

Accumulation de la protéine soluble (PR 1a) dans les interactions *Nicotiana tabacum*/ *Phytophthora* ssp

N Maïa, L Cardin *

INRA, station de Botanique et de Pathologie végétale, villa Thuret, BP 2078, F06606 Antibes cedex, France

(Reçu le 15 mai 1992; accepté le 25 février 1993)

Résumé — Le but de ce travail était de comparer les cinétiques d'accumulation de PR 1a, dans les différents niveaux d'interactions entre 4 génotypes de *Nicotiana tabacum* et 5 isolats de *Phytophthora* sp. Nous avons dans un premier temps vérifié sur gel de polyacrylamide que la protéine PR1a était majoritaire parmi les protéines de type PR dans les 4 génotypes. La quantification de la protéine PR 1a a été réalisée par la méthode immunoenzymatique DAS-Elisa, à partir d'extraits séparés des 2 feuilles situées immédiatement après le point d'inoculation de la tige. Les isolats de *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* (NIC 181, NIC 183, NIC 310) agent du black shank sont seuls compatibles avec le *N tabacum*. Une incompatibilité spécifique s'établit entre les variétés possédant le gène R1 (lignée d'Helgeson 46-8) et la race physiologique commune r0 du champignon parasite. Cette résistance est surmontée par l'isolat de race r1 (NIC 181). Certaines variétés, comme Escambray, possèdent une tolérance ou résistance non spécifique aux isolats de race 0 et 1. Les variétés Xanthi nc et la lignée 49-10 d'Helgeson sont sensibles aux 2 races. Enfin l'incompatibilité générale (résistance « plante non hôte ») peut être observée entre ces 4 génotypes et les 2 espèces étudiées de *Phytophthora* : *P cryptogea* (CRY 52) et *P parasitica sensu lato* (PAR 44) productrices d'élicitine (E+). Les 4 variétés ou lignées étudiées renfermaient avant décapitation de la tige et inoculation des quantités variables de PR 1a (0,03 µg/gMF à 6,6 µg/gMF), celles-ci non corrélées à la résistance générale. La réaction de résistance de la lignée 46-8 (R1) à la race physiologique r0, n'a pas été marquée par une accumulation de PR 1a. Dans les interactions compatibles, le flétrissement du limbe foliaire, envahi par le parasite, s'accompagne dans tous les cas d'une accumulation importante de PR 1a (pouvant atteindre plus de 700 µg/gMF pour Escambray à J7). En ce qui concerne les interactions incompatibles de type plante « non hôte », l'interprétation des cinétiques observées est plus complexe. Une induction précoce de PR 1a à J1 pourrait être liée à l'action des éliciteurs produits par les espèces *P cryptogea* et *P parasitica*; l'accumulation plus tardive est beaucoup plus élevée entre J4 et J7 serait la conséquence indirecte des nécroses induites par la seule souche nécosante *P cryptogea*. Chez Xanthi nc, elle n'a pas été observée dans les interactions avec *P parasitica sensu lato* qui n'a pas provoqué de nécrose à distance. Toute réaction nécrotique à distance ou envahissement des limbes s'accompagne d'une accumulation de PR 1a, mais nous n'avons pu mettre en évidence de relation directe entre la résistance et la synthèse de PR 1a.

***Nicotiana tabacum* = tabac / *Phytophthora* / PR 1a / Elisa**

Summary — **Accumulation of pathogenesis-related protein (PR 1a) in *Nicotiana tabacum*/*Phytophthora* interactions.** The aim of this study was to compare the kinetics of PR 1a accumulation in different types of interaction between 4 genotypes of *N tabacum* and 5 isolates of *Phytophthora* ssp. It was first shown by PAGE that PR 1a was predominantly induced in the 4 genotypes. The quantification of PR 1a induced in the 2 leaves under the inoculation point was performed by an immunoenzymatic technique (DAS-ELISA). *P parasitica* var *nicotianae* (NIC) isolates are the only ones compatible with *N tabacum*. Specific incompatibility (vertical resistance) controlled by the gene R1 occurs between 46-8 Helgeson's line and isolates NIC 183, NIC 310 race r0, whereas isolate NIC 181 race r1 overcomes it. The variety Xanthi nc and Helgeson's line 49-10 are susceptible to both races. General incompatibility (non-host resistance) is observed between all *N tabacum* genotypes and isolates of *Phytophthora* ssp other than *P parasitica* var *nicotianae*, for instance *P cryptogea* (CRY 52) and *P parasitica sensu lato* (PAR 44). It has been demonstrated that incompatible species are more or less able to induce foliar necrosis without colonization and that their culture filtrates contain a protein elicitor (elicitin) identified respectively as cryptogein and parasiticein. Healthy plants of the 4 genotypes contain different amounts of PR 1a, ranging from 0.03 µg/gFW in Xanthi nc to 6.6 µg/gFW in Escambray. However, this level of PR 1a is not correlated with varietal resistance, either specific or nonspecific. The resistance process in the specifically incompatible interaction 46-8 (R1)/NIC 183 race r0 is not associated with a noticeable increase of PR 1a in the leaves (table IV). In the compatible interactions, petiole colonization and foliar wilt are followed by a

* Correspondance et tirés à part

high level of PR 1a accumulation in Escambray reaching > 700 µg/gFW (table III). In the incompatible interactions, interpretation of the accumulation kinetics is more complex: early induction on the first day after inoculation could be directly stimulated by elicitors. This response depends on the varietal genotype: only Xanthi nc responds to parasiticein. Afterwards, a higher amount of PR 1a found on the fourth and seventh days in 46–8 and 49–10 lines inoculated with CRY 52 could be directly related to foliar necrosis; this peak is apparently absent in the same genotypes inoculated by the non-necrotic isolate PAR 44. In conclusion, from our results it seems that all necrotic reactions induced by incompatible *Phytophthora* species or foliar invasion by compatible strain release a large amount of PR 1a. On the other hand, no direct relation between any resistance state and PR 1a accumulation has been clearly established.

