

DÉTERMINATION DES ENZYMES PECTINOLYTIQUES DE DEUX SOUCHES *PHYTOPHTHORA* DE BARY VARIATIONS D'ACTIVITÉ DANS LES TISSUS DES PLANTULES DE TOMATE EN RELATION AVEC LES GÉNOMES DE RÉSISTANCE

A. RAVISÉ

par

B. TRIQUE

Laboratoire de biologie végétale, Université de Bretagne occidentale, Brest (ORSTOM)

INTRODUCTION

Les inoculations expérimentales réalisées avec des *Phytophthora* de BARY sur des plants de tomate, à différents stades végétatifs (15), ont démontré qu'il existe chez cette plante des facteurs contribuant à ralentir ou à bloquer l'évolution des nécroses suivant les souches et les variétés éprouvées. Afin d'éviter toute interférence avec, d'une part, l'action d'autres microorganismes et, d'autre part, des variations des conditions de culture sur l'expression des réactions de l'hôte, l'expérimentation a été reprise avec des plantules cultivées aseptiquement sur milieu synthétique. Ces essais ont porté sur trois espèces de *Lycopersicon esculentum* MILL. et sur douze variétés de tomate (16) inoculées avec huit souches appartenant à cinq espèces de *Phytophthora*. Il s'est confirmé que l'expression de la résistance aux souches de *Phytophthora* étudiées est liée à plusieurs génomes, certains étant sélectionnés contre d'autres parasites. En outre, il existe des écarts importants dans les rapports de virulence des souches suivant les variétés testées. Ces résultats tendent à indiquer l'apparition de réactions différentielles à l'égard de diverses souches de l'agent pathogène. C'est pourquoi, avec deux souches possédant des aptitudes parasitaires différentes, nous avons recherché d'éventuelles variations d'activités pectinolytiques dans les tissus de treize espèces et variétés de sensibilités préalablement reconnues.

MATERIEL ET TECHNIQUES

1) LES PLANTES-HOTES

Trois espèces de *L. esculentum* MILL. possédant plusieurs caractères de résistance : *L. pimpinellifolium* au *P. infestans* (MONT.) de BY (Ph + S) et au *F. oxysporum* f. *lycopersici* BRUSHI (I), *L. peruvianum* var. *dentatum* aux nématodes (MI.), *L. hirsutum* var. *glabratum* au *Septoria lycopersici* SPEG. et au *Cladosporium fulvum* CKE.

Neuf variétés de tomate se répartissent ainsi : Saint-Pierre et Roma sans caractères de résistance, X 305 (Ph + S), WVA'106 et Geneva late blight (Ph + S'), Pierbotans (Ph + S + Ve), Pieralbo (Ve), Supermarmande (semblant un hybride complexe à phénotype Marmande), Marsol et Rossol (Ve, I, Mi).

2) LES SOUCHES DE *PHYTOPHTHORA*

La souche I, de *P. palmivora* (BUTL.) BUTL., a été isolée sur aubergine en Côte-d'Ivoire et provient de la mycothèque du centre ORSTOM d'Abidjan. Elle est fortement pathogène pour douze plantes-hôtes. La souche II du *P. parasitica* DASTUR, isolée de l'île Maurice sur *Nigella damascina*, a été fournie par le laboratoire de phytopathologie de l'INRA à Clermont-Ferrand. Elle est moins pathogène que la précédente, sauf pour certaines variétés de tabac et de coton.

3) EXPERIMENTATION

Tous les essais ont été réalisés à 30° C et *in vitro* sur milieu synthétique précédemment décrit (14). La production d'enzymes pectinolytiques a été obtenue en milieu liquide, constamment agité, dans lequel furent incorporés soit des pectines à 1 %, soit des tissus de plantules de tomate.

Les semences de tomates subissaient une désinfection par l'hypochlorite de calcium à 4 % suivie de plusieurs lavages pendant 24 heures. Les sèmis étaient effectués en fioles de Roux ou en tubes de 300 mm × 25 mm sur un milieu gélosé à 0,8 %.

4) PREPARATION ENZYMATIQUE

In vitro, elle s'obtenait à 4° C par filtration des cultures ou, lors des inoculations expérimentales, en exprimant les substrats gélosés.

In vivo, les tiges des plantules récoltées étaient coupées soit sur une longueur standard, soit en fonction des symptômes, puis broyées en bain de glace à l'« ultra-turrax » pendant 6 minutes, en présence d'un antioxydant (acide ascorbique ou thioglycolate de sodium). Les extraits centrifugés le furent, à 2° C, avec une ultra-centrifugeuse MSE.

5) DOSAGES

L'activité pectinolytique des filtrats fut éprouvée sur cinq substrats de méthylation décroissante : pectine ruban brun (S₁, 95 %), citrus pectine (S₃, 85 %), pectine ruban rouge (S₂, < 75 %), polypectate de sodium (S₄) et acide polygalacturonique (S₅). Ceux-ci furent incorporés à 250 ppm, sans chauffage, dans le milieu réactionnel contenant du CaCl₂ à 1 mM et tamponnée avec du tri/HCl, 50 mM, à pH 8,5.

La dégradation des substrats fut déterminée par trois méthodes complémentaires : en viscosimétrie, en spectrophotométrie par l'accroissement de l'absorption entre 227 nm et 240 nm corrélatif à la formation de doubles liaisons et par la densité optique entre 480 nm et 560 nm après traitement par l'acide thiobarbiturique (ATB) indiquant la libération de groupes réducteurs (5, 9, 13, 21).

L'activité des polyphénol-oxydases fut mesurée en suivant les techniques de FUHCS, MATTA et DIMOND (4, 11). Le substrat était une solution fraîche de pyrocatechol ; 1,2 benzène diol (« catéchol », NBC) à 0,5 % dans un tampon MAC ILVAINE (0,1 M) à pH 6,0.

