



**HAL**  
open science

## Isolement, composition et activité élicitrice chez l'oeillet de fractions extraites de la paroi de *Phytophthora* *parasitica* Dastur

Isabelle Fabre, Maud Bruneteau, Pierre Ricci, Georges Michel

### ► To cite this version:

Isabelle Fabre, Maud Bruneteau, Pierre Ricci, Georges Michel. Isolement, composition et activité élicitrice chez l'oeillet de fractions extraites de la paroi de *Phytophthora parasitica* Dastur. *Agronomie*, 1986, 6 (1), pp.35-45. hal-00884846

**HAL Id: hal-00884846**

**<https://hal.science/hal-00884846>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Isolement, composition et activité élicitrice chez l'œillet de fractions extraites de la paroi de *Phytophthora parasitica* Dastur.

Isabelle FABRE, Maud BRUNETEAU, Pierre RICCI (\*) & Georges MICHEL

Laboratoire de Biochimie microbienne, Université Lyon I, 43, bd du 11 Novembre 1918, F 69622 Villeurbanne (\*) I.N.R.A., Station de Pathologie végétale, Villa Thuret, B.P. 2078, F 06606 Antibes Cedex

## RÉSUMÉ

Divers traitements de la paroi du champignon phytopathogène *Phytophthora parasitica* fournissent des extraits hydrosolubles capables d'éliciter chez l'œillet l'accumulation de phytoalexines dérivées de l'acide N-benzoylanthranilique : la dianthalexine et la dianthramide A. L'extrait S1 obtenu par autoclavage de la paroi dans l'eau est quantitativement le plus actif. Il contient des protéines (54 p. 100), des polysaccharides et des traces de lipides.

Les lipides de S1 sont représentés par des acides gras libres et des acides gras estérifiés, ces derniers contenant une forte proportion d'acides insaturés en C<sub>20</sub>. Ils sont dépourvus d'activité élicitrice chez l'œillet (ainsi que les lipides directement extraits de la paroi).

La chromatographie d'échange anionique permet de séparer S1 en une fraction non liée (A) et une fraction retenue (B). Des β-D-glucanes, composants majoritaires de A, ont été purifiés. Le composé de plus faible masse moléculaire a un faible pouvoir éliciteur, les autres aucun.

La fraction la plus élicitrice (B) est composée de protéines et de polysaccharides contenant une forte proportion de mannose. Son activité, comme celle de l'extrait S1, est détruite par action de la pronase et par oxydation périodique, ce qui incite à penser que le principe éliciteur pourrait être de nature glycoprotéique.

**Mots clés additionnels :** Dianthus, phytoalexines.

## SUMMARY

*Isolation, composition and eliciting activity on carnation of fractions extracted from the cell walls of Phytophthora parasitica Dastur.*

Water-soluble extracts were released from the cell walls of the phytopathogenic fungus *Phytophthora parasitica* by various treatments. Applied to carnation cuttings, they elicited the accumulation of phytoalexins : the N-benzoylanthranilic derivatives, dianthalexin and dianthramide A. Extract S1, obtained by hot water treatment of the cell walls, had the highest specific activity. It contained proteins (54 %), polysaccharides and trace amounts of lipids. The lipids in S1 were represented by free and esterified fatty acids and, among the latter, a high proportion of unsaturated C<sub>20</sub> acids. They were devoid of eliciting ability on carnation (as well as the lipids directly extracted from the cell walls). Using anion exchange chromatography, S1 was separated into fractions A (non retained) and B (retained). β-D-glucans were the major components of A and were purified. The glucan of lowest molecular weight faintly elicited carnation ; the others did not. Fraction B had the greatest eliciting activity and was composed of proteins and polysaccharides containing a high proportion of mannose. Its activity, as well as that of extract S1, was destroyed by pronase and by periodate oxidation. Thus, the eliciting factor could be a glycoprotein.

**Additional key words :** Dianthus, phytoalexins.

## I. INTRODUCTION

L'infection d'une plante par un champignon parasite s'accompagne généralement de modifications histologiques et biochimiques pouvant aboutir à induire localement un état de résistance (HEITFUSS, 1982).

En 1972, KEEN *et al.* appellent éliciteurs les substances produites par le champignon et responsables de ce phénomène d'induction de résistance. Nous nous sommes proposé l'étude de la nature et de l'activité des éliciteurs de *Phytophthora parasitica* Dastur vis-à-vis de l'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.).

*P. parasitica* est un agent pathogène de l'œillet qui se conserve dans le sol et provoque une pourriture du collet sur les boutures récemment plantées (TRAMIER & MERCIER, 1965). LUCAS & PONCHET observent en 1974 qu'on peut protéger des boutures d'œillet contre *P. parasitica* par un pré-trempe de 24 h dans un milieu de germination de zoospores du même champignon. RICCI & JACQUEMOND (1978) montrent que le principe éliciteur de résistance contenu dans le milieu de germination résiste à la dialyse et à la chaleur (3 h à 120 °C) et que la même activité se retrouve dans le filtrat de culture du champignon et dans une préparation soluble obtenue par autoclavage de la paroi mycélienne. Des trois préparations élicitrices, cette dernière a la plus forte activité spécifique. Il semble donc qu'on puisse caractériser dans l'extrait de paroi un éliciteur de résistance.

Parallèlement, RICCI & JACQUEMOND (1978) montrent que l'induction de résistance chez les boutures s'accompagne toujours de l'apparition de composés antifongiques. Deux d'entre eux sont maintenant caractérisés : le dianthalexine (BOUILLANT *et al.*, 1983) et la dianthramide A (PONCHET *et al.*, 1984) ; leurs structures sont rappelées sur la figure 1. La quantité de ces phytoalexines accumulées après une élicitation est directement corrélée au degré de résistance acquise par les boutures vis-à-vis de *P. parasitica* (RICCI, en préparation). En outre, l'addition à l'éliciteur d'acide salicylique inhibe simultanément l'apparition des phytoalexines et l'induction de résistance (PONCHET *et al.*, 1983). Il semble donc bien qu'on puisse attribuer à ces molécules un rôle essentiel dans l'état de résistance acquis par les tissus élicités. Aussi est-il justifié de prendre comme critère de pouvoir éliciteur l'aptitude à induire la dianthalexine et la dianthramide A chez les boutures d'œillet.

Les données de la littérature concernant la nature des éliciteurs extraits de *Phytophthora* spp. sont limitées. Elles indiquent qu'il peut s'agir, selon les couples hôte-parasite considérés, de polysaccharides (ALBERSHEIM & VALENT, 1978), de glycoconjugués (KEEN & LEGRAND, 1980 ; KEEN *et al.*, 1983) ou de lipides

(KURANTZ & OSMAN, 1983). Dans aucune situation cependant n'a été présentée une comparaison systématique de l'activité élicitrice de ces différents types de fractions, obtenues à partir d'un même mycélium. C'est cette approche que nous avons utilisée, en nous inspirant des auteurs précités pour le choix des méthodes de fractionnement, afin de faciliter les comparaisons. La figure 2 présente les différentes fractions étudiées.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. Traitements de la paroi mycélienne

#### 1. Préparation

La souche 26 de *P. parasitica* (isolée d'œillet) est cultivée en milieu liquide comme indiqué précédemment (FABRE *et al.*, 1984). Des lots de 40 g de mycélium congelé (correspondant à environ 10 g de poids sec) sont broyés pendant 5 mn à l'Ultraturrax à 0 °C dans 125 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7. Après filtration sous vide, le résidu est lavé par agitation pendant 15 mn dans 800 ml du même tampon, puis par le même volume du tampon à 0,5 M, 2 fois par l'eau distillée et enfin 2 fois par l'éther. La paroi brute ainsi obtenue est séchée à l'air.

