
Caractérisation des rôles de la lipoxygénase et de la ferritine dans la protection contre la gale commune de la pomme de terre

Rapport final

Projet financé par Innov'Action agroalimentaire / MAPAQ

Projet No IA119088

Mai 2019 à Février 2022

Responsable scientifique

Nathalie Beaudoin

Département de biologie



Équipe de recherche

Chercheurs

Nathalie Beaudoin, Ph. D., Professeure titulaire, Département de biologie, Université de Sherbrooke

Carole Beaulieu, Ph. D., Professeure titulaire, Département de biologie, Université de Sherbrooke

Équipe de recherche

Iauhenia Isayenka, Stagiaire post-doctorale

Safa Labidi, étudiante au doctorat, diplôme obtenu en janvier 2020

Marc-Antoine Turcotte, étudiant à la maîtrise, diplôme obtenu en janvier 2021

Juan Camillo Duque, étudiant à la maîtrise

Ravinderjit Kaur Sandhu, étudiante à la maîtrise, mémoire en évaluation

Stagiaires : Janie Savignac, Andréa Duclos, Émilie Boulerne

Partenaire industriel

Consortium de recherche sur la pomme de terre du Québec (CRPTQ)

Contact :

Nathalie Beaudoin

Département de biologie

Université de Sherbrooke

2500 Boul de l'université

Sherbrooke, J1K 2R1

Nathalie.Beaudoin@usherbrooke.ca

Tél : 819-821-8000 x62060

Résumé

La maladie de la gale commune de la pomme de terre est caractérisée par la présence de lésions liégeuses en surface des tubercules, réduisant ainsi leur valeur marchande. L'actinobactérie *Streptomyces scabiei* est le principal agent causal de cette maladie. La gestion de la gale commune est complexe et souvent inefficace selon les conditions environnementales. L'utilisation de variétés plus résistantes à la maladie reste une approche efficace pour réduire l'incidence de la maladie. Cependant, les facteurs qui contribuent à l'établissement de la résistance à la gale commune sont peu connus. La production de somaclones plus résistants à la maladie a été possible grâce à l'habitude de cals de pomme de terre à la thaxtamine A, un facteur de pathogénicité de *S. scabiei*.

Afin d'identifier chez ces somaclones les changements qui pourraient contribuer à l'augmentation de la résistance à la gale commune, des analyses protéomiques comparant le protéome des tubercules de somaclones avec les variétés d'origine ont été réalisées. Parmi les changements observés, l'abondance de la lipoxygénase, une enzyme impliquée dans les réponses de défense, était augmentée chez le somaclone RB9 issu de la variété Russet Burbank. Des expériences réalisées avec des minitubercules infectés par *S. scabiei* ont montré que l'abondance et l'activité de la lipoxygénase augmentent en réponse à l'infection chez Russet Burbank, et cette augmentation est amplifiée chez le somaclone RB9. Ces résultats suggèrent que la voie de la lipoxygénase est activée en réponse à la bactérie, alors qu'elle est constitutivement activée chez RB9 même sans infection, contribuant possiblement à une meilleure protection contre la gale commune.

Chez les somaclones YG8 et YG32 issus de la variété Yukon Gold, un des changements détectés par l'analyse protéomique était l'augmentation de l'abondance de la ferritine. La ferritine est une protéine qui séquestre le fer, protégeant les tissus végétaux du stress oxydatif qui peut être induit par les agents pathogènes. Les bactéries ont également besoin de fer pour leur croissance et/ou l'infection. Pour déterminer si l'accumulation de ferritine dans les tubercules des somaclones compétitionne avec la bactérie pour l'acquisition de fer, des minitubercules de YG32 ont été cultivés en présence de *S. scabiei* après avoir été exposés au déferoxamine mésylate (DFOM), un chélateur qui extrait le fer de la ferritine. La sensibilité à la gale commune a été restaurée par le DFOM chez les minitubercules de YG32. Il est possible que l'accumulation de fer par la ferritine dans les tubercules contribue à réduire l'infection par *S. scabiei* en réduisant la disponibilité du fer pour la bactérie.

Les résultats de ce projet présentent de nouvelles pistes à explorer pour mieux comprendre les mécanismes mis en place dans les tubercules de pomme de terre pour une meilleure protection contre *S. scabiei*. Ces données pourront éventuellement être utiles pour développer des marqueurs utilisés pour la sélection ou le développement de variétés plus résistantes à la gale commune.

Introduction

La gale commune de la pomme de terre est une maladie très répandue qui se caractérise par le développement de lésions plus ou moins profondes en surface des tubercules (Braun et al. 2017). Cette maladie diminue grandement la valeur marchande des tubercules et cause des pertes importantes au Québec et partout dans le monde (Dees and Wanner 2012; Hill and Lazarovits 2005). En particulier, les

tubercules ayant plus de 5% de leur surface infectée sont rejetés par l'industrie. La gestion de la gale commune est complexe est souvent inefficace selon les conditions environnementales. À ce jour, l'approche la plus efficace et respectueuse de l'environnement pour réduire l'incidence de la maladie est l'utilisation de variétés de pomme de terre qui sont plus résistantes à la maladie. Cependant, il n'y a pas actuellement sur le marché de variétés complètement résistantes à la gale commune (Dees and Wanner 2012). De plus, on connaît peu de choses sur les facteurs génétiques et moléculaires impliqués dans la protection contre la maladie, ce qui complique l'utilisation d'approches d'amélioration génétique classique pour la production de variétés très résistantes à la gale commune (Dees and Wanner 2012; Kaiser et al. 2020).

L'actinobactérie *Streptomyces scabiei* (syn. *scabies*) est l'un des principaux agents pathogènes responsables de la maladie (Dees and Wanner 2012). *S. scabiei* infecte généralement les tubercules en expansion, dans les premières six semaines suivant le début de la tubérisation (Khatri et al. 2011; Khatri et al. 2010). L'infection se fait par les lenticelles, des blessures, ou toute autre ouverture dans la surface des tubercules. Pendant l'infection, *S. scabiei* sécrète une phytotoxine appelée thaxtomine A (TA) qui joue un rôle central dans le développement des symptômes de la maladie et la pathogénicité de *S. scabiei* (Goyer et al. 1998; Lawrence et al. 1990). En particulier, des mutants de *S. scabiei* incapables de synthétiser la toxine ne sont pas capables d'infecter les tubercules de pomme de terre (Goyer et al. 1998; Joshi et al. 2007).

Plusieurs effets de la TA ont été rapportés, même si la cible précise de la TA n'est pas encore connue. Par exemple, la TA inhibe la synthèse de la cellulose, cause un épaissement au niveau des tiges et des racines, induit une hypertrophie cellulaire, des changements de flux ioniques, la production de scopolétine, et une mort cellulaire programmée (MCP) atypique (Bischoff et al. 2009; Duval et al. 2005; Errakhi et al. 2008; Fry and Loria 2002; Leiner et al. 1996; Lerat et al. 2009; Meimoun et al. 2009; Scheible et al. 2003; Tegg et al. 2005). L'inhibition de la synthèse de la paroi cellulosique serait un facteur central dans le mode d'action de la TA, puisque des cellules en suspension d'*Arabidopsis thaliana* traitées avec l'isoxabène, un autre inhibiteur de la synthèse de cellulose, induit des changements transcriptionnels semblables à ceux induits par la TA (Duval and Beaudoin 2009).

Dans les dernières années, la résistance à la gale commune a été augmentée chez quelques variétés de pomme de terre en utilisation des méthodes de sélection de cellules somatiques résistant à de fortes concentrations de TA (Wilson et al. 2009; Wilson et al. 2010) ou encore par l'habituation progressive de cals à la TA (notre laboratoire; Beaudoin et al. 2021). Cette dernière approche a permis de régénérer des somaclones qui sont plus résistants à la gale commune que la variété d'origine. Des tests d'infection en chambre de croissance et en champ ont montré que le somaclone RB9 issu de la variété Russet Burbank, produit jusqu'à 22% de plus de tubercules vendables que la variété parentale. De même, l'infection par *S. scabiei* de tubercules produits par les somaclones YG8 et YG32 issus de la variété Yukon Gold ont montré une plus grande protection contre la gale commune avec une diminution significative de l'indice de sévérité de la maladie et une réduction de la profondeur des lésions (Labidi 2020).

Afin d'identifier les changements qui contribuent à l'augmentation de la résistance à la gale commune chez les somaclones habitués à la TA qui sont plus résistants à la maladie, nous avons réalisé une étude protéomique comparant le protéome des tubercules de la variété d'origine avec celui des tubercules des somaclones (Labidi 2020; Isayenka 2020). Trois familles de protéines qui sont plus

abondantes dans les tubercules du somaclone RB9 ont attiré notre attention du fait de leur implication dans la défense végétale. Il s'agit de la famille des patatines, lipoxygénases et inhibiteurs de protéase de type Kunitz. La première partie de ce projet s'est intéressée plus particulièrement au rôle de la lipoxygénase dans la mise en place de la résistance à la gale commune chez RB9. La voie de la lipoxygénase mène à la synthèse d'une variété de composés faisant partie des oxylipines, dont plusieurs ont une activité antimicrobienne qui pourrait agir contre *S. scabiei* (Wasternack and Feussner 2018). Pour ce qui est des somaclones YG8 et YG32, une augmentation de l'abondance de la ferritine a été détectée dans les tubercules des deux somaclones par rapport à ceux de la variété Yukon Gold. La ferritine est une protéine qui séquestre le fer, protégeant les cellules végétales d'un stress oxydatif souvent activé lors d'infection pathogène. Des travaux précédents ont également montré une accumulation de la ferritine en réponse à une attaque pathogène, suggérant un possible rôle dans la défense (Aznar et al. 2015). D'autre part, les bactéries ont aussi besoin de fer pour leur croissance. Dans la deuxième partie de ce projet, nous avons étudié la possibilité que l'accumulation de ferritine dans les tubercules contribue à réduire la disponibilité du fer pour *S. scabiei*, diminuant ainsi sa capacité à infecter les tubercules.

Matériel et Méthodes

Multiplication et maintien des boutures

Les somaclones habitués à la thaxtamine A ont été produits par habitude à la thaxtamine A et testés pour leur résistance à la gale commune tel que décrit précédemment (Beaudoin et al. 2021; Isayenka 2020; Labidi 2020). Les boutures de pomme de terre ont été maintenues et multipliées en conditions stériles, sur milieu de maintien Murashige et Skoog (MS) contenant 4,3 g L⁻¹ de MS (Sigma), 3% de saccharose et 0,7% de bactoagar (Becton et Dickinson), pH 5,7. Le bouturage a été fait aux deux mois en coupant des tiges en sections de 1 à 2 cm portant un ou plusieurs nœuds transférés sur milieu de maintien aux 2 mois, dans des contenants Magenta GA7 (77 mm x 77 mm x 97 mm; PhytoTechnology Laboratories), avec 5 boutures par contenant. Les plants ont été cultivés en cabinet de croissance (Sanyo Scientific) avec une température constante de 20 à 22 °C, avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité.

Préparation de *S. scabiei*

La culture de *Streptomyces scabiei* EF-35 (Paradis et al. 1994) a été faite à partir de 50-100 µL de spores qui ont été inoculés dans un milieu YME (Yeast Malt Extract) contenant 4 g L⁻¹ d'extrait de levures (Fisher Scientific), 4 g L⁻¹ glucose (Sigma) et 10 g L⁻¹ d'extrait de malt (BD Difco) dans une fiole Erlenmeyer pendant une semaine à 30°C sous agitation (Isayenka 2020). Un volume de 1 mL de cette culture dense de spores de *S. scabiei* EF-35 a été étalé sur un pétri contenant le milieu YMEA plus CaCO₃ (4 g L⁻¹ glucose, 4 g L⁻¹ extrait de levures, 10 g L⁻¹ extrait de malt, 15 g L⁻¹ d'agar et 1 g L⁻¹ CaCO₃). Ces cultures ont été incubées à 30°C, à l'obscurité, pendant 5 à 8 jours puis les géloses ont été découpées en cubes de 1 cm³. Ensuite, des contenants Magenta ont été préparés pour la culture du mycélium de la bactérie. Ces contenants ont été remplis aux trois quarts du volume de vermiculite avant d'être stérilisés deux fois à l'autoclave pendant 30 minutes. Un volume de 90 mL de solution SAY (20 g L⁻¹ sucrose, 1,2 g L⁻¹ L-

asparagine, 0,6 g L⁻¹ K₂HPO₄ et 10 g L⁻¹ d'extrait de levures) a été ajouté dans chaque Magenta pour saturer la vermiculite. Par la suite, deux cubes découpés dans la culture ont été déposés dans les Magenta, à l'envers, sur la vermiculite et incubés à 30°C pendant 3 à 4 semaines à l'obscurité.

Culture des plantes, production de minitubercules et infection

Les plants de pomme de terre ont été cultivés à partir de boutures *in vitro* d'environ 4 semaines dans un mélange de terreau, sable et vermiculite (2 : 2 : 1) préalablement autoclavé avec une photopériode de 16 h lumière et 8 h obscurité à 22/16°C pour le premier mois et de 12 h par la suite. Les plantes ont été fertilisées une fois par semaine avec engrais soluble tout usage 20-20-20 et arrosées deux fois par semaine au besoin. Les minitubercules ont été produits à partir de plants d'environ 8 semaines (Fig. 1) avec une photopériode de 12 h à 22/16°C. Des sections de tiges portant une feuille et un bourgeon foliaire ont été placées pendant 7 jours dans un bac contenant de la vermiculite humidifiée en prenant soin de couvrir le bourgeon du mélange tout en laissant la feuille en surface (Struik and Wiersema 1999). Les bourgeons foliaires ont été arrosés deux à trois fois par semaine avec au moins 200 mL pour 2 L de substrat. Après 7 jours, les sections de tige portant les minitubercules ont été transférés dans un pot avec 3 L de vermiculite : sable (1 :1) inoculé avec *S. scabiei* EF35 (1 :40 v/v). Des minitubercules ont été transférés dans le même type de substrat sans bactéries comme témoin. Pour l'évaluation de la résistance à la gale commune, les minitubercules ont été récoltés après 17 ou 21 jours, tel qu'indiqué, et photographiés des deux côtés pour évaluer l'intensité de la maladie à l'aide d'ImageJ (Schneider et al. 2012).

