

Pour Paris

DEPARTEMENT DE FORMATION  
EN PROTECTION DES VEGETAUX  
Niamey BP 12625 - Niger

# Rapport de stage

DES TECHNICIENS SUPERIEURS  
EN PROTECTION DES VEGETAUX

1996

THEME : INITIATION A LA NEMATOLOGIE : APPLICATION AUX  
CULTURES MARAICHERES

STAGIAIRE : Aliou DIONGUE

PERIODE : du 07-10-96 au 07-12-96

LIEU DE STAGE : ORSTOM/LABORATOIRE de NEMATOLOGIE  
DAKAR/SENEGAL

RESPONSABLE DE STAGE : Dr. T. MATEILLE  
Chercheur en Nématologie

Fonds Documentaire ORSTOM



010014312

DEPARTEMENT DE FORMATION  
EN PROTECTION DES VEGETAUX  
Niamey BP 12625 - Niger

# Rapport de stage

DES TECHNICIENS SUPERIEURS  
EN PROTECTION DES VEGETAUX

1996

THEME : INITIATION A LA NEMATOLOGIE : APPLICATION AUX  
CULTURES MARAICHERES

STAGIAIRE : Aliou DIONGUE

PERIODE : du 07-10-96 au 07-12-96

LIEU DE STAGE : ORSTOM/LABORATOIRE de NEMATOLOGIE  
DAKAR/SENEGAL

RESPONSABLE DE STAGE : Dr. T. MATEILLE  
Chercheur en Nématologie

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : A\* 14312 Ex:

*unique*

# SOMMAIRE

\* \* \*

-Remerciements  
-Sigles et Abréviations  
-Résumé

I/ INTRODUCTION	1
II/ GENERALITES	3
<b>2. 1 Présentation du Sénégal</b>	3
2. 1. 1 Géographie - climat - hydrographie	3
2. 1. 2 Démographie et Economie	
<b>2. 2 Structure d'accueil</b>	4
2. 2. 1 Présentation del'ORSTOM	4
2. 2. 2 L'Organigramme	5
2. 2. 3 Les centres de recherche	6
2. 2. 4 Présentation du laboratoire de nématologie	6
<b>2. 3 Les principales contraintes phytosanitaires</b>	7
III/ ETUDES REALISEES DANS LE CADRE DU THEME	9
<b>3. 1 Revue bibliographique sur les nématodes parasites des cultures maraîchères</b>	9
3. 1. 1 Problématique nématologique	9
3. 1. 2 Nématodes à galles des cultures maraîchères: Cas de <i>Meloidogyne</i>	10
3. 1. 2. 1 Introduction	10
3. 1. 2. 2 Description	10
3. 1. 2. 3 Position systématique	11
3. 1. 2. 4 Morphologie	11
3. 1. 2. 5 Biologie et cycle de développement	13
3. 1. 2. 6 Pathogénie	13
3. 1. 2. 7 La lutte	15

<b>3. 2 Etudes pratiques: Techniques nématologiques</b>	18
3. 2. 1 Diagnostic nématologique	18
3. 2. 2 Echantillonnage	18
3. 2. 3 Extraction des nématodes	18
3. 2. 4 Identification de quelques genres de nématodes au Stéréomicroscope	22
3. 2. 5 Comptage	23
3. 2. 5. 1 Résultats des analyses nématologiques sur les parcelles de TROPICASEM	23
3. 2. 5. 2 Distribution des genres de nématodes	23
3. 2. 5. 3 Discussion sur les résultats	23
3. 2. 6 Coloration des racines au Lactophénol fuschine	26
3. 2. 7 Electrophorèse des estérases de <i>Meloidogyne</i>	26
3. 2. 8 Montage pour collection de quelques specimens de nématodes	30
IV/ CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS	32
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXE	

## SIGLES ET ABRÉVIATIONS

C.D.H.	Centre pour le Développement de l'Horticulture.
C.E.E.	Communauté Economique Européenne
D.F.P.V.	Département de Formation en Protection des Végétaux
D.R.P.F.	Direction de Recherche et de Production Forestière
D.I.S.A.	Division des Investigations et Statistiques Agricoles
D.P.V.	Direction de la Protection des Végétaux
F.P.G.	Formol-acide Propionique-Glycérine.
GIS-LINNÉ	Groupement d'Intérêt Scientifique- Lutte Intégrée et Nématologie
H <sub>2</sub> OΔ	Eau distillée.
I.E.R	Institut d'Économie Rurale.
I.S.R.A.	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
J1, J2	Juvénile de premier stade , Juvénile de deuxième stade
P.I.B.	Produit Intérieur Brut
M.A.A.	Milieus et Activité Agricole
mA	milliampère.
O.P.A.N.	Organismes Parasites et Antagonistes des Nématodes
O.R.S.C.	Office de la Recherche Scientifique Coloniale.
ORSOM	Office de Recherche Scientifique d' Outre Mer
ORSTOM	Intitut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération
q.s.p.	quantité suffisante pour
r. m.	rythme de migration.
S.P.V.	Service de la Protection des Végétaux
TROPICASEM	Société de Production des Semences Maraîchères (variétés tropicales)
T.S.P.V.	Technicien Supérieur en Protection des Végétaux
U.C.A.D.	Université Cheikh Anta Diop
V	Volt

## Remerciements

A tous ceux qui m'ont aidé durant l'élaboration de ce rapport, j'exprime ma profonde reconnaissance.

Je prie Monsieur Ph. MATHIEU, représentant de l'ORSTOM au Sénégal, de vouloir bien agréer l'hommage de ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein de l'institut.

J'exprime ma reconnaissance la plus vive à Monsieur T. MATEILLE, mon maître de stage pour ses précieux conseils, ses suggestions et sa disponibilité qu'il n'a cessé de m'accorder durant toute la durée du stage, malgré ses multiples occupations.

J'adresse à Monsieur S. B. NDIAYE, mes vifs remerciements, pour m'avoir éclairé des enseignements profondément imprégnés d'une science qui a pour nom : la taxonomie.

Je dois à Mlle Ndéye Khady KEBE et à Mme Anna Marthe KONTE mes remerciements pour la frappe et la présentation de ce rapport sous cette forme claire et ordonnée.

Que soient également remerciés tous les étudiants de 3ème cycle et tous les techniciens du laboratoire pour leur collaboration franche et sincère durant tout le délai du stage.

Je pense notamment à :

M. T. DIOP, KH. SENGHOR, ND. NDIAYE, S. FOULD, E. PATE.

L. DIEDHIOU, J. LOPEZ, M. SAGNA, R. SARRA, H. DIOUF, Y. DIABANG, J. H. DIEME.

Mais aussi et surtout à J. CHAUDRON pour sa disponibilité face à toutes mes sollicitations matérielles.

## RESUME

Les nématodes du genre *Meloidogyne* (Goeldi, 1892) constituent un groupe important dans les régions de production maraîchère du Sénégal où leur virulence et leur large spectre d'hôte en font un parasite redoutable.

L'association de cette espèce à des baisses de rendement justifie l'attention particulière qu'accorde le laboratoire de nématologie de l'Institut Français de la recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) à une recherche d'alternatives nouvelles pour le contrôle de ce nématode.

Ce stage fût orienté à l'étude (la description, la morphologie, la biologie, la lutte...) de ce genre, ainsi que les techniques nématologiques appliquées depuis l'échantillonnage, l'extraction jusqu'à la reconnaissance des espèces de *Meloidogyne* par électrophorèse monodimensionnelle d'isoenzymes et des montages de spécimens sur Lame de Cobb.

## **I. INTRODUCTION**

A l'issue de la 1ère année d'études, le Département de Formation en protection des Végétaux (DFPV) envoie ses étudiants dans leur pays respectif pour un stage de contact et d'imprégnation.

C'est donc dans ce cadre que s'inscrit ce stage de neuf (09) semaines passé au laboratoire de Nématologie de l' ORSTOM à Dakar.

Ce stage, effectué au Département Milieux et Activité Agricole (MAA) sous le programme "Organismes Parasites et Antagonistes des Nématodes" (OPAN) avait comme thème : INITIATION à la NEMATOLOGIE : APPLICATION aux CULTURES MARAÏCHERES.

L'application aux cultures maraîchères se justifie dans un pays comme le Sénégal où sa production maraîchère annuelle de 120000 tonnes de légumes (source Ministère Développement Rural du Sénégal) est fortement menacée par une population de *Meloidogyne* dont sa fréquence et sa dominance dans les quatre grandes zones maraîchères du Sénégal (la région du Cap-Vert, les Pays sérères, les Niayes et la Vallée occidentale du Sénégal) sont confirmées par une prospection effectuée en 1993 par l'équipe du laboratoire de Nématologie.

Le programme OPAN s'applique à étudier les facteurs telluriques biotiques et abiotiques auxiliaires des organismes parasites et antagonistes des nématodes phytoparasites mais aussi à des études :

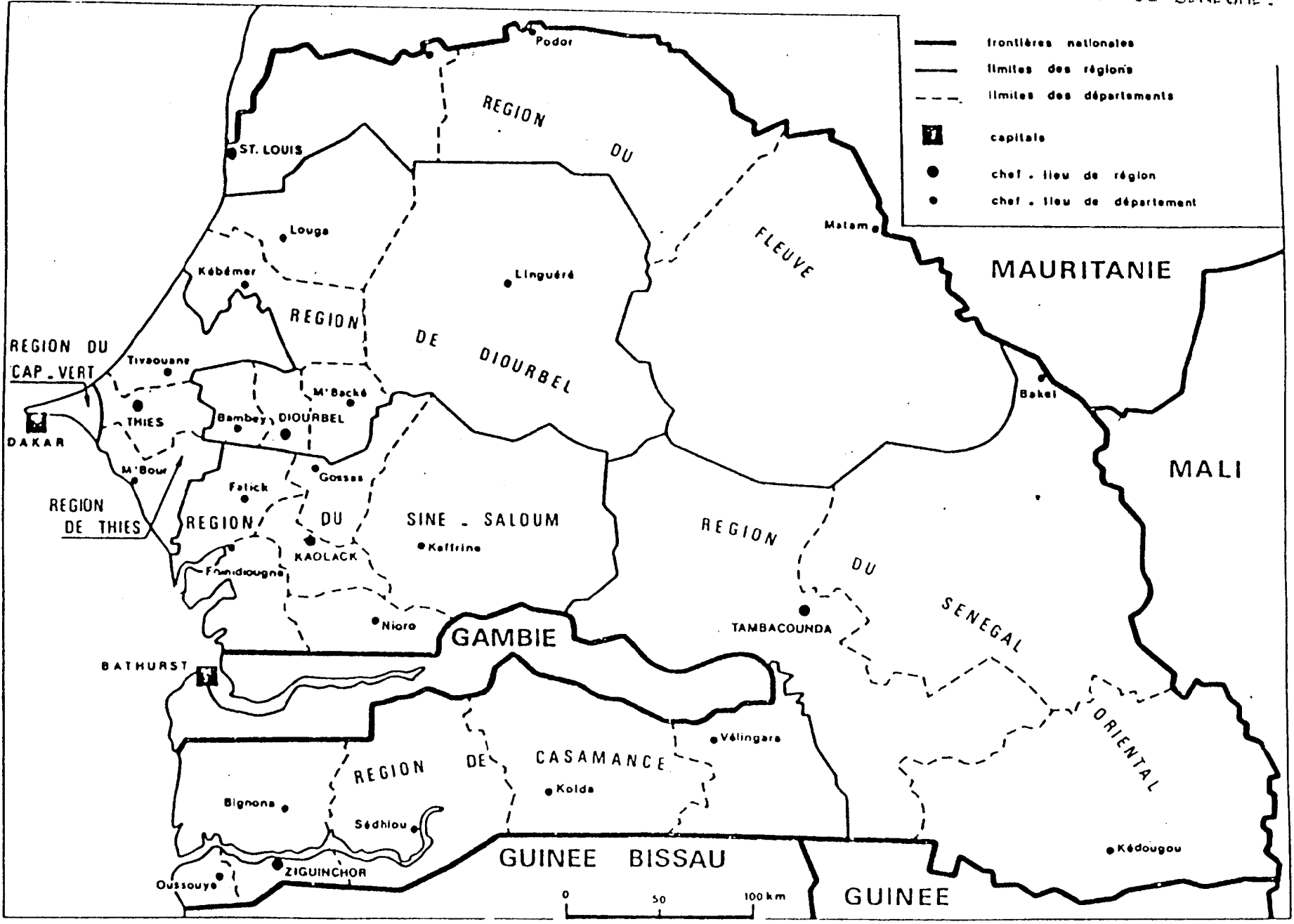
- D'estimation faunistique des nématodes parasites des cultures maraîchères et de caractérisation des espèces.
- De contraintes parasitaires (nématodes, champignons, virus) en culture maraîchère.
- De la diversité des systèmes de cultures maraîchères et des contraintes d'application des méthodes de lutte contre les nématodes.

Dans ce rapport sont étudiées et décrites certaines techniques nématologiques appliquées au laboratoire pour l'étude des *Meloidogyne* , les résultats obtenus après l'extraction des échantillons, la conclusion et les recommandations.

Toutefois en prélude sont décrits ces points suivants :

- Généralités sur le Sénégal
- La présentation de la structure d'accueil
- Les études bibliographiques de *Meloidogyne spp* .

FIG. 1 : CARTE DU SENEGAL.



## **II. GENERALITES**

### **2. 1. Présentation du Sénégal**

#### **2. 1. 1. Géographie - climat - hydrographie**

##### **A. Situation géographique**

Le Sénégal est situé à l'extrémité Ouest du continent africain entre le 12°30 et 16°30 de latitude Nord et entre le 11°30 et le 17°30 de longitude Ouest.

Il est limité au Nord par la République Islamique de Mauritanie, à l'Est par la République du Mali, au Sud par la République de Guinée et la Guinée Bissau, et à l'Ouest par l'Océan Atlantique sur une bande de 700 km.

Sa superficie totale est de 197161km<sup>2</sup>.

A part la région du sud-est où le relief est quelque peu accidenté, sans que l'altitude ne dépasse toute fois 581 m au point culminant des contreforts du Fouta Djallon, le Sénégal est un pays plat ne s'élevant pas au-dessus de 130 m (Anonyme, 1984), les sols sont de type Dior (sableux) ou Deck (argileux).

##### **B. Climat**

Le climat est caractérisé par l'existence de deux saisons :  
une saison sèche, relativement longue s'étalant du mois de Novembre à Mai,  
et une saison des pluies (Hivernage) qui s'étend de Juin à Octobre.

