

## Marquage par le $^{35}\text{S}$ d'*Heterodera oryzae* et d'*Heterodera sacchari* et application à l'étude de la compétition pour l'infestation de la plante-hôte<sup>1</sup>

par G. REVERSAT<sup>2</sup> et J.-F. BOIS<sup>3</sup>

Par inoculation de plantes de riz, croissant sur un substrat contenant du  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ , on obtient des juvéniles marqués d'*Heterodera oryzae* et d'*Heterodera sacchari*. Par inoculation de mélanges de juvéniles non marqués et de juvéniles marqués, identifiés ultérieurement par autoradiographie, on montre que les juvéniles d'*H. sacchari* ont un pouvoir infestant supérieur à celui des juvéniles d'*H. oryzae*, et que les juvéniles d'*H. oryzae* issus de masses d'œufs et les juvéniles d'*H. oryzae* issus de kystes ont un pouvoir infestant identique.

### Introduction

L'étude expérimentale des interactions de deux espèces de nématodes endoracinaires sur la même plante est *a priori* limitée aux couples d'espèces dont les formes infestantes peuvent être identifiées visuellement dans les racines. Cette différenciation peut reposer sur la réponse histopathologique de l'hôte, comme dans le couple *Meloidogyne hapla* Chitwood et *Heterodera schachtii* Schmidt (Jatala & Jensen, 1976), ou sur l'aspect morphologique du stade infestant comme dans le couple *Meloidogyne incognita* (Kofold & White) Chitwood / *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Chitwood & Oteifa (Turner & Chapman, 1972). Ces critères font défaut pour des espèces du même genre ou des races ou pathotypes différents de la même espèce ; on doit alors envisager l'utilisation du marquage par un isotope radioactif.

Le marquage radioactif des nématodes phytoparasites a été réalisé principalement avec le phosphore  $^{32}\text{P}$  (Dropkin & King, 1956 ; Luc *et al.*, 1969 ; Shimizu, 1975), le carbone  $^{14}\text{C}$  (Mayo & Thomas, 1971 ; Wallace, 1974 ; Bird & Loveys, 1975 ; Shimizu, 1975 ; McClure, 1977) et le tritium  $^3\text{H}$  (Rohde & McClure, 1975).

A notre connaissance le soufre  $^{35}\text{S}$  n'a pas encore été utilisé pour de telles études. Cet isotope, cependant, présente un certain nombre d'avantages. Tout d'abord, sa demi-vie radioactive, de 88 jours, le rend plus adapté que le phosphore  $^{32}\text{P}$ , dont la demi-vie radioactive est de 14 jours, pour le marquage des nématodes phytoparasites, dont le cycle de développement est généralement compris entre 4 et 8 semaines. Par ailleurs, le soufre  $^{35}\text{S}$  peut être ajouté comme sulfate soluble à l'eau d'irrigation de la plante, tandis que le carbone  $^{14}\text{C}$  doit être fourni à la plante sous forme gazeuse, ce qui implique un équipement complexe.

Dans le présent travail est décrite une méthode permettant d'obtenir des juvéniles d'*Heterodera oryzae* Luc & Berdon et d'*Heterodera sacchari* Luc & Merny marqués par le soufre  $^{35}\text{S}$ . Le marquage est obtenu en développant ces deux espèces sur un milieu nutritif contenant à l'état dissout du  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ . Les animaux marqués sont utilisés pour étudier, par autoradiographie, la compétition pour l'infestation des racines de riz entre 1) les juvéniles d'*H. oryzae* et les juvéniles d'*H. sacchari* et 2) les juvéniles d'*H. oryzae* issus de masses d'œufs et les juvéniles d'*H. oryzae* issus de kystes. Ce travail a été réalisé en 1974 au Centre ORSTOM d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire).

1) Communication présentée au Colloque OEPP sur les nématodes à kystes des céréales, Rennes (France), 23-26 juin 1981.

2) Laboratoire de Nématologie, ORSTOM, B.P. 1386, Dakar (Sénégal).

3) Antenne ORSTOM - CEA, Service de Radioagronomie, B.P. 1, 13115 Saint-Paul les Durance (France).