6) MACERATION

Chaque essai fut réalisé à la fois sur dix disques (diamètre 10 mm, épaisseur 1 mm) de tubercules de pomme de terre (2) et sur cinquante coupes transversales (diamètre 3 mm, épaisseur 0,5 mm) de tiges de tomate. Les échantillons étaient lavés 3 heures à l'eau courante puis dégazés dans le tampon d'essai. Un ressuyage précédait le transfert dans le mélange réactionnel : tampon citrate (pH 4,5 et 6) à 50 mM, thiomersal à 200 ppm, kinétine à 1 ppm et extrait à tester (v/v). L'essai était incubé à 30° C dans un agitateur « gallenkamp », à faible vitesse, durant 12 heures à 38 heures. Un contrôle microscopique permettait d'apprécier la dégradation des tissus ; il était, en outre, nécessaire pour déceler d'éventuelles infections lors des incubations les plus longues. L'évolution de l'intensité de l'absorption de l'essai vis-à-vis du témoin inactivité par ébullition, suivie soit par turbidimétrie à 475 nm (2), soit par le spectre ultra-violet entre 228 nm et 320 nm permettait une mesure objective de la « macération ».

RESULTATS

1) NATURE DES ENZYMES PECTINOLYTIQUES SYNTHETISES PAR LES SOUCHES

Les deux souches produisent *in vitro* deux groupes d'enzymes pectinolytiques (23). L'ensemble des tests tend à indiquer que ce sont des lyases dont plusieurs isozymes ont été séparés par chromatographie sur colonne de sephadex G 75. Le premier groupe est composé d'endopectine lyase, endo-PTE (E.C.4.2.2.3), qui attaque les substrats fortement méthylés (fig. 1). Le second est constitué d'endopectate lyase, endo-PATE (E.C.4.2.2.1), dégradant l'acide polygalacturonique et dans une moindre mesure son sel de sodium. Antérieurement, plusieurs auteurs (1, 12) avaient présumé l'existence d'endopolygalacturonase et de pectine méthyl estérase chez les *Phytophthora*. Ces deux enzymes ne furent pas décelées au cours de nos expériences. Récemment, MANTRI et DESHPANDE (9) ont identifié une endo-PTE et une endo-PATE chez le *P. rubra* parasite du *Phaseolus vulgaris* et du *Cyamopsis tetragonoloba*. Il n'existe pas de différences fondamentales entre leurs investigations et nos travaux. Ces enzymes ne sont synthétisées qu'en présence d'ions Ca⁺⁺ (tableau I). L'optimum d'action de l'endo-PATE se situe vers pH 6, celui de l'endo-PTE à pH 7,5 (graphique 2).

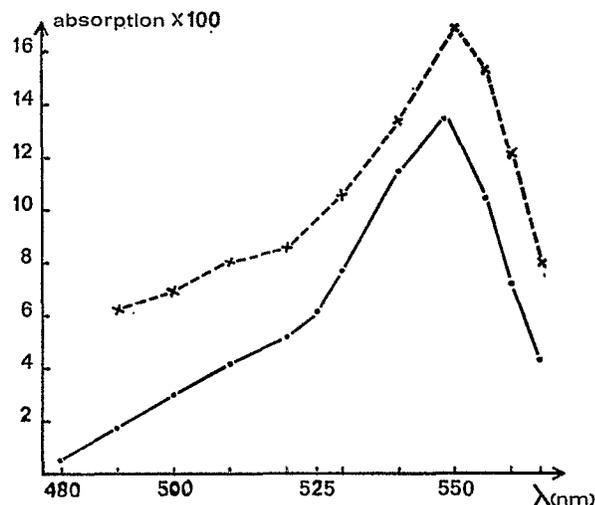


Fig. 1. — Absorption des extraits après traitement à l'acide thiobarbiturique mettant en évidence la libération de groupes réducteurs à 548 nm.

— ● — : extraits enzymatique obtenus *in vitro*.
 - - - × - - - : extraits obtenus avec un inducteur végétal, épaulement à 525 nm.

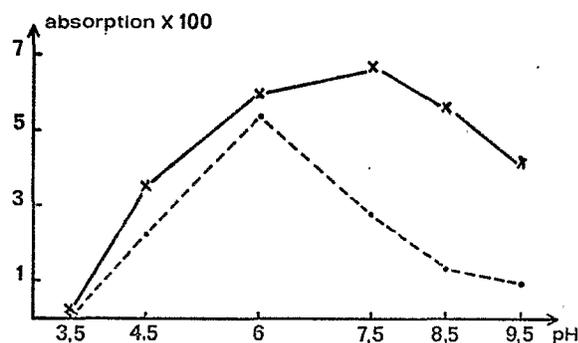


Fig. 2. — Spectre d'activité en fonction du pH des lyases synthétisées par les *Phytophthora*.

— × — : endo-PTE.
 - - - ● - - - : endo-PATE.
 Absorption à 232 nm.

TABLEAU I

INFLUENCE DU CALCIUM SUR L'ACTIVITÉ DES LYASES LIBÉRÉES PAR LA SOUCHE I
 (en 96 heures de culture dans un milieu à 1 % de pectines et 1 % de glucose)

Essais	Substrats				
	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
Sans calcium	0	0	9	8,4	1,5
Ca (NO ₃) ₂ , 1 mM	8,4	19,6	3	28,5	53,2

Variations de l'absorption à 232 nm, selon les substrats, rapportées à 1 mg de protéines dans le mélange réactionnel.

Dans plusieurs essais, les mesures spectrophotométriques après traitement à l'acide thiobarbiturique révèlent l'existence d'un épaulement entre 525 nm et 530 nm. Nous avons observé des profils analogues sur des spectres établis pour une lyase du *R. solani* (18) et pour celle du *P. rubra* (10), les auteurs n'indiquant pas la cause de cette particularité. L'application sur ces extraits de tests à la diéthylamine cuprique et au nitrate d'argent ammoniacal (17) fait apparaître, en chromatographie sur couche mince de cellulose,

des spots caractéristiques de radicaux « désoxy » dans la zone des oligo-galacturonides. Selon les résultats des récents travaux d'HATANAKA et OZAWA (6), l'épaulement serait l'indice de la présence d'une oligo-galacturonate lyase. Elle pourrait dégrader, à la suite des deux autres groupes, des oligo-galacturonates insaturés avec formation d'un acide désoxy-uronique.

Ces enzymes sont inactivées par chauffage pendant 15 minutes à 50° C. Les extraits incubés à 45° C possèdent les mêmes caractéristiques que les témoins non traités. Alors que les lyases produites par le *Fusarium roseum* f. *avenaceum* (13) se conservent à — 22° C, celles des souches de *Phytophthora* sont inactivées par passage à cette température, quelles que soient les précautions opératoires.

