

Variabilité protéique observée par électrophorèse bidimensionnelle sur neuf isolats d'*Heterodera schachtii* provenant de six pays européens et sur deux isolats d'*H. trifolii* f. sp. *beta*

Michel BOSSIS, Georges CAUBEL et Catherine PORTE

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Zoologie, INRA, Centre de Recherches de Rennes, Domaine de la Motte-au-Vicomte, B.P. 29, 35650 Le Rheu, France.

Accepted for publication 23 April 1996.

Résumé – La variabilité protéique de neuf isolats européens d'*Heterodera schachtii* et de deux isolats d'*H. trifolii* f. sp. *beta* élevés en conditions contrôlées sur colza, *Brassica napus* L. var. *napus* cv. Samourai a été étudiée par électrophorèse bidimensionnelle (E2D). Les gels électrophorétiques sont comparés à l'aide d'un système informatique d'analyse d'images. Les indices de similarité (F) et les distances génétiques ($D=1-F$) sont calculés à partir des taches homologues. Le dendrogramme est obtenu avec la méthode UPGMA. Les résultats montrent une assez grande similitude protéique des deux espèces. Les principales différences interspécifiques sont mises en évidence, ainsi que deux zones communes caractéristiques. Concernant la variabilité infraspécifique, des taches caractéristiques de certains isolats ont été repérées. La possibilité d'utiliser l'E2D pour identifier des protéines liées à la virulence est envisagée, ce qui nécessitera l'étude d'un grand nombre d'isolats.

Summary – *Proteinic variability observed by means of two-dimensional gel electrophoresis on nine isolates of Heterodera schachtii originating from six European countries and on two isolates of H. trifolii f. sp. beta* – Two dimensional gel electrophoresis (2-DGE) was applied on females reared on standard conditions on rape, *Brassica napus* L. var. *napus* cv. Samourai. Gels were compared by a computerized image analysis system. The similarity index (F) and the genetic distances ($D=1-F$) were calculated on the basis of all spots observed from each isolate being compared and of the shared spots observed between these isolates. The dendrogram was obtained according to the UPGMA method. The two species able to multiply on *Beta vulgaris* were closely related, and the main differences are indicated out by arrows and letters on the figures. Some typical spots of isolates of *H. schachtii* were identified. The possible use of 2-DGE for the identification of specific proteins linked to the virulence of isolates seems a promising way of investigation. A large sampling of isolates is needed.

Key-words : Bidimensional electrophoresis, genetic distance, *Heterodera schachtii*, *H. trifolii*, image analysis, pathotypes, plant parasitic nematodes, virulence.

La variabilité infraspécifique de divers nématodes phytoparasites est de plus en plus étudiée. Le plus souvent ces études sont conduites en parallèle avec la recherche de sources de résistance variétale, principalement dans le but d'identifier des entités capables de contourner certains gènes de cette résistance. Ces études portent surtout sur les Heteroderidae pour lesquels des pathotypes ont été caractérisés chez diverses espèces. Ainsi, chez *Heterodera avenae*, parasite des céréales, dix pathotypes ont été identifiés dont quatre en France (Rivoal, 1977). Pour les parasites des solanacées, que ce soit *Globodera rostochiensis* ou *G. pallida*, une classification internationale des pathotypes a été réalisée (Kort *et al.*, 1977). Plus récemment, des gènes de virulence ont été mis en évidence dans plusieurs populations allemandes d'*H. schachtii* (Müller, 1992). Chez cette espèce, la population allemande « 129 » est capable de former des kystes sur deux lignées de translocation de betterave sucrière, *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, présentant la résistance portée par le chromosome pro-1 de *B. procumbens*. La multiplication de cette population en conditions contrôlées sur des hôtes présentant ou non des gènes de résistance a permis d'obtenir des populations

plus virulentes en quelques générations (Lange *et al.*, 1993).

