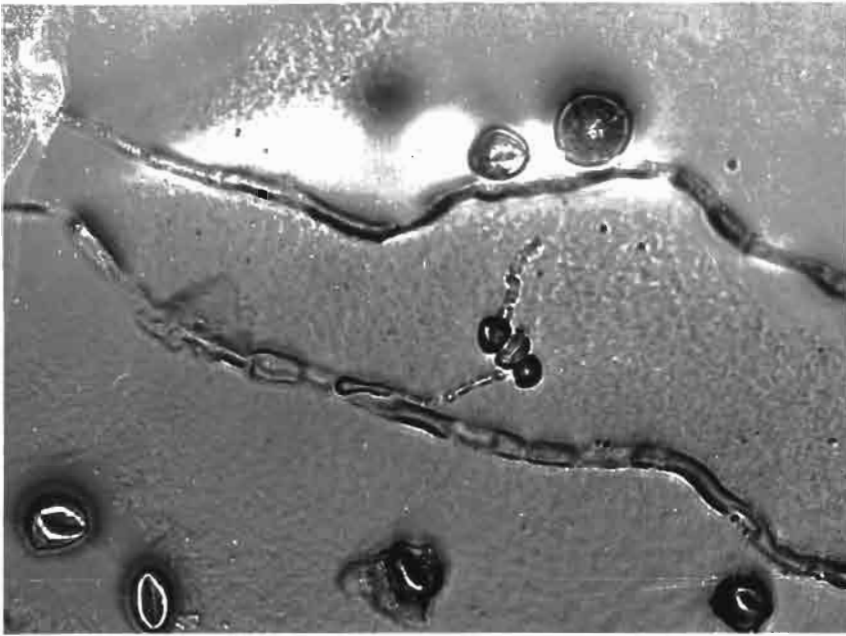


Figure 6 - Confrontation Pollen - Zoospores : Couple compatible
Pollen de la variété Black R1/zoospores de la race 1.

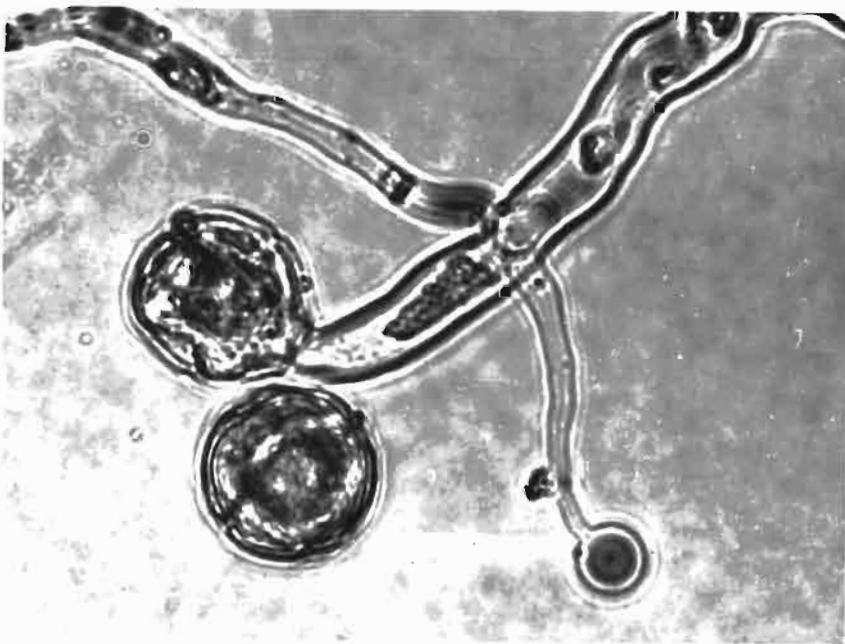


Figure 7 - Confrontation Pollen - Zoospores : Couple incompatible
Pollen de la variété Black R4/zoospores de la race 1.

: Melon - *P. infestans*. Quelle que soit la race de zoospores utilisée (race 0, 1, ou race 4), le comportement du champignon par rapport aux tiges de melon est tout à fait comparable au cas décrit au paragraphe A1 pour des zoospores sur milieu Knop sans hôte végétal. La durée de motilité et l'encystement des spores sont identiques à ce témoin. Les tiges de melon ne sont pas colonisées par le champignon.

. Tomate - *P. infestans*. Le comportement du champignon (race 1 ou race 4) est tout à fait comparable à ce que nous avons décrit pour un couple compatible pomme de terre - *P. infestans*. La durée de motilité est de 10 mn. Les portions de tige sont colonisées par la race 1, comme par la race 4, au bout de 4 à 6 jours.

