

## EVOLUTION DES ACIDES AMINES LIBRES ET DES AMIDES AU COURS DE L'INFECTION DU MELON PAR *COLLETOTRICHUM LAGENARIUM* (PASS.) ELL. ET HALST. (ANTHRACNOSE)

A. TOUZÉ

Centre de Physiologie végétale, Faculté des Sciences, Toulouse, France

(Received 27 April 1963)

**Résumé**—Quelques répercussions physiologiques de l'antracnose sur le métabolisme azoté d'une variété d'hôte susceptible: le Melon Cantaloup charentais, sont rapportées. Les teneurs en azote aminé étant fortement accrues dans les plantes parasitées, une étude systématique, au cours de l'infection, des acides aminés libres et des amides a été effectuée à l'amino acid analyzer Beckman; elle montre que cette fraction subit un remaniement profond. Les variations les plus marquées intéressent la citrulline, les acides aminés dicarboxyliques et les amides.

**Abstract**—Some physiological repercussions of anthracnose infection on the nitrogen metabolism of a susceptible host (*Cucumis melo* L., var. Cantaloup charentais) are reported. The amino nitrogen content was increased in the infected plants, and a systematic study of amino acids and amides at different stages of infection showed that this fraction is greatly modified: citrulline and the amides accumulated in the diseased plants, whereas the dicarboxylic acid content was lower than in comparable healthy tissues.

### INTRODUCTION

L'ANTHRACNOSE est une infection parasitaire commune à de nombreuses Cucurbitacées. Cette maladie, causée par un champignon imparfait *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. et Halst., affecte les feuilles, les tiges et les fruits. La prospection biochimique des causes de la résistance à cette maladie a été récemment abordée par Hadwiger et Hall.<sup>1</sup> Par contre, bien que la gravité et l'importance des symptômes présentés par les plantes malades laissent supposer des répercussions physiologiques profondes, peu de données sont acquises, à ce jour, sur les déviations du métabolisme normal de la plante au cours de la pathogénèse. Le Melon (*Cucumis melo* L.) ayant été retenu pour l'expérimentation, les résultats présentés ci-après concernent l'évolution des acides aminés libres dans la plante saine et dans le complexe hôte-parasite, depuis l'inoculation jusqu'à un stade avancé de l'infection.

### RESULTATS

Dans un travail antérieur<sup>2</sup> j'ai montré que les fractions aminée et amidée des tissus atteints d'antracnose pris au moment où la maladie a terminé son évolution, sont le siège de transformations profondes; une étude dynamique des changements induits, par le parasite, en ce domaine, complète ces résultats.

<sup>1</sup> L. A. HADWIGER et C. V. HALL, *Plant disease Repr.* **45**, 373 (1961).

<sup>2</sup> A. TOUZÉ, *Compt. rend. acad. sci. France*, **254**, 920 (1962).

Dans le Tableau 1 sont rapportées les variations des teneurs globales en azote aminé, au cours du développement du processus pathologique dans les parties épicotylées de Melon présentant trois feuilles.

TABLEAU 1. EVOLUTION DES TENEURS EN AZOTE AMINÉ AU COURS DU PROCESSUS D'INFECTION

Temps d'infection, jours	0	2	4	6	8
Nature de l'échantillon	μmol dans 100 organes				
Sain	765	1259	798	816	1021
Parasité		1082	940	1874	2500
Parasité Sain		0,86	1,18	2,30	2,45

La détermination des différents acides aminés de ces mêmes organes montre que l'installation du parasite dans la plante hôte se traduit par des fluctuations quantitatives des composés présents et ne s'accompagne pas, apparemment, de modifications qualitatives. A des degrés divers, tous les constituants sont affectés, aussi je n'envisagerai ici que les résultats les plus significatifs; ils concernent: la citrulline, les amides, les acides aminés dicarboxyliques.

