

UNIVERSITES DE PARIS XI ET PARIS VI - INA PARIS - GRIGNON

D.E.A. DE PHYTOPATHOLOGIE

1986

Etude chez le citronnier Rough Lemon des réactions de défense
provoquées par des inoculations artificielles de Phytophthora
parasitica ou de Phytophthora citrophthora et de leur modulation
par des médiateurs chimiques.

H. JARQUIN - BARBERENA

Laboratoire de Phytopathologie

ORSTOM - Bondy

P L A N

- INTRODUCTION

- OBJECTIFS DE RECHERCHE

- MATERIEL ET TECHNIQUES

- . Matériel végétal
- . Agent pathogène
- . Obtention de l'inoculum et infections expérimentales
- . Traitements de plants dans la série d'infections
- . Récolte et observations
- . Préparation des extraits
- . Dosage de composés phénoliques
- . Chromatographie sur couche mince de silice C.C.M.
- . Identification de produits
- . Chromatographie liquide sur colonne atmosphérique de silice
- . Chromatographie liquide à haute performance C.L.H.P.
- . Test biologiques

- RESULTATS

- . Réactions différentielles au parasitisme
- . Essai de repérage des facteurs de résistance
- . Modulation de la réaction de défense
- . Test de toxicité in vitro

- DISCUSSION ET CONCLUSION

- BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La gommose des citrus est provoquée par plusieurs espèces de Phytophthora. Cette maladie est probablement l'une des plus anciennement connues et parmi les plus graves (BOCCAS et LAVILLE, 1978)

Les Phytophthora spp. attaquent les racines des agrumes dont ils provoquent une pourriture molle du cortex. Au niveau du collet et de la base des troncs la maladie se traduit par des chancres à exudat gommeux. La maladie est largement distribuée dans les régions d'agrume-culture (liste de répartition géographique). L'intensité des attaques et leur fréquence relative dépend des conditions climatiques.

Liste de répartition géographique des Phytophthora spp. dans les principales régions agrumicoles du monde

P. parasitica et P. citrophthora

Italie, Corse, Espagne, Grèce. Israël - Moyen-Orient. Puerto Rico - Mexique - Guatemala - Costa Rica - Argentine - Brésil - Australie - Océanie - Asie sud-est - Sénégal - Guinée - Côte d'Ivoire - Haute Volta - Bénin - Mali - Congo - Zaïre - RCA - Cameroun.

P. palmivora

Italie - Moyen-Orient - Guyane - Puerto Rico - Inde - Indochine - Malaisie - Java - Vanuatu - Côte d'Ivoire - Cameroun - Congo.

Dans la distribution géographique citée par BOCCAS et LAVILLE (1978) et par de VALLAVIEILLE (1981) sur les Phytophthora spp., le P. parasitica et le P. palmivora sont les plus actifs dans les régions tropicales à deux saisons chaudes et humides notamment l'Amérique Centrale et du Mexique, et dans les zones subtropicales et méditerranéennes.

Les attaques racinaires sont attribuées à P. citrophthora, P. parasitica et P. palmivora, espèces les plus susceptibles d'envahir les organes souterrains : grosses racines, racines secondaires et tertiaires des arbres en place. Ces attaques sont habituellement désignées par le terme de pourriture molle à Phytophthora (Phytophthora root rot). Elles provoquent des réductions de la surface foliaire, parfois des jaunissements prématurés. La lutte préventive dépend de l'utilisation de porte-greffes résistants (BOCCAS et LAVILLE 1978, de VALLAVIEILLE et PERRIER 1981) parmi lesquels le brigadier tient une place prépondérante. La Lime Rangpur et le Rough Lemon sont aussi fréquemment utilisés comme porte-greffe bien que dans certaines conditions de terrains lourds et sous certains climats ils soient sensibles à la gommose.

Dans les vergers d'agrumes, LAVILLE et CHALANDON (1982) ont démontré que l'application d'un fongicide systémique le phoséthyl d'aluminium (TEPA) peut avoir une action non seulement préventive mais aussi curative. Chez d'autres plantes telles que la tomate, ce fongicide provoque une réaction de défense contre des Phytophthora spp. (VO THI HAI et al. 1979, BOMPEIX et al. 1980). Il intervient également en accroissant, semble-t-il, la résistance du piment et du tabac aux Phytophthora spp. (GUEST 1982, 1984). Une action directe est présumée dans les couples P. Fragaria - fraisier et Bremia Lactucae - salade (DERCKS et BUCHENAUER, 1986). De même, BOMPEIX et SAINDRENAN (1984) ont démontré la toxicité in vitro du phoséthyl d'aluminium espèces de Phytophthora notamment le P. parasitica et le P. citrophthora.

LES OBJECTIFS DE RECHERCHE

Nous avons essayé d'établir, chez le Rough Lemon fréquemment utilisé comme porte-greffe, si les réactions aux attaques de Phytophthora spp. peuvent être modulées chez des plants âgés de 1 an. Pour cela, nous avons inoculé et traité 700 plants en serre pour :

- étudier les réactions différentielles aux attaques de P. parasitica considéré comme non pathogène et de P. citrophthora parasite pour le Rough Lemon ;
- analyser l'influence de la pression d'inoculum en fonction du temps -entre 3 et 10 semaines - ;
- provoquer une modification de la réaction de l'hôte par des traitements soit avec un fongicide systémique le TEPA, soit avec 2 analogues d'éliciteurs fongiques ;
- déterminer les modifications physiologiques intervenant au niveau des racines et tenter de mesurer les accumulations des substances en fonction de ces différentes manipulations.

Pour cela nous avons associé des observations macroscopiques et microscopiques de tissus de racines et de tiges, des analyses chromatographiques et des dosages de composés phénoliques, enfin des tests de toxicité in vitro d'extraits de tissus pour deux souches de Phytophthora spp.

MATERIEL ET TECHNIQUES

* Matériel végétal

Les expériences sont réalisées avec des plants de la variété Citrus jambhi ou Rough Lemon dont les semences sont fournies par la station INRA de Corse. Les plants âgés de 1 an sont cultivés dans un mélange de terre franche, de tourbe et de sable (1 : 1 : 1). Ils ont subi plusieurs rempotages pour stimuler la formation de racines.

* Agents pathogènes

Les souches de Phytophthora spp. proviennent de la mycothèque de l'IRFA (Montpellier). La souche de P. parasitica (SF) n'est pas pathogène pour le Rough Lemon. Les souches de P. citrophthora (BB₁₃ et ED) isolées de chancres d'agrumes en Corse attaquent le Rough Lemon. Ces souches sont cultivées en tubes sur décoction gélosée et glucosée de pois supplémentée en thiamine.

* Obtention de l'inoculum et infections expérimentales

L'inoculum est multiplié en milieu liquide sur décoction de pois, additionnée de sulfate de polymyxine à 20 ppm, à raison de 100 ml en fioles coniques de 250 ml. Le volume utilisé pour la 1ère série d'infections expérimentales correspond à 12 litres de culture. L'incubation a lieu en étuve à 28 °C pendant 2 semaines.

Les talles sont dilacérés avec un broyeur Turmix pendant 2 mn. L'estimation du poids sec du mycelium est réalisée à partir d'échantillons de 15 ml d'inoculum séchés au four à 150 °C pendant 24 heures.

La première série d'infections expérimentales est réalisée après scarification superficielle du sol provoquant des blessures de radicules proches de la surface. Le volume d'inoculum versé au pied de chaque plant sont :

P. parasitica (SF) C₁ = 20 ml, C₂ = 40 ml, C₃ = 60 ml
P. citrophthora (ED et BB₁₃) C₁ = 15 ml ; C₂ = 30 ml

Pour la seconde série d'inoculations, il est pratiqué des blessures sur racines superficielles et à la base du collet. Les souches SF de P. parasitica et BB13 de P. citrophthora sont inoculées à raison de 15 ml de broyat par plant. Les cultures sont maintenues sous éclairage naturel et artificiel 14 h/24 h ; la température varie de 22 à 30 °C. L'humidité est maintenue par 2 arrosages quotidiens.

* Traitements de plants dans la seconde série d'infections expérimentales

L'action protectrice du TEPA est comparée à celle d'un éliciteur fongique, la galactosamine (oligomère des chitosanes) et à celle d'un dérivé chimique d'un autre éliciteur, un complexe d'acide arachidonique dans des β cyclodextrines. Ce complexe a été préparé au laboratoire des Médiateurs Chimiques INRA-CNRS par Mr KUNESCH et Mmes RAMIANDRASOA et CHUILON.

Les applications de TEPA ont été faites à 2 doses, 250 mg/plant et 100 mg/plant dans le sol au niveau de racines mensuellement pendant 3 mois. La galactosamine à la dose de 100 μ g/25 ml eau en apport hebdomadaire pendant 4 semaines, la rémanence du traitement est suivie pendant 2 mois. Le dérivé monohydroxilé de l'acide arachidonique fut incorporé en une seule fois à raison de 5 mg de complexe à la base du tronc sous l'écorce, au début de l'expérience.

* Récolte et observations

La première série expérimentale est récoltée 3, 5, 8, 10 semaines après l'inoculation. Des observations macroscopiques et microscopiques sont effectuées à chaque fois, 2 à 3 jours avant et après la récolte de l'échantillon pour extraction. Dans chaque observation il a été apprécié la vigueur végétative et l'état du feuillage, l'émission de nouvelles racines. Pour la recherche de lésions dans le phloème nous avons effectué des coupes longitudinales et transversales du collet de la base de la tige, des racines et radicelles. En cas de symptômes nous avons essayé de dénombrer les nécroses racinaires et le pourcentage d'infection. Les analyses concernent les 3 premiers prélèvements.

Pour la seconde série d'infections expérimentales des plants sont récoltés à 1, 2, 3 mois après l'inoculation. Pour chaque série les poids de racines sont établis puis tous les lots sont conservés à - 18 °C. Les analyses concernent le prélèvement à 1 mois.

* Préparation des extraits

Elle est réalisée par dilacération de tissus dans le méthanol à l'aide d'un broyeur Turmix pendant 3 mn. Après une diffusion de 24 h à température ambiante et à l'obscurité, les tissus sont essorés puis subissent une seconde diffusion. Les extraits sont rassemblés et séchés sous vide ; le résidu sec est repris à raison de 1 ml de méthanol redistillé pour 5 g de tissus frais.

* Dosage des composés phénoliques

L'estimation quantitative des phénols totaux dans les tissus est réalisée selon le test de Folin Ciocalteu. Un volume d'extrait, correspondant à une quantité connue de tissus frais, est comparé en densitométrie à une gamme étalon d'acide chlorogénique 10^{-3} M préparée dans les mêmes conditions. Les concentrations en phénols totaux sont exprimées en μ g d'équivalents d'acide chlorogénique par gramme de tissus frais.

* Chromatographie sur couche mince de silice (C.C.M.)

Les substances toxiques accumulées au cours des réactions de défense sont recherchées par chromatographie sur plaques de silice en utilisant plusieurs solvants. Ces systèmes sont principalement : Hexane - Acétate d'éthyle (Hx - Ae (2 : 1)), Hexane - Acétate d'éthyle - Méthanol (Hx - Ae - Me (50 : 40 : 5)) pour les sesquiterpènes et les dérivés d'acide gras insaturés. Chloroforme - Acétate d'éthyle - Méthanol (Clf - Ae - Me (50 : 40 : 5)) pour les composés phénoliques et les substances polaires.

* Identification des produits

Les substances actives séparées en C.C.M. sont visualisées sous ultra-violet (U.V.) à 254 nm et à 366 nm. Certains produits n'étant pas fluorescents, des réactions colorées sont obtenues :

- par le trichlorure d'antimoine ($SbCl_3$) à saturation dans le chloroforme et après chauffage à 115 °C pendant 10 mn (Terpènes stéroïdes, lipides, etc ...) ;
- paranitraniline diazotée à froid (composés phénoliques ou aminés).

* Chromatographie liquide sur colonne atmosphérique de silice

Un échantillon de 306 mg de tissus de racines provenant de plants inoculés par la souche SF (inoculum doublé) a été partiellement séparé sur colonne de 3 cm x 50 cm chargée de silice Merk 40 (70 - 230 mesh ASTM) avec les séquences successives d'élué : Hexane, Hx - Ae (100 : 10), (100 : 20), (50 : 50) acétate d'éthyle.

* Chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P.)

Elle est réalisée avec un appareil cromatem comportant 2 pompes pilotées par un micro-ordinateur APPLE II. La détection en ultra-violet est faite par un détecteur Shimadzu SPD - 2A à 280 nm. Les chromatographies analytiques et semi-préparatives sont faites avec une colonne de silice greffée en C18 - 5 μ , 3/8' x 30 cm - éluée par un gradient d'acétonitrile dans une solution acétique à 5 °/°. Lors des chromatographies semi-préparatives, les fractions correspondant à chaque pic sont ensuite étudiées en C.C.M. et utilisées pour des tests biologiques.

* Tests biologiques

Deux catégories de tests de toxicité sont réalisées avec les extraits bruts de tissus ou des extraits partiellement purifiés.

Après avoir effectué une chromatographie en C.C.M. des extraits bruts à tester à une équivalence de 150 à 400 μ g de poids de tissus frais, les plaques sont ensuite pulvérisées avec une suspension de spores de Cladosporium cladosporioides suivie de celle d'une solution nutritive P.D.A. La plaque est mise en incubation en étuve à 28 °C dans une enceinte où l'humidité atmosphérique est proche de la saturation. Après 48 h, les zones où le champignon n'a pas poussé restent blanches et révèlent les substances toxiques. La persistance de la toxicité des produits sur plaques de C.C.M. est appréciée pendant une période allant de 8 à 15 jours.