Il s'avère possible de mettre rapidement en évidence, par ce système expérimental, l'aptitude ou l'incapacité du parasite à coloniser une espèce de plante. La compatibilité ou l'incompatibilité du couple formé s'exprime, comme précédemment, par des résultats du type "tout ou rien".

B. ETUDE DES FACTEURS IMPLIQUES DANS LES INTERACTIONS HOTE-PARASITE

1) Mise en évidence de substances préformées par la plante jouant un rôle dans ses systèmes de défense.

Dès la mise en contact avec un hôte sensible ou résistant les zoospores de *P. infestans* présentent un comportement différent. La rapidité de cette réaction, d'une part, rend improbable l'intervention d'un mécanisme de défense inductible chez la plante (du type phytoalexines par exemple), et suggère d'autre part, l'action de substances exsudées par la plante. Pour démontrer l'existence de telles substances et déterminer si leur excrétion est antérieure ou postérieure à l'inoculation, nous avons fait succéder, sans contact entre eux, la plante puis les zoospores sur un même milieu.

Des fragments de tige des variétés Kennebec (R1) et Black 4 (R4) sont incubés à l'obscurité 24 h à 20°C dans une goutte d'eau stérile déposée à la surface d'une plaque de milieu KNOP. A l'issue de ce délai les portions de tiges sont retirées et remplacées par 0,05 ml d'une suspension de zoospores de race 1.

Que la combinaison soit compatible ou incompatible, les zoospores naissent de façon aléatoire sans tropisme apparent pendant 15 à 20 mn et s'encystent. Des différences, portant sur l'aptitude à germer, sont cependant décelables au bout de 24 heures d'incubation après le dépôt des zoospores sur le milieu (figure 8). Au contact de l'exsudat incompatible de la variété Black 4 (R4) la germination des spores est très réduite, voire nulle. Confrontées à un exsudat de Kennebec les spores ont une croissance tout à fait comparable à celle du témoin.

Ces résultats ont été retrouvés pour différentes combinaisons compatibles ou incompatibles. Les exsudats issus de variétés dépourvues de gène majeur de résistance n'ont pas d'effet sur les zoospores des races 0, 1 et 4 de *P. infestans*. Ces expériences montrent la sensibilité spécifique des zoospores de *P. infestans* à des substances exsudées par les différentes variétés de pomme de terre possédant un gène R, et ceci sans qu'il n'y ait eu de contact avec le parasite.

