

Méthode d'étude de la pénétration et du développement des deux sexes chez les *Heterodera* (Nematoda : Tylenchida)

Patrice CADET et Georges MERNY *
Laboratoire de Nématologie, ORSTOM, B.P. V 51,
Abidjan, Côte-d'Ivoire

RÉSUMÉ

Une méthode est décrite permettant, sur des systèmes radiculaires ayant reçu les mêmes inoculums, d'évaluer parallèlement la pénétration des juvéniles du deuxième stade d'*Heterodera* spp. par coloration dans les racines et leur développement en mâles ou en femelles en culture hydroponique.

ABSTRACT

A method is described for evaluating penetration of juveniles and development of both sexes in *Heterodera* spp. It consists of inoculating at the same time a number of plants which are, after the time of penetration has elapsed, divided in two batches. In the first batch, the roots are coloured and penetration is counted whereas the entire plants of the second batch are put in hydroponic conditions, males being recovered on the bottom of the container and females on the roots, at the end of the experiment.

Pour l'étude du déterminisme du sexe et des variations de l'indice andrique d'*Heterodera oryzae* sur le riz (Cadet et al., 1975), une méthode, dérivée de celle de Trudgill (1967), a été brièvement décrite qui permettait d'étudier parallèlement l'importance de la pénétration ainsi que celle du développement des mâles et des femelles.

L'extension de ce type d'études à d'autres plantes que le riz a rendu nécessaire le réaménagement de la méthode, notamment en ce qui concerne la culture hydroponique. En effet, le récipient, suffisant pour des racines de riz, s'est révélé trop petit pour celles de certaines autres plantes. Par ailleurs, certaines plantes, spécialement le maïs, ne peuvent survivre en culture hydroponique sans une assez forte aération

continue du milieu. Enfin, les plantes étudiées étant diversement sensibles aux variations de la luminosité, l'apport d'un éclairage d'appoint a été jugé nécessaire.

1. INOCULATION

Elle a lieu dans des pots de 750 cm³ remplis de terre préalablement stérilisée au four. Les plantes à inoculer y sont repiquées dès la germination des graines ou la formation de racines sur les boutures. Au moment de l'inoculation, l'âge des plantes inoculées varie suivant leur vitesse de développement et l'importance de leur système racinaire.

Il n'y a pratiquement pas de limite à l'importance de l'inoculum qu'on peut appliquer à un tel système. Toutefois, on ne peut descendre au-dessous de 30 larves du 2^e stade (L₂) si l'on veut obtenir une pénétration qui puisse être mesurée avec une variabilité acceptable.

Dans le cas d'*Heterodera oryzae* la plante et l'inoculum restent en contact huit jours. On sait que, chez une plante favorable à la pénétration du parasite, on a, au bout de ce temps, une pénétration importante (Reversat & Merny, 1973), et, par ailleurs, c'est un temps trop court pour que des mâles aient atteint leur maturité et soient sortis des racines, cette éventualité étant très improbable avant le 11^e jour.

À la fin de ce temps de contact, les plantes sont dépotées, leurs systèmes racinaires sont lavés et elles sont divisées en deux lots égaux, l'un servant à l'étude de la pénétration, l'autre continuant à végéter en culture hydroponique pour l'étude du développement des mâles et des femelles.

* Adresse actuelle : O.R.S.T.O.M., Laboratoire de Biologie des Sols, 70-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy, France.

2. ÉTUDE DE LA PÉNÉTRATION

Les racines servant à cette étude sont soigneusement lavées. Leur séchage représente un point délicat de la méthode : avant leur coloration, il convient d'éviter tout contact aux racines. On les suspend plusieurs heures jusqu'à ce qu'elles soient extérieurement sèches mais non desséchées, ce qui est la condition optimale pour obtenir une bonne coloration.

Celle-ci a lieu dans des tubes de pyrex de 25 cm de haut et 2 cm de diamètre intérieur. Les tubes sont placés dans un portoir métallique posé sur une plaque chauffante (fig. 1 A). Dans le fond du tube, les racines à colorer baignent dans une quantité de lactophénol variable suivant le volume des racines (généralement de 10 à 50 cm³).

Après deux minutes d'ébullition du lactophénol, le portoir est ôté de la plaque chauffante et, après refroidissement, on ajoute au lactophénol incolore la quantité de solution concentrée de bleu coton dans le lactophénol nécessaire pour obtenir la concentration appropriée (de Guiran, 1966). Celle-ci est de 0,001 % dans le cas de racines de riz inoculées à un âge inférieur à deux semaines, de 0,0012 % si cet âge est de deux ou trois semaines et de 0,0015 % pour les racines de riz de plus de trois semaines ou celles de toutes les autres plantes.