Nicotiana tabacum = tobacco / Phytophthora / PR 1a / Elisa

INTRODUCTION

La maladie du *black-shank* des cultures de tabac est provoquée par les isolats de *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* (*Ppn*). Selon les concepts des relations hôte-parasite développés par Heath (1981), «l'incompatibilité générale» (résistance plante non-hôte) intervient entre le tabac et toutes les espèces ou variétés de *Phytophthora* autres que les isolats de *Ppn*, seuls compatibles. Un gène *R1* d'incompatibilité spécifique (résistance verticale) aux isolats de la race commune *Ppn* race r0 a été introduit par hybridation interspécifique entre *N. tabacum* et *N. plumbaginifolia* par Helgeson (1976) dans la lignée 46–8 de type Virginie. Cette lignée 46–8 (*R1*) est donc résistante aux isolats *Ppn*, race r0, mais sensible aux isolats de race r1 capables de contourner cette résistance. Enfin, différentes variétés possèdent une incompatibilité non spécifique (résistance horizontale) aux isolats *Ppn* race r0 et r1.

L'expression de l'incompatibilité générale (plante non-hôte) entre l'espèce cultivée *Nicotiana tabacum* var Xanthi nc ou var Samsun, et les isolats de *Phytophthora* ssp a été décrite par Bonnet *et al* (1986). Avec les isolats incompatibles, inoculés sur tiges de tabac décapités à l'état végétatif, l'envahissement caulinaire est faible ou nul, alors que l'on observe une réaction qualifiée de «type hypersensible» caractérisée par des nécroses foliaires à distance. Cette réaction nécrotique est plus ou moins marquée selon les espèces du genre *Phytophthora*: ainsi, l'espèce *P. cryptogea* est fortement nécrosante, l'espèce *P. parasitica* faiblement nécrosante.

La même réaction nécrotique est déclenchée par une protéine de 10 kDa excrétée dans le filtrat de culture des espèces incompatibles. La séquence de cette protéine est caractéristique de chaque espèce: cryptogéine de *P. cryptogea* (Ricci *et al*, 1989), parasiticeïne de *P. parasitica* (Bruneteau, communication personnelle). Cette famille de protéines dites «élicites» possède

des propriétés d'éliciteurs de résistance à l'égard des souches compatibles. En première analyse, les isolats compatibles très agressifs de *Ppn* originaires des États-Unis ou de Cuba en sont dépourvus, mais des isolats peu agressifs de *black-shank* d'origine australienne en produisent (Bonnet, communication personnelle).

La réaction de type «hypersensible» de l'interaction plante «non hôte» est toujours marquée par un pic d'accumulation de la protéine soluble PR 1a, 4 j après inoculation par des isolats incompatibles nécrosants ou peu nécrosants, ou par l'apport de leur filtrat de culture sur les tiges décapitées de tabacs Xanthi nc ou Samsun (Bonnet *et al*, 1986). Dans les interactions compatibles, une faible accumulation de PR 1a est décelable entre les 8^e et 15^e j qui suivent l'inoculation, dans les feuilles situées en avant du front d'envahissement caulinaire. Les auteurs posent la question des relations entre réaction nécrotique et synthèse de PR 1a. Parmi les 25 protéines de type PR décrites dans la littérature (Stintzi *et al*, 1990), la PR 1a, dont la fonction biologique n'est pas connue, est dans le genre *Nicotiana* généralement la plus abondante. Son accumulation a été signalée dans un grand nombre d'interactions hôte-parasite: bactéries, champignons, virus, viroïdes. Elle est induite par certains composés abiotiques dans des situations de stress ou des états physiologiques particuliers (Kauffmann, 1988).

C'est pourquoi nous l'avons retenue comme «marqueur» dans les différents types de relation entre le tabac et le *phytophthora*, et nous avons comparé les cinétiques de son accumulation dans les niveaux d'interactions précédemment décrits:

- incompatibilité générale avec les espèces: *P. cryptogea* fortement nécrosant; *P. parasitica sensu lato* faiblement nécrosant;
- incompatibilité spécifique gène *R1/Ppn* race r0;
- incompatibilité non spécifique;
- compatibilité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique

Variétés de tabac

Nous avons inoculé 4 géotypes de tabac. La variété Xanthi nc est sensible aux différents isolats de *Ppn*. La lignée 46-8 possède le gène de résistance spécifique *R1* à la race physiologique commune *r0*, elle est sensible aux isolats de race *r1*, sa lignée isogénique 49-10 est sensible aux isolats de *Ppn* *r0* et *r1*; ces 2 lignées sont issues de l'hybridation interspécifique entre les espèces *N tabacum* et *N plumbaginifolia* (Helgeson *et al*, 1976). Dans le texte, par opposition à la lignée 46-8 *R1*, nous désignerons par *R0* les 3 géotypes dépourvus de ce gène de résistance.

Matériel fongique

Isolats incompatibles : *P parasitica sensu lato* (PAR 44) isolé de citrus faiblement nécrosant sur feuille de tabac, et *P cryptogea* (CRY 52) isolé de *Gerbera* fortement nécrosant. Les deux isolats sont producteurs d'élicitrine.