2) INDUCTION DE LA SYNTHÈSE DES ENZYMES

La synthèse des lyases est adaptative (tableau II). Les deux souches les produisent en présence de pectines ou de matériaux pectiques, ceux-ci stimulant largement la sécrétion. Les délais d'incubation sont courts. *In vitro*, avec un implant correspondant à moins de 0,1 mg de mycélium sec, l'activité lyase est décelable entre 36 heures et 48 heures après l'ensemencement. Elle est dosable 24 heures après l'incorporation d'inducteurs à des cultures de 4 jours.

TABLEAU II
INFLUENCE DE DEUX INDUCTEURS SUR L'ACTIVITÉ DES LYASES LIBÉRÉES PAR LA SOUCHE I
(en 96 heures de culture dans un milieu à 1 % de pectines)

Essais	Substrats				
	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
Milieu sans glucose	35	0	42	21	21
Milieu avec glucose 1 % et fibres écrues à 530 ppm	27,5	0	54,5	53	9
Milieu avec glucose 1 % et tiges stérilisées à 0,25 % ...	75,9	109	131,8	47,2	116,2

Variations de l'absorption à 232 nm, selon les substrats, rapportées à 1 mg de protéines dans le mélange réactionnel.

L'adjonction de glucose aux pectines augmente la croissance du thalle ; dans ces conditions, la production de lyase est accrue.

L'incorporation au milieu de culture, par filtration stérilisante, d'extraits de plantules ne modifie pas la synthèse des lyases. Par contre, l'adjonction de fibres écrues, 40 mg pour 75 ml de milieu, provenant de ces mêmes tissus accroît la synthèse d'enzymes, surtout d'endo-PATE. L'apport de tiges de tomate, 270 mg de tissus frais pour 100 ml, stérilisées *in situ*, donc avec toutes leurs substances pectiques, stimule la synthèse également chez les deux souches, même en présence de glucose.

Enfin, dans un milieu contenant seulement du glucose à 1 %, l'incorporation de fibres écrues, correspondant à 250 mg de tissus frais pour 100 ml, déclenche la synthèse d'endo-PATE. Celle des deux groupes d'enzymes est obtenue avec l'apport des tiges entières, aux mêmes concentrations. La présence de glucose, même dans la proportion de 4/1 par rapport au poids de tissus frais incorporés, n'influe pas sur l'induction enzymatique. Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec d'autres parasites (3, 8) mais concordent avec des observations récentes sur le *Fusarium* f. sp. *elaeidis* (22).

3) EVOLUTION DE L'ACTIVITE LYASE DANS L'INOCULUM

L'inoculum est préparé à partir de thalles âgés de dix jours préalablement lavés à l'eau stérile. Depuis cinq ans, nous utilisons un inoculum exempt de milieu de culture afin de ralentir, à concentrations comparables, l'évolution des symptômes et d'en faciliter l'observation. Après broyage dans de l'eau distillée stérile, 1 ml de suspension contenant l'équivalent d'environ 1 mg de mycélium sec est déposé à la base de chaque plantule.

Plusieurs vérifications ont établi qu'avant l'inoculation les enzymes pectinolytiques ne sont pas décelables dans le milieu de culture et sur les parois des hyphes.

L'évolution de l'activité enzymatique pendant les cinq jours suivant l'inoculation est analogue à celle décelée *in vitro* dans un milieu contenant 1 % de glucose et de pectines, 0,25 % de tissus de plantules. Les délais d'induction sont brefs. L'invasion d'une partie des cellules corticales au niveau du collet ou du système racinaire commence vers la quatrième heure suivant l'inoculation. Les dosages révèlent une intense activité enzymatique huit heures après, même pour la souche II la moins virulente. A ce stade, les deux types de lyases sont synthétisés. La mesure de l'activité de l'endo-PATE est pratiquement double de celle de l'endo-PTE.

Dans tous les cas, l'intensité de l'action enzymatique est proportionnelle à la quantité de mycélium introduite avec l'inoculum et indépendante de la variété à laquelle appartiennent les plantules éprouvées. Il semble donc qu'aucune substance inhibitrice ne diffuse hors des tissus des plantules résistantes, au moins à une concentration affectant les lyases.

Si les deux souches produisent les mêmes enzymes, il existe des différences quantitatives (tableau III). Tout se passe comme si en 62 heures, la souche I produisait autant de lyases que la souche II en 120 heures au contact de plantules de *L. pimpinellifolium* (source de résistance au *P. infestans* et au *F. oxysporum* f. *lycopersici*). De plus, l'activité de l'endo-PATE est toujours moindre avec la souche II, dans des rapports variant de 1/3 à 1/2.

TABLEAU III
COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ DES LYASES DANS LES INOCULUM DES SOUCHES I ET II
(après respectivement 63 h et 120 h de contact avec des plantules de *L. pimpinellifolium* ;
1 ml correspondant à 1 mg de mycelium sec)

Extrait	Substrats				
	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
Inoculum souche I ...	34,5	2,8	32,5	8,5	36
Inoculum souche II ..	32	61	55	0	12

La répartition des enzymes autour des plantules est différente suivant les souches et en relation avec les observations ci-dessus. Alors qu'avec la souche I, la teneur en lyases est importante non seulement dans le liquide baignant la base des tiges, mais aussi dans celui imprégnant la gélose (après 60 heures d'incubation, les valeurs dans et hors du substrat sont à 10 % près analogues à celles indiquées dans le tableau III), les lyases produites par la souche II diffusent très peu dans le milieu et sont à peine dosables au niveau des racines.

4) EVOLUTION DES LYASES DANS LES TISSUS DE L'HOTE

Dans les plantules appartenant à des variétés sensibles, Roma ou Saint-Pierre, les nécroses évoluent rapidement après inoculation aux doses standardisées indiquées ci-dessus. La fanaison intervient entre trois et cinq jours avec la souche I, entre cinq et dix jours avec la souche II.

L'étude des enzymes pectinolytiques dans les tissus a fourni plusieurs informations.

Les lyases s'adsorbent fortement sur les substrats (tableau IV). Après centrifugation de broyats de tissus (plantules de WVA'106 inocuées avec la souche I), la comparaison des activités lyases dans les surnageants et les culots de centrifugation fait apparaître dans ceux-ci une augmentation variant dans le même sens que l'intensité de centrifugation.