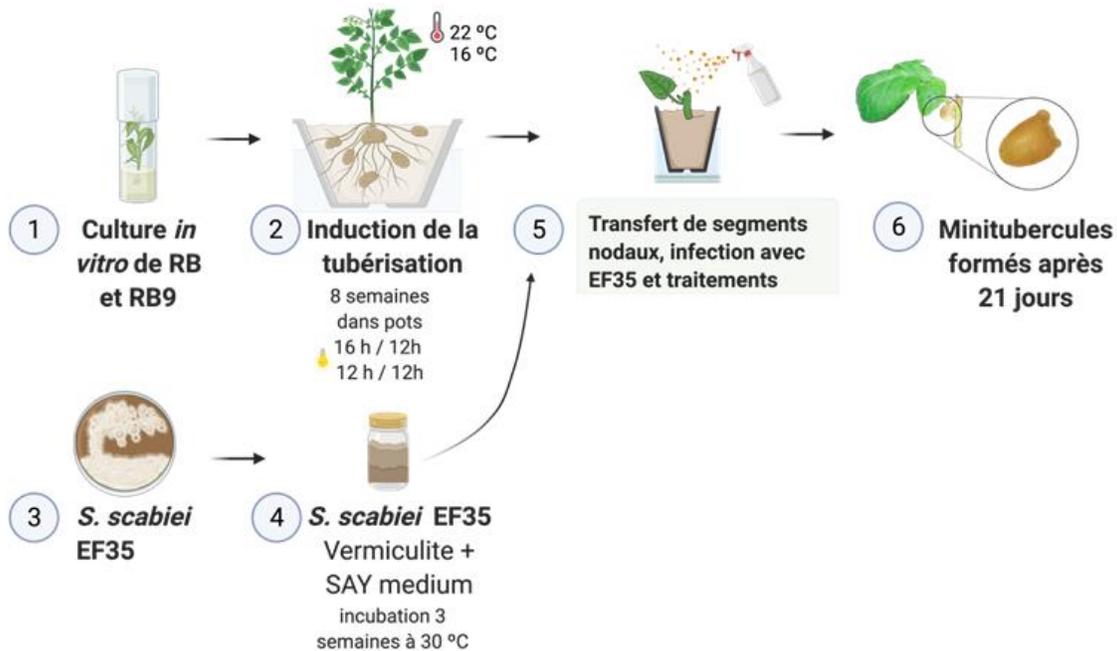


Figure 1. Représentation schématique de la production de minitubercules à partir de bourgeons foliaires et de leur infection par *S. scabiei*.

Traitements des minitubercules

Pour évaluer l'implication de la lipoxigénase, les minitubercules du somaclones RB9 et de la variété parentale RB ont été traités avec des composés pharmacologiques inhibant la lipoxigénase, soit du Naproxène (Nap) (Kolomiets et al. 2001) et de l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) (del Carmen Pinto et al. 2007), tous deux préparés dans de l'éthanol. Un volume de 50 mL pour chaque inhibiteur à une concentration finale de 500 μM pour Nap et 100 μM pour le NDGA a été pulvérisé aux jours 0, 7 et 14 après l'infection. La même quantité d'éthanol diluée dans l'eau a été pulvérisée sur les témoins infectés et non infectés. Dix bourgeons foliaires ont été utilisés par chaque traitement. Les minitubercules ont été cultivés pendant 21 jours et récoltés pour les différentes analyses.

Pour étudier le rôle de la ferritine et du fer dans la protection contre la gale commune, des minitubercules du somaclones YG32 et de la variété parentale YGP ont été traités avec du déféroxamine mésylate au moment de l'infection par *S. scabiei*. Les minitubercules de 7 jours, infectés ou non avec *S. scabiei*, ont été arrosés directement avec 5 mL d'une solution de déféroxamine mesylate (DFOM)(Sigma) 10 mM pH (4,87). Des minitubercules ont été récoltés après 8 h, 24 h et 17 jours pour évaluer l'expression du gène *FER1* et/ou évaluer les symptômes de gale commune.

Production de microtubercules et infection

Les microtubercules ont été produits *in vitro* à partir de boutures cultivées *in vitro* (Fig. 2). Un segment nodal de tige a été coupé et placé verticalement dans une boîte Magenta contenant un milieu MS contenant 4,3 g L⁻¹ de MS (Sigma), 8% saccharose, 0,1 % PPM (Plant Preservative Mixture) (Plant Cell

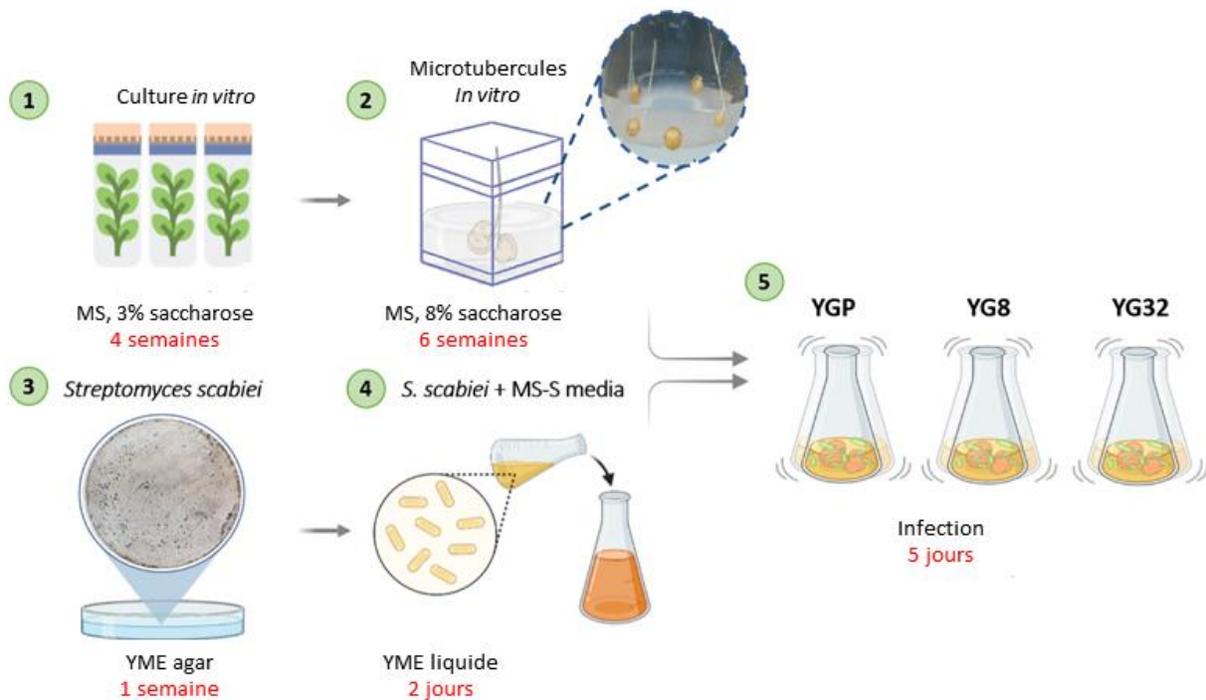


Figure 2. Représentation schématique de la production de microtubercules et l'infection par *S. scabiei*.

Technology) et 0,7% de bactoagar (Becton et Dickinson), pH 5,7. Les cultures ont été incubées à température ambiante à l'obscurité pendant environ 6 semaines. Un inoculum primaire de *S. scabiei* a été préparé, tel que décrit ci-haut. Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation à 3450 g pendant 10 minutes à 4°C, et le culot a été resuspendu dans 5 volumes d'une solution de 0,85% de chlorure de sodium. 150 µL de cette suspension bactérienne ont été ajoutés à 10 mL de milieu MS supplémenté de saccharose (3%) et de 0,05% (w/v) d'amidon, à un pH 5,8. Finalement, cinq microtubercules de taille semblable pour YG8 et YGP ont ensuite été transférés avec les bactéries en milieu MS et placés sous agitation (125 rpm) pendant 5 jours à 30°C. Des microtubercules ont également été transférés dans des conditions semblables sans bactéries comme témoin. Après 5 jours, 0,2 mL de solution STOP contenant de l'éthanol 100% et du phénol (pH 4,3) (95 :5) a été ajouté au milieu de culture, suivie d'une centrifugation à 3540 g pendant 10 min à 4°C pour récupérer les bactéries. Le culot bactérien et les microtubercules ont été conservés à -80°C. L'expérience a été répétée trois fois.

Évaluation de la sévérité des symptômes de la gale commune

Après récolte des minitubercules, le pourcentage de surface infectée a été évalué. L'indice de sévérité de la maladie a été calculé selon l'échelle suivante, où 0 = aucune infection ; 0,5 moins de 1% de surface infectée ; 1 = 1 à 5% de surface infectée ; 2 = 6 à 10% de surface infectée; 3 = 11 à 35 % de surface infectée; 4 = 36 à 50 % de surface infectée; 5 = 51 à 75% de surface infectée; 6 = 76 à 100 % de surface infectée.

Immunobuvardages de type western

Pour l'analyse de l'abondance et de l'activité LOX, chaque échantillon utilisé pour l'extraction des protéines était constitué d'un pool de 2 minitubercules récoltés après 21 jours d'infection. L'extraction de protéines a été faite avec une proportion de 1 partie du matériel végétal et 3 parties du tampon d'extraction selon la méthode employée par Isayenka (2020). Ainsi, 200 mg de poudre de chair de minitubercules ont été pesés et ajoutés à 600 µL du tampon d'extraction composé de 0,1 M Tris-base pH= 8,0, 5% (m/v) sucrose, 2% (m/v) SDS, 1 mM PMSF (Sigma) et 0,5 % cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma). Trois réplicats biologiques ont été utilisés, chacun étant constitué de deux minitubercules du même poids et du même stade de développement. La quantification de la teneur en protéines a été faite en utilisant le kit RC DC (BioRad). Pour le SDS-PAGE, 5 µg de protéines totales ont été chargés sur un gel d'acrylamide 12%. Les protéines ont été électro-transférées sur une membrane PVDF pendant 1,5 h à 2 h à 100 V. Les membranes ont été bloquées avec un du lait écrémé (Marque Sélection) 4 % (m/v) dans du tampon T-TBS (2 h) à température ambiante avec agitation constante à 70 rpm. Les anticorps primaires ont été appliqués pendant une nuit dans une dilution de 1:5000 (Anti-LOX, AS06 128A, Agrisera) avec agitation à 4 °C. Les anticorps contre l'actine, utilisée comme protéine de référence, ont été utilisés dans une dilution 1:3000 (Anti-ACT, AS13 2640, Agrisera). Après lavage avec du T-TBS 2 fois, la membrane a été incubée avec des anticorps secondaires. Le conjugué de chèvre anti-lapin IgY HRP (Transgen biotech) a été utilisé dans une dilution de 1 : 10 000 pendant 1 heure à température ambiante. La membrane a été lavée comme précédemment et développée avec ECL (substrat Clarity Western ECL, BioRad, 170-5060) pendant une incubation de 5 minutes. Les membranes ont été photographiées avec Bio-Rad ChemiDoc™. La densité absolue de la bande a été estimée avec le programme ImageJ (National Institutes of Health) après soustraction du bruit de fond (Schneider et al. 2012).

Quantification de l'activité LOX par la méthode d'oxydation ferreuse-xylénol orange (FOX)

L'extraction des protéines a été faite avec une proportion de 1 partie du volume de matériel végétal et 2 volumes du tampon d'extraction selon la méthode employée par González-Gordo et al. (2019)(Gonzalez-Gordo et al. 2019) avec certaines modifications. 100 mg de poudre de chair de minitubercules ont été pesés et ajoutés dans 200 μ L du tampon d'extraction composé de 50 mM Tris-base pH= 7,5, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 1 mM $MgCl_2$ et 10 % (v/v) glycérol. Trois réplicats biologiques ont été utilisées, chacun provenant de deux minitubercules du même poids et du même stade de développement. La concentration en protéines a été mesurée en utilisant le « Bradford protein assay » (BioRad). Pour la préparation du substrat enzymatique, la méthode proposée par Heinisch et al. (1996) a été utilisée. Pour la préparation du substrat, 50 μ L d'acide linoléique 99 % (Sigma, L1376) et 50 μ L d'éthanol 95 % ont été mélangés dans une poire graduée de 50 mL à l'aide d'un agitateur magnétique à 4 °C à l'obscurité. L'échantillon a été complété jusqu'à 50 mL avec du tampon borate 0,2 M pH 9,0. Le substrat a été aliquoté dans des tubes de 2 mL et les tubes ont été stockés à -20 °C jusqu'à utilisation. Pour la production des hydroperoxydes d'acide linoléique, le substrat d'acide linoléique 3,2 mM et la lipoxygénase (LOX) de Glycine max (soja) (Sigma, L7395) ont été utilisées selon la méthode proposée par del Carmen Pinto et al. 2007. 450 U de LOX de soja ont été utilisés pour la génération d'une solution d'hydroperoxydes d'acide linoléique, laquelle a été mesurée à température ambiante par spectrophotométrie à 234 nm et quantifiée en utilisant un $\epsilon = 25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ensuite, des dilutions pour la courbe d'étalonnage avec des concentrations entre 0 et 1,5 μ M d'hydroperoxydes d'acide linoléique ont été faites. La quantification de l'activité LOX a été réalisée en utilisant la méthode d'oxydation ferreuse-xylénol orange FOX proposée par del Carmen Pinto et al. (2007) avec certaines modifications. Cette méthode permet de quantifier la production d'hydroperoxydes à partir de la formation du complexe Fe^{3+} /xylénol orange avec une absorption à 560 nm. 3 μ g d'extrait brut de protéines ont été incubés avec 320 μ M d'acide linoléique en présence de 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 jusqu'à un volume de 125 μ L pendant 2 minutes à température ambiante. La réaction a été terminée avec l'ajout de 125 μ L de réactif FOX 2X (220 mM d'acide perchlorique, 0,25 mM de sulfate ferreux et 37,5 μ M de Xylénol orange dans un mélange 9:1 méthanol : eau) (Timabud et al. 2013). Ensuite, une incubation de 10 min à température ambiante a été réalisée. Finalement, la densité optique a été mesurée à 560 nm dans un lecteur de plaques (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek). Dans toutes les expériences, un blanc a été exécuté, mais avec une séquence différente. L'activité LOX a été déterminée à partir de la différence de l'absorbance à 560 nm de l'échantillon moins l'absorbance à 560 nm du blanc de l'échantillon.