TABLEAU 2. TENEURS EN CITRULLINE AUX DIFFÉRENTS STADES DE L'INFECTION

Temps d'infection, jours	0	2	4	6	8
Nature de l'échantillon	% de l'azote aminé de 100 organes				
Sain	4,9	6,6	5,1	4,2	5,7
Parasité		9,9	7,2	13,8	20,0

TABLEAU 3. TENEURS EN AMIDES\* AUX DIFFÉRENTS STADES DE L'INFECTION

Temps d'infection, jours	0	2	4	6	8
Nature de l'échantillon	% de azote aminé de 100 organes				
Sain	9,6	15,2	13,2	14,8	12,4
Parasité		14,6	12,3	19,5	17,3

\* Les amides sont dosées globalement et exprimées en équivalent asparagine.

TABLEAU 4. TENEURS EN ACIDES AMINÉS DICARBOXYLIQUES AUX DIFFÉRENTS STADES DE L'INFECTION

Temps d'infection, jours	0	2	4	6	8
% de l'azote aminé de 100 organes					
Ac. aspartique					
Sain	5,4	5,8	5,6	6,5	8,8
Parasité		6,6	5,4	4,2	2,5
Ac. glutamique					
Sain	8,4	9,8	9,1	9,4	12,1
Parasité		8,2	7,4	6,8	4,4

## DISCUSSION

Le métabolisme de l'hôte et du complexe hôte-parasite dépendant fortement du milieu environnant, l'expérimentation a été conduite dans des conditions parfaitement contrôlées; une attention spéciale a été portée à l'état des tissus de l'hôte et à l'uniformité de l'infection. Les résultats sont exprimés pour 100 organes; en effet, comme les rendements en matière sèche des plantes saines et malades sont très différents, il est plus rigoureux de rapporter à un nombre fixe d'échantillons plutôt qu'à une unité de substance sèche.

L'examen du Tableau 1 fait apparaître une augmentation progressive des teneurs en azote soluble au fur et à mesure que l'infection se développe; ce fait semble s'expliquer par un ralentissement de la synthèse protéique, car dans la plante saine l'azote protéique augmente régulièrement avec la croissance, alors que dans la plante malade cette fraction reste pratiquement constante à partir du moment où le parasite s'installe.

Au deuxième jour de l'infection, les quantités d'acides aminés dosés présentent une nette augmentation; ce fait peut s'expliquer par le séjour des plantules à l'obscurité pendant 24 hr. Cette période initiale obscure est nécessaire pour le succès de l'infection, car la germination des spores est liée à la présence de gouttelettes d'eau. Après pulvérisation de la suspension conidienne sur les plantules, un éclairage immédiat entraîne l'évaporation du milieu aqueux de dispersion, et un état hygrométrique même très élevé est insuffisant pour assurer la contamination.

Les teneurs en citrulline augmentent progressivement en fonction du temps d'infection; la diminution de la synthèse protéique ne peut expliquer ce fait, car cet amino-acide n'a pu être mis en évidence dans les protéines du Melon; le métabolisme de ce composé, découvert par Wada en 1930<sup>3</sup> semble donc particulièrement influencé par l'installation de l'agent pathogène. L'existence d'un rapport avec la spécificité parasitaire du champignon peut être envisagée, et une investigation dans ce sens paraît justifiée.

Enfin, alors que les amides dosées globalement sont toujours en quantités supérieures dans les plantes malades, on peut constater que les acides aminés dicarboxyliques diminuent. La diminution de ces constituants est-elle liée à une utilisation préférentielle par le parasite, ou s'agit-il d'une orientation différente du métabolisme de l'azote sous l'action du champignon? Une étude des besoins nutritifs de l'agent parasitaire, ainsi que des systèmes

<sup>3</sup> M. WADA, *Biochem. Z.* 224, 420 (1930).

enzymatiques impliqués dans le métabolisme de ces composés, actuellement en cours, devrait permettre d'expliquer ces faits.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### Culture de l'Hoste

