

Purification de divers filtrats de culture de *Phytophthora* et activités biologiques sur le tabac des différentes fractions

Philippe BONNET

avec la collaboration technique de Georges ROUSSE

I.N.R.A., Station de Pathologie végétale, Centre de Recherches d'Antibes, B.P. 2078, F 06606 Antibes Cedex

RÉSUMÉ

Trois filtrats de culture toxiques à l'égard du tabac, obtenus avec 3 espèces de *Phytophthora* non pathogènes sur tabac (*P. cryptogea*, *P. capsici*, et *P. parasitica*), sont fractionnés suivant un schéma identique pour purifier les substances toxiques. A chaque étape de purification les 2 fractions obtenues sont déposées sur tige décapitée de tabac afin de contrôler conjointement l'apparition de toxicité foliaire, la présence de protéine b_1 , et l'induction possible d'un état de résistance vis-à-vis d'une inoculation ultérieure avec le parasite : *P. parasitica* var. *nicotianae*. Les résultats obtenus montrent une corrélation étroite entre les 3 phénomènes : seules les fractions toxiques induisent la présence de protéine b_1 et un certain état de résistance vis-à-vis du parasite. En conséquence il paraît souhaitable à l'avenir d'orienter la recherche d'éliciteurs potentiels de résistance vers les souches incompatibles à phytotoxicité faible (*P. capsici* par exemple), car moins dommageables à l'égard de la plante.

Mots clés additionnels : *Phytotoxicité, protéine b_1 , induction de résistance.*

SUMMARY

Culture filtrates of three Phytophthora spp. : purification and biological activity of different fractions.

Three culture filtrates were obtained from three species of *Phytophthora* which are not compatible with tobacco : *P. cryptogea*, *P. capsici* and *P. parasitica*. These filtrates, toxic on detached tobacco leaves, were purified to isolate toxic substances. For each purification step, fractions were tested for foliar toxicity, protein b_1 and induced resistance towards *P. parasitica* var. *nicotianae*. Results obtained showed a good correlation between these three characters. So, in the search for elicitors of resistance, it seems desirable to concentrate on non-compatible strains or filtrates, while avoiding those which are excessively phytotoxic.

Additional key words : *Phytotoxicity, b_1 -protein, induced resistance.*

I. INTRODUCTION

Dans diverses interactions plante-pathogène l'induction de résistance semble souvent corrélée à 2 autres facteurs : apparition de phénomènes nécrotiques et présence de protéines nouvelles chez la plante hôte. Dans certaines confrontations l'induction de résistance est simplement reliée au caractère nécosant. Pour HECHT & BATEMAN (1964) par exemple, on induit un état de résistance non spécifique chez le tabac avec divers organismes (virus de la nécrose ou de la mosaïque du tabac, *Thielaviopsis basicola*) qui, tous, sont agents de nécrose ; la capacité nécosante des inducteurs fongiques est soulignée dans la résistance induite

chez le concombre vis-à-vis de *Colletotrichum lagenarium* (KUC *et al.*, 1975, JENNS *et al.*, 1979, BERGSTROM *et al.*, 1982) ou chez le melon à l'égard de *C. lagenarium* (ROSSIGNOL, 1979). Dans d'autres interactions il semble y avoir relation entre présence de nécroses et apparition (ou augmentation) de protéines nouvelles chez la plante hôte : protéines b chez le couple tabac-*Thielaviopsis basicola* (GIANINAZZI *et al.*, 1980, AHL, 1983) ou protéines P_{14} chez le couple tomate-*Cladosporium fulvum* (DE WIT & VAN DER MEER, 1986). Enfin dans la relation de type hypersensible entre tabac (var. Xanthi nc.) et virus de la mosaïque du tabac (VMT), l'inoculation virale entraîne conjointement l'apparition de nécroses foliaires, de protéines b

et d'un certain état de résistance de la plante à une seconde inoculation virale (ROSS 1961, GIANINAZZI *et al.*, 1969, VAN LOON & VAN KAMMEN 1970).