TABLEAU IV
RÉPARTITION DE L'ACTIVITÉ DE L'ENDO-PTE, CINQ JOURS APRÈS L'INOCULATION AVEC LA SOUCHE I
(dans un extrait de tissus de plantules de WVA' 106 [25 mg/ml] suivant la vitesse de centrifugation ;
durée 15 mn ; $\Theta = + 2^{\circ} C$; absorption à 232 nm)

	x 5.000 g			x 25.000 g		
	S 1	S 2	S 3	S 1	S 2	S 3
Surnageant ...	0,7	2,7	1,1	1,5	1,5	1,6
Culot	34	14	14,5	42,5	31	15

Cette « affinité » de la lyase pour son substrat rend particulièrement délicate l'approche de l'activité enzymatique dans les tissus. Il s'y ajoute une autre difficulté concernant la répartition des hyphes de *Phytophthora* et la sécrétion d'enzymes dans les assises infectées. Pour la variété Roma, sur plantules âgées de deux mois, deux jours après l'inoculation avec la souche I, l'étude comparative des zones nécrosées, brunes, avec début d'affaïssissement du cortex par rapport aux marges en début d'altération, a donné les résultats suivants. L'activité d'endo-PTE est de 1/5, celle de l'endo-PATE d'environ 1/10 et prédominante par rapport à la première, en front de nécrose par rapport au foyer d'infection. L'activité enzymatique semble donc particulièrement intense dans les zones en cours de désorganisation.

Dans les plantules de variétés de tomate sensibles aux *Phytophthora*, les teneurs en enzymes augmentent presque régulièrement dans les tissus jusqu'au début du flétrissement. Dès que le stade fanaison est atteint et que les tissus perdent leur turgescence, l'activité lyase n'est plus décelée dans les extraits, quelle que soit leur concentration. Cette disparition a été observée avec des plants fanés appartenant aussi bien à des variétés tolérantes que sensibles aux deux souches de *Phytophthora*.

MULLEN et BATEMAN (13) ont également observé la perte d'activité de la lyase du *Fusarium roseum* (L.K.) SNYD. et HANS. f. *avenaceum* dans les tubercules de pomme de terre nécrosés. Dans ce cas, l'activité lyase est rétablie après conservation de l'échantillon pendant deux mois à -20°C . Les auteurs pensent que pendant ce temps la polyphénol-oxydase de la pomme de terre a été inactivée et qu'en conséquence la lyase n'est plus inhibée dans les extraits préparés à partir des tissus congelés.

Dans nos expériences, l'activité lyase n'est pas rétablie après trois mois de conservation à -25°C .

Les teneurs en enzymes semblent varier en fonction du temps dans les plantules appartenant aux variétés tolérantes ou résistantes. Nous avons essayé de suivre cette évolution dans les tissus de plantules de Supermarmande âgées de 90 jours. Cette variété est partiellement résistante à la souche I, sensible à la souche II avec laquelle fut réalisée l'expérience (fig. 3 et 4).

Douze heures après l'inoculation, l'activité de l'endo-PATE atteint presque son maximum d'intensité ; au contraire, celle du groupe d'endo-PTE semble juste s'initier. Les valeurs croissent jusque vers la vingt-quatrième heure, surtout pour l'endo-PTE. Puis, entre 24 heures et 36 heures pour l'endo-PATE, entre 30 heures et 48 heures pour l'endo-PTE, intervient une régression très importante. Celle-ci, d'abord décelée sur les dosages d'échantillons après 36 heures et 48 heures d'inoculation, paraissait en opposition avec les activités décelées cinq jours après l'inoculation dans les plants survivants. Ensuite, l'activité de l'endo-PATE se rétablit pour atteindre un maximum vers 48 heures, puis décroître jusqu'à s'annuler à 96 heures. Le profil d'action de l'endo-PTE est analogue, avec un décalage de l'ordre de 12 heures. Un second pic apparaît à 72 heures, moins important que celui de 24 heures, puis l'activité diminue pour cesser vers 120 heures dans les tissus de plants fanés. Les nécroses provoquent une augmentation importante des activités de polyphénol-oxydases dans les tissus, celles-ci vont croissant jusqu'à la fanaison (fig. 4). Les variations des teneurs en phénol au cours de cette période ne sont pas décelées avec les moyens disponibles.

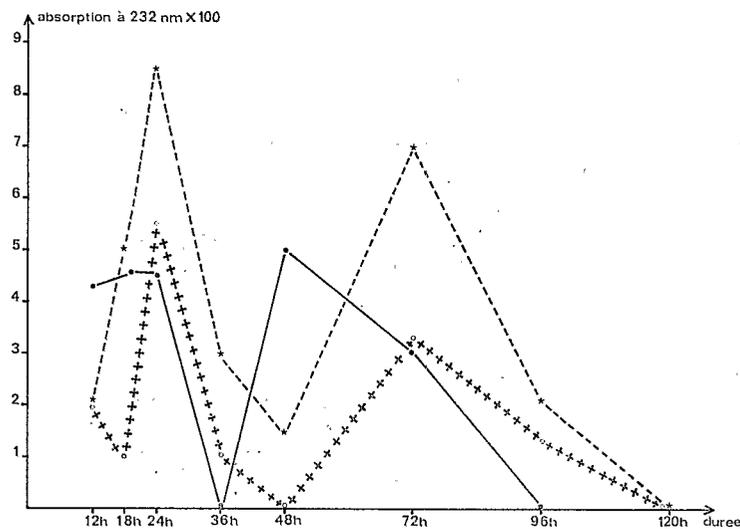


Fig. 3. — Evolution de l'activité des lyases dans les tissus de plantules de Supermarmande en fonction du temps, pour 100 mg de poids frais. Absorption à 232 nm.

— ● — : endo-PATE.
 - - - × - - - : endo-PTE sur pectine ruban brun.
 + + + ○ + + + : endo-PTE sur pectine ruban rouge.

Une esquisse d'interprétation peut s'ébaucher à partir des vérifications *in vitro* mentionnées ci-dessous. L'invasion des tissus par l'agent pathogène provoquerait une réaction physiologique de la plante pouvant inhiber les activités des lyases, principalement d'endo-PATE, au cours du deuxième jour suivant l'infection. Par contre, les hyphes de *Phytophthora* ne seraient pas atteints et, poursuivant leur croissance et leurs synthèses, ils élaboreraient des enzymes pectinolytiques en quantités suffisantes pour forcer la barrière de la plante. Lorsque les tissus sont morts, l'autolyse des cellules libérerait des substances agissant comme effecteurs.