#### 2. Délipidation

La paroi brute est délipidée par homogénéisation à l'Ultraturrax dans le mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v) ou, dans certains cas, par lavage avec le mélange chloroforme-méthanol (1 : 1, v/v).

Le résidu, séparé du filtrat de délipidation (L) est traité par l'acétone (lavage ou broyage). Après filtration, le résidu est lyophilisé. Il représente la paroi délipidée (R).

#### 3. Autoclavage

La paroi (R) est soumise à un autoclavage dans l'eau (AYERS *et al.*, 1976) ou en milieu tamponné (RASCHKE & BALLOU, 1972).

Dans le 1<sup>er</sup> cas, 3 à 5 g de paroi mis en suspension dans 300 à 500 ml d'eau distillée sont autoclavés 3 h à 120 °C, puis centrifugés pendant 20 mn à 3 000 g. Le culot est lavé par l'eau. Les surnageants sont réunis et filtrés sur Millipore (0,22 µm). Le filtrat concentré sous vide, dialysé puis lyophilisé, constitue l'extrait S1.

Dans le 2<sup>e</sup> cas, 100 mg de paroi en suspension dans 5 ml de tampon citrate de sodium 0,02 M pH 7 sont autoclavés 2 h à 120 °C. Après centrifugation 10 mn à 5 000 g, le surnageant, dialysé, concentré et lyophilisé, représente l'extrait S2.

#### 4. Traitement acide (HAHN *et al.*, 1981)

100 mg de paroi (R) sont hydrolysés par 6 ml d'acide trifluoroacétique 2 N pendant 1 h à 85 °C. L'hydrolysat est centrifugé à 5 000 g. Le surnageant, évaporé sous vide, remis en suspension dans le méthanol et évaporé jusqu'à neutralisation, est repris par l'eau et lyophilisé. Il représente l'extrait S3.

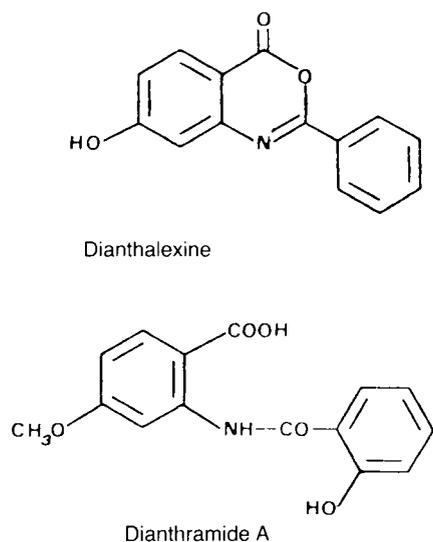


Figure 1

Formule chimique des phytoalexines de l'œillet.  
Chemical formulae of carnation phytoalexins.

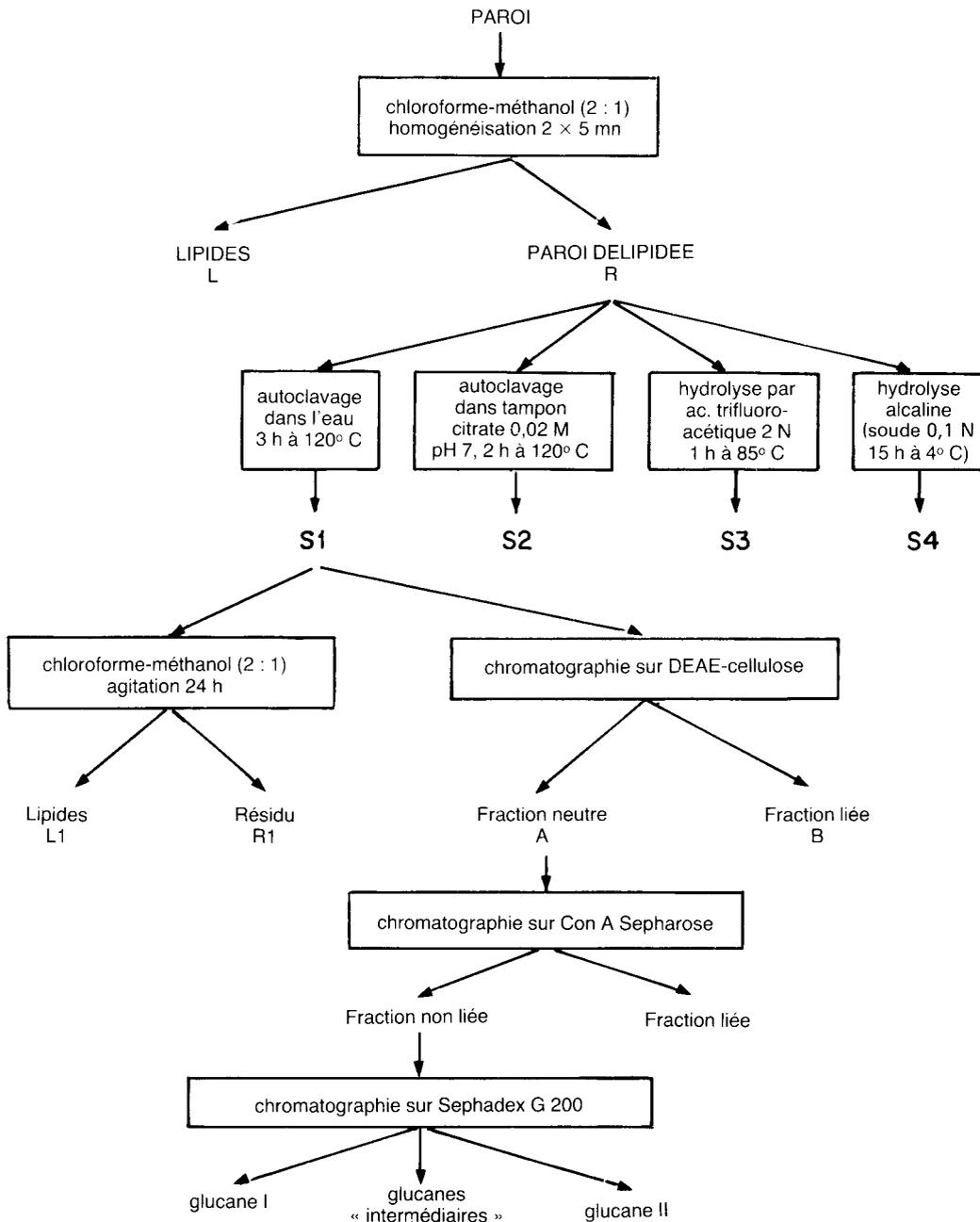


Figure 2

Schéma d'obtention des différents extraits de la paroi mycélienne de *Phytophthora parasitica* et de leurs fractions.

Preparation of the various extracts from the mycelial walls of *Phytophthora parasitica* and of their fractions.

### 5. Traitement alcalin (KEEN & LEGRAND, 1980)

100 mg de paroi (R) sont traités par 6 ml de soude 0,1 N. Après agitation pendant 15 h en chambre froide, le milieu réactionnel est centrifugé pendant 10 mn à 5 000 g. Le culot est lavé à l'eau à 0 °C. Les surnageants sont réunis, ajustés à pH 7 avec HCl N, dialysés puis lyophilisés. Ils représentent la fraction S4.