En ce qui concerne les interactions *Phytophthora*-plantes, les travaux de différents auteurs indiquent, dans les filtrats de culture de diverses espèces du champignon, la présence de substances phytotoxiques. Cette phytotoxicité est mise en évidence sur des plantes (ou parties de plante) très diverses : pomme de Terre (RONNEBECK 1956, GRANITI 1969, BEHNKE 1977), soja (PAXTON 1972), tomate (GRANITI 1969, BALLIO *et al.*, 1972, PLICH & RUDNICKI, 1979, BREIMAN & BARASH 1981) ou eucalyptus (WOODWARD *et al.*, 1980) ; dans certains cas la nature biochimique de la substance est avancée : protéinique (RONNEBECK, 1956), glycoprotéinique et de faible poids moléculaire (pour l'une des 2 toxines trouvées par BREIMAN & BARASH, 1981) ou de nature polysaccharidique (BALLIO *et al.*, 1972, WOODWARD *et al.*, 1980). Bien qu'ayant travaillé essentiellement avec des extraits mycéliens, CSINOS & HENDRIX (1977) signalent que la phytotoxine de *P. cryptogea* à l'égard du tabac est également présente dans le filtrat de culture. Nous avons pu montrer précédemment que l'inoculation sur tige de tabac de diverses espèces incompatibles de *Phytophthora* s'accompagne de lésions nécrotiques foliaires à distance (BONNET, 1985) et entraîne l'apparition conjointe de protéine b₁ et d'un certain état de résistance vis-à-vis de l'espèce compatible : *P. parasitica* var. *nicotianae* ; or, l'ensemble de ces 3 réactions peut être également obtenu si l'on apporte, sur la tige décapitée, 20 µl d'un filtrat de culture brut d'une souche incompatible (BONNET *et al.*, 1986). Le schéma de purification d'un filtrat de culture (BONNET *et al.*, 1985) est appliqué à 3 filtrats de culture d'espèces incompatibles afin de préciser si, au cours des différentes étapes de purification, on peut ou non séparer les 3 inducteurs (de nécroses, de protéine b₁, de résistance) présents dans le filtrat brut.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Filtrats de culture, schéma de purification et fractions utilisées

Nous avons choisi 3 espèces de *Phytophthora* non pathogènes sur tabac : *P. cryptogea* (N° 52), *P. capsici* (N° 147) et *P. parasitica* (N° 26) ; après culture de 21 jours sur milieu liquide, le filtrat de culture brut est séparé du mycélium, ajusté à pH 6 et stérilisé sur filtre millipore (0,22 µm) comme décrit précédemment (BONNET *et al.*, 1985). Toxiques à l'égard du tabac mais à des degrés divers (BONNET, 1985, BONNET *et al.*, 1986) les 3 filtrats de cultures bruts ont été soumis à un schéma de purification des substances toxiques, identique dans les divers cas et voisin de celui déjà décrit pour *P. cryptogea* (BONNET *et al.*, 1985). Après concentration et précipitation au sulfate d'ammonium (75 p. 100 P/W) le culot, toxique, est repris dans un tampon acétate de Na (10 mM, pH5) et déposé sur colonne de carboxy-méthyl-cellulose ; pour *P. cryptogea* la fraction toxique est celle retenue sur la colonne (C II), tandis que pour *P. capsici* et *P. parasitica* ce sont les fractions non liées sur la colonne (C I) qui se

révèlent toxiques. Après dialyses et reconcentration, les fractions toxiques sont reprises en tampon Tris (10 mM pH8) et chromatographiées sur colonne de DEAE cellulose ; après dialyses la toxicité se retrouve soit dans la fraction non liée (D I pour *P. cryptogea* et *P. parasitica*), soit dans la fraction liée sur la colonne (D II pour *P. capsici*). Au cours des différentes étapes de purification les diverses fractions sont toutes ramenées à un volume équivalent au volume de filtrat brut de départ (C = 1) et la toxicité évaluée sur feuille détachée de tabac placée dans des extraits dilués au 1/10.

B. Tests biologiques sur plants de tabac var. « Xanthi nc »

Les plants de tabac utilisés dans les 3 essais sont âgés de 45 à 52 j et élevés en chambre climatisée (16 h lumière et 10 000 lux, 24 °C) ; les tests biologiques sont effectués dans ces mêmes conditions d'environnement.

