

DEUXIEME CONFERENCE INTERNATIONALE
SUR LES MALADIES DES PLANTES
Bordeaux - 8, 10 novembre 1988

MECANISMES DE RESISTANCE DE L'ARACHIDE AU PUCCINIA
ARACHIDIS Speg. .

J.P. GEIGER (1), P.V. SUBBA RAO (2), J. EINHORN (3),
C. MALOSSE (3), B. RIO (1), S. SAVARY (1), M. NICOLE (1)
et A. RAVISE (1a).

- (1) ORSTOM, Abidjan-B.P. V 51 (C.I.), (1a) 93143 Bondy
- (2) ICRISAT, Patancheru P.O.-Andhra Pradesh 502324, Inde
- (3) Laboratoire INRA-CNRS des Médiateurs chimiques
Brouessy, Magny les Hameaux, 78470 Saint Rémy.

RESUME

L'arachide oppose plusieurs mécanismes de résistance au P. arachidis: teneurs élevées en inhibiteurs constitutifs et/ou stimulation différentielle de synthèse de phytoalexines aliphatiques ou phénoliques. Dix facteurs de résistance sont identifiés, leur accumulation pour partie analysable en CLHP. La plante oppose peu de barrières mécaniques. Les réactions de défense sont stimulées par la prémunition ou l'application de Phosétyl Al, déprimées par celle d'un inhibiteur. L'incidence de la modulation est étudiée sur des composantes de la résistance, ses conséquences en termes épidémiologiques évaluées sur la base d'expérimentations au champ et de simulation dynamique.

SUMMARY

DEFENCE MECHANISMS OF GROUNDNUT AGAINST PUCCINIA ARACHIDIS Speg. .

Resistance of groundnut to P. arachidis was associated with preformed barriers and/or differential synthesis of aliphatic or phenolic phytoalexins. Actually ten of these inhibitors have been identified, their accumulation partially determined by HPLC. However, physical barriers seemed ineffective. Host reactions were triggered by cross protection or by treatment with Phosetyl Al, conversely depressed by an inhibitor. The effects of defence modulation were analysed statistically. Their consequences with respect to processes of rust epidemics have been evaluated on the basis of field and simulation experiments.

29 OCT. 1990

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 30.807 ex 1

Cote :

M B VIII PWR

INTRODUCTION

L'arachide, légumineuse cultivée entre les 40° sud et 40° nord parallèles, couvre environ 19 millions d'Ha pour une production annuelle estimée à 20,4 millions de tonnes en gousses (SUBBA RAO, 1987).

La rouille, provoquée par Puccinia arachidis, peut provoquer 50% -dans les cas extrêmes 80%- de pertes. Cette maladie s'est rapidement propagée de l'Amérique du Sud et des Caraïbes vers l'Asie du Sud Est puis vers l'Afrique. C'est pourquoi, sont réalisés à l'ICRISAT et à l'IRHO (ICRISAT, 1987) des travaux de sélection de variétés résistantes, à l'ORSTOM et à l'ICRISAT des recherches sur l'étiologie du parasite et les mécanismes de résistance de l'arachide.

MATERIEL ET ETCHNIQUES

Le matériel végétal, fourni par l'ICRISAT et par l'IRHO, correspond à 6 variétés originaires de 3 continents et 3 espèces sauvages dont 2 immunes et 1 hautement résistante (SUBRAHMANYAM et al. 1983).

La souche de P. arachidis, isolée en Côte d'Ivoire, entretenue sur folioles in vitro, sert également aux études épidémiologiques. Les infections expérimentales sont réalisées par voie sèche ou par voie humide les suspensions de spores étant calibrées à 5×10^4 /ml.

L'étude de l'interaction porte sur l'analyse des composantes de la résistance: période d'incubation et de latence, fréquence d'infection, diamètre des lésions, intensité de sporulation, pourcentages de feuilles colonisées et de lésions nécrosées.

La plasticité des mécanismes de défense est mise en évidence par prémunition avec une souche de Puccinia sorghi parasite du maïs ou par application de médiateurs chimiques -phosétyl Al (TEPA) fongicide à action indirecte prédominante, acide alpha oxy amino acétique (AOA) inhibiteur de synthèses phénoliques- .