Il est fortement influencé par la latitude (pluviométrie) et la proximité de l'Atlantique (atténuant les températures moyennes et les amplitudes thermiques). Les précipitations croissent du Nord au Sud, déterminant ainsi différentes zones climatiques : (Annexe 1 a)

- la zone côtière à l' Ouest qui est sous l'influence maritime,
- la zone septentrionale à climat sahélien (moins de 350 mm),
- la zone centrale à climat sahélo-soudanien (350-500 mm),
- la zone sud-est (Sénégal oriental) au climat de type soudanien (500-800 mm),
- et la zone méridionale avec un climat de type soudano-guinéen qui est la plus humide des régions où les précipitations annuelles peuvent atteindre 1000m (Chamard et Sall, 1973).

## C. Hydrographie

Les principales ressources en eau de surface sont (Gueye, 1992) :

- le fleuve Sénégal avec 700 km de long pour un volume d'eau mobilisable de 4 à 5 milliards de m<sup>3</sup> par an.
- le fleuve Gambie : 750 km dont seule la vallée moyenne est au Sénégal sur 300 à 400 km,
- la Casamance : 300 km entièrement à l'intérieur du territoire
- l'Anambé : affluent dont une fraction seulement du bassin versant est au Sénégal
- le Sine et le Saloum : anciennes vallées mortes envahies par la mer sur plus de 130 km
- les mares temporaires qui se remplissent en hivernage constituent des sources d'eau non négligeables.

### **2. 1. 2. Situation démographique et économique**

La population du Sénégal est estimée à environ 7 millions d'habitants (7.000.000) pour une densité de 36 habitants au km<sup>2</sup>, le français est la langue officielle. L'économie sénégalaise est dominée par le secteur primaire où l'agriculture représente l'activité la plus importante. Elle contribue à 25% au produit intérieur brut (P. I. B) et mobilise 70% de la population active. Les principales cultures pratiquées au Sénégal sont : l'arachide, le coton, les céréales (mil, sorgho, maïs et riz), le niébé et les cultures maraîchères dont une grande partie est destinée à l'exportation.

Ainsi la production s'élevait en 1994 à 718125 tonnes pour l'arachide, 38769 tonnes pour le coton, 28928 tonnes pour le niébé et 943370 tonnes pour toutes les céréales confondues (DISA, 1995).

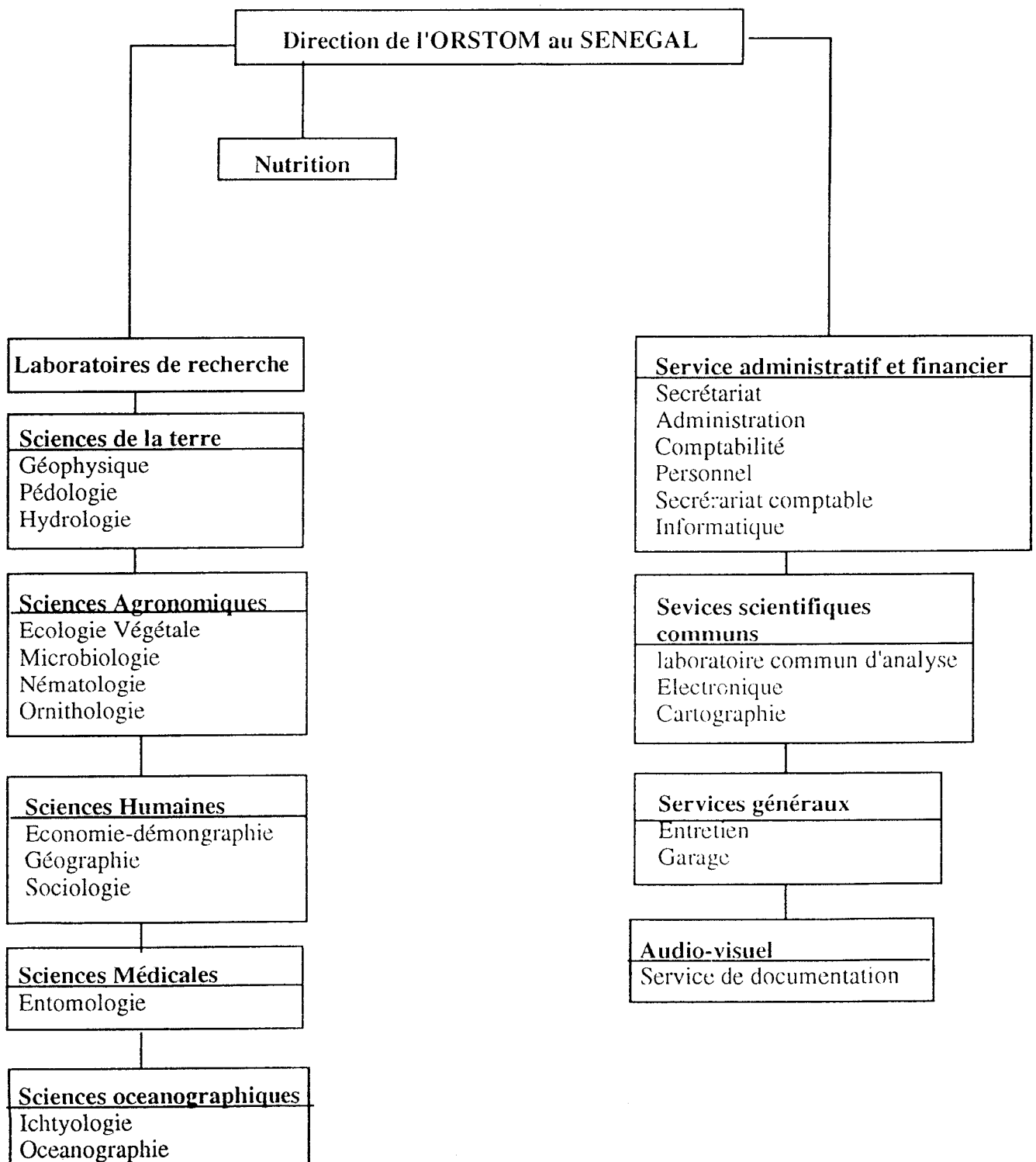
## **2. 2. Structure d'accueil**

### **2. 2. 1. Présentation de l'ORSTOM**

1943 marque la date de création de l'Office de Recherche Scientifique Coloniale (ORSC). Il avait comme grands objectifs : orienter, coordonner et contrôler les recherches scientifiques aux colonies par la mise sur pied d'un programme de recherche. Dans le domaine de la production agricole figuraient la forêt, l'agriculture et l'élevage.

Jusqu'aux années 50, les chercheurs et techniciens de l'ORSC puis de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-mer (ORSTOM) étaient envoyés en mission dans les différents sites d'action de l'office. Mais de nos jours, une grande partie des activités de recherche de l'ORSTOM est basée sur des accords par des partenaires extérieurs (Instituts de Recherche, Universités, Ministères, Organisations internationales ect...). Le travail des chercheurs de l'ORSTOM à l'étranger est régi depuis 1960 par des accords-cadres avec les pays concernés. Présentement certains programmes sont menés dans le cadre de conventions particulières et touchant différents domaines de la recherche (systèmes physiques, biologiques, ressources naturelles, certaines maladies, systèmes sociaux, l'économie informelle etc..).

### 2. 2. 2. L'organigramme



### 2. 2. 3. Les Centres de recherche

En 1953, l'ORSTOM est en plein essor en Afrique noire. Les instituts de recherche sont implantés en Afrique équatoriale, alors française, au Congo, au Tchad, au Cameroun... En Afrique de l'Ouest, l'implantation principale est à Adiopodoumé (Côte-d'Ivoire). Deux centres qui voient le jour à Dakar, l'un de pédologie et l'autre de géophysique. Mais présentement, l'ORSTOM à Dakar s'est attaché à étudier un grand nombre de domaines (voir les différentes sections de l'organigramme) répartis dans 2 sites : celui de Hann et celui de Bel-Air où nous avons le laboratoire de Nématologie, lieu de mon stage.

### 2. 2. 4. Présentation du laboratoire de Nématologie

#### Historique

Le laboratoire de Nématologie de Dakar Bel-Air, situé dans le centre ORSTOM/ISRA a été créé en 1970. Il s' est d'abord orienté vers l'inventaire des nématodes de la zone soudano-sahélienne. Environ 70 espèces de nématodes phytoparasites ont été observées au Sénégal dont 20 y ont été décrites pour la première fois par des techniques telles que : la morpho-biométrie, électrophorèse, les plaques périnéales et l'utilisation de gammes de plantes hôtes.

Le programme (défini dans le paragraphe "Introduction")

Les structures de collaboration sont :

- La Faculté des Sciences de l'Université Cheikh Anta Diop (UCAD), Département de Biologie Animale. La collaboration repose sur la taxonomie , l'ultrastructure, les techniques électrophorétiques et des échanges d'idées dans le cadre du Groupement d'Intérêt Scientifique-Lutte Intégrée et Nématologie (GIS-LINNE).

- L'Institut Sénégalais de Recherche Agricole depuis 1980. La collaboration repose sur l'étude de la typologie des systèmes de culture, l'étude des complexes parasitaires et l'application de nouvelles techniques défavorables aux nématodes

\* Le Centre pour le Développement de l'Horticulture (CDH) : la collaboration repose sur la mycologie, l'entomologie, la phytotechnie et la lutte intégrée.

\* La Direction de la Recherche et de la Production Forestière (DRPF), la collaboration repose sur des études microbiologiques.

- La Direction de la Protection des Végétaux (DPV) : dans le cadre du GIS-LINNE pour les transferts de technologie

- au Sahel le laboratoire collabore avec :

\* L'Institut d'Economie Rurale (IER) au Mali dans le cadre du projet CEE biodiversité et développement durable.

\* Le service de la Protection des Végétaux (SPV) de Bobo Dioulasso au Burkina Faso dans le cadre du projet CEE Biological contr l of root-knot-nematodes.

### **2. 3. Les principales contraintes phytosanitaires**

D'après le bilan de la campagne phytosanitaire 1995-1996 de la Direction de la Protection des Végétaux (DPV). Le Sénégal se caractérise par la présence de nombreux organismes nuisibles d'importance variable selon les zones agro-écologiques et la physionomie des hivernages. Parmi ces principales contraintes on peut signaler :

- Des infestations de divers sauteriaux dont l'espèce la plus redoutée : *Oedaleus senegalensis*   des densités de 30 individus/m<sup>2</sup> dans la zone centre du pays. Elle est en association avec les chenilles, les iules et les pucerons ; ils causent des défoliations en début et milieu de cycle des cultures.
- Des pourritures et avortements de panicules causés par des attaques de mineuses, foreurs sur céréales.
- Un dépérissement de certaines plantes d  à des attaques de pucerons et cochenilles.
- Des dégâts d'oiseaux granivores (*Quelea quelea*) sur céréales et sur parcelles de riz jouxtant le casier sucrier (Richard-Toll) et les départements de Podor et de Matam.
- Quelques maladies cryptogamiques : charbon et mildiou du mil ont été observées sur des superficies très réduites à Fatick.
- Des populations de rats sur tomate et riz maîtrisés grâce à une dératisation continue par appâtage.

Une apparition brutale de la cochenille farineuse *Rastrococcus invadens* des arbres fruitiers a été observée au cours de l'année dans la région de Dakar. Des prospections extensives suivies de lâchers de deux ennemis naturels (*Anagyrus mangicola* et *Gyranusoidea tebygi*) ont été menés pour limiter les populations de cochenille.

- Les ravageurs des panicules (*Pachnoda sp*, *M loides*), mineuse de l' pi (*Heliocheilus albipunctella*) ont été signalés dans les régions de Tamba et Kolda sur des superficies assez vastes atteignant parfois 15 individus/ pi. Leur présence en mi-Août jusqu'à fin septembre a coïncidé avec l'épiaison du mil.

- Enfin de campagne, *Caryedon serratus* et *Aphanus sordidus* sur arachide, *Sitotroga cerealla* sur mil et *Callosobruchus sp* ont été notés sur les stocks de ces spéculations.

Ainsi le faible niveau de dégâts enregistrés dans l'ensemble du territoire s'explique par l'abondance de la végétation dans les jachères et l'efficacité des traitements phytosanitaires.

Tableau n°1 Situation des infestations et des traitements phytosanitaires camp, 1995-1996 (source DPV, bilan de la campagne phytosanitaire, 1995-1996)

<u>Superficies prospectées</u> *	332.700 ha
<u>Superficies infestées</u>	103.000 ha
dont : <u>criquet pélerin</u>	6.468 ha
<u>Sauteriaux</u>	72.128 ha
<u>autres ravageurs</u>	24.435 ha
oiseaux et rats non déterminés	
<u>Superficies traitées</u>	70.320 ha
dont : <u>criquet pélerin</u>	2.610 ha
<u>sauteriaux</u>	48.910 ha
<u>autres ravageurs</u>	18.800 ha

\* tous ravageurs

### III. ETUDES REALISEES DANS LE CADRE DU THEME

#### 3.1. Revue bibliographique sur les nématodes parasites des cultures maraîchères

##### 3.1.1. Problématique nématologique

Le Sahel dépend toujours de son agriculture et celle-ci est toujours soumise à la forte pression parasitaire ne lui permettant pas de répondre aux exigences économiques et financières attendues par les producteurs. Malgré l'effort soutenu par la plupart des Gouvernements sahéliens pour essayer de limiter l'hétérogénéité des hivernages, la consommation maraîchère actuelle dans les régions tropicales est de l'ordre de 90 g de légumes/habitant/jour comparativement aux besoins optimaux moyens de population mondiale qui sont de 250 g/habitant/jour (Fereol, 1995).

Cet écart entre les besoins et la satisfaction est dû aux conditions agro-climatiques et pédologiques souvent défavorables mais aussi à un complexe parasitaire tel que : les oiseaux, les insectes, les rongeurs, les bactéries, les champignons... et surtout les nématodes.

D'après Fereol (1995), sur ces 5 spéculations maraîchères tropicales ; ces espèces de nématodes sont rencontrées dans les régions tropicales.