En plus des divers essais mentionnés ci-dessus, ces résultats sont confirmés par une expérience réalisée sur des plantules de quatre-vingt-dix jours et de croissance homogène appartenant à la variété Saint-Pierre. Inoculées avec un broyat de culture homogénéisé de la souche II, elles furent réparties en deux lots après 240 heures d'incubation : d'une part les plants fanés, d'autre part ceux en fin de flétrissement. Dans celui-ci, l'activité de l'endo-PTE était huit fois plus importante que celle de l'endo-PATE, alors que les deux lyases ne furent pas décelées dans les tissus morts.

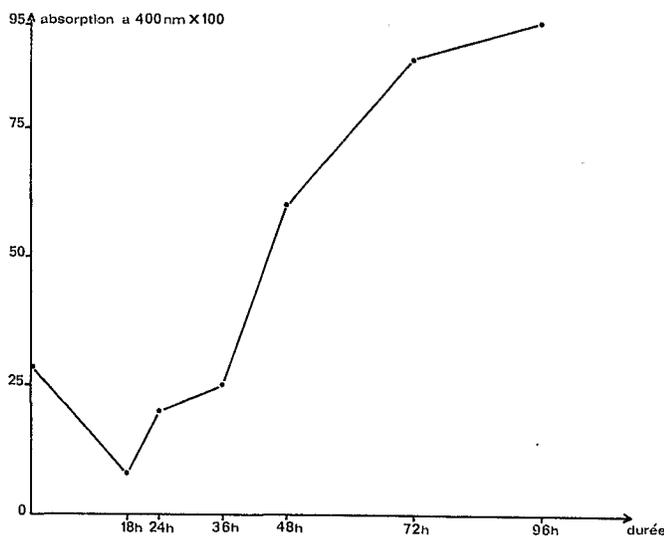


Fig. 4. — Evolution de l'activité des polyphénol oxydases dans les tissus infectés de plantules de Supermarmande en fonction du temps, pour 100 mg de poids frais.

5) EVOLUTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES EN FONCTION DU GENOME DES PLANTULES

Nous avons indiqué schématiquement l'évolution des deux types de lyases dans les tissus de Supermarmande. Plusieurs observations, reproductibles dans le temps, tendent à préciser ces relations. Dans les tissus des variétés sensibles, l'activité des lyases décelée quarante-huit heures après l'incubation est équivalente à celle dans l'inoculum. En outre, les rapports observés entre endo-PTE et endo-PATE varient dans le même sens. Par contre, il n'en est pas de même avec une variété résistante (tableau V). Ainsi, les plantules de *L. pimpinellifolium* réagissent à l'infection avec une dose correspondant à 1 mg de mycélium sec par plantule, tandis que pour un volume d'inoculum six fois plus important cette barrière s'effondre.

TABLEAU V

COMPARAISON DES ACTIVITÉS LYASES DANS :

- A) l'inoculum de la souche I après 3 jours d'incubation (pour 1 mg de mycélium sec) ;
 B) des tissus de plantules de *L. pimpinellifolium* inoculées avec la dose standardisée ;
 C) des tissus de plantules de *L. pimpinellifolium* inoculées avec une dose 6 fois plus forte après 3 jours d'incubation; absorption à 232 nm.

Substrats	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
A) Inoculum à 3 jours	20	43,5	30,5	8,5	26
B) Plants inoculés à 3 jours. (dose standard)	14	11	19,5	0	3,5
C) Plants inoculés à 3 jours. (dose x 6)	34,5	18	42,5	0	0

Tout se passe comme si, jusqu'à un certain potentiel infectieux, les tissus s'opposaient quantitativement à l'activité des lyases. Or, avec l'inoculum standardisé, dont la concentration ne doit pas être fréquente dans la nature, sept dixièmes des plants survivent une semaine après l'infection, quatre dixièmes à la fin de la deuxième semaine. Les nécroses des bases des tiges, quelle que soit leur étendue, se stabilisent, seul le *L. pimpinellifolium* peut survivre aux infections de ce type réalisées avec la souche I.

La réduction d'activité enzymatique dans les tissus de *L. pimpinellifolium* concerne l'endo-PTE et l'endo-PATE. Cette plante étant à l'origine des gènes (Ph + S) et (I), nous avons étudié l'activité des lyases pour plusieurs variétés possédant ces gènes. De même, les essais ont aussi concerné le *L. hirsutum* var. *dentatum* et le *L. peruvianum* ayant manifesté une résistance (16) à l'une des souches de *Phytophthora* malgré qu'ils possèdent seulement les caractères de résistance, l'un aux nématodes (Mi), l'autre au *Cladosporium fulvum* CKE. et au *Septoria lycopersici* SPEC.

Le tableau VI regroupe une partie des résultats obtenus avec la souche I. Il précise également l'intensité de la variation de l'activité polyphénol-oxydase dans les tissus et les proportions de plants survivant une semaine après inoculation avec chacune des souches.

TABLEAU VI

EVOLUTION DU PARASITISME SUIVANT LE GÉNOME DES PLANTULES
(rapportée à des échantillons de 50 mg de tissus frais)

L'activité des lyases est exprimée par l'absorption à 232 nm, celle de la p.p.o. à 400 nm, Δ d.o. $\times 10^{-4}$ /seconde.
L'intensité du parasitisme est exprimée par la proportion de plants survivant à une semaine.

Extraits	Activité des lyases					Variations d'activité p.p.o.	Intensité du parasitisme	
	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5		Survie souche I	Survie souche II
Inoculum 4 X. Souche I à 48 h.	28,5	51,5	41	0	24,2	/	/	/
<i>L. hirsutum</i> (par souche II) ...	3	0	4,5	20	14	6,5	0	4/10
<i>L. peruvianum</i> (par souche I) ..	21,5	10	25	0	2,5	0,8	4/10	9/10
X 305 (I)	0	4,2	4,5	0,8	1,8	4,3	0	10/10
WVA' 106 (I)	9	5,3	8	3,5	2,8	5,0	3/10	9/10
Pierbotans (I)	1	0	8,5	0,5	8,5	0	0	7/10
Pierabo (I)	16,5	20,5	20	29	22,5	0	0	6/10
Marsol (I)	10,2	12	14	0,5	7,2	5,0	1/10	10/10
Saint-Pierre (I)	18,5	20	20	0	11,5	0	0	4/10

D'après ces résultats, l'aptitude à atténuer l'activité des lyases dans les tissus nécrosés est observée chez plusieurs espèces et variétés possédant des caractères de résistance différents.