Les plantules de Melon (*Cucumis melo* L., variété Cantaloup charentais), sont obtenues en "culture sans sol".<sup>4</sup> La vermiculite préalablement lavée et stérilisée sert de support; une solution de Hoagland<sup>5</sup> est retenue comme milieu nutritif. Les cultures sont effectuées dans une salle conditionnée éclairée artificiellement par des tubes fluorescents type "lumière du jour de luxe"; l'éclairement au niveau des plantules est de 6000 lux. La photopériode a été fixée à 14 hr, l'hygrométrie à 55 pour cent et la température à 22°; pendant la phase obscure la température s'abaisse à 20°, l'hygrométrie est alors de 75 pour cent. Dans ces conditions, le stade "trois feuilles" des plantules est atteint après 30 jours.

### Isolation et Culture du Parasite

Les souches de *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. et Halst., proviennent de cultures monospores du champignon recueilli sur des fruits de Melon atteints d'anthracnose. L'isolement des spores est réalisé au micromanipulateur de de Fontbrune.<sup>6</sup> Le parasite est maintenu en culture à l'étuve obscure, sur un milieu naturel gélosé<sup>7</sup>; par incubation à 24° il sporule abondamment en moins de 15 jours.

### Conditions D'Infection

L'infection est réalisée par pulvérisation sur les parties aériennes des plantules, hors de la salle de culture, d'une suspension de spores dans l'eau distillée (2 millions de spores/ml). Lorsque les plantules sont abondamment mouillées par cette suspension conidienne, elles sont replacées dans la salle de culture. Celle-ci est alors maintenue obscure à 25°, et à saturation en humidité pendant 24 hr. Les conditions d'éclairement et d'hygrométrie ci-dessus décrites sont ensuite rétablies.

### Extraction de la Fraction Azotée Soluble

Les acides aminés libres et les amides sont dosés sur cette fraction, obtenue à froid, après précipitation des protéines par l'acide trichloracétique.

*Mode opératoire.* A 400 mg de poudre végétale sèche (dessiccation sous vide en présence de chlorure de calcium) contenus dans un tube à centrifuger, on ajoute goutte à goutte 10 ml d'eau distillée glacée, et on place le tube dans le mélange réfrigérant glace-eau, sur un agitateur magnétique. La rotation d'un barreau aimanté déposé dans le tube à centrifuger permet d'obtenir une suspension homogène et facilite le contact intime de la poudre avec le milieu aqueux d'extraction. Après 15 min d'agitation, on défèque le milieu par 10 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 10% dans l'eau et on abandonne 12 hr au frigidaire. Par centrifugation, on procède alors à la séparation des fractions azote protéique (culot) et azote soluble (surnageant). Cette dernière est recueillie quantitativement après filtration, dans une fiole jaugée de 50 ml; on y ajoute les 10 ml de la solution d'acide trichloracétique à 2,5% utilisés en deux fois pour le lavage du culot et les 5 ml d'eau d'un dernier rinçage. L'extrait est amené

<sup>4</sup> P. CHOUARD, *Cultures sans sol*. La Maison rustique. Paris. (1952).

<sup>5</sup> In A. DEMOLON, *Principes d'agronomie II. Croissance des végétaux cultivés*. Dunod, Paris (1956).

<sup>6</sup> P. DE FONTBRUNE, *Technique de micromanipulation*. Masson & Cie, Paris (1949).

<sup>7</sup> M. J. GOODE, *Phytopathology* **48**, 79 (1958).

finalement à un volume de 50 ml avec de l'eau distillée; sa concentration en acide trichloracétique est de 2,5%.

*Technique chromatographique.* Les acides aminés libres et les amides sont déterminés à l'amino acid analyzer Beckman.<sup>8</sup> Pour l'analyse, 4 ml de la solution suivante: — 4 ml du filtrat trichloracétique ci-dessus décrit — Compléter à 10 ml avec le tampon de dilution (Acide citrique—NaOH, 0,2 N, pH 2,2) sont fixés sur chaque colonne de résines échangeuses d'ions.

<sup>8</sup> D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN et S. MOORE, *Anal. Chem.* 30, 1190 (1958).