

Etude sur la variabilité de la longueur des larves chez *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 et *Meloidogyne javanica* Chitwood, 1949

Caspar NETSCHER
Laboratoire de Nématologie
Centre ORSTOM, B.P. 1386, Dakar Sénégal

RÉSUMÉ

L'auteur étudie la longueur moyenne des juvéniles de deuxième stade (= larves) de *Meloidogyne incognita* et de *M. javanica* chez différentes populations provenant de Côte d'Ivoire et du Sénégal. Ces populations ont été élevées monoxéniquement sur cultures de racines de Tomate. Les longueurs moyennes des larves se recouvrent en partie chez ces espèces ce qui rend ce caractère inadéquat pour les différencier.

Une étude détaillée portant sur les générations successives d'une souche clonale de *M. Javanica* a montré :

— Que la longueur moyenne des larves varie considérablement d'une génération à l'autre pour une même lignée.

— Que cette valeur diffère significativement entre les larves provenant des femelles de même génération.

SUMMARY

A study concerning the mean length of second stage larvae of different populations of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* from Ivory Coast and Senegal has been undertaken. The populations were grown monoxenically on cultures of Tomato roots. Mean lengths of larvae partly overlap for the two species thus making this character unsuitable to differentiate them.

A detailed study concerning successive generations of a clonal strain of *M. javanica* has shown :

— That the mean length of larvae varies considerably from one generation to the other.

— That this value differs significantly between larvae originated from females of the same generation.

INTRODUCTION

Depuis les travaux de CHITWOOD (1949), qui a divisé l'espèce *Heterodera marioni* (Cornu, 1879, Goodey, 1932) en cinq espèces et une sous-espèce qu'il plaçait dans le genre *Meloidogyne* Goeldi, 1887, rétabli à cette occasion, un certain nombre de nouvelles espèces ont été décrites ; cependant la plupart d'entre elles ont une répartition beaucoup plus limitée et ont un rôle économique bien moins important que les espèces de CHITWOOD.

En effet, cinq taxons, *M. hapla* Chitwood, 1949, *M. arenaria* Chitwood, 1949, *M. javanica* Chitwood,

1959, *M. incognita* Chitwood, 1959 et *M. incognita acrita* Chitwood, 1949, ont une très vaste répartition géographique et font l'objet de nombreuses études en raison de leur polyphagie et de la gravité des dommages qu'ils causent à des cultures essentielles. *M. hapla* est principalement rencontré dans les zones tempérées, tandis que les autres espèces sont les plus fréquentes dans les pays chauds. Il faut noter que, depuis 1960, *M. incognita* et la sous-espèce *M. incognita acrita* ont été synonymisées (TRIANTAPHYLLOU & SASSER, 1960), ne laissant que trois espèces polyphages à vaste répartition dans les zones tropicales : *M. arenaria*, *M. incognita* et *M. javanica*.

Outre son intérêt systématique, la révision de CHITWOOD (1949) pouvait avoir une grande importance pratique, qui était de définir l'éventail des plantes-hôtes des différentes espèces. On pouvait ainsi à ce moment définir les plantes à mettre en cultures sans dommages sur un terrain infesté par une espèce donnée de *Meloidogyne*. Malheureusement, la détermination des *Meloidogyne* était très difficile car fondée essentiellement sur la morphologie de l'ornementation cuticulaire de la région vulvaire des femelles adultes (plaques périnéales), structure très variable et ne possédant que peu de caractères mesurables, permettant une appréciation objective. De plus, la préparation de ces plaques demande un grand soin et un temps non négligeable.

WHITEHEAD (1968) a étudié un grand nombre de caractères des mâles, des femelles et des juvéniles de deuxième stade de *Meloidogyne* afin d'arriver à une détermination dépendant moins exclusivement des plaques périnéales. Il a ainsi trouvé que la longueur de larves de deuxième stade de *Meloidogyne* constituait un caractère permettant de différencier certaines espèces de *Meloidogyne*.