L'inhibition in vitro de la croissance de P. parasitica et P. citrophthora est testée pour chaque extrait en milieu liquide nutritif (pois - thiamine - polymyxine) sur lames à concavité. Les implants sont prélevés sur des cultures en boîtes de Pétri. Les concentrations éprouvées vont de 150 μ g à 300 μ g d'équivalents de tissus frais par ml de solution nutritive. L'incubation a lieu en étuve à 28 °C. L'inhibition de croissance par rapport au témoin est mesurée au microscope entre 2 et 6 jours d'incubation. Les résultats correspondent à la moyenne de 18 mensurations pour chaque motif.

RESULTATS

Au cours de nos essais, nous observons tant au niveau des symptômes macroscopiques que lors des dosages et analyses, des différences de réactions chez les plants de Rough Lemon suivant les parasites inoculés.

I - Réactions différentielles au parasitisme en fonction du temps

Nous avons suivi entre 3 et 10 semaines après l'inoculation de 15 ml et 20 ml de broyats par plant, les réactions de l'hôte aux 3 souches de Phytophthora spp.

1) Cas de la tolérance

La souche SF de P. parasitica ne provoque pas de maladie (Fig. 1). Le poids des racines augmente au cours de l'essai. L'accumulation au cours du temps de plusieurs barrières mécaniques ou biochimiques, en particulier de composés phénoliques constitue une défense effective pour les racines des plants. Les nouvelles racines formées après l'inoculation restent en majorité saines, ce qui est évident vu l'augmentation du poids de tissus frais à la fin de l'expérience.

Entre 3 et 8 semaines, l'émission de nouvelles radicules est importante puis elle diminue (Tableau 1).

Tableau 1 - Réactions différentielles au parasitisme en fonction du temps : Emission de nouvelles racines par motif et par prélèvement en pourcentage.

Prélèvement \ Motif	SF ₁	ED ₁	BB ₁
	3 semaines	50	40
5 semaines	30	30	40
8 semaines	30	20	10
10 semaines	20	10	10

SF₁ : souche de P. parasitica (10 ml d'inoculum par plant)

ED₁ et BB₁ : souches de P. citrophthora (15 ml d'inoculum par plant)

Cependant la souche SF est capable de provoquer des lésions locales sur les radicules dont le pourcentage de mortalité de 10% à 3 semaines est quadruplé à la fin de l'essai (Tableau 2).

Tableau 2 - Pourcentage de radicules mortes par motif et par prélèvement.

Prélèvement \ Motif	SF ₁	ED ₁	BB ₁
	3 semaines	10	15
5 semaines	20	35	20
8 semaines	40	40	40
10 semaines	40	50	50

Conditions expérimentales analogues à celles du Tableau 1.

Ces observations sont confirmées par les résultats des dosages des composés phénoliques totaux (Tableau 3) dont les concentrations augmentent en fonction du temps. Les analyses chromatographiques présentées ci-après vont dans le même sens.

On note une bonne cicatrisation des tissus au niveau des radicules nécrosées.

Tableau 3 - Dosage de phénols totaux dans les tissus de racines par la méthode de Folin Ciocalteu. Les résultats sont exprimés en μg # acide chlorogénique par g de tissus frais.

P. parasitica : SF₁ = 20 ml, SF₂ = 40 ml, SF₃ = 60 ml d'inoculum
P. citrophthora : BB₁ et ED₁ = 15 ml d'inoculum
 BB₂ et ED₂ = 30 ml d'inoculum

Prélèvement \ Motif	SF ₁		SF ₂		SF ₃		ED ₁		ED ₂		BB ₁		BB ₂	
3 semaines	4773	7983	7541	9061	9923	9923	9923	9923	9923	9923	9923	9923	10656	
5 semaines	13008	10385	9631	6165	4563	9022	9438							
8 semaines	15554	12736	9717	5136	14156	11160	11264							

Teneur de phénols totaux dans le témoin initial : 6697 mg/g.F.

2) Cas de la sensibilité

Les deux souches de P. citrophthora provoquent des dégâts semblables (Figure 2). Nous constatons la chute rapide de la réémission de radicelles (Tableau 1 et Figure 3) confirmée par l'augmentation du pourcentage de racines mortes (Tableau 2). Les dosages des composés phénoliques totaux indiquent une régression avec la souche ED et une quasi stagnation avec la souche BB (Tableau 3). Les régressions de teneurs en composés phénoliques sont nettement décelées en C.L.H.P. comme nous l'indiquons ci-dessous.

II - Comparaison des réactions de l'hôte en fonction de la pression de l'inoculum

1) Cas de la tolérance

Lorsque le volume d'inoculum de la souche SF est doublé ou triplé, les réactions de défense persistent : émission de racines (Tableau 4), augmentation de teneur en composés phénoliques.

Tableau 4 - Evolution de la formation de nouvelles racines en fonction de la pression de l'inoculum au cours du temps (en pourcentage).

Prélèvement \ Motif	SF ₂		SF ₃		ED ₂		BB ₂	
3 semaines	40	50	50	40				
5 semaines	30	30	30	40				
8 semaines	30	30	20	10				
10 semaines	10	10	20	10				

Conditions expérimentales identiques à celles du Tableau 3.

Cependant pour la plus forte concentration le tableau 3 indique une tendance au fléchissement des réactions phénoliques. Celle-ci est peut être en relation avec l'augmentation des pourcentages de racines nécrosées à 8 et 10 semaines (Tableau 5).

Tableau 5 - Réactions différentielles au parasitisme. Pourcentage de radicelles mortes par motif et par prélèvement.

Prélèvement \ Motif	SF ₂	SF ₃	ED ₂	BB ₂
	3 semaines	20	30	30
5 semaines	20	30	35	40
8 semaines	30	50	40	40
10 semaines	50	50	40	50

Conditions expérimentales analogues à celles du Tableau 1.

Les analyses chromatographiques en C.L.H.P. sur colonne de silice greffée en C18 indiquent d'importantes accumulations des produits par rapport au témoin chez les plants inoculés avec la souche SF aux 3 concentrations.

Sur les chromatographies correspondant aux Figures 4 à 6, l'éluion de substances est divisée en 4 zones de gradient d'acétonitrile. Nous y distinguons 29 pics dont la plupart ont une surface accrue après l'inoculation de la souche avirulente. Le tableau 6 récapitule les principales modifications décelées à 3 et à 8 semaines pour des doses de 20 à 60 ml d'inoculum apportées par plant.

2) Cas de la sensibilité

Les tableaux 4 et 5 concernent les réactions aux souches de P. citrophthora. S'ils indiquent une aggravation de symptômes en fonction des volumes d'inoculum appliqués, ils ne permettent pas d'apprécier la gravité de l'attaque.

Celle-ci est mise en évidence par la comparaison des analyses en C.L.H.P. des lots de plants inoculés par les souches BB₁₃ ou ED par rapport à ceux inoculés avec la souche avirulente SF. Les figures 7 à 9 indiquent les réductions des synthèses à 3 semaines avec la souche ED, à 8 semaines avec la souche BB₁₃ (aux 2 concentrations). Il apparaît que pratiquement toutes les zones sont concernées surtout entre 10% et 80% d'acétonitrile dans le gradient. Il est évident que le doublement de concentrations d'inoculum de la souche BB₁₃ provoque une plus forte altération de synthèses à 8 semaines. Le tableau 7 indique ces variations par rapport aux réactions à la souche SF, avirulente de P. parasitica.

III - Modulation de la réaction de défense

Les traitements par un fongicide (TEPA) et des analogues d'éliciteurs (galactosamine et complexe de cyclodextrine avec un dérivé monohydroxylé de l'acide arachidonique) modifient après 1 mois d'incubation les réactions de l'hôte contre la souche SF de P. parasitica avirulente et la souche BB₁₃ de P. citrophthora qui est pathogène.

Le tableau 8 indique les stimulations de synthèses phénoliques consécutives aux traitements dans le cas d'inoculations des 2 souches de parasites à l'exception d'une discordance (modulation de la souche BB et traitement par le complexe arachidonique). Cependant, les principaux aspects de la modulation sont plus accessibles grâce à l'analyse en C.L.H.P. des extraits de tissus.

Tableau 6 - Tableau synoptique des concentrations de substances de défense accumulées chez des plants de Rough Lemon âgés d'1 an, 3 et 8 semaines après l'inoculation par la souche avirulente SF de *Phytophthora parasitica* aux doses de 20 et 60 ml par rapport au témoin non inoculé. Analyse en C.L.H.P. Colonne de silice greffée en C18 - 5 μ , 3/8' x 30 cm - élué par un gradient d'acétonitrile de 10% à 90% dans une solution acétique 5 °/°. Détection U.V. 280 nm.

Intensité de substances décelées : a = x 1 d = x 8 T = traces
 b = x 2 e = x 16
 c = x 4 - = absence

ZONES	A 10% - 20%						B 20% - 40%									C 40% - 70 %									D 70% - 90%				
	Pics						Motif									Motif									Motif				
Motif	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Témoin	b	a	-	-	-	T	-	T	-	a	T	a	T	a	b	b	T	a	a	e	b	c	b	b	d	T	T	T	b
SF [C ₁] 3 sem.	T	T	a	a	b	a	T	T	-	a	T	b	T	a	a	a	T	a	a	e	a	b	b	a	c	T	T	T	T
SF [C ₁] 8 sem.	T	a	b	b	b	a	a	b	-	-	T	T	T	T	-	b	T	a	-	a	T	T	-	-	-	-	-	-	-
SF [C ₂] 3 sem.	a	T	T	-	-	a	b	-	-	a	a	a	a	a	a	a	c	c	a	e	b	d	a	b	d	T	a	b	c
SF [C ₂] 8 sem.	a	b	c	a	a	T	-	-	-	a	b	a	a	T	c	c	b	b	b	e	b	d	b	c	d	T	T	a	b

[C₁] = 20 ml/plant

[C₂] = 60 ml/plant

Tableau 7 - Tableau synoptique des concentrations de substances de défense accumulées chez des plants de Rough Lemon âgés d'1 an, inoculés par 2 souches virulentes de *Phytophthora citrophthora* après 3 et 8 semaines d'incubation en comparaison avec la souche avirulente SF de *P. parasitica*. Analyse en C.L.H.P. dans les mêmes conditions que pour le tableau 6.

Intensité de substances décelées : a = x 1 d = x 8 T = traces
 b = x 2 e = x 16
 c = x 4 - = absence

ZONES	A 10% - 20%						B 20% - 40%									C 40% - 70 %									D 70% - 90%				
	Pics						Motif									Motif									Motif				
Motif	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
SF [C ₁] 3 sem.	T	T	a	a	b	a	T	T	-	a	T	b	T	a	a	a	T	a	a	e	a	b	b	a	c	T	T	T	T
ED [C ₁] 3 sem.	a	a	T	a	a	a	-	b	-	T	a	a	-	b	a	a	a	a	a	e	a	b	d	b	d	T	T	a	b
[C ₁] 3 sem.	T	T	T	T	T	a	T	T	T	b	a	a	b	a	a	a	b	b	b	e	c	c	c	d	a	a	a	a	b
[C ₁] 8 sem.	-	a	a	T	d	T	T	b	b	b	b	a	a	a	a	c	b	b	b	e	d	d	c	-	e	T	a	a	b
BB ₁₃ 3 sem.	d	d	b	T	T	T	T	T	T	T	T	a	a	a	a	a	-	-	-	e	b	c	b	d	b	b	b	b	b
[C ₂] 8 sem.	-	-	a	a	c	T	T	c	-	b	b	b	b	b	b	c	b	b	b	e	c	d	c	-	e	T	a	a	b

C₁ = 15 ml de broyat par plant, souches ED et BB de *Phytophthora citrophthora*
 C₁ = 15 ml de broyat par plant, souche SF *Phytophthora parasitica*
 C₂ = 30 ml de broyat par plant, souche BB de *Phytophthora citrophthora*

Tableau 8 - Evolution des teneurs en phénols totaux par rapport au témoin, exprimés en équivalent de μg d'acide chlorogénique par g de tissus frais dans les racines de plants inoculés puis traités par le fongicide ou les éliciteurs 1 mois après l'inoculation.

SF = inoculé par P. parasitica

BB = inoculé par P. citrophthora

Traitements :

TEPA I : 250 mg/plant au niveau des racines lors de l'inoculation

TEPA II : 100 mg/plant au niveau des racines lors de l'inoculation

galactosamine : 10 mg/plant en solution ; apport hebdomadaire aux racines.

Complexe β cyclodextrine/acide arachidonique monohydroxylé 10 mg dans le cortex lors de l'inoculation.

Motifs	Inoculés	TEPA I	TEPA II	galactosamine	complexe
SF	10 638	11 565	10 744	12 472	12 613
Modulation par rapport au témoin	58.8 %	72.7 %	60.4 %	82.2 %	88.3 %
BB	11 381	12 299	10 747	12 271	10 222
Modulation par rapport au témoin	69.9 %	83.6 %	60.5 %	83.2 %	52.6 %

Teneur phénols totaux témoin non inoculé = 6 697 $\mu\text{g/g.F.}$

1) Action du TEPA

Le fongicide un mois après le traitement s'avère efficace à la dose de 250 mg/plant qui provoque des réactions marquantes dans les tissus des tiges et des racines. L'analyse en C.L.H.P. des extraits de racines met en évidence que les augmentations de synthèses et/ou d'accumulation concernent essentiellement les substances éluées entre 30% et 80% d'acétonitrile dans le gradient. Il est remarquable que la réaction provoquée par le TEPA est aussi intense dans la confrontation Rough Lemon - P. citrophthora que dans celle avec le P. parasitica comme l'indiquent les Figures 10 et 11.