Après environ deux semaines, les racines sont étalées sur une plaque de verre de 12 × 9 cm et de 3 mm d'épaisseur. Une autre plaque de verre de mêmes dimensions est posée sur la première, les racines sont écrasées entre les deux plaques par une pression exercée à la main et elles sont maintenues ensemble par deux pinces métalliques (fig. 1 B).

Les parasites, aux divers stades de développement, contenus dans les racines, peuvent ainsi être observés et dénombrés à l'aide d'une loupe binoculaire.

3. CULTURE HYDROPONIQUE

3.1. RÉCIPIENT

Elle a lieu dans un tube de chlorure de polyvinyle (P.V.C.) de 50 mm de diamètre extérieur et dont la paroi a une épaisseur de 4 mm. La longueur totale du tube : 335 mm est suffisante pour que les racines de la plupart des plantes puissent se développer en longueur sans se replier sur elles-mêmes. A 10 mm au-dessous de son orifice, le tube est muni d'une collerette de P.V.C. de 10 mm de large et 3 mm d'épaisseur. Le rôle de cette collerette est d'arrêter le tube à une hauteur convenable sur son support.

Ce tube contient de la solution de Kimura (Yoshida *et al.*, 1959) (fig. 1 C, 2 A et B).

Le couvercle du tube, qui sert de support à la plante (fig. 1 C et 2 C, D et E) est constitué de trois parties :

— une plaque de P.V.C. carrée de 62 mm de côté percée, en son centre, d'un trou circulaire de 21 mm de diamètre;

— un tube de P.V.C. de 21 mm de diamètre extérieur, 2 mm d'épaisseur et 60 mm de long, adapté et collé à l'intérieur du trou circulaire au centre de la plaque. C'est dans la lumière de ce tube que se trouve la plante;

— un manchon de P.V.C. de 62 mm de diamètre, 3 mm d'épaisseur et 18 mm de hauteur. Sa section est inscrite dans le carré constitué par la plaque, à laquelle il est collé. Son diamètre intérieur correspond exactement au diamètre extérieur de la collerette à laquelle il s'adapte parfaitement, empêchant tout mouvement latéral de la plaque et maintenant la plante au centre du tube.

Plaque et manchon sont creusés d'une saignée large de 10 à 15 mm dans la plus grande largeur, qui a pour rôle de laisser passer le tuyau servant à aérer le milieu par bullage (fig. 2 C et E).

La plante est maintenue en place, au centre du tube, par des tampons de coton cardé.

3.2. SUPPORT

Le support recevant les tubes de P.V.C. est une planche de 20 mm d'épaisseur percée de trous de 52 mm de diamètre : les planches peuvent être de tailles variables mais les dimensions les plus courantes sont 85 × 60 cm avec 60 trous en six rangées de dix. La planche peut, quand cela est jugé nécessaire, être posée sur un bac plein d'eau, ce qui a pour effet d'amortir beaucoup de variations de température entre les différentes heures du jour et de la nuit (fig. 1 D et E).

3.3. AÉRATION DU MILIEU

La pulsion d'air nécessaire au bullage est fournie par une pompe électrique, d'une puissance de 7 watts, conçue pour les gros aquariums. Une pompe suffit à assurer l'aération de 60 tubes, sans qu'aucun réglage de débit soit nécessaire, à conditions d'utiliser des tubes d'un diamètre n'excédant pas 1/2 mm. On utilise, à cet effet, des gaines plastiques servant à l'isolement des fils électriques. Elles sont réunies en faisceaux de 30 gaines aboutissant chacune à un tube de culture. Deux faisceaux sont assujettis à l'orifice de sortie d'une pompe à air au moyen d'un ajutage en T (fig. 1 F). L'extrémité