Chacune des fractions à tester (filtrat brut ou fractions de purification) est apportée sous forme d'une goutte (20 µl) déposée au sommet d'une tige décapitée de tabac et à raison de 5 plants par fraction. Deux jours après on évalue, pour chaque plant, les nécroses foliaires apparues. Trois des plants de chaque lot sont alors inoculés par la souche pathogène (*P. parasitica* var. *nicotianae* N° 183) apportée sous forme mycélienne (pastilles de culture sur malt-gélosé) ; on suit alors l'installation et l'invasion du pathogène en notant, pendant les 12 jours suivant l'inoculation, l'apparition et la progression des nécroses sur la tige inoculée. Enfin, sur les 2 plants restants de chaque lot, on prélève, 4 jours après le dépôt, les 2 feuilles apicales pour recherche de protéines b. Le schéma d'extraction des protéines b et leur mise en évidence par électrophorèse (gel de polyacrylamide) est identique à celui déjà utilisé ; comme précédemment (BONNET *et al.*, 1986) seule la présence de la protéine b₁ a été prise en compte en tant que réponse positive.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus avec les 3 filtrats de culture et leurs fractions de purification respectives montrent, en premier lieu (tabl. 1) que la concordance entre toxicité et nécroses foliaires est généralement satisfaisante quoique variable suivant la souche de *Phytophthora* productrice et le test utilisé. En effet, avec *P. cryptogea*, toutes les fractions toxiques en trempage de feuilles détachées donnent des nécroses foliaires très importantes (50 à 65 p. 100) sur les 5 plants traités ; par contre, avec *P. capsici* ou *P. parasitica* certaines des fractions toxiques en trempage de feuilles détachées (test effectué 40 h à l'obscurité) ne donnent plus que des nécroses foliaires faibles, voire nulles (D II de *P. capsici*, culot de *P. parasitica*), quand elles sont apportées sur tige de tabac soumis à un éclairage journalier de 16 h. Ces résultats restent toutefois parfaitement cohérents avec les observations précédentes différenciant souches incompatibles à toxicité forte (*P. cryptogea*) ou faible (*P. capsici* et *P. parasitica*).

TABLEAU I

Toxicité des diverses fractions de purification obtenues à partir de 3 filtrats de culture ; relations entre nécroses foliaires, production de protéine b_1 et induction de résistance après apport de ces fractions sur tige décapitée de tabac.

a) Toxicité : flétrissement de feuilles détachées de tabac mises à tremper dans les diverses fractions (dilution 1/10 ; étuve 24 °C, 40 h).

b) Nécroses foliaires : nombre de plants (sur 5) présentant, 2 j après traitement, des nécroses foliaires ; expression en % de surface nécrosée (5 feuilles apicales/plant).

c) Protéine b_1 : présence (+), en gel de polyacrylamide, dans les extraits de feuilles prélevées 4 j après traitement.

d) R/NIC : nombre de plants (sur 3) présentant des nécroses caulinaires 3, 6 et 12 j après inoculation de *P. parasitica* var. *nicotianae* (N° 183) ; évaluation moyenne des nécroses (mm) obtenues.

Toxicity of various purification fractions from three culture filtrates ; relation between leaf necrosis, b_1 protein and resistance after deposition of 20- μ l drops on detopped tobacco plants.

a) Toxicity with detached tobacco leaves put in diluted (1/10) filtrates or fractions.

b) Number of plants with leaves exhibiting necrosed area, expressed as % necrosed leaf area (5 leaves on 5 plants).

c) Presence of b_1 protein in leaf extracts (4 days after treatment).

d) R/NIC : number of plants with external necrosis (expressed by average of lengths in mm) 3, 6 and 12 days after inoculation of *P. parasitica* var. *nicotianae* on pre-treated (2 days before) detopped tobacco plants.