Non seulement les accumulations sont importantes par rapport au témoin non inoculé (Fig. 4) mais aussi par rapport à celles observées dans les tissus des plantes sensibles à la souche BB₁₃ de P. citrophthora (Tableau 9).

2) Action de la galactosamine en applications hebdomadaires

Nous notons une stimulation de même amplitude que le TEPA. Cependant les pics élués entre 20% et 30% d'acétonitrile sont plus importants que dans le cas du traitement par le TEPA. Il en est de même pour les intensités des pics dans la zone éluée entre 40% et 80% d'acétonitrile (Fig. 12 et Tableau 9). Cependant nous observons que les extraits des tissus de plants inoculés par la souche BB₁₃ contiennent moins de produits que ceux inoculés par la souche SF, dans le segment de gradient compris entre 50 et 70% d'acétonitrile. Même dans ce cas, les teneurs sont plus importantes qu'après traitement par le TEPA.

Tableau 9 - Tableau synoptique des concentrations de substances de défense accumulées chez des plants de Rough Lemon, inoculés par les souches de Phytophthora parasitica avirulente et BB de P. citrophthora virulente, traités avec les éliciteurs et fongicide TEPA.

Colonne de silice greffée en C18 - 5 μ , 3/8' x 30 cm -
Mêmes conditions techniques que pour les Tableaux 6 et 7.

ZONES	A 10% - 20%						B 20% - 40%									C 40% - 70 %									D 70% - 90%				
Motif \ Pics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Témoïn	a	b	b	-	-	T	-	T	-	a	T	a	T	a	b	b	T	a	a	e	b	c	b	b	d	T	T	T	a
I	-	-	-	-	-	-	-	-	b	d	-	c	a	a	b	c	c	c	c	e	-	d	c	c	b	a	a	a	a
TEPA ^I	a	b	c	T	-	-	-	-	T	T	a	a	b	b	a	a	c	c	a	e	a	b	c	b	d	T	T	T	b
SF TEPA ^{II}	a	a	a	-	-	a	-	-	-	-	T	a	a	c	c	a	b	b	a	e	c	c	c	a	d	T	a	a	b
G a	-	-	-	-	-	-	-	-	b	d	a	a	a	c	c	b	c	d	c	e	e	d	b	c	e	a	a	a	b
C p	-	-	-	-	-	-	-	-	a	b	-	d	a	a	b	c	d	d	c	e	e	e	d	d	e	b	a	a	b
I	a	a	a	T	a	a	-	T	T	a	a	c	a	a	a	a	b	b	b	e	c	c	-	b	d	T	T	a	a
TEPA ^I	a	a	a	T	T	a	-	-	-	-	a	a	b	b	T	a	c	c	b	e	b	d	b	c	e	T	T	a	b
TEPA ^{II}	a	a	b	b	-	a	-	-	-	-	a	a	b	a	a	b	a	b	a	e	c	c	c	b	d	T	T	a	a
G a	a	a	a	c	-	a	-	-	-	-	a	c	c	a	a	a	c	c	b	e	b	d	b	b	d	T	a	T	a
C p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	c	b	b	a	b	c	c	d	c	e	d	d	d	-	d	a	a	T	a

I = inoculés avec la souche correspondante
 TEPA I = dose de 250 mg/plant/mensuel
 TEPA II = dose de 100 mg/plant/mensuel
 G a = galactosamine, 10 mg/plant/hebdomadaire
 C p = complexe dans cyclodextrine de dérivé monohydroxylé d'acide arachidonique. 10 mg/plant/initial.

3) Action du complexe (β cyclodextrine - dérivé monohydroxylé

d'acide arachidonique)

Le produit incorporé dans les tissus au début de l'expérience peut être comparé pour son action avec le TEPA appliqué une seule fois. Nous notons une divergence de résultats de dosages de phénols pour les plantes traitées et inoculées par les souches SF et BB₁₃. Seules les analyses ultérieures des récoltes effectuées à 2 mois et à 3 mois permettront d'établir s'il s'agit d'un artefact. Par contre, les analyses en C.L.H.P. fournissent des indications cohérentes sur les réactions similaires des plants traités aux inoculations par les 2 souches, l'une virulente, l'autre avirulente. La figure 13 présente les résultats de l'analyse en C.L.H.P. des extraits de tissus de plants inoculés avec la souche pathogène BB₁₃.

Nous observons que le complexe provoque une importante stimulation de synthèse de substances élucées entre 10% et 70% d'acétonitrile. D'après les analyses répétées, la réaction provoquée par le complexe concerne davantage de produits et des accumulations plus grandes qu'avec le TEPA (Tableau 9).

IV - Essai de repérage des facteurs de résistance

1) à partir de chromatographie sur colonne atmosphérique

Un extrait de racines inoculées par la souche SF (inoculum 20 ml/plant) correspondant à 306 mg de tissus frais fut fractionné sur une colonne de silice (cf Matériel et Techniques).

Tableau 10 - Test de toxicité pour le *Cladosporium cladosporioides* en C.C.M., après élution par le système Hx - Ae (2 : 1) réalisé avec les fractions d'extraits brut de racines obtenues sur colonne atmosphérique de silice.

RF Frac.	Résiduel	0.14-0.18	0.28-0.34	0.44-0.52	0.54-0.66	0.66-0.72	0.88-0.95
F ₁	—	—	P	—	P	—	P
F ₂	—	—	T	P	T	P	—
F ₃	—	P	T	T	T	P	—
F ₄	P	P	P	T	T	—	—

— = Non toxicité P = Toxicité partielle T = Toxicité totale

Extrait de tissus de racines : plants inoculés par SF (*P. parasitica*) inoculum doublé après 3 semaines d'inoculation en serre.

Fractions : F₁ élucée par l'Hexane ; F₂ et F₃ élucées par le mélange Hexane - Acétate d'éthyle (50 : 50) ; F₄ élucée par l'acétate d'éthyle.

Après regroupement des fractions, 4 groupes sont retenus : n° 1 élucé par l'hexane, n° 2 et 3 élucés par le mélange Hexane - acétate d'éthyle (50 : 50), n° 4 élucé par l'acétate d'éthyle. Ils sont chromatographiés en C.C.M. dans plusieurs systèmes dont le mélange Hx - Ae (2 : 1). Ces fractions contiennent plusieurs substances toxiques inhibant le *C. cladosporioides* sur plaques (Tableau 10).

2) à partir de chromatographies en C.L.H.P.

Utilisant la colonne de silice greffée en C18, le gradient d'acétonitrile a été collecté en 8 fractions (Tableau 11) correspondant aux pics 1 à 29. Ces fractions sont ensuite étudiées en C.C.M. puis font l'objet d'un test de toxicité pour le C. cladosporioides (Tableau 11).

Tableau 11 - Test de toxicité à Cladosporium cladosporioides en C.C.M. avec pour éluants A : Clf - Ae - Me (50 : 40 : 5) ; B : Hx - Ae (2 : 1) sur les fractions obtenues par C.L.H.P. sur colonne de silice greffée en C18 (5 μ , 3/8' x 30 cm).

n ^{os} des Fract.	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈
n ^{os} des Pics	1-4	5-6	7-10	11-14	15-18	19-22	23-28	29
A	résiduel	résiduel	0	0.4-0.13				
				0.80-0.90	0.80-0.90	0.86-0.96	0.86-0.96	0.88-0.91
B		NON	TESTES			0.60-0.66		
						0.70-0.80	0.73-0.80	0.74-0.76

Elution de la colonne : gradient d'acétonitrile de 10% à 90% dans une solution d'acide acétique à 5 °/°° ; débit 1.5 ml/min, détection U.V. à 280 nm.

Les fractions correspondent aux séquences de gradient d'acétonitrile F₁ = 10%, F₂ = 10% - 25%, F₃ = 25% - 40%, F₄ = 40% - 55%, F₅ = 55% - 65%, F₆ = 65% - 80%, F₇ = 80% - 95%, F₈ = fin d'élution.

Plages de toxicité : les RF indiqués correspondent aux limites des zones de fortes toxicité.

Les tableaux 10 et 11 permettent d'établir la correspondance entre les substances toxiques éluées par les 2 méthodes.

En C.L.H.P., les produits élués entre 30% et 80% d'acétonitrile sont de nature phénolique et réagissent positivement au test à la paranitraniline. Certains d'entre eux sont identifiés sur le gradient (Tableau 12).

Tableau 12 - Caractéristiques d'élution de composés phénoliques de référence (produits naturels ou de synthèse) en C.L.H.P. sur colonne de silice greffée en C18 - 5 μ , 3/8' x 30 cm - éluee par un gradient d'acétonitrile de 10% à 90% dans une solution acétique à 5 °/°°. Injections de 200 μ l d'éluant. Détection U.V. à 280 nm.

Substances	élution en % d'acétonitrile	Substances	élution en % d'acétonitrile
Acide cafeique	22 %	Acide diméthoxy-	
Acide benzoique	23 %	benzoique	42 %
Acide férulique	26 %	Précurseur de :	
7 hydroxy coumarine	32 %	Xanthylétine	57 %
diméthoxy-		Xanthylétine	75 %
benzaldéhyde	35 %	Isomère de Xanthylétine	78 %

V - Etude in vitro de la toxicité des extraits de tissus selon les souches et les traitements

A l'aide des microcultures en lames à concavité, nous avons vérifié la toxicité à des concentrations comprises entre 400 mg et 150 mg de tissus frais par ml de solution nutritive pour les souches SF de P. parasitica et ED de P. citrophthora. 3 semaines après l'inoculation, les extraits de tissus contiennent chez les plants inoculés davantage de substances toxiques que chez le témoin. Cette réaction persiste jusqu'à la 8ème semaine même chez les plants sensibles aux souches BB₁₃ et ED de P. citrophthora qui détruisent une partie des racines.

L'augmentation de la pression de l'inoculum de la souche avirulente SF, tend à provoquer une augmentation de toxicité dans les extraits de tissus. La Figure 14 schématise les résultats obtenus avec des extraits de plants récoltés 5 semaines après l'inoculation.

L'application du fongicide ou celle des analogues des éliciteurs fongiques provoque un accroissement de toxicité des extraits des plants traités (Figure 15). Deux observations s'imposent : le TEPA et les éliciteurs confèrent une augmentation semblable de toxicité des extraits. L'effet des 3 substances semble quasi identique dans les tissus de racines de l'hôte quelle que soit la souche inoculée - SF de P. parasitica avirulente, BB₁₃ de P. citrophthora virulente. Les essais n'ont pas concerné les extraits de plants récoltés 2 et 3 mois après l'inoculation.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans nos essais les réactions de défense du Rough Lemon aboutissent à la résistance aux infections effectuées avec la souche de P. parasitica à une réaction de sensibilité augmentant avec le temps aux 2 souches de P. citrophthora.

Les barrières opposées aux deux espèces de Phytophthora semblent identiques. Elles correspondent à plusieurs types de défense : émission rapide de nouvelles radicelles et aussi de racines secondaires, cicatrisation rapide des tissus nécrosés dans le cas de P. parasitica, augmentation des teneurs en composés phénoliques dans les tissus.

La réaction de défense contre la souche SF de P. parasitica persiste quand la quantité d'inoculum est accrue, voire triplée. Dans une première phase, l'augmentation de l'inoculum provoque des réactions de défense plus importantes à 3 et 5 semaines. Nous ne pouvons pas établir si ces observations correspondent à une élicitation accrue par le parasite. Puis, les symptômes de nécroses augmentent et tendent à ressembler à ceux observés dans le cas de la souche la moins agressive, ED, de P. citrophthora à la plus faible concentration d'inoculum.

Dans le cas de sensibilité, une importante émission de racines secondaires est observée jusqu'à 5 semaines après l'inoculation, puis celle-ci décroît d'autant plus vite que la souche de P. citrophthora est agressive. Au lieu de se cicatriser, les nécroses de radicelles progressent et atteignent les racines principales. En 2 mois, peu de nécroses se développent sur le collet ou la base des tiges. Les teneurs en composés phénoliques régressent à partir de la 5ème semaine, d'autant plus vite que la souche est agressive et l'inoculum plus important. Cette régression des synthèses ou de l'accumulation des facteurs de résistance n'est pas homogène : d'après les analyses en C.L.H.P. plusieurs substances toxiques disparaissent dans les tissus, d'autres comme les coumarines ont seulement des teneurs réduites en comparaison avec les tissus inoculés par le P. parasitica.

L'application du fongicide systémique, le TEPA, provoque une augmentation des synthèses de plusieurs composés phénoliques, dont la Xanthylétine (KHAN et al., 1985). Nous constatons que la stimulation de ces synthèses est quasi semblable face aux 2 souches inoculées de P. parasitica avirulente et P. citrophthora pathogène.

Cependant, en augmentant la pression d'inoculum, il se pourrait que le traitement avec le TEPA soit impuissant à provoquer la réaction de défense aux concentrations utilisées plus faibles que celles employées dans les vergers (LAVILLE et CHALANDON, 1982). Les expériences réalisées avec des analogues structuraux d'éliciteurs fongiques, l'un du groupe des Fusarium sp., l'autre de Phytophthora infestans, confirment des études préliminaires (KHAN et RAVISE, 1985). Ces substances provoquent dans les tissus des racines des plants de Rough Lemon des accroissements de concentrations en phénols totaux et les synthèses des mêmes substances que le TEPA. L'examen des tableaux synoptiques tendent à indiquer que plusieurs voies biosynthétiques - dérivés de l'acide benzoïque et des acides cinnamiques, voie des coumarines entre autres - sont stimulées par l'application des éliciteurs et celle du fongicide.