Ainsi, deux espèces les plus fréquentes : *M. incognita* et *M. javanica* se distinguaient par la moyenne de la longueur des larves. L'emploi de ce caractère présente de grands avantages sur celui des plaques périnéales. La longueur des larves peut être, en effet, facilement et rapidement mesurée et constitue un caractère objectif.

Afin de déterminer la validité de ce caractère, nous avons entrepris son étude chez un certain nombre d'élevages monolarves de *M. incognita* et de *M. javanica*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tous les Nématodes ont été élevés sur des cultures de racines clonales stériles afin de minimiser la variabilité provenant de la plante hôte et éviter les contaminations d'une souche de *Meloidogyne* à l'autre. La technique de culture de ces racines est la suivante :

Quelques graines de Tomate (var. Roma) sont lavées pendant quelques secondes à l'alcool à 70° et transférées dans une fiole à vide remplie d'eau. Les graines sont placées sous vide pendant trois heures pour chasser l'air contenu entre les poils des graines. Celles-ci sont ensuite placées dans une solution aqueuse de NaClO à 20% (la solution mère est obtenue en ajoutant 2,5 g de Ca(ClO)₂ à une solution de 5 g de la Na₂CO₃ dans 100 cm³ d'eau, on agite pendant 5 mn et on filtre la solution).

Après avoir agité la suspension des graines, dans la solution de NaClO, pendant dix minutes, celles-ci sont rincées deux fois à l'eau stérile et transférées dans des boîtes de Petri contenant de la gélose à 1,5%. Quatre jours après les graines ont germé et possèdent des racines d'environ 2 cm de longueur.

Ces racines sont excisées et transférées dans une boîte de Petri contenant du milieu de White modifié⁽¹⁾ (SKOOC & TSUI, 1948).

Après une semaine on ne conserve qu'une seule de ces boîtes ; les racines y ont produit des radicules de premier ordre qui sont à leur tour excisées et transférées dans des boîtes de Petri contenant le même milieu. Quand elles ont 2 cm de long, les radicules de deuxième ordre sont transférées sur de nouvelles boîtes ; ce processus a été répété 24 fois de suite de façon à obtenir un nombre suffisant de boîtes contenant chacune une racine de même ordre provenant de la même racine originelle. Les racines de 25^e ordre sont alors transférées dans des tubes à essai de 18 × 180 mm, inclinés, contenant le même milieu. Après deux à trois semaines les racines ont couvert le milieu et sont prêtes à être inoculées.

Des populations de *Meloidogyne javanica* et de *M. incognita* provenant de différentes régions de Côte d'Ivoire et du Sénégal ont été élevées en serre sur haricot « niébé » (*Vigna sinensis* Endt). A partir de chaque population des masses d'œufs ont été prélevées et stérilisées en bloc pendant dix minutes dans une solution de NaClO à 5%. Après avoir été rincées avec de l'eau stérile un certain nombre de masses d'œufs étaient transférées stérilement, chacune séparément, sur une culture de racines de Tomate. La masse d'œufs était placée près de l'ouverture du tube de culture, en évitant le contact direct avec les racines (fig. 1.a).

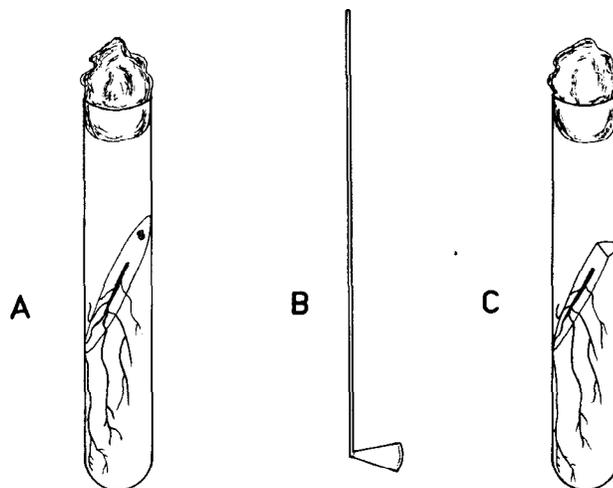


Fig. 1
(Explications dans le texte)