## B. Traitements de l'extrait S1

### 1. Extraction des fractions lipidiques

15 mg de S1 sont mis en suspension dans 9 ml du mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v) et agités 24 h à température ambiante. Le milieu réactionnel

est centrifugé 10 mn à 5 000 g. Le culot (R1) est lavé avec le même solvant. Les surnageants lipidiques (L1) sont réunis et séchés sur sulfate de sodium. Après filtration sur papier, ils sont évaporés à sec sous courant d'azote.

### 2. Fractionnement par chromatographie d'échange anionique

100 mg d'extrait S1 dissous dans 3 ml de tampon phosphate de potassium 10 mM pH 8, sont chromatographiés sur une colonne (32 x 3 cm) de DEAE-cellulose type DE 52 équilibrée avec le même tampon. La chromatographie est réalisée à un débit constant de 20 ml/h. L'absorption de l'éluat est lue en continu à 206 et 275 nm au moyen d'un analyseur de fractions LKB Uvicord. On recueille des fractions de 4 ml sur

lesquelles on dose également les groupements réducteurs à l'anthrone sulfurique (SHIELDS & BURNETT, 1960) et les protéines selon LOWRY *et al.* (1951). Les composés neutres (A) non liés sur DEAE-cellulose sont élués avec le tampon phosphate de potassium 10 mM pH 8. L'élué des composés adsorbés (B) est obtenue par un gradient continu 0-1 M NaCl dans le même tampon. Les fractions A et B sont dessalées sur Sephadex G25 et lyophilisées.

La DEAE-cellulose est régénérée par agitation pendant 30 mn dans NaOH 0,5 N. La solution alcaline de régénération est dialysée contre l'eau distillée jusqu'à neutralisation, puis concentrée sous vide et lyophilisée.

### 3. Traitement par la pronase

5 mg de la fraction étudiée (S1 ou B) sont dissous dans 1,5 ml de tampon Tris HCl 0,1 M pH 8 contenant 1,65 mg/ml de pronase E (Merck) et incubés 48 h à 37 °C. La pronase est ensuite inactivée par ébullition pendant 5 mn. Pour le test d'activité élicitrice, le mélange réactionnel est dilué par l'eau distillée et le pH ramené à 7. Un témoin est constitué par la fraction subissant, dans le tampon Tris, le même traitement en l'absence de pronase.

### 4. Oxydation periodique

3 mg de la fraction étudiée (S1 ou B) sont incubés pendant 3 j dans une solution de NaIO<sub>4</sub> 0,05 M. L'excès de periodate est détruit par addition de 1 ml d'éthylène-glycol pendant 1 h. Le mélange réactionnel est lyophilisé, soit immédiatement, soit après réduction par addition de 2 ml de NaBH<sub>4</sub> 0,075 M et incubation une nuit à 4 °C. Avant le test d'activité élicitrice, on opère une dialyse contre l'eau distillée, une dilution convenable et un ajustement du pH à 7.

## C. Méthodes analytiques

L'analyse quantitative des sucres est réalisée par chromatographie gazeuse des acétates d'alditols (SAWARDEKER *et al.*, 1965) ou par dosages colorimétriques (SHIELDS & BURNETT, 1960). La glucosamine (STROMINGER *et al.*, 1969), les protéines (LOWRY *et al.*, 1951) et le phosphore (LOWRY *et al.*, 1954) sont dosés colorimétriquement.

### Chromatographie gazeuse

Les esters méthyliques d'acides gras sont analysés par chromatographie gazeuse dans un appareil Intersmat 120 FB à ionisation de flamme sur une colonne de 300 cm × 0,3 cm contenant 10 p. 100 de diéthylène-glycol succinate sur Chromosorb W 80/100 mesh. Les acétates d'alditols provenant des oses sont analysés sur colonne de verre de 200 cm × 0,3 cm contenant 3 p. 100 de ECNSS-M sur Chromosorb G 80/100 mesh.

## D. Mesure de l'activité élicitrice

### 1. Elicitation des boutures d'œillet

Les fractions hydrosolubles, préalablement lyophilisées, sont mises en solution dans l'eau permutée à la concentration désirée. Les fractions lipidiques, solubi-

lisées dans une faible quantité (2 p. 1 000 du volume final) de mélange éther-éthanol (1 : 1, v/v), sont ensuite dispersées dans l'eau. Dix boutures d'œillet (type « Sim » var. « Scania ») non enracinées, sont recoupées au niveau d'un nœud et mises à tremper par leur base dans un bécher contenant 15 ml de la solution à étudier. Après 24 h d'incubation à 24 °C sous lumière périodique de 16 h, on prélève les 3 mm inférieurs de chaque bouture. Les 10 tronçons sont pesés et immédiatement congelés.

### 2. Dosage des phytoalexines

Les tissus d'œillet congelés sont broyés dans l'acétone à l'Ultraturrax. On rajoute 200 µl d'une solution méthanolique d'acide β-naphthoïque 10<sup>-2</sup> M pour servir de marqueur interne. Après passage sous vide à travers une membrane de téflon (filtre Millipore Mitex 5 µm), le filtrat est évaporé à sec sous vide, repris dans un faible volume d'acétone et réévaporé à sec sous courant d'azote. L'échantillon est repris extemporanément dans 200 µl de méthanol. On en injecte 20 µl dans un chromatographe liquide haute performance (Waters) équipé d'une colonne de silice greffée avec une phase inverse C<sub>18</sub> (colonne RP18 Merck 7 µm, longueur 30 cm) et d'un détecteur UV (Beckman 153) muni d'un filtre à 254 nm. La colonne est éluée en conditions isocratiques par un mélange de méthanol et d'acide acétique à 5 p. 100 dans les proportions 65 : 95, v/v, avec un débit de 1 ml/mn. Le chromatogramme est analysé à l'aide d'un intégrateur électronique (Delsi ICAP 50). Les coefficients de réponse de l'acide naphthoïque, de la dianthalexine et de la dianthramide A sont déterminés par étalonnage externe avec des solutions calibrées de ces composés obtenus par synthèse. Les résultats sont exprimés en nmole de phytoalexines/g de tissu frais (les masses molaires de la dianthalexine et de la dianthramide A sont respectivement 239 et 287).

## III. RÉSULTATS

La paroi délipidée R représente 3 p. 100 du mycélium frais (soit 11 p. 100 du poids sec). Elle renferme 8 p. 100 de protéines, 1,8 p. 100 de glucosamine et 37 p. 100 d'oses totaux exprimés en glucose. Le glucose et le mannose identifiés par chromatographie gazeuse des acétates d'alditols (SAWARDEKER *et al.*, 1965) existent dans le rapport 22 : 1.

### A. Activité élicitrice de l'extrait de paroi S1

La composition de l'extrait S1 obtenu par autoclavage dans l'eau de la paroi délipidée (R) a été décrite précédemment (FABRE *et al.*, 1984). Rappelons que cet extrait représente 7 à 10 p. 100 de la paroi et contient 53,5 p. 100 de protéines, 25,5 p. 100 de glucose et 10,5 p. 100 de mannose.