Des résultats semblables ont été décrits chez la tomate en réaction aux Phytophthora spp. (VERNENCHI, 1985) et chez le palmier à huile contre l'agent de la fusariose vasculaire (TAQUET, 1985). Chez le poivron et le tabac, GUEST (1984) démontre que la résistance aux Phytophthora spp. est accrue par l'application de TEPA. Plus récemment GUEST et BOMPEIX (1984) ont formulé plusieurs hypothèses sur le mode d'action du TEPA. Une action directe du fongicide est démontrée contre des Phytophthora spp. dont le P. parasitica et le P. citrophthora par BOMPEIX et SAINDRENAN (1984). Dans d'autres couples hôte-parasite tels le P. fragariae/fraise et le Bremia lactucae/salade, des doses élevées de TEPA provoquent la guérison et des fortes augmentations de teneurs en composés phénoliques dans les tissus des plants traités (DERCKS et BUCHENAUER, 1986). La toxicité in vitro du fongicide et celle des extraits de tissus ne sont pas indiquées dans ces deux couples hôte-parasite.

Nous présumons qu'outre l'action directe du fongicide sur le parasite, le TEPA provoque chez l'hôte des modifications métaboliques qui présentent des analogies avec celles induites par les 2 analogues d'éliciteurs. Nous envisageons d'étudier la portée pratique de ces traitements.

LISTE DES ABBREVIATIONS

Acétate d'éthyle	=	Ae
Chloroforme	=	Clf
Hexane	=	Hx
Méthanol	=	Me
C.C.M.	=	Chromatographie en Couche Mince
C.L.H.P.	=	Chromatographie Liquide à Haute Performance

BIBLIOGRAPHIE

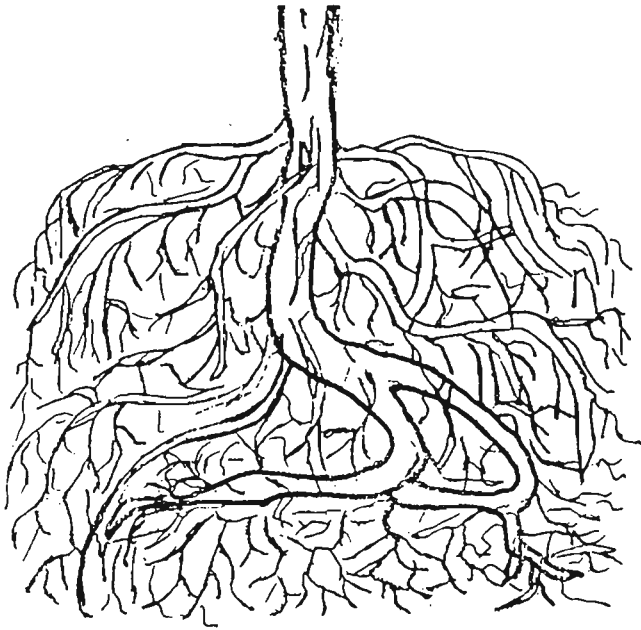
- BOCCAS B. et LAVILLE E., 1978 : Les maladies à Phytophthora des agrumes. Ed. S.E.T.C.O. - IRFA. Paris, 162 p.
- BOMPEIX G. et al., 1980 : Modalités de l'obtention des nécroses bloquantes sur feuilles détachées de tomate par l'action du tris-O-éthylphosphonate d'aluminium, hypothèse sur son mode d'action in vitro. Ann. Phytopathol., 12, 337-351.
- BOMPEIX G., FETTOUCHE F. et SAINDRENAN P., 1981 : Mode d'action du Phosétyl Al. Phytiatr. Phytopharm., 30, 257-272.
- BOMPEIX G. and SAINDRENAN P., 1984 : In vitro anti-fungal activity of Fosetyl Al and phosphorous acid on Phytophthora species. Fruits, 39, 777-786.
- BOMPEIX G., RAVISE A. et SAINDRENAN P., 1985 : Comportement des fongicides au niveau des relations hôte-parasite. Conf. au Coll. Franco-Brit., Fongicides et protection des plantes, 100 ans de progrès ; BCPC monograph, n° 31, 107-118.
- CLERJEAU M. et al., 1981 : Etudes sur les propriétés et le mode d'action des nouveaux fongicides antimildiou chez la vigne. Phytiatr. Phytopharm., 30, 215-234.
- FARIH A., TSAO P.H. and MENGE J.A., 1981 : Fongitoxic activity of fosetyl aluminium on growth, sporulation and germination of Phytophthora parasitica et P. citrophthora. Phytopathology, 71, 934-936.
- FRERE J.M. et GERDAY C., 1981 : Les méthodes de purification et d'analyse des protéines Masson. Paris, p. 124.
- GUEST D.I., 1984 : Modification of defence responses in Tobacco and capsicum following treatment with Fosetyl Al. Physiolol. Plant Pathol., 25, 125-134.
- GUEST D.I. and BOMPEIX G., 1984 : Fosetyl Al. as tool in understanding the resistant response in plants. Phytophthora News-letter, 12, 62-69.
- LAVILLE F. et CHALANDON A., 1982 : Synthèse des résultats obtenus avec le Phosétyl Al. dans la lutte contre les maladies à Phytophthora des agrumes. Fruits, 40, 807-811.
- KHAN A.J. et al., 1985 : Structure and biological activity of Xanthyletin a new phytoalexin of citrus. Fruits, 40, 807-811.
- MISAGHI I.J., 1982 : Physiology and Biochemistry of plant - pathogen interactions. Plenum Press. N.Y., 287 p.
- MANSFIELD W.J., 1982 : Phytoalexins. Ed. Blackie & son Ltd. London. 334 p.
- TAQUET B. et al., 1985 : Modulation des réactions de défense du palmier à huile contre le Fusarium oxysporum f. sp. Elaeidis Toovery. Applications : prémunition et stimulation chimique. Phytopath. Z., 112, 298-314.
- DE VALLAVIEILLE C., 1983 : Structure d'une population phytopathogène sélectionnée sous la pression d'une population hôte pérenne : le cas de phytophthora spp. inféodés aux agrumes de la plaine orientale de Corse. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Paris-Sud. Centre d'Orsay.

- DE-VAL LAVIELLE C. et PERRIER X., 1981 : Etude sur la pathogénie de Phytophthora citrophthora (S.M. et S.M.) Léonian sur la gamme de porte-greffe d'agrumes par deux méthodes. Agronomie, 1, 527-534.
- VERNENGI A., 1985 : Réactions de défense du Lycopersicum esculentum Mill. à des infections cryptogamiques : mise en évidence de phytoalexines et de leurs propriétés inhibitrices. Thèse de spécialités, Université de Paris VI.
- VERNENGI A. et RAVISE A., 1985 : Stimulation de la réaction de défense de la tomate contre le Phytophthora parasitica par le Phosétyl Al. et par des éliciteurs fongiques. Fruits, 40, n° 7-8, 495-502.
- VO-THI-HAI, BOMPEIX G. et RAVISE A., 1979 : Rôle du Tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium dans la stimulation des réactions de défense des tissus de tomate contre le Phytophthora capsici. C.R. Acad. Sci., Sér. D., 288, 1171-1174.

A N N E X E

Figures n° 1 à n° 15

Figure 1 - Réactions différentielles au parasitisme : Comparaison de l'état racinaire de plants de Rough Lemon âgés d'1 an inoculés par la souche avirulente SF de *Phytophthora parasitica* à concentration de 20 ml de broyat par plant à 3 et 8 semaines d'incubation par rapport au témoin non inoculé.

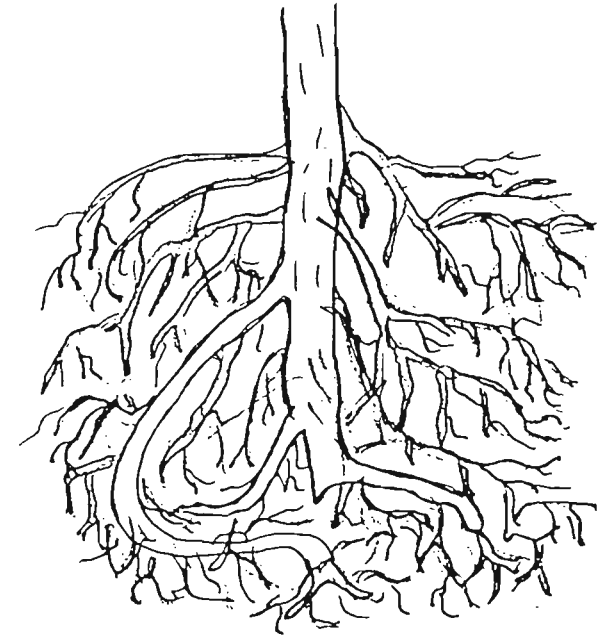


TEMOIN



SF (20ML/PLANT)

3 SEMAINES



SF (20ML/PLANT)

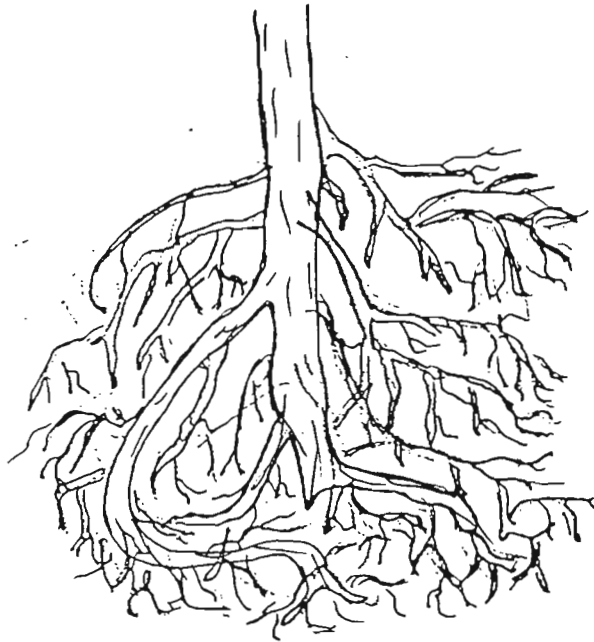
8 SEMAINES

Figure 2 - Réactions différentielles au parasitisme : Comparaison de l'état racinaire de plants de Rough Lemon âgés d'1 an inoculés par les souches virulentes ED et BB₁₃ de *P. citrophthora*.

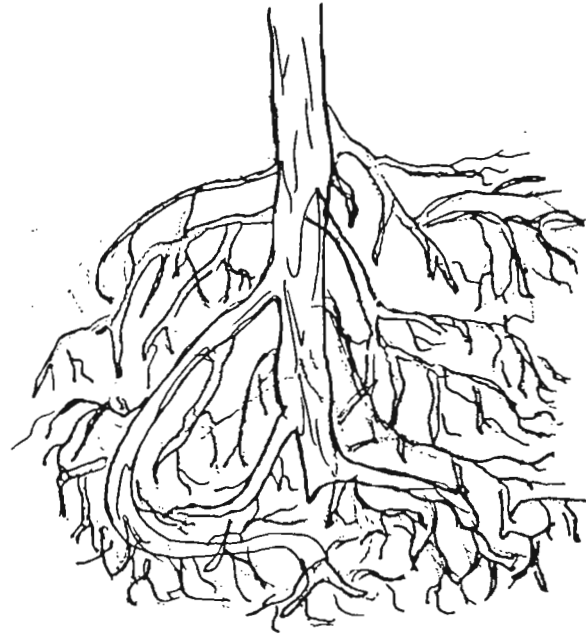
ED à concentration de 15 ml de broyat par plant à 3 semaines d'incubation.

ED à concentration de 15 ml de broyat par plant à 8 semaines d'incubation.

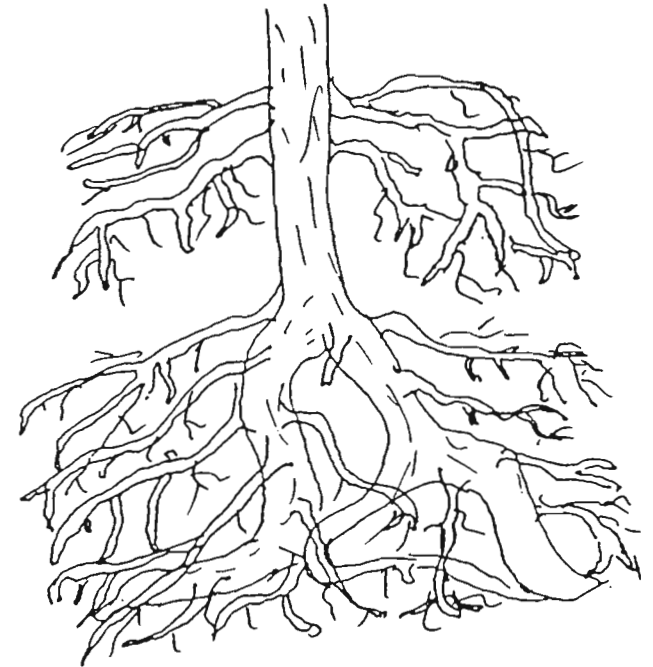
BB₁₃ à concentration 15 ml de broyat par plant à 3 semaines d'incubation.



BB₁₃
3 SEMAINES



ED
3 SEMAINES



ED
8 SEMAINES

Figure 3 - Réactions différentielles au parasitisme : Evolution de l'émission de nouvelles racines en fonction du temps selon la souche inoculée sur plants de Rough Lemon âgés d'1 an.

Souche SF de *Phytophthora parasitica* non virulente à concentration de 20 ml de broyat par plant. Souches BB₁₃ et ED de *P. citrophthora* virulentes à concentration de 15 ml de broyat par plant.