L'identification de ces pathotypes par d'autres techniques plus simples à mettre en oeuvre que les gammes d'hôtes fait l'objet de nombreux travaux où les techniques biochimiques ont une large place. Diverses techniques électrophorétiques ont été employées pour essayer de caractériser biochimiquement les espèces d'Heteroderidae. Parmi celles-ci, la révélation de certains phénotypes enzymatiques, principalement les estérases, a été utilisée sur *H. avenae* (Bergé *et al.*, 1981); elle permet l'identification de la plupart des espèces de *Meloidogyne* (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985). La discrimination au niveau infraspécifique, que ce soit des populations ou des pathotypes, nécessite cependant l'utilisation de techniques encore plus performantes. Parmi celles-ci, l'électrophorèse bidimensionnelle (E2D) a déjà été utilisée dans ce but (Bakker, 1987). La caractérisation d'entités interspécifiques ou infraspécifiques a été réalisée grâce à cette technique sur les *Globodera* (Bakker & Gommers, 1982; de Boer *et al.*, 1992) ainsi que sur *H. glycines* (Ferris *et al.*, 1985, 1986) et sur *H. avenae* (Ferris *et al.*, 1989); mais, compte tenu des diffi-

cultés de sa mise en œuvre pour l'obtention de résultats reproductibles et compte tenu également des problèmes liés à l'interprétation des résultats, elle reste peu employée. Les progrès récents réalisés notamment dans l'interprétation des résultats par analyse d'images assistée par ordinateur la rendent cependant assez performante pour de telles caractérisations (Bossis & Mugniéry, 1993; Bossis & Rivoal, 1996). Dans cette étude préliminaire de la variabilité protéique, l'E2D couplée à l'analyse informatisée a été utilisée sur neuf isolats européens d'*H. schachtii* et deux isolats d'*H. trifolii* f. sp. *beta* (Maas et al., 1982) étudiés par ailleurs pour leur aptitude à se développer sur des lignées présentant des gènes de résistance.

Matériel et méthodes

ORIGINE DES ISOLATS, ÉLEVAGE ET PRÉPARATION DES FEMELLES

Le Tableau 1 donne les origines géographiques des isolats étudiés. Après éclosion dans une solution aqueuse de chlorure de zinc (4 mM), environ 500 juvéniles sont inoculés sur des plantules du colza, cv. Samouraï cultivées en pot de 60 ml sur un substrat de sable blanc, selon la technique et les conditions décrites par Caubel et Chaubet (1988). Dix pots par isolat sont ainsi réalisés. Les femelles blanches sont récoltées sur les racines, au hasard, 40 jours après l'inoculation, puis elles sont triées et débarrassées des débris végétaux à l'aide d'une aiguille et d'un pinceau sous le microscope stéréoscopique.

ELECTROPHORÈSE

La variabilité protéique est étudiée par l'E2D, selon la technique d'O' Farrell (1975) avec coloration au nitrate d'argent (Oakley et al., 1980). Pour chaque isolat, trois

échantillons de 100 femelles sont préparés selon la technique utilisée pour d'autres nématodes phytoparasites appartenant aux Heteroderidae (Bossis & Rivoal, 1996). Les concentrations protéiques sont estimées par la technique de Bradford (1976) et ajustées à 2 µg/µl. Pour chaque échantillon, trois électrophorèses sont réalisées avec le système Mini-Protean II (Bio-Rad). La quantité de protéines utilisée par gel est de 5 µg. Les préparations des gels, les migrations (première et deuxième dimensions) et les colorations sont conduites selon les conditions précédemment définies (Bossis & Mugniéry, 1993). L'estimation des poids moléculaires et celle des points isoélectriques sont réalisées à l'aide du kit de calibration « 2D SDS-PAGE Standards » (Bio-Rad).

ANALYSE DES GELS

A partir des gels préalablement séchés entre deux feuilles de cellophane (Bossis & Rivoal, 1996) les images sont analysées sur une station de travail Vax (Vaxstation 4000-60; Digital Equipment Corporation). La saisie est réalisée à l'aide d'un scanner de type Eikonix (EC 78/99 Kodak). Les images sont numérisées à l'aide d'une interface (Bus Controller SCSI 488/D, Iotech) et ensuite traitées avec le progiciel Kepler (Large Scale Biology Corporation, Rockville, USA). A partir de l'image brute, divers filtres permettent d'éliminer le bruit de fond et les traînées. Le programme utilisé fait appel à la méthode « procville3 » (Zivy, 1990) avec certains paramètres que nous avons adaptés pour le type de gels utilisés, de façon à mieux prendre en compte les petites taches : le nombre de billes nécessaires pour synthétiser une courbe gaussienne et les valeurs fixes des s_x et s_y (voir ci-dessous) ont été réduits de moitié.