Dans la série sélectionnée pour la résistance au *P. infestans*, la variété X 305 (Ph + S) et, à un moindre degré semble-t-il, les variétés Geneva late blight et WVA'106 (Ph + S') inhibent partiellement les deux lyases ; la variété Pierbotans (Ph + S + Ve), l'endo-PTE mais très peu l'endo-PATE. Il en est de même pour le *L. hirsutum*. Par contre, le *L. peruvianum* atténue faiblement l'activité de l'endo-PTE et inhibe celle de l'endo-PATE.

L'évolution de l'activité polyphénol-oxydase en réponse à l'infection est différente selon ces variétés. Elle est très faible dans toute la série Saint-Pierre, tout comme d'ailleurs chez le *L. pimpinellifolium*. Les variétés possédant les gènes de résistance au *P. infestans* (Ph + S ou S') ou les trois autres caractères réunis (Ve, Mi, I) manifestent une très forte réaction des polyphénol-oxydases, de même que le *L. hirsutum*.

Dans tous les cas de survie, la stabilisation des nécroses s'accompagne d'une forte accumulation de composés phénoliques dans les tiges. Il existe des différences dans les réactions au parasitisme. L'activité des lyases est arrêtée, chez le *L. pimpinellifolium* par exemple, en relation avec une forte accumulation de composés phénoliques et une faible activité polyphénol-oxydase, ou bien, comme chez le WVA'106, en présence d'une réaction phénolique moitié-moindre mais avec une rapide augmentation des polyphénol-oxydases.

6) VERIFICATIONS EXPERIMENTALES

Les essais *in vitro* ont concerné essentiellement la vérification de l'aptitude des lyases à dégrader des tissus végétaux vivants, la détermination des seuils de toxicité de divers extraits phénoliques de plantules pour les souches ainsi que leur incidence sur l'activité enzymatique.

L'altération des structures vivantes, couramment désignée par le terme de macération, fut étudiée sur des coupes de tubercules de pomme de terre et de plantules de tomate. Les dégradations provoquées par les lyases de *Phytophthora* furent comparées à celles obtenues avec l'endo-polygalacturonase du *Sclerotium rolfsii* SACC. La macération provoquée par cette dernière est intense sur coupes de pomme de terre.

A un degré moindre, des résultats comparables sont obtenus avec les lyases, tant en modifications du spectre d'absorption en ultra-violet qu'en turbidimétrie. Alors qu'un extrait de tissus infectés provenant de plantules sensibles à l'une des deux souches provoque la macération de coupes de tiges de tomate et de tubercules de pomme de terre, les extraits provenant de variétés résistantes perdent tout ou partie de cette aptitude.

Ainsi, les extraits de plantules de Supermarmande infectées avec la souche I ne possèdent plus d'activité endo-PATE, celle d'endo-PTE étant moyenne, et provoquent une macération très faible des coupes de tubercules. Les extraits de plantules de WVA'106, ou de Geneva late blight, obtenus dans les mêmes conditions, avec une activité d'endo-PTE quasi nulle et d'endo-PATE faible, agissent d'une façon égale ou plus intense que les précédents. L'incorporation simultanée des deux types d'extraits, avec la même concentration finale dans le milieu réactionnel, aboutit à un accroissement important de la macération non proportionnel à l'association des activités d'endo-PTE. Il semble que l'augmentation d'activité pectinolytique résulte de la présence simultanée des deux enzymes, alors qu'isolée ou pratiquement seule l'endo-PATE ne déclenche pas ce processus. L'hypothèse semble confirmée par l'apport d'endo-PATE produite *in vitro* par la souche I à un extrait de plantules de Roma infectées par cette souche (fig. 5). L'endo-PATE ne dissocie pas les tissus, pourtant son incorporation à la solution enzymatique provoque, sans modifier les concentrations, un accroissement de macération qui, exprimé en turbidimétrie à 475 nm, atteint 30 %.

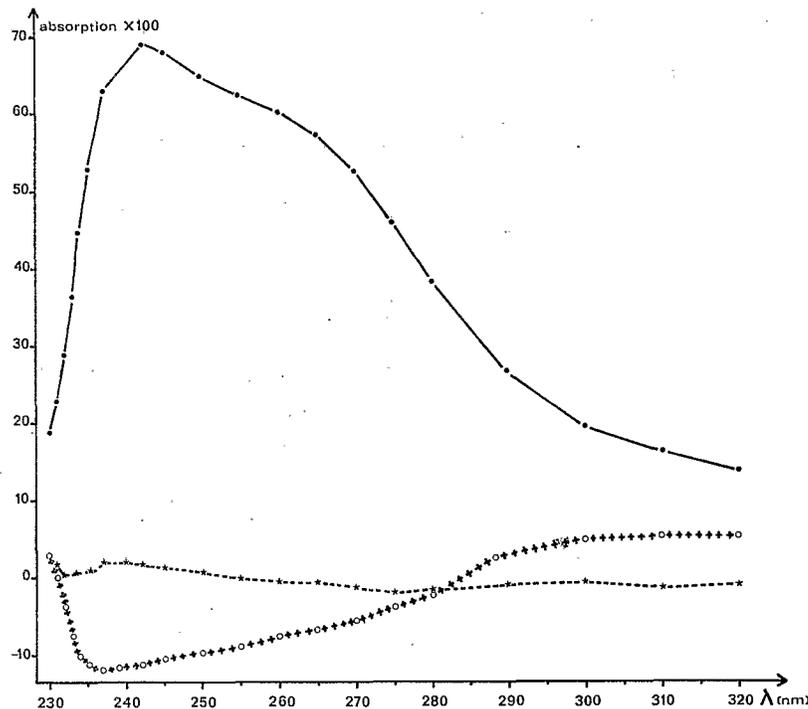


Fig. 5. — Macération de coupes de tubercule de pomme de terre en 24 heures. Spectre en UV de l'activité des lyases par rapport aux témoins.

- ● — : extrait de tissus infectés de Roma (100 mg/ml) et endo-PATE produite *in vitro* (1/1 en v/v).
- + + + ○ + + + : extrait de tissus infectés de Roma (100 mg/ml).
- — — × — — — : endo-PATE produite *in vitro*.