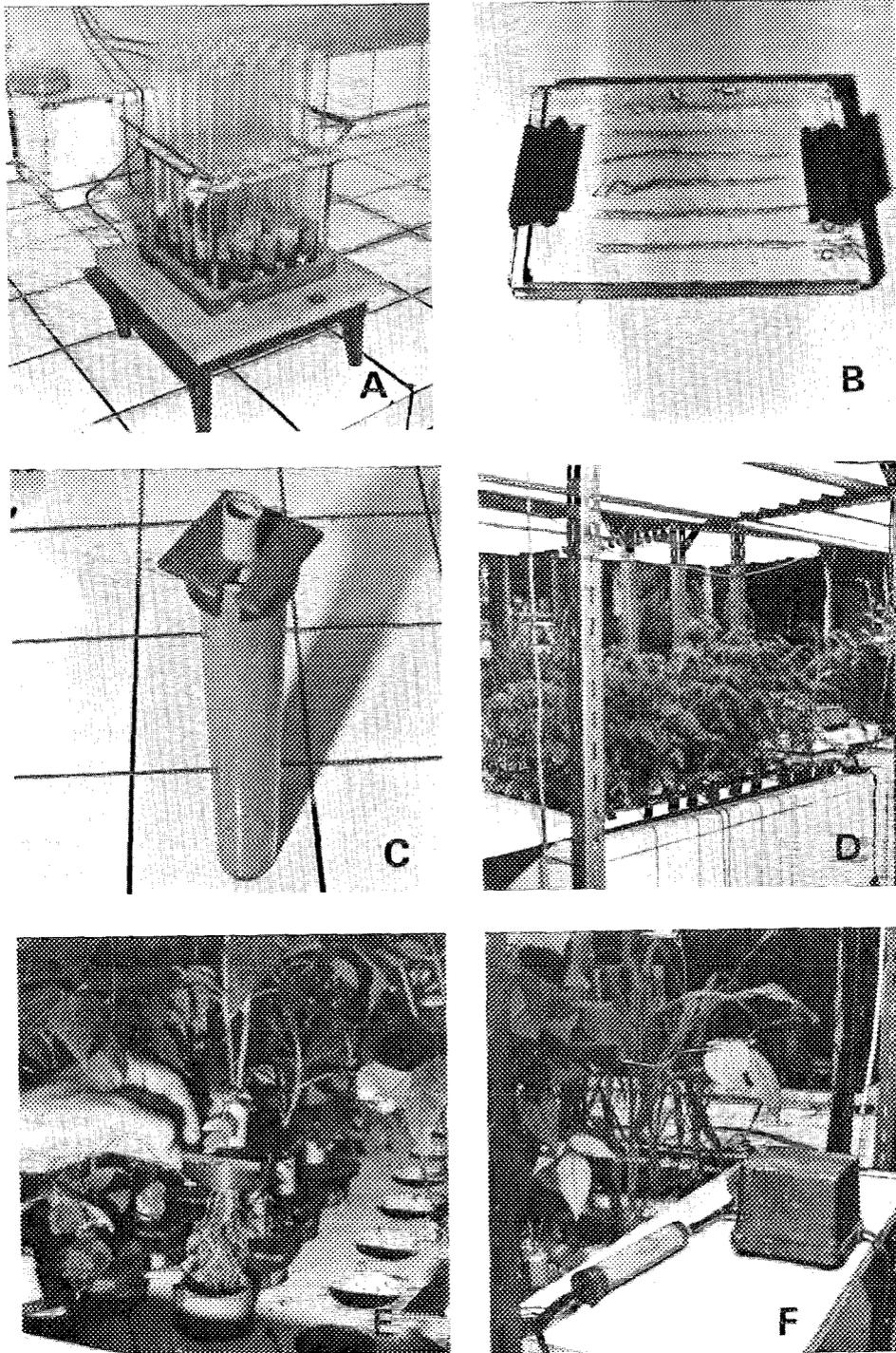


FIG. 1. — A : Dispositif de chauffage des tubes utilisé pour colorer les racines au bleu coton pour observer la pénétration ou à la fuchsine acide pour compter les femelles. — B : plaques de verre pour observation de la pénétration. — C : Tube de culture hydroponique. — D : Support recevant 60 tubes de culture hydroponique surmonté du dispositif d'éclairage. — E : Détail du support. — F : Dispositif de pulsion d'air.