Isolats compatibles, agents du black-shank : *P parasitica var nicotianae* (NIC 181) race *r1*, NIC (183) race *r0* ont été isolés de tabac aux États-Unis. L'isolat (NIC 310) isolé de tabac en Australie, produit dans son filtrat de culture une élicitrine comparable à celle des souches incompatibles (Bonnet, communication personnelle).

Système expérimental

Inoculations, symptômes et prélèvements

Les plants de tabac sont cultivés en chambre climatisée : 23°C, 14 h d'éclairage à 16 000 lux. Les tabacs sont décapités et on apporte sur la blessure un disque de culture mycélienne sur malt gélosé. Dans le tableau I, sont indiquées les différentes interactions étudiées. Nous avons inoculé des plants des variétés Xanthi nc et Escambray âgés de 60 j. Les plants des lignées 49-10 et 46-8, inoculés dans les 2 essais successifs, étaient âgés de 73 j ou 80 j. Ces 2 lignées ont un allongement caulinaire plus lent; de ce fait le test sur tiges décapitées a été impossible à réaliser à 60 j.

On a noté à J2 la réaction nécrotique de type «hypersensible», en relevant le nombre de feuilles présentant des nécroses à distance.

À J2, J4, J7, pour l'ensemble des souches, on a mesuré en millimètres, l'envahissement caulinaire et éventuellement celui des pétioles. À ces mêmes dates, les feuilles F1 et F2 situées immédiatement sous la blessure, sont prélevées pour l'extraction de la

protéine PR 1a. Chaque prélèvement a été fait sur un seul plant. Pour chacun des quatre géotypes, un prélèvement à J0 (avant décapitation) indique le taux constitutif de PR 1a.

Préparation des extraits et électrophorèse en PAGE

Les feuilles F1 de plusieurs plants des 4 géotypes ont été prélevées à J0 et J7 suite à l'inoculation par la souche CRY 52 inductrice de nécroses foliaires à distance. En référence, des feuilles de Xanthi nc présentant des lésions locales ont été récoltées 4 j après inoculation par le virus de la mosaïque du tabac.

La préparation des extraits a été faite selon Abad *et al* (1986). Elle consiste à broyer au mortier les feuilles congelées dans un tampon de 84 mM acide citrique et 32 mM phosphate disodique à pH 2,8. Après filtration sur étamine, le jus est clarifié par 2 centrifugations à 5 000 puis 14 000 *g* durant 10 et 20 min. On procède à une précipitation par adjonction au surnageant de 50% (poids/volume) de sulfate d'ammonium pendant 30 min à 4°C/ Après centrifugation à 10 000 *g* durant 20 min, le culot est repris dans un tampon 10 mM tris-HCl (pH 8,0) puis dialysé abondamment contre ce même tampon à 4°C durant la nuit. La technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide est décrite par Abad *et al* (1986). L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 15% (plaque de 120 x 85 x 1 mm) se fait en condition non dénaturante sous un voltage constant de 150 v durant 3 h. Le dépôt de chaque échantillon correspond à l'équivalent de 0,1 g de MF. Les gels sont colorés dans une solution eau-méthanol-acide acétique (5-5-1) contenant 0,03% de bleu de Coomassie Brilliant Blue R 250. Après décoloration dans la même solution, sans colorant, les gels sont séchés.

Extraction et dosage de la PR 1a

On a dosé la PR 1a séparément dans les feuilles F1 et F2 (de 1,5 à 8,6 gMF), par la méthode immunoenzymatique (DAS-Elisa) décrite pour cette même protéine par Abad *et al* (1986). En comparaison avec la technique de dosage par HPLC, Abad *et al* (1989) ont démontré qu'en dépit des parentés sérologiques entre les protéines acides de cette famille (1a, 1b, 1c) la technique DAS-Elisa, permettait une quantification fiable de la PR 1a, sans que les PR 1b et PR 1c interviennent notablement dans le dosage.

La technique de dosage choisie a l'avantage de pouvoir traiter rapidement un nombre élevé d'échantillons à partir d'un extrait obtenu par simple broyage dans le même tampon que précédemment (pH 2,8) et centrifugation à faible vitesse. On établit une gamme de dilution très large des extraits (progression géométrique de raison 2), dans du tampon 10 mM tris-HCl + 0,5% Tween 20 et 1% d'albumine de sérum bovin (pH 8,0). Ainsi, pour le test Elisa, des valeurs de densité optique se situeront dans la zone de dosage préala-

Tableau I. Interactions étudiées entre *Nicotiana tabacum* et *Phytophthora* ssp.

Variété de tabac	Isolats de <i>Phytophthora</i>				
	CRY 52 E+	PAR 44 E+	NIC 310, r0 E+	NIC 183, r0 E-	NIC 181, r1 E-
Xanthi nc sensible aux races 0 et 1	INE	ICG	C	C	C
Escambray tolérant aux races 0 et 1	INE	ICG	INE	ICNS	ICNS
49-10 sensible aux races 0 et 1	ICG	ICG	INE	C	C
46-8 résistant à r0 sensible à r1	ICG	ICG	INE	ICS	C

C : compatibilité; ICS : incompatibilité spécifique (gène *R1*/race physiologique r0); ICNS : incompatibilité non spécifique (résistance horizontale); ICG : incompatibilité générale «plante non hôte»; INE : interaction non étudiée; E+ : isolats de *Phytophthora* producteurs d'élicitines; E- : isolats de *Phytophthora* non producteurs d'élicitines.

blement définie par une gamme étalon donnée avec de la protéine PR 1a pure (purification par HPLC).

Deux répétitions sont effectuées pour chaque dilution. Les valeurs de DO, mesurées à 405 nm, sont enregistrées par un appareil Titrek Twinreader et traitées à l'aide d'un programme Flow-Laboratory en tenant compte des indications données par Cardin *et al* (1983).