Après trois jours, quand une partie des larves avait éclos, la petite fraction du milieu où avait été déposée la masse d'œufs était soulevée stérilement (fig. 1 c) à l'aide d'une lame d'acier montée sur une tige (fig. 1 b).

Ainsi les spores de microorganismes qui auraient échappé à la stérilisation de masses d'œufs étaient supprimées avant qu'elles puissent contaminer les racines. Les élevages ont été gardés en chambre stérile à température constante (28°).

Toutes les opérations précédentes étaient faites en salle de manipulation stérile.

Six semaines après l'inoculation plusieurs galles portant des masses d'œufs ayant été formées, le contenu du tube était transféré dans une boîte de Petri stérile. Une partie des masses d'œufs était employée à la poursuite des élevages, les autres étaient stockées dans une solution de 0,3 mol NaCl (DROPKIN *et al.*, 1958) pendant une semaine. Elles étaient ensuite mises à éclore dans de l'eau. Trois jours après, la plupart des larves ayant éclos, celles-ci furent tuées en bloc avec du FP 4 / 1 chaud (NETSCHER, 1960), puis fixées au formol à 4%. Après avoir séjourné dans le formol pendant au moins trois jours, 30 larves de chaque élevage étaient montées dans la glycérine suivant la technique rapide de SEINHORST (1959).

L'axe longitudinal de chaque larve a été tracé à l'aide d'une chambre claire (grossissement 200 x) et les courbes obtenues mesurées au curvimètre. Les longueurs de larves étaient arrondies au µm.

La détermination des *Meloidogyne* était faite par l'examen des plaques périnéales des femelles développées dans les élevages.

RÉSULTATS

Dans le tableau I sont rapportées les longueurs moyennes des différentes populations issues d'une seule masse d'œufs, classées par ordre de taille crois-

(1) Composition du milieu (en mg par dm³) : MgSO₄ · 7H₂O, 72,0 ; Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 144,0 ; KNO₃, 80,0 ; NH₄NO₃, 400,0 ; KH₂PO₄, 38,0 ; KCl, 65,0 ; ZnSO₄ · 7H₂O, 2,7 ; MnSO₄ · H₂O, 4,9 ; H₃BO₃, 1,6 ; KI, 0,75 ; chlorhydrate de pyridoxine, 0,5 ; chlorhydrate de thiamine, 0,1 ; glyco-colle, 0,1 ; saccharose, 20000 ; gélose, 15000. Le fer est ajouté sous forme de chélate de fer (5 cm³ d'une solution de 5,57 g de FeSO₄ · 7H₂O et de 7,45 g du sel de Na de EDTA dans un litre d'eau).

sante. On observe un recouvrement de cette grandeur pour les deux espèces *M. incognita* et *M. javanica*.

TABLEAU I
LONGUEUR MOYENNE DE LARVES *
DE DIFFÉRENTES POPULATIONS
ISSUES D'UNE SEULE MASSE D'ŒUFS
DE *M. INCOGNITA* ET DE *M. JAVANICA*

Numéro population	Espèce	Longueur moyenne
M 6	<i>inc.</i>	371 μm
3270	<i>inc.</i>	377 μm
3433	<i>inc.</i>	377 μm
M138	<i>inc.</i>	378 μm
3244	<i>jav.</i>	388 μm
3448	<i>jav.</i>	394 μm
M 80	<i>inc.</i>	394 μm
M 39	<i>jav.</i>	409 μm
3239	<i>inc.</i>	413 μm
3280	<i>jav.</i>	418 μm
3458	<i>jav.</i>	424 μm
3205	<i>jav.</i>	425 μm
3406	<i>jav.</i>	426 μm
3431	<i>jav.</i>	430 μm
3414	<i>jav.</i>	435 μm
3262	<i>jav.</i>	439 μm

* Calculés sur 30 individus.