Pour chaque image, un fichier de taches est créé. Après avoir été détectée, chaque tache est modélisée selon une double gaussienne avec les paramètres suivants : les coordonnées (x, y), l'étalement en x et y (s_x, s_y) et l'amplitude ou densité de la tache (amp). Cette modélisation permet de réduire d'environ 400 fois la taille de chaque fichier image et de le rendre ainsi plus facile à utiliser. Le système calcule ensuite l'ajustement de l'amplitude à des distributions gaussiennes (en deux dimensions), en minimisant l'écart entre les valeurs observées et les valeurs théoriques. Le montage des images selon le plan d'expérience et leur analyse sont réalisés, de façon interactive, sur ces fichiers de taches. Une image type est construite à partir de l'ensemble des taches observées dans tous les isolats. Toutes les combinaisons d'isolats sont alors étudiées deux à deux pour obtenir le nombre de protéines communes. Une protéine est considérée comme appartenant bien à un isolat lorsqu'elle est présente dans deux images sur trois de cet isolat. La distance génétique (D) entre deux isolats est calculée à partir de l'indice de similarité (F), selon la formule $D = 1 - F$ où $F = 2N_{xy}/(n_x + n_y)$, n_x et n_y étant le nombre total de taches détectées pour chacun des deux isolats et N_{xy} le nombre de protéines communes à ces deux isolats.

Tableau 1. Origine et code des isolats d'*Heterodera schachtii* et *H. trifolii*

Espèces	Code	Origine
<i>Heterodera schachtii</i>		
	Allemagne 1	Hannovre
	Allemagne 2a	Schluden
	Allemagne 2b	Schluden
	France 1	Aisne : Concevieux
	France 2	Finistère : Saint Pol de Léon
	Grande-Bretagne	Burry
	Irlande	Dublin
	Italie	Rovigo
	Pays-Bas 1	Westmaas
<i>Heterodera trifolii</i> forma <i>specialis beta</i>		
	France 3	Corse : Moriani Plage
	Pays-Bas 2	Inconnue

a, b : Populations de même origine, différenciées par un nombre différent de cycles d'élevage en conditions contrôlées.

Le dendrogramme correspondant est construit selon la méthode UPGMA qui utilise les moyennes arithmétiques (Sokal & Michener, 1958), à l'aide du logiciel SAS (SAS Institut INC, Cary, North Carolina, USA), à partir des distances normalisées.

Résultats

Les photographies de gels représentatives de chacune des deux espèces sont présentées; les isolats Allemagne 2a et Pays-Bas 2 ont été choisis pour représenter respectivement *H. schachtii* et *H. trifolii* (Fig. 1). Les flèches permettent de repérer les différences les plus marquées entre les deux espèces. Par comparaison avec d'autres espèces d'Heteroderidae étudiées par ailleurs avec la même technique électrophorétique (Bossis & Mugniéry, 1993; Bossis & Rivoal, 1996), on constate que les deux groupes de protéines « y » et « z » sont très caractéristiques de ces deux espèces. Ces protéines ont des poids moléculaires compris entre 31 et 33 kilodaltons et des points isoélectriques 5,1 pour « y » et 5,3 pour « z ».

Les protéinogrammes de différents isolats d'*H. schachtii* ont été comparés (Fig. 2). Les flèches couplées avec les lettres minuscules mettent en évidence des protéines qui permettent de reconnaître ces isolats. L'isolat de Grande-Bretagne se caractérise par deux protéines « a » et « b » qui présentent des variations quantitatives nettes par rapport aux autres isolats : la protéine « a » y

est plus abondante que dans chacun des autres isolats alors que la protéine « b » y est nettement moins abondante. Ces deux protéines sont signalées sur la Fig. 2A et B où les différences sont faciles à observer. L'isolat d'Irlande est identifié par l'absence de la protéine « c »; celle-ci est signalée sur la Fig. 2A et la zone où elle se situerait si elle existait est repérée par un cercle sur la Fig. 2B. Les protéines « d » et « e » semblent être des variantes de points isoélectriques qui pourraient être des produits d'expression résultant d'allèles d'un même locus. Elles sont inexistantes dans les isolats France 2, Grande-Bretagne, Italie, Allemagne 2a et Allemagne 2b, très faiblement exprimées dans Pays-Bas 1 et Allemagne 1, présentes dans France 1 et Irlande. L'isolat Italie possède la protéine « f » qui se trouve absente de tous les autres isolats à l'exception de France 2. Les différences entre Allemagne 1 (Fig. 2E) et Allemagne 2a (Fig. 1A) sont très ténues et non repérables *de visu* sur les photographies. Par contre la comparaison de ces deux isolats avec le troisième isolat allemand, Allemagne 2b (Fig. 2F), montre qu'il est possible d'identifier ce dernier avec la protéine « i » qui présente une variation de point isoélectrique par rapport à la protéine « h » présente dans les autres isolats allemands. Là aussi, ces deux protéines pourraient être les produits d'expression de deux allèles d'un même locus. La protéine « j » est beaucoup plus abondante dans cet isolat.