### 1. Mise en évidence de l'activité de S1

Des boutures d'œillet non enracinées et fraîchement recoupées sont mises à tremper par leur base pendant

24 h dans une solution aqueuse de la fraction S1. Les extraits acétoniques des 3 mm inférieurs de ces boutures sont chromatographiés en HPLC. Le diagramme *a* de la figure 3 représente un profil d'élution typique. Les 2 phytoalexines identifiées chez l'œillet [la dianthalexine (DX) et la dianthramide A (DA)], repérables grâce à leur absorption dans l'UV, sont éluées respectivement après 12,5 et 26 mn, soit des temps relatifs par rapport à l'acide  $\beta$ -naphthoïque (AN) utilisé comme standard interne, de 1,66 et 3,90.

Ces 2 substances ne sont pas totalement absentes de la base de boutures témoin ayant trempé dans l'eau permutée (fig. 3, diagramme *b*). Ceci peut sans doute être attribué à l'effet de blessure au niveau de la coupe ainsi qu'à une élévation éventuelle par les bactéries fréquemment présentes à l'intérieur des tissus. Ce « bruit de fond » reste nettement inférieur à la réponse obtenue avec la fraction S1 dès que celle-ci est utilisée à une concentration au moins égale à 0,3 mg/l.

Au-delà, les quantités de DX et DA accumulées varient linéairement avec le logarithme de la concentration en S1 (fig. 4), le rapport [DX]/[DA] demeurant constant ; les régressions linéaires sont hautement significatives. La réponse varie donc lentement avec la concentration de la fraction élévatrice ; il est par suite difficile de définir précisément son activité spécifique sans une étude complète de la réponse à la dose. Toutefois, dans ce qui suit, il n'a pas toujours été possible d'employer plusieurs concentrations ; on a alors utilisé une valeur standard de 20 mg/l, suffisante pour obtenir une bonne reproductibilité intra-essai. Il faut noter enfin que, pour une même fraction, les paramè-

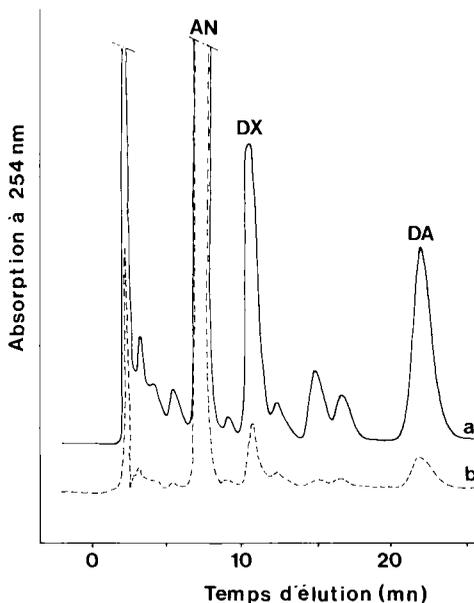


Figure 3

Profil d'élution en chromatographie liquide haute performance sur phase inverse  $C_{18}$  d'un extrait acétonique de la base de boutures d'œillet ayant trempé pendant 24 h.

$C_{18}$  reverse-phase HPLC elution profile of an acetone extract of the bottom of carnation cuttings dipped for 24 h.

*a* (trait plein) dans une préparation élévatrice (extrait S1) ;  
(solid line) in an eliciting preparation (extract S1).  
*b* (pointillé) dans l'eau ;  
(dotted line) in water.

DX : dianthalexine ; DA : dianthramide A.

AN : acide  $\beta$ -naphthoïque introduit comme marqueur interne ;  
 $\beta$ -naphthoic acid introduced as an internal standard.

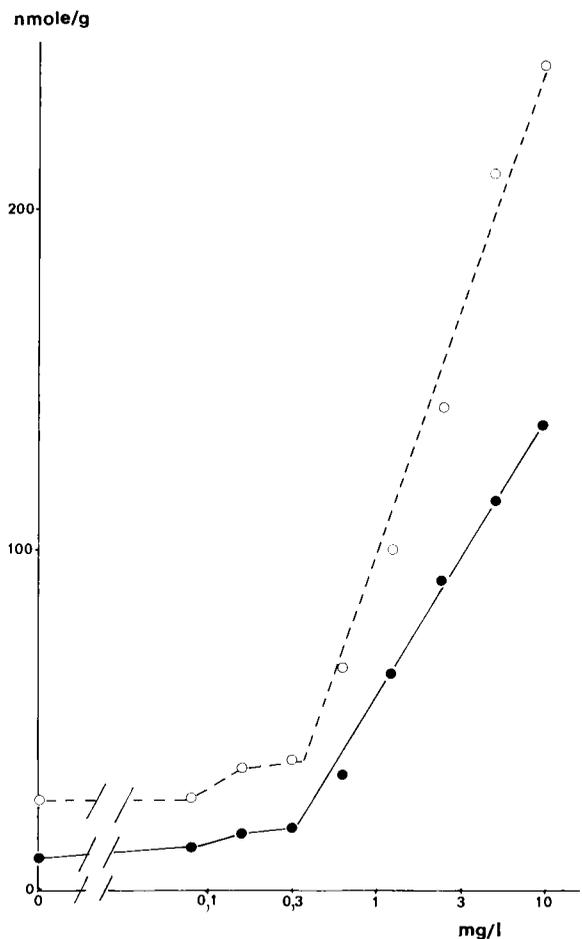


Figure 4

Accumulation des phytoalexines dans la base de boutures d'œillet après 24 h de trempage en fonction de la concentration en extrait élévatrice S1 ;

●—● dianthalexine.  
○---○ dianthramide A.

Accumulation of phytoalexins in the bottom of carnation cuttings dipped for 24 h as a function of the concentration of the eliciting extract S1.

tres de la réponse varient d'un essai à l'autre en fonction notamment du lot de boutures utilisé. Les activités de diverses fractions ne peuvent donc être comparées qu'en tenant compte du facteur « essai » (ce qui a été fait systématiquement dans les analyses de variance).

## 2. Effet de la dialyse

En règle générale, la fraction S1 a été dialysée avant d'être lyophilisée. Le tableau 1 montre qu'avant dialyse son activité élévatrice est légèrement plus faible (la différence est à la limite de la signification au seuil 5 p. 100). On peut donc admettre que le ou les composés actifs de S1 ne sont pas dialysables.

## B. Etude des extraits lipidiques

Malgré la délipoïdation préalable de la paroi, l'extrait S1 contient des traces de lipides qui pourraient être responsables de son activité (BOSTOCK *et al.*, 1982). Nous avons donc étudié les lipides présents aux différents niveaux d'extraction et de fractionnement (fig. 2).

TABLEAU 1

*Effet de la dialyse de la fraction S1 sur son activité élicitrice.*  
*Effect of dialysing fraction S1 on its eliciting activity.*

Fraction S1 (20 mg/l)	Accumulation des phytoalexines en 24 h	
	DX	DA
avant dialyse	65	75
après dialyse	93	123

Résultats en nmole/g. Moyenne de 3 essais.

### 1. Analyse des acides gras présents dans le filtrat de délipidation (L)

Le filtrat (L), obtenu par délipidation des parois mycéliennes par le mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v), est traité par le diazométhane gazeux, ce qui permet la méthylation des acides gras libres. Les esters méthyliques d'acides gras en solution dans le chloroforme sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse (tabl. 2). On constate la présence d'acides saturés à 14, 16, 18 et 19 atomes de carbone et d'acides insaturés à 16 et 18 atomes de carbone. L'acide le plus abondant est l'acide palmitique, ce qui a déjà été observé pour les lipides de *Phytophthora capsici* (TURELLI *et al.*, 1982).