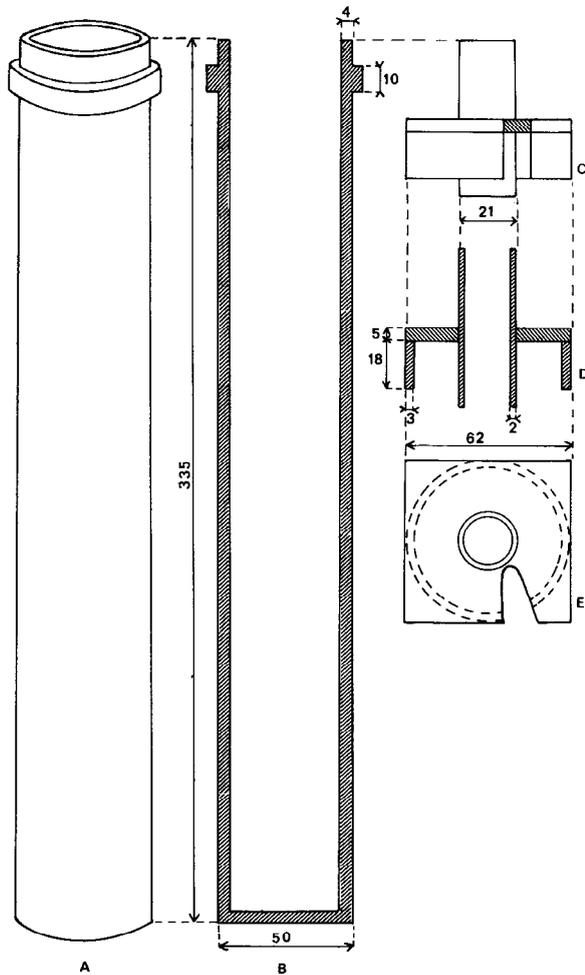


FIG. 2. -- Dispositif de culture hydroponique. — A : Tube, en perspective. — B : Tube en coupe. — C : Couvercle, élévation. — D : Couvercle, coupe. — E : Couvercle, plan.

libre de chaque gaine est maintenue immergée au moyen d'un poids métallique, généralement un écrou en inox.

3.4. ÉCLAIRAGE

L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents « lumière du jour », rouges et « gro-lux », ces derniers riches en radiations bleues et rouges très favorables à la photosynthèse. Un ensemble de 60 tubes de cultures hydroponiques est éclairé par 10 tubes fluorescents, généralement cinq « lumière du jour », deux rouges et trois « gros-lux ». On obtient ainsi une croissance normale des plantes, même des plus exigeantes comme le maïs.

4. ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT

4.1. DÉVELOPPEMENT DES MÂLES

Chaque semaine, la solution nutritive est changée dans les tubes de culture hydroponique. Le tube est vidé dans un pot de matière plastique de 750 cm³. Après trois heures, on considère que tous les mâles présents dans la solution sont tombés au fond du pot. Le contenu de celui-ci est alors aspiré à l'aide d'une trompe à vide, à l'exception d'un culot qui contient tous les mâles. Ce culot est alors versé dans des tubes de 25 × 250 mm et après quelques heures, on aspire à nouveau le liquide surnageant et les mâles peuvent être comptés dans le culot.

Le temps mis par les mâles pour arriver à maturité et sortir des racines est variable d'une plante à l'autre. Avec *Heterodera oryzae*, sur le riz, les derniers mâles sortent au bout de trois semaines; sur le maïs, la sortie est plus rapide : généralement deux semaines. Le temps n'a excédé cinq semaines sur aucune des plantes inoculées jusqu'à ce jour.

4.2. DÉVELOPPEMENT DES FEMELLES

Quand on constate que la sortie des mâles a pratiquement cessé, la culture hydroponique prend fin. Chaque système racinaire est mis à sécher à l'air et introduit ensuite dans un tube de verre de 25 × 250 mm où il est noyé dans une solution de 0,05 g de fuchsine acide pour 100 cm³ de lactophénol qui est ensuite portée à ébullition pendant deux minutes (fig. 1 A).

Après refroidissement, les racines sont extraites du colorant, mises en suspension dans de l'eau et passées au mixer (Waring Commercial blender) dont les pales métalliques ont été remplacées par des pales de plastique confectionnées à l'aide d'un tube coupé en deux dans le sens de la longueur. Le passage au mixer a lieu en quatre opérations successives durant respectivement 5,5, 10 et 20 secondes. A la fin de chaque opération, le contenu du vase du mixer est versé sur deux tamis superposés; le tamis supérieur, à mailles de 2 mm retient les gros fragments de racines alors que les fragments plus fins et les femelles sont retenus sur le tamis inférieur, à mailles de 35 µm (fig. 3). Ce qui est retenu dans le tamis supérieur est repris dans le mixer au cours de l'opération suivante.