Ces résultats tendent à indiquer, d'une part, que les lyases émises par les deux souches de *Phytophthora* peuvent dégrader les structures pectiques des plantes, et, d'autre part, que l'hypothèse émise par KARR et ALBERSHEIM (7) concernant le « cell wall modifying enzyme » peut s'appliquer à ce parasite.

Les extraits phénoliques sont toxiques pour les deux souches à des doses différentes selon les variétés (16). Pour les microcultures réalisées en chambres à huile, sous faible tension d'oxygène, le seuil d'inhibition varie de 7 μg à 70 μg d'équivalents d'acide chlorogénique par ml de milieu. D'après l'ensemble des dosages réalisés par TANGUY suivant des méthodes précédemment décrites (19, 20), il semble exister une corrélation entre la nature des composés phénoliques, notamment les acides hydroxycinnamiques et le seuil fongistatique.

Les expériences effectuées en milieu liquide, certes de courte durée (96 heures et 144 heures), ont fourni des résultats analogues. Le tableau 7 indique l'incidence d'extraits de tissus de plantules provenant, d'une part, de la variété Saint-Pierre, incorporés au milieu à raison de 1,6 μg et 2,4 μg d'acide chlorogénique par ml, et, d'autre part, de la variété Supermarmande à 1,2 μg par ml. Les concentrations les plus faibles n'affectent pas la croissance du thalle mais, quel que soit le stade auquel l'extrait est ajouté, inhibent la synthèse et/ou l'activité des lyases.

TABLEAU VII

VARIATIONS EN % DU POIDS DE MYCÉLIUM SEC PAR RAPPORT AU TÉMOIN OBTENUES AVEC LA SOUCHE I EN INCORPORANT DES EXTRAITS PHÉNOLIQUES DE PLANTULES

A) lors de la mise en culture; B) 48 h; C) 72 h; D) 96 h après l'ensemencement.

Extrait	Traitement	Témoin	A	B	C	D
Ext. Saint-Pierre 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$..		100	85	/	85	/
Ext. Saint-Pierre 2,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$..		100	8,0	/	88	/
Ext. Supermarmande 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$		100	91	90	/	86

Enfin, l'incorporation d'extraits phénoliques à des essais enzymatiques confirme que l'inhibition des lyases correspond à des concentrations de l'ordre de dix fois plus faibles que celles bloquant la croissance des thalles. Toutefois, tant que ces expériences n'auront pas été reproduites sur des izozymes purifiés, il ne sera pas possible d'analyser ces résultats.

CONCLUSION

La souche du *P. palmivora* et celle du *P. parasitica* synthétisent, en présence d'inducteur, deux groupes de lyases. Celles-ci peuvent dégrader les structures pectiques de tissus vivants. L'existence de lyases possédant des propriétés analogues a été démontrée pour une autre espèce de *Phytophthora* (9, 10).

Les deux types d'enzymes pectinolytiques paraissent agir *in situ* avec des propriétés complémentaires. Tout se passe comme si l'endo-PATE, ne pouvant pas dissocier les parois cellulaires à elle seule, devait cependant altérer les structures avant que l'endo-PTE puisse les attaquer activement. Ainsi, la souche II synthétise moins d'endo-PATE que la souche I et sa virulence semble moindre pour les plantules de variétés sensibles. De même, lorsque les tissus de variétés résistantes ou tolérantes ont des teneurs réduites en endo-PATE, les nécroses évoluent lentement, même avec des activités relativement importantes d'endo-PTE; leurs extraits provoquent *in vitro* une macération faible.

Dans certains cas, l'évolution des symptômes et parfois leur stabilisation tendent à indiquer que certaines variétés de tomate opposent une réaction de défense. Par comparaison avec les activités des lyases dans les inoculum et dans les tissus des variétés sensibles, il se pourrait qu'une partie des réactions de l'hôte tendent à inhiber les enzymes pectinolytiques. Selon les variétés éprouvées, soit l'endo-PATE, soit l'endo-PTE, parfois les deux groupes d'enzymes simultanément manifestent une perte d'activité par rapport aux témoins sensibles.

Cette relation semble, en première approximation, quantitative. Lorsque chez le *L. pimpinellifolium* l'activité des lyases est bloquée dans les tissus, la plantule survit. Par contre, lorsque la dose d'inoculum appliquée aux plantules est six fois plus grande, la réaction de l'hôte paraît surmontée et les symptômes évoluent de la même façon que chez les variétés sensibles.

D'après les observations actuelles, l'hypothétique processus de défense pourrait correspondre à différents comportements suivant les proportions d'inactivation apparente des lyases, l'évolution de l'activité polyphénol-oxydasique et celle des teneurs en composés phénoliques dans les tiges. Il semble également que différents gènes, non seulement de résistance au *P. infestans* mais aussi à d'autres parasites, confèrent une protection au moins contre la souche la moins pathogène. Dans ces conditions, il serait peut-être