La discrimination des deux isolats français est facile à l'aide des protéines « k » et « l » respectivement spécifiques de France 1 et de France 2 (Fig. 2).

Toutes les protéines détectées sur la totalité des isolats étudiés sont représentées par des ellipses et celles qui sont communes aux deux espèces sont repérées en noir (Fig. 3).

Au Tableau 2 sont donnés le nombre de taches détectées par isolat, le nombre de taches communes entre deux isolats (au-dessus de la diagonale) et les distances génétiques qui en résultent (en dessous de la diagonale). Pour les isolats d'*H. schachtii*, les nombres de taches pris en compte varient entre 220 et 279. Les valeurs sont légèrement inférieures pour les isolats de *H. trifolii*.

Le dendrogramme construit sur les seules données protéiques (Fig. 4) permet d'observer divers regroupements. Le groupement 10, unit les isolats Allemagne 2a et 2b : ces deux isolats qui sont issus de la même population et multipliés dans des conditions différentes se retrouvent très fortement liés. Le groupement 9 rassemble l'isolat Allemagne 1 avec les deux précédents. Le groupement 7 unit l'isolat France 1 et l'ensemble des isolats d'Allemagne. Le groupement 6 unit le groupement 7 à l'isolat Pays-Bas 1. Une certaine similitude est observée entre les isolats Italie et Grande-Bretagne (groupement 8) rattachés par ailleurs à l'isolat France 2 (groupement 5). Tout cet ensemble (groupement 4) se trouve légèrement plus éloigné de l'isolat Irlande (groupement 3). Enfin les deux isolats d'*H. trifolii*, Pays-Bas 2 et France 3 se regroupent, bien qu'étant assez distants.

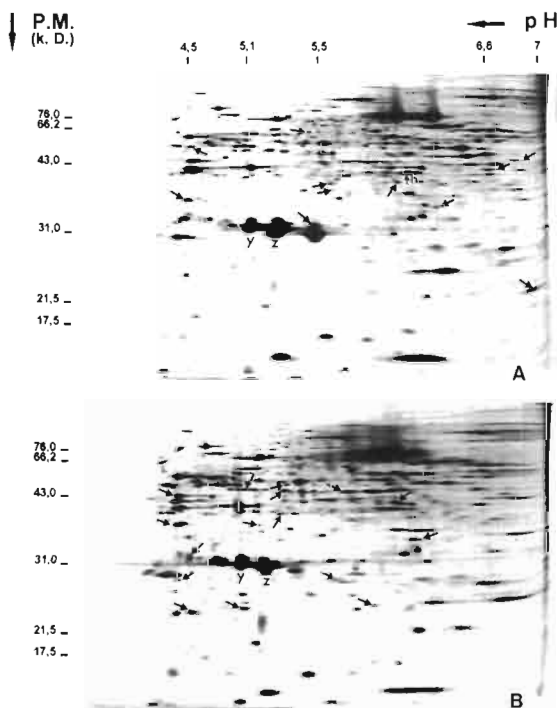


Fig. 1. Protéinogrammes : A : *Heterodera schachtii*, isolat Allemagne 2a; B : *H. trifolii*, isolat Pays-Bas 2. (Les flèches indiquent les principales protéines spécifiques de chacune des deux espèces. Les lettres « y » et « z » font référence à des commentaires dans le texte).