De ce fait, la distinction des deux espèces ne peut être fondée sur la longueur moyenne de larves comme l'avait proposé WHITEHEAD (1968), sur la base d'une étude de populations provenant de l'Afrique de l'Est. La figure 2 représente nos données et celles de WHITE-

HEAD ; elle montre de plus que les populations d'Afrique de l'Ouest sont en général plus grandes que celles de l'Afrique de l'Est.

La population 3244 (*M. javanica*) représentant une grandeur intermédiaire par rapport aux données de WHITEHEAD a été employée pour vérifier si la valeur de la longueur moyenne des larves se révélait constante pendant plusieurs générations. L'examen du tableau II montre que la variabilité de la longueur des larves est très grande entre générations tout en étant très homogène à l'intérieur de chaque génération ce qu'implique l'écart-type de la moyenne, très peu important par rapport aux moyennes. Selon les chiffres de WHITEHEAD, la génération I représenterait une forme intermédiaire entre *M. javanica* et *M. incognita*, la génération III correspondrait à *M. javanica* et les générations V et VII à *M. incognita*.

TABLEAU II
LONGUEUR MOYENNE ET ÉCART-TYPE
DE LA MOYENNE DE TRENTE LARGES
APPARTENANT A DIFFÉRENTES GÉNÉRATIONS
DE LA POPULATION 3244
(*M. javanica*)

Génération	Longueur moyenne	Ecart-type de la moyenne
I	388 μm	3,1 μm
III	418 μm	2,9 μm
V	375 μm	2,5 μm
VII	379 μm	3,2 μm

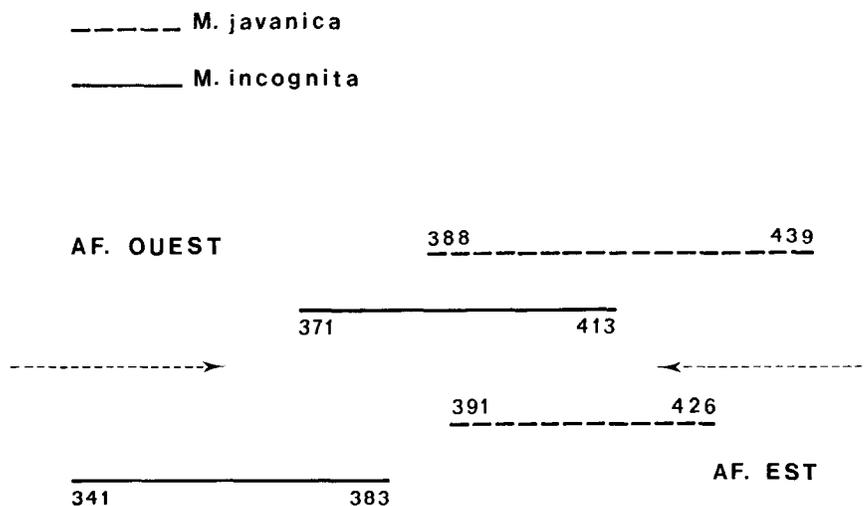


Fig. 2
(Explications dans le texte)

homogène, la longueur de larves de trois différentes masses d'œufs prélevées dans un même tube a été comparée (tabl. III).

TABLEAU III
LONGUEUR MOYENNE * ET ÉCART-TYPE
DE LA MOYENNE DE LARVES PROVENANT
DES TROIS DIFFÉRENTES MASSES D'ŒUFS
D'UN MÊME ÉLEVAGE DE LA POPULATION 3244

Numéro masse d'œufs	Longueur moyenne	Ecart-type de la moyenne
I	385 μm	1,7 μm
II	385 μm	2,8 μm
III	410 μm	1,5 μm

* Calculée sur 15 individus.