Choux	<i>Meloidogyne spp.</i> , <i>Tylenchorhynchus brassicae</i> ; <i>Hirschmanniella oryzae</i> ; <i>Rotylenchus reniformis</i> ; <i>Paratrichodorus minor</i> , <i>Tylenchus brassicae</i>
Laitue	<i>Meloidogyne spp.</i> ; <i>R. reniformis</i> ; <i>P. minor</i> ; <i>Longidorus africanus</i> ; <i>Scutellonema cavenessi</i>
Tomate	<i>Meloidogyne spp.</i> ; <i>R. reniformis</i> ; <i>Nacobbus aberrans</i> ; <i>Tylenchorhynchus brassicae</i> ; <i>Xiphinema basiri</i> ; <i>Hoplolaimus indicus</i> ; <i>Radopholus spp.</i> , <i>P. minor</i>
Oignon	<i>Dylenchus dipsaci</i> ; <i>Meloidogyne spp.</i> , <i>N. aberrans</i> ; <i>Radopholus spp.</i> ; <i>B. longicaudatus</i> ; <i>P. minor</i> ; <i>Tylenchus filiformis</i>
Aubergine	<i>Meloidogyne spp.</i> , <i>R. reniformis</i> ; <i>T. brassicae</i> ; <i>X. basiri</i> ; <i>Radopholus spp.</i> , <i>P. minor</i>

Les informations disponibles sur les nématodes et leurs dégâts sont plutôt maigres ou inexistantes et leur action est plutôt grave et complexe dans les sols sableux et chauds du Sahel très propice aux infestations de nématodes, surtout dans les périmètres irrigués des zones maraîchères à culture continue.

### **3.1.2. Nématodes à galles des cultures maraîchères**

La production maraîchère connaît une expansion dans de nombreux pays africains en raison de sa très bonne rentabilité, de son intérêt du point de vue nutritionnel, du fait que les cultures maraîchères s'intègrent bien aux systèmes de production traditionnels et qu'elles sont source de devises. Cela constitue une alternative aux traditionnels produits tropicaux d'exportation dont les cours actuels ne sont pas stimulateurs pour ces pays.

Mais la production maraîchère doit malheureusement faire face à de multiples problèmes parasitaires dont les nématodes phytoparasites récemment décrits, et leurs effets dépressifs sur la production des principaux légumes sont considérables. Les estimations de pertes de production des cultures maraîchères en régions tropicales sont de l'ordre de 17-20 % pour l'aubergine, 18-33% pour le melon, 24-38% pour la tomate et plus d'autres espèces (Sasser, 1979).

Par rapport à ces pertes générales dues aux maladies et ravageurs, les nématodes, en particulier les *Méloidogyne*, principaux nématodes de la sous-région sont responsables de 30 à 60% des pertes sur aubergine et de 50% sur melon et pastèque (Lamberti, 1979).

Au Burkina Faso les *Méloidogyne* peuvent causer sur tomate 60 à 80% de chute de rendement (Sawadogo *et al.*, 1993).

Au Sénégal, d'après la prospection du laboratoire de Nématologie en 1993, *Méloidogyne* spp. constitue le principal parasite. Il est pratiquement aussi abondant dans toutes les zones maraîchères, aussi bien dans le sol que dans les racines. Par contre sa fréquence est variable : c'est dans la vallée du Sénégal qu'il est moins répandu, partout ailleurs, il y est très fréquent.

Il est plus souvent trouvé dans les racines que dans le sol. Ceci est particulièrement marqué dans la région des Niayes. Il est rencontré: sur la tomate (90%) des échantillons de racines contenaient *Méloidogyne* spp., sur l'aubergine, chou, pomme de terre, gombo, pastèque etc...

La population de *Méloidogyne* spp. est forte et homogène dans les racines de ces cultures (80 à 100 %) et hétérogène d'une culture à l'autre dans le sol (45 à 70%).

Cette importance au niveau du Sénégal fait que le programme du laboratoire de Nématologie de Dakar s'est orienté à la recherche d'alternatives biologiques et culturelles nouvelles pour le contrôle des nématodes à galles ( genre *Méloidogyne* )

#### **3.1.2.2. Description d'un nématode phytoparasite**

Le mot " nématode " est dérivé du nom grec " nema " qui veut dire fil.

Les nématodes phytoparasites, également appelés anguillules sont des vers ronds allongés en fuseau, non segmentés. Cependant chez certaines espèces le corps de la femelle adulte peut se renfler et devenir plus ou moins globuleux (Prot, 1984). Ils vivent partout où pousse une plante aux dépens de laquelle ils peuvent se nourrir dans les milieux et sous des climats très divers : des herbes de la toundra sibérienne, aux arbres du désert, des plants épiphyte aux algues marines, et des plantes cultivées. Ils sont de taille microscopique (0,3 à 5 mm de long et 15 à 50  $\mu\text{m}$  de section), (Prot, 1984). Ce sont des parasites obligatoires, pourvus d'un stylet, sorte de seringue buccale leur permettant de parasiter les plantes en s'attaquant aux parties aériennes ou aux parties souterraines. Ils réalisent tout ou une partie de leur cycle de développement dans le sol provoquant des dommages importants aux cultures.

### 3.1.2.3. Position systématique

Les nématodes du genre *Meloidogyne* appartiennent à l'embranchement des *Nemathelminthe* (vers ronds) à la classe des *Nematoda* (pas de cils vibratiles, oesophage différencié, appareil excréteur glandulaire) et à la sous classe des *Phasmida*.

D'après la révision de (Luc & Fortuner 1987) la systématique du genre se présente comme suit :

Ordre	<i>Tylenchida</i> Thorne, 1949
Sous-ordre	<i>Tylenchina</i> Thorne, 1949
Super-famille	<i>Tylenchoidea orley</i> , 1980
Famille	<i>Meteroderidae Filipjer &amp; Schuurmans Stekhoven</i> , 1941
Sous-famille	<i>Méloidogyne</i>

Le genre *Méloidogyne* compte au moins une cinquantaine d'espèces ; leur étude taxonomique repose sur : l'étude des figures périnéales, l'utilisation des gammes de plantes hôtes et l'étude électrophorétique des protéines et des isoenzymes des femelles.

### 3.1.2.4. Morphologie ( figure 2 )

Le mâle du *Méloidogyne* est filiforme et long de 0,8 à 2 mm. A l'extrémité antérieure s'ouvre la bouche, elle est pourvue d'un stylet de 2 fois la largeur des lèvres, mince avec des boutons (Jacob *et al.*, 1988). C'est grâce à ce stylet et que le nématode se nourrit.

Il possède 1 ou 2 testicules débouchant, avec l'intestin, dans un cloaque où se trouvent deux spicules, ou organes copulateurs qui font saillie à l'extérieur.

La femelle est globuleuse et mesure 0,44 à 1,3  $\mu\text{m}$ . Deux ovaires, qui débouchent dans le vagin, occupent la majeure partie du corps. Dans la partie postérieure se sont développées six glandes qui débouchent dans le rectum. Ces glandes produisent une substance gélatineuse dans laquelle une partie de oeufs est englobée.

Les larves de 2ème stade sont vermiformes, pointues à l'extrémité postérieure. Elles ont une longueur variant de 0,3 à 0,5 mm et un diamètre d'environ 10  $\mu\text{m}$ . Leur cavité générale est occupée presque totalement par le système digestif qui comprend la bouche, s'ouvrant à l'extrémité antérieure, l'oesophage, puis l'intestin qui débouche dans le rectum. La bouche contient un stylet creux et protractile. (De Guiran et Netscher, 1970).

Les *Méloidogyne* sont pourvus aussi d'un système musculaire formé de quatre champs musculaires et d'un système nerveux composé d'un anneau nerveux, de cordons nerveux, d'organes sensoriels tactiles et de chimio-récepteurs.

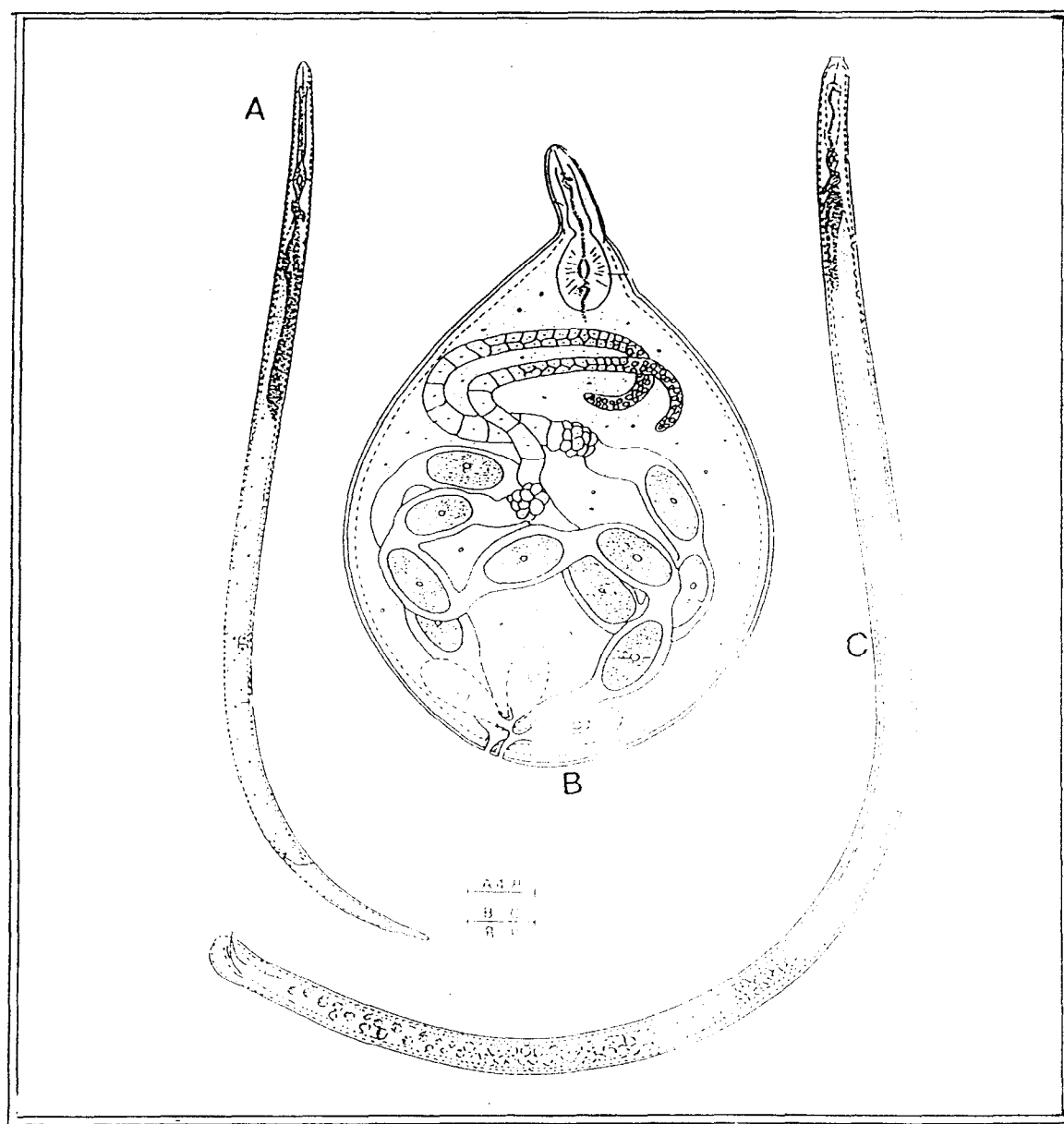


Figure 2: Morphologie du juvénile (A), de la femelle (B), et du mâle (C) de *Meloidogyne* spp. (Netscher, 1970)

### 3. 1. 2. 5. Biologie et cycle de développement Figure 3

L'adulte femelle pond ses oeufs dans une substance (enveloppe) gélatineuse fixée à l'arrière de celle-ci et appelée "masses d'oeufs" ; cette substance est produite par des glandes débouchant dans le rectum. Quelques heures après la ponte, l'oeuf subit une série de divisions cellulaires aboutissant au juvénile de premier stade (J1). Ce juvénile subit une première mue pour donner un juvénile de deuxième stade (J2) qui déchire la coque et émerge. A une température de 28°C, le délai ponte-éclosion dure sept à neuf jours (Nestcher, 1970).

Le juvénile J2 est le stade infestant, il est vermiforme et mesure entre 0,3 et 0,5 mm de longueur et environ 10 µ de diamètre.

Le J2 oriente son déplacement par rapport à un gradient de substances émises par les plantes, substances pour la plupart hydrosolubles et rémanentes (Prot, 1975).

Lorsqu'il rencontre une racine hôte, il y pénètre au niveau de la zone apicale et s'y déplace intracellulairement (partie molle à intenses activités métaboliques) et se fixe sur le cylindre central, la tête fichée dans le plérome sur les cellules duquel il se nourrit. Le juvénile de deuxième stade devient alors sessile (immobile) et subit 3 mues successives qui conduisent à l'adulte mâle ou femelle. Ce processus dure deux semaines.

Entre la deuxième et la troisième mue, il perd son stylet et ne se nourrit pas (De Guiran et Netscher, 1970).

Le déterminisme sexuel dépend des conditions du milieu. En milieu défavorable les juvéniles se développent préférentiellement en mâles. Tel est le cas en présence de fortes infestations racinaires. Les mâles, absents ou rares quittent les racines et se déplacent librement dans le sol. Ils ne sont pas fonctionnels (chez les espèces tropicales) : la reproduction de *Meloidogyne* est parthénogénétique.

### 3. 1. 2. 6. Pathogénie

Les nématodes du genre *Meloidogyne* font partie du groupe des endoparasites sédentaires : ils pénétrant dans la racine s'y sédentarisent et ne quittent plus le site choisi. Ainsi le corps de la femelle devient piriforme et parfois fait saillie à l'extérieur de la racine (Prot, 1984).

Du point de vue port végétatif et stades phénologiques de la plante, il est difficile de reconnaître une attaque de nématode, même lorsque les dégâts subis par les plantes sont évidents.