Les réactions de l'hôte sont évaluées par des méthodes histologiques et biochimiques. Outre des dosages de teneurs en phénols totaux, les substances inhibitrices sont séparées par chromatographie sur plaques (CCM) ou sur colonnes (CLHP), leur toxicité déterminée par des tests biologiques in vitro (Subba Rao 1987). Les structures des phytoalexines sont élucidées par spectrométrie de masse (EINHORN et al 1987) et par analyses microchimiques sur les produits préalablement purifiés.

RESULTATS Les mécanismes physiologiques décelés chez les variétés ou espèces d'arachides résistantes ou immunes au *P. arachidis* semblent de même nature. Contrairement aux réactions à d'autres parasites foliaires décrits précédemment (AGUAMAH et al, 1981; VAZIRI et al, 1981) ils correspondent à la stimulation de multiples biosynthèses dérivant des cycles de l'acétyl Co A et des phénylpropanoïdes. Globalement, 2 situations prédominent (Fig. I). La résistance peut correspondre à des concentrations initiales importantes de substances inhibitrices constitutives ou bien à de faibles teneurs de celles-ci associées à des synthèses rapides de phytoalexines.

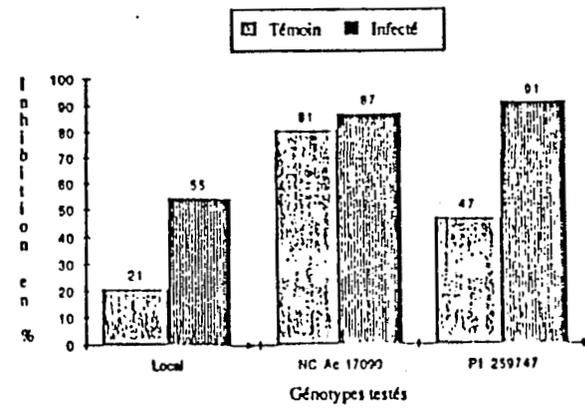


Figure I
Toxicité des inhibiteurs constitutifs chez les témoins et de l'ensemble des facteurs de résistance 10 j après inoculation pour la germination des urédospores de *P. arachidis*. Concentration correspondante à 1,25 mg frais par ml de milieu liquide. local = sensible, NC Ac 17099 et PI 25747 = résistants au *P. arachidis*.

Chez les espèces immunes, 2 mécanismes distincts interviennent: l'accumulation majoritaire de phytoalexines dérivant ou associées à la voie de l'acétyl Co A ou bien celle quasi exclusive de facteurs de résistance de nature phénolique. Au stade actuel des investigations, les barrières mécaniques opposées à l'infection semblent restreintes hormis des dépôts faibles de callose.

Parmi 15 substances inhibitrices, 10 phytoalexines sont identifiées. La figure 2 représente les structures de 3 d'entre elles. Parmi les substances aliphatiques,

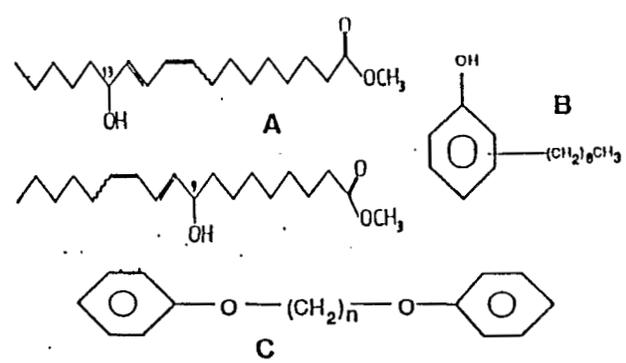


Figure 2
Structures de 3 des phytoalexines récemment identifiées chez l'arachide :
A : diénols,
B : nonyl phénols,
C : alkyl bis phényl éthers.

prédominant des dérivés d'acides gras insaturés tels que le linoléate de méthyle (SUBBA RAO, 1988) et des dérivés oxygénés, des diénols également identifiés chez 3 autres plantes (VERNENGI et al, 1987) ainsi qu'un tétrabutyl ester. La conjonction des deux voies de biosynthèse aboutit, entre autres, à l'accumulation de nonyl phénols et d'alkyl bis phényl éthers.