	Filtrat brut	Fractions de purification des filtrats bruts						Témoins (eau)	
		SO ₄ (NH ₄) ₂		C.M.C.		D.E.A.E.			
		Surnageant	Culot	CI	CII	DI	DII		
P. C. R. Y. P. T. O. G. E. A. (52)	Toxicité (a)	+	0	+	0	+	+	0	0
	Nécroses foliaires (b)	5(49 ± 10)	0	5(65 ± 17)	0	5(50 ± 18)			0
	Protéine b_1 (c)	+	0	+	0	+			0
	R/NIC (d)	2 j	0	3(14 ± 0,5)	0	0	0	NT	NT
6 j		0	3(52 ± 4)	0	3(39 ± 25)	0			3(55 ± 8)
12 j		1(27,5)	3(57 ± 7)	0	3(41 ± 27)	1(20)			3(58 ± 11)
P. C. A. P. S. I. C. I. (147)	Toxicité (a)	+	0	+	+	0	0	+	0
	Nécroses foliaires (b)	1(4)	0	1(8)	2(8,5 ± 0,7)	0	0	0	0
	Protéine b_1 (c)	+	0	+	+	0	0	+	0
	R/NIC (d)	3 j	0	3(31 ± 3)	0	0	3(34 ± 4)	3(29 ± 3)	0
6 j		1(12,5)	3(54 ± 4)	0	0	3(60 ± 11)	3(58 ± 9)	0	3(62 ± 7)
12 j		1(50)	3(58 ± 10)	0	1(30)	3(71 ± 23)	3(71 ± 21)	0	3(65 ± 8)
P. P. A. R. A. S. I. I. C. A. (26)	Toxicité (a)	+	0	+	+	0		0	0
	Nécroses foliaires (b)	3(1)	0	0	0	0	0	0	0
	Protéine b_1 (c)	+	?	+	+	?	+	?	0
	R/NIC (d)	3 j	0	3(31 ± 1)	0	0	3(28 ± 2)	0	3(30 ± 0,5)
6 j		2(30 ± 7)	3(78 ± 12)	2(42 ± 10)	1(20)	3(81 ± 11)	1(15)	3(88 ± 1)	3(88 ± 7)
12 j		2(145 ± 21)	3(176 ± 51)	2(135 ± 35)	1(90)	3(186 ± 15)	1(95)	3(185 ± 39)	3(168 ± 20)

tica), mettant en évidence le rôle des conditions d'éclairage dans l'extériorisation du phénomène de toxicité (BONNET, 1985), déjà observé, d'ailleurs, par CSINOS & HENDRIX (1977).

En second lieu, pour la présence de protéine b_1 on constate que son apparition peut être reliée dans certains cas à des nécroses foliaires (cas de *P. cryptogea* par exemple), mais qu'elle est aussi susceptible d'apparaître en l'absence de toutes nécroses, du moins visibles à l'œil nu (fraction D II de *P. capsici*, diverses fractions de *P. parasitica*) ; ceci tendrait donc à prouver que la production de protéine b_1 n'est pas obliga-

toirement corrélée à des phénomènes nécrotiques et qu'elle peut apparaître en absence de nécroses visibles.

Quant à la protection induite par les diverses fractions vis-à-vis d'une inoculation ultérieure par le parasite un fait apparaît certain : de toutes les fractions non toxiques testées, aucune n'induit de résistance et l'invasion du parasite est nettement visible dès le 3^e j. A l'inverse l'application des fractions toxiques entraîne le plus souvent, après inoculation, une invasion nulle ou limitée du parasite. Toutefois, les résultats sont variables puisqu'on peut observer, suivant les cas, une absence de toute pénétration sur les 3 plants (culots de

P. cryptogea ou de *P. capsici*), une invasion tardive et limitée sur l'un des 3 plants (CII de *P. cryptogea*) soit un retard à l'invasion sur 2 des 3 plants (culot de *P. parasitica*). Il semblerait que les extraits de *P. parasitica* soient les moins efficaces. Enfin, il faut préciser ici — à la différence des essais précédemment décrits (BONNET *et al.*, 1986) — que le parasite a été inoculé directement sur la tige décapitée et prétraitée ; nous ignorons si la protection ainsi induite est uniquement localisée ou systémique.

Ces résultats semblent montrer, d'une manière générale, qu'il existe une corrélation indiscutable entre facteur nécrosant et induction d'un certain état de résis-

tance. Nous pouvions espérer, lors de la purification d'un filtrat de culture de souche incompatible, séparer le facteur nécrosant d'un facteur éliciteur de résistance mais l'hypothèse semble donc devoir être abandonnée. De ce fait les possibilités d'induire un certain état de résistance de la plante-hôte à l'égard de son parasite par utilisation de filtrats de culture (ou fractions purifiées de ces filtrats) doivent s'orienter vers les souches non compatibles à phytotoxicité la plus restreinte possible vis-à-vis du tabac.