La sensibilité de la technique est de 0,25 ng/ml de PR 1a avec une gamme de dosage comprise entre 0,5 et 64 ng/ml. Les coefficients de variations intra-essais et inter-essais étaient respectivement de l'ordre de 5% et de 15 à 20% (Abad *et al*, 1989).

RÉSULTATS

Électrophorégramme en PAGE des 4 génotypes étudiés (fig 1)

Avant de doser la PR 1a en Elisa dans les différentes interactions souches/variétés étudiées, nous avons comparé les électrophorégrammes obtenus en gel de polyacrylamide (15%) en conditions non dénaturantes des 4 génotypes. Cette étude a été faite sur des extraits de la feuille F1 de plants sains (J0) et de plants inoculés par l'isolat CRY 52 (J7). La feuille F1 des 4 génotypes inoculés présentait des nécroses foliaires. Nous avons pris comme référence un extrait de feuille de la variété Xanthi nc inoculé par du VMT.

Par cette technique, on ne décèle de PR que dans les plants inoculés par l'isolat CRY 52. En référence au témoin VMT, les génotypes Xanthi nc, 49-10 et 46-8 ont des profils sensiblement identiques avec la bande Pr 1a majoritaire ; la

variété Escambray présente également une bande Pr 1a majoritaire, ainsi qu'une bande sur-numéraire située au dessus de cette dernière (fig 1). Après avoir découpé et élué cette bande, nous avons vérifié, par immuno-électrophorèse en gel d'agarose, qu'elle était reliée sérologiquement à la PR 1a (résultats non présentés).

Teneur en PR 1a des plants non inoculés

Les teneurs en PR 1a des plants non inoculés avant décapitation (J0) ou à 1 j (J1), 2 j (J2), 4 j (J4) ou 7 j (J7) après la décapitation figurent dans le tableau II. Les plants des variétés Xanthi nc et Escambray étaient âgés de 60 j. Pour les lignées isogéniques dont l'élongation caulinaire

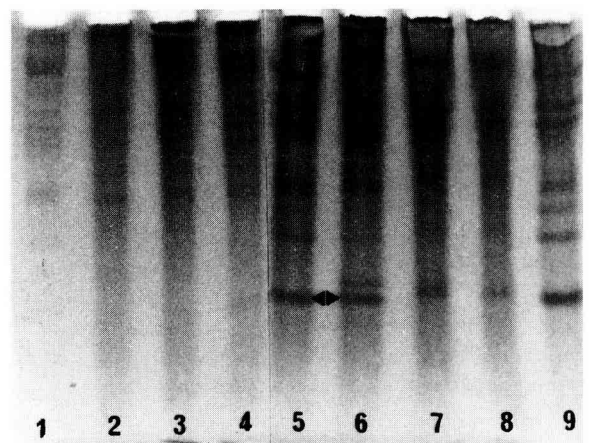


Fig 1. Électrophorégramme en PAGE 15% en conditions non dénaturantes d'extraits de feuilles de tabac. Piste 1, 2, 3, 4 : témoins non inoculés (J0) de Xanthi nc; Escambray; 49-10; 46-8. Piste 5, 6, 7, 8 : feuille F1 (J7) après inoculation par CRY 52 de Xanthi nc; Escambray; 49-10; 46-8. Piste 9 : feuille de Xanthi nc (J4) inoculé par du VMT.

est plus lente, nous avons dû utiliser des plants plus âgés : 73 ou 80 j. Chaque dosage a été fait sur les feuilles 1 et 2, d'un seul plant : l'effet «individu» intravariétal n'a pu donc être apprécié. La variété Escambray, les lignées 49-10 et 46-8 renferment des teneurs en PR 1a sensiblement plus élevées que la variété Xanthi nc. Cette teneur augmente avec l'âge de la feuille et l'âge du plant. D'après les valeurs dosées dans les 7 jours qui ont suivi la décapitation, on observe une variation importante, sans que se dégage nettement une cinétique d'accumulation de PR 1a, propre à l'effet blessure.

Symptômes observés après inoculation

Incompatibilité générale (tableau III)

L'isolat de *P. cryptogea*, CRY 52 incompatible, n'envahit pas la tige des lignées 49-10 et 46-8. Dès le 2^e j après l'inoculation, des réactions nécrotiques apparaissent sur les feuilles de rang 1 à 4 situées sous le point d'inoculation.

L'isolat *P. parasitica* 44, inoculé sur les 4 génotypes, n'envahit que faiblement les tiges (10 à 18 mm), sans provoquer de réactions nécrotiques à distance (fig 2).

Incompatibilité spécifique

Dans l'interaction d'incompatibilité spécifique entre la lignée (R1) 46-8 et les isolats de race physiologique r0 : NIC 183 et NIC 310, le champignon n'envahit pas la tige, et aucune réaction, de type nécrose foliaire à distance, n'est apparue (fig 2).

Compatibilité

Les isolats compatibles envahissent la tige et colonisent successivement les pétioles foliaires, entraînant le flétrissement du limbe. Sur les graphiques de la figure 2, sont représentées les courbes d'envahissement caulinaire pour les quatre génotypes étudiés ainsi que le nombre de pétioles envahis à J7 ([x] voir légende). Dans ce mode d'inoculation sur tige décapitée, la résistance horizontale (non-spécifique) de la variété Escambray se traduit par le fait que seul le pétiole de la première feuille est envahi à J7 par les souches compatibles. La lignée 46-8 (R1) se montre moins sensible à l'isolat NIC 181 race 1 que la lignée isogénique 49-10. Sur les trois génotypes Xanthi nc, Escambray et 49-10 dépourvus du gène R1, l'isolat NIC 310, producteur d'élicite (E+), est moins agressif que les isolats (E-), NIC 181 et NIC 183.

