

NOTE TECHNIQUE

ÉLEVAGE MONOXÉNIQUE
DU NÉMATODE *HETERODERA ORYZAE*
SUR LE RIZ

G. REVERSAT

Laboratoire de Nématologie,
Centre O. R. S. T. O. M. d'Adiopodoumé,
B. P. 20, Abidjan (Côte d'Ivoire)

RÉSUMÉ

Une méthode de culture axénique de la plante entière de riz en tube à essai est décrite. Par inoculation de ces tubes à l'aide de masses d'œufs stérilisées d'*Heterodera oryzae*, on obtient une pénétration importante de juvéniles dans les racines de la plante. Le développement de ces juvéniles aboutit à la formation d'adultes dans la même proportion que ce qui est observé dans l'élevage d'entretien. Cette méthode permet d'obtenir des kystes et des masses d'œufs dépourvus de contaminants en vue d'études physiologiques.

Une autre méthode est décrite, de culture axénique de racines excisées de riz en tube à essai. La croissance des racines est importante au contact de la paroi du tube et une technique particulière de moulage de la gélose permet de la favoriser. Par inoculation de ces tubes à l'aide de masses d'œufs stérilisées d'*Heterodera oryzae* on obtient une pénétration importante de juvéniles dans les racines, mais peu d'entre eux parviennent au stade adulte. Ce résultat ouvre des perspectives pour l'analyse des exigences nutritionnelles de ce nématode au cours de son développement.

INTRODUCTION

L'élevage d'un nématode phytoparasite est dit monoxénique lorsqu'à la plante hôte n'est associé que le parasite, à l'exclusion de toute autre espèce. L'intérêt présenté par un tel élevage a été discuté par ZUCKERMAN (1971).

L'objet du présent travail était de développer des techniques d'élevage monoxénique d'*Heterodera oryzae* LUC et BERDON 1961 sur le Riz (*Oryza sativa*).

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

L'hôte est d'abord cultivé axéniquement (sans espèce associée), puis inoculé avec des animaux stérilisés. La culture axénique de l'hôte a été réalisée sous deux formes : la plante entière et les racines excisées.

Culture axénique de la plante entière de riz

La méthode utilisée est dérivée de celles de PITCHER *et al.* (1960) et de MACRAE et CASTRO (1967).

Le substrat est composé de sable lavé, de granulométrie inférieure à $250\ \mu\text{m}$ et de solution nutritive minérale adaptée au riz (YOSHIDA *et al.*, 1959) à la concentration 5/1. La solution contient $0,5\ \text{g/l}$ de glucose afin de favoriser la révélation des contaminants.

Dans des tubes à essai de 18×180 en pyrex sont introduits successivement $10\ \text{cm}^3$ de solution, puis $19,5\ \text{g}$ de sable.

Les tubes sont bouchés par du coton hydrophile imprégné au cuivre. Ce coton est obtenu en trempant du coton hydrophile pendant 10 heures dans une solution contenant $250\ \text{g}$ de sulfate de cuivre et $500\ \text{cm}^3$ d'ammoniaque concentrée pour un litre. Puis le coton est rincé abondamment et séché à l'étuve à 30°C .

Les tubes bouchés sont autoclavés pendant 30 minutes à 120°C . Le tube prêt à l'emploi est représenté par le croquis A de la fig. 1.

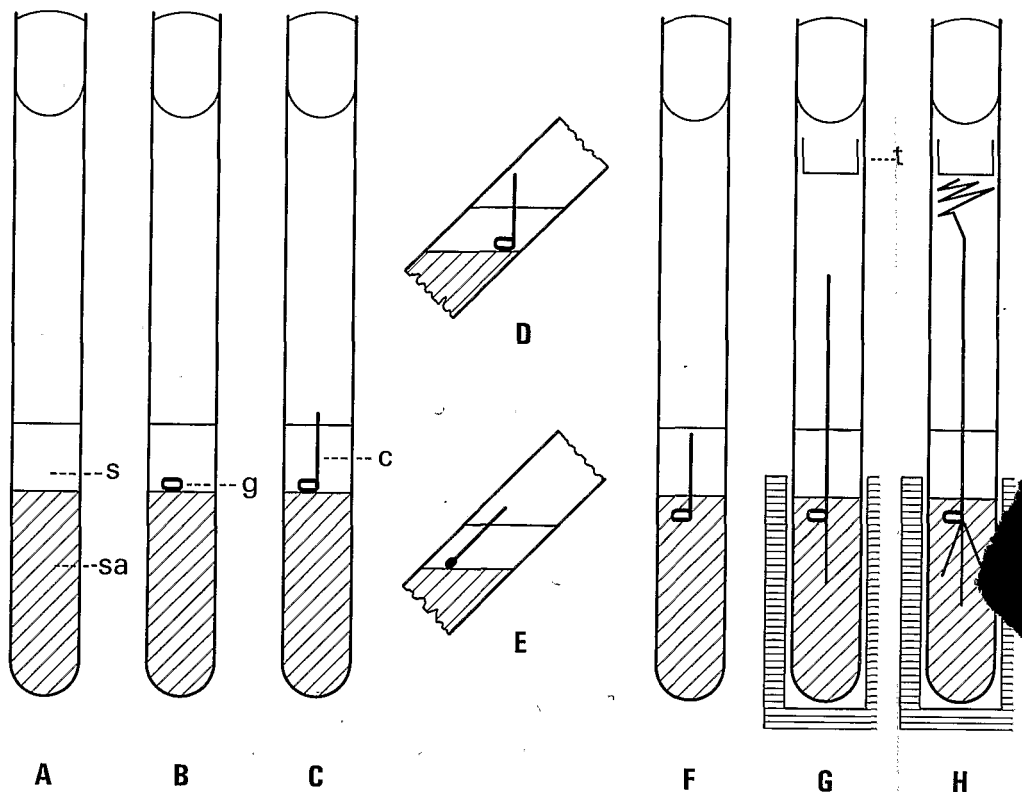


FIG. 1. — Culture axénique de la plante entière de riz

Les états A, B, C, D, E, F, G, H sont décrits dans le texte (C : coléoptile ; g : graine ; sa : sable immergé dans la solution nutritive ; s : solution nutritive en excès ; t : tamis