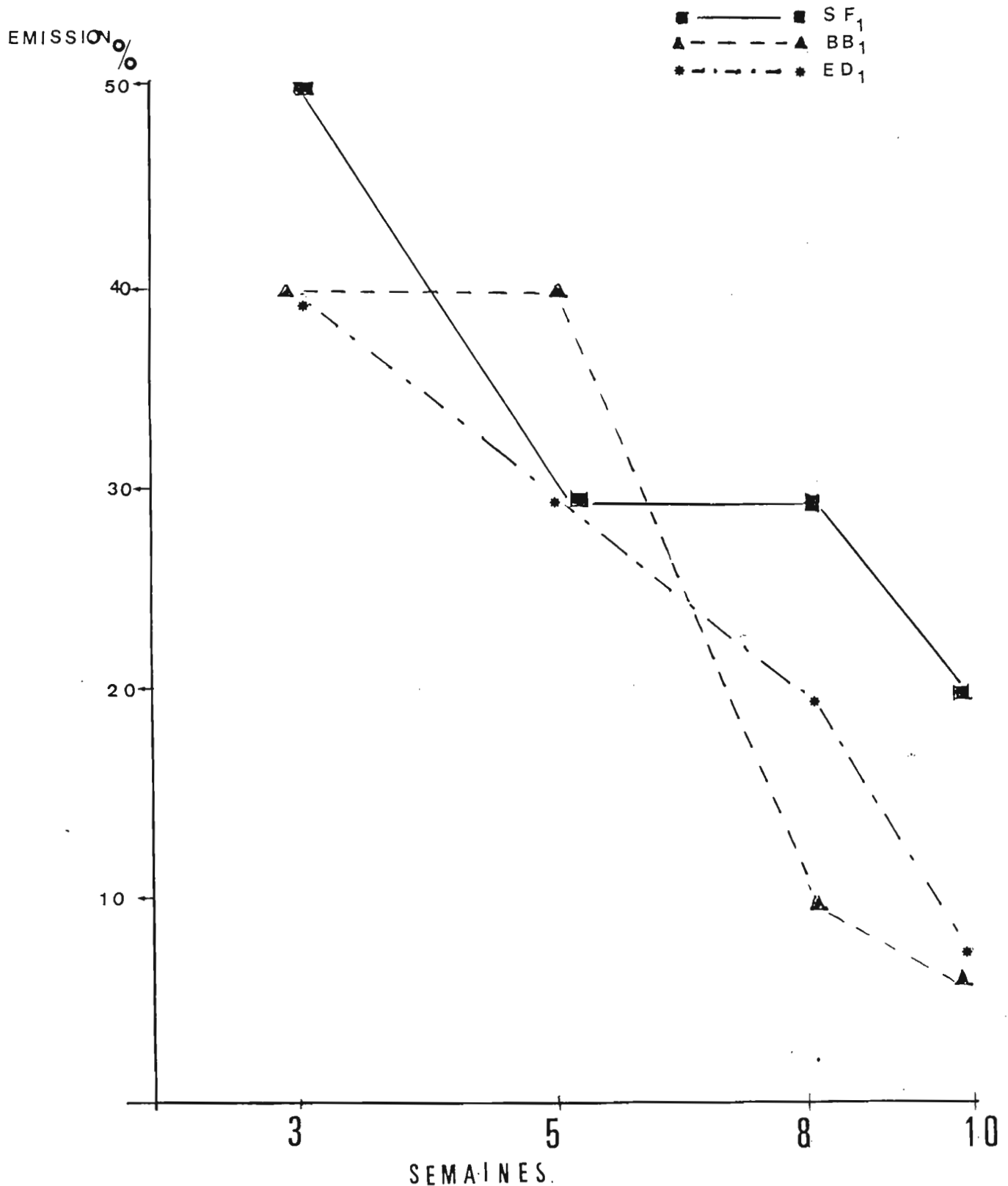
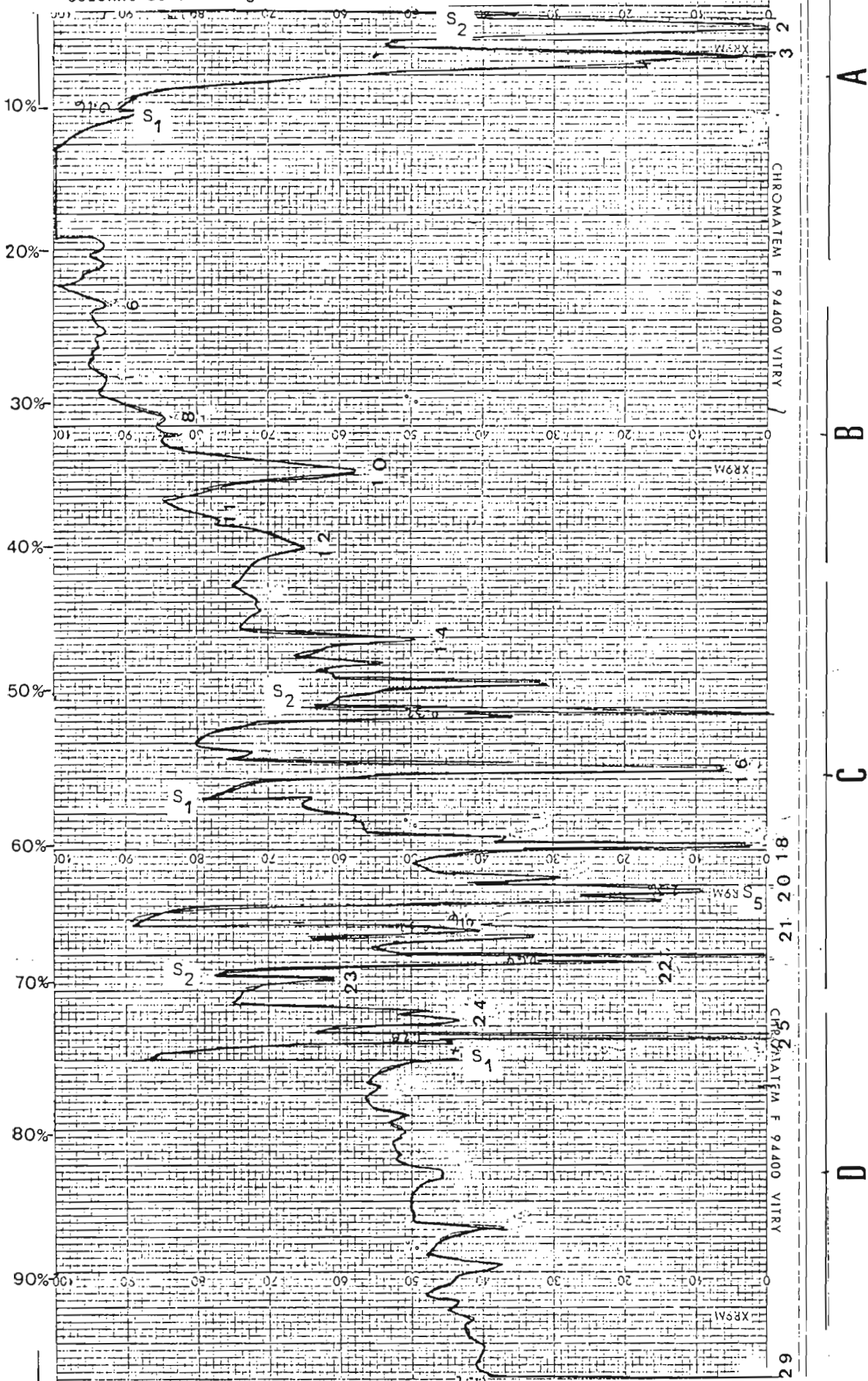
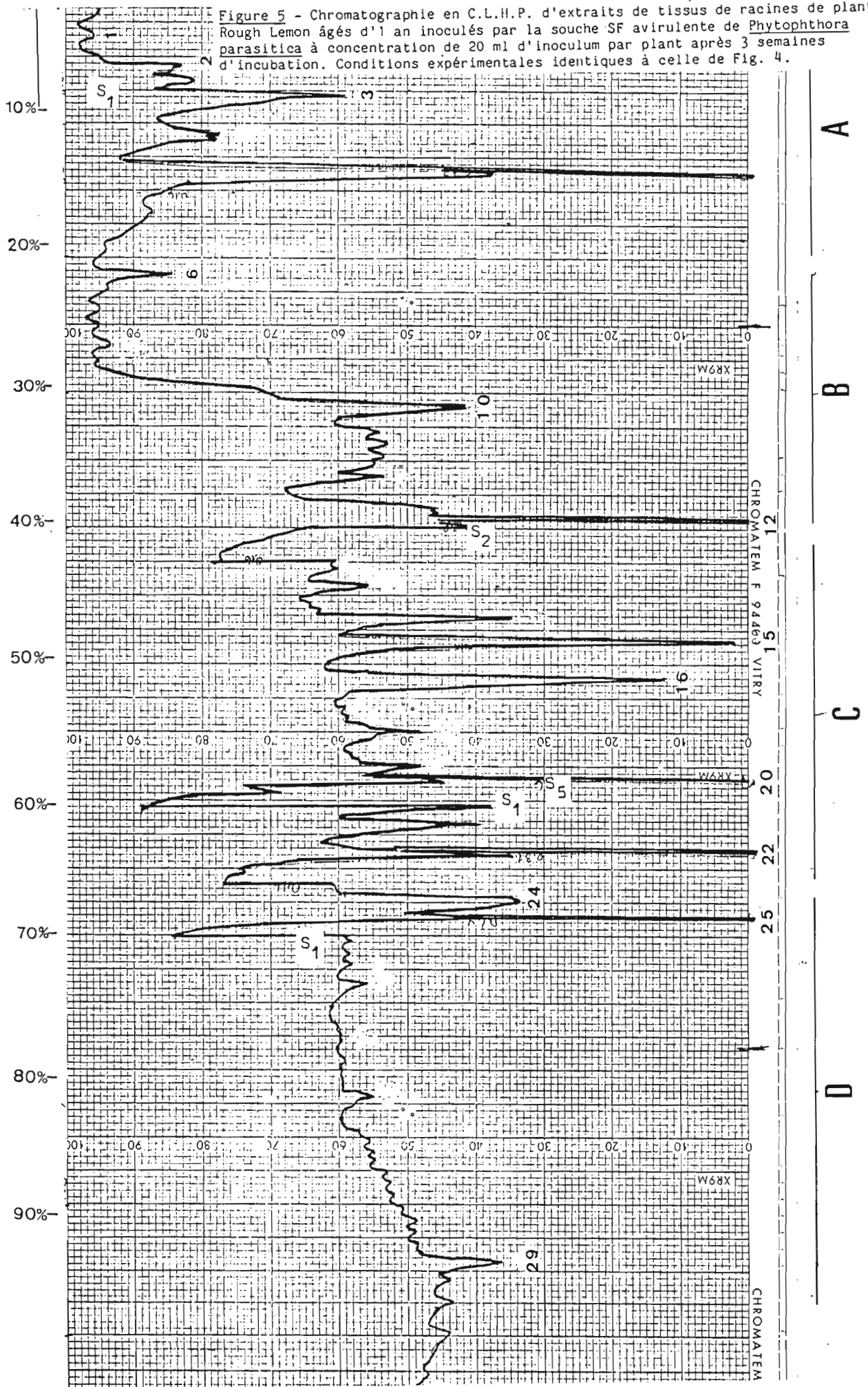


Figure 4 - Chromatographie en C.L.H.P. d'extraits de tissus de racines de plants de Rough Lemon âgés d'1 an non inoculés. Elution divisée en 4 zones de gradient d'acétonitrile 5 %/°. Colonne de silice greffée en C18 - 5µ, 3/8' x 30 cm - détection U.V. 280 nm.



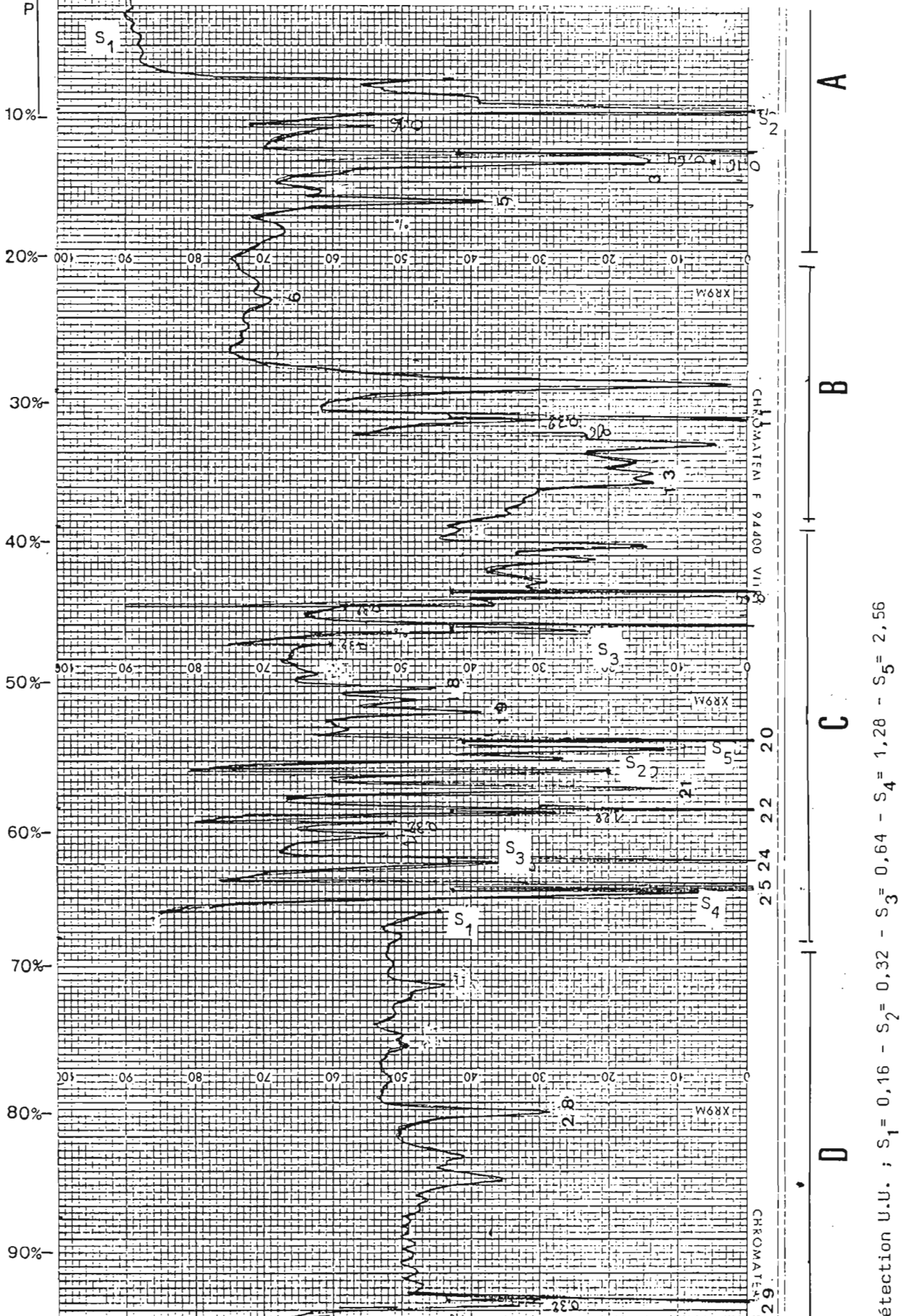
détection U.V. : $S_1 = 0,16$ - $S_2 = 0,32$ - $S_3 = 0,64$ - $S_4 = 1,28$ - $S_5 = 2,56$