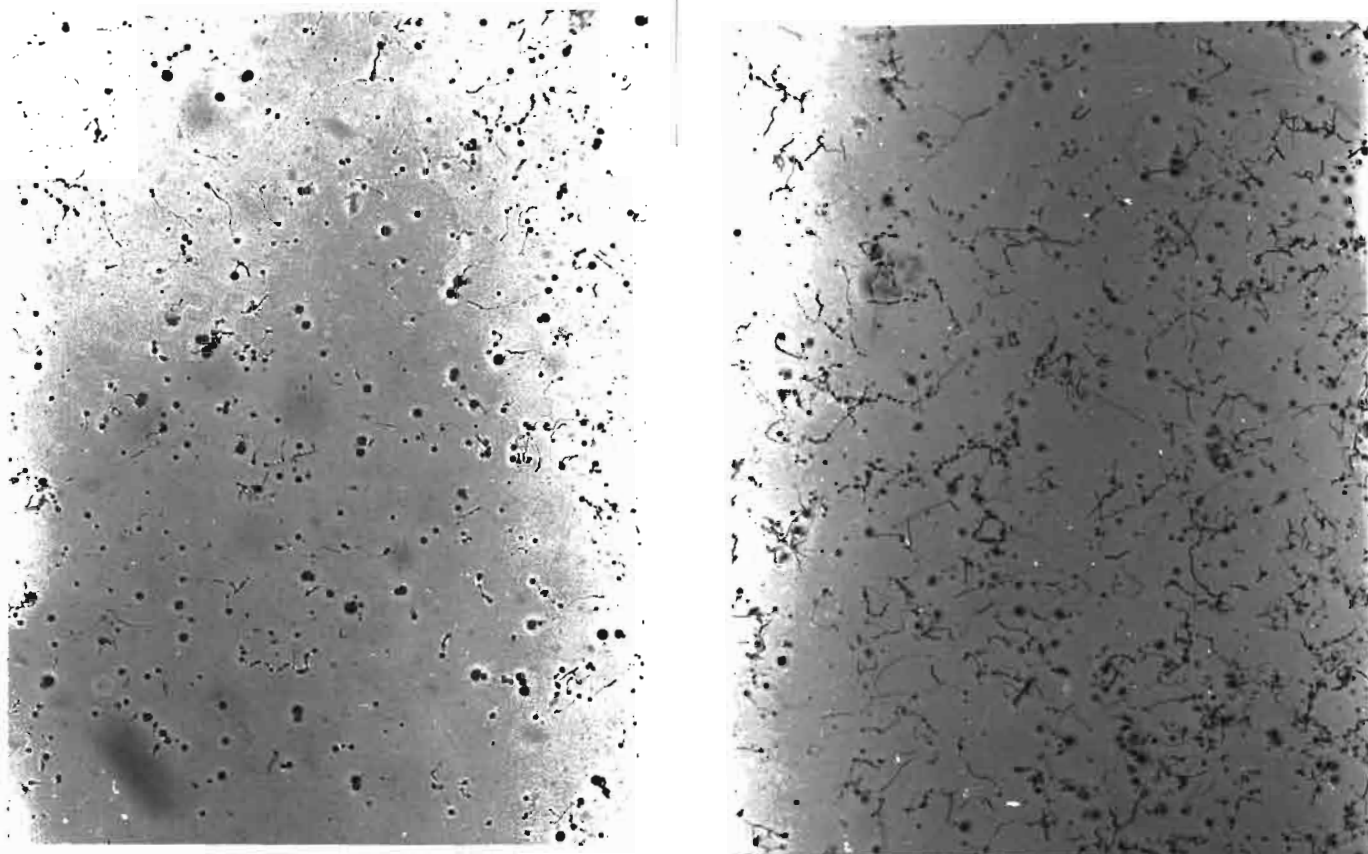


Figure 8 - Mise en évidence de substances excrétées par la plante.
Sensibilité spécifique des zoospores à ces exsudats après
24 heures d'incubation (x 50).

à droite : zoospores de la race 1 en présence d'un exsudat
de la variété compatible Kennebec (R1)

à gauche : zoospores de la race 1 en présence d'un exsudat
de la variété incompatible Black 4 (R4).

2) Rôle de ces substances dans la pathogénèse.

a). Action d'exsudats de tige sur les sporocystes de *P. infestans*.

Les substances contenues dans un exsudat d'une variété incompatible par rapport à une race donnée de zoospores, altèrent leur germination. Il est intéressant de déterminer si cette action inhibitrice s'applique aux zoosporocystes qui sont dans les conditions naturelles les propagules infectieuses. Durant le temps de contact avec la plante, des conditions écologiques précises régissent la maturation et l'expulsion des zoospores. Dans quelle mesure l'exsudat de plante ne peut-il pas perturber cette étape fondamentale de la biologie du parasite ?

Expérimentalement nous avons déposé simultanément sur le milieu de confrontation, une goutte de suspension de sporocystes à 1000/ml et une goutte du diffusat de plante. Des couples compatibles et incompatibles ont été formés. Les boîtes de Pétri contenant sporocystes et diffusat sont incubées au froid à + 10°C durant 2 heures pour provoquer l'expulsion des zoospores.

Dans tous les essais, compatible comme incompatible (Kennebec/sporocystes race 1 et BlackR4/ sporocystes race 1) l'expulsion des zoospores s'accomplit d'une manière comparable au témoin sporocystes sans diffusat.

Il convient de remarquer que le sporocyste, à l'inverse de la zoospore possède une paroi vraie. Il est donc possible d'envisager qu'une mauvaise perméation des substances exsudées ou une absence de récepteur spécifique sur cette paroi soient responsables de cette insensibilité apparente du sporocyste aux exsudats des tiges de pomme de terre.

b). Action d'exsudats de tige de pomme de terre sur la colonisation de l'hôte par des zoospores compatibles.

Nous venons de voir qu'un diffusat incompatible altère le développement de spores de *P. infestans*. Quel peut être l'effet d'un tel diffusat sur un couple tige-zoospores ? Pour répondre à cette question, nous avons complété des couples compatibles et incompatibles par, respectivement, des diffusats de la variété Houma ("r"), de la variété Kennebec et de la variété Black 4. Les lots témoins reçoivent de l'eau stérile.

Couples formés	Diffusat R ₁	Diffusat R ₄	Diffusat "r"
Plante "r" + Zoospores de race 1	+	+	+
Plante R ₁ + Zoospores de race 1	+	-	+
Plante R ₄ + Zoospores de race 4	-	+	+
Plante "r" + Zoospores de race 4	+	+	+

Tableau III - Devenir de l'interaction entre tige en survie Zoospores compatibles, diffusat de plante.

+ = colonisation de l'hôte
- = échec de l'infection

plante "r" = Houma
plante R₁ = Kennebec
plante R₄ = Black 4.