Extraction d'ARN et analyse PCR quantitative (RTqPCR)

Pour les échantillons de pomme de terre, l'ARN total a été extrait de la poudre de chair de tubercule de pomme de terre congelée, comme décrit précédemment (Kumar et al. 2007). Les analyses ont été réalisées à partir de 3 échantillons biologiques différents, constitué chacun de soit un tubercule mature, 2 minitubercules ou 4 à 6 microtubercules de même poids et même stade de développement.

L'ARN de *S. scabiei* a été extrait en ajoutant 1 mL d'une solution de lysozyme fraîchement préparée contenant 15 mg pour 1 mL de tampon TE buffer au culot obtenu tel que décrit plus haut, et mélangé vigoureusement (vortex) pour 30 secondes. Après une incubation de 10 min à 37°C, 700 μ L d'un tampon

contenant 10 μL de β -mercaptoethanol pour 1 mL de tampon RLT (RNeasy mini kit QIAGEN) a été ajouté au lysat. Le mélange a été vortexé pendant 2 min, suivi d'une sonication pendant 20 secondes et complété par deux extractions au phénol : chlorophorme (50 :50) et une extraction finale au chlorophorme. L'ARN contenu dans la phase supérieure a été précipité avec 500 μL d'éthanol 100%, et l'extraction a été complétée tel que décrit pour le RNeasy mini kit (QIAGEN).

Le traitement à la transcriptase inverse a été fait sur 2 μg d'ARN mélangé avec 1 μL de 0,5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ d'oligo dT (IDT) dans un volume total de 10 μL et chauffé à 70°C pendant 5 min. Après avoir refroidi l'échantillon à 4°C, 1,5 μL de AMVRT transcriptase inverse (Promega), 1,5 μL de RNAsin (Promega), 2,5 μL de dNTPs (10 mM; IDT) et 5 μL de tampon 5x AMVRT (Promega) ont été ajoutés à chaque échantillon d'ARN pour une volume final de 25 μL . La synthèse des ADNc s'est faite dans les conditions suivantes : 42°C pendant 1 h, 70°C pendant 10 min. Les échantillons ont été refroidies à 4°C et gardés congelés (-20°C) jusqu'à l'analyse. Les amorces utilisées pour l'amplification PCR sont indiquées au Tableau 1. Les conditions pour l'amplification par RT-qPCR étaient : 1) 3 min. à 95°C, 2) 40 cycles, 95° C pour 15 sec. et 63°C pour 30 sec., 3) 95° C pour 1 min., 60°C pour 30 sec. et 95°C pour 30 sec. Pour les amorces de 18S, une température de 60°C a été utilisée à l'étape 2 au lieu de 63°C. L'appareil utilisé était le QuantStudioTM qPCR machine (ThermoFisher). L'expression relative a été évaluée en utilisant le gène de référence 18S (Nicot et al. 2005) ou *gyrA* selon la méthode delta delta Ct (Livak and Schmittgen 2001).

Tableau 1. Amorces utilisées pour la RTqPCR.

Nom du gène	No de protéine / locus	Amorces (5'-3')
<i>Lox1.2</i>	Linoleate 9S-lipoxygenase 2-like / 102602192	F : TTTGGTGGCCCTGATGACTC R : AACCGTTTGGCCAAGGAAC
<i>StAOS</i>	Allène oxide synthase / 102577479	F : CGGAAACGGAAAGTCCGACA R : TCCCGACCTCGATCCAAAAC
<i>StAOC</i>	Allène oxide cyclase / 102577822	F : GCTCAACAGATTCAACTAACACTGA R : AGATAAGCAGGGCTTCCACG
<i>StDES</i>	9-Divinyl éther synthase / 102588225	F : GCAAGTCCGCTGTGTCCATA R : GTGTGTAGACTAGCCCCTGC
<i>StEH1</i>	Epoxide hydrolase /102577894	F : CTATCCCTGATGCTCCGGTT R : CCAGTTTATGGGTAAAGCACGG
<i>StHPL</i>	Hydroperoxyde lyase / 102577863	F : CCAAATGTGGTGGCGTTTT R : TCTTAATCTGGGCATGTTTAGGTTT
<i>FER1</i>	Ferritine / 102577652	F : CTGAAATAATGGCAGTTTCAGC R : CGATGAAGTTTTCAATGGAGTC
18S (référence)	18S ARNr	F : AATTACCCAATCCTGACACGGG R : TTGCCCTCCAATGGATCCTCGTTA
<i>SCAB_1471</i>		F : TACCTGTTACGGACGTTTT R : ATGTCTGAACAGGCCGAAG
<i>SCAB_1481</i>		F : CACCTCGTACGTCATCTTAC R : GATGTCCTCGACGGTGTG
<i>gyrA</i> (référence)	Gyrase A	F : GGACATCCAGACGCAGTACA R : CTCGGTGTGAGCTTCTCT

Coloration histochimique et microscopie

La détection du fer a été réalisée dans des tubercules matures des somaclones YG8, YG32 et de la variété parentale YGP. La coloration de Perls a été effectuée tel que décrite par Roschztardt et al. 2013. Le réactif de Perls a été préparé avec 4% d'acide chlorhydrique (HCl) (RICCA) et 4% (w/v) de ferrocyanure de potassium (Sigma). À l'aide d'une lame de microtome, des tranches aussi minces que possible ont été coupées manuellement sur des tubercules lavés. Des sections de tranches ont été submergées dans le réactif de Perl sous vide pendant 15 minutes, suivi d'une incubation de 30 minutes à la température ambiante. L'intensification de la coloration a été réalisée par une coloration au diaminobenzidine (DAB). Les échantillons ont été lavés avec de l'eau distillée représentant trois volumes de la solution Perls utilisée, suivi d'une incubation dans une solution de méthanol contenant 0,01 M d'azote de sodium (NaN_3) (Sigma) et 0,3% de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Sigma) pendant 1 heure. Les sections ont ensuite été lavées avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (3 volumes) suivi d'une incubation de 30 minutes dans la solution d'intensification contenant 0,025% de DAB, 0,005% de H_2O_2 et 0,1 M tampon phosphate pH 7,4. La réaction a été arrêtée en lavant les sections trois fois avec de l'eau distillée. Les images ont été prises à l'aide d'un stéréomicroscope Leica.

Quantification du fer

La quantification du fer a été réalisée pour des tubercules matures et des microtubercules de YGP et des somaclones YG8 et YG32. Pour chaque lignée, 3 tubercules différents (chair et périoderme séparés) et 3 pools de 3 à 5 microtubercules ont été broyés à l'azote liquide et séchés à 60°C. Pour chaque spécimen, le fer a été quantifié dans trois échantillons différents par Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) au Département de chimie de l'Université de Sherbrooke.

Résultats et discussion

Importance de la lipoxigénase (LOX) dans la résistance à la gale commune

Le somaclone de pomme de terre habitué à la TA RB9, produit de la variété parentale Russet Burbank (RB), est plus résistant à la gale commune que RB (Beaudoin et al. 2021). Une étude protéomique a été réalisée précédemment pour identifier les changements du protéome des tubercules de RB9 comparé à celui des tubercules de RB qui pourraient expliquer l'augmentation de la résistance à la gale commune. Plusieurs protéines de défense ont été identifiées parmi les protéines dont l'abondance a augmenté chez RB9, soit des membres de la famille des patatines, des lipoxigénases (LOX) et des inhibiteurs de protéase de type Kunitz (Isayenka 2020). Dans ce projet, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle possible de la LOX dans l'augmentation de la résistance à la gale commune observée chez le somaclone RB9.

Les LOX sont impliquées dans la formation d'oxylipines, un groupe de molécules dont plusieurs ont une activité de défense contre les agents pathogènes (Blee 2002; Hwang and Hwang 2010). Ainsi, l'augmentation de l'abondance de ces protéines pourrait permettre de mettre en place dans le tubercule une défense active qui serait déjà très efficace lors de l'attaque par *S. scabiei*. Dans cette première partie

du projet, nous avons évalué l'effet d'inhibiteurs de LOX sur le développement des symptômes de la maladie et l'effet de l'infection sur l'expression, l'abondance et l'activité de la LOX.

Expression génique dans la voie de synthèse des oxylipines

La famille des lipoxygénases est classée en deux types selon la position spécifique où l'oxygène est ajouté sur la chaîne acyl des acides gras polyinsaturés. Ainsi, les 9-LOX et les 13-LOX produisent respectivement des dérivés de 9- ou 13-hydroperoxydes d'acides gras qui peuvent être davantage modifiés par différentes voies métaboliques pour former une grande famille de métabolites appelés oxylipines (Fig. 3A)(Wasternack and Feussner 2018). L'activité de la 13-LOX mène entre autres, via l'activité de l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC), à la production de l'acide jasmonique, une hormone impliquée dans la formation des tubercules et les réponses de défense (Göbel et al. 2001; Royo et al. 1999). L'activité 9-LOX conduit à la production de 9-hydroperoxydes d'acides gras qui peuvent emprunter différentes branches de la voie des oxylipines impliquant entre autres la divinyle

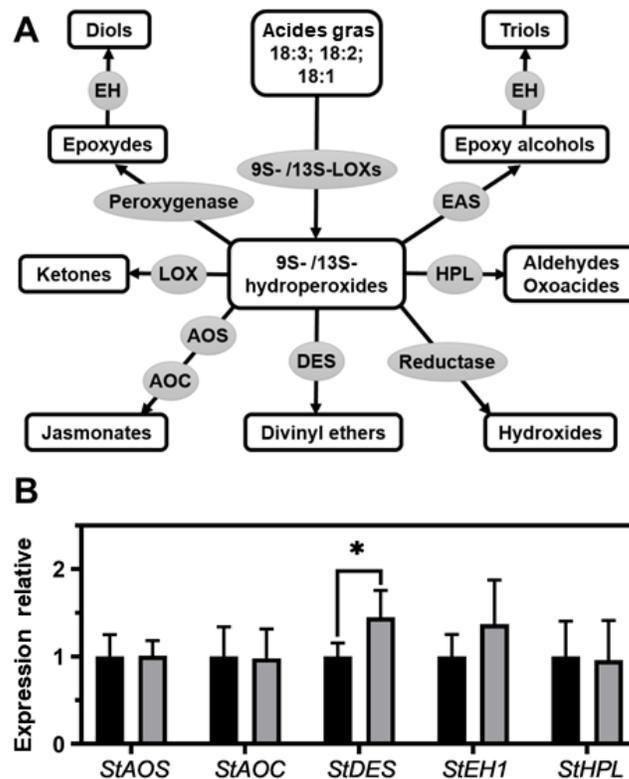


Figure 3. Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la voie des oxylipines chez les tubercules du somaclone RB9 et de la variété parental Russet Burbank (RB). A) Schéma des voies de synthèse des oxylipines régulées par la lipoxygénase. **B)** Expression relative évaluée par RTqPCR de gènes impliqués dans la synthèse des oxylipines dans les tubercules de RB9 (barres grises) comparé à RB (barres noires). Le gène de référence utilisé est 18S. Les données représentent la moyenne de trois réplicats biologiques constitués d'un tubercule chacun. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type. L'astérisque indique des moyennes significativement différentes (t-test, $P < 0,05$). Abréviations : LOX= lipoxygénase; AOS = allène oxyde synthase; AOC = allène oxyde synthase; DES = divinyl éther synthase; EH = époxyde hydrolase; HPL = hydroperoxyde lyase.

éther synthase (DES), l'époxyde hydrolase (EH) ou l'hydroxyperoxyde lyase (HPL). La voie activée par les 9-LOX a été impliquée à plusieurs occasions dans la défense et la résistance à la maladie chez les plantes (Hwang and Hwang 2010; Rancé et al. 1998; Vicente et al. 2012). Le groupe de LOX dont l'abondance augmente chez RB9 fait partie des 9-LOX, mais il est possible qu'elle puisse également produire une certaine quantité de 13-hydroperoxydes d'acide gras (Royo et al. 1996). Pour déterminer quelle branche de la voie des oxylipines est principalement activée chez les tubercules de RB9, nous avons évalué l'expression de différents gènes codant pour des enzymes impliqués dans ces voies (Fig. 3).

L'expression des gènes *StAOS* et *StAOC*, impliqués dans la voie de synthèse de l'acide jasmonique, n'était pas augmenté dans les tubercules de RB9 par rapport à RB, suggérant que cette voie impliquant la formation de 13-hydroperoxydes d'acides gras, n'est pas activée chez RB9 (Royo et al. 1996). Parmi les autres gènes testés, seule l'expression du gène *StDES* était augmentée de façon significative chez RB9, suggérant une activation de cette branche, qui mène à la formation de divinyl éthers tels que l'acide colnelénique et colneléique, des oxylipines connues pour leur activité antimicrobienne (Göbel et al. 2001). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la LOX chez RB9 activerait une voie de synthèse d'oxylipines qui pourraient jouer un rôle dans la défense contre *S. scabiei*. D'autres analyses, telle qu'une détermination de oxylipines présentes dans les tubercules de RB9, seront utiles pour supporter ces résultats.

Effet des inhibiteurs de lipoxygénase sur l'infection de mini-tubercules par S. scabiei

Afin de déterminer si l'augmentation de l'abondance de la LOX chez les tubercules de RB9 active une voie de défense protégeant les tubercules contre *S. scabiei*, nous avons traité des minitubercules avec des inhibiteurs de l'activité de LOX et infectés ces minitubercules avec *S. scabiei*. L'utilisation de minitubercules permet de synchroniser leur production et l'infection par *S. scabiei*. Il est également possible de traiter le bourgeon foliaire directement avec le composé à l'étude (Fig. 1).