### 2. Analyse des acides gras présents dans S1, A et B

Les acides gras libres résiduels L1 présents dans S1 sont extraits par agitation dans le mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v). Ils n'existent qu'à l'état de tra-

TABLEAU 2

*Composition en acides gras du filtrat de délipidation (L).*  
*Fatty acid composition of the delipidation filtrate (L).*

Constituants	Composition (a)
Acide myristique (C <sub>14</sub> )	8,2
Acide palmitique (C <sub>16</sub> )	50,3
Acide palmitoléique (C <sub>16:1</sub> )	6,6
Acide stéarique (C <sub>18</sub> )	1,6
Acide oléique (C <sub>18:1</sub> )	25,4
Acide nonadécanoïque (C <sub>19</sub> )	7,9

(a) en p. 100 du total des acides gras.

ces. Les acides gras liés sont libérés après saponification de S1 par NaOH N à 37 °C pendant 15 mn (THARANATHAN *et al.*, 1978). Leur taux est également très faible. La composition en acides gras, étudiés après méthylation par chromatographie en phase gazeuse, est représentée dans le tableau 3.

Les mêmes acides gras déjà présents à l'état libre sont identifiés après saponification de S1 ; mais on note un taux plus élevé pour les acides ramifiés à 14 atomes de carbone, les acides insaturés à 16 atomes de carbone et on identifie en plus des acides insaturés à 20 atomes de carbone : ces acides appartiennent vraisemblablement à des fractions lipoconjuguées.

Après chromatographie de S1 sur DEAE-cellulose, on retrouve dans les fractions non liée (A) et retenue (B) des traces des acides gras précédents (tabl. 3). L'acide palmitique non lié dans S1 se retrouve essentiellement dans A et l'acide insaturé en C<sub>20</sub>, lié dans S1, exclusivement dans B.

### 3. Rôle des lipides dans l'élicitation

On a examiné l'activité des lipides initialement présents dans la paroi (L) ou qui peuvent être extraits de S1. Le tableau 4 montre qu'aucune fraction lipidique n'est élicitrice. L'activité de l'extrait S1 se retrouve en grande partie dans le résidu de sa délipidation (R1) et, si on ajoute à ce résidu les lipides extraits (L1 + R1), l'activité n'est pas significativement modifiée.

MOLOT (comm. pers.) a constaté qu'un extrait S1 que nous avons préparé à partir d'une paroi simplement lavée dans le mélange chloroforme-méthanol 1 : 1 v/v était éliciteur sur piment, alors que l'extrait S1 d'une paroi mieux délipidée (broyage dans le chloroforme-méthanol 2 : 1) ne l'était pas. Sur œillet, l'activité de ces 2 extraits n'est pas significativement différente (tabl. 5).

L'ensemble de ces résultats indique que les lipides de la paroi de *P. parasitica* n'ont pas d'activité élicitrice chez l'œillet.

### C. Comparaison d'extraits hydrosolubles de paroi obtenus par différentes méthodes (S1, S2, S3, S4)

Les auteurs qui ont étudié l'élicitation du soja à partir de *P. megasperma* f. sp. *glycinea* ont utilisé des méthodes diverses d'extraction de la paroi fongique : autoclavage (AYERS *et al.*, 1976), hydrolyse acide (ALBERSHEIM & VALENT, 1978) ou alcaline (KEEN & LEGRAND, 1980). Nous avons comparé, dans notre

TABLEAU 3

*Composition en acides gras de l'extrait S1 et de ses fractions chromatographiques A et B.*  
*Fatty acid composition of extract S1 and its chromatographic fractions A and B.*

	Acides gras identifiés (a)						
	C <sub>14</sub> ramifié	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>20</sub> insaturé
Acides gras libres de S1 (L1)	4	8	60	8	8	12	—
Acides gras totaux de S1	20	5	6	20	21	2	46
Acides gras totaux de A	17	—	46	28	1,5	5	—
Acides gras totaux de B	25	—	9	21	1	2	42

(a) en p. 100 du total des acides gras.

TABLEAU 4

Activité élicitrice des fractions lipidiques et du résidu de délipidation.  
Eliciting activity of lipidic fractions and residue of the delipidation.

Fraction testée	Accumulation des phytoalexines en 24 h	
	DX	DA
L	6	6
S1	137	161
L1	7	8
R1	81	70
L1 + R1	50	29

Résultats en nmole/g. Moyenne de 2 essais.

Les quantités de fraction utilisées par litre sont : 20 mg pour S1 ; les lipides extraits d'une quantité de paroi fournissant 20 mg de fraction hydrosoluble pour L ; les quantités extraites de 20 mg de S1 pour les autres.

TABLEAU 5

Effet du mode de délipidation de la paroi sur l'activité élicitrice de la fraction S1 qui en est extraite.

Effect of the mode of cell wall delipidation on the eliciting activity of the extracted S1 fraction.

Mode de délipidation	Accumulation des phytoalexines en 24 h	
	DX	DA
D1 (a)	195	342
D2 (b)	209	412

Extraits S1 utilisés à 20 mg/l. Résultats en nmole/g. Moyenne de 3 essais.

(a) lavage par chloroforme-méthanol 1 : 1, v/v.

(b) broyage dans chloroforme-méthanol 2 : 1, v/v.

système, l'application de ces diverses méthodes à la paroi délipidée R (fig. 2), tant au niveau de la composition osidique des extraits obtenus que de leur activité élicitrice.

### 1. Analyse des oses neutres

Elle a été réalisée par chromatographie gazeuse des acétates d'alditols. On constate (tabl. 6) que l'autoclavage en milieu tamponné fournit un extrait S2 beaucoup moins riche en oses neutres que S1. L'extrait S3 obtenu par hydrolyse acide est le plus riche en glucose, tandis que dans S1 et S2, qui proviennent d'un autoclavage, le rapport mannose/glucose est plus

élevé. Ces différents traitements, déjà appliqués à de nombreux champignons et levures, permettent en effet d'isoler soit les mannanes, soit les glucanes présents dans la paroi fongique (RASCHKE & BALLOU, 1972 ; MANNERS *et al.*, 1973 ; AYERS *et al.*, 1976 ; GRIMMECKE & REUTER, 1981 ; HAHN *et al.*, 1981).

### 2. Activité élicitrice

Elle a été comparée à des concentrations comprises entre 0,2 et 60 mg/l (fig. 5). On constate ici encore que l'accumulation des phytoalexines est une fonction linéaire du logarithme de la concentration des fractions ; les régressions sont hautement significatives, excepté pour S4. En outre, les pentes des droites de régression sont très voisines et non significativement différentes. Ainsi, ces 4 extraits ont des effets qualitativement analogues, mais avec des écarts sensibles dans leur activité spécifique. En prenant pour pente commune la valeur moyenne, on a calculé ces activités spécifiques relativement à S1 (tabl. 7). Il apparaît que S1 est l'extrait le plus actif. L'appauvrissement en oses neutres (S2) ou l'enrichissement en glucose (S3) diluent l'activité. Avec ces 3 extraits, le pouvoir éliciteur semble parallèle à la teneur en mannose. Dans le cas de l'hydrolyse alcaline (S4), on peut penser que la ou les substances élicitrices sont partiellement dégradées : un effet semblable a été observé lors de l'hydrolyse alcaline du milieu de germination de zoospores (RICCI & JACQUEMOND, 1978).