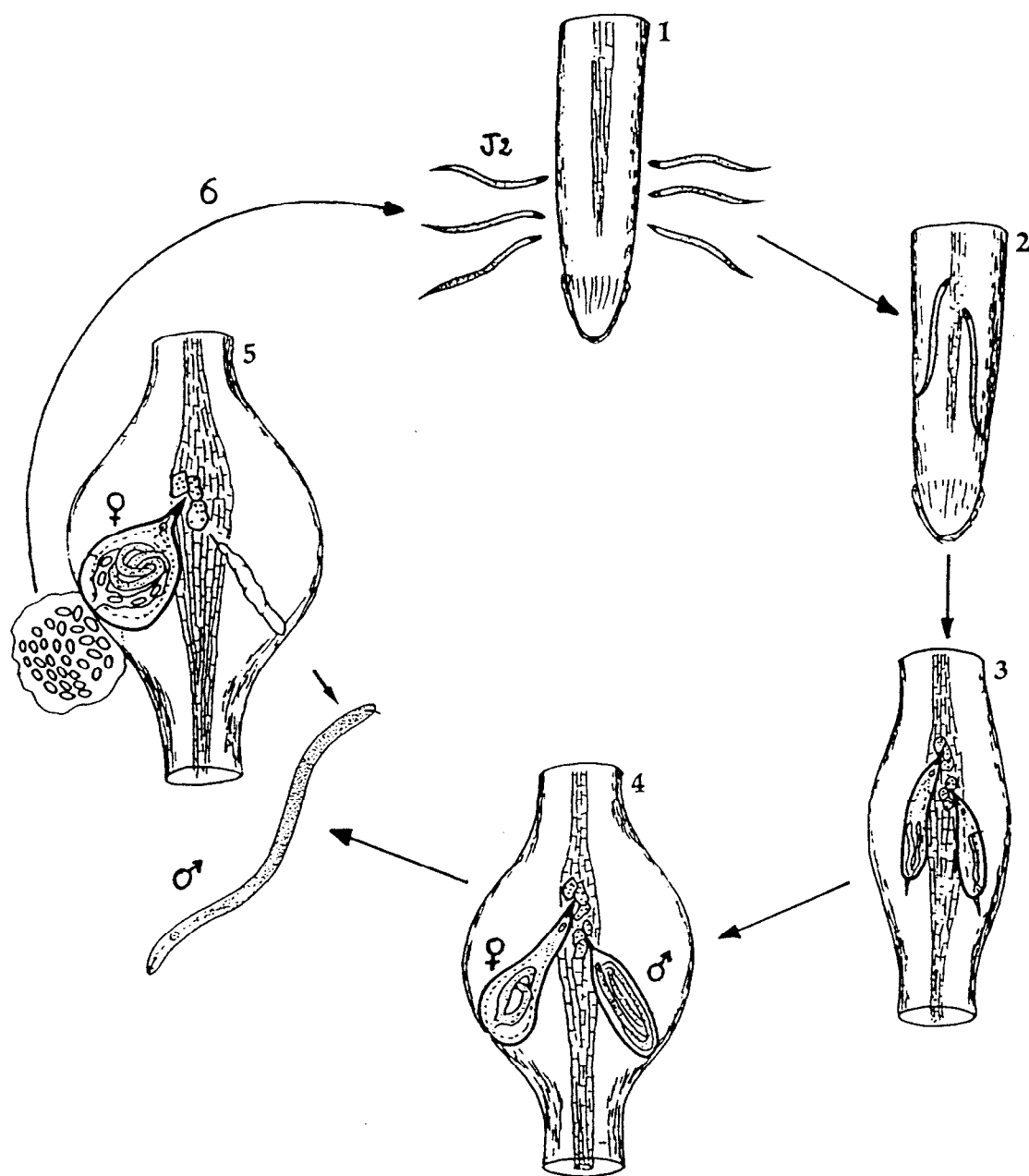


Figure 3 : Cycle de développement de *Meloidogyne* spp. (Netscher, 1970).

- 1 : pénétration des juvéniles de deuxième stade.
- 2 : sédentarisation des juvéniles au niveau de sites de nutrition.
- 3 : début de maturation des juvéniles en adultes.
- 4 : différenciation sexuelle des juvéniles.
- 5 & 6 : libération des mâles et éclosion des oeufs produits par les femelles.

Cependant pour *Meloidogyne*, son infestation induit à une formation de galles sur les racines et tubercules des plantes attaquées par les juvéniles (J2).

Ces manifestations provoquées par la sécrétion salivaire du nématode qui induit des modifications anatomiques entraînant une déformation du tissu vasculaire provoquent la formation de cellules géantes polynucléées et une hypertrophie des cellules corticales. Ces déformations constituent les galles. Elles sont solidaires de la racine et situées dans un axe alors que les nodules des *Rhizobium* ont une position excentrée par rapport à l'axe de la racine (Prot, 1984). Il y a aussi d'autres genres de nématodes qui provoquent des galles, comme les *Nacobbus* mais celles-ci sont en général plus petites (Bakker, 1986).

D'autres dommages sont causés par les *Meloidogyne* :

- carences en potassium chez de nombreuses plantes (Bakker, 1986)
- détournement d'une partie du métabolisme de la plante à leur profit
- endommagement du système racinaire par réduction et destruction des racines et radicelles de la plante, et prolifération anormale de radicelles près des points de pénétration
- décoloration et flétrissement des feuilles
- interviennent en association avec d'autres micro-organismes

exemples :

\*\* La résistance de cultivars de tomate au *Fusarium oxysporium sp. Lycopersici* est réduite en présence de *Meloidogyne* (Fereol, 1995).

\*\**Rhizoctoria* associé au *Meloidogyne* provoque des dégâts sévères sur tomate et piment (Van Gundy *et al.*, 1977 ; Shall *et al.*, 1993).

\*\* Bon développement de *Pseudomonas solanacearum* sur des végétaux déjà endommagés par de fortes pullulations de *Meloidogyne* (Bakker, 1986)..

\*\* Attaque sévère de *Fusarium* quand les *Meloidogyne* sont présents sur le cotonnier (Bakker, 1986).

### 3. 1. 2. 7. La lutte

Pour lutter contre les nématodes du genre *Meloidogyne* , plusieurs méthodes de lutte culturale, physique, chimique, génétique et biologique sont préconisées.

#### Méthodes culturales :

Ces méthodes culturales visent à réduire la population de *Meloidogyne* dans le sol en jouant sur la prophylaxie, les rotations culturales , les amendements organiques ou l'utilisation des plantes pièges ou à pouvoir nématicide ; ainsi nous avons :

### A. la prophylaxie

Le contrôle approprié des mauvaises herbes souvent hôtes des nématodes.

La mise en place des pépinières sur des sites n'ayant pas précédemment abrités des cultures hôtes de nématodes.

### B. Les rotations culturales :

La succession culturale avec des cultures non-hôtes ou résistantes exemples une alternance coton/arachide permet de mieux contrôler *M. arenaria* (Rodriguez Kabana *et al.*, 1987), une alternance aubergine avec arachide pour le contrôle de *M. incognita* (Netscher, 1983)

Une rotation arachide/fonio ou arachide/tomate réduit l'action néfaste de *Meloidogyne* (Sarr *et al.*, 1986).

### C. Des amendements organiques

L'utilisation sur concombre des composts issus de fientes de poules, à la dose de 10% dans le sol permettent le contrôle de *M. spp* un jour après l'infestation des plantes par 3000 larves (Zhemchizhina *et al.*, 1989).

Des composts, feuilles broyées, résidus végétaux et toute partie de jacinthe d'eau et de Neem à 30g/ha permettent le contrôle de *M. incognita* aussi bien que l'aldicarbe à 2kg/ha (Pathar *et al.*, 1988).

### D. Extraits des plantes

Sur aubergine des tourteaux de graines d'arachides à raison de 100g/500G de semence permettent le contrôle de *M. incognita* (Singh et Singh, 1988).

Des extraits des feuilles de Neem ou d'*Eucalyptus tereticornis* constituent une matière efficace pour le traitement par immersion de graines de tomate contre *M. javanica* (Vats et Nandal, 1993).

### Méthodes physiques :

Chauffage du sol à la vapeur d'eau (Chiba et Suzuki, 1990)

Solarisation du sol qui permet une réduction de près de 92% de la population de *M. incognita* sur une culture de patate douce (Stevens *et al.*, 1988).

Submersion par l'eau (Sarr, 1988).

### Méthodes chimiques :

Les produits chimiques sont classés en fumigants et non fumigants.

#### A. Les fumigants

Le dazomet (Basamide Gr) appliqué en pépinière à  $40\text{g/m}^2$  contre *M. incognita* sur tomate, le 1, 3 - D améliore les rendements de tomate de l'ordre de 50% à un taux d'application de 150l/ha et de 121% avec 200l/ha (Lamberti, 1979).

#### B. Les non fumigants

L'aldicarbe  $10\text{g/m}^2$ , le carbofuran 3g/ha, le phorate  $10\text{g/m}^2$  (Verma *et al.*, 1994). De même le dichloropropène 50-100 l/ha, le vibromure d'éthylène 200l/ha pour le contrôle de *M. incognita* (Mateille *et al.*, 1988).

### Méthodes génétiques :

Elles reposent sur l'utilisation de variétés résistantes, exemple : *Lycopersicon peruvianum* présente une résistance à *M. incognita* (Sakhuja *et al.*, 1991) grâce à la présence du gène Mi.

### Méthodes biologiques :

La microflore de la plupart des sols est très dense et variée. Certaines micro-organismes qui la constituent, sont utilisés par le contrôle des *Meloidogyne*.

L'actinomycètes parasite : *Pasteuria penetrans* (Sayre et Starr, 1985) ubiquiste et très inféodé à *Meloidogyne*. Ses sporanges se fixent sur la cuticule des J2 et l'hyphe bactérien pénètre dans la cavité générale des nématodes, huit jours après il se développe des thalles végétatifs dans le corps du nématode. La femelle ne produit plus d'oeufs (Prasad et Mankau, 1969) et devient un "sac" de spores.

Les champignons prédateurs tel que *Arthrobotrys oligospora* (Cayrol et B'chir, 1979) qui forme des pièges différenciés capables d'immobiliser et de tuer le nématode.

### Méthodes intégrées :

Par une utilisation simultanée dans un cadre stratégique des différentes méthodes disponibles contre les ennemis des cultures dans le but de maintenir leur population à un niveau bas pour que les

dégâts occasionnés soient économiquement rentables. Cette méthode de lutte est la plus recherchée présentement.

### **3.2. Etudes pratiques : techniques nématologiques**

#### **3.2.1. Diagnostic nématologique**

A défaut d'un champ paysan, un diagnostic nématologique avait été effectué au niveau des parcelles et serres de multiplication semencière du TROPICASEM, situées dans une zone maraîchère à proximité du (CDH).

Il portait sur les cultures suivantes : aubergine, tomate, piment, gombo et oignon.

Aucun diagnostic précis sur feuillage ne nous permettait d'affirmer avec exactitude la présence des nématodes malgré certaines zones de mauvaise croissance sur piment et aubergine.

Un échantillonnage de sol et de racine était donc obligatoire malgré la présence notoire de galles sur certaines racines de piment.

#### **3. 2. 2. Echantillonnage**

Des échantillons sont composés de sol et de racines prélevés sur les parcelles et dans les serres. On prélève, sur une profondeur de 15 centimètres environ, des échantillons de sol et de racines pour connaître les espèces de nématodes présentes dans le terrain et en évaluer leur nombre. Ces échantillons, d'au moins 250 cm<sup>3</sup> de sol, sont recueillis à l'aide de transplantoir et placés dans des sacs plastiques. Chaque sac porte la référence du prélèvement et fermé hermétiquement par un bracelet en caoutchouc de façon à éviter le dessèchement. Les racines sont placées dans le même sac que la terre et le tri est fait au moment de l'analyse.

La référence du prélèvement est tirée d'un carnet à souche où sont consignées toutes les indications utiles concernant le prélèvement : lieu, date, état de la lutte, précédent cultural, etc...

#### **3. 2. 3. Extraction des nématodes**

##### **a). But**

Cette opération consiste à séparer les nématodes de la terre et des racines pour les identifier, les compter et éventuellement les récupérer pour collection.

##### **b). Appareils utilisés**

L'élutriateur de Seinhorst, 1962 (pour le soi), l'asperseur de Seinhorst, 1951 (pour les racines) et les tamis.

c). Principe pour le sol: (Figure 4 a)

C'est une opération qui consiste à séparer les particules de sol dont les nématodes en fonction de leur poids moléculaire et d'un débit ascendant.

Préparation de l'échantillon

On fait passer 250 ml de sol à travers un tamis grossier (1 mm de maille) au-dessus d'un entonnoir dans un erlen de 2 l avec un courant d'eau

On remplit l'erlen d'eau à ras.

Extraction

On fait passer dans l'élutriateur un courant d'eau ascendant de 60 à 80 ml/mm (réglage avec un débitmètre) pendant 20 min.

On récupère le trop plein dans un seau

Après 20 min., on arrête le courant d'eau, on verse dans le seau le contenu de l'erlen, puis remise du courant d'eau pendant 10 min.

Récupération du contenu de l'élutriateur dans le seau

On laisse reposer le contenu du seau

Tamisage

On verse le seau sur 4 tamis superposés de 50  $\mu$ m.

On recueille le refus du tamis dans un verre à pied de 250 cc.

Purification

Ensuite on verse le contenu du verre à pied sur un tamis grossier tapissé de 2 feuilles de kleenex préhumidifiés et on pose le tout dans une boîte de Pétri ou une assiette.

Après 48 heures on verse le contenu de la boîte de Pétri dans un tube de comptage gradué.

d). Pour les racines: (Figure 4 b)

Cette opération consiste à faire quitter les nématodes des racines par un pourrissement de ces dernières dans la chambre à brouillard et de piéger les nématodes dans un bocal contenant de l'eau.

Les racines sont coupées au collet et découpées à des dimensions de 1 à 1,5 cm.

Elles sont placées dans la chambre à brouillard pendant 15 jours.

Deux extraits d'eau contenant dans le bocal sont récupérés à 7 et 14 jours.

On fait un tamisage de 48 heures (identique à celui du sol).

Les extraits sont mis dans des tubes de 25 cc.

On effectue un comptage à la loupe binoculaire.