Figure 5 - Chromatographie en C.L.H.P. d'extraits de tissus de racines de plants d Rough Lemon âgés d'1 an inoculés par la souche SF avirulente de *Phytophthora parasitica* à concentration de 20 ml d'inoculum par plant après 3 semaines d'incubation. Conditions expérimentales identiques à celle de Fig. 4.

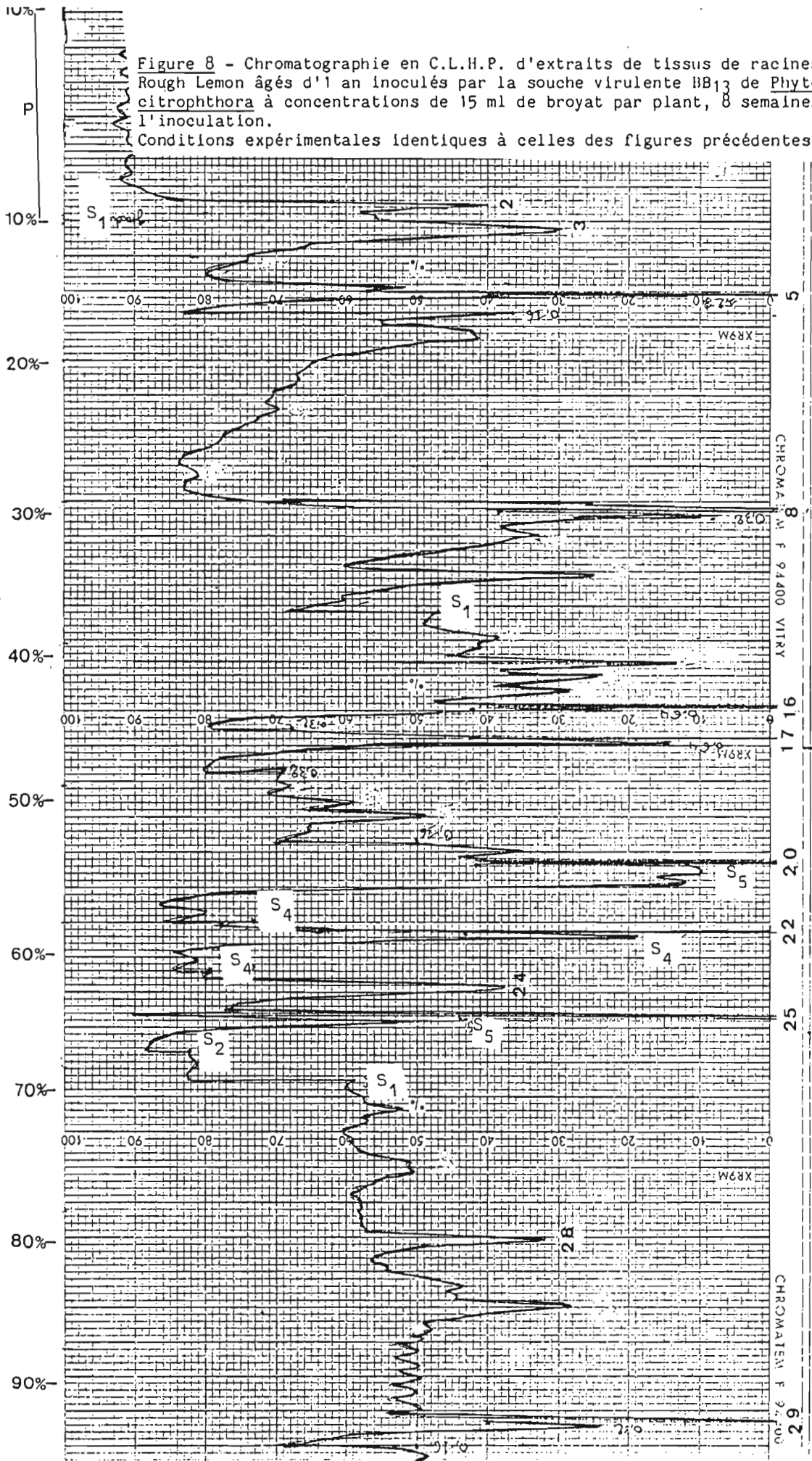


étection U.U. ; $S_1 = 0,16$ - $S_2 = 0,32$ - $S_3 = 0,64$ - $S_4 = 1,28$ - $S_5 = 2,56$

Figure 6 - Chromatographie en C.L.H.P. d'extraits de tissus de racines de plants Rough Lemon âgés d'1 an inoculés par la souche avirulente SF de *Phytophthora parasitica* à concentration de 60 ml de broyat par plant après 8 semaines d'incubation.
Conditions expérimentales identiques à celles des figures précédentes.

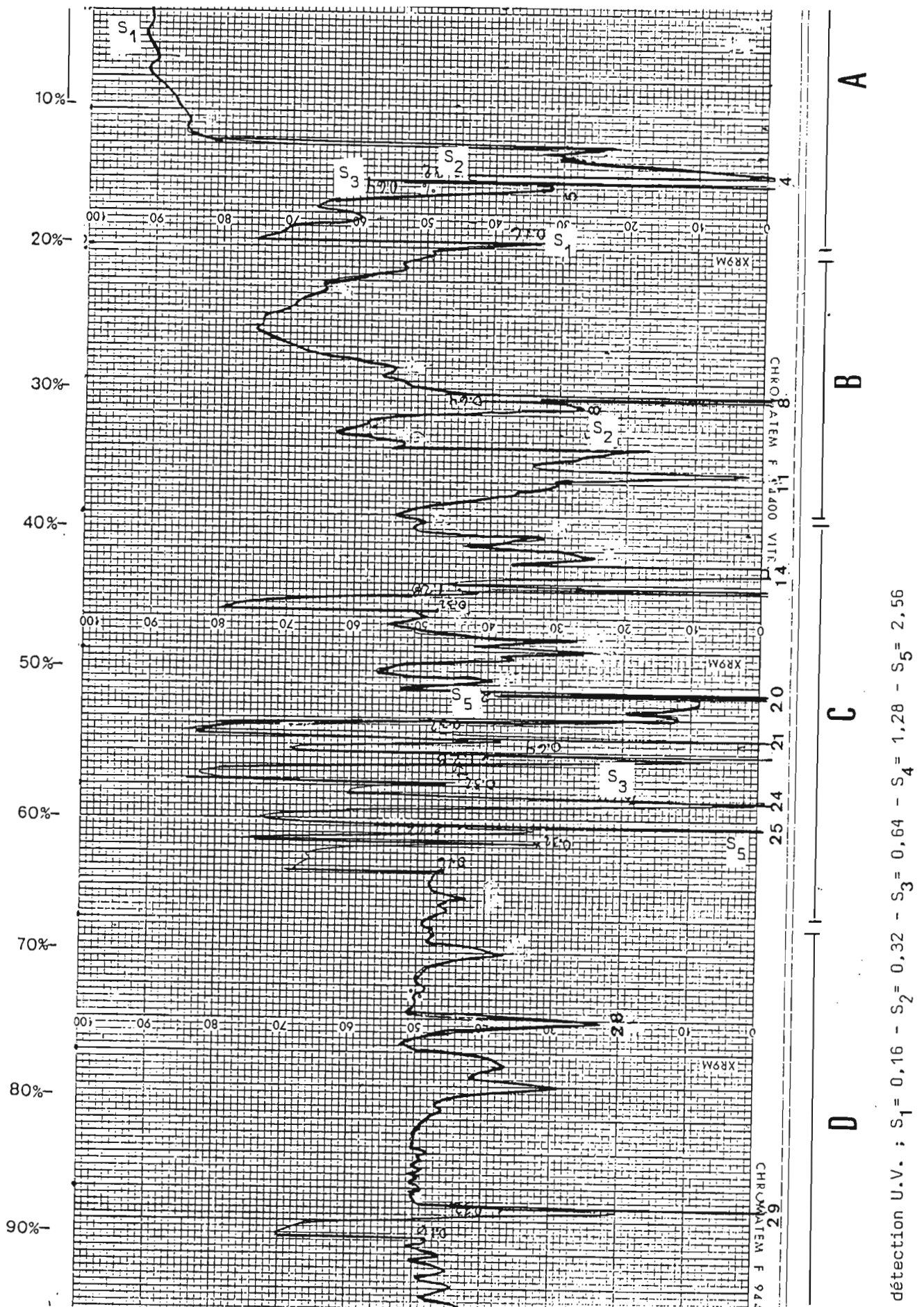


étection U.U. ; S₁ = 0,16 - S₂ = 0,32 - S₃ = 0,64 - S₄ = 1,28 - S₅ = 2,56



détection U.V. : $S_1 = 0,16$ - $S_2 = 0,32$ - $S_3 = 0,64$ - $S_4 = 1,28$ - $S_5 = 2,56$

Figure 9 - Chromatographie en C.L.H.P. d'extraits de tissus de racines de plants de Rough Lemon âgés d'1 an inoculés par la souche BB13 virulente de *Phytophthora citrophthora* à concentration de 30 ml de broyat par plant. Conditions expérimentales identiques à celles des figures précédentes.