Trois essais ont été réalisés pour cette expérience, avec deux inhibiteurs soit le naproxène (Nap) utilisés dans les trois essais, et l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) utilisé dans les deux derniers essais. Le naproxène est un anti-inflammatoire non stéroïdien qui a été utilisé pour inhiber l'activité LOX dans les cellules de soja en culture (Creelman et al. 1992) et aussi pour déterminer le rôle des LOX dans le développement de tubercules de pomme de terre (Kolomiets et al. 2001). Pour sa part, le NDGA a permis d'inhiber l'activité LOX dans plusieurs espèces végétales telles que la tomate, la pomme de terre et le soja (del Carmen Pinto et al. 2007; Ealing 1994). Les inhibiteurs de LOX utilisés dans notre étude, dont le NDGA, agissent en réduisant l'enzyme active Fe^{3+} à la forme inactive Fe^{2+} , perturbant ainsi le cycle redox de LOX et provoquant son inactivation (Manda et al. 2020; Maccarrone et al. 2001).

Les résultats présentés à la Figure 4 montrent que l'indice de gale commune chez les minitubercules infectés de RB9 était toujours inférieur à celui de ceux de la lignée parentale, confirmant la plus grande résistance à la gale commune chez les minitubercules de RB9 (Beaudoin et al. 2021). Sauf pour les traitements au naproxène dans l'essai 1 pour RB et dans l'essai 3 pour RB9, la sévérité des symptômes de gale commune a été augmentée par les traitements aux inhibiteurs de LOX à la fois chez RB et RB9, suggérant que l'inhibition de l'activité LOX augmente l'infection par *S. scabiei*. Cependant, même si la tendance est conservée dans les différents essais, les analyses statistiques n'ont pas confirmé de changement significatif dans les minitubercules infectés et traités aux inhibiteurs par rapport aux témoins infectés sans traitements. Il faut donc rester prudent dans l'interprétation des résultats de ces

essais. Le fait que seulement 10 minitubercules ont été étudiés par condition pourrait expliquer ces résultats, une analyse à plus grande échelle est donc souhaitable.

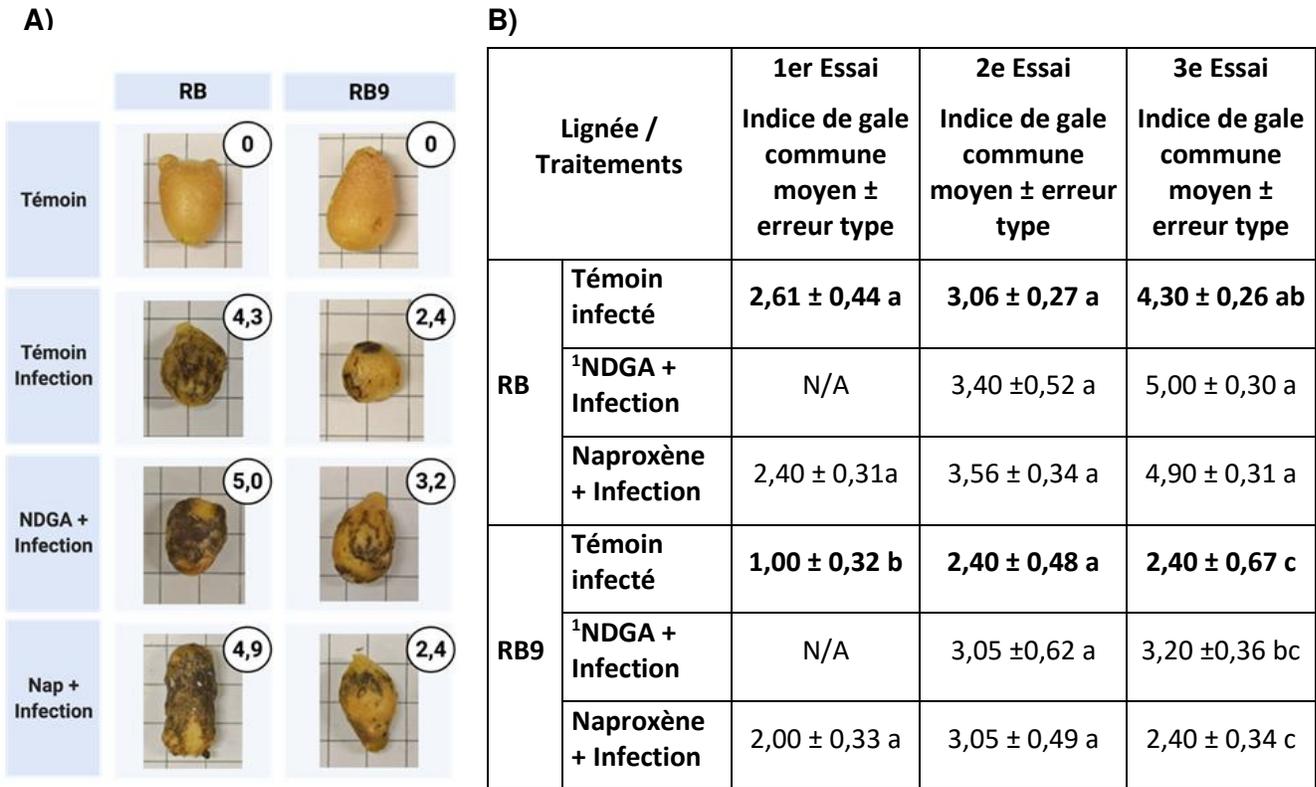


Figure 4. Effet des inhibiteurs de lipoxygénase sur l'indice de gale commune des minitubercules du somaclone RB9 et de la variété parentale RB. A) Images représentatives de minitubercules de RB et RB9 non infectés (témoïn), infectés par *S. scabiei* et traités avec les inhibiteurs de lipoxygénase soit acide nordihydroguaiarétique (NDGA) et Naproxène (Nap) après 21 jours. L'indice moyen de gale commune est indiqué pour chaque condition. **B)** Valeurs des indices moyens de gale commune pour trois essais d'infection avec *S. scabiei* et combinés avec les inhibiteurs de LOX NDGA et Naproxène chez des minitubercules de RB et RB9. Pour chaque essai, 10 minitubercules ont été utilisés par traitement. Les lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes au cours d'un même essai (ANOVA, $P < 0,05$).

Abondance, activité et expression de la LOX pendant l'infection et après traitements avec les inhibiteurs de LOX

L'abondance, l'activité et l'expression de LOX ont été évaluées dans les minitubercules présentés précédemment après 21 jours d'infection (Fig. 5). Une augmentation de l'abondance de LOX de 2,2 fois a été détectée par immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement les LOX dans les minitubercules de RB9 comparés à ceux de RB, confirmant les résultats obtenus dans l'analyse protéomique de jeunes tubercules (Isayenka 2020). L'abondance de LOX a aussi été augmentée par l'infection par *S. scabiei* à la fois chez RB (plus de 2,5 fois) et chez RB9 (plus de 2,3

fois) par rapport à leur témoin respectif. Une augmentation de l'accumulation de LOX a souvent été rapportée dans l'activation des réponses de défense (Hou et al. 2018; Hwang and Hwang 2010; Perla et al. 2014; Viswanath et al. 2020). Nos résultats suggèrent donc que l'infection par *S. scabiei* pourrait activer la voie de LOX chez les minitubercules afin de se défendre contre l'infection. Fait intéressant, l'accumulation de LOX chez les minitubercules de RB9 non infectés était déjà à un niveau comparable à celui induit par l'infection dans les tubercules de RB. Ces données suggèrent que les minitubercules de RB9 ont déjà un niveau élevé de LOX même en absence d'infection, ce qui pourrait leur permettre de se défendre plus rapidement et/ou de façon plus intense lors de l'infection pathogène.

Les traitements aux inhibiteurs de LOX chez les minitubercules infectés n'ont pas eu d'effet significatif sur l'abondance de la LOX sauf pour une augmentation de la LOX chez les minitubercules de RB en réponse au NDGA. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la LOX a peu ou pas d'effet sur l'abondance de la LOX.

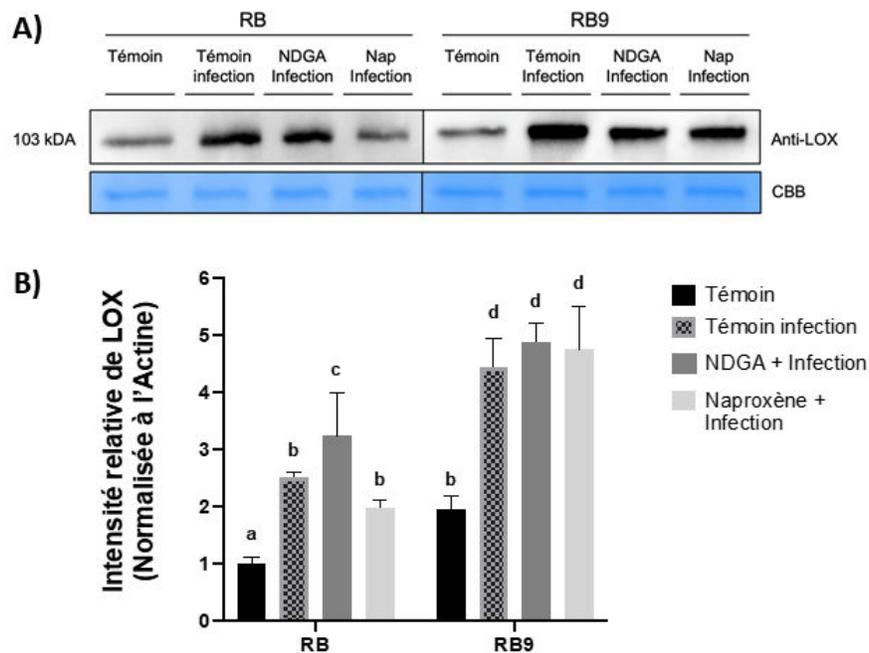


Figure 5. Évaluation de l'abondance de la lipoxygénase (LOX) chez les minitubercules de RB et RB9 infectés par *S. scabiei* et traités avec des inhibiteurs de LOX. A) Image représentative de l'accumulation de LOX telle que détectée par immunobuvardage de type western avec un anticorps spécifique (anti-LOX) chez des minitubercules de RB et RB9 infectés par *S. scabiei* et traités avec le NDGA et Naproxène après 21 jours. 5 µg de protéines solubles ont été chargés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 12 % (w/v). CBB = coloration au bleu de Coomassie. **B)** Intensité relative de la bande correspondant à la LOX détectée par immunobuvardage et normalisée par rapport à l'abondance de l'actine. Les valeurs représentent la moyenne des intensités relatives de trois expériences sauf pour ce qui est du traitement au NDGA qui a été réalisé 2 fois. Les lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes (ANOVA, P < 0,05).

L'activité de la LOX a ensuite été évaluée dans les minitubercules infectés par *S. scabiei* et traités avec les inhibiteurs (Fig. 6). L'activité enzymatique a été mesurée par une méthode inspirée de la

méthode d'oxydation ferreuse-xylénol orange (FOX) (del Carmen Pinto et al. 2007; Timabud et al. 2013), qui détermine la production d'hydroperoxydes d'acide gras. Cette activité était 1,6 fois plus élevée dans les minitubercules témoin de RB9 comparés à ceux de RB, soit 2,8 vs 4,6 nM d'hydroperoxydes d'acide gras produits par min et par μg de protéine respectivement. Ceci montre que l'augmentation de l'abondance de la LOX chez RB9 est corrélée avec une augmentation de son activité. De même, l'infection par *S. scabiei* a augmenté l'activité de la LOX pour atteindre 3,9 nM/min/ μg protéine chez RB et 5,0 nM/min/ μg protéine chez RB9, montrant que l'augmentation de l'accumulation de LOX en réponse à l'infection est aussi corrélée avec une plus grande activité. Ces données appuient notre hypothèse que la voie de LOX est activée dans les minitubercules en réponse à l'infection, et que cette voie est déjà plus active chez RB9 même avant l'infection.

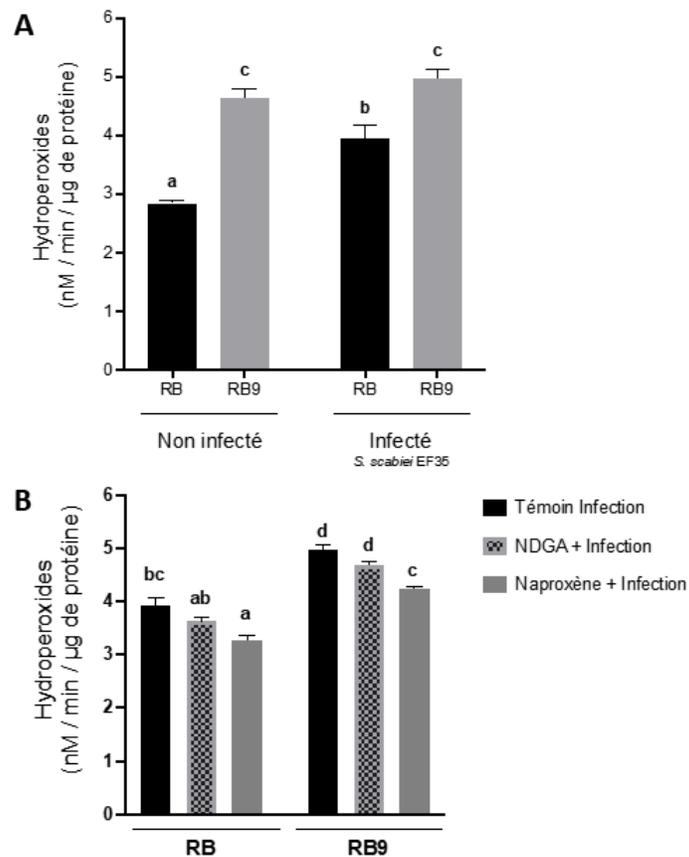


Figure 6. Activité lipoxigénase (LOX) dans les minitubercules de Russet Burbank (RB) et RB9 infectés ou non avec *S. scabiei* EF35 et traités avec des inhibiteurs d'activité LOX. A) Activité LOX dans des minitubercules de RB et RB9 infectés ou non par *S. scabiei*. **B)** Activité LOX dans des minitubercules de RB et RB9 infectés par *S. scabiei* et traités avec le NDGA et le Naproxène. L'activité LOX a été déterminée par l'essai d'oxydation ferreuse-xylénol orange (FOX) dans les minitubercules de RB et RB9 non-infectés ou après 21 jours d'infection par *S. scabiei* EF35. 1 μg de protéines solubles totales a été utilisé pour l'activité enzymatique mesurée à 560 nm à température ambiante. L'activité spécifique a été exprimée en Vmax de produit formé par unité de temps par quantité de protéine (nM d'hydroperoxydes d'acide linoléique/min/ μg de protéine totale). Les barres d'erreur indiquent l'erreur type de trois réplicats biologiques. Les lettres différentes représentent des moyennes significativement différentes (ANOVA ; $P < 0,05$). Les expériences ont été répétées deux fois, avec des résultats similaires.