Une analyse de la variance des résultats de cette expérience montre qu'il existe une différence hautement significative entre la longueur des larves issues de différentes femelles sœurs (tabl. IV).

TABLEAU IV
ANALYSE DE LA VARIANCE
DE LONGUEUR DE LARVES
APPARTENANT A TROIS MASSES D'ŒUFS
VENANT D'UN ÉLEVAGE MONOXÉNIQUE
DE LA POPULATION 3244

Source de la variabilité	Sommes des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens	F calculé	F tabulé 0,01
Masses d'œufs	6 250	2	3 225	49,6	5,18
Erreur	2 752	42	65,5		
Total	9 002	44			

Ces résultats sont assez étonnants parce que *M. javanica* a une reproduction parthénogénétique mitotique. La descendance d'une seule femelle forme donc un clone et toute variabilité à l'intérieur d'une population clonale doit être attribuée au milieu. Or, dans le cas de nos élevages monoxéniques tout a été mis en œuvre pour standardiser au maximum les conditions ; il est donc difficile de donner une explication. Pour vérifier dans quelle mesure le milieu a une influence sur la longueur des larves élevées sur cultures de racines, deux tubes ont été infestés, chacun avec

une masse d'œufs prélevée dans un même tube de la population 3244. Un tube a été maintenu à 28°, tandis que l'autre était gardé à 23°. Quand des masses d'œufs furent visibles dans les deux tubes, trois d'entre elles ont été prélevées dans chaque tube et la longueur moyenne des larves déterminée pour chaque masse d'œufs (tabl. V).

TABLEAU V
LONGUEUR MOYENNE * ET ÉCART-TYPE
DE LA MOYENNE DE LARVES APPARTENANT
A SIX MASSES D'ŒUFS DE LA SOUCHE n° 3244
Trois des 6 masses d'œufs provenant d'un élevage maintenu
à une température de 23°, les trois autres d'un élevage à 28°

28°		23°	
Longueur moyenne	Ecart-type de la moyenne	Longueur moyenne	Ecart-type de la moyenne
366 μm	2,2 μm	387 μm	2,8 μm
385 μm	3,1 μm	404 μm	3,0 μm
397 μm	4,7 μm	371 μm	1,7 μm

* Calculée sur 15 individus.

Une analyse de la variance montre que les différences entre masses d'œufs sont significatives au seuil de 1% tandis que la température n'a eu aucun effet sur la longueur des larves (tabl. VI).

DISCUSSION

Les résultats des mesures de larves des populations Ouest africaines ont montré que la longueur n'est pas un bon critère pour différencier *M. incognita* et *M. javanica* par suite du recouvrement de ces valeurs chez les deux espèces. Dans le travail de WHITEHEAD (1968), les limites de la variabilité de ce caractère ont été déterminées sur quatre populations seulement de chacune des deux espèces, populations provenant toutes de la même région. Auparavant, RIGGS et WINSTEAD (1959) avaient observé que la moyenne de la longueur des larves de *M. incognita typica* et de *M. incognita acrita* provenant d'élevages de Beltsville (U.S.A.) était de 388 μm . Chez ces deux variétés, cette longueur, qui a d'ailleurs été retrouvée dans la première génération de nos élevages de population 3244 (*M. javanica*), est une valeur intermédiaire par rapport aux chiffres de WHITEHEAD.

Ces résultats contradictoires montrent que tout caractère servant à différencier des espèces de *Meloidogyne* doit être déterminé sur un grand nombre de souches de différentes provenances géographiques.

Les difficultés rencontrées pour garder des populations « pures » peuvent être surmontées par l'utilisation d'élevages monoxéniques. Il faut cependant souligner que de tels élevages, étant clonaux, ne possèdent plus la variabilité potentielle de la population originelle.