On observe que des zoospores au contact d'un diffusat issu d'une variété incompatible ne colonisent pas la tige (compatible) sur laquelle elles sont déposées. Cette protection, du fait de l'action du diffusat n'est acquise que pour les variétés possédant un gène majeur de résistance. Plus précisément l'effet inhibiteur du diffusat sur les zoospores (rapporté au paragraphe B1) - se maintient et interdit toute colonisation quand la plante possède un gène R, - semble supprimé pour, ou par, une variété "r", qui est alors colonisée par les zoospores. Cet échec de l'infection d'une plante R compatible par des zoospores au contact du diffusat incompatible est observable seulement à partir de 2 jours de contact entre les 3 composantes (Plante - diffusat - zoospores). En effet, on note durant les premières heures de contact la formation d'une frange de spores tout autour du fragment de tige. Ainsi que nous l'avons décrit au paragraphe A1, ceci traduit une compatibilité initiale entre les génotypes de la plante et du parasite dont le devenir normal semble ensuite perturbé par le diffusat.

De plus il s'avère, qu'à l'inverse des variétés R, un diffusat d'une variété "r" n'a pas d'effet notable sur une interaction compatible.

Ces données nous permettent de faire les remarques suivantes :

Le génotype des variétés - R ou "r" s'exprime spécifiquement par le mode d'action différent des diffusats. Ainsi un même couple (plante R1 - zoospores de race 1) confronté à un diffusat R4 ou à un diffusat R1 sera incompatible ou compatible. Il serait intéressant de vérifier ces résultats avec des diffusats R2, R3 ou R1R4 etc. .

En ce qui concerne le mode d'action des diffusats plusieurs hypothèses peuvent être envisagées.

- La modification de l'interaction initialement compatible est uniquement le fait de l'action du diffusat sur les zoospores. L'altération que subissent alors les spores permet à la plante possédant un gène R de reconnaître cette race (initialement compatible) comme étant un agresseur incompatible et entraîne en retour la mise en place des systèmes de défense de la plante.

Dans cette hypothèse, la colonisation d'une variété "r" par le même couple "zoospores-diffusat incompatible" pourrait s'expliquer par l'absence de système de reconnaissance spécifique au *Phytophthora* dans une variété sans gène majeur de résistance.

- La modification de l'interaction initialement compatible est le fait de l'action du diffusat incompatible sur la plante compatible. Dans ce cas, on peut envisager que le diffusat de plante R, outre les substances agissant spécifiquement sur les zoospores, doit contenir un "facteur" nécessaire à la reconnaissance par une plante d'un agresseur incompatible ; le diffusat d'une variété "r" en serait alors dépourvu.

Pour essayer de trancher entre ces hypothèses, deux expériences ont été mises en place. Nous avons repris le protocole précédent qui combinait les trois composantes - diffusat - plante - zoospores - pour, cette fois, décaler dans le temps l'apport de la plante ou l'apport des zoospores. Les résultats de ces deux expériences sont regroupés dans le tableau IV.

Couples formés t = 0 jour	Variété de plante ou race de zoospores apportées à t = 2j.	Devenir de l'inter- action t = 8 jours
diffusat R ₄ + zoospores 1	plante R ₁	-
diffusat R ₄ + zoospores 1	plante r	+
diffusat R ₄ + zoospores 4	plante R ₄	+
diffusat R ₄ + zoospores 1	.	-

diffusat R ₁ + zoospores 4	plante R ₄	-
diffusat R ₁ + zoospores 4	plante r	+
diffusat R ₁ + zoospores 1	plante R ₁	+
diffusat R ₁ + zoospores 4	.	-
diffusat R ₁ + plante R ₄	zoospores 4	-
diffusat R ₄ + plante R ₁	zoospores 1	-

Tableau IV - Action du diffusat sur la spore et, ou, protection directement induite dans la variété hôte par le diffusat incompatible ?

Quels que soient les couples formés, les résultats obtenus ne diffèrent aucunement par rapport à ceux du tableau III. Comme précédemment, et malgré le décalage apporté dans l'interaction entre les trois composantes, le diffusat incompatible modifie le devenir des seuls couples mettant en jeu une variété R. Un fait doit être noté cependant. Les lots où la plante "r" est apportée après deux jours de contact du diffusat incompatible - zoospores présentent, une colonisation normale des tiges après 8 jours. C'est dire que l'action de diffusat sur les zoospores décrit au paragraphe B1 n'est pas létale. L'inhibition des spores mise en évidence sur milieu sans hôte végétal, se trouve levée pour une variété "r" de pomme de terre.