Tableau II. Accumulation de PR 1a exprimée en $\mu\text{g/gMF}$ dans les feuilles (F1) et (F2) de tabacs sains non décapités (J0), ou 1 j (J1), 2 j (J2), 4 j (J4) et 7 j (J7), après décapitation sans inoculation.

Variétés	Âges des plants (en j)	Niveau des feuilles	Teneur en PR 1a ($\mu\text{g/gMF}$)				
			J0	J1	J2	J4	J7
Xanthi nc	60	1	0,03	0,01	0,02	0,04	0,03
		2	0,01	0,09	0,17	0,37	0,10
Escambray	60	1	6,60	2,5	12,9	5,40	3,70
		2	21,60	3,9	21,7	15,80	4,80
49-10	73	1	0,84	6,23	1	26,90	4,34
		2	1,01	3,24	8	1,57	9,77
46-8	73	1	0,01	0,29	1,73	2,18	3,54
		2	0,27	0,14	2,43	12,10	13,70
49-10	80	1	1,42	2,01	2,23	0,69	4,67
		2	1,67	0,60	2,03	2,58	3,95
46-8	80	1	3,66	5,41	7,73	0,44	12,20
		2	16,20	9,92	6,10	10,90	42,20

Tableau III. Symptômes observés et accumulation de PR 1a en $\mu\text{g/gMF}$ dans la première feuille (F1) et dans la seconde feuille (F2) après inoculation des 4 génotypes de tabac par les souches incompatibles *P. cryptogea* (CRY 52) et *P. parasitica* (PAR 44).

Isolats	Variétés	Âges du plant (en j)	Longueur de l'envahissement caulinaire (en mm)	Feuilles présentant des nécroses (à J2)	Teneur en PR 1a ($\mu\text{g/gMF}$)					
					Niveaux Feuilles	J0	J1	J2	J4	J7
<i>P. cryptogea</i> CRY 52	49-10	73	0	F2 F3 F4	F1	0,8	13	19	243	381
					F2	1	4	14	261	541
	46-8	73	0	F1 F2 F3 F4	F1	0,01	1,8	17	52	184
					F2	0,2	1,6	12	43	174
<i>P. parasitica</i> PAR 44	Xanthi nc	60	18		F1	0,03	2,6	0,5	0,7	5
					F2	0,01	8	0,7	4	13
	Escambray	60	16	Absence de nécroses foliaires	F1	7	2,6	3	10	6
					F2	22	5	5	6	11
	49-10	80	10		F1	1,4	0,5	6	4	9
					F2	1,6	1,5	3	11	7
	46-8	80	10		F1	3,6	0,6	0,4	8	11
					F2	1,6	16	1,6	26	31

Cinétique d'accumulation de la PR 1a

Incompatibilité générale (tableau III)

En réponse à l'isolat *P. cryptogea* 52, la teneur en PR 1a s'élève dès J1 dans les lignées 49-10 et 46-8, mais les valeurs observées sont de l'ordre de celles des témoins sains décapités (tableau I). C'est à partir de J4 que les valeurs sont indiscutablement supérieures à celles relevées dans les témoins.

En réponse à l'isolat *P. parasitica* (PAR 44), seule la variété Xanthi nc réagit par une augmentation notable de PR 1a. Cette teneur passe de 0,03 $\mu\text{g/gMF}$ dans les plants témoins non décapités à 8 $\mu\text{g/gMF}$ à J1 dans la seconde feuille. Les 3 autres génotypes ne réagissent pas à l'inoculation de cet isolat incompatible, qui ne provoque pas de nécrose à distance. Leur taux constitutif de PR 1a plus élevé peut masquer la réponse à cet isolat.

Incompatibilité spécifique (tableau IV)

Cette incompatibilité R1/*Ppn* race r0 intervient entre la lignée 46-8 (R1) et l'isolat NIC 183 de

race physiologique r0 incapable d'envahir la tige décapitée. On n'a pas décelé d'accumulation notable de PR 1a, dans les feuilles de la lignée 46-8 âgée de 73 ou 80 j inoculée par l'isolat NIC 183 race r0. Mais elle serait peut-être décelable dans les tissus de la tige plus proche du site d'interaction.

Interactions compatibles (tableau V)

Dans les interactions compatibles avec les isolats non producteurs d'élicitine NIC 181 et NIC 183, l'envahissement successif des pétioles des feuilles 1 et 2 entre J4 et J7, qui provoque le flétrissement du limbe foliaire, est marqué par une accumulation brutale de PR 1a à J4 dans la première feuille, à J7 dans la seconde feuille.

La cinétique d'accumulation est identique dans les 4 génotypes. À J7, dans la première feuille des 4 génotypes inoculés par NIC 181, on a relevé respectivement (tableau V): 108 $\mu\text{g/g MF}$ pour Xanthi nc, 711 $\mu\text{g/gMF}$ pour Escambray, 403 $\mu\text{g/gMF}$ et 261 $\mu\text{g/gMF}$ pour 49-10 et 46-8 inoculés par l'isolat 181. Les résultats sont comparables pour l'isolat NIC 183. Dans la seconde feuille, l'amplitude de l'accumulation est