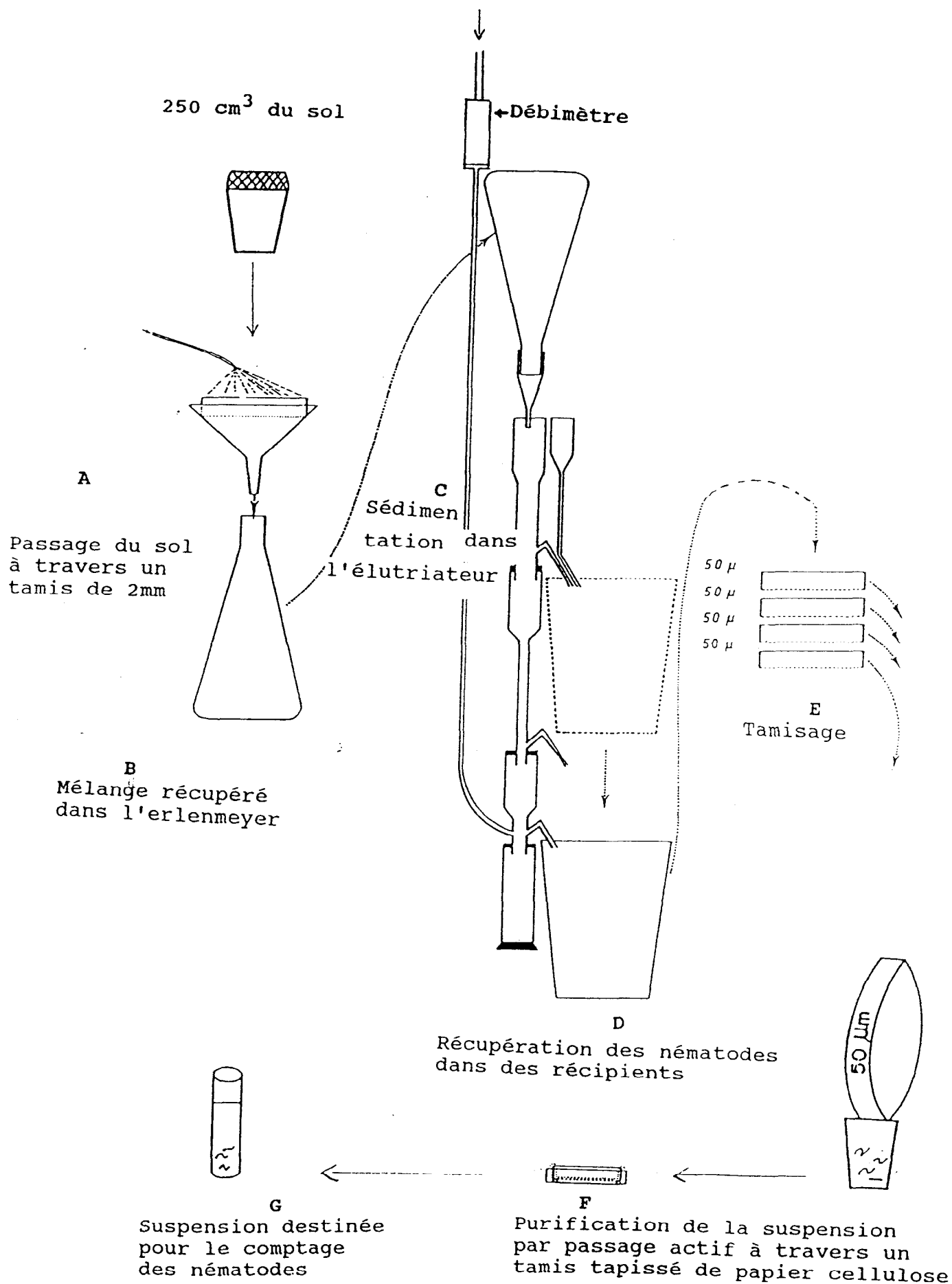


Figure 4 a : Technique d'extraction des nématodes du sol (Seinhorst, 1962)

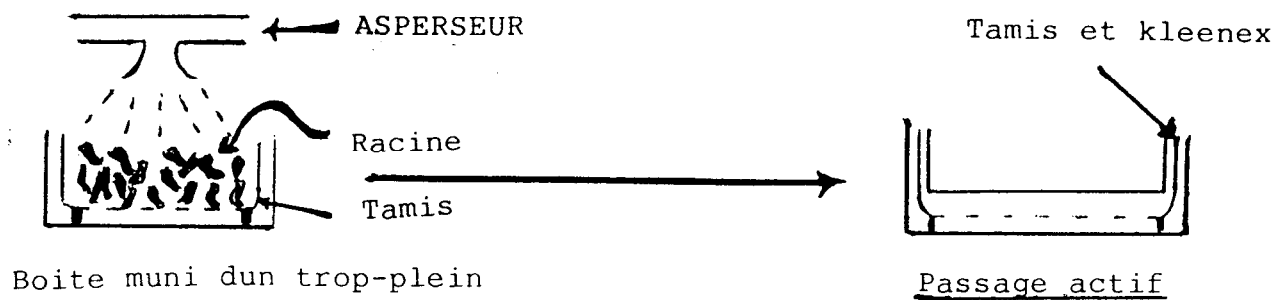


Fig. Techniques d'extraction des nematodes des racines (Seinhorst, 1950)

(4b)

### 3.2.4 Identification au stéréoscope de quelques genres de nématodes

Par l'appui du technicien Samba Baidy N'Diaye taxonome de l'équipe, ces différents genres de nématodes ont été reconnus à la loupe binoculaire par des isolements espèce par espèce. L'identification s'arrêtait à une simple observation de certains caractères discriminants: longueur du stylet, forme de la tête, forme de la queue, forme du corps etc...

Tableau : caractéristiques morphobiométriques de certains genres de nématodes ( J.J.S' Jacob et W.C.T. Middelplaats ).

Genre	<i>Hemicyclo.</i>	<i>Criconemoid.</i>	<i>Scutellonema</i>	<i>Meloidogyne</i>	<i>Helicotylench.</i>	<i>Tylencho.</i>	<i>Pratylenchus</i>	<i>Hirschmanie.</i>
Sclérotisation céphalique	non développée	non développée	bien développée	légèrement développée	bien développée	légèrement ou bien développée	bien développée	bien développée
Stylet buccal	long, mince de 1/16 à 1/4 de la largeur du corps	long et robuste (40à100µm)avec boutons basaux	deux fois la largeur des lèvres, fortement développée avec des boutons apparents	2 fois la largeur des lèvres, minces avec des boutons	2 fois la largeur des lèvres avec des boutons apparents	bien développé avec des boutons apparents	court, bien développé avec des boutons apparents	une fois et demie à 4 fois la longueur du corps avec des boutons apparents
Intestin	-	-	généralement foncé	généralement foncé	souvent foncé	-	foncé	-
Queue femelle	hémisphérique à aigüe allongée	forme variable cylindrique aigüe allongée	hémisphérique en pointe ou non; la queue est claire, les scutellas sont visibles	variable, subaigüe parfois incisée; partie hyaline	allongée ventralement; extrémité hémisphérique	conique à arrondie	conique ronde	effilée avec pointe
Position de la vulve en %	80-85	85-96	50-60	-	55-69	40-60	75-80	48-58

Légende: *Hemicycliophora* spp.

*Meloidogyne* spp.

*Pratylenchus* spp

*Criconemoides* spp

*Helicotylenchus* spp

*Pratylenchus* spp

*Scutellonema cavenessi*

*Tylenchorhynchus* spp

*Hirschmaniella* spp

### **3. 2. 5. Comptage**

#### **3. 2. 5. 1. Résultats des analyses nématologiques** **sur les parcelles de TROPICASEM**

Le comptage est fait au microscope stéréoscopique (grossissement 40X). Il est effectué dans une petite plaque quadrillée et les nombres de nématodes sont ramenés au  $\text{dm}^3$  de sol ou au gramme de racines. ( voir annexe 3 )

Les échantillons de sol sont comptés au laboratoire de l'ORSTOM tandis que ceux des racines au laboratoire de la D. P. V.

#### **3. 2. 5. 2. Distribution de genres de nématodes (sol et racine)**

D'après le principe de Fortuner et Merny (1973), l'importance d'un genre est établie en connaissant sa fréquence et son abondance ( tableau 5 )

La fréquence est égale au pourcentage d'échantillons dans lesquels le genre ou l'espèce a été trouvée.

L'indice d'abondance est le logarithme décimal de la moyenne des effectifs du genre dans les échantillons où ils ont été trouvés.

\*\* Dans le sol : ( tableau 3 et figure 5 )

- *Scutellonema cavenessi* est peu fréquent et peu abondant.
- *Helicotylenchus spp* est peu fréquent et peu abondant
- *Pratylenchus spp* est très fréquent et peu abondant.
- *Meloidogyne spp* est très fréquent et très abondant.
- *Hirschmaniella oryzae* est peu fréquent et très abondant.
- *Tylenchorhynchus spp* est très fréquent et peu abondant.

\*\* Dans les racines : ( tableau 4 )

- *Meloidogyne spp* est très fréquent et très abondant.
- *Hoplolaimus spp* est peu fréquent et peu abondant.

#### **3.2.5.3 Discussion sur les résultats**

Nous avons aperçu que seules trois espèces sont très fréquentes: *Meloidogyne*, *Pratylenchus* et *Tylenchorhynchus*, et 2 espèces très abondantes : *Meloidogyne* et *Hirschmaniella*.

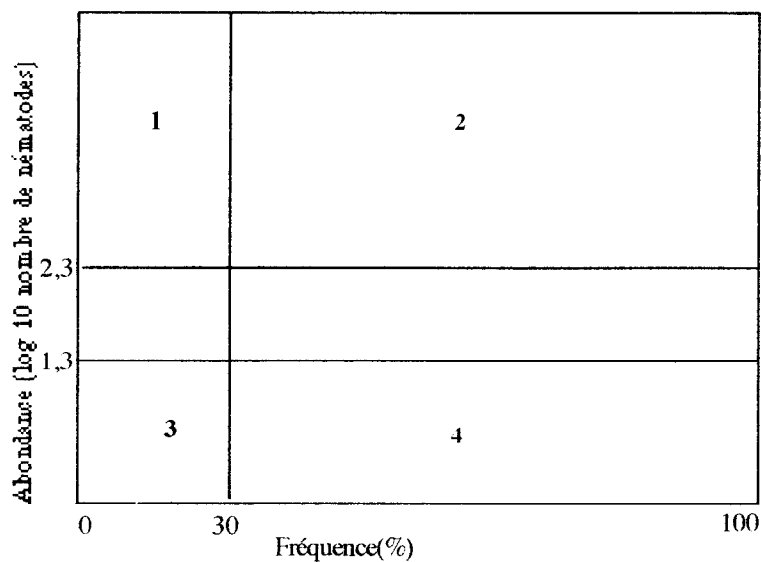
Tableau 3 : Calcul des moyennes, fréquence et abondance (sol)

	Moyenne X	Fréquence	Abondance (log(X+1))
<i>Scutellonema cavinessi</i>	1,66	8,33%	0,424
<i>Helicotylenchus</i>	5	25%	0,778
<i>Pratylenchus</i>	20	33,33%	1,959
<i>Meloidogyne spp</i>	382	41,66	2,5828
<i>Hirschmaniela oryae</i>	138	25%	2,144
<i>Tylenchorhenchus</i>	65	58,33%	1,81

Tableau 4 : calcul des moyenne, fréquence et abondance dans les racines

Genre	Moyenne X	Fréquence	Abondance
<i>Meloidogyne</i>	2847	87	3,45
<i>Hoplolaimus</i>	3	25	1,415

Tableau 5 : structure d'un diagramme fréquence/abondance (Fortuner &amp; Merny, 1973)



1,3 = limite d'abondance dans les racines(20 nématodes/g)

2,3 = limite d'abondance dans le sol (200 nématodes/dcm<sup>3</sup>)

30% = seuil de fréquence dans le sol et les racines

1,2,3,4 = quadrants identifiés par les seuils de fréquences et d'abondance.

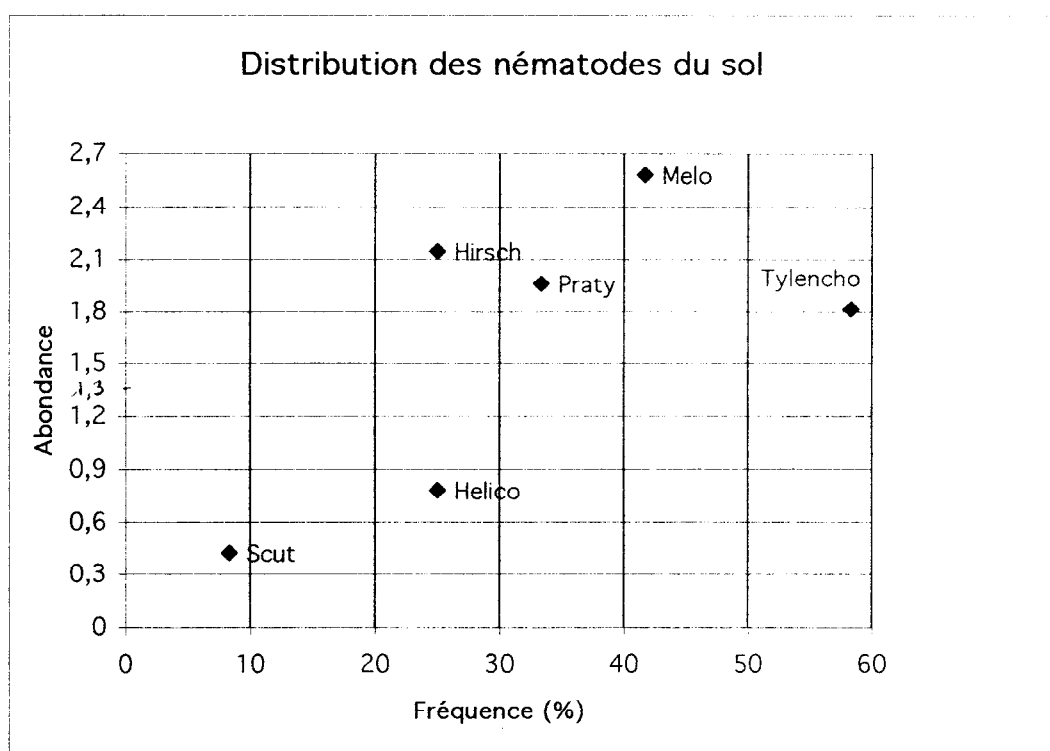


Figure 5: Diagramme de distribution des nématodes du sol

Sur l'ensemble des échantillons prélevés, 7 ont montré une abondance pour au moins une espèce soit 58,3% des échantillons, 2 pour une abondance de 2 espèces soit 16,7% des échantillons.

Les échantillons 221, 231, 236, ont montré une abondance très élevée en *Meloidogyne* aussi bien dans le sol que dans les racines. Par contre dans l'échantillon 230 *Meloidogyne* est abondant dans les racines et absent dans le sol.

### **3. 2. 6. Coloration des racines au lactophénol fuschine**

Dans le but de voir les différents stades de développement des *Meloidogyne* (oeufs, larves et adultes), les racines de tomate ont été colorées puis observées à la loupe binoculaire.

Principe (solution de base: annexe 4)

- Prélèvement des racines de tomate qui ont été inoculées le 05/11/96.
- On fait bouillir le lactophénol prêt à l'emploi et on plonge les racines préalablement lavées et égoutées pendant 2 min.
- On lave les racines à l'eau courante et on fait la coloration en les trempant pendant quelques secondes dans une solution d'acide chlorhydrique à 1‰
- On conserve ensuite dans une boîte de Pétri contenant du lactophénol blanc.
- Les racines sont coupées et étalées entre deux plaques de verre.