### D. Fractionnement de S1 sur DEAE-cellulose

Les résultats qui précèdent diffèrent notablement de ceux qu'ALBERSHEIM & VALENT (1978), d'une part, KEEN & LEGRAND (1980), d'autre part, ont obtenus en étudiant le système *P. megasperma* f. sp. *glycinea-soja*. Afin d'affiner cette comparaison, l'extrait le plus actif (S1) a été fractionné par chromatographie d'échange anionique sur colonne de DEAE-cellulose.

Ce fractionnement, décrit précédemment (FABRE *et al.*, 1984) fournit : des composés A non liés, élués avec le tampon phosphate de potassium 10 mM pH 8 et qui représentent 27 p. 100 de S1 ; des composés B adsorbés, dont l'éluion est obtenue par un gradient continu 0-1 M de NaCl dans le même tampon, qui représentent 41 p. 100 de S1. Ces fractions sont purifiées par dialyse contre l'eau distillée et chromatographie sur colonne de Sephadex G25. Leur composition et leur activité élicitrice chez l'œillet ont été étudiées.

TABLEAU 6

Composition en oses neutres des extraits hydrosolubles de paroi.  
Neutral sugar composition of water-soluble cell wall extracts.

Extrait	Mode d'extraction	Composition en oses neutres (a)		
		glucose	mannose	galactose
S1	Autoclavage dans l'eau	25,5	10,5	traces
S2	Autoclavage dans le tampon citrate	9,1	5,0	1
S3	Hydrolyse acide	48,5	2,3	1
S4	Hydrolyse alcaline	36,0	10,0	traces

(a) en p. 100 du poids de matière sèche ; moyenne de 2 expériences.

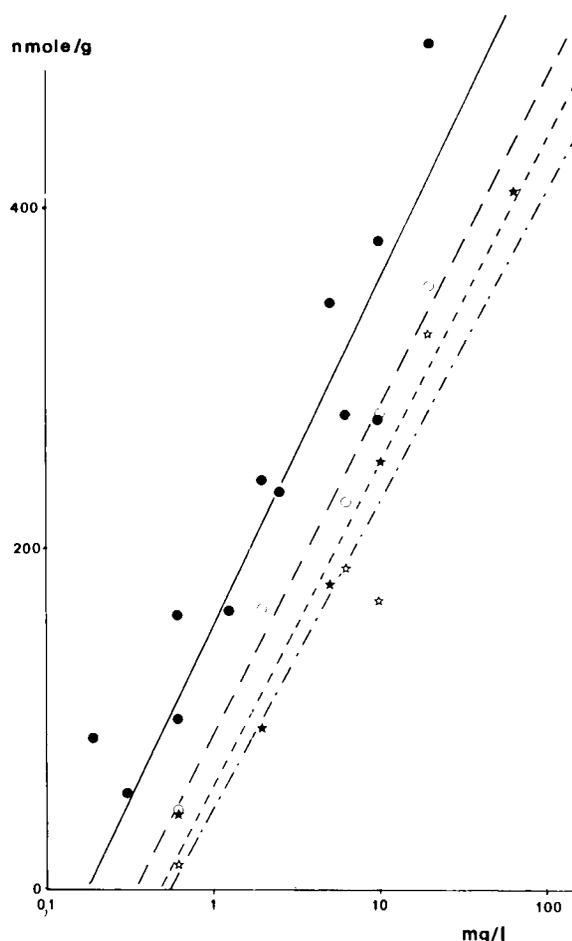


Figure 5

Activité élicitrice comparée des différentes préparations hydrosolubles extraites des parois délipidées : accumulation des deux phytoalexines (DX + DA) en fonction de la concentration de l'extrait.

S1 ●—●  
S2 ○—○  
S3 ★—★  
S4 ☆—☆

Compared eliciting activities of different water-soluble preparations extracted from delipided cell-walls : accumulation of both phytoalexins (DX + DA) as a function of extract concentration.

### 1. Analyse des constituants non lipidiques de S1, A et B

La composition des oses neutres de S1 et des fractions chromatographiques A et B est déterminée après hydrolyse chlorhydrique par chromatographie gazeuse des acétates d'alditols. La glucosamine, les protéines et le phosphore sont dosés colorimétriquement. Les résultats sont indiqués dans le tableau 8.

La fraction A, constituée essentiellement de glucose (83 p. 100), renferme des glucanes dont la purification et la structure ont été récemment obtenues (FABRE *et al.*, 1984). Les 2 composés majeurs sont des  $\beta$ -D-glucanes constitués d'une chaîne linéaire  $\beta$ -1-3 portant des ramifications  $\beta$ -1-6. L'un (I) a une masse moléculaire voisine de 200 000 d et des ramifications essentiellement trisaccharidiques ; l'autre (II) a une masse de 9 000 d et porte principalement des ramifications mono-saccharidiques.

La fraction B a une composition plus complexe avec une partie protéique (54 p. 100) et une partie polysaccharidique constituée d'oses neutres (le glucose et le mannose) et d'un ose aminé, la glucosamine.

TABLEAU 7  
Caractéristiques <sup>(a)</sup> de la relation dose-effet pour 4 extraits de paroi.  
Parameters of the dose-effect relationship for 4 cell-wall extracts.

Extrait	Pente	Terme constant	Activité spécifique <sup>(b)</sup>
S1	188	168	100
S2	195	89	40
S3	190	60	27
S4	185	44	21

<sup>(a)</sup> calculées à partir des données de la fig. 4.

<sup>(b)</sup> en p. 100 de l'activité spécifique de S1.

TABLEAU 8  
Composants non lipidiques de l'extrait S1 et de ses fractions chromatographiques A et B.  
Non-lipidic components of extract S1 and its chromatographic fractions A and B.

Fractions	Glucose	Mannose	Glucosamine	Protéines	Phosphore
S1	25,5	10,5	4,9	53,5	0,5
A	83,0	4,5	0,8	4,5	2,1
B	3,6	15,0	6,4	54,0	1,0

Les résultats sont exprimés en p. 100 du poids de la matière sèche.

### 2. Activité élicitrice des fractions A et B

L'activité élicitrice sur boutures d'œillet de l'extrait S1 se répartit entre les fractions A et B (tabl. 9). Dans tous les essais, B s'est toujours montré plus actif que A. Cependant, aucune des fractions n'atteint l'activité spécifique de l'extrait de départ.

Si on mélange les fractions A et B dans les proportions de leur obtention (tabl. 9) ou si on récupère l'éluat total de la colonne, on obtient des éliciteurs moins actifs que S1. La réduction d'activité après la chromatographie n'est donc pas liée à la séparation de molécules à activité synergique (comme dans le cas étudié par BOSTOCK *et al.*, 1982). Elle ne semble pas résulter non plus d'une rétention de l'éliciteur sur la colonne (le produit de régénération alcaline de celle-ci n'a qu'une faible activité), mais plus probablement d'une altération partielle des molécules élicitrices en cours de chromatographie.

TABLEAU 9  
Activité élicitrice des fractions A et B.  
Eliciting activity of fractions A and B.

Fraction testée (20 mg/l)	Accumulation des phytoalexines en 24 h	
	DX	DA
S1	185	247
A	57	75
B	92	101
A + B <sup>(a)</sup>	76	78

Résultats en nmole/g. Moyenne de 3 essais.

<sup>(a)</sup> mélange fait dans la proportion 2 : 3 de leur obtention ; concentration totale : 20 mg/l.