Nous avons également évalué l'expression d'un gène de la LOX pendant le processus d'infection. Le gène choisi code pour une LOX dont l'abondance était augmentée de 1,8 fois pendant l'analyse protéomique et qui a été rapportée pour être impliquée dans la voie de synthèse des oxylipines impliquant la DES (Fauconnier et al. 2008; Royo et al. 1996). Les résultats obtenus pour les essais 2 et 3 (Fig. 7) montrent une très grande variabilité de l'expression de ce gène, bien qu'il y ait une tendance vers une plus grande expression en réponse à l'infection, autant chez RB que RB9. Il a été rapportée que l'augmentation de l'expression de LOX lors d'infection pathogène est souvent observée dans les premiers jours de l'infection (Fammartino et al. 2007; Fauconnier et al. 2008). Puisque cette analyse a été réalisée après 21 jours d'infection, il est fort probable que l'expression du gène n'est plus régulée par la présence de l'agent pathogène. De nouvelles analyses suivant l'expression du gène au cours des premiers jours de l'infection seront nécessaires pour déterminer si l'augmentation de l'abondance de la LOX est aussi corrélée à une augmentation de l'expression du gène.

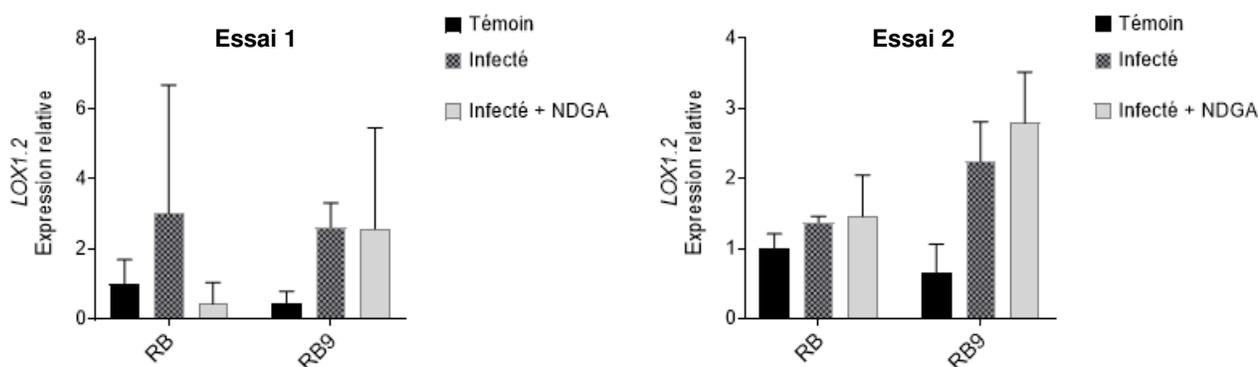


Figure 7. Analyse de l'expression du gène de *LOX1.2* chez les minitubercules de Russet Burbank (RB) et RB9 témoin, infectés avec *S. scabiei* et traités avec le NDGA après 21 jours d'infection. L'expression relative a été évaluée par RTqPCR en comparant l'expression de *LOX1.2* chez les minitubercules de RB9 à celle chez la variété d'origine. Le gène de référence utilisé est 18S. Les données représentent la moyenne des valeurs obtenues pour trois pools de deux minitubercules chacun. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type.

Rôle de l'accumulation de la ferritine et du fer dans l'interaction tubercules – *Streptomyces scabiei*

Les somaclones YG8 et YG32 ont été régénérés à partir de cellules de pomme de terre la variété parentale Yukon Gold (YGP) habituées à la TA. Ces deux somaclones sont plus résistants à la gale commune que la variété d'origine (Labidi 2020). Une analyse comparative du protéome des tubercules des somaclones et de YGP a identifié 24 protéines dont l'abondance est augmentée d'au moins 2 fois ($P > 0,05$), autant chez YG8 que YG32 comparé à YGP. La ferritine est la protéine dont l'abondance a le plus augmenté par rapport à YGP, avec une augmentation de 11 et 19 fois chez les tubercules de YG8 et YG32, respectivement (Labidi 2020). Ce changement est aussi corrélé avec une augmentation de l'abondance du fer de 70 et 118% dans les tubercules de YG8 et YG32, respectivement, par rapport à ceux de YGP (Labidi 2020).

La ferritine est une protéine qui séquestre le fer, prévenant ainsi son interaction avec l'oxygène et la formation d'espèces actives de l'oxygène (ROS). Elle participe à l'homéostasie du fer en convertissant l'ion ferreux en ion ferrique non réactif qu'elle entrepose et libère selon les besoins de la cellule (Arosio et al. 2009). L'entreposage du fer par la ferritine jouerait également un rôle dans la défense, tel que lors de l'interaction d'*Arabidopsis thaliana* et *Erwinia chrysanthemi*, où la ferritine a été montrée nécessaire pour réduire les symptômes d'infection (Briat et al. 2010; Dellagi et al. 2005). D'un autre côté, les bactéries pathogènes ont également besoin de fer pour leur croissance et synthétisent des molécules chélatrices appelées sidérophores qui leur permettent d'acquérir le fer dont elles ont besoin (Dellagi et al. 2005; Franza et al. 2005). La synthèse de sidérophores pendant l'interaction plante – agent pathogène suggère l'existence d'une compétition entre la plante et l'agent pathogène pour l'acquisition du fer (Aznar et al. 2014; Neema et al. 1993). Cette partie du projet s'est intéressée à étudier la contribution de l'augmentation de la ferritine dans les somaclones YG8 et YG32 dans la protection contre *S. scabiei*.

Localisation histochimique et quantification du fer

Il a été montré que les tubercules de YG8 et YG32 accumulent davantage de fer que les tubercules de YGP (Labidi 2020). Pour déterminer si la localisation du fer chélaté par la ferritine se retrouve dans les portions internes (chair) ou externes (périderme) du tubercule, nous avons réalisé une coloration Perls suivie d'une intensification par le DAB, un procédé qui détecte la présence du fer par une coloration brune (Fig. 8)(Meguro et al. 2007). Étant donné que la distribution du fer est corrélée à la distribution de la ferritine (van Duijn et al. 2013), ces analyses donneront également une idée de la localisation de la ferritine dans les tubercules.

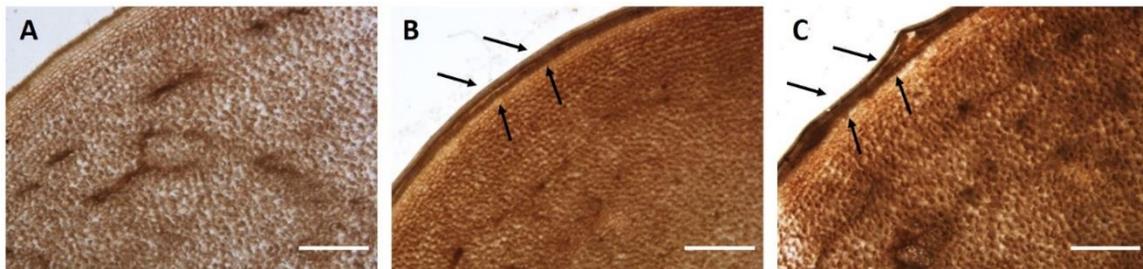


Figure 8. Déposition du fer en bordure du périderme dans les tubercules matures des somaclones YG8 et YG32 comparés à ceux de YGP. Les images représentent des sections de tranches de tubercules coupées longitudinalement après coloration de Perls et intensification par le diaminobenzidine (DAB). **A)** Yukon Gold parent (YGP); **B)** somaclone YG8 et **C)** somaclone YG32. Les images ont été prises avec un stéréomicroscope Leica. Les flèches indiquent une coloration brune plus intense qui représente l'accumulation de fer près du périderme de YG8 et YG32. L'échelle représente 1 mm. Trois tubercules ont été analysés pour chaque lignée avec des résultats semblables.

Dans tous les échantillons, on observe une coloration brune plus marquée au niveau de l'anneau vasculaire, indiquant une accumulation de fer associée au système vasculaire des tubercules. Une coloration plus intense est observée dans les couches vivantes du périderme chez YG8 et YG32 (indiqué par des flèches à la Fig. 8B-C) mais absente chez YGP. Ces données suggèrent que chez les somaclones

plus résistants à la gale commune, le fer et la ferritine s'accumulent davantage en bordure du périoderme alors que ce n'est pas le cas chez la variété parentale. Puisque le périoderme est la première barrière à l'entrée de la bactérie, il est possible que l'accumulation de fer à cet endroit joue un rôle pour freiner l'entrée de la bactérie. Cette hypothèse n'est toutefois pas appuyée par des résultats de quantification du fer par ICP-MS (Fig. 9) qui montrent que seule la chair et non le périoderme des somaclones accumule davantage de fer. Des analyses de localisation plus précises au niveau des différentes couches du périoderme pourraient nous aider à mieux préciser les sites d'accumulation du fer.

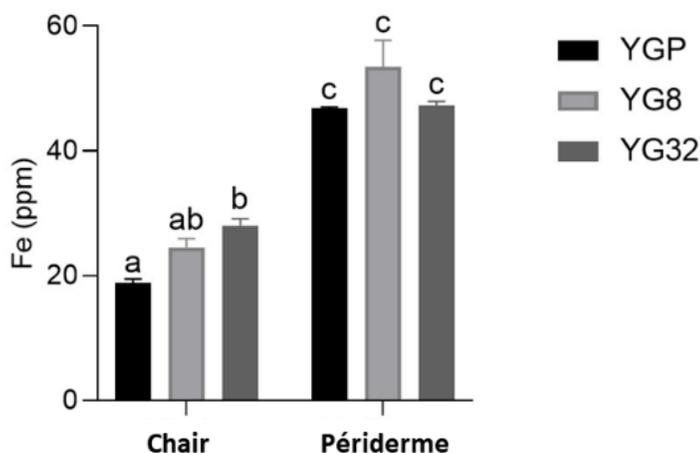


Figure 9. Quantification du fer (Fe) par ICP-MS dans la chair et périoderme de tubercules matures des somaclones YG8 et YG32 et de la variété Yukon Gold (YGP). Les résultats représentent la moyenne de la quantification en ppm de trois échantillons biologiques pour la chair de chaque lignée et deux pour le périoderme. Des lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes (ANOVA, P < 0,05).

Expression de gènes de synthèse de sidérophore en présence de microtubercules

L'accumulation de la ferritine et du fer dans les tubercules des somaclones YG8 et YG32 pourrait potentiellement réduire la disponibilité du fer pour *S. scabiei*. Un des mécanismes utilisés par les bactéries pour l'acquisition de fer est la synthèse et la libération de sidérophores qui seront transportés dans la bactérie une fois le fer chélaté (Franza et al. 2005). L'un des sidérophores produit par *S. scabiei* est la pyochéline dont la synthèse est régulée par un groupe de gènes présents dans le génome de *S. scabiei* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). Pour déterminer si la présence de tubercules stimule la synthèse de pyochéline chez les bactéries, nous avons évalué l'expression de gènes de synthèse de la pyochéline chez *S. scabiei*. Nous avons utilisé une approche *in vitro* qui permet de mettre en contact des microtubercules de pomme de terre et *S. scabiei* dans un milieu liquide (Fig. 2). Après cinq jours de co-culture, les bactéries ont été recueillies pour en extraire l'ARN alors que les microtubercules ont été conservés pour la quantification du fer. L'analyse de l'expression de gènes de synthèse de pyochéline chez *S. scabiei* cultivé en présence de microtubercules de YG8 a montré une légère augmentation (17%) significative de l'expression du gène *SCAB_1471* par rapport à l'expression de ce gène chez YGP (Fig. 10). Une tendance similaire a été observée pour le gène *SCAB_1481* mais ce changement n'était pas significatif. Ces résultats suggèrent que *S. scabiei* détecte en présence des microtubercules de YG8 une certaine carence en fer et active en retour la synthèse d'un gène de synthèse de pyochéline. Cette

activation étant relativement faible, il serait intéressant de déterminer si l'expression d'autres gènes impliqués dans l'acquisition ou le transport du fer sont également induit par la présence des microtubercules de YG8. Alors que la quantification du fer par ICP-MS dans les microtubercules de YG8 et YGP a montré un niveau semblable de fer en absence de bactéries, soit environ 48 ppm, la culture des microtubercules de YG8 avec *S. scabiei* a mené à une accumulation de fer dans ces microtubercules qui était de 96 ppm, soit plus de deux fois celle retrouvée dans les microtubercules infectés de la variété parentale à 43 ppm (Fig. 10C). Ces données montrent que les microtubercules de YG8, qui contiennent plus de ferritine que ceux de YGP, accumulent davantage de fer en réponse à la bactérie. D'autre part, *S. scabiei* réagit à la présence des microtubercules de YG8 en activant la synthèse de sidérophore, suggérant une possible compétition pour le fer entre les microtubercules de YG8 et *S. scabiei*.