A cet effet deux montages de racines colorées ont été effectués le 19/11 et le 20/11/96. Les racines du 1<sup>er</sup> montage n'ont pas été trempées dans une solution d'acide chlorhydrique contrairement à la deuxième.

Et dans la deuxième plaque presque tous les stades de développement de *Meloidogyne* y sont fixés : oeufs, larves de 2<sup>ème</sup> stade, larve de 3<sup>ème</sup> stade, larve de 4<sup>ème</sup> stade qui va devenir femelle, larve de 4<sup>ème</sup> qui va devenir mâle, la femelle adulte.

### **3. 2. 7. Electrophorèse des estérases de *Meloidogyne*: Etude d'un système enzymatique( iso-estérases ) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.**

#### **3. 2. 7. 1. Principe de l'électrophorèse**

La technique de l'électrophorèse est un moyen de distinguer les protéines par certaines de leurs caractéristiques tels que le poids moléculaire et leurs charges électriques. Elle consiste à

faire migrer les protéines sur un support inerte en l'occurrence le polyacrylamide, qui permet un déplacement plus ou moins facile des protéines en fonction de leur taille.

La combinaison de la charge électrique et de la taille permet ainsi une vitesse plus ou moins rapide.

### **3. 2. 7. 2. Matériel et méthodes**

#### **A. Matériel végétal**

Les échantillons de tomates ont été prélevés dans la serre du laboratoire de nématologie et dans les parcelles d'essai de neem du CDH pour une identification des différentes espèces de *Meloidogyne* présentes dans les racines et également relancer l'élevage des espèces de *M. javanica* et *M. incognita* du laboratoire.

#### **B. Solution de base**

La préparation des gels, du tampon cuve, ainsi que du tampon d'extraction figurent en annexe, n° 4 b

#### **C. Les méthodes de l'électrophorèse**

Les étapes de cette étude se résume à cinq phases:

- . Extraction des femelles
- . Coulage des gels
- . L'électrophorèse
- . Révélation des estérases
- . Fixation et séchage des gels

### - Extraction des femelles et préparation des gels

Les femelles sont extraites des racines et placées dans des tubes micro- hémathocrites remplis du tampon d'extraction (5  $\mu$ l de la solution Nonidet), à raison d'une femelle par tube. Ces femelles sont écrasées au fond des tubes à l'aide d'un piston. Les broyats sont ensuite stockés au réfrigérateur. Pendant ce temps, le gel de séparation est préparé. Dans un bêcher sont placés 1,5 ml de la solution A, 3 ml de la solution B; 1,5 ml d'eau distillée et 6 ml de la solution C. Ce mélange est homogénéisé à l'aide d'une seringue. Le gel de concentration est ensuite préparé.

### - Coulage des gels

. Les plaques de verre sont lavées avec un détergent mouillant puis rincées avec de l'eau distillée. On applique les deux plaques de verre l'une contre l'autre, avec les espaceurs, le joint et les pinces.

. A l'aide d'une seringue on injecte 1 ml de gel de migration pour éviter la formation de bulles d'air.

- . On ajoute de l'eau distillée en surface pour éviter un dessèchement du gel.
- . On laisse polymériser à température ambiante pendant 1 heure
- . On retire l'eau à l'aide d'une pointe de micropipette branchée à une trompe à vide
- . On place le peigne
- . On laisse polymériser pendant 1/2 heure.

### Electrophorèse :

. Les peignes, les pincés et le joint sont retirés en maintenant les gels et les espaceurs entre les plaques.

. On fixe les plaques sur la cuve avec les pinces

. On retire l'eau contenue dans les puits à l'aide d'une pointe de micropipette branchée à une trompe à vide

. Les broyats de *Meloidogyne* sont injectés dans les puits, en ayant bien soin de rincer la seringue entre les opérations avec le tampon cuve.

. On remplit le compartiment supérieur de la cuve avec le tampon de cuve auquel on a rajouté quelques ml de colorant (bleau de bromophénol)

. Les puits aussi sont recouverts avec le tampon de cuve.

. L'appareil est fermé et placé dans le réfrigérateur, puis branché au générateur électrique situé hors du réfrigérateur

. Une prémigration de 15-20 mn à 40 V et 50 mA est effectuée, le voltage est ensuite ajusté à 120 V (50 mA) pour faire migrer rapidement les protéines pendant 1 à deux heures,

. Dès que le front de migration aura atteint 5 à 6 cm, (voir la position de la bande du bleu de bromophénol à la partie inférieure du gel) l'électrophorèse est arrêtée.

#### Révélation des estérases :

. La cuve du tampon est vidée

. Les plaques sont retirées de la cuve et décollées à l'aide d'un scalpel

. L'angle inférieur droit des gels est coupé pour servir de repère

. On retire le gel de concentration

. Les gels sont décollés des plaques et plongés dans des boîtes de pétri contenant le révélateur

. Les gels sont placés dans une étuve à 35°C pendant 30 mn pour révéler les phénotypes enzymatiques des femelles de *Méloïdogyne*

#### Fixation et séchage des gels :

. Les gels placés à l'étuve seront sortis au bout de 30 mn et lavés à l'eau du robinet

. Ils sont ensuite trempés pendant au moins 1/4 d'heure dans de l'acide acétique à 10%

. Ils sont rincés à l'eau et trempés dans la solution de déshydratation (méthanol) pour réduire la surface des gels et permettre une concentration des bandes (maximum 3 heures)

. Les gels sont déposés entre deux films cellophane transparents (type congélation aliments) et entre deux plaques de verre et on laisse sécher.

. Après séchage les gels sont photocopiés et le calcul des  $R_m$  (ou  $RF$ ) est effectué. Nous rencontrons que la deuxième plaque, l'ensemble des femelles mises en électrophorèse étaient de l'espèce *Javanica*. Les masses d'oeufs correspondant à cette deuxième plaque sont ensuite rassemblées dans un éclosoir pour continuer l'élevage de cette espèce. (annexes 5)

### 3. 2. 8 Montage pour collection de quelques spécimens de nématodes

Dans le cadre toujours de l'étude taxonomique, des nématodes ont été montés sur des lames de Cobb pour une observation plus poussée au microscope de certaines de leurs caractéristiques morpho-biométriques

Nombre de lames montées: 7

Nombre de genres conservés: 6

Caractéristiques des lames:

lame N° 00001: *Tylenchorhynchus sulcatus* : 5 femelles, 3 larves et 1 mâle

lame N° 00002: *Meloidogyne* spp : 10 larves

lame N° 00003: *Xiphinema* spp : 3 femelles

lame N° 00004: *Pratylenchus* spp : 6 femelles

lame N° 00005: *Helicotylenchus* spp : 5 femelles

lame N° 00006: *Hemicycliophora* spp : 5 femelles

lame N° 00007: *Meloidogyne* spp : 2 femelles, 1 L4 (mâle), 1L4 (femelle) et 1L3

#### 3. 2. 8. 1 Le matériel utilisé

- Une loupe binoculaire
- Une canne à pêche fabriquée avec un fragment de bambou portant à son bout éffilé un poil de porc
- Des lames portes objet de Cobb et des lamelles couvre objet de 16 à 22 mm de large rondes
- Des étiquettes insérées à a lamelle
- Des calles qui servent de support entre lame et lamelle pour éviter d'écraser les nématodes
- Des salières de conservation des nématodes
- Un dessiccateur, une étuve à 37° c
- Des solutions de fixation

#### 3. 2. 8. 2 Technique de montage

- Les nématodes sont mis dans une salière contenant une fine goutte d'eau,
- on chauffe le fixateur (FPG) à 70 - 80° C et on le verse dans la salière pour tuer les nématodes,
- la salière contenant les nématodes est placé dans un dessiccateur pendant au moins 24 h,
- on retire le FPG et on le remplace par la solution S<sub>1</sub>,
- on place la salière en position ouverte dans un dessiccateur fermé contenant de l'alcool à 95%,
- on place le tout à l'étuve à 37° C pendant au moins 12 h,
- on enlève ensuite la moitié de la S<sub>1</sub> et on rajoute la S<sub>2</sub> à une quantité égale,

- on remet la salière en position fermée directement à l'étuve pendant 3 jours pour permettre l'évaporation de l'alcool contenu dans la S2,
- après évaporation complète de l'alcool on place la salière dans un dessiccateur contenant du silicagel pour poursuivre la dessiccation pendant 3 jours,
- sous la loupe binoculaire les nématodes contenus dans la salière sont pêchés et déposés dans une goutte de glycérine sur la lame porte - objet,
- trois calles de diamètre conforme à celui des nématodes sont déposés en triangle dans la goutte.
- une lamelle est déposée lentement sur la goutte et l'excès de liquide qui déborde sous la lamelle est éliminé avec un papier filtre,
- le bord de la lamelle est luté avec du "glyceel" ou vernis à ongles,
- la lame est étiquetée (genre, espèce, sexe, localité, hôte, date) et conservée dans des boîtes de collection pour séchage.

### 3. 2. 8. 3 Composition des solutions de fixation

- Composition du FPG:

100 cc de formol à 40° C  
 15 cc (ou 30 cc) d'acide propionique  
 10 cc de glycérine  
 + qsp 100 ml d'eau distillée  
 + quelques gouttes d'acide propionique (pour obtenir une coloration jaune citron)

- Formule du S1:

200 cc alcool à 95%  
 100 cc glycérine  
 qsp 1000 cc H2O distillée

- Formule du S2 blanc:

950 cc alcool à 95%  
 95 cc de glycérine

- Formule du S2 Orceïne:

950 cc alcool 95%  
 1 cc solution mère Orceïne  
 50 cc glycérine

### 1. Conclusion générale

Ce stage d'initiation à la nématologie est d'un grand intérêt pour moi:

Il m'a permis de connaître l'impact des nématodes dans un complexe parasitaire des cultures maraîchères au Sénégal, de bien cerner leur pathogénicité, d'assimiler certaines techniques nématologiques appliquées au laboratoire pour l'étude et le contrôle des nématodes phytoparasites, en particulier les *Meloidogyne*. Il me permet de mieux aborder le cours de nématologie de la 2<sup>e</sup> année. Mais aussi et surtout de comprendre comment est difficile la tâche d'un nématologiste face à l'action néfaste de ces anguillules.

### 2. Recommandations

Au vu des résultats obtenus au niveau des comptages des échantillons du TROPICASEM, il serait souhaitable dans le cadre d'une collaboration scientifique au sein du GIS-LINNE que la DPV, l'ORSTOM et le volet Génétique du TROPICASEM puissent continuer les essais dans ces serres de multiplication.

De prendre en compte tous les facteurs biotiques et abiotiques nécessaires et d'analyser les interactions possibles favorables pour prétendre avoir à une banque semencière nationale résistante ou tolérante face aux agressions des nématodes phytoparasites.

Mais désormais, il demeure impératif que la TROPICASEM puisse dénématiser ces aires de multiplication et adopter une rotation adéquate.