### 3. Activité élicitrice des glucanes purifiés à partir de A

Les glucanes I et II et les glucanes « intermédiaires », séparés sur Sephadex G200, ont été testés sur boutures d'œillet à deux concentrations (fig. 6). Seul le glucane II, de plus faible poids moléculaire, a une activité nettement significative. Toutefois, si on considère que ce glucane représente en poids moins de 10 p. 100 de S1 et qu'il a un niveau d'activité beaucoup plus faible, on doit admettre qu'il ne peut contribuer que fort peu au pouvoir éliciteur de l'extrait brut S1.

### E. Rôle des parties protéique et polysaccharidique dans l'activité élicitrice

L'activité élicitrice de S1 n'étant pas liée aux glucanes, composés majoritaires de A, semble dépendre de motifs existant principalement dans la fraction B, qui comporte une partie protéique et une partie polysaccharidique. Le rôle de ces 2 parties a été étudié en faisant agir, d'une part, la pronase, d'autre part, l'oxydation periodique.

#### 1. Effet de la pronase sur l'activité élicitrice de S1 et B

L'activité de l'extrait S1 et de sa fraction B est supprimée après incubation pendant 48 h à 37 °C en présence de pronase (tabl. 10). Il apparaît ainsi qu'une partie protéique est essentielle à l'activité élicitrice.

#### 2. Effet de l'oxydation periodique sur l'activité élicitrice de S1 et B

Après oxydation periodique, l'extrait S1 et sa fraction B n'élicitent plus significativement l'accumulation de phytoalexines dans les boutures d'œillet (tabl. 11). L'activité est très partiellement restaurée si les fonctions aldéhydiques résultant de l'oxydation sont ensuite réduites par NaBH<sub>4</sub>. Un résultat analogue a été obtenu par ALBERSHEIM & VALENT (1978) dans le cas des polysaccharides de la paroi de *P. megasperma* éliciteurs de glyceolline chez le soja. On peut donc conclure à l'intervention d'un motif polysaccharidique dans l'élicitation.

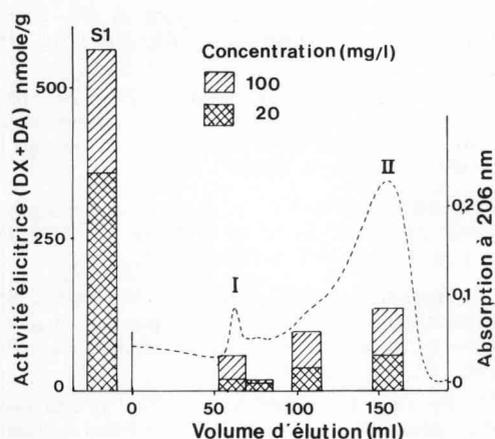


Figure 6  
Activité élicitrice (à deux concentrations) des glucanes de la fraction A séparés sur Séphadex G200, comparés à l'extrait brut S1.

Eliciting activities (at two concentrations) of the glucans from fraction A separated on G200 Sephadex, compared to that of the crude extract S1.

TABLEAU 10

Effet de la pronase sur l'activité élicitrice S1 et B.  
Effect of pronase on the eliciting activity of S1 and B.

Fraction testée Concentration finale (mg/l)	S1		B
	20	200	100
Activité élicitrice (a) de la fraction :			
— en solution dans l'eau	205 (c)	500 (c)	105
— en tampon Tris (b) + pronase dénaturée	150 (c)	310 (c)	—
— après incubation à 37 °C puis chauffage 5 mn à 100 °C dans :			
• tampon Tris	200	470	83
• tampon Tris + pronase	13 (c)	25 (c)	8
Témoin eau	12 (c)		

(a) accumulation des phytoalexines (DX + DA) en 24 h en nmole/g.

(b) tampon Tris HCl 0,1 M pH 8.

(c) moyenne de 2 essais.

TABLEAU 11

Effet de l'oxydation periodique sur l'activité élicitrice de S1 et de B.  
Effect of periodate oxidation on the eliciting activity of S1 and B.

Fraction testée Concentration finale (mg/l)	S1		B
	20	100	100
Activité élicitrice (a) :			
— en solution dans l'eau	125	500	150
— après oxydation par NaIO <sub>4</sub>	10	35	13
— après oxydation par NaIO <sub>4</sub> puis réduction par NaBH <sub>4</sub>	21	60	28
Témoin eau	18		

(a) accumulation des phytoalexines (DX + DA) en 24 h en nmole/g.

## IV. CONCLUSIONS

Par autoclavage dans l'eau selon la méthode d'AYERS *et al.* (1976), on extrait de la paroi de *P. parasitica* une préparation hydrosoluble (S1) qui, après dialyse, reste dotée sur l'œillet d'une activité élicitrice de la production de phytoalexines. Les quantités de dianthalexine et de dianthramide A accumulées dans les boutures traitées varient linéairement avec le logarithme de la concentration de l'extrait éliciteur (fig. 4). Une réponse significative est décelable dès 0,3 mg/l de S1.

Selon ALBERSHEIM & VALENT (1978), une hydrolyse acide ménagée de la paroi de *P. megasperma* f. sp. *glycinea* fournit le plus fort rendement en éliciteur de glyceolline chez le soja. Travaillant sur le même système biologique, KEEN & LEGRAND (1980) utilisent pour leur part une hydrolyse alcaline. Appliqués à la paroi de *P. parasitica*, ces 2 traitements, ainsi que l'autoclavage en tampon citrate pH 7 selon RASCHKE & BALLOU (1972), fournissent des extraits hydrosolubles de compositions différentes (tabl. 6). Ces extraits élicitent l'œillet de manière qualitativement comparable à l'extrait S1 obtenu par autoclavage dans l'eau (fig. 5), mais tous ont une activité spécifique nettement inférieure à celle de S1 (tabl. 7).

Notre étude s'est donc concentrée sur l'extrait S1. Il contient (tabl. 8) des protéines (54 p. 100), des polysaccharides, composés principalement de glucose et de mannose, et aussi des traces de lipides.

Les lipides sont représentés par des acides gras libres et des acides gras estérifiés (tabl. 3) avec, parmi ces derniers, une forte proportion d'acides insaturés en C<sub>20</sub> comme ceux qui élicitent la pomme de terre ou le piment (BLOCH *et al.*, 1984). Cependant, les lipides extraits de S1 ou directement de la paroi sont dépourvus d'activité élicitrice chez l'œillet (tabl. 4).

Environ 20 p. 100 de l'extrait S1 sont constitués par des β(1-3, 1-6)-D-glucanes qui ont pu être purifiés par chromatographies successives d'échange d'ions, d'affinité et de perméation de gel (FABRE *et al.*, 1984). Le plus abondant d'entre eux (glucane II) est doté d'une activité élicitrice relativement faible, qui ne peut nullement rendre compte de celle de l'extrait brut S1 ; les autres sont pratiquement inactifs (fig. 6). Contrairement au soja, l'œillet paraît donc peu élicitable par les polysaccharides neutres. Ainsi l'hydrolyse acide de la paroi de *P. parasitica*, qui extrait préférentiellement des glucanes (tabl. 6) fournit-elle une préparation S3 4 fois moins active que S1 (tabl. 7). Par ailleurs, une préparation semi-purifiée d'oligo-glucosides de la paroi de *P. megasperma* f. sp. *glycinea* (aimablement fournie par P. ALBERSHEIM & K. R. DAVIS), appliquée à une concentration suffisante pour induire une accumulation maximale de glycéolline chez le cotylédon de soja, n'a pas d'activité élicitrice chez l'œillet (RICCI & FERRARIS, non publié).