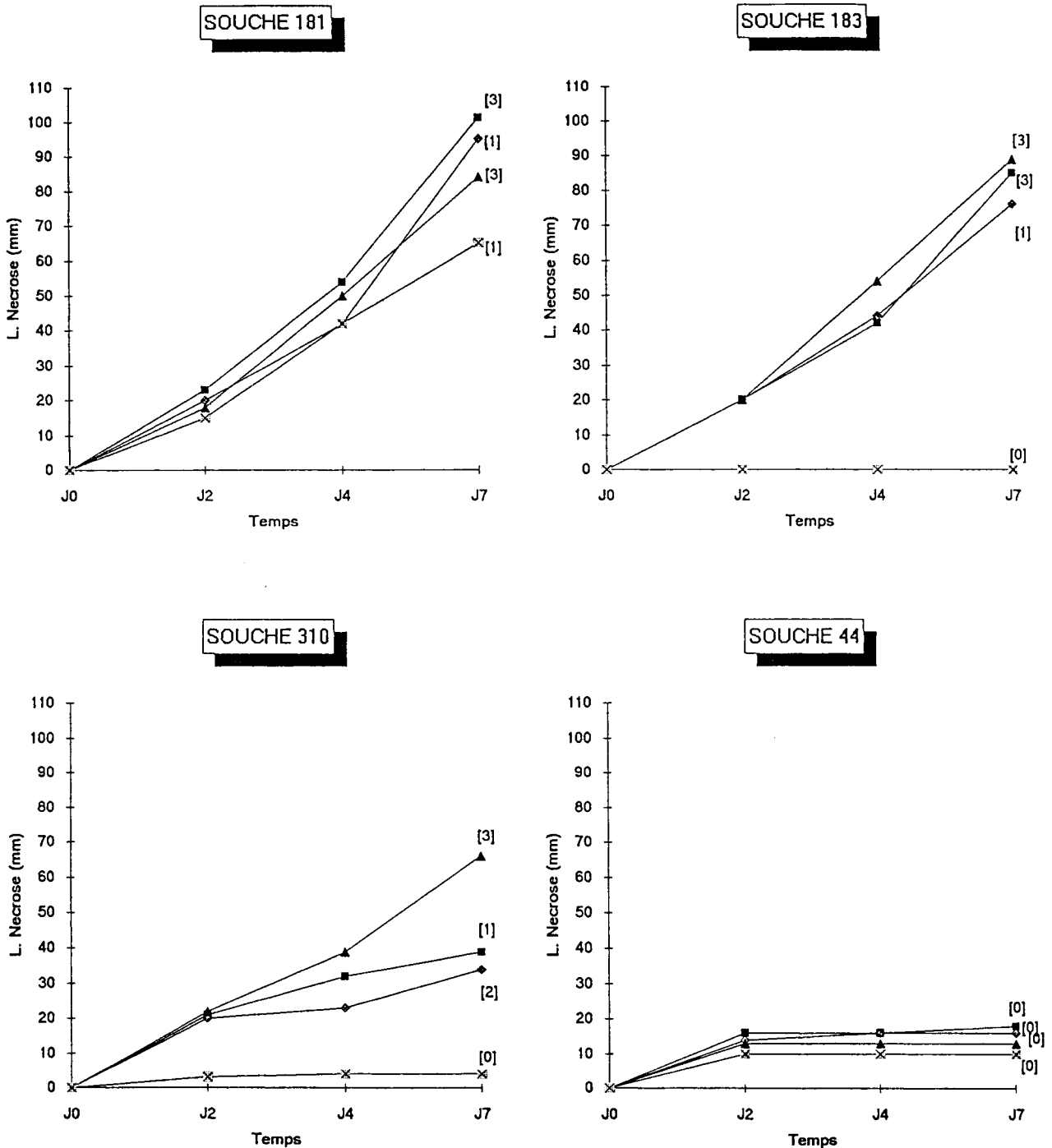


Fig 2. Envahissement caulinaire (en mm) en fonction du temps, des 4 génotypes de tabac : Xanthi nc ---■---; Escambray ---◆---; 49-10 ---▲---; 46-8 ---✱---; inoculés par les isolats compatibles; NIC 183, NIC 181, NIC 310 et incompatible : PAR 44. [x] = nombre de pétioles envahis à J7.

plus variable selon les génotypes et les essais considérés.

Comportement de l'isolat NIC 310

Cet isolat de *black-shank* peu agressif (fig 2) produit de la parasiticéine. Dans la figure 3, nous avons tracé les courbes d'accumulation de la PR

1a dans la première feuille de tabac var Xanthi nc, après inoculation par NIC 181, NIC 310 et PAR 44. Dans l'interaction incompatible avec PAR 44, on note un pic d'accumulation 2,6 µg/gMF à J1. La teneur diminue entre J2 et J4 pour augmenter à nouveau à J7.

Dans l'interaction compatible avec NIC 181, l'induction plus tardive à J4 marque le début du

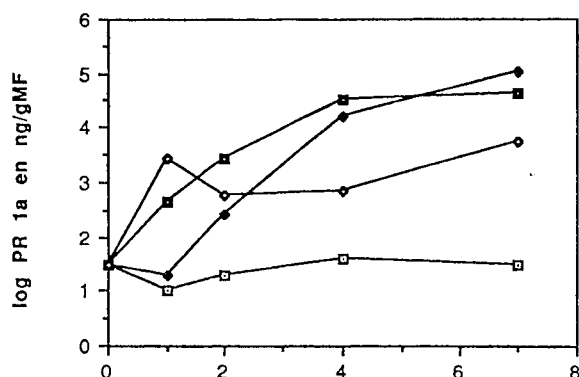


Fig 3. Cinétique d'accumulation de PR 1a dans la première feuille (F1) de Xanthi nc, inoculé par les isolats compatibles NIC 181 (E-) ---◆---, NIC 310 (E+) ---■--- et la souche incompatible PAR 44 (E+) ---◇---; témoin ---□---; valeur de PR 1a en échelle logarithmique.

flétrissement du limbe foliaire. La teneur s'élève à 4 µg/gMF à J4, 21 µg/gMF à J7. Avec l'isolat compatible NIC 310 producteur d'éclicitine, la teneur s'élève déjà à 2,6 µg/gMF, pour atteindre 33 µg/gMF à J4 et 45 µg/gMF à J7.