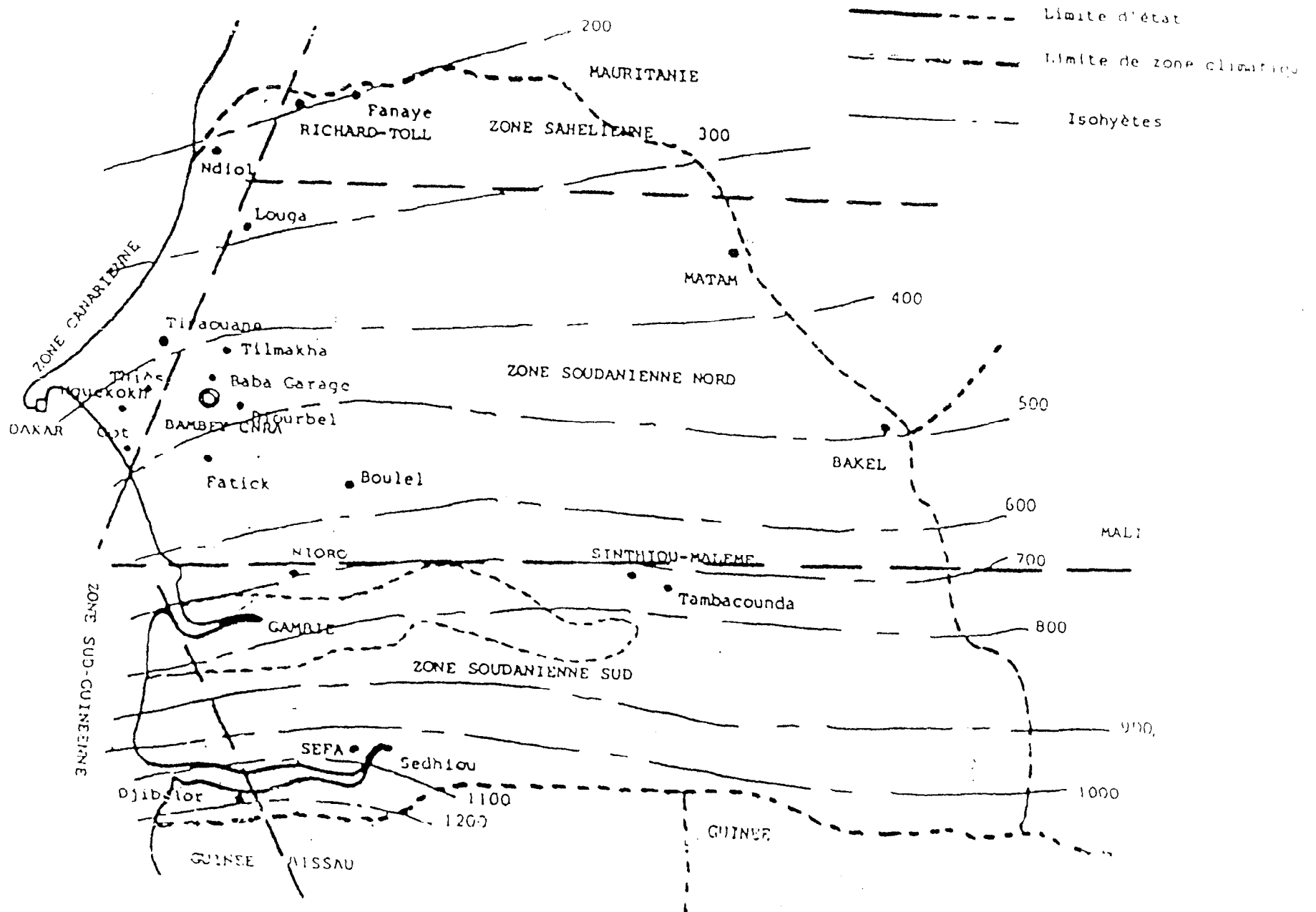
## BIBLIOGRAPHIE

- ANONYME, 1984 . Carte d'identité du Sénégal, Ministère du Plan et de la coopération en collaboration avec le Ministère de l'information. Éditions NEA, 74 p.
- BAKKER, 1986 . Fascicule du cours de nématologie, DPV, centre AGRHYMET, Niamey 81p.
- CHAMARD, P. C. , & SALL, M., 1973 . Géographie du Sénégal, Ministère de l' éducation nationale.
- CHIBA, T. ; SUZUKI, M.,1990 . The influence of soil heating and application of live matter into the soil on the occurrence of corky root, crown and root-rot, and root-knot nématode (*Meloidogyne spp.*) in forcing tomato culture. Proceeding of the Kanto-Tosan Protection Society N°37 : 241-242.
- DE GUIRAN.G.& NETSCER, C., 1970 .Les nématodes du genre *Meloidigyne* parasites des cultures maraicheres tropicales. Cahier ORSTOM ,Serie Biologique, M 11 : 151-158.
- DISA, 1995 . Resultats définitifs de la campagne agricole 1994/1995, Direction de l' agriculture du Sénégal, Dakar,15p.
- FEREOL, L., 1995. les nématodes des cultures maraichères en régions tropicales chaudes, Revue bibliographiques 41 p.
- FORTUNER,R. , & MERNY, G., 1973 .Les nématodes parasites des racines associés au riz en Basse-Casamance (Sénégal) et en Gambie. Cahier ORSTOM, Serie Biologique, 21 : 3-20.
- GUEYE, C. C., 1992 . Les problemes phytosanitaires au Sénégal et l 'appareil destiné à les résoudre pp 19-38, In : méthode de recherche en écologie des traitements antiacridiens en Afrique. Compte-rendu de l'atelier CCE-CIRAD du 24 au 27 Fvrier 1992, Montpellier France : 175 p.
- JACOB, J. J., & MIDDEPIAATS, W. C. T. 1988 . Fascicule de détermination des principaux nématodes phytoparasites au steéréoscope. Cours de nématologie. TSPV2. DFPV/AGRHYMET/CILSS (Niamey).
- LAMBERTY, F., 1990 . Chemical and cultural control. In : Lamberty, F., et Taylor, C. E. Eds . Root-knot nematodes (Meloidigyne species) Systematics, Biology and Control. London, Academic Press : 401-423
- MATEILLE,T.; NETSCHER, G. & CADET, P., 1988 . Protection temporaire des cultures maraichères contre *Meloidogyne incognita* par application en pépinière de microdoses de nématicides endothérapeutiques. In : Compte-rendu de la conférence Internationale sur les maladies des plantes, Lima, Pérou, CIP. 555-462.
- NETSCHER, C. 1970 . Les nématodes parasites des cultures maraichères au Sénégal. Cahier ORSTOM. Serie Biologique 11 : 209-229.
- PATHAR, A. K.; VADAN, B. S.& BRAR, J. S., 1988 . Water Hyacinth and neem leaves for the control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on Brinjal. Plant Disease Research, 3 (1) : 74-76.
- PRASAD, N & MANKAU, R., 1969 . Study on a sporozoan endopatasitic of nematodes. Journal of Nematology, 1 : 301-302.
- PROT, J. C. 1975. Recherche concernant le déplacement des juvéniles de *Meloidogyne spp.* vers les racines. Cahier ORSTOM, Serie biologique, 10 : 351 p.

- PROT, J. C. 1984 . Introduction aux nématodes phytoparasites des cultures maraichères. USAID, Dakar 28 p.
- RODRIGUEZ-KABANA, R. VEV, H. & BACKMAN, P. A., 1987 . Peanut-cotton rotation for the management of *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology, 19 : 484-486.
- SAKHUJA, P. K.; SINGH, I.; DHALIWAL, H. S. & RAMAN, H., 1991 . New sources of resistance against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* among wild species of tomato. Indian Journal of Nematology 21 (2) : 160-161.
- SARR , E. & PROT, J. C., 1986 . Pénétration et développement des juvéniles d'une souche de *Meloidogyne javanica* et d'une race B de *M. incognita* dans les racines de fonio (*Digitaria exilis*). Revue de Nématologie 8 (1) : 59-65.
- SARR , E. 1988 . Nématologie Tome 11. Département de formation en protection des végétaux. CENTRE AGRHYMET NIGER(Niger) P 54.
- SASSER, J. N., 1978 . Economic importance of *Meloidogyne* in Tropical countries; In : Lamberti, F. & Taylor, C. E. (Eds). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Systematic, Biology and control. London, Academic Press, 359-374.
- SAWADOGO, A.; THIO, B. & KINI, H. L. , 1993 . Estimation des pertes causées par les nématodes au maïs pluvial et à la tomate subséquente sur un maraîcher de l'ouest du Burkina-faso. Projet BF 91-06 rapport final, Laboratoire de protection des végétaux, Bp 403. Bobo-Dioulasso, Burkina-faso. 29 p.
- SAYRE, R. M., & STARR, M. P. , 1985 . *Pasteuria penetrans* ( ex Thorne, 1940), a mycelial and endospore bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. Proc Helm. Soc. Wash. 52 : 149-165.
- SEINHORST, J. W. 1962. Modification of the elutriation method for extraction nematodes from soil. Nematologica 8 : 117-128.
- SINGH, H. P. & SINGH, V., 1988. Évaluation of oilcakes and nematicides of *Meloidogyne incognita* infecting eggplants, Indian Journal of Nematology 18 : 366-368.
- STEVENS, C.; KHAN, V.; TANG, A. V. & BONSI, C., 1988. The effect of soil solarisation on growth response and root-knot damage of sweet potato. Horticulture Sciences 23 : 827.
- VAN GUNDY, S. D.; KIRKPATRICK, J. D. & GOLDEN, J., 1977 . The nature and role of metabolic leakage from root-knot galls and infection by *Rhizoctonia solani*. Journal of nematology 9 : 113-121.
- VATS, R. & NANDAL, S. N., 1993 . Effect of different concentrations of leaves extracts of neem and *Eucalyptus* used as bare-root-dip treatment of tomato seedlings against *Meloidogyne javanica*. Current Nem 4 : 15-18.

**ANNEXES**

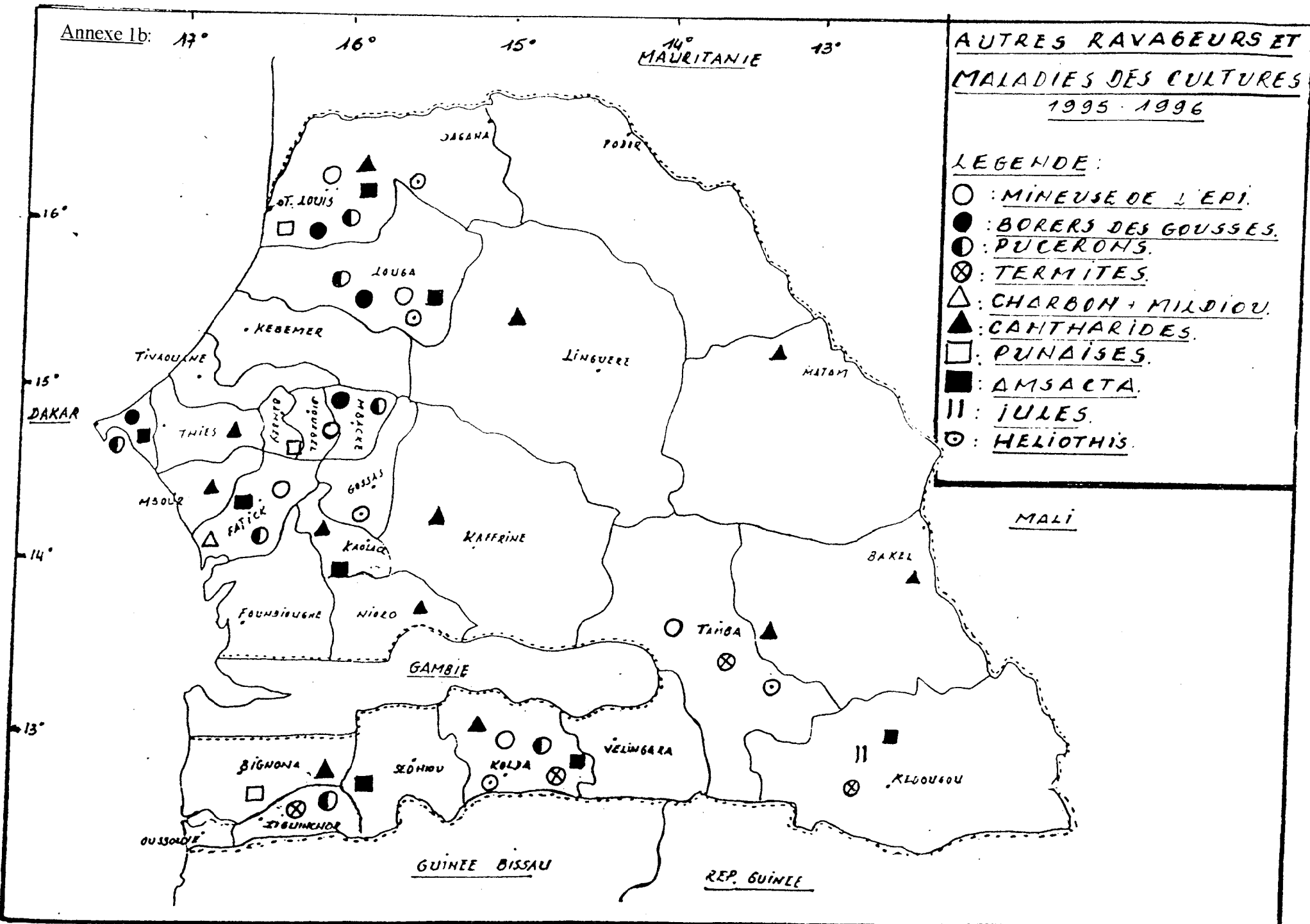
Annexe 1a: Carte de différentes zones climatiques du SENEGAL (Gueye, 1992)



AUTRES RAVAGEURS ET MALADIES DES CULTURES  
1995 - 1996

LEGENDE:

- : MINEUSE DE L'ÉPI.
- : BORERS DES GOUSSES.
- ◐ : PUCERONS.
- ⊗ : TERMITES.
- △ : CHARBON + MILDIOU.
- ▲ : CANTHARIDES.
- : PUNAISES.
- : AMSACTA.
- || : JULES.
- ⊙ : HELIOTHIS.



Annexe 2:

LABORATOIRE DE NEMATOLOGIE

Date :                      Recolt. :

Sol. :

Plante :

Aspect :

Lieu :

*antécédent culturaux :*

N° 15001

N° 15001

Vaz :

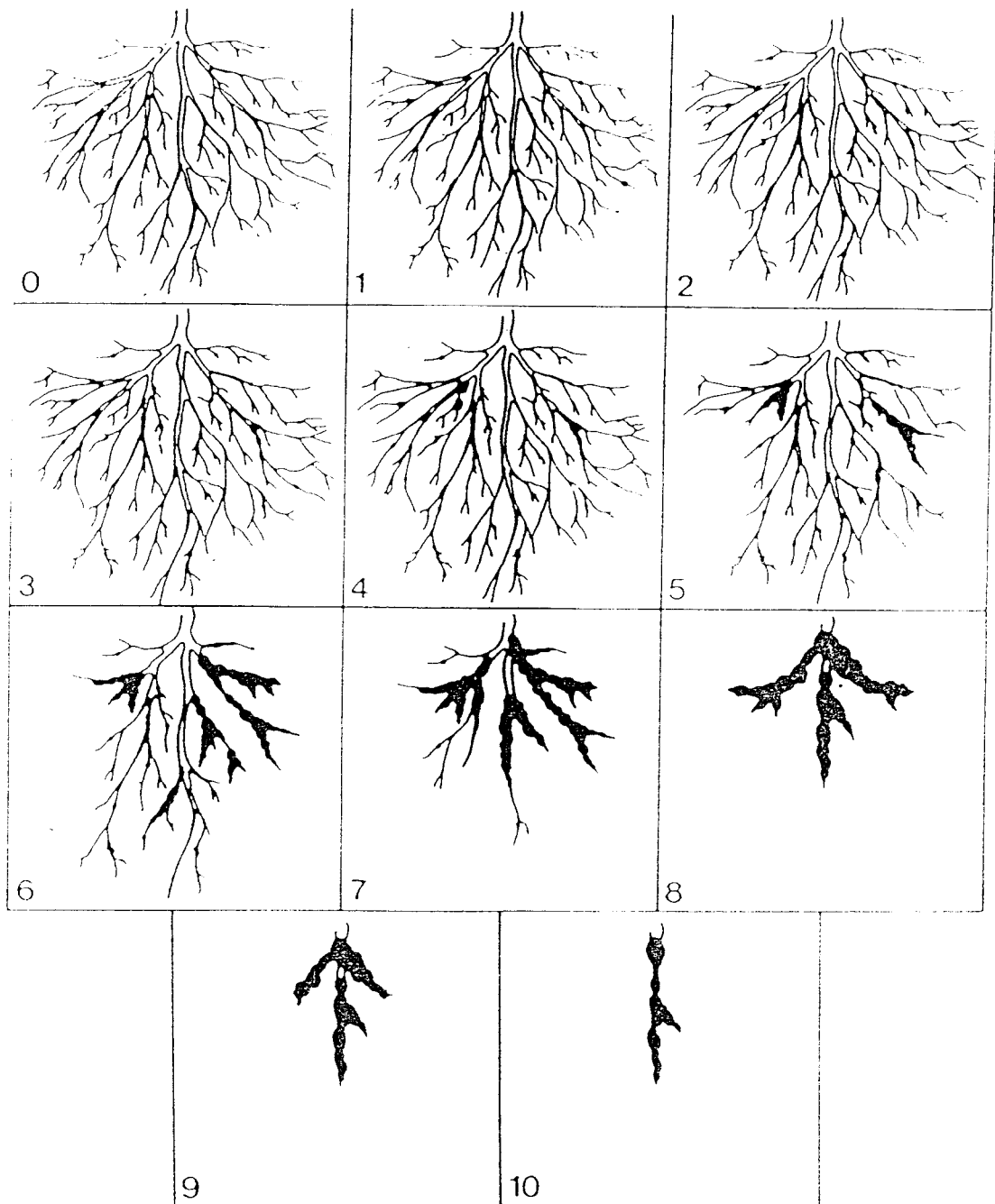
N° 15001

N° 15001

Exemple de carnet d'échantillonnage.