## Matériel et méthodes

### 1. Production de nématodes marqués

Dans des boîtes cylindriques en matière plastique sont introduits 250 ml de solution nutritive d'Hoagland, la dose nécessaire de  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  et 500 ml de terre stérile. On repique dans chaque boîte 10 plantules de riz (Morobérékan), puis 10 jours après chaque boîte est inoculée avec 8000 juvéniles de l'une ou l'autre espèce. Au cours d'une première expérience effectuée avec *H. oryzae* six doses ont été expérimentées : 0 - 0,03 - 0,1 - 0,3 - 1 et 3 mCi/boîte. Au cours d'une seconde expérience, portant sur les deux espèces, deux doses ont été utilisées : 0 et 0,3 mCi/boîte.

Cinq semaines après l'inoculation les masses d'œufs et les kystes d'*H. oryzae* sont récoltés et placés dans du NaCl 0,3 M qui inhibe les éclosions (Reversat, 1975). On procède de même pour les kystes d'*H. sacchari*, 8 semaines après l'inoculation.

### 2. Première expérience : effets de la dose chez *H. oryzae*

Des masses d'œufs provenant des récoltes des six doses d'isotopes sont mises à éclore dans l'eau pendant 3 jours. Une partie des juvéniles éclos est colorée au bleu coton (De Guiran, 1966), puis l'intensité de leur marquage est déterminé par autoradiographie (voir 4). Le reste des juvéniles est inoculé sur des pots de riz (1000 juvéniles par pot sur trois pots par dose) puis les animaux descendants sont récoltés 5 semaines après, mis à éclore pendant 4 semaines, et les juvéniles éclos sont comptés.

### 3. Seconde expérience : compétition pour l'infestation de la plante-hôte

En plaçant à éclore dans l'eau pendant 4 jours les kystes et les masses d'œufs des deux espèces, on obtient six variétés de juvéniles :

- HO M - juvéniles d'*H. oryzae*, issus de masses d'œufs, non marqués.
- HO M\* - juvéniles d'*H. oryzae*, issus de masses d'œufs, marqués.
- HO K - juvéniles d'*H. oryzae*, issus de kystes, non marqués.
- HO K\* - juvéniles d'*H. oryzae*, issus de kystes, marqués.
- HS - juvéniles d'*H. sacchari* (issus de kystes), non marqués.
- HS\* - juvéniles d'*H. sacchari* (issus de kystes), marqués.

Dans deux séries de 10 tubes à essais contenant cinq plantules de riz Morobérékan âgées de 4 jours, on introduit par tube : 500 juvéniles HO M et 500 juvéniles HS\* (série directe) et 500 juvéniles HO M\* et 500 juvéniles HS (série réciproque). De la même façon dans deux autres séries de 10 tubes identiques, on introduit par tube 300 juvéniles HO M et 300 juvéniles HO K\* (série directe) et 300 juvéniles HO M\* et 300 juvéniles HO K (série réciproque).

Neuf jours après l'inoculation, les systèmes racinaires de chacun des 40 tubes sont colorés par le lactophénol bleu coton (De Guiran, 1966). Pour chacune des quatre séries, on dissèque les racines, sous la loupe binoculaire, en récupérant tous les juvéniles, colorés en bleu, présents dans les racines. Leur marquage est ensuite déterminé par autoradiographie (voir 4).

### 4. Autoradiographie

Sur des feuilles de bristol quadrillées, les animaux préparés précédemment (voir 2 et 3) sont déposés individuellement puis fixés par une goutte de vernis transparent (épaisseur après séchage : environ 30  $\mu\text{m}$ ).

Un film radiographique Kodak Kodirex est appliqué et pressé fermement sur le bristol. Au cours de la première expérience (voir 2) quatre temps d'exposition (1, 2, 3 et 4 semaines) ont été essayés. Au cours de la seconde expérience (voir 3), le temps d'exposition a été de 4 semaines.

Après le temps d'exposition requis, les films sont développés dans le révélateur Radio Kodak LX 24 durant 3 min, rincés pendant 2 min puis fixés dans le fixateur Radio Kodak AL 4 durant 8 min.