En conclusion, le décalage dans le temps de l'apport de la plante ou des zoospores n'apporte aucune modification dans l'expression des résultats discutés au paragraphe précédent (tableau III). Cette impossibilité à découpler l'effet particulier du diffusat sur les zoospores de celui du diffusat sur la plante ne nous permet pas de trancher entre les deux hypothèses formulées plus haut quant à son mode d'action.

c). Action d'exsudats de tige de pomme de terre sur un champignon non pathogène.

Pour ces expériences, nous avons utilisé une souche de *Colletotrichum lagenarium*. Des gouttes d'une suspension à 10³ conidies/ml ont été déposées sur milieu avoine au contact de gouttes de l'exsudat des variétés Houma "r", Kennebec (R₁), Black R₄. La croissance des cultures a été suivie par rapport au témoin *Colletotrichum*. La germination des conidies au contact d'exsudats R₁, R₄, comme de l'exsudat de variété "r" n'est pas initiée avant le troisième jour. La croissance du thalle est ensuite tout à fait comparable à celle du témoin.

Ainsi, quel que soit le génotype de la variété utilisée, les exsudats ont une action fongistatique sur les conidies. L'effet ne se maintient pas au delà de 3 jours. Il est intéressant de constater que l'exsudat d'une variété "r", sans action sur les zoospores de *P. infestans* (Cf. paragraphe B1), est efficace contre un non-pathogène. Un fractionnement et une analyse biochimique des divers exsudats s'avèrent nécessaire pour comprendre leur mode d'action. Dans un deuxième temps la comparaison, à l'aide du système de confrontation in vitro (cf. tableau III), de diffusats R et "r" permettrait de cerner la nature et le fonctionnement d'un gène majeur de résistance.

3) Possibilité d'induction par la spore d'un mécanisme de défense de la plante.

Depuis MULLER et BORGER (1940) de nombreux auteurs (VARNS et al., 1971 ; KIRALY et al., 1972 ; VARNS et KUC, 1971) font état du développement d'une résistance localisée qui, à la suite d'une préinoculation par une race incompatible de *P. infestans* enraye toute infestation de tubercules de pomme de terre. Le succès de cette protection est conditionné par le délai intervenant entre les deux contaminations. A chaque fois que cela a été vérifié cette protection est associée à l'accumulation de phytoalexines. Ce mécanisme de défense inductible et non spécifique dans ses effets mis en évidence dans les tubercules de pomme de terre a été recherché dans les fragments de tige de plantules miniatures obtenues in vitro.

Des lots de fragments de plantules de la variété Kennebec (R1), préinoculés avec la race incompatible de virulence 0 ont été postinoculés, après 1 h, 4 h, 11 h, 22 h, 36 h, 52 h, 70 h et 92 h d'incubation à 20°C, par une suspension de zoospores du pathotype 1 compatible avec la variété Kennebec. Tous les lots sont incubés 8 jours à 20°C, et au bout de ce délai l'éventuelle colonisation des portions de tige est notée (tableau V).

Durée en heures du délai d'incubation entre les deux inoculations	Succès ou échec de la deuxième inoculation par une race compatible (+ succès ; - échec)
0	+
1	+
4	+
11	+
22	+ ou -
36	-
52	-
70	-
92	-

Tableau V - Délai d'induction d'une protection de la plante par une préinfection incompatible.

L'apport simultané sur une même tige de zoospores compatibles et de zoospores incompatibles entraîne une colonisation de l'hôte par la race compatible. Les lots de plantes laissés moins de 22 h au contact de la seule race incompatible sont également colonisés.

En revanche les lots surinfectés après un délai de 36 h sont indemnes de mycelium ce qui traduit une incompatibilité vis-à-vis de la race 1 (compatible) à la suite de la protection induite par la race 0.

Il s'avère possible de prémunir un plant axénique de pomme de terre par un contact d'au moins 22 h avec des zoospores incompatibles. Un tel délai correspond au temps donné par différents auteurs KUC (1972), METLITSKII et al (1968) pour la mise en place des phytoalexines. Nous avons voulu nous assurer que dans notre système expérimental, comme dans les variétés adultes de pomme de terre, ces substances fongitoxiques inductibles étaient responsables de cette situation d'incompatibilité de l'hôte vis-à-vis de tout nouvel agresseur. En collaboration avec Claude de VALLAVIEILLE nous avons pu extraire et caractériser par chromatographie sur gel de silice, des phytoalexines produites par des plantules de la variété Kennebec infectées par des zoospores de race 4. Ainsi l'incompatibilité vis-à-vis d'une race de *Phytophthora infestans* s'exprime pour les plants axéniques comme pour les plantes adultes, par la formation de composés terpénoïdes fongitoxiques. Dans ces deux systèmes il est possible d'induire chez la plante un état d'incompatibilité générale par une préinfection.