possible d'envisager de lutter contre les dépérissements de plantules de tomate provoqués par ces *Phytophthora* en tentant de stimuler les processus de réaction de l'hôte, par l'une des voies présumées, dans la mesure où les caractères à concentrer seraient aisément transmissibles et compatibles, à ce niveau, avec les qualités technologiques exigées par les producteurs.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) AKINREFON (O.A.), 1969. Production of extracellular enzymes by *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL. *J. Gen. Microbiol.*, 51, 67-74.
- (2) BATEMAN (D.F.), 1968. The enzymatic maceration of plant tissue. *Neth. J. Pl. Path.*, 74, 67-80.
- (3) BIEHN (W.L.), DIMOND (A.E.), 1970. Effect of carbon sources on the production of polygalacturonase by *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 60, 284.
- (4) FUCHS (A.), 1965. Polyphenol oxidases and phenolics in relation to resistance against cucumber scab in *Cucumis sativus*. I. Fungal and host polyphenol oxidases. *Neth. J. Plant Path.*, 71, 157-66.
- (5) GARIBALDI (A.), BATEMAN (D.F.), 1970. Association of pectolytic and cellulolytic enzymes with bacterial slow wilt of Carnation caused by *Erwinia chrysanthemi* BURKJ. Mc FAD et DIM. *Phytopath. Mediterranea*, 9, 136-44.
- (6) HATANAKA (C.), OZAWA (J.), 1970. An oligogalacturonate transeliminase from *Erwinia aroidea*. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1618-24.
- (7) KARR JR. (A.L.), ALBERSHEIM (P.), 1970. Polysaccharide-degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a "wall-modifying enzyme". *Plant Physiol.*, 46, 69-80.
- (8) KEEN (N.T.), ERWIN (D.C.), 1971. Endopolygalacturonase: evidence against involvement in *Verticillium* wilt of cotton. *Phytopathology*, 61, 198-203.
- (9) MANTRI (J.M.), DESHPANDE (K.B.), 1970. Physiological studies of the genus *Phytophthora*. I. *In vitro* production of transeliminases by *Phytophthora rubra*. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 72, 129-38.
- (10) —, —, 1970. II. *In vivo* production of pectic enzymes by *P. rubra*. *Marathwada Univ. J. Sci.*, 9, 5-9.
- (11) MATTA (A.), DIMOND (A.E.), 1963. Symptoms of *Fusarium* wilt in relation to quantity of fungus and enzyme activity in tomato stems. *Phytopathology*, 53, 574-8.
- (12) MOORE (L.D.), 1970. Pectic enzymes associated with black shank of tobacco. *Phytopathology*, 60, 1016-7.
- (13) MULLEN (J.M.), BATEMAN (D.F.), 1971. Production of an endo-polygalacturonate transeliminase by a potato dry rot pathogen, *Fusarium roseum avenaceum*, in culture and in disease tissue. *Phys. Plt. Path.*, 1, 363-73.
- (14) RAVISÉ (A.), 1968. Exigences nutritives de Pythiacées parasites de cultures tropicales. *CR Acad. Sci.*, 267, série D, 1821-4.
- (15) —, 1970. Etude comparative des aptitudes parasitaires de souches de *Phytophthora* parasites de cultures tropicales. *L'Agron. Trop.*, 25, 1015-31.
- (16) —, TANGUY (J.), 1971. Relations entre les constituants phénoliques de divers *Lycopersicum* MILL. et leur résistance à plusieurs espèces de *Phytophthora* de BARY. *CR Acad. Sci.*, 272, série D, 1252-5.
- (17) SASLAW (L.D.), WARAVIDEKAR (V.S.), 1967. The thiobarbituric acid method for deoxyribonucleosides. *In Method in Enzymology*, Acad. Press, New-York, London, 108-13.
- (18) SHERWOOD (R.T.), 1966. Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology*, 56, 279-86.

- (19) TANGUY (J.), GALLET (M.), 1969. Evolution qualitative de certains composés phénoliques lors du déclenchement du phénomène d'hypersensibilité au virus de la mosaïque du tabac.
CR Acad. Sci., 269, série D, 589-92.
- (20) —, —, 1969. Evolution quantitative en fonction du temps des composés phénoliques chez le *Nicotiana xanthi* n.c. infecté à 20° C.
CR Acad. Sci., 269, série D, 773-6.
- (21) TRIQUE (B.), 1971. Pectinases et acide fusarique du *Fusarium oxysporum* f. sp. *ealeidis* en relation avec la fusariose du palmier à huile.
Oléagineux, 26, 163-8.
- (22) —, 1971. Propriétés des pectinases du *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*.
Oléagineux, 26, 563-5.
- (23) —, RAVISE (A.), 1971. Enzymes pectinolytiques de souches de *Phytophthora* de BARY parasites de cultures tropicales.
CR Acad. Sci. (sous presse).

RESUME. — Des lyases altérant les matières pectiques sont synthétisées en présence d'inducteur par une souche de *P. palmivora* et une de *P. parasitica*. L'induction se réalise en plusieurs étapes indépendamment de la concentration en glucose dans le milieu de culture. Associées, ces enzymes altèrent in vitro et in vivo les structures cellulaires. Leur activité varie dans de larges proportions à l'intérieur des tissus de plantules de tomate possédant des caractères de résistance au *P. infestans* ou à d'autres parasites. Les extraits phénoliques de plantules résistantes atténuent l'activité enzymatique in vitro.

SUMMARY.—DETERMINATION OF THE PECTINOLYTIC ENZYMES OF TWO STRAINS OF PHYTOPHTHORA DE BARY. ACTIVITY VARIATIONS IN THE TISSUES OF THE TOMATO SEEDLINGS IN RELATION TO THE RESISTANCE GENOME.

Lyases which alter the pectic matter are synthesized in presence of a inducer by a strain of *P. palmivora* and a strain of *P. parasitica*. Induction occurs in several stages irrespective of glucose content in the culture media. When associated these enzyme alter in vitro and in vivo the cellular structures. Their activity largely vary within the tissues of tomato seedlings having resistance characters to *P. infestans* or other pests. The phenolic extracts from resistant seedlings diminish the enzymatic activity in vitro.

RESUMEN. — DETERMINACION DE LAS ENZIMAS PECTINOLITICAS EN DOS EJEMPLARES DE PHYTOPHTHORA DE BARY. VARIACIONES DE ACTIVIDAD EN LOS TEJIDOS DE PLANTULAS DE TOMATE EN RELACION CON LOS GENOMAS DE RESISTENCIA.

Ciertas lyasas que alteran las materias pécicas son sintetizadas en presencia de inductor por un ejemplar de *P. palmivora* y uno de *P. parasitica*. La inducción se realiza en varias etapas independientemente de la concentración de glucosa en el medio de cultivo. Asociadas, estas enzimas alteran in vitro e in vivo las estructuras celulares. Su actividad varía en grandes proporciones al interior de los tejidos de plántulas de tomate que poseen caracteres de resistencia al *P. infestans* o a otros parásitos. Los extractos fenólicos de las plántulas resistentes atenúan la actividad enzimática in vitro.

L'AGRONOMIE TROPICALE

Extrait du Vol. XXVII, n^{os} 6-7
JUN-JUILLET 1972

DÉTERMINATION DES ENZYMES PECTINOLYTIQUES DE DEUX SOUCHES *PHYTOPHTHORA* DE BARY VARIATIONS D'ACTIVITÉ DANS LES TISSUS DES PLANTULES DE TOMATE EN RELATION AVEC LES GÉNOMES DE RÉSISTANCE

A. RAVISÉ

par

B. TRIQUE

Laboratoire de biologie végétale, Université de Bretagne occidentale, Brest (ORSTOM)

30 NOV. 1972

O. R. S. I. O. M.

Collection de Référence

n^o

5786 Phy