**ANNEXE 3 : RESULTATSS DES ANALYSES NEMATOLOGIQUES  
(Parcelles TROPICASEM)**

N° ECHANTILLON	Huische- maniella orysae	Scutello.	Helioty.	Pratylen	Meloïdo. spp.	Tylencho	Indice de galle	Résultat R1 (Melo)	Résultat R2 Melo Hoplo		ΣR x dil.	Nombre nématodes/gr de racines Melo Hoplo	
219	0	0	20	100	0	600	00	0	05	0	25	2	-
226	0	0	0	0	0	0	00	0	0	0	0	0	0
227	1.580	0	0	0	0	0	05	6.740	1.852	0	42.960	5.084	-
229	0	20	0	0	780	80	07	13.350	4.620	12	89.910	5.650	3
230	0	0	0	0	0	20	07	18.450	6.630	0	125.400	4.084	-
231	0	0	0	0	620	20	06	3.790	2.170	17	29.885	1.330	4
233	20	0	0	0	0	0	00	45	18	0	315	-	-
234	0	0	0	0	0	20	00	09	03	0	60	7	-
235	0	0	20	20	20	0	00	07	01	0	40	3	-
236	0	0	0	0	3.000	20	04	7.311	3.213	12	52.730	1.625	2
237	60	0	20	20	0	0	00	77	02	0	395	17	-
241	0	0	0	0	160	20	00	18	04	0	110	35	-



Rating schema for evaluation of root-knot infestation (Zeck, 1971)

0: Complete and healthy root system, no infestation

1: Very few galls can only be detected upon close examination

2: Small galls as in "1" but more numerous and easy to detect

3: Numerous small galls, some grown together, function of root not seriously affected

4: Numerous small galls, some big galls, majority of roots still functioning

5: 25% of root system severely galled and not functioning

6: 50% of root system severely galled and not functioning

7: 75% of root system severely galled and lost for production

8: No healthy roots, nourishment of plant interrupted, plant still green

9: The completely galled root system is rotting, plant is dying

10: Plant and roots are dead

## ANNEXES 4 :

### Préparation et composition des produits utilisés pour les montages de collection de spécimens de nématode

- Lactophénol blanc:
  - \* 500 cc de phénol cristallisé
  - \* 100 cc d'acide lactique
  - \* 1000 cc de glycérine
  
- Solution mère de lactophénol fuschine acide (à 5% de colorant)
  - \* on fait chauffer 100 cc de lactophénol blanc dans un flacon de 5100 ml
  - \* on y ajoute 20 g de fuschine acide et on agite
  - \* on ajoute ensuite 300 cc de lactophénol blanc
  
- Solution de lactophénol prête à l'emploi
  - \* on ajoute 990 g ou 860 g de lactophénol blanc dans 10 g ou 9 cc de lactophénol fuschine acide.

Annexe 5a: Composition des solutions utilisées pour l'électrophorèse des b-estérases de Meloidogyne spp.

**A. SOLUTIONS MÈRES**

**1. SOLUTIONS ET TAMPONS DE GEL**

**\* Tampon cuve**

Tris	6g	Colorant tampon	
Glycine	28,8g	Tampon cuve	100ml
Eau dist.	qsp 1litre	Bleu de Bromo.	20mg

**\* Gel de séparation**

<b>Sol. A</b>		<b>Sol. B (gel 7%)</b>		<b>Sol. C</b>
HCl 1N	20 ml	Acrylamide	28 g	Persulfate
Tris	12 g	Bisacryl.	0,735 g	Eau dist.
Temmed	0,23 ml	Eau dist.	qsp 100 ml	qsp 10 ml
pH(HCl)	8,4			
Eau dist.	qsp 100 ml			

**\* Gel de concentration**

<b>Sol. D</b>		<b>Sol. E</b>		<b>Sucrose</b>
Eau dist.	20 ml	Acrylamide	10 g	Saccharose
HCl	40 ml	Bisacryl.	2,5 g	Eau dist.
Tris	5,98 g	Eau dist.	qsp 100 ml	qsp 10 ml
Temmed	0,46 ml			
pH(HCl)	6,7	<b>Sol. F</b>		
Eau dist.	qsp 100ml	Persulfate	0,028 g	
		Eau dist.	qsp 5 ml	

**2. SOLUTIONS DE REVELATION DES ESTERASES DU TYPE B**

**Solutions phosphatées**

A = NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15,6 g
Eau dist.	qsp 1litre
B = Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,8 g
Eau dist.	qsp 1litre

**Tampon phosphate pH 7,2**

Sol.A  
Sol.B  
vérifier pH 7,2

**ColorantFast Blue RR**

Tampon phosphate	10 ml
Fast Blue RR	300 mg

**Substrat Naphtyl acétate**

Acétone	1 ml
Naphtyl ac	40 mg

**B. PREPARATION DES TAMPONS ET DESGELS**

**\* Tampon cuve.**

solution mère	50 ml
eau dist.	qsp 500ml

**\* Gel de séparation**

Sol. A	Sol. B	Eau Dist.	Sol. C
1,5 ml	3 ml	1,5 ml	6 ml

**\* Gel de concentration**

Sol. D	Sol. E	Sucrose	Sol. F
0,5 ml	1 ml	2 ml	0,5 ml

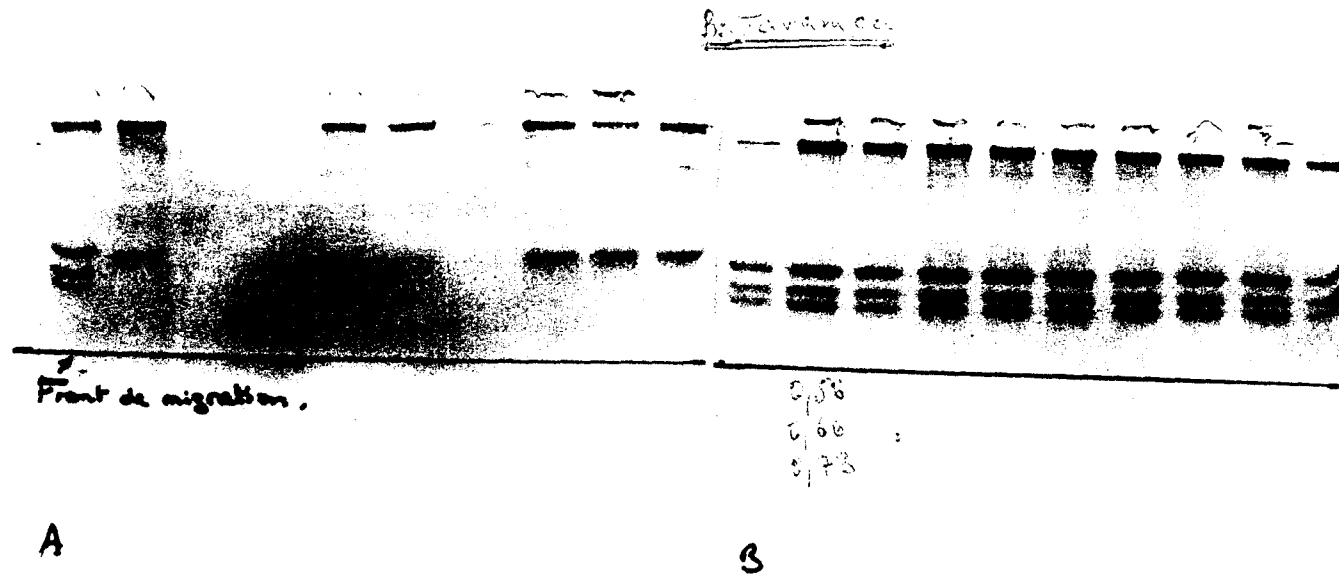
**3. REVELATION DES ESTERASES**

Tampon phosphate	48 ml
Fast Blue RR	1 ml
Naphtyl acétate	1 ml

**4. FIXATION ET CONSERVATION DES GELS**

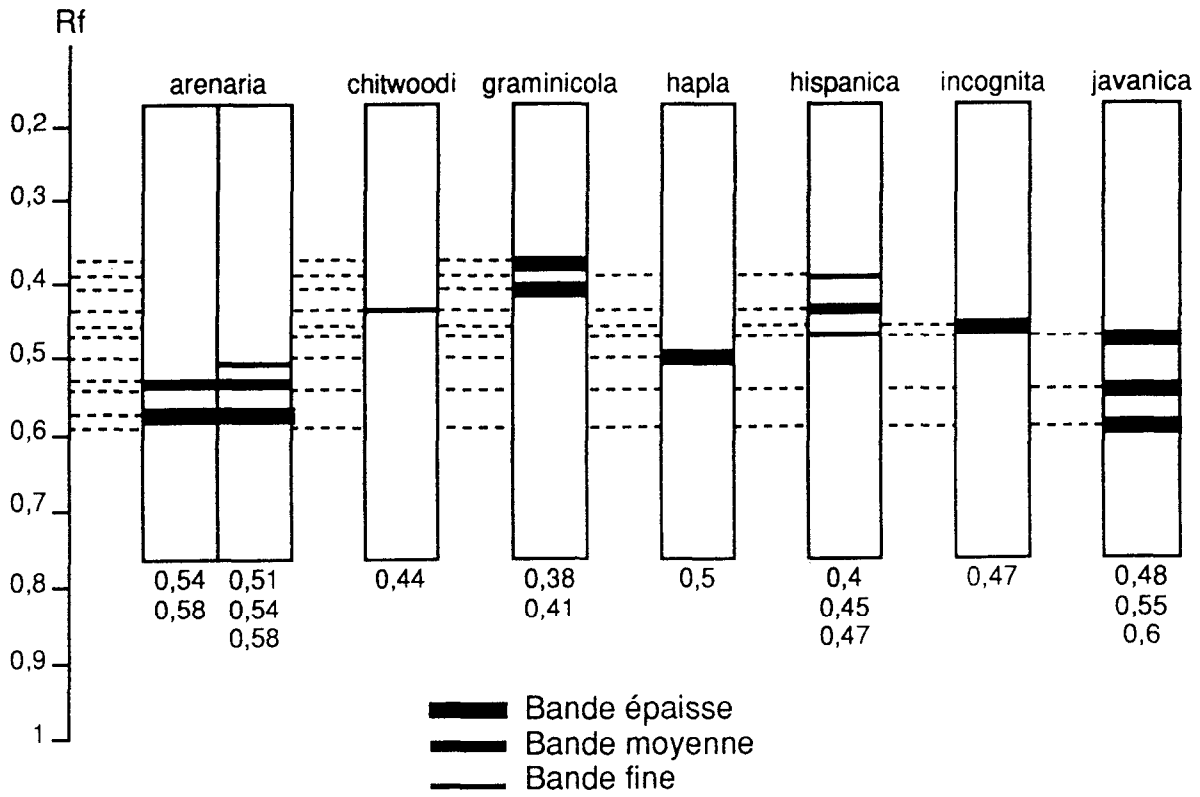
- \*Acide acétique 10ml
- \*Eau distillée qsp 100ml
- Solution de desydratation
- \*Metanol 30ml
- \*Eau distillée qsp 100ml

Annexe 5b: Résultat de l'électrophorèse



Annexe 5c:

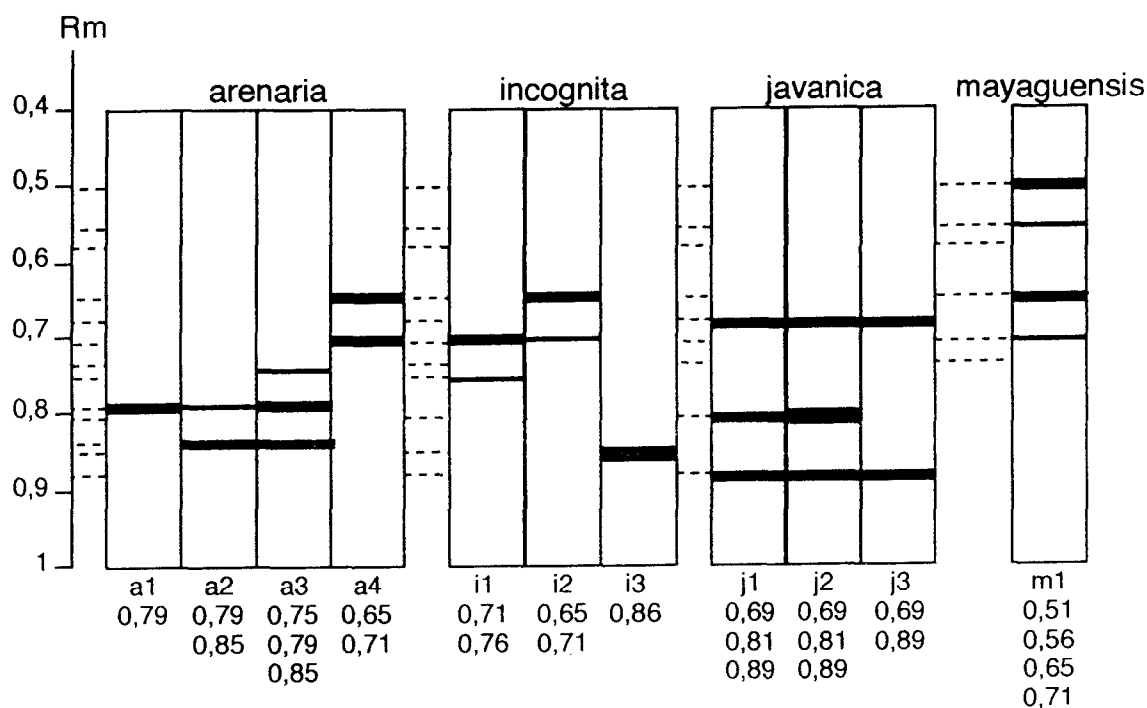
# PROFILS ESTERASIQUES DE *MELOIDOGYNE* SPP. (données INRA)






# PROFILS ESTERASIQUES DE *MELOIDOGYNE* SPP.

(données de Mireille FARGETTE)

## ESPÈCES D'AFRIQUE DE L'OUEST



 Bande épaisse  
 Bande moyenne  
 Bande fine

## ESPÈCES TEMPÉRÉES