4) Essai de mise en évidence de facteurs émis par la zoospore impliqués dans les systèmes de reconnaissance hôte-parasite.

Des zoospores avirulentes de *P. infestans* confrontées à un hôte ont la capacité d'induire dans celui-ci une situation d'incompatibilité générale à l'égard des pathogènes. Les zoospores virulentes n'induisent pas ce phénomène et peuvent parasiter l'hôte. Cette infection de l'hôte par des propagules compatibles est-elle le fait d'un non-déclenchement des systèmes de défense de la plante ou bien le résultat d'une neutralisation par les spores, ou des substances émises par elles, des systèmes de reconnaissance de l'hôte ? Pour tenter de répondre à ces questions nous avons recherché dans des filtrats de germination de zoospores et dans des broyats de spores un facteur impliqué dans le phénomène de l'incompatibilité ou de la compatibilité.

a). Filtrats de germinations.

Dans un premier temps l'expérience d'induction d'une protection chez la plante (décrite au paragraphe B3) a été répétée en utilisant le filtrat de germination pour préinfecter les plantules (tableau VIa).

D'autre part, si le facteur impliqué dans les mécanismes de reconnaissance existe dans les filtrats, deux modes d'action peuvent être envisagés : la spore compatible possède le facteur "F" qui lui permet de ne pas être reconnue comme agresseur par l'hôte, ou, au contraire la spore incompatible possède un facteur "F" qui est responsable de la réaction de défense de la plante. Nous avons donc essayé de compléter des spores compatibles par un filtrat incompatible, et réciproquement, avant d'infecter des variétés sensibles ou résistantes (tableau VI b et c).

		Couples formés		Devenir de l'Infection
a		Filtrat de race 1 + plante R ₄	zoospores 4	+
		Filtrat de race 4 + plante R ₁	zoospores 1	+
b		Filtrat de race 4 + zoospores 1 + plante R ₄		-
		Filtrat de race 1 + zoospores 4 + plante R ₁		-
c		Filtrat de race 4 + zoospores 1 + plante R ₁		+
		Filtrat de race 1 + zoospores 4 + plante R ₄		+

Tableau VI - a) Essai d'induction par le filtrat, d'une protection dans la plante contre une surinfection compatible à $t = 3$ jours.
 b) Essai de complémentation de zoospores incompatibles par un filtrat compatible.
 c) Essai d'inhibition par le filtrat d'une interaction compatible.

Malgré trois répétitions de chacune de ces expériences, nous n'avons jamais mis en évidence dans les filtrats de germination un effet inducteur de l'incompatibilité chez l'hôte ou une capacité à rendre incompatible ou compatible une race de zoospores par complémentation. En l'état actuel de nos recherches, bien que nos résultats contredisent les observations de KIRALY (1972) sur l'induction d'une prémunition par des filtrats de culture, il ne semble pas que le "facteur inducteur" soit présent ou actif dans nos filtrats.

b). Broyat de spores.

Nous avons, dans cette expérience, préinfecté des tiges de Kennebec (R₁) et de BF₁₅ "r" par un homogénat de spores de race 0. Après 3 jours de contact on contamine chaque essai par des zoospores de race 1 (compatibles pour les 2 variétés) afin de mettre en évidence l'éventuel déclenchement d'une réaction d'incompatibilité par l'homogénat. Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le tableau VII. Plusieurs contrôles ont été effectués et nous avons noté en particulier que l'homogénat n'a aucune action nocive directe sur les zoospores.

VARIETE	PREINOCULATION	POSTINOCULATION EVENTUELLE t = 3 jours	SUCCES (+) OU ECHEC (-) DE L'INFECTION
KENNEBEC (R ₁)	race <u>0</u>	.	-
	race <u>1</u>	.	+
	race <u>0</u> + race <u>1</u>	.	+
	race <u>0</u>	race <u>1</u>	-
	broyat <u>0</u> + race <u>1</u>	.	+
	-----	-----	-----
	broyat <u>0</u>	race <u>1</u>	-
BF 15 (r)	race <u>1</u>	.	+
	race <u>0</u>	.	+
	-broyat <u>0</u> + race <u>1</u>	.	+
	-----	-----	-----
	broyat <u>0</u>	race <u>1</u>	-

Tableau VII - Induction d'une protection de la plante par un homogénat de zoospore de la race 0.