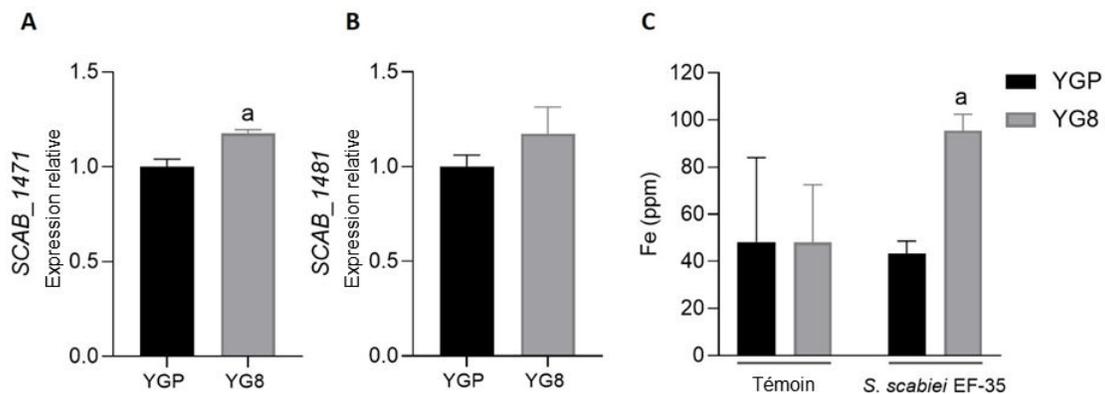


Figure 10. Analyse de l'expression de gène de synthèse de la pyochéline chez *S. scabiei* en présence de microtubercules de YG8 et YGP et quantification du fer par ICP-MS dans les microtubercules. Des microtubercules du somaclone YG8 et de la variété parentale YVP ont été co-cultivés avec *S. scabiei* ou en absence de bactéries (témoin). L'expression relative de gènes de synthèse de pyochéline a été analysée par RTqPCR chez *S. scabiei* co-cultivée avec YG8 et comparé à la co-culture avec YGP. **A)** *SCAB_1471* (t-test; n=3, a: P < 0.05); **B)** *SCAB_1481*. Le gène *gyrA* a été utilisé comme gène de référence. **C)** Quantification du fer par ICP-MS dans des microtubercules de YGP et YG8 cultivés avec ou sans *S. scabiei* EF-35 (t-test; n=3, a: P < 0.05). Les barres d'erreur représentent l'erreur-type. Les données représentent la moyenne de trois réplicats biologiques.

Effet de *S. scabiei* combinée à l'ajout d'un chélateur sur la sévérité de l'infection des minitubercules et l'expression du gène de ferritine

L'augmentation de l'abondance de la ferritine chez les somaclones de YG8 et YG32 a été corrélée à une plus grande expression du gène de ferritine (*FER1*) (Labidi 2020). Il a été montré précédemment dans différentes interactions plante-pathogène que la ferritine est importante pour la défense, et que l'expression du gène de la ferritine peut augmenter en réponse à l'infection (Briat et al. 2010; Deak et al. 1999; Dellagi et al. 2005). En particulier, l'infection de feuilles de pomme de terre par *Phytophthora infestans* a stimulé une augmentation de l'expression du gène de ferritine (García Mata et al. 2001). Pour évaluer si l'expression de la ferritine dans les tubercules est induite suite à l'infection par *S. scabiei*, nous avons utilisé tel que décrit plus haut des minitubercules de pomme de terre de 7 jours qui ont été infectés de façon synchrone par *S. scabiei* (Fig. 1).

Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'expression du gène *FER1* était également augmentée chez les minitubercules tel qu'observé dans les tubercules matures (Fig. 11). Chez les tubercules matures, l'expression de *FER1* mesurée était chez YG8 1,5 fois et chez YG32 1,8 fois supérieure à celle observée chez YGP. L'expression de *FER1* était aussi plus élevée chez les minitubercules des somaclones, avec un niveau près de 3 fois et 3,7 fois supérieur chez YG8 et YG32 respectivement comparé à YGP. Ces résultats indiquent que l'utilisation des minitubercules pour évaluer l'effet de l'augmentation de l'abondance de la ferritine chez les somaclones est un bon système pour cette étude.

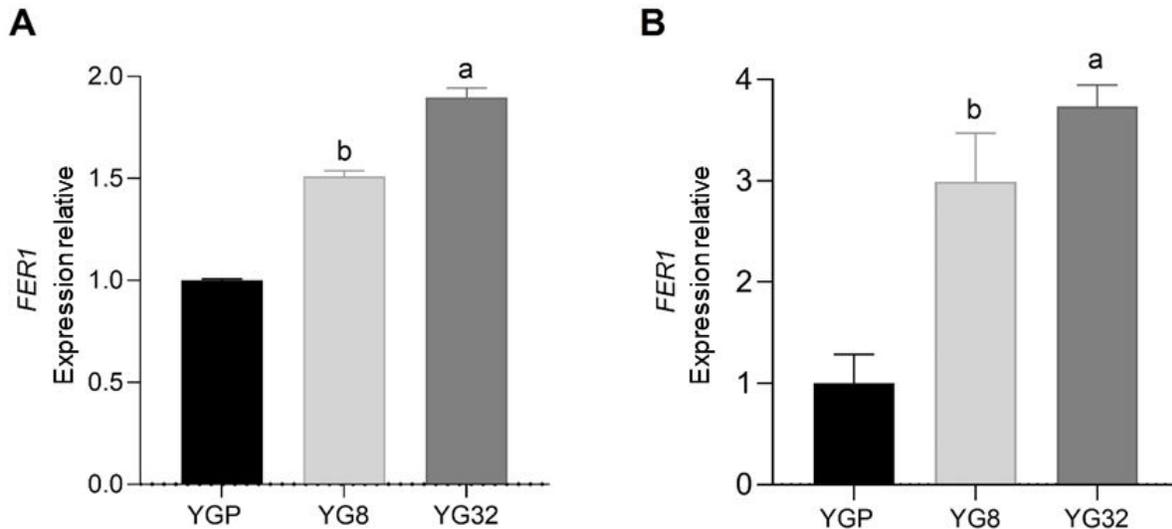


Figure 11. Analyse de l'expression du gène de ferritine (*FER1*) chez des tubercules matures et des minitubercules de la variété parentale Yukon Gold (YGP) et des somaclones YG8 et YG32. A) Tubercules matures. B) Minitubercules. L'expression relative a été évaluée par RTqPCR en comparant l'expression de *FER1* chez YG8 et YG32 avec celle de YGP. Le gène de référence utilisé est 18S. Les lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes (ANOVA, $P < 0,05$, $n = 3$). Les barres d'erreur indiquent l'erreur type. Les données ont été obtenues de 3 tubercules matures ou de 3 pools de 2 à 4 minitubercules chacun.

En plus de l'effet de l'infection par *S. scabiei*, nous avons évalué l'effet d'un chélateur, le déferoxamine mésylate (DFOM), qui mime l'effet du sidérophore déferoxamine B produit par *Streptomyces pilosus* lorsque le fer est en quantité limitante (Fig. 12)(Bellotti and Remelli 2021). Fait intéressant, *S. scabiei* possède également les gènes de synthèse du déferoxamine E (Liu et al. 2021). Il a été rapporté que le DFOM peut relâcher le fer séquestré par la ferritine (De Serrano 2017). Ainsi, un traitement des minitubercules au DFOM devrait réduire la quantité de fer entreposé dans les tubercules. Ce traitement devrait également libérer du fer qui pourrait ainsi devenir disponible pour les bactéries. Le DFOM a été ajouté aux minitubercules juste avant l'infection par *S. scabiei*. Des minitubercules non infectés avec ou sans traitement ont été conservés comme témoins. L'effet du traitement au DFOM seul sur l'expression de *FER1* a été évaluée après 8 h et 24 h. Après 17 jours d'infection, la sévérité de la maladie a été évaluée pour les minitubercules (Fig. 12) et l'expression de *FER1* a été mesurée par RTqPCR (Fig. 13).

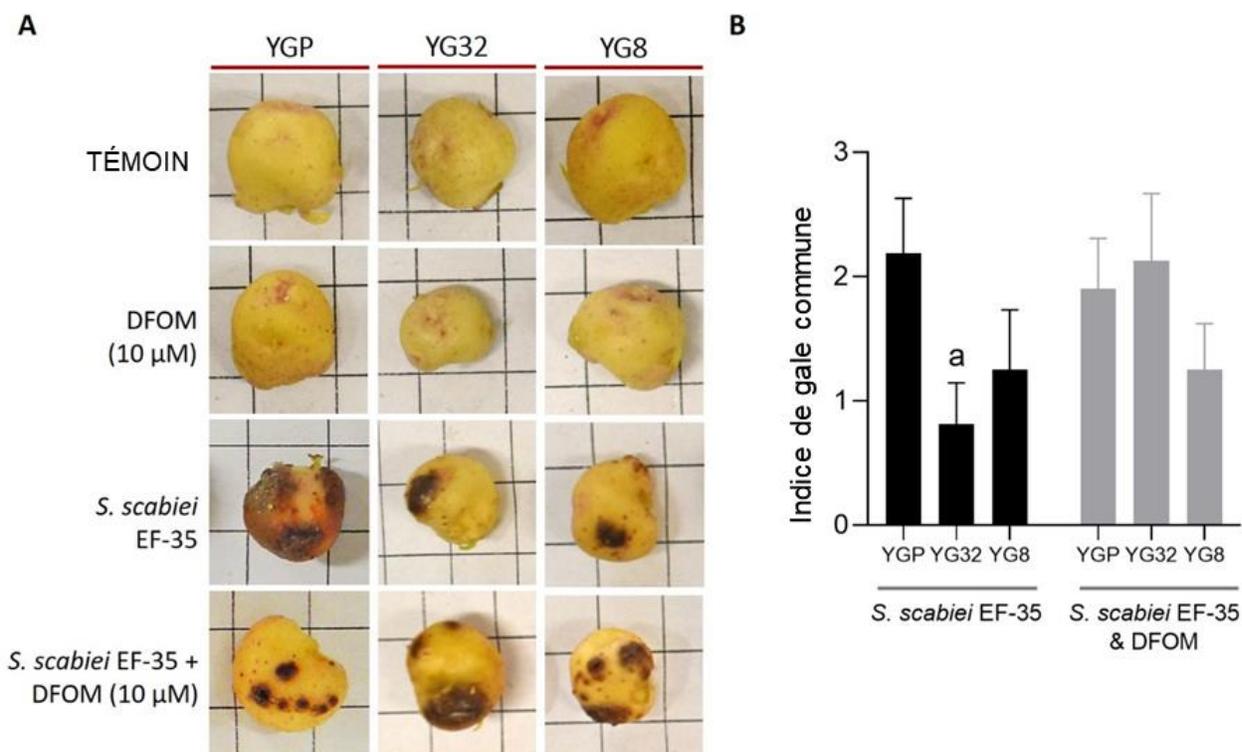


Figure 12. Évaluation de l'indice de gale commune chez les minitubercules de YG8, YG32 et YGP infectés par *S. scabiei* pendant 17 jours. A) Photos représentatives des minitubercules témoins, traités au DFOM, infectés par *S. scabiei* ou traités au DFOM et infectés. B) Graphique représentant l'index de gale commune moyen pour les tubercules infectés de YGP, YG8 et, YG32 sans traitement ou traités au DFOM. L'indice moyen de sévérité de la gale commune a été calculé en faisant la moyenne des indices pour chaque minitubercule évalué par une valeur de 0 à 6 représentant le pourcentage de surface du minitubercule couverte de lésions, où 0 = sans lésions; 0,5 = moins de 1%; 1 = 1 à 5%; 2 = 6 à 10%; 3 = 11 à 25%; 4 = 26 à 50%; 5 = 51 à 75%; et 6 = 76 à 100%. Les données ont été obtenues de 8-10 minitubercules par traitement. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type. La lettre 'a' indique une moyenne significativement différente (t-test; $P < 0,05$). Cette expérience a été répétée deux fois avec des résultats semblables.

Comme présenté à la Fig. 12A, l'indice de sévérité de la gale commune était plus faible chez les minitubercules de YG8 et YG32 que chez ceux de YGP, avec une différence significative pour les minitubercules de YG32 ($P < 0,05$). Le pré-traitement des minitubercules au DFOM a restauré le niveau de gale commune chez YG32 à celui observé chez la variété d'origine. Étant donné que le DFOM chélate le fer séquestré par la ferritine, ces résultats indiquent que la diminution de fer dans les tubercules du somaclone YG32 contribue à augmenter l'infection par *S. scabiei*, mais cet effet pourrait être indirect. Dans ces conditions, il est en fait probable que le DFOM rend le fer disponible à la bactérie, ce qui favoriserait alors sa croissance et l'infection des minitubercules.