La toxicité des facteurs de résistance in vitro pour le parasite est vérifiée à partir des extraits bruts de tissus ainsi qu'après purification. Pour le linoléate de méthyle et les diénols, les recherches furent approfondies à l'aide de substances de synthèse. le tableau I indique les résultats obtenus avec un diénol.

Concentration en diénol (en µg/ml)	Inhibition de la germination (%)	Longueur moyenne du tube germinatif (mm)
Témoin	0	0,21
0,5	3	0,18
1,0	4	0,19
2,0	0	0,11
5,0	74	0,03
10,0	100	0,00

Tableau I
Inhibition in vitro de la germination d'urédospores et de la croissance de tubes germinatifs de *P. arachidis* par un diénol: hydroxy 13 octadécadien 9,11 oate de méthyle.

La dynamique des réactions de défense est suivie par des dosages de composés phénoliques totaux-peu représentatifs des variations qualitatives- et par des analyses chromatographiques en CCM et en CLHP d'extraits de tissus. Ainsi, en CLHP sur colonne de silice, une fraction appelée alpha contient plusieurs phytoalexines entre autres du linoléate de méthyle, des diénols, des alkyl bis phényl éthers et des nonyl phénols. Ses variations d'intensité par rapport à un extrait de plants non inoculés mettent en évidence 2 types de cinétiques chez des variétés résistantes (Fig.3). Le blocage du parasite correspond soit à une synthèse précoce soit à une accumulation tardive mais plus intense des produits.

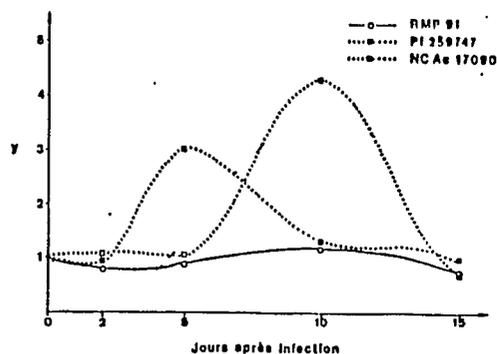


Figure 3
Courbes d'évolution établies d'après les analyses en CLHP sur colonne de silice des rapports, Y, des surfaces de la zone alpha contenant des phytoalexines pour des extraits de plants inoculés par rapport aux témoins.
RMP 91 = sensibles,
PI 259747 et NC Ac 17090 = résistants.

La modulation des mécanismes de résistance par la prémunition et par l'application de médiateurs chimiques influe sur l'interaction hôte-parasite.

La protection conférée par la préinoculation du Puccinia sorghi est plus importante lorsqu'un délai de 48 h la sépare de l'infection par le P. arachidis. L'analyse des étapes d'infection en fonction du délai entre les 2 apports d'inoculum prémunisant puis infectant prouve que les différences de réactions de défense provoquées chez l'hôte ne sont pas seulement quantitatives. L'étude statistique (analyse de variance bidimensionnelle) révèle que l'effet de la prémunition est semblable à celui de TEPA indiqué ci-dessous.

L'apport d'AOA sur plants témoins ou inoculés provoque dans l'ensemble une réduction partielle des teneurs en composés phénoliques totaux. Des analyses en CLHP révèlent dans les extraits de tissus de plants traités, sensibles ou résistants à la rouille, une réduction des composantes de la fraction alpha (Cf Fig.3). Cela se traduit par un accroissement de la vulnérabilité de la variété sensible et une réduction de la résistance chez l'autre variété (Tabl.2).

L'application de TEPA sur le feuillage ou au niveau des racines provoque une réaction inverse de celle à l'AOA, assortie d'une diminution de l'infection foliaire chez les 2 variétés. Il convient de préciser que le TEPA manifeste in vitro une faible activité inhibitrice, comparée à celle des diénols, pour le P. arachidis.