Cette expérience démontre la capacité d'un homogénat de spores de la race 0 à déclencher un phénomène de prémunition de l'hôte contre une surinfection compatible. De plus, au contact d'une variété compatible (BF 15), un aliquot du même homogénat permet également de protéger la plante contre les zoospores de race 1. Ces résultats indiquent que la spécificité de l'établissement de l'interaction incompatible semble liée à l'intégrité cellulaire de la spore. Contrairement à ce que l'on observe avec des zoospores vivantes de *P. infestans*, il est possible à l'aide d'un broyat de spores de déclencher une situation d'incompatibilité dans une variété de pomme de terre ne possédant pas de gène majeur de résistance. Ces résultats sont confirmés par les expériences de KIRALY et al. (1972). Ceux-ci démontrent que la sonication de zoospores de *P. infestans*, de même que leur traitement au chloramphenicol ou au chloroforme déclenche une accumulation de phytoalexines qui prémunit la plante contre toute surinfection.

IV - CONCLUSIONS

La technique d'observation des confrontations que nous venons de décrire permet de déterminer clairement et simplement le caractère de compatibilité ou d'incompatibilité d'un couple hôte-parasite. Cependant ce système expérimental demande à être amélioré. Ainsi des essais, visant à supprimer l'effet de blessure sur les tiges lors de confrontations *in vitro* et dans le mode d'obtention des diffusats, sont actuellement en cours. D'ores et déjà cet "outil" nous a permis d'apporter des éléments nouveaux concernant les interactions entre les variétés de pomme de terre et les races de *P. infestans*.

Les réponses quasi instantanées et spécifiques des zoospores de *P. infestans* à la présence d'un hôte résistant ou sensible suggèrent l'existence de substances, excrétées par la plante en absence de tout contact avec le parasite, et jouant un rôle dans la pathogenèse. Cette hypothèse est démontrée par la sensibilité spécifique des zoospores aux seuls exsudats de pomme de terre. Ceux-ci déterminent des variations de comportement des zoospores en ce qui concerne la durée de motilité, la position d'encystement et l'aptitude à germer. Ces substances perturbent de plus le déroulement normal d'une interaction initialement compatible à condition que la variété réceptrice possède un gène majeur de résistance. Toutes ces données semblent conformes aux propriétés que l'on peut attendre de substances impliquées dans un système de reconnaissance entre la plante hôte et le parasite. L'existence dans les plantes de composés inhibiteurs préformés jouant un rôle dans la pathogenèse a été rapportée (SCHONBECK, 1976) mais leur spécificité s'applique à des parasites différents (LUNING 1975, ARNESON et DURBIN 1975). En effet à l'exception des couples *Fusarium*-pois (BUXTON 1957) et *Fusarium*-tulipe (BERGMAN 1966) on connaît peu de systèmes hôte-parasite où des composants préformés par la plante sans contact avec le parasite, agissent spécifiquement sur les différentes races du même pathogène. Pour notre part, les relations *Solanum* - *P. infestans* mettent manifestement en jeu dans les exsudats de tige de telles substances.

Il est possible d'induire dans un fragment de tige en survie une incompatibilité propre à interdire le développement d'une contamination compatible, à la condition qu'un délai minimal de 22 heures intervienne entre le déclenchement initial de la protection et la surinfection. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par différents auteurs sur les tubercules (VARNS et al., 1971). Dans les deux types d'organes - tige de plant axénique et tubercule - ce délai correspond au temps nécessaire à une accumulation notable de phytoalexines.

Les expériences effectuées sur les broyats de spores sont en accord avec les résultats de KIRALY et al., (1972). Ces données et la mise en évidence chez la plante de substances préformées intervenant dans les interactions hôte-parasite rejoignent les hypothèses de DOKE et al., (1973). En effet ceux-ci soupçonnent la formation d'un complexe moléculaire entre une fraction d'un homogénat de plante et une fraction d'un homogénat de zoospores, susceptible de déclencher la réaction d'incompatibilité dans les cellules de pomme de terre. Dans cette optique KITAZAWA et al., (1973) suggèrent d'après des observations microcinématographiques effectuées sur des cellules de pétiole inoculées par une race incompatible de *P. infestans*, l'existence d'interactions à l'interface hôte-parasite entre des substances

Issues des hyphes d'infestation et des composés émis par le cytoplasme des cellules de l'hôte. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une participation active de composés émis par la zoospore et de substances préformées par la plante dans le déroulement de la pathogenèse. En conclusion, les relations entre *Solanum tuberosum* et *P. infestans* semblent faire intervenir des échanges d'informations entre la plante et le parasite.

Les premiers résultats que nous avons obtenus nous permettent de distinguer dans le potentiel de reconnaissance et de défense de la plante deux mécanismes différents :

. Un mécanisme qui par l'intermédiaire des substances préformées s'exprime de manière spécifique dès le contact avec le parasite. Il agit sur la phase nageuse et la germination des spores.