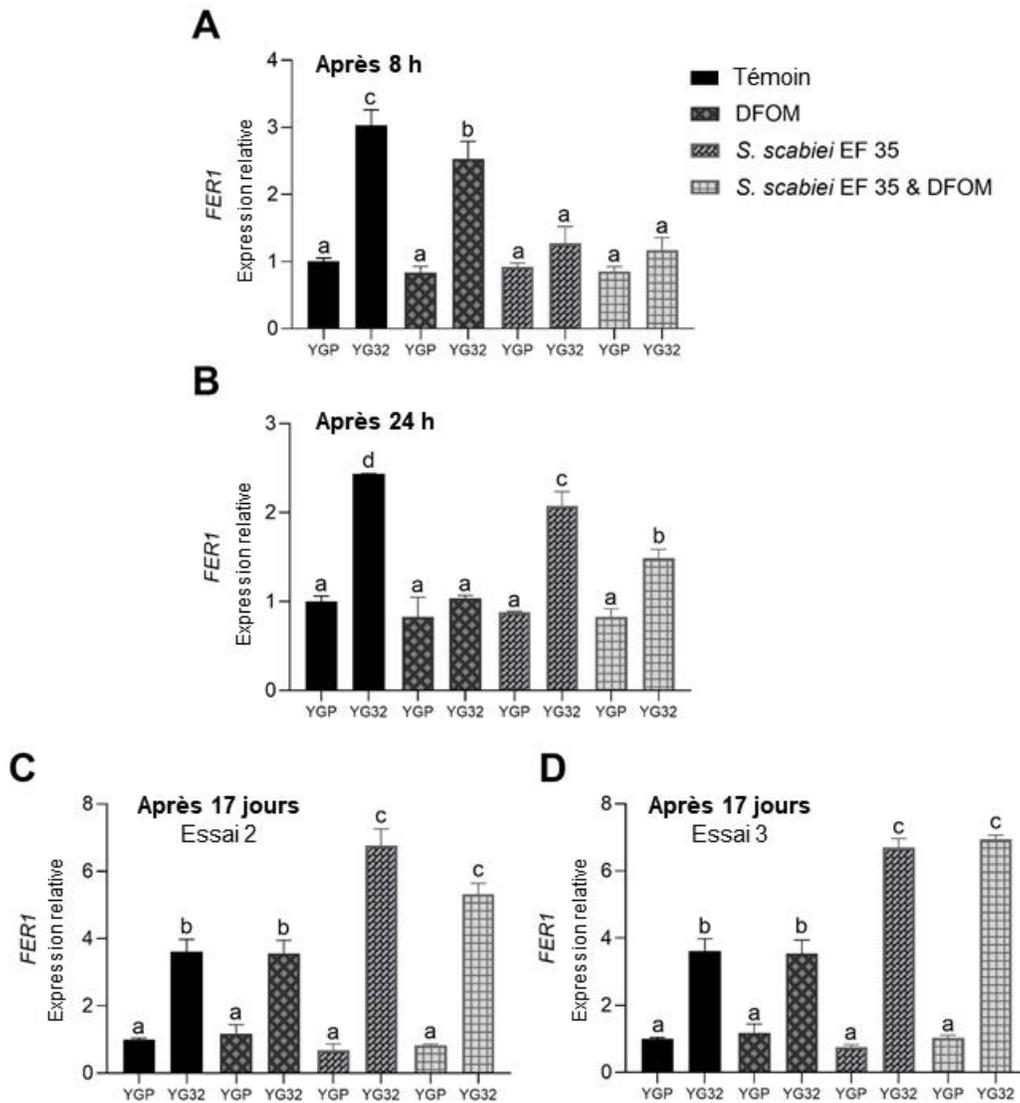


Figure 13. Analyse de l'expression du gène de ferritine (*FER1*) en réponse au traitement au déferoxamine mésylate (DFOM) et en présence ou non de *S. scabiei* chez les minitubercules des somaclone YG32 et la variété Yukon Gold (YGP). A) 8 h après le traitement au DFOM et /ou l'infection par *S. scabiei* B) 24 h après le traitement au DFOM et/ou l'infection par *S. scabiei*, C) 17 jours après le traitement au DFOM et/ou l'infection par *S. scabiei*, essai 2, D) 17 jours après le traitement au DFOM et/ou l'infection par *S. scabiei*, essai 3. L'expression relative a été évaluée par RTqPCR en comparant l'expression de *FER1* chez tous les échantillons à celui du témoin non traité (YGP). Le gène de référence utilisé est 18S. Les données représentent la moyenne de trois réplicats biologiques constitués de pool de 4 à 6 minitubercules. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type. Les lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes (ANOVA, $P < 0,05$).

L'expression de *FER1* dans les témoins était pendant toute l'expérience de 2,6 à 3,6 fois plus élevée dans les minitubercules de YG32 comparé aux minitubercules de YGP. Ceci confirme les résultats obtenus à la Fig. 12. Pour l'ensemble des traitements et pendant toute la durée de l'expérience, l'expression de

FER1 est restée semblable au témoin dans les minitubercules de YGP (Fig. 13). Pour les minitubercules de YG32, le traitement au DFOM seul a commencé à réduire l'expression de *FER1* de 3 à 2,5 après 8 h jusqu'à un niveau comparable à celui du témoin YGP après 24 h. En présence de la bactérie seulement, l'expression de *FER1* chez YG32 a été réduite à un niveau semblable à celui du témoin YGP après 8 h, mais a été augmenté à un niveau s'approchant de celui du témoin YG32 après 24 h, soit près de 2 fois comparé à 2,5 fois. Après 17 jours, le niveau d'expression de *FER1* était supérieur à celui du témoin YG32, à plus de 6 fois comparé à 3,6 chez le témoin YG32, suggérant une induction supplémentaire de l'expression de la ferritine chez YG32 stimulé par les bactéries. Lorsque les minitubercules ont été à la fois traités au DFOM et infectés par *S. scabiei*, l'expression après 8 h a diminué au niveau de celui du témoin YGP, mais a augmenté à 1,5 fois après 24 h tout en restant à un niveau inférieur à celui observé en présence de bactérie seule. Par contre, l'expression à la fin de l'expérience était semblable à celle observée en présence de la bactérie, soit un niveau supérieur au témoin YG32 non infecté.

Dans un premier temps, ces données indiquent que l'expression du gène de ferritine n'est pas induite en présence de bactéries dans les minitubercules de la variété Yukon Gold. Ceci suggère que les tubercules de pomme de terre, chez cette variété tout au moins, n'utilise pas l'induction de la ferritine *FER1* comme réponse de défense. De même, le traitement au DFOM n'a pas eu d'impact sur l'expression de la *FER1* dans les minitubercules de YGP. En revanche, chez le somaclone YG32, qui exprime déjà davantage de ferritine en absence de *S. scabiei*, on observe d'abord une réduction de l'expression de *FER1* dans les premiers 8 h pour éventuellement observer une augmentation de l'expression de *FER1* à 24 h pour dépasser les niveaux d'expression du témoin YG32 à la fin de l'expérience en présence de la bactérie. Ces résultats suggèrent des changements importants dans la régulation de l'expression de ce gène chez ce somaclone dans la réponse à *S. scabiei*. Au début de l'infection, il est probable que la disponibilité du fer est réduite initialement par la présence de la bactérie qui doit également acquérir du fer, ce qui réduirait la nécessité d'induire la synthèse de ferritine. Mais rapidement, l'expression du gène est rétablie et même induite à un niveau supérieur à celui du témoin, ce qui potentiellement contribuerait à réduire l'incidence de la maladie. Cependant, lorsque les minitubercules sont traités au DFOM, l'expression du gène de *FER1* reste plus faible (1,5 fois après 24 h) par rapport au témoin YG32, réduisant ainsi la capacité de stockage du fer dans les minitubercules dès les premiers stades de l'infection. Comme mentionné précédemment, le DFOM lui-même peut potentiellement aider *S. scabiei* à acquérir le fer dont elle a besoin, stimulant sa croissance et favorisant l'infection. Ces résultats concordent d'ailleurs avec une plus grande infection des minitubercules de YG32 par *S. scabiei* lors qu'ils sont préalablement traités au DFOM (Fig. 12).

Ces derniers résultats, combinés à ceux obtenus avec les microtubercules, suggèrent que l'augmentation de l'abondance de la ferritine contribuerait à augmenter la capture du fer dans les minitubercules, réduisant ainsi la disponibilité du fer pour *S. scabiei*. Des analyses de l'implication des transporteurs du fer, à la fois dans les tubercules et chez *S. scabiei* pendant leur interaction, permettront d'étayer l'hypothèse d'une compétition entre les tubercules et la bactérie pour le fer. On ne peut toutefois pas exclure la possibilité que l'accumulation de la ferritine elle-même, de par son effet protection contre la production de ROS et le stress oxydatif, jouerait un rôle plus direct dans la protection contre l'infection par *S. scabiei*. Des analyses de la production de ROS dans les tubercules des somaclones YG8 et YG32 comparés à ceux de YGP en réponse à l'infection pourraient nous permettre d'évaluer cette hypothèse.

Analyse des somaclones habitués à la thaxtomine A produits à partir de différentes variétés de pomme de terre.

La méthode d'habituation à la TA a été appliquée, avec quelques modifications, à d'autres variétés de pomme de terre. Des somaclones plus résistants à la gale commune ont été identifiés par un test d'infection avec des minitubercules par des tests d'infection en pots (Isayenka 2020). À partir de tubercules produits en serre, nous avons déterminé si l'habituation à la TA chez ces somaclones est associée à des changements tels que ceux observés dans ce projet, soit l'augmentation de l'abondance de la LOX chez le somaclone RB9 ou encore l'accumulation de ferritine chez les somaclones YG8 et YG32.

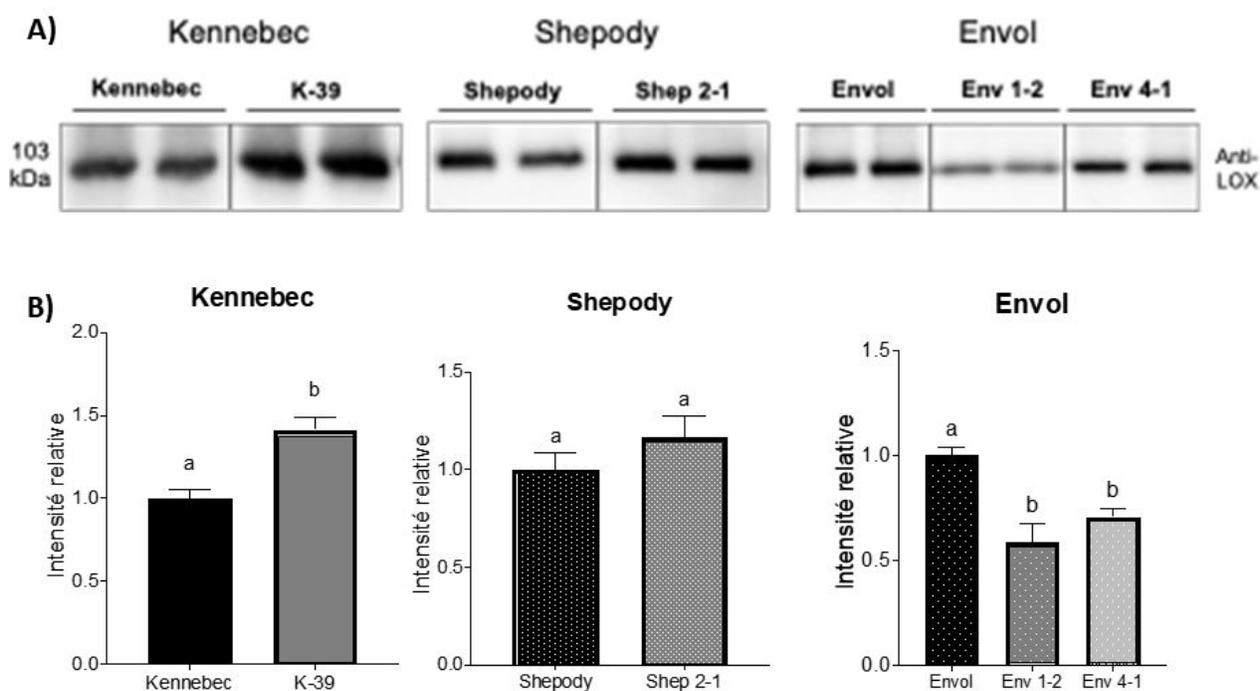


Figure 14. Évaluation de l'abondance de la lipoxigénase chez les tubercules de somaclones habitués à la thaxtomine A et la variété parentale correspondante **A)** Image représentation de l'accumulation de lipoxigénase telle que détectée par immunobuvardage de type western avec un anticorps spécifique (anti-LOX) chez des tubercules de somaclones habitués à la TA et la variété d'origine correspondante. 5 µg de protéines solubles ont été chargés sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 12 % (w/v). **B)** Intensité relative de l'abondance de LOX détectée par immunobuvardage. Les valeurs représentent la moyenne des intensités relatives obtenues pour quatre tubercules différents. Les lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes (t-test, $P < 0,05$).

L'analyse de l'abondance de la LOX estimée par immunobuvardage de type Western a montré une plus grande abondance de la LOX chez le somaclone K-39 (près de 1,5 fois) comparé à la variété parentale Kennebec (Fig. 14). Cependant, l'abondance de la LOX n'était pas significativement plus élevée pour les somaclones Shep 2-1 originaire de la variété Shepody, et était significativement moindre chez les somaclones Env-1-2 et Env-4-1 issus de la variété Envoy, ce qui suggère que la LOX pourrait

potentiellement contribuer à l'augmentation de la résistance à la gale commune chez le somaclone K-39, mais pas chez les autres.

Nous avons également évalué l'expression du gène *FER1* pour déterminer si des changements dans l'abondance de la ferritine pourraient expliquer l'augmentation de la résistance chez ces somaclones (Fig. 15). Une augmentation significative de l'expression de *FER1* (près de 5 fois) a été observée chez le somaclone K-39 par rapport à la variété d'origine Kennebec. L'expression a également été augmentée dans les tubercules des somaclones Env_1-2 et Env-4-1, sans que cette variation soit significative par rapport à la variété parentale Envol. Il serait intéressant de quantifier l'abondance du fer dans ces somaclones pour déterminer si l'augmentation de l'expression de *FER1* se traduit par une plus grande accumulation de ferritine (et donc de fer) comme observé chez les somaclones YG8 et YG32.

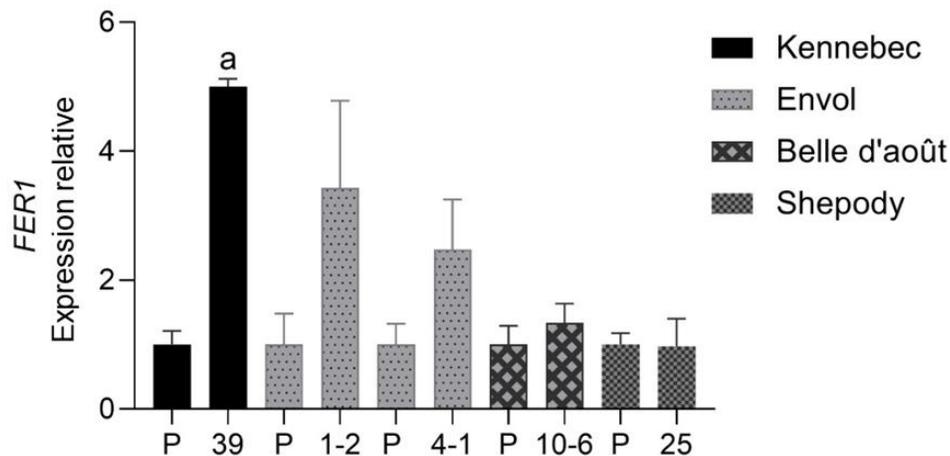


Figure 15. Analyse de l'expression du gène de ferritine (*FER1*) chez les tubercules de somaclones habitués à la thaxtomine A et la variété parentale correspondante. L'expression relative a été évaluée par RTqPCR en comparant l'expression de *FER1* chez le somaclone à celui de la variété d'origine. Le gène de référence utilisé est 18S. Les données représentent la moyenne des valeurs obtenues pour trois tubercules différents. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type. Les lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes (t-test, $P < 0,05$).