Après la quatrième opération, on récupère ce qui a été retenu par le tamis inférieur, on le met en suspension dans l'eau dans un tube de 25 × 250 mm et, après décantation et élimination du liquide en excès, les femelles sont comptées, au milieu des débris, dans une plaque de plexi-glass spécialement réalisée à cet effet,

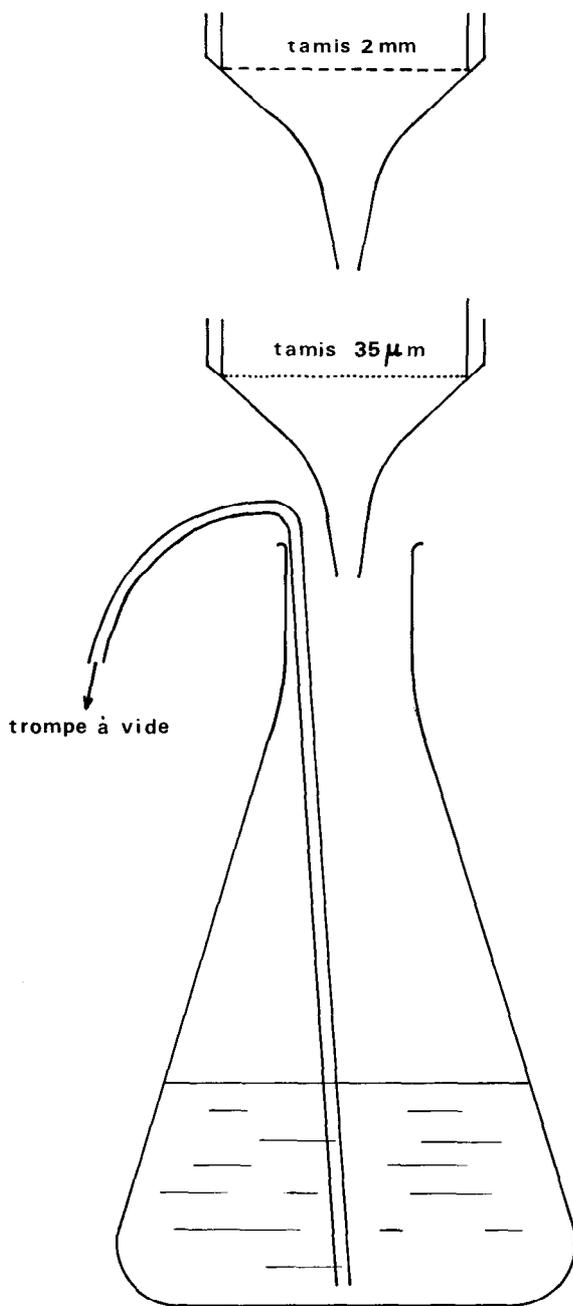


FIG. 3. — Tamisage des femelles après passage des racines au mixer (voir texte).

de 11 cm de long sur 6 cm de large, dont le fond porte un quadrillage de $0,5 \times 0,5$ cm et qui peut contenir 15 cm^3 de liquide.

Le développement des deux sexes est étudié sur les mêmes plantes mais, pour des raisons évidentes, la pénétration ne peut être étudiée que sur des plantes différentes. Les lots colorés au dépotage et ceux mis en culture hydroponique comprennent 20 à 25 répétitions et l'expérience a montré qu'on obtenait ainsi une moyenne acceptable bien que le coefficient de variation soit souvent très élevé. La comparaison des données obtenues sur les deux lots permet d'évaluer, avec une marge raisonnable d'erreur, la proportion de larves ayant pénétré qui se développent dans chacun des deux sexes. Il faut cependant noter que le dénombrement des animaux ayant pénétré est parfois délicat, surtout quand les racines sont nombreuses et relativement âgées et que les données concernant la pénétration doivent souvent être considérées par défaut. De plus, il y a une probabilité non négligeable pour que la pénétration ait été sensiblement plus intense dans le lot mis en culture hydroponique que dans le lot coloré. Ceci explique qu'on ait parfois une proportion de développement supérieure à 100 %.

Manuscrit reçu au S.C.D. de l'ORSTOM le 30 juillet 1976.

BIBLIOGRAPHIE

- CADET (P.), REVERSAT (G.), MERNY (G.), 1975. — Facteurs affectant le déterminisme du sexe chez *Heterodera oryzae* (Nematoda: Tylenchoidea). *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, vol. X, n° 3 : 207-214.
- GUIRAN (G. de), 1966. — Coloration des nématodes dans les tissus végétaux par le bleu coton à froid. *Nematologica*, 12 : 646.
- REVERSAT (G.), MERNY (G.), 1973. — Influence de quelques facteurs sur la pénétration du nématode *Heterodera oryzae* dans les racines du riz. *Cah. ORSTOM, Sér. Biol.*, n° 21 : 111-115.
- TRUDGILL (D.L.), 1967. — The effect of environment on sex determination in *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 13 : 263-272.
- YOSHIDA (S.), OHNISHI (Y.), KITAGISHI (K.), 1959. — Role of silicone in rice nutrition. *Soil and Plant Food*, 5 : 127-133.