### 5. Relation entre la dose d'isotope radioactif et l'intensité des images autoradiographiques

A partir de la solution d'origine de  $\text{Na}_2^{35}\text{S}\text{O}_4$  on prépare quatre dilutions (à 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) pour chacune desquelles la radioactivité est évaluée en scintillation liquide et par autoradiographie.

La mesure en scintillation liquide est effectuée avec un spectromètre à scintillation liquide, type SL 30 Intertechnique. On introduit 100  $\mu\text{l}$  de la dilution dans une fiole contenant 10 ml de liquide scintillant (2 volumes de toluène ; 1 volume de Triton X 100 ; 5 g/l de PPOP, 1,5 phényloxazoly1 benzène).

Les dilutions sont déposées sur des feuilles de bristol comme précédemment (voir 4) à raison de 0,4  $\mu\text{l}$  par dépôt. Après séchage et protection des dépôts par du vernis, des films sont appliqués sur ces feuilles pendant 1, 2, 3 ou 4 semaines, puis traités comme précédemment.

## Résultats

### Effet de la dose initiale de l'isotope radioactif sur l'intensité du marquage des juvéniles d'*Heterodera oryzae*

La figure 1 présente, pour chacune des 20 combinaisons temps d'exposition-dose, l'aspect de deux spots autoradiographiques dus à des juvéniles d'*H. oryzae* marqués. Pour chacun des temps d'exposition la proportionnalité entre la dose et la surface du spot est bien marquée. Par contre, pour les deux plus fortes doses, le temps d'exposition affecte peu la surface du spot. La descendance des juvéniles marqués (tableau 1) est significativement diminuée aux doses 1 et 3 mCi/pot.

### Relation entre la dose d'isotope radioactif et la densité des images autoradiographiques

Les activités des dilutions de  $\text{Na}_2^{35}\text{S}\text{O}_4$  sont données par le tableau 2 et l'intensité des spots autoradiographiques par la figure 2. La solution à  $10^{-3}$  n'a donné aucun spot détectable et n'a donc pas été représentée.

Tableau 1. Effet de la dose de marquage de  $^{35}\text{S}$  sur la fécondité des juvéniles marqués d'*Heterodera oryzae* (moyenne de 3 répétitions  $\pm$  écart type).

Dose par pot (mCi)	Nb. de juvéniles descendants
0	50.400 $\pm$ 8.000
0,03	61.300 $\pm$ 6.000
0,1	76.000 $\pm$ 8.000
0,3	46.900 $\pm$ 6.000
1,0	27.500 $\pm$ 5.000
3,0	3.500 $\pm$ 1.000

Tableau 2. Radioactivité (coups par min) d'une série de solutions de  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ .

Concentration	Activité mesurée cpm/100 $\mu\text{l}$	Activité calculée cpm/0,4 $\mu\text{l}$ *
1	42.910 $\pm$ 270	171
$10^{-1}$	4.357 $\pm$ 21	17
$10^{-2}$	524 $\pm$ 25	1,7
$10^{-3}$	155 $\pm$ 6	0,2
0	106 $\pm$ 2	-

\* Correspond aux activités ayant provoqué les spots autoradiographiques de la figure 2.

### Compétition à l'infestation entre les deux espèces (tableau 3)

Dans les deux expériences, directe et réciproque, les pourcentages sont équivalents pour chaque espèce : 68-73 % pour *H. sacchari* et 27-32 % pour *H. oryzae*, et ces deux pourcentages diffèrent significativement de 50 %.

### Compétition à l'infestation entre les deux types de juvéniles d'*Heterodera oryzae* (tableau 4)

Dans les deux expériences, directe et réciproque, les pourcentages sont identiques pour les deux types de juvéniles et ne diffèrent pas significativement de 50 %.

Tableau 3. Compétition à l'infestation entre les juvéniles d'*Heterodera oryzae* et les juvéniles d'*Heterodera sacchari*.

Expérience	Inoculum par tube	Juvéniles dans les racines			
		total	marqués	% <i>H. oryzae</i>	% <i>H. sacchari</i>
Directe	500 <i>H. oryzae</i> 500 <i>H. sacchari</i> *	626	460	26,5	73,5
Réciproque	500 <i>H. oryzae</i> * 500 <i>H. sacchari</i>	558	177	31,7	68,3

\* Juvéniles marqués.