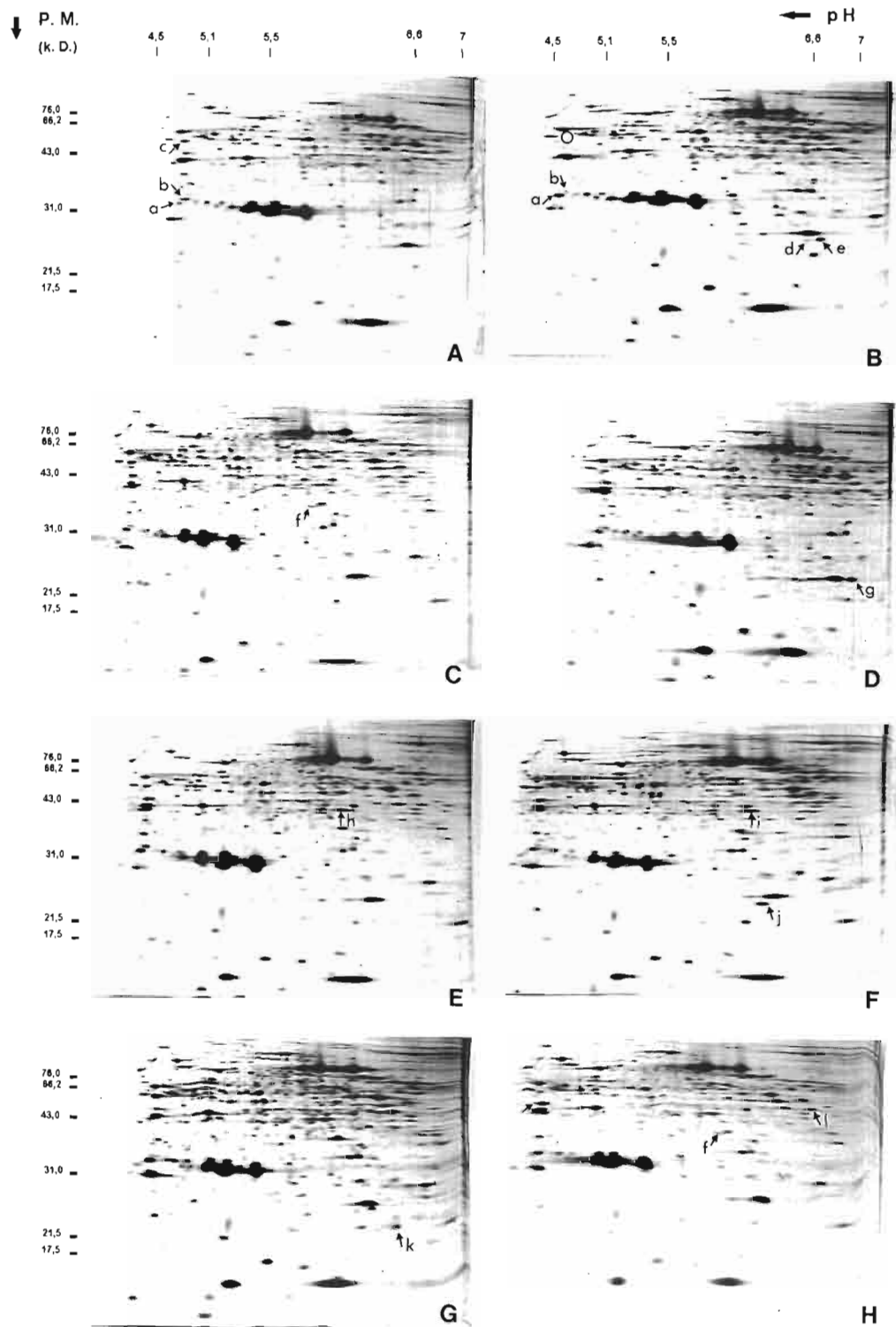


Fig. 2. Protéinogrammes d'*Heterodera schachtii*. A : Isolat Grande-Bretagne; B : Isolat Irlande; C : Isolat Italie; D : Isolat Pays-Bas 1; E : Isolat Allemagne 1; F : Isolat Allemagne 2b; G : Isolat France 1; H : Isolat France 2. (Les lettres font référence à des protéines spécifiques pour lesquelles des commentaires sont donnés dans le texte).