Reçu le 8 juillet 1987.
Accepté le 19 février 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahl Patricia, 1983. *Aspect génétique et moléculaire de la résistance (réaction d'hypersensibilité) chez les Nicotiana*. Thèse Univ. Genève, 123 p.
- Ballio A., Gianini Luciana, Borelli R., Bottalico A., Graniti A., 1972. Production of phytotoxins by *Phytophthora nicotianae* B. de Haan var. *parasitica* (Dast.) Waterhouse, 431-432. In R. K. S. Wood *et al.*, "Phytotoxins in Plant Diseases". Acad. Press, New York, 530 p.
- Behnke M., 1977. Isolation and partial characterization of phytotoxic substances from culture filtrates of the fungus *Phytophthora infestans*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **85** (1), 17-27.
- Bergstrom G. C., Johnson M. C., Kuc J., 1982. Effects of local infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*, *Pseudomonas lachrymans*, or tobacco necrosis virus on systemic resistance to cucumber mosaic virus. *Phytopathology*, **72**, 922-926.
- Bonnet Ph., 1985. Réactions différentielles du tabac à 9 espèces de *Phytophthora*. *Agronomie*, **5** (9), 801-808.
- Bonnet Ph., Poupet A., Bruneteau M., 1985. Toxicité vis-à-vis du tabac des fractions purifiées d'un filtrat de culture de *Phytophthora cryptogea* Pethyb. et Laff. *Agronomie*, **5** (3), 275-282.
- Bonnet Ph., Poupet A., Abad P., Venard P., Cardin L., 1986. Induction de nécroses foliaires, de protéines b et de résistance dans les interactions tabac-*Phytophthora*. *Agronomie*, **6** (9), 829-837.
- Breiman Adina, Barash I., 1981. Partial characterization of phytotoxic compounds in culture filtrates of *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathol. Z.*, **102**, 1-9.
- Csinos A., Hendrix J. W., 1977. Toxin produced by *Phytophthora cryptogea* active on excised tobacco leaves. *Can. J. Bot.*, **55** (9), 1156-1162.
- De Wit P. J. G. M., Van Der Meer F. E., 1986. Accumulation of the pathogenesis-related tomato leaf protein P₁₄ as an early indicator of incompatibility in the interaction between *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) and tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **28**, 203-214.
- Gianinazzi S., Vallée J. C., Martin C., 1969. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* n.c. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **268**, 800-802.
- Gianinazzi S., Ahl P., Cornu A., Scalla R., 1980. First report of host b protein appearance in response to a fungal infection in tobacco. *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 337-342.
- Graniti A., 1969. Host-parasite relations in *Citrus* diseases as exemplified by *Phytophthora gummosis* and *Deuterophoma* "mal secco". *Proc. 1st Internat. Citrus Symp.*, **3**, 1187-1200.
- Hecht Eva, Bateman D. F., 1964. Non-specific acquired resistance to pathogens resulting from localized infections by *Thielaviopsis basicola* or viruses in tobacco leaves. *Phytopathology*, **54**, 523-530.
- Jenns Anne E., Caruso F. L., Kuc J., 1979. Non-specific resistance to pathogens induced systemically by local infection of cucumber with tobacco necrosis virus, *Colletotrichum lagenarium* or *Pseudomonas lachrymans*. *Phytopathol. mediterr.*, **18**, 129-134.
- Kuc J., Schockley G., Kearney K., 1975. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.*, **7**, 195-199.
- Paxton J. D., 1972. Toxin production by *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *sojae* Hild., 433. In R. K. S. Wood, A. Ballio & A. Graniti : "Phytotoxins in Plant Diseases". Acad. Press, New York, 530 p.
- Plich M., Rudnicki R. M., 1979. Studies of the toxins of *Phytophthora cactorum* pathogenic to apple trees. I. Isolation, some of the properties and activities of a toxin produced by the fungus cultured in vitro. *Phytopathol. Z.*, **94** (3), 270-278.
- Ronnebeck W., 1956. Ein phytotoxisches Prinzip aus *Phytophthora infestans* de By. *Z. Pflkrankh.*, **63** (7), 385-389. (Abstr. in *Rev. Appl. Mycol.*, **35**, 843.)
- Ross A. F., 1961. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology*, **14**, 329-339, 340-358.
- Rosignol M., 1979. *La prémunition des plants de Melon contre l'antracnose. Approches physiologiques du phénomène*. Thèse Univ. P. Sabatier, Toulouse, 63 p.
- Van Loon L. C., Van Kammen A., 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Xanthi and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, **40**, 199-211.
- Woodward J. R., Keane P. J., Stone B. A., 1980. Structures and properties of wilt-inducing polysaccharides from *Phytophthora* species. *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 439-454.