Tableau 4. Compétition à l'infestation entre les juvéniles d'*Heterodera oryzae* issus de masses d'œufs et les juvéniles d'*Heterodera oryzae* issus de kystes.

Expérience	Inoculum par tube	Juvéniles dans les racines			
		total	marqués	% juvéniles de kystes	% juvéniles de masses d'œufs
Directe	300 juvéniles de kystes* 300 juvéniles de masses d'œufs	403	212	52,6	47,4
Réciproque	300 juvéniles de kystes 300 juvéniles de masses d'œufs*	423	223	47,3	52,7

\* Juvéniles marqués.

## Discussion

### Le marquage

Le marquage obtenu au cours de ce travail est durable, même lorsqu'il y a eu mue des animaux après l'infestation des racines. Ceci prouve qu'il y a eu incorporation du  $^{35}\text{S}$  dans les structures stables de l'animal ; on peut en particulier penser aux acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) qui existent dans les protéines. Pour des raisons de sensibilité, la détermination du marquage d'un seul juvénile en scintillation liquide est impossible. Il est néanmoins possible d'obtenir un ordre de grandeur du marquage réalisé en comparant les spots autoradiographiques donnés par les figures 1 et 2. On peut estimer que chaque nématode correspond à une source dont l'activité est intermédiaire entre les deux dilutions ( $10^{-2}$  et  $10^{-1}$ ), ce qui correspond à des sources de 0,8 à 8 pCi. Ceci est en accord avec les résultats de Mayo & Thomas (1971), qui, utilisant du carbone  $^{14}\text{C}$ , obtiennent des spots autoradiographiques semblables à ceux de la figure 1 pour des intensités de marquage individuel de l'ordre de 6 pCi.

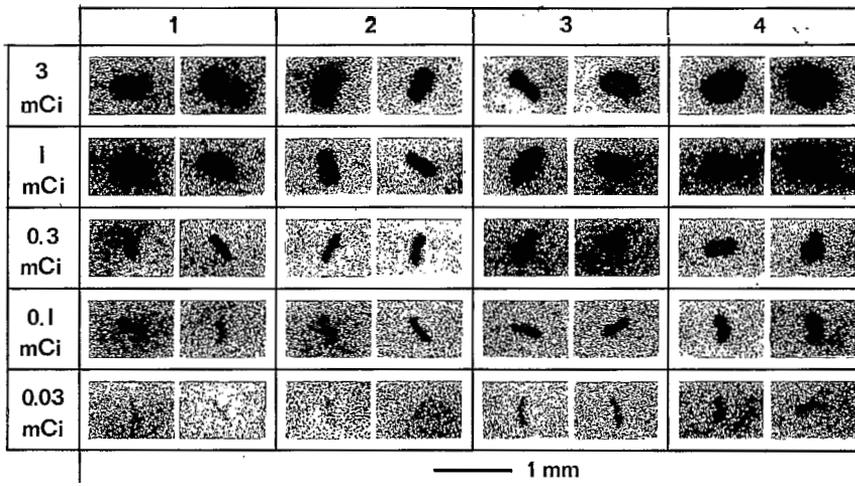


Fig. 1. Reproduction photographique des spots autoradiographiques obtenus avec des juvéniles d'*Heterodera oryzae* marqués par le  $^{35}\text{S}$  (chiffres horizontaux : temps d'exposition en semaines ; chiffres verticaux : dose d'isotope radioactif par boîte d'élevage).

Le marquage provoque des effets secondaires certains sur la biologie des nématodes. L'effet le plus évident concerne la reproduction aux fortes doses (1 et 3 mCi, tableau 1). Ces effets des rayonnements sur la reproduction des nématodes ont déjà été observés pour les rayons  $\gamma$  (Wood & Goodey, 1957) et les rayons UV (Green & Plumb, 1967). Par ailleurs, on observe une tendance à la stimulation des nématodes aux doses moyennes (0,1 et 0,3 mCi/boîte), la reproduction étant supérieure (tableau 1). A 0,3 mCi/boîte, au cours des expériences de compétition à l'infestation (tableaux 3 et 4), on observe que le pourcentage correspondant à l'animal marqué est toujours supérieur à celui correspondant à l'animal non marqué dans l'expérience réciproque. Cela suggère que le marquage pourrait stimuler le pouvoir infestant. Cette observation reste à confirmer ; cependant, il conviendrait de prendre une dose de marquage plus faible. Compte tenu de la netteté des spots obtenus (fig. 1), la dose de 0,1 mCi/boîte paraîtrait plus appropriée dans les conditions retenues (500 ml de terre - 250 ml de solution nutritive - une dizaine de plantules de riz).