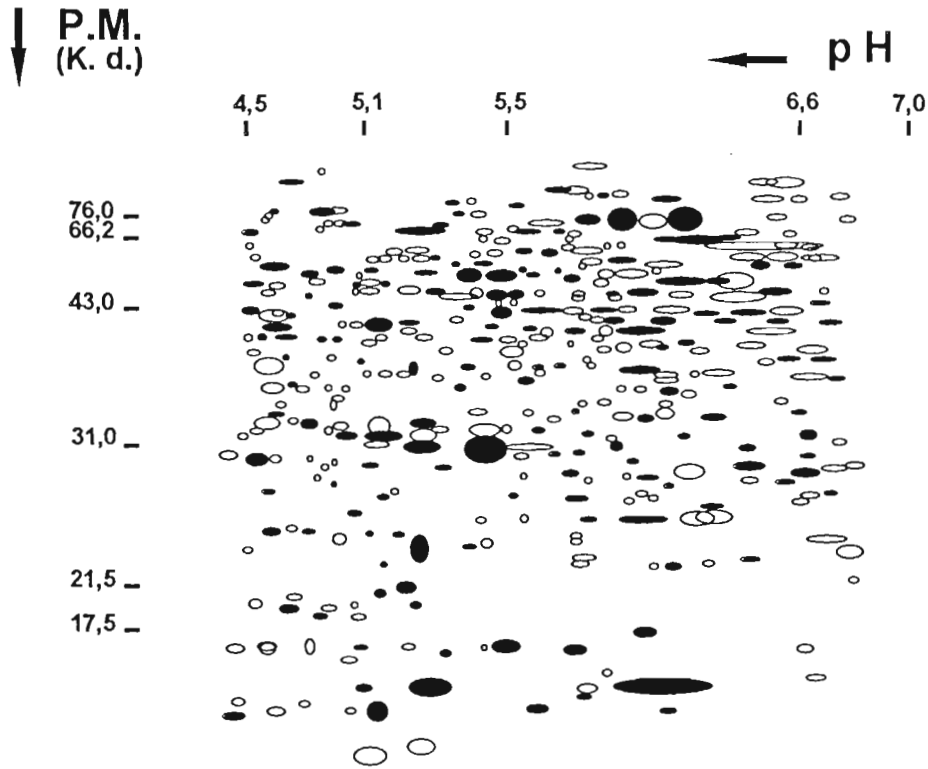


Fig. 3. Protéines observées dans les deux espèces *Heterodera schachtii* et *H. trifolii* et représentées par des ellipses, avec en noir les protéines communes aux deux espèces.

Tableau 2. Nombre de protéines communes (au-dessus de la diagonale) et distance génétique (au-dessous de la diagonale) entre neuf isolats d'*Heterodera schachtii* et deux isolats d'*H. trifolii*.

Isolats	Nbre de taches	France 1	France 2	Italie	Pays-Bas 2	Grande-Bretagne	Irlande	Allemagne 2a	Allemagne 1	Pays-Bas 1	France 3	Allemagne 2b
France 1	253		180	191	152	173	168	208	189	180	163	185
France 2	223	0,244		181	139	164	159	192	174	161	151	172
Italie	243	0,230	0,223		150	181	171	206	185	177	165	182
Pays-Bas 2	197	0,324	0,338	0,318		139	147	162	151	142	146	148
Grande-Bretagne	221	0,270	0,261	0,220	0,335		163	191	171	161	144	174
Irlande	220	0,290	0,282	0,261	0,295	0,261		189	166	158	149	170
Allemagne 2a	279	0,218	0,235	0,211	0,319	0,236	0,242		208	189	171	210
Allemagne 1	242	0,236	0,252	0,237	0,312	0,261	0,281	0,202		182	158	187
Pays-Bas 1	226	0,248	0,283	0,245	0,329	0,280	0,291	0,251	0,222		143	178
France 3	213	0,300	0,307	0,276	0,288	0,336	0,312	0,305	0,305	0,349		158
Allemagne 2b	245	0,257	0,265	0,254	0,330	0,253	0,269	0,198	0,232	0,244	0,310	

Discussion

D'un point de vue méthodologique, il existe un certain nombre d'artefacts liés aux diverses étapes de l'E2D et au traitement informatisé des images. D'abord, lors de la définition de la zone d'intérêt de chaque image, la

partie basique pour laquelle les protéines ne sont pas séparées en isofocalisation n'est pas prise en compte, car la migration en deuxième dimension provoque un empilement de ces protéines rendant le traitement de l'image inopérant dans cette zone; il faudrait donc ajouter environ 70 protéines supplémentaires dont une très