Ces données suggèrent que l'accumulation de ferritine combinée à celle de la LOX pourrait contribuer à augmenter la résistance à la gale commune dans le somaclone K-39. Néanmoins, il apparaît que les changements induits pendant l'habituation à la TA et qui mènent à une plus grande résistance à la gale commune ne semblent pas conservés d'une variété de pomme de terre à l'autre. Ainsi, plusieurs mécanismes pourraient contribuer à réduire l'infection par la gale commune chez la pomme de terre.

Conclusion

Nous avons développé des somaclones de pomme de terre habitués à la thaxtomine A qui sont plus résistants à la gale commune que les variétés dont ils sont issus. Le somaclone RB9, issu de la variété

Russet Burbank, produit dans ses tubercules une plus grande quantité de LOX, une protéine clé de la voie de synthèse des oxylipines. L'abondance et l'activité de la LOX augmentent dans les minitubercules de Russet Burbank en réponse à l'infection par *S. scabiei*, et cette réponse est amplifiée dans les minitubercules de RB9. Ces données suggèrent que la voie des oxylipines, médiée par l'activité LOX, serait davantage activée dans les minitubercules de RB9, ce qui contribuerait à stimuler la défense et augmenter la protection contre la gale commune. D'autre part, les somaclones YG8 et YG32, produits de la variété Yukon Gold, accumulent davantage de ferritine dans leurs tubercules que la variété d'origine. Une plus grande abondance de ferritine permet de séquestrer le fer dans les tubercules, le rendant probablement moins disponible pour *S. scabiei* qui en a besoin pour sa croissance et l'infection des tubercules. Lorsque le fer est libéré de la ferritine par un chélateur appliqué sur les minitubercules, l'infection par *S. scabiei* est plus intense, suggérant une disponibilité accrue du fer pour la bactérie et l'infection. Ces données proposent des pistes intéressantes à explorer pour mieux comprendre les mécanismes mis en place dans les tubercules pour se défendre contre *S. scabiei*.

Références

- Arosio, P., Ingrassia, R., and Cavadini, P. 2009. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790:589-599.
- Aznar, A., Chen, N. W., Thomine, S., and Dellagi, A. 2015. Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Science* 240:90-97.
- Aznar, A., Chen, N. W., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaele, D., Mouille, G., Boutet, S., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J. P., Thomine, S., Expert, D., and Dellagi, A. 2014. Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores. *Plant Physiology* 164:2167-2183.
- Beaudoin, N., Isayenka, I., Ducharme, A., Massie, S., Gagnon, A., Hogue, R., Beaulieu, C., and Michaud, D. 2021. Habituation to thaxtomin A increases resistance to common scab in 'Russet Burbank' potato. *PLoS ONE* 16:e0253414.
- Bellotti, D., and Remelli, M. 2021. Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules* 26.
- Bischoff, V., Cookson, S. J., Wu, S., and Scheible, W. R. 2009. Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Experimental Botany* 60:955-965.
- Blee, E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* 7:315-322.
- Braun, S., Gevens, A., Charkowski, A., Allen, C., and Jansky, S. 2017. Potato common scab: A review of the causal pathogens, management practices, varietal resistance screening methods, and host resistance. *American Journal of Potato Research* 94:283-296.
- Briat, J. F., Ravet, K., Arnaud, N., Duc, C., Boucherez, J., Touraine, B., Cellier, F., and Gaymard, F. 2010. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany* 105:811-822.

- Creelman, R. A., Tierney, M. L., and Mullet, J. E. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:4938-4941.
- De Serrano, L. O. 2017. Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields. *Biomolecular Concepts* 8:169-178.
- Deak, M., Horvath, G. V., Davletova, S., Torok, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Kiraly, Z., and Dudits, D. 1999. Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature biotechnology* 17:192-196.
- Dees, M., and Wanner, L. 2012. In Search of Better Management of Potato Common Scab. *Potato Research* 55:249-268.
- del Carmen Pinto, M., Tejeda, A., Duque, A. L., and Macías, P. 2007. Determination of lipoxygenase activity in plant extracts using a modified ferrous oxidation– xylene orange assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:5956-5959.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J. F., Gaymard, F., and Expert, D. 2005. Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant journal* 43:262-272.
- Duval, I., and Beaudoin, N. 2009. Transcriptional profiling in response to inhibition of cellulose synthesis by thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Cell Reports* 28:811-830.
- Duval, I., Brochu, V., Simard, M., Beaulieu, C., and Beaudoin, N. 2005. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta* 222:820-831.
- Ealing, P. M. 1994. Lipoxygenase activity in ripening tomato fruit pericarp tissue. *Phytochemistry* 36:547-552.
- Errakhi, R., Dauphin, A., Meimoun, P., Lehner, A., Reboutier, D., Vatsa, P., Briand, J., Madiona, K., Rona, J. P., Barakate, M., Wendehenne, D., Beaulieu, C., and Bouteau, F. 2008. An early Ca²⁺ influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *Journal of Experimental Botany* 59:4259-4270.
- Fammartino, A., Cardinale, F., Göbel, C., Mene-Saffrané, L., Fournier, J., Feussner, I., and Esquerré-Tugayé, M.-T. 2007. Characterization of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in tobacco. *Plant Physiology* 143:378-388.
- Fauconnier, M.-L., Rojas-Beltran, J., Dupuis, B., Delaplace, P., Frettinger, P., Gosset, V., and du Jardin, P. 2008. Changes in oxylipin synthesis after *Phytophthora infestans* infection of potato leaves do not correlate with resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:823-831.
- Franza, T., Mahe, B., and Expert, D. 2005. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology* 55:261-275.
- Fry, B. A., and Loria, R. 2002. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. *Physiol Mol Plant Pathol* 60:1-8.

- García Mata, C., Lamattina, L., and Cassia, R. O. 2001. Involvement of iron and ferritin in the potato–*Phytophthora infestans* interaction. *European Journal of Plant Pathology* 107:557-562.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., and Rosahl, S. 2001. Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *Journal of Biological Chemistry* 276:6267-6273.
- Gonzalez-Gordo, S., Bautista, R., Claros, M. G., Canas, A., Palma, J. M., and Corpas, F. J. 2019. Nitric oxide-dependent regulation of sweet pepper fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 70:4557-4570.
- Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* 88:442-445.
- Heinisch, O., Kowalski, E., Tauscher, B., and Ludwig, H. 1996. Staining for soybean lipoxygenase activity in electrophoretic gels. *Lipid/Fett* 98:183-184.
- Hill, J., and Lazarovits, G. 2005. A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Canadian journal of plant pathology. Revue Canadienne de Phytopathologie* 27:46-52.
- Hou, Y., Ban, Q., Meng, K., He, Y., Han, S., Jin, M., and Rao, J. 2018. Overexpression of persimmon 9-lipoxygenase DkLOX3 confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation* 84:179-189.
- Hwang, I. S., and Hwang, B. K. 2010. The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiology* 152:948-967.
- Isayenka, I. 2020. Augmentation de la résistance à la gale commune chez des variétés de pommes de terre produites au Québec. Thèse de doctorat. Université de Sherbrooke.
- Joshi, M. V., Bignell, D. R., Johnson, E. G., Sparks, J. P., Gibson, D. M., and Loria, R. 2007. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Molecular microbiology* 66:633-642.
- Kaiser, N., Coombs, J., Felcher, K., Hammerschmidt, R., Zuehlke, M., Buell, C., and Douches, D. 2020. Genome-wide association analysis of common scab resistance and expression profiling of tubers in response to Thaxtomin A treatment underscore the complexity of common scab resistance in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research* 97:513-522.
- Khatri, B. B., Tegg, R. S., Brown, P. H., and Wilson, C. R. 2010. Infection of potato tubers with the common scab pathogen *Streptomyces scabiei* in a soil-less system. *Journal of Phytopathology* 158:453-455.
- Khatri, B. B., Tegg, R., Brown, P. H., and Wilson, C. 2011. Temporal association of potato tuber development with susceptibility to common scab and *Streptomyces scabiei*-induced responses in the potato periderm. *Plant Pathology* 60:776-786.
- Kolomiets, M. V., Hannapel, D. J., Chen, H., Tymeson, M., and Gladon, R. J. 2001. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *The Plant Cell* 13:613-626.
- Kumar, G. M., Iyer, S., and Knowles, N. R. 2007. Extraction of RNA from fresh, frozen, and lyophilized tuber and root tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:1674-1678.

- Labidi, S. 2020. Amélioration de la résistance de la pomme de terre à la gale commune par l'habituement de cals à la thaxtomine a et le traitement au 2, 4-D. Thèse de doctorat. Université de Sherbrooke.
- Lawrence, C. H., Clark, M. C., and King, R. R. 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* 80:606-608.
- Leiner, R. H., Fry, B. A., Carling, D. E., and Loria, R. 1996. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* 86:709-713.
- Lerat, S., Babana, A. H., El Oirdi, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Beaudoin, N., Bouarab, K., and Beaulieu, C. 2009. *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 28:1895-1903.
- Liu, J., Nothias, L. F., Dorrestein, P. C., Tahlan, K., and Bignell, D. R. D. 2021. Genomic and Metabolomic Analysis of the Potato Common Scab Pathogen *Streptomyces scabiei*. *ACS Omega* 6:11474-11487.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402-408.
- Maccarrone, M., Melino, G., and Finazzi-Agro, A. 2001. Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 8:776-784.
- Manda, G., Rojo, A. I., Martinez-Klimova, E., Pedraza-Chaverri, J., and Cuadrado, A. 2020. Nordihydroguaiaretic Acid: From Herbal Medicine to Clinical Development for Cancer and Chronic Diseases. *Frontiers in Pharmacology* 11:151.
- Meguro, R., Asano, Y., Odagiri, S., Li, C., Iwatsuki, H., and Shoumura, K. 2007. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Archives of Histology and Cytology* 70:1-19.
- Meimoun, P., Tran, D., Baz, M., Errakhi, R., Dauphin, A., Lehner, A., Briand, J., Biligui, B., Madiona, K., Beaulieu, C., and Bouteau, F. 2009. Two different signaling pathways for thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis* and tobacco BY2. *Plant Signaling and Behaviour* 4:142-144.
- Neema, C., Laulhere, J. P., and Expert, D. 1993. Iron Deficiency Induced by Chrysobactin in *Saintpaulia* Leaves Inoculated with *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiology* 102:967-973.
- Nicot, N., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., and Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56:2907-2914.
- Paradis, E., Goyer, C., Hodge, N. C., Hogue, R., Stall, R. E., and Beaulieu, C. 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern Canada. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44:561-564.
- Perla, V., Jayanty, S. S., Holm, D. G., and Davidson, R. D. 2014. Relationship between tuber storage proteins and tuber powdery scab resistance in potato. *American Journal of Potato Research* 91:233-245.
- Rancé, I., Fournier, J., and Esquerré-Tugayé, M.-T. 1998. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:6554-6559.

Roschttardt, H., Conejero, G., Divol, F., Alcon, C., Verdeil, J. L., Curie, C., and Mari, S. 2013. New insights into Fe localization in plant tissues. *Frontiers in Plant Science* 4:350.

Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A. G., Sanz, C., Stormann, K., Rosahl, S., and Sanchez-Serrano, J. J. 1996. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *The Journal of Biological Chemistry* 271:21012-21019.

Royo, J., Leon, J., Vancanneyt, G., Albar, J. P., Rosahl, S., Ortego, F., Castanera, P., and Sanchez-Serrano, J. J. 1999. Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:1146-1151.

Scheible, W. R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., Loria, R., and Somerville, C. R. 2003. An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *Plant Cell* 15:1781-1794.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9:671-675.

Struik, P. C., and Wiersema, S. G. 1999. Seed potato technology. Wageningen Academic Publishers.

Tegg, R. S., Melian, L., Wilson, C. R., and Shabala, S. 2005. Plant cell growth and ion flux responses to the streptomycete phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. *Plant Cellular Physiology* 46:638-648.

Timabud, T., Sanitchon, J., and Pongdontri, P. 2013. A modified ferrous oxidation-xylene orange assay for lipoxygenase activity in rice grains. *Food Chemistry* 141:2405-2411.

van Duijn, S., Nabuurs, R. J. A., van Duinen, S. G., and Natté, R. 2013. Comparison of histological techniques to visualize iron in paraffin-embedded brain tissue of patients with Alzheimer's disease. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 61:785-792.

Vicente, J., Cascón, T., Vicedo, B., García-Agustín, P., Hamberg, M., and Castresana, C. 2012. Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Molecular Plant* 5:914-928.

Viswanath, K. K., Varakumar, P., Pamuru, R. R., Basha, S. J., Mehta, S., and Rao, A. D. 2020. Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *Journal of Plant Biology* 63:83-95.

Wasternack, C., and Feussner, I. 2018. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annual review of plant biology* 69:363-386.

Wilson, C., Luckman, G., Tegg, R., Yuan, Z., Wilson, A., Eyles, A., and Conner, A. 2009. Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A. *Plant Pathology* 58:137-144.

Wilson, C. R., Tegg, R. S., Wilson, A. J., Luckman, G. A., Eyles, A., Yuan, Z. Q., Hingston, L. H., and Conner, A. J. 2010. Stable and extreme resistance to common scab of potato obtained through somatic cell selection. *Phytopathology* 100:460-467.