S = 0,16

SF-INOCULÉS

10%

9

10

S₄

12

11

S₁

13

16

17

S₃

19

20

S₅

50%

24

S₂

25

S₂

S₁

90%

29

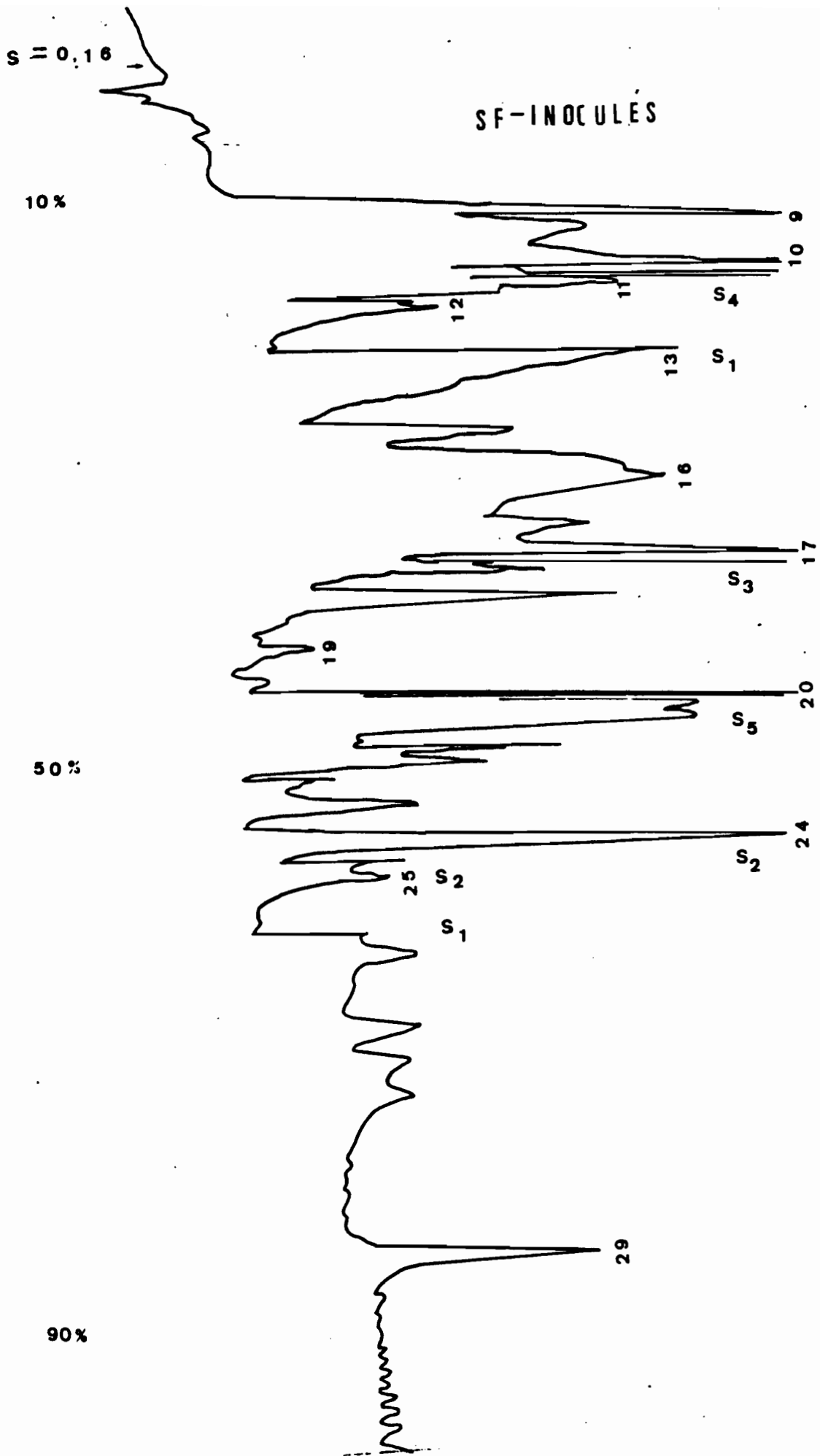
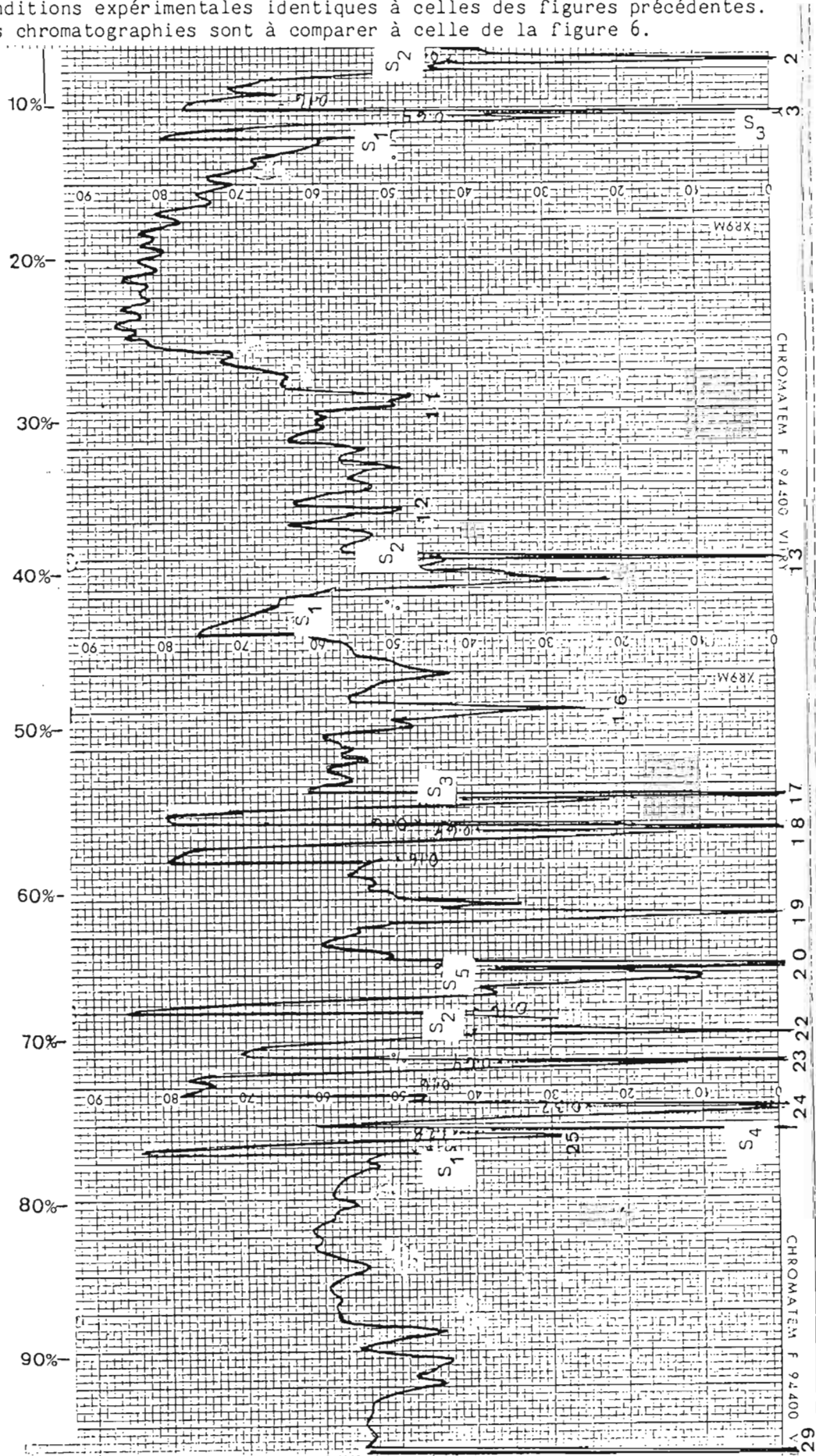


Figure 10 - Comparaison des chromatographies en C.L.H.P. de l'accumulation de substances de défense chez des plants de Rough Lemon âgés d'1 an inoculés par la souche SF de *Phytophthora parasitica* traités et non traités par le fongicide TEPA à la dose de 250 mg par plant après 1 mois d'incubation. Conditions expérimentales identiques à celles des figures précédentes. Ces chromatographies sont à comparer à celle de la figure 6.



A
B
C
D

détection U.V. ; $S_1 = 0,16$ - $S_2 = 0,32$ - $S_3 = 0,64$ - $S_4 = 1,28$ - $S_5 = 2,56$

BB-INOULÉS

S = 0.16

10 X

50 X

90 X

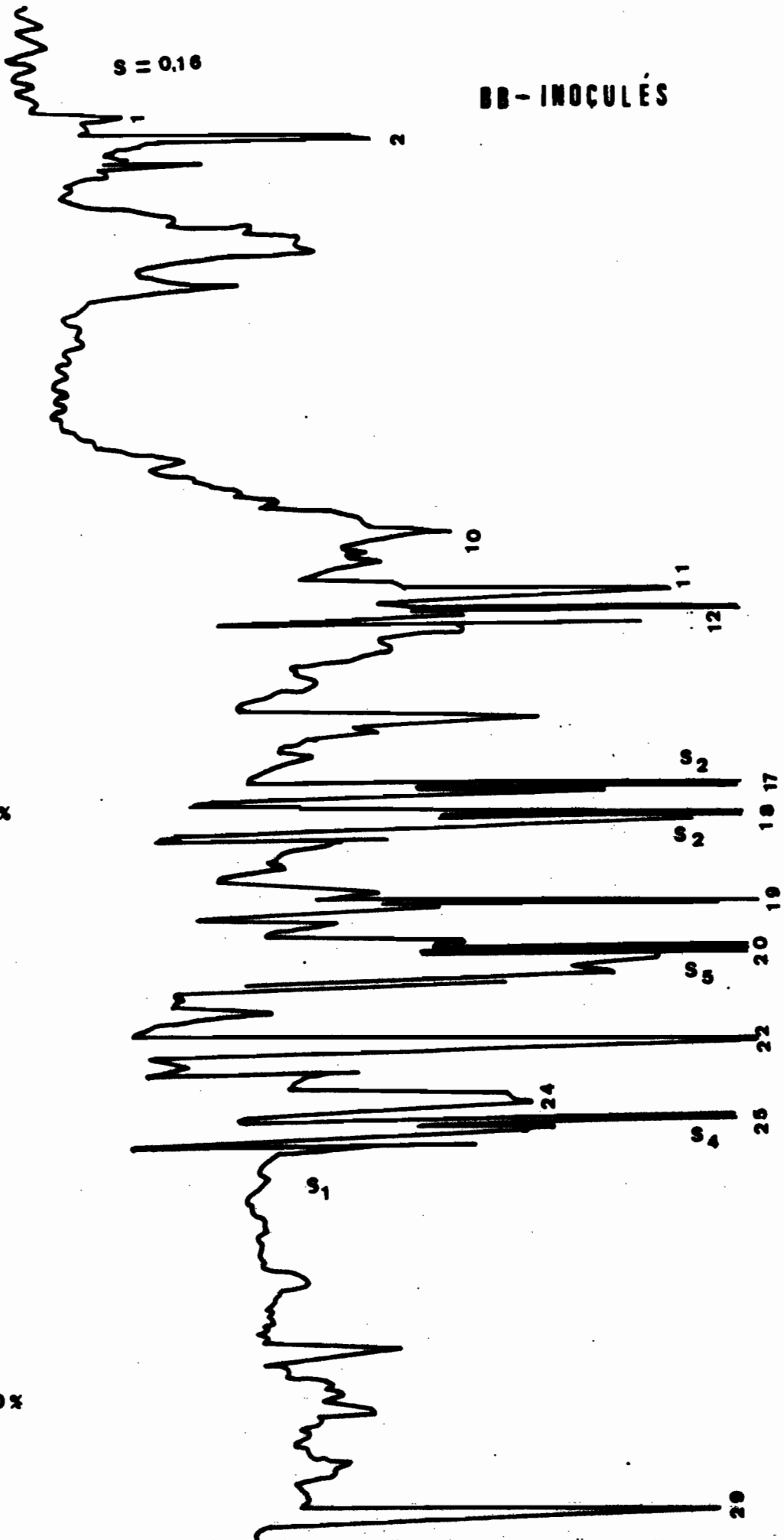
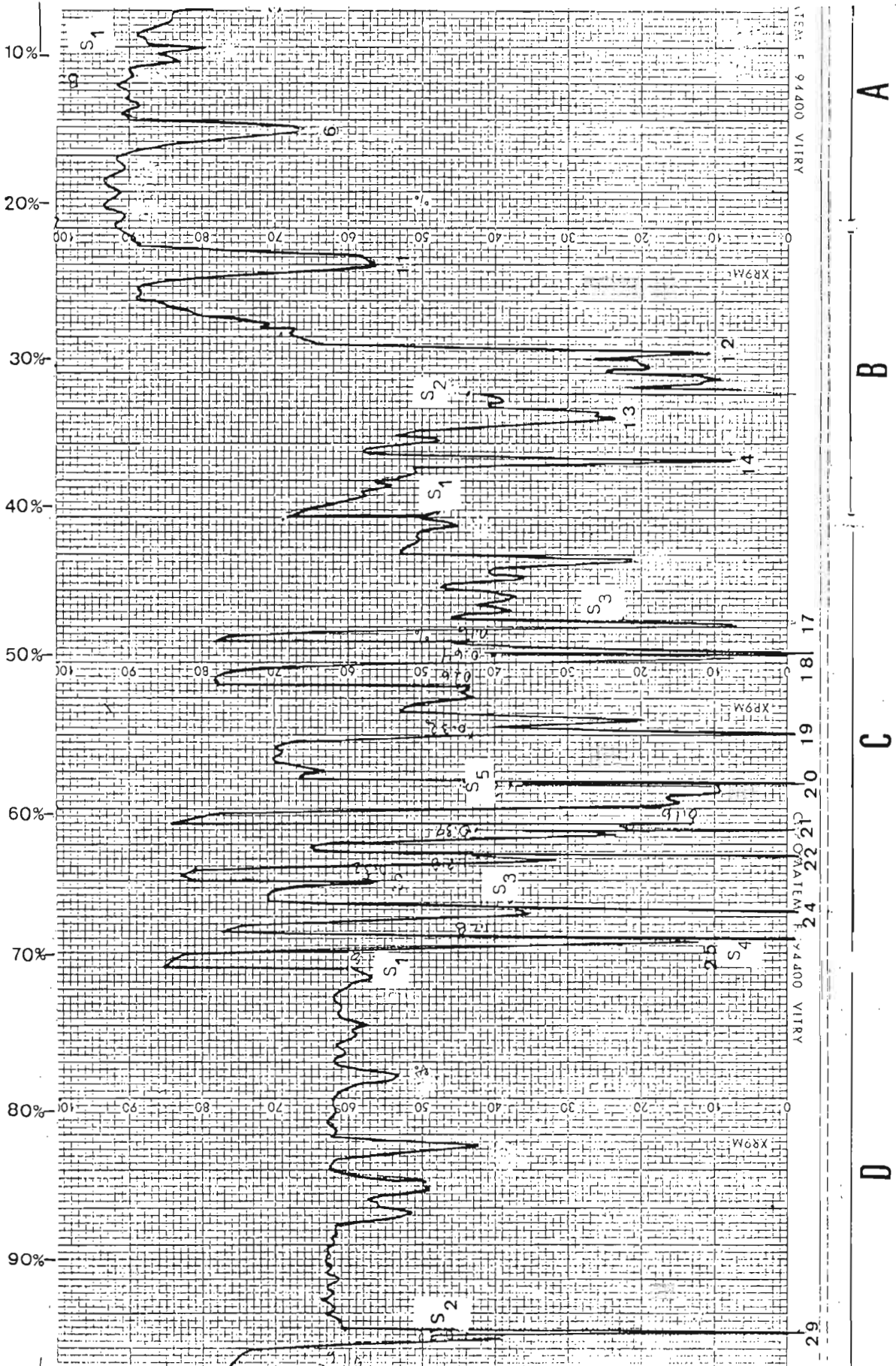


Figure 11 - Comparaison des chromatographies en C.L.H.P. de l'accumulation de substances de défense chez des plants de Rough Lemon âgés d'1 an inoculés par la souche BB13 de *Phytophthora citrophthora* traités et non traités par le fongicide TEPA à la dose de 250 mg par plant après 1 mois d'incubation. Conditions expérimentales identiques à celles des figures précédentes. Ces chromatographies sont à comparer à celles des figures 7 et 8.