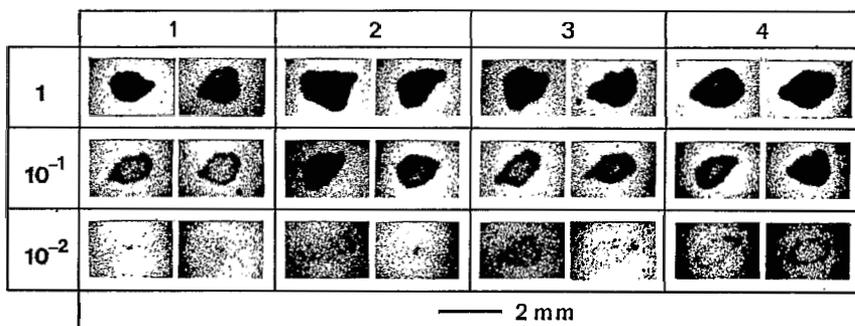


Fig. 2. Reproduction photographique des spots autoradiographiques obtenus avec des dépôts de trois dilutions de  $\text{NA}_2^{35}\text{SO}_4$  (chiffres horizontaux : temps d'exposition en semaines ; chiffres verticaux : dilutions dont les activités sont données dans le tableau 2).

### Compétition à l'infestation

Un nombre limité d'espèces d'*Heterodera* possèdent à la fois kystes et masses d'œufs. D'après les travaux effectués sur deux de ces espèces, *Heterodera oryzae* (Merny, 1966) et *Heterodera glycines* Ichinohe (Ishibashi *et al.*, 1973), il apparaît que la différence essentielle entre les juvéniles issus des masses d'œufs et ceux issus de kystes réside dans leur cinétique d'éclosion. Les juvéniles issus des masses d'œufs éclosent rapidement et participent à la réinfestation immédiate, permettant ainsi la succession de plusieurs générations du parasite au cours du cycle de la plante. Les juvéniles issus de kystes éclosent lentement et permettent la survie du parasite en l'absence d'hôtes. Les résultats du présent travail montrent, en revanche, que le pouvoir infestant des juvéniles des deux origines, kystes ou masses d'œufs, est identique chez *Heterodera oryzae*.

Le pouvoir infestant des juvéniles d'*Heterodera sacchari* est supérieur à celui des juvéniles d'*Heterodera oryzae*. Il reste à préciser si ce résultat est dû à une différence dans la cinétique d'infestation, plus rapide chez *H. sacchari* que chez *H. oryzae*, ou dans le choix des sites d'infestation plus exclusif chez *H. oryzae* que chez *H. sacchari*. Dans les rizières où subsistent les deux espèces (Merny, 1970), l'avantage procuré par ce pouvoir infestant plus important n'est pas évident puisque *H. sacchari* est dépourvu des masses d'œufs qui permettent à *H. oryzae* des réinfestations immédiates.

### Remerciements

Les auteurs remercient M. M. Gnahore Gohi pour la dissection des racines et M. B. Souchaud pour les photographies.

**<sup>35</sup>S-labelling of *Heterodera oryzae* and *Heterodera sacchari*  
and its Use in Studies on Competition for Host-plant Colonization**

Labelled juveniles of *Heterodera oryzae* and *Heterodera sacchari* can be obtained by inoculating rice plants growing on a substrate containing Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub>. Competition between the species was studied by inoculating mixtures of labelled and unlabelled juveniles, subsequently identified by autoradiography. *H. sacchari* juveniles have greater infestation potential than *H. oryzae* juveniles. *H. oryzae* juveniles have the same potential, whether they originate from egg masses or from cysts.