DISCUSSION

Teneur en PR 1a des tabacs sains avant et après la décapitation (tableau II)

Les feuilles de tabacs sains de la variété Xanthi nc renferment entre 0,01 µg/gMF et 0,37 µg/gMF de PR 1a : ces valeurs sont de l'ordre de celles citées dans la littérature (Abad *et al*, 1988, 1989). Les quantités dosées dans la variété Escambray sont nettement plus élevées : ces génotypes peuvent contenir de la PR 1a à l'état constitutif comme certains hybrides interspécifiques cités par Ahl et Gianinazzi, en 1982, ou bien leur stade physiologique, dans nos conditions d'essais, pouvait être différent de celui de

la variété Xanthi nc. On sait que des protéines PR sont synthétisées au moment de la floraison chez les tabacs sains Xanthi nc (Fraser, 1981) : le décalage de précocité entre les 4 génotypes pourrait expliquer les différences observées.

L'effet «décapitation» n'entraîne pas, semble-t-il, de modification nette et importante dans le temps, de la teneur en PR 1a, si ce n'est tardivement à J7, dans la seconde feuille de la lignée 46-8. Van Loon (1983) rapporte qu'une blessure ne modifie pas cette teneur. L'accumulation tardive dans la lignée 46-8 pourrait peut-être marquer la reprise du bourgeonnement axillaire sur les plants décapités, quand on sait que les plants *in vitro* de Xanthi nc, ou Samsun, dont le bourgeonnement axillaire est stimulé par des cytokinines, en renferment des quantités élevées (Poupet *et al*, 1990).

Expression de la résistance et accumulation de PR 1a

Pour Kassanis (1981), l'accumulation des protéines PR est associée à l'état de résistance; pour Gianinazzi (1984), elles marquent l'hyper-sensibilité et la résistance acquise. D'après nos résultats, leur rôle n'apparaît pas aussi clairement. Leur teneur dans les tabacs sains n'est pas corrélée au niveau de résistance non-spécifique : ainsi, la variété Xanthi nc et la lignée 49-10, qui ont un même niveau de sensibilité aux différents isolats de *Ppn*, ont des teneurs en PR 1a qui varient dans un rapport de 1 à 100.

Dans les interactions compatibles, l'envahissement du pétiole pour les 4 génotypes déclenche leur accumulation (tableau V). Pour De Witt et Bakker (1980) dans le couple tomate/*Cladosporium fulvum*, la synthèse de protéines solubles, analogues aux protéines PR du tabac, accompagnerait le passage du champignon de la

Tableau IV. Accumulation de PR 1a en µg/gMF dans l'interaction d'incompatibilité spécifique génotype R1/race r0.

Variétés	Âges des plants (en j)	Niveaux feuilles	Isolat	Teneur en PR 1a (µg/gMF)				
				J0	J1	J2	J4	J7
46-8	73	1		0,01	0,3	0,6	6,3	8
		2	183	0,27	0,4	0,3	5	4
	80	1		3,6	9	15	4	20
		2		16	11	9	20	30

Tableau V. Accumulation de PR 1a en $\mu\text{g/gMF}$ dans la première feuille (F1) et la deuxième feuille (F2) dans les interactions compatibles.

Variétés	Âges des plants (en j)	Niveau de feuilles	Isolats	Teneur en PR 1a ($\mu\text{g/gMF}$)				
				J0	J1	J2	J4	J7
Xanthi nc	60	1	181	0,03	0,02	0,2	16	108
				0,01	0,03	0,1	3	43
		2	183	0,03	0,1	0,1	4	21
				0,01	0,06	0,4	0,02	18
Escambray	60	1	181	7	24	18	273	711
				22	31	11	23	24
		2	183	7	4	18	66	260
				22	7	4	17	19
49-10	73	1	181	0,8	4,6	1	44	403
				1	1,6	3,4	49	436
		2	183	0,8	1,7	14	32	373
				1	1,1	2	11	472
46-8	73	1	181	0,01	0,08	0,3	29	261
				0,27	0,04	0,9	0,4	29
	80	1	181	3,6	2,6	5	56	403
				16,3	10	6	11	42

biotrophie à la nécrotrophie. Chez le tabac, on a pu observer que les PR sont associées aux situations de stress (Hogue *et al.*, 1987), ou induites par la plasmolyse (Wagih et Coutts, 1981) : le flétrissement du limbe peut être assimilé à un stress.

La résistance spécifique de l'interaction 46-8 (R1)/NIC 183 race r0 n'entraîne aucun processus d'accumulation dans les feuilles 1 ou 2 (tableau IV) : cela peut s'expliquer par le fait que l'interface hôte-parasite est limité à un très faible nombre de cellules sans réaction nécrotique systémique visible.