détection U.U. : $S_1 = 0.16$ - $S_2 = 0.32$ - $S_3 = 0.64$ - $S_4 = 1.28$ - $S_5 = 2.56$

S = 0.16

SF-INOCULÉS

10%

9

10

S₄

12

11

S₁

13

16

17

S₃

19

20

S₅

50%

24

S₂

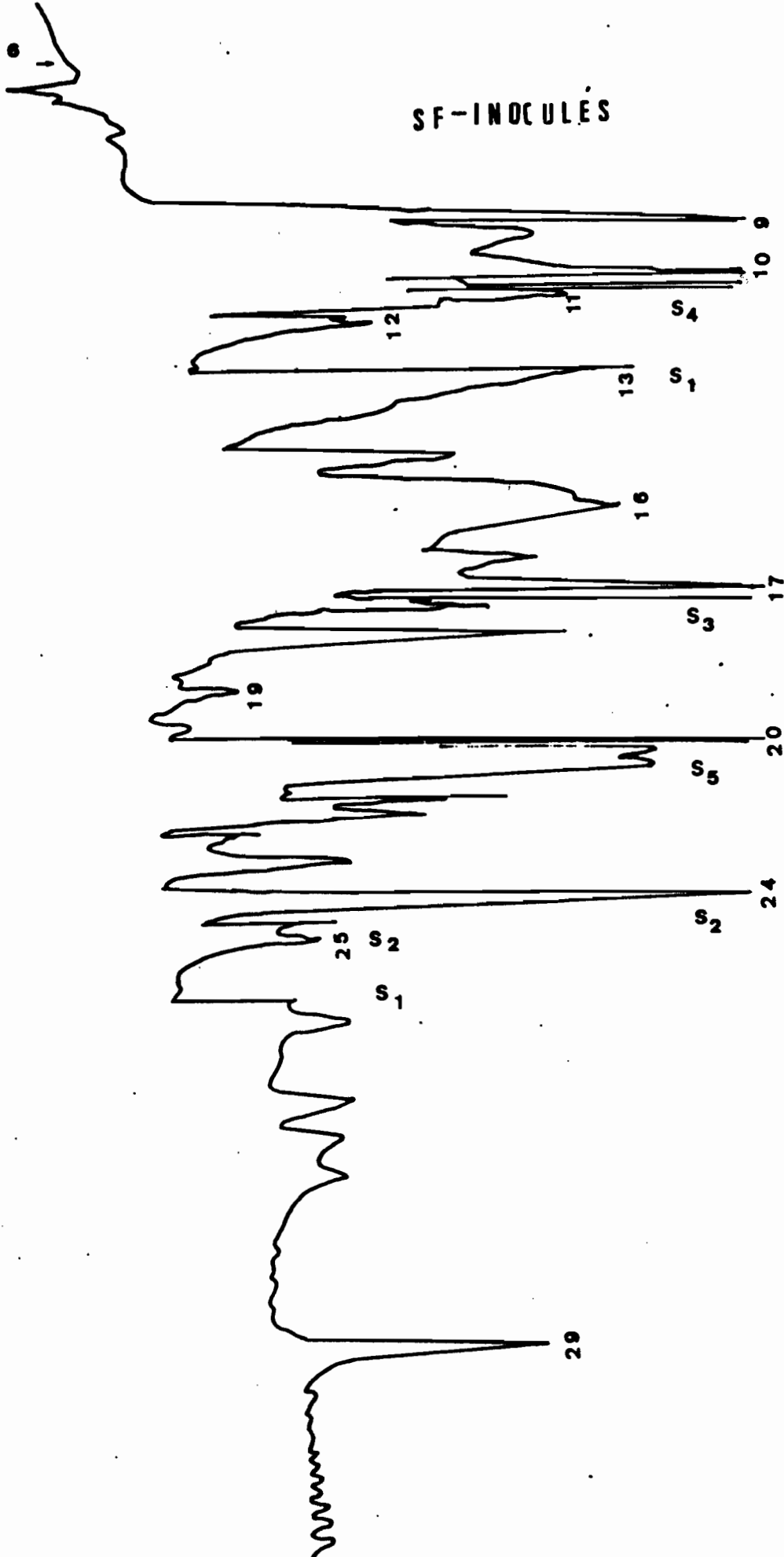
S₂

25

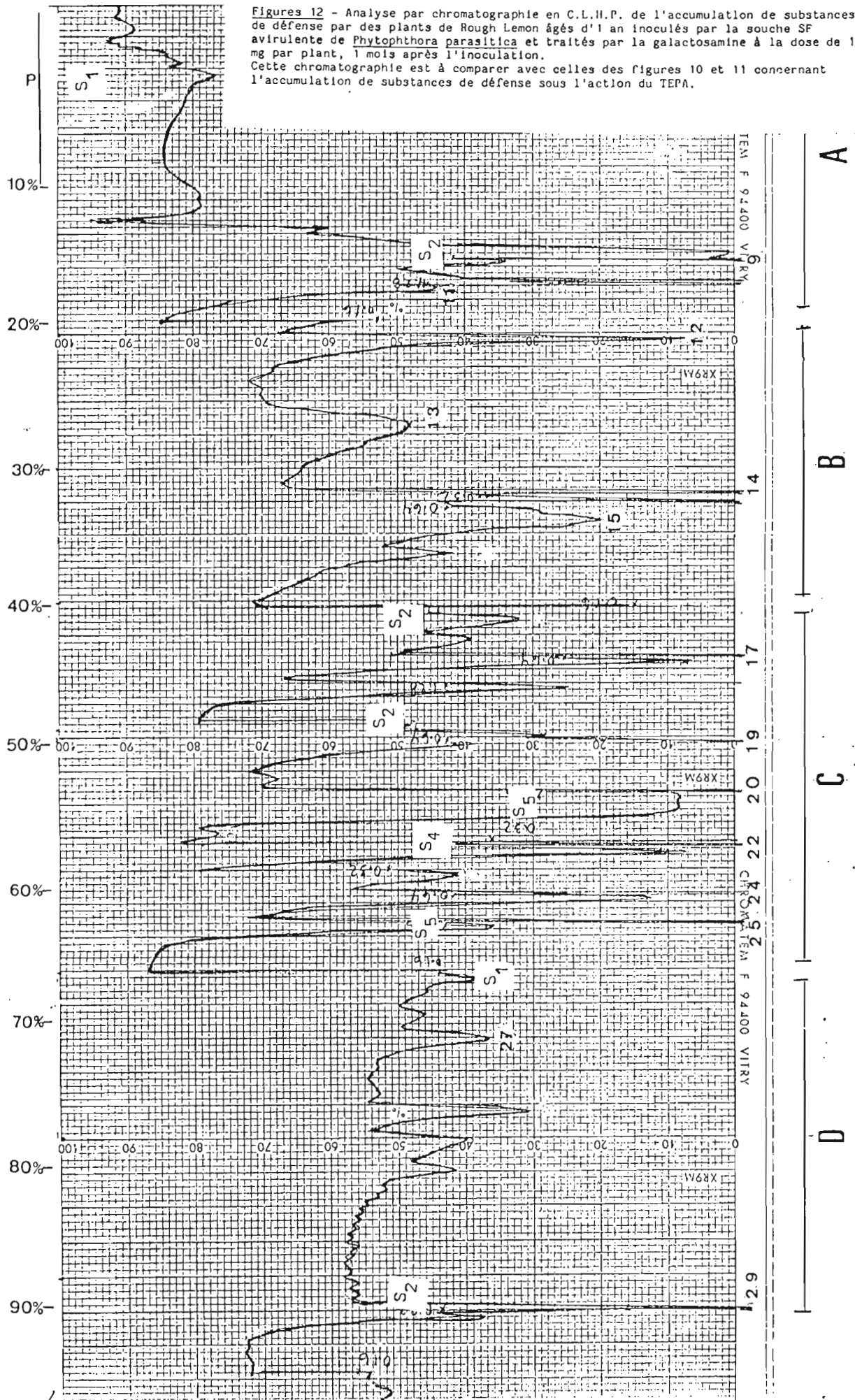
S₁

90%

29

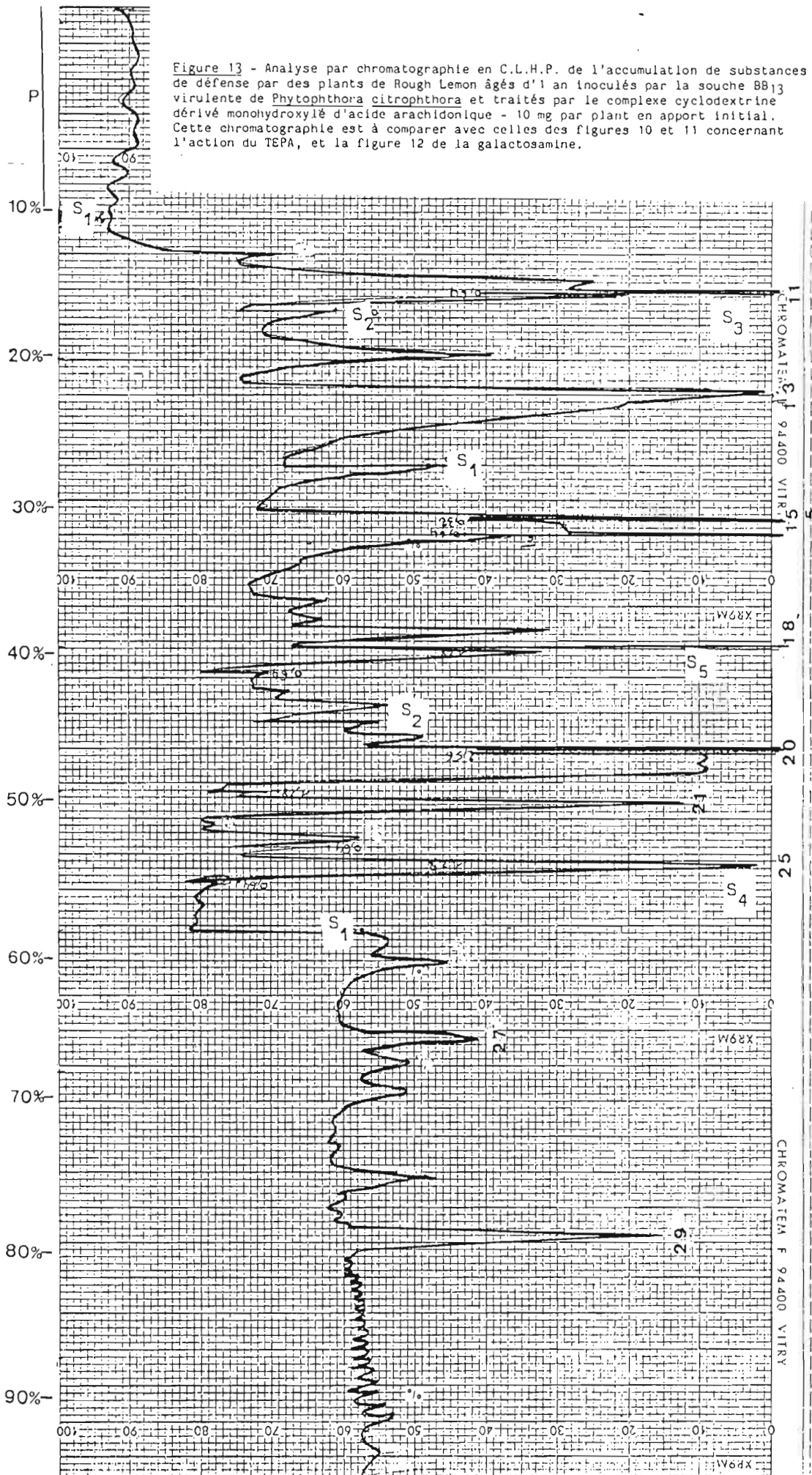


Figures 12 - Analyse par chromatographie en C.L.H.P. de l'accumulation de substances de défense par des plants de Rough Lemon âgés d'1 an inoculés par la souche SF avirulente de *Phytophthora parasitica* et traités par la galactosamine à la dose de 10 mg par plant, 1 mois après l'inoculation. Cette chromatographie est à comparer avec celles des figures 10 et 11 concernant l'accumulation de substances de défense sous l'action du TEPA.



détection U.U. ; $S_1 = 0,16$ - $S_2 = 0,32$ - $S_3 = 0,64$ - $S_4 = 1,28$ - $S_5 = 2,56$

Figure 13 - Analyse par chromatographie en C.L.H.P. de l'accumulation de substances de défense par des plants de Rough Lemon âgés d'1 an inocués par la souche BB13 virulente de *Phytophthora citrophthora* et traités par le complexe cyclodextrine dérivé monohydroxylé d'acide arachidonique - 10 mg par plant en apport initial. Cette chromatographie est à comparer avec celles des figures 10 et 11 concernant l'action du TEPA, et la figure 12 de la galactosamine.



A
B
C
D

détection U.U. ; S₁ = 0,16 - S₂ = 0,32 - S₃ = 0,64 - S₄ = 1,28 - S₅ = 2,56

Figure 15 - Comparaison après 5 jours d'incubation à 28 °C de l'inhibition de la croissance de la souche ED de *P. parasitica* en lames à concavité selon les souches inoculées et le traitement appliqué :

SF = *Phytophthora parasitica*

BB = *P. citrophthora*

TEPA = 100 mg par plant en apport mensuel

Galactosamine = 10 mg par plant en apport hebdomadaire

Complexe = 10 mg par plant le jour de l'inoculation.

Les extraits correspondent à 150 mg de tissus frais par ml de solution nutritive.

CROISSANCE