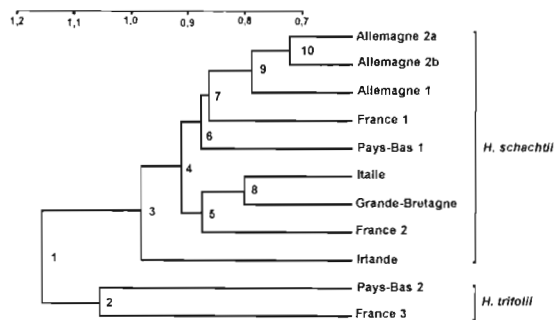


Fig. 4. Dendrogramme de neuf isolats d'*Heterodera schachtii* et de deux isolats *H. trifolii* f. sp. beta, obtenus par la méthode UPGMA et construits à partir des distances génétiques.

forte proportion de protéines communes. Ensuite, certaines protéines se retrouvent dans le gel avec une forme assez éloignée de l'ellipse classique et de ce fait sont mal prises en compte lors de la modélisation. De plus, avec l'appariement automatique propre au système, certaines taches réellement homologues ne sont pas considérées comme telles en raison de déformations inhérentes à la technique électrophorétique. Enfin, toutes les taches détectées par le système d'analyse d'images, même les plus ténues, sont retenues et il est inévitable que de légères variations au niveau de la coloration du fond puissent être considérées par erreur comme des taches protéiques; cela explique, par exemple, que l'isolat Allemagne 2a totalise plus de taches que les autres, car c'est à partir de celui-ci que l'image type a été constituée; de ce fait des taches de très faible amplitude (densité de la tache exprimée à partir des valeurs observées de densité optique) ont été retenues. Pour toutes ces raisons, les distances génétiques observées se trouvent considérablement augmentées; on peut cependant considérer que le positionnement des isolats les uns par rapport aux autres ne s'en trouve que peu altéré.

En ce qui concerne la variabilité protéique des isolats, on observe un regroupement de ceux qui proviennent des populations allemandes, hollandaise et française du nord, ce qui laisse supposer l'appartenance à une même entité. Un autre regroupement est mis en évidence : Italie, Grande-Bretagne et France 2, l'Irlande étant un peu plus éloignée encore de ces deux groupes. Les deux isolats français présentant des protéinogrammes différents proviennent de deux régions géographiquement distinctes, l'une, l'Aisne est essentiellement à vocation betteravière, l'autre, le Finistère est une zone maraîchère de culture du chou. Quant aux isolats provenant des populations d'*H. trifolii* f. sp. beta, ils se regroupent, quoique relativement éloignés tant géographiquement que par les cultures offertes à leur développement, la population Corse n'ayant jamais rencontré de betterave sucrière. On note globalement une assez grande similitude protéique entre ces deux espèces, avec deux zones très similaires.

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les couples de protéines « d » et « e » ainsi que « h » et « i » seraient les produits d'allèles, des croisements pourraient être envisagés.

Les protéinogrammes d'Allemagne 2a et Allemagne 2b sont proches; ces deux isolats ne diffèrent entre eux que par le nombre de générations développées sur colza dans les multiplications antérieures. Ces deux isolats, ainsi que celui provenant d'Irlande, comportent, contrairement aux autres isolats étudiés, des individus virulents vis-à-vis de la betterave résistante HM1091 (1) (Porte *et al.*, 1995). Il existe une variabilité protéique au sein de *H. schachtii* et celle-ci pourrait éventuellement être liée à la virulence. Il serait nécessaire d'explorer de manière plus approfondie ces variations au niveau infraspécifique en améliorant les techniques d'étude. Ainsi, la technique d'E2D appliquée dans ce travail sur des gels de petite taille (80 × 60 mm) peut très facilement être transposée sur des gels de plus grande taille (200 × 200 mm, par exemple). Il serait alors possible, sans problème particulier, de multiplier la résolution par quatre, voire plus, ce qui augmenterait la probabilité de détecter des protéines liées à la virulence. Il serait également nécessaire de disposer d'une grande quantité de populations présentant les mêmes caractéristiques de virulence. Cette voie semble donc particulièrement intéressante à explorer en utilisant l'E2D et l'interprétation informatisée des résultats.

Remerciements

Les auteurs remercient les Drs D. Cooke, W. Heijbroek, P. Maas, H. Marzin, J. F. Moore, J. Müller et R. Tacconi pour la fourniture des isolats. Ils remercient également L. Renault et C. Le Lan pour leur assistance technique.