Ces traitements modifient sensiblement 3 caractéristiques épidémiologiques: la durée de la période de latence, la fréquence d'infection et le diamètre des lésions. Les 2 paramètres les plus affectés sont la fréquence d'infection et le diamètre des lésions. Si la réponse des 2 variétés, sensible et résistante, est équivalente en pourcentages de variation, en revanche la valeur effective des composantes diffère considérablement suivant le niveau de résistance. En effet, pour les essais témoin (plantes inoculées non traitées) la variété résistante se caractérise par une durée de la période de latence environ double de celle de la variété sensible (27,7 j contre 13 j) et une fréquence d'infection environ de moitié inférieure à celle de la variété sensible (4,5 lésions/cm² contre 10,4).

A l'aide d'un modèle de simulation dynamique, nous avons tenté d'extrapoler à l'épidémie de rouille de l'arachide les variations induites par les traitements avec le TEPA et l'AOA sur le déroulement du processus monocyclique. Le tableau 2 présente les résultats d'une simulation sur la base de variations considérées comme

significatives (supérieures à 20% par rapport au témoin). Il en ressort, d'une part, une très grande différence dans l'intensité des épidémies suivant les variétés -différence essentiellement imputable à celle des temps de latence - et, d'autre part, un effet très net des traitements.

Géotype	Traitement	% intensité de l'épidémie	Variation (%) par rapport In + AOA	Variation (%) par rapport In (seul)
Local	In + AOA	9,19	-	(+) 40
	In (seul)	6,57	(-) 29	-
	In + TEPA	4,08	(-) 56	(-) 38
NC Ac 17090	In + AOA	1,88	-	(+) 59
	In (seul)	1,18	(-) 37	-
	In + TEPA	0,81	(-) 57	(-) 31

Tableau 2
Intensité cumulée de l'épidémie selon les traitements et variations relatives.

traitements :

In = inoculé,
AOA = inhibiteur,
TEPA = phosétyl Al.

Ainsi, le traitement par l'AOA se traduirait par une augmentation de l'intensité des épidémies d'environ 40 et 60% respectivement dans le cas de la variété sensible et de la variété résistante, tandis que l'application du TEPA entraînerait une diminution d'environ 35% de l'intensité des épidémies chez les 2 variétés. Il est certain que la validité d'une telle extrapolation devra être vérifiée par des essais sur le terrain.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A ce stade des investigations, les réactions de défense de l'arachide contre le *P. arachidis* semblent correspondre à des mécanismes biologiques complexes. Ceux-ci font intervenir vraisemblablement 16 stimulations de biosynthèses de substances inhibitrices, pour une partie d'entre elles de novo, correspondant à plusieurs voies métaboliques chez l'hôte. Cette situation se distingue de celles décrites pour la résistance de l'arachide aux cercosporioses et au *Phoma* spp. mettant en oeuvre des stilbènes (AGUIAH et al, 1981) et un ptérocarpane (VAZIRI et al, 1981).

Si parmi les mécanismes de défense contre le *P. arachidis* interviennent peu de barrières mécaniques décrites chez d'autres légumineuses en réaction à des attaques de rouilles foliaires, par contre ce processus présente des analogies avec l'interaction haricot-*Uromyces phaseoli* (ELNAGY et HEITEFUSS, 1976; EBRAHIM NESBAT et al, 1982).

L'étude des facteurs de résistance de l'arachide à l'agent de la rouille doit être approfondie. En particulier il est nécessaire de préciser la nature de plusieurs inhibiteurs, la contribution du pool phénolique dont les

1

variations qualitatives semblent particulièrement importantes avec l'apparition, entre autres, de nonyl phénols et d'alkyl bis phényl éthers. Pour chaque type de résistance sont envisagées des études de cinétique de synthèse des substances inhibitrices et de leur localisation spatio temporelle dans les tissus par rapport à l'agent pathogène au cours de l'infection.

D'après nos résultats expérimentaux, selon l'origine génétique des espèces et variétés d'arachide étudiées, plusieurs mécanismes de résistance sont opposés au parasite. Il semble important que les sélectionneurs puissent ainsi envisager de transférer dans des variétés pour accroître leur résistance soit des gènes régulant la biosynthèse de substances inhibitrices de nature constitutive soit des gènes régulant la synthèse de phytoalexines. Dans ce cas, plusieurs possibilités pourraient s'envisager puisque chez certaines espèces immunes prédominent des facteurs de résistance de nature phénolique, chez d'autres des inhibiteurs dérivant de l'acétyl Co A. Parmi ces situations, il importera en matière de sélection de hiérarchiser les mécanismes de résistance à transférer en fonction de critères génétiques et de stabilité. Devront également être pris en compte d'une part l'incidence de ces mécanismes de défense sur la productivité, d'autre part leur effet sur l'adaptation du matériel végétal aux variations des conditions de milieu. Dans une autre étape, la résistance au P. arachidis sera envisagée en association avec celle aux parasites foliaires, principalement d'origine fongique, les plus courants dans les grandes zones de culture.