Après chromatographie sur DEAE-cellulose, c'est la fraction retenue B, composée de protéines et de polysaccharides, qui possède l'activité élicitrice la plus élevée. Cette activité, comme celle de l'extrait brut S1,

est sensible à la fois à la pronase et à l'oxydation périodique (tabl. 10 et 11). On peut donc supposer que le principe éliciteur est de nature glycoprotéique.

Des glycoprotéines élictrices ont été isolées de *Rhizopus stolonifer* (LEE & WEST, 1981) et d'*Erwinia carotovora* (DAVIS *et al.*, 1984) ; leur pouvoir inducteur de phytoalexines a pu être relié à une activité enzymatique. Dans le cas présent, le caractère thermostable de l'activité permet d'écarter cette hypothèse. Par ses propriétés, le principe éliciteur de l'œillet provenant des parois de *P. parasitica* paraît se rapprocher plutôt des glycopeptides extraits par DE WIT & ROSEBOOM (1980) de la paroi de *Fulvia fulva* et qui provoquent l'accumulation de rishitine chez la tomate. Une caractérisation plus poussée de ce principe fait l'objet de travaux en cours.

Peu ou non élicitable par les glucanes et les lipides, l'œillet se différencie donc de nombre de plantes cultivées (légumineuses et solanacées notamment) examinées jusqu'à présent de ce point de vue (ALBERSHEIM & VALENT, 1978 ; KEEN *et al.*, 1983 ; BLOCH *et al.*, 1984). Ce résultat vient souligner la diversité des molécules qui peuvent jouer le rôle d'éliciteur selon l'interaction hôte-parasite considérée.

Reçu le 6 juin 1985.

Accepté le 13 août 1985.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une A.T.P. I.N.R.A./C.N.R.S. « Phytopathologie ». Les auteurs remercient les Établissements BARBERET S.A. qui ont fourni gracieusement le matériel végétal et M. Georges ROUSSE pour sa précieuse contribution technique.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albersheim P., Valent B. S., 1978. Host-pathogen interactions in plants. Plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *J. Cell Biol.*, **78**, 627-643.
- Ayers A., Ebel J., Valent B., Albersheim P., 1976. Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.*, **57**, 760-765.
- Bloch C. B., De Wit P. J. G. M., Kuć J., 1984. Elicitation of phytoalexins by arachidonic and eicosapentaenoic acids : a host survey. *Physiol. Plant Pathol.*, **25**, 199-208.
- Bostock R. M., Laine R. A., Kuć A. J., 1982. Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acids in potato. *Plant Physiol.*, **70**, 1417-1424.
- Bouillant M. L., Favre-Bonvin J., Ricci P., 1983. Dianthalexine, nouvelle phytoalexine de type benzoxazinone isolée de l'œillet *Dianthus caryophyllus* L. (Caryophyllacées). *Tetrahedron Letters*, **24**, 51-52.
- Davis K. R., Lyon G. D., Darvill A. G., Albersheim P., 1984. Host-pathogen interactions. XXV. Endopolygalacturonase acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiol.*, **74**, 52-60.
- De Wit P. J. G. M., Roseboom P. H. M., 1980. Isolation, partial characterization and specificity of glycoprotein elicitors from culture filtrates, mycelium and cell walls of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 391-408.
- Fabre I., Bruneteau M., Ricci P., Michel G., 1984. Isolement et étude structurale de glucanes de *Phytophthora parasitica*. *Eur. J. Biochem.*, **142**, 99-103.
- Grimmecke H. D., Reuter G., 1981. Struktur der Zellwandpolysaccharide in der Futterweiss-Hefe *Candida* spec. H. VI — Isolierung und Strukturaufklärung der Glucane. *E. allg. Mikrobiol.*, **21**, 643-650.
- Hahn M. G., Darvill A. G., Albersheim P., 1981. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.*, **68**, 1161-1169.
- Heitefuss R., 1982. General review of active defence mechanisms in plants against pathogens. In R. K. S. Wood : « *Active defence mechanisms in plants* », Plenum Press, 381 p.
- Keen N. T., Legrand M., 1980. Surface glycoproteins : evidence that they may function as the race specific phytoalexin elicitors of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol. Plant Pathol.*, **17**, 175-192.
- Keen N. T., Partridge J. E., Zaki A. T., 1972. Pathogen-produced elicitor of a chemical defence mechanism in soybeans monogenically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology*, **62**, 768.
- Keen N. T., Yoshikawa M., Wang M. C., 1983. Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* and other sources. *Plant Physiol.*, **71**, 466-471.
- Kurantz M. J., Osman S. F., 1983. Class distribution, fatty acid

composition and elicitor activity of *Phytophthora infestans* mycelial lipids. *Physiol. Plant Pathol.*, **22**, 363-370.

Lee S. C., West C. A., 1981. Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer* is an elicitor of casbene synthase activity in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, **67**, 633-639.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

Lowry O. H., Roberts N. R., Lenier K. Y., Wu H. L., Farr A. L., 1954. The quantitative histochemistry of brain. I. Chemical methods. *J. Biol. Chem.*, **207**, 1-17.

Lucas P., Ponchet J., 1974. Production par l'œillet d'une substance du type phytoalexine inhibitrice d'une souche pathogène du *Phytophthora nicotianae parasitica* (Dastur) Waterh. *Ann. Phytopathol.*, **6**, 494-495.

Manners D. J., Masson A. J., Patterson J. C., 1973. The structure of a  $\beta$ -(1-3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.*, **135**, 19-30.

Ponchet M., Duprez V., Ricci P., 1983. Suppression of both induced resistance and phytoalexin production by salicylic acid during elicitation of carnation cuttings. *Acta Horticulturae*, **141**, 61-70.

Ponchet M., Martin-Tanguy J., Marais A., Poupet A., 1984. Dianthramides A and B, new N-benzoylanthranilic acid derivatives from *Dianthus caryophyllus* L. elicited tissues. *Phytochemistry*, **23**, 1901-1903.

Raschke W. C., Ballou C. E., 1972. Characterization of a yeast mannan containing N-acetyl-D-glucosamine as an immunological determinant. *Biochemistry*, **11**, 3807-3816.

Ricci P., Jacquemond M., 1978. Induced resistance to *Phytophthora parasitica* in carnation cuttings. *3rd. int. Congr. Plant Pathol. Munich*.

Sawardeker J. S., Sloneker J. S., Jeanes A., 1965. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **37**, 1602-1604.

Shields R., Burnett W., 1960. Determination of protein-bound carbohydrate in serum by a modified anthrone method. *Anal. Chem.*, **32**, 885-886.

Strominger J. L., Park J. F., Thomson R. E., 1969. Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus* : its relation to the mechanism of action of penicillin. *J. Biol. Chem.*, **234**, 3263-3269.

Tharanathan R. N., Weckesser J., Mayer H., 1978. Structural studies on the D-arabinose-containing lipid A from *Rhodospirillum tenue* 2761. *Eur. J. Biochem.*, **84**, 385-394.

Tramier R., Mercier S., 1965. *Phytophthora nicotianae f. parasitica* (Dastur) Waterh., nouveau parasite de l'œillet en France. *Phytopathol. Mediterr.*, **4**, 176-177.

Turelli M., Coulomb C., Roggero J. P., Coulomb P. J., 1982. Etude de la composition lipidique de la fraction membranaire d'un champignon pathogène, le *Phytophthora capsici*, responsable du mildiou du piment (*Capsicum annum*). *C. R. Acad. Sci., Paris*, **294**, sér. III, 897-900.