. Un second mécanisme de mise en route plus tardive, qui se traduit, après son induction par une race incompatible, par une réaction d'hypersensibilité de la plante. Cette situation confère alors à l'hôte une résistance générale à toutes les agressions.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il s'avère impossible de définir les corrélations existant entre ces deux mécanismes, très différents dans leur mise en place et leur mode d'action. Cependant on peut penser que la mise en évidence et la caractérisation chimique de fractions actives dans les exsudats de tige, aussi bien que dans les homogénats de spores, devraient permettre une meilleure compréhension des interactions entre *Solanum tuberosum* et *Phytophthora infestans*.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNESON, P.A. and R.D. DURBIN, 1967.- Hydrolysis of tomatine by *Septoria lycopersici* : a detoxification mechanism. Phytopathology, 57, 1358-1360.
- BERGMAN, B.H.H., 1966.- Presence of a substance in the white skin of young tulip bulbs which inhibits growth of *Fusarium oxysporum*. Neth. J. Pl. Path., 72, 222-230.
- BLACK, W., MASTENBROEK, C., MILLS, W.R. and L.C. PETERSON, 1953.- A proposal for international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and gene controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. Euphytica, 2, 173-179.
- BUXTON, E.W., 1957.- Differential rhizosphere effects of three pea cultivars on physiological races of *Fusarium oxysporum* f. pisi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 40, 305-317.
- DOKE, N., TOMIYAMA, K. et N. NISHIMURA, 1975.- In vitro interactions between components of *Phytophthora infestans*. zoospores and components of potato tissue. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 41, 425-433.
- FLOR, H.H., 1942.- Inheritance of pathogenicity in *Melanospora lini*. Phytopathology, 32, 653-669.
- GRENAN, S., 1976.- Analyse de phénomènes posés par la multiplication végétative in vitro de la pomme de terre. Thèse 3ème Cycle, Université PARIS-SUD, Centre d'ORSAY.
- KIRALY, Z., BARNA, B. et T. ERSEK, 1972.- Hypersensitivity as a consequence not the cause of plant resistance to infection. Nature, 239, 456-458.
- KITAZAWA, K. et K. TOMIYAMA, 1969.- Microscopic observations of infection of potato cells by compatible and incompatible races of *Phytophthora infestans*. Phytopath. Z., 66, 317-324.
- KITAZAWA, K., INAGAKI, H. et K. TOMIYAMA, 1973.- Cinemicrographic observations on the dynamic responses of protoplasm of a potato plant cells to infection by *Phytophthora infestans*. Phytopath. Z., 76, 80-86.
- KUC, J., 1972.- Phytoalexins. Ann. Rev. Phytopathol., 10, 204-232.
- LUNING, H.U., 1975.- Saponine in *Avena sativa*, ihre Bedeutung im Resistenzmechanismus gegenüber phytopathogenen Pilzen. Dissertation, Bonn - (cité par SCHONBECK (1976)).
- MARTIN, T.J., ELLINGBOE, A.H., 1976.- Differences between compatible parasite/host genotypes involving the Pm 4 locus of wheat and the corresponding genes in *Erysiphe graminis* f.sp. tritici. Phytopathology, 66, 1435-1438.
- METLITSKII, L.V., OZERETSKOVSAYA, O.L., 1968.- Plant immunity : biochemical aspects of plant resistance to parasitic fungi. New York Plenum Press.

- MULLER, K.O. et H. BORGER, 1940.- Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora* ; Resistenz der Kartoffel. Arb. biol. Abt. (Aust. Reichsanst.) (Berlin), 23, 189-231. (cité par KUC, 1972).
- NANDRIS, D., 1976.- Aspects physiologiques des interactions entre la pomme de terre et *Phytophthora infestans*. Rapport D.E.A. Amélioration des Plantes, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay.
- SATO, N. et K. TOMIYAMA, 1976.- Relation between rishitin accumulation and degree of resistance of potato tuber tissue to infection by an incompatible race of *Phytophthora infestans*. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 42, 431-435.
- SCHONBECK, F., 1976.- Role of preformed factors in specificity. In Specificity in Plant Diseases. R.K.S. WOOD and A. GRANITI Editors. Nato Advanced study institutes series. Plenum Press, New York and London.
- VALLAVIEILLE, C. (de), 1976.- Les phytoalexines de la pomme de terre en réponse à une agression parasitaire. Rapport D.E.A. Amélioration des Plantes, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay.
- VARNIS, J.L., CURRIER, W.W. et J. KUC, 1971.- Specificity of rishitin and phytuberin accumulation by potato. Phytopathology, 61, 968-971.
- VARNIS, J.L. et J. KUC, 1971.- Suppression of rishitin and phytuberin accumulation and hypersensitive response in potato by compatible races of *Phytophthora infestans*. Phytopathology, 61, 178-181.