Au plan physiopathologique, nous observons la possibilité de stimuler les réactions de défense de l'arachide contre le P. arachidis même chez une variété sensible. On peut donc estimer qu'une intervention analogue sur des cultivars partiellement résistants aurait pour effet de maintenir l'intensité d'une épidémie de rouille à des niveaux acceptables pour un producteur d'arachide. Une telle hypothèse est-elle réaliste aux plans technique et économique? Là encore, la réponse ne peut être apportée que par des essais de terrain.

Plus généralement, la tentative de modélisation de ces résultats présente l'intérêt de fournir une estimation de l'impact d'un processus biochimique sur une composante de résistance, expression biologique d'un phénomène particulièrement complexe. Par la modélisation, la valeur prospective de résultats obtenus à l'échelle moléculaire peut être envisagée à l'échelle épidémiologique. Ces résultats sont alors susceptibles d'être

exploités rationnellement dans une perspective globale de sélection pour la résistance variétale de l'arachide à la rouille, puis dans une autre étape contre une partie du cortège parasitaire du feuillage.

BIBLIOGRAPHIE

AGUAMAH G.E., LANGCAKE P., LEWORTHY D.P., PAGE J.A., PRYCE R.J. and STRANGE R.N., 1981. TWO novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogea*. *Phytochemistry*, 20, 1381-1383.

EBRAHIM NESBAT H.H., HOPE F. and HEITEFUSS R., 1982. Ultrastructural studies on the development of *Uromyces phaseoli* in bean leaves protected by elicitors of phytoalexins accumulation. *Phytopath. Z.*, 103, 261-271 .

EINHORN J., DUFFAULT J.M., VIRELIZIER H. and TABET J.C., 1987. Gas phase ion-molecular reactions of unsaturated hydroxy-fatty acid derivatives and analogs. 5th European Symposium on Organic Chemistry, Jerusalem 30 aug. 1987

ELNAGY M.N. and HEITEFUSS R., 1976. Permeability changes and production of antifungal compounds in *Phaseolus vulgaris* infected with *Uromyces phaseoli*. *Physiological Plant Pathology*, 8, 269-277 .

ICRISAT, 1987. Groundnut Rust Disease. Proceedings of a Discussion Group Meeting. 24-28 sep. 1984; ICRISAT Center Patancheru, INDIA.

SUBBA RAO P.V., 1987. La rouille de l'arachide, étude de quelques mécanismes de défense de l'hôte. Thèse de doctorat en Sciences de la Vie, Université de Paris sud, Centre d'Orsay, 21 décembre 1987.

SUBBA RAO P.V., GEIGER J.P., EINHORN J., MALOSSE C., RIO B. NICOLE M., SAVARY S. and RAVISE A., 1988. Isolation of methyl linolenate, a new antifungal compound from *Arachis hypogea* L. leaves infected with *Puccinia arachidis* Speg. *Oléagineux*, 43, (4), sous presse.

SUBRAHMANAM P., MCONALD D., GIBBONS R.W. and SUBBA RAO P. V., 1983. Components of resistance to *Puccinia arachidis* in Peanuts. *Phytopathology*, 73, 253-256 .

VAZIRI A., KEEN N.T. and ERWIN D.C., 1981. Correlation of medicarpin production with resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* in alfalfa seedlings. *Phytopathology*, 71, 1235-1238.

VERNENGI A., TAQUET B., RENARD J.L. et RAVISE A. ? 1987. Détection chez le palmier à huile de dérivés oxygénés d'acides gras polyéniques toxiques pour le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*; variation de leur accumulation selon les croisements et les modalités de traitements. *Oléagineux*, 42, I - IO .