Leur accumulation dans les interactions d'«incompatibilité générale» est plus complexe à interpréter : en effet, elle varie avec le génotype de la plante-hôte et avec la souche incompatible, selon qu'elle est nécosante ou non nécosante. Dans la variété Xanthi nc, la souche PAR 44 induit dès J1 l'accumulation de PR 1a en l'absence de symptôme nécrotique visible (tableau III); les élicites déclencheraient une accumulation précoce et directe de PR 1a du type de celle obtenue avec certains inducteurs chimiques (Asselin *et al.*, 1985 ; Abad *et al.*, 1989). Les 3 génotypes Escambray, 49-10, 46-8 ne répondent pas à cette induction. Leur absence de réactivité à la parasitocine pourrait être expliquée par le bruit de fond dû au taux non négligeable de PR à l'état constitutif. Cependant, dans les lignées 49-10 et

46-8, inocuées par CRY 52 très nécosante, le taux de PR 1a s'est accrue fortement dès J4 (tableau III) ; cette accumulation plus tardive serait étroitement associée au phénomène nécrotique déjà décrit par Bonnet *et al.* (1986).

Dans les interactions tabac-*Phytophthora* étudiées, l'accumulation de PR 1a aurait plusieurs modes d'induction : précoce, dès J1, en réponse à l'élicite, plus tardif à J4, marquant soit l'envahissement des tissus dans les interactions compatibles, soit les nécroses à distance de l'incompatibilité générale. L'analyse comparée des cinétiques d'accumulation dans la variété Xanthi nc inocuée par NIC 181, non productrice d'élicite (E-) ou NIC 310 et PAR 44 productrices (E+), répond à ce schéma (fig 3). Avec les 2 isolats (E+), le taux s'élève dès J1, il cesse d'augmenter avec l'isolat incompatible PAR 44 qui n'envahit pas la tige. Avec l'isolat compatible NIC 310 qui colonise le pétiole, il continue de croître. Avec l'isolat compatible NIC 181 (E-), l'augmentation plus tardive de PR 1a marque seulement l'envahissement du pétiole.

Toute réaction nécrotique à distance ou envahissement des limbes foliaires s'accompagnent d'une augmentation de PR 1a, mais nous n'avons pu mettre en évidence de relation directe entre la résistance et la synthèse de PR 1a.

RÉFÉRENCES

- Abad P (1986) Aspects moléculaires des mécanismes de résistance chez *Nicotiana tabacum* en réponse à des agressions induites par des agents pathogènes ou abiotiques. Thèse de doctorat sciences, université Paris Sud, Orsay, 140 p
- Abad P, Marais A, Cardin L, Poupet A, Ponchet M (1988) The effect of benzoic acid derivatives on *Nicotiana tabacum* growth in relation to PR-b1 production. *Antiviral Res* 9, 315-327
- Abad P, Cardin L, Poupet A, Ponchet M (1989) Comparison of pathogenesis related «b1» protein determination obtained by Elisa and HPLC techniques. *J Phytopathol* 124, 175-188
- Ahl P, Gianinazzi S (1982) b protein as a constitutive component in highly (TMV) resistant interspecific hybrids of *Nicotiana glutinosa* x *Nicotina debneyi*. *Plant Sci Lett* 26, 173-181
- Asselin A, Grenier J, Cote F (1985) Light influenced extracellular accumulation of b (pathogenesis-related) proteins in *Nicotiana* green tissue induced by various chemicals or prolonged floating on water. *Can J Bot* 63, 1276-1283
- Bonnet P, 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, 829-837
- Cardin L, Salle D, Poupet A, Ponchet M (1983) Dosage immunoenzymatique du virus de la mosaïque du tabac dans différents tissus cultivés *in vitro*. *agronomie* 3, 983-988
- De Witt PJ, Bakker J (1980) Differential changes in soluble tomato leaf proteins after inoculation with virulent and avirulent race of *Cladosporium fulvum* (syn *Fulvia fulva*). *Physiol Plant Pathol* 17, 121-130
- Fraser RS (1981) Evidence for the occurrence of the «pathogenesis-related» proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. *Physiol Plant Pathol* 19, 69-76
- Gianinazzi S (1984) Genetic and molecular aspects of resistance induced by infection or chemicals. *In: Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspective* (Kosuge T, Nester EW, eds) Macmillan Publishing Co, New York, 321-352
- Heath MC (1981) A generalized concept of host parasite specificity. *Phytopathology* 71, 1121-1123
- Helgeson JP, Haberlandt GT, Upper CD (1976) A dominant gene conferring disease resistance to tobacco plants expressed in tissue cultures. *Phytopathology* 66, 91-96
- Hogue R, Asselin A (1987) Detection of 10 additional pathogenesis related (b) proteins in intracellular fluid extracts from stressed *Xanthi nc* tobacco leaf tissue. *Can J Bot* 65, 476-481
- Kassanis B (1981) Some speculations on the nature of the natural defense mechanism of plants against virus infection. *Phytopathol Z* 102, 277-291
- Kauffmann S (1988) Les protéines PR (pathogenesis-related) du tabac. Des protéines impliquées dans les réactions de défense aux agents phytopathogènes. Isolement, propriétés sérologiques et activités biologiques. Thèse doctorat biologie moléculaire, université Louis-Pasteur, Strasbourg I, 85 p
- Poupet A, Cardin L, Bettachini B, Beck D (1990) Accumulation de protéines solubles (PR 1a protéine) dans des bourgeons de *Nicotiana tabacum* cultivés *in vitro* en présence de cytokinine. *CR Acad Sci Sér III* 311, 239-146
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* 183, 55-563
- Stintzi A, Heitz T, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1990) Protéines de défense du tabac. 2^e congrès de la Société française de phytopathologie, Strasbourg, 1 p
- Van Loon LC (1983) Mechanisms of resistance in virus-infected plants. *In: The Dynamics of Host Defense* (Bailey JA, Deverall BJ, eds) Academic Press, Sydney, Australia, 123-190
- Wagih EE, Coutts RH (1983) Similarities in the soluble protein profiles of leaf tissue following either a hypersensitive reaction to virus infection or plasmolysis. *Plant Sci Lett* 21, 61-69