Références

- BAKKER, J. (1987). *Protein variation in cyst nematodes*. Thesis, Landbouwwuniversiteit, Wageningen, Nederlands, 159 p.
- BAKKER, J. & GOMMERS, F. J. (1982). Differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* and of two *G. rostochiensis* pathotypes by means of two-dimensional electrophoresis. *Proc. K. ned. Akad. Wetensch., Ser. C*, 85 : 309-314.
- BERGÉ, J. B., DALMASSO, A., PERSON, F., RIVOAL, R. & THOMAS, D. (1981). Isoestérasés chez le nématode *Heterodera avenae*. 1. Polymorphisme chez différentes races françaises. *Revue Nématol.*, 4 : 99-105.
- DE BOER, J. M., OVERMARS, H., BOUWMAN-SMITS, L., DE BOEVERE, M., GOMMERS, F. J. & BAKKER, J. (1992). Protein polymorphisms within *Globodera pallida* assessed with mini two dimensional gel electrophoresis of single females. *Fundam. appl. Nematol.*, 15 : 495-501.

(1) Cultivar nouvellement inscrit au catalogue français sous le nom « Évasion ».

- BOSSIS, M. & MUGNTERY, D. (1993). Specific status of six *Globodera* parasites of solanaceous plants studied by means of two-dimensional gel electrophoresis with comparison of gel patterns by a computed system. *Fundam. appl. Nematol.*, 16 : 47-56.
- BOSSIS, M. & RIVOAL, R. (1996). Protein variability in cereal cyst nematodes from different geographic regions assessed by two-dimensional gel electrophoresis. *Fundam. appl. Nematol.*, 19 : 25-34.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72 : 248-254.
- CAUBEL, G. & CHAUBET, B. (1988). Méthodologie pour l'évaluation de la résistance des crucifères à *Heterodera schachtii* Schmidt. *C. r. Acad. Agric. Fr.*, 74 : 93-98.
- ESBENSHADE, P. R. & TRIANTAPHYLLOU, A. C. (1985). Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *J. Nematol.*, 17 : 6-20.
- FERRIS, V. R., FAGHIHI, J., IREHOLM, A. & FERRIS J. M. (1989). Two-dimensional protein patterns of Cereal Cyst Nematodes. *Phytopathology*, 79 : 927-933.
- FERRIS, V. R., FERRIS, J. M., & MURDOCK, L. L. (1985). Two-dimensional protein patterns in *Heterodera glycines*. *J. Nematol.*, 17 : 422-427.
- FERRIS, V. R., FERRIS, J. M., MURDOCK, L. L. & FAGHIHI, J. (1986). *Heterodera glycines* in Indiana. III. 2-D protein patterns of geographical isolates. *J. Nematol.*, 18 : 177-182.
- KORT, J., ROSS, H., RUMPENHORST, H.J. & STONE, A. R. (1977). An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica*, 23 : 333-339.
- LANGE, W., MÜLLER, J. & DE BOCK T. S. M. (1993). Virulence in beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) versus some alien genes for resistance in beet. *Fundam. appl. Nematol.*, 16 : 447-454.
- MAAS, P. W. TH., DU BOIS E. & DEDE J. (1982). Morphological and host range variation in the *Heterodera trifolii* complex. *Nematologica*, 28 : 263-270.
- MÜLLER, J. (1992). Detection of pathotypes by assessing the virulence of *Heterodera schachtii* populations. *Nematologica*, 38 : 50-64.
- OAKLEY, B. R., KIRSCH, D. R. & MORRIS, N. R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.*, 105 : 361-363.
- O' FARRELL, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. biol. Chem.*, 250 : 4007-4021.
- PORTE, C., CAUBEL, G. & MUCHEMBLED, C. (1995). La résistance de la betterave sucrière au nématode à kyste *Heterodera schachtii*. 58^e Cong. Inst. int. Rech. betteravières, Beaune, France, 19-22 juin 1995. Presses Universitaires de Bruxelles : 233-241.
- RIVOAL, R. (1977). Identification des races biologiques du nématode à kystes des céréales, *Heterodera avenae* Woll., en France. *Annal. Zool. Ecol. anim.*, 9 : 261-272.
- SOKAL, R. R. & MICHENER, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas sci. Bull.*, 38 : 1409-1438.
- ZIVY, M. (1990). Une nouvelle méthode de détection des spots d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines. 8^e Congr. Soc. Electrophorèse, Lyon.