МАРКИРОВАНИЕ *Heterodera oryzae* И *Heterodera sacchari* С ПОМОЩЬЮ <sup>35</sup>SO<sub>4</sub>  
И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОТНОШЕНИЙ ВРЕДИТЕЛЬ/РАСТЕНИЕ-ХОЗЯИН

С помощью инокуляции рисовых ростков на субстрате, содержащем Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub>, были получены маркированные личинки *Heterodera oryzae* и *Heterodera sacchari*. При инокуляции смеси, состоящей из немаркированных и маркированных личинок, впоследствии обнаруженных автордиографией, было показано, что личинки *H. sacchari* имеют большую способность к поражению риса, чем личинки *H. oryzae*, а также что личинки *H. oryzae* вышедшие из яйцекладки и личинки *H. oryzae* вышедшие из цист имеют идентичную способность к поражению.

BIBLIOGRAPHIE

- BIRD, A.F. & LOVEYS, B.R. (1975). The incorporation of photosynthates by *Meloidogyne javanica*. *J. Nematol.* 7 : 111-113.
- DE GUIRAN, G. (1966). Coloration des nématodes dans les tissus végétaux par le bleu coton à froid. *Nematologica* 12 : 646.
- DROPKIN, V.H. & KING, R.C. (1956). Studies on plant parasitic nematodes homogeneously labeled with radiophosphorus. *Expl Parasitol.* 5 : 469-480.
- GREEN, C.D. & PLUMB, S. (1967). The effect of ultra-violet radiation on the invasion, survival and fertility of larvae of *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 13 : 186-190.
- ISHIBASHI, N., KONDO, M., MURAOKA, M. & YOKOO, T. (1973). Ecological significance of dormancy in plant parasitic nematodes. I. Ecological differences between eggs in gelatinous matrix and cyst of *Heterodera glycines* Ichinoe (Tylenchida : Heteroderidae). *Appl. Ent. Zool.* 8 : 53-63.
- JATALA, P. & JENSEN, H.J. (1976). Histopathology of *Beta vulgaris* to individual and concomitant infections by *Meloidogyne hapla* and *Heterodera schachtii*. *J. Nematol.* 8 : 336-341.
- LUC, M., LESPINAT, P. & SOUCHAUD, B. (1969). Marquage direct d'*Hemicycliphora paradoxa* par le phosphore radioactif. Utilisation pour l'étude des déplacements des nématodes phytoparasites dans le sol. *Nematologica*. 15 : 35-43.
- MAYO, M.A. & THOMAS, P.R. (1971). Labelling of *Longidorus elongatus* and *Xiphinema diversicaudatum* with glucose <sup>14</sup>C. *Nematologica* 17 : 23-28.
- McCLURE, M.A. (1977). *Meloidogyne javanica* : a metabolic sink. *J. Nematol.* 9 : 88-90.
- MERNY, G. (1966). Biologie d'*Heterodera oryzae* Luc & Berdon. II. Rôle des masses d'œufs dans la dynamique des populations et la conservation de l'espèce. *Annls Epiphyties* 17 : 445-449.
- MERNY, G. (1970). Les nématodes phytoparasites des rizières inondées de Côte d'Ivoire. I. Les espèces observées. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.* n° 11 : 3-43.
- REVERSAT, G. (1975). Influence d'une inhibition préalable par la pression osmotique sur l'éclosion des masses d'œufs du nématode *Heterodera oryzae*. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.* X : 189-206.
- ROHDE, R.A. & McCLURE, M.A. (1975). Autoradiography of developing syncytia in cotton roots infected with *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* 7 : 64-69.
- SHIMIZU, K. (1975). Intake of labelled nutrient by *Heterodera elachista* at different developmental stages. *Jap. J. Nematol.* 5 : 32-35.
- TURNER, D.R. & CHAPMAN, R.A. (1972). Infection of seedlings of alfalfa and red clover by concomitant populations of *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus penetrans*. *J. Nematol.* 4 : 280-286.
- WALLACE, H.R. (1974). The influence of rootknot nematode, *Meloidogyne javanica*, on photosynthesis and on nutrient demand by roots of tomato plant. *Nematologica* 20 : 27-33.
- WOOD, F.C. & GOODEY, J.B. (1957). Effects of gamma ray irradiation on nematodes infesting cultivated mushroom beds. *Nature* 180 : 760-761.