TABLEAU VI
ANALYSE DE LA VARIANCE DE LA LONGUEUR DES LARVES
ISSUES DE MASSES D'ŒUFS PROVENANT D'ÉLEVAGES DE LA SOUCHE 3244 MAINTENUS A 23° ET 28°

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens	F calculé	F tabulé	
					0,05	0,01
Température	490	1	490	1,3	7,71	21,2
Masse d'œufs	15 500	4	3 075	27,1	2,45	3,48
Erreur	12 027	84	143,1			
Total	28 017	89				

Les chiffres observés sur les différents élevages de la souche 3244 sont difficiles à comprendre. Les caractères morphologiques (plaques périnéales) et cytologiques ($2n = 44$) correspondent parfaitement à *M. javanica* et l'emploi de cultures stériles de racines pour élever la souche exclut toute possibilité de contamination avec *M. incognita*. L'unique conclusion des résultats obtenus est que la variabilité de la longueur des larves issues d'une masse d'œufs est un caractère aléatoire. RIGGS et WINSTEAD (1959) ont observé que chez *M. incognita*, des larves écloses deux jours après que des masses d'œufs avaient été placées dans l'eau étaient plus longues que des larves récoltées douze jours plus tard. Le même phénomène était observé sur une population de *M. arenaria* tandis que sur une autre population de la même espèce, les larves de 2 jours étaient par contre plus courtes que celles écloses à 14 jours.

Des conditions non contrôlables et pouvant exercer une influence sur le nombre de larves produites par femelle pourraient être la cause des différences de longueur des larves entre la descendance de différentes femelles. Ainsi, le nombre de femelles par galle où l'emplacement de la galle (plongée dans le milieu ou à sa surface) pourrait, par exemple, jouer un rôle sur la longueur des larves issues d'une masse d'œufs.

Les données des tableaux 5 et 6 ont été fournies par des élevages qui constituaient la dixième génération depuis l'établissement de la souche 3244. Du fait que chaque génération était établie à partir de la descendance d'une seule femelle, une sélection rigide aurait pu s'effectuer au cours de ces dix générations si une variabilité génétique existait dans le clone. Étant donné que la même variabilité existe toujours entre les différentes masses d'œufs de la dixième génération, on doit conclure, ou bien qu'il n'y a aucune variabilité génétique, ou bien que, si une telle variabilité existe, la longueur des larves est un caractère non lié aux caractères sur lesquels s'est exercé la sélection.

Manuscrit reçu au S.C.D. le 31 août 1973.

BIBLIOGRAPHIE

- CHITWOOD (B. G.) - 1949 - Root-knot nematodes. Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi 1887. *Proc. helminthol. Soc. Washington*, **16**, 90-104.
- DROPKIN (V. H.), MARTIN (G. C.), JOHNSON (R. W.) - 1958 - Effect of osmotic concentration on hatching of some plant parasitic nematodes. *Nematologica*, **3**, 115-126.
- NETSCHER (C.) - 1970 - A rapid technique for mass-killing nematodes with hot fixative. *Nematologica*, **16**, 603.
- RIGGS (R. D.), WINSTEAD (N. N.) - 1959 - Studies in tomato root-knot nematodes and the occurrence of pathogenic biotypes. *Phytopathology*, **49**, 716-724.
- SEINHORST (J. W.) - 1959 - A rapid method for the transfer from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, **4**, 67-69.
- SKOOG (F.), TSUI (C.) - 1948 - Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *Am. J. Bot.*, **35**, 782-787.
- TRIANAPHYLLOU (A. C.), SASSER (J. N.) - 1960 - Variation in perineal patterns and host specificity of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, **50**, 724-735.
- WHITEHEAD (A. G.) - 1968 - Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea : Heteroderidae) with description of four new species. *Trans. zool. Soc. London*, **31**, 263-401.