En salle stérile, des graines de riz (variété « Moroberekan ») décortiquées sont stérilisées pendant 30 minutes dans du chlorure mercurique à 0,1 p. 100 additionné de quelques gouttes d'un mouillant (Teepol). Les graines sont ensuite rincées à l'eau stérile, puis une graine est placée dans chaque tube (croquis B de la fig. 1).

Les tubes sont placés verticalement en serre (température moyenne 26°C). Après cinq jours la plantule présente un coléoptile de 10 à 30 mm de long (croquis C de la fig. 1). La graine est alors enfouie dans le sable, sans déboucher le tube : en inclinant le tube, un espace en coin se forme entre le sable et la paroi (croquis D de la fig. 1). Quelques chocs suffisent pour y entraîner la graine (croquis E de la fig. 1). En redressant doucement le tube, la graine est enfouie dans le sable à une profondeur de 5 à 10 mm (croquis F de la fig. 1). Cet enfouissement est nécessaire sinon la racine ne s'enfonce pas dans le sable, ce qui rend le tube impropre à l'inoculation.

Les tubes sont laissés en serre sur des portoirs pleins (croquis G de la fig. 1) qui protègent de la lumière les racines se développant contre leur paroi. Ces portoirs sont recouverts d'une couche de peinture d'aluminium, ce qui a pour effet d'empêcher les condensations le long des parois internes des tubes.

Vers le 10^e jour, en salle stérile, est mis en place dans chaque tube un tamis d'arrêt en toile d'acier inoxydable préalablement stérilisé par flambage à l'alcool. Il évite à la partie aérienne de la plantule le contact du coton (croquis G de la fig. 1).

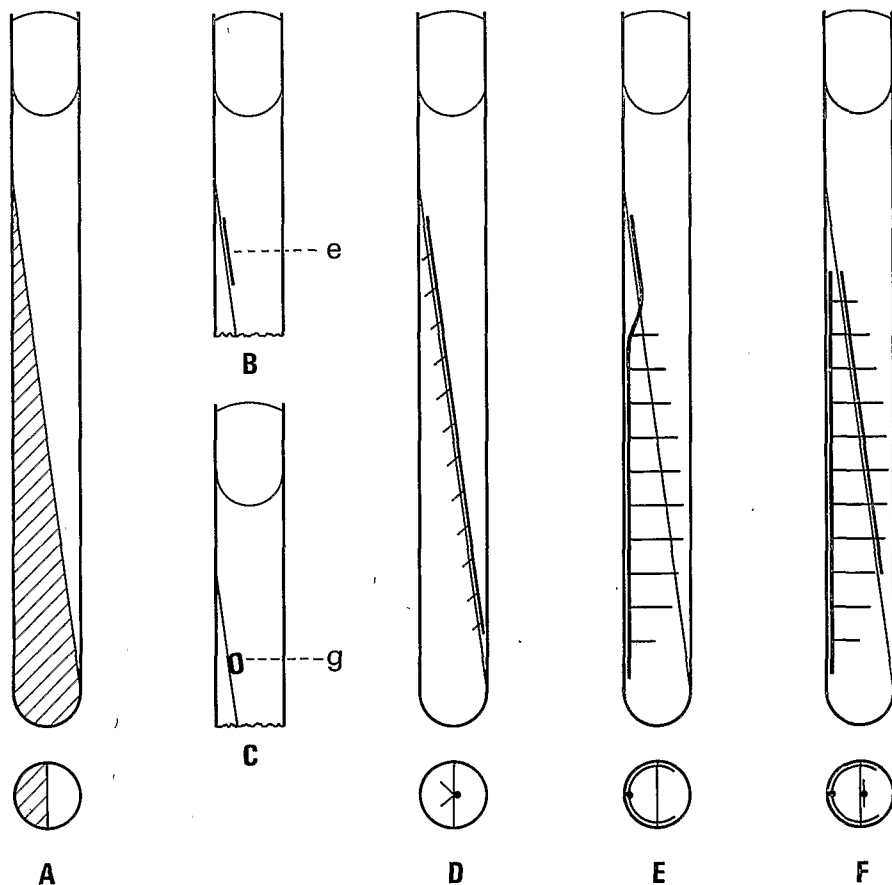


FIG. 2. — Culture axénique de racines excisées de riz sur gélose inclinée

Les états A, B, C, D, E, F sont décrits dans le texte. Pour chacun des états A, D, E, F a été représentée une coupe transversale du tube à mi-hauteur de la gélose (e : explant ; g : graine)

Culture axénique de racines excisées de riz

Le milieu de base est celui qui a été mis au point par FUJIWARA et OJIMA (1954) pour la culture de racines excisées de riz en milieu liquide. Ce milieu de base additionné d'agar à 1,5 p. 100 est appelé milieu normal. Ce milieu normal, additionné de 0,1 p. 100 d'hydrolysate de caséine (Merck 2 238) et de 0,1 p. 100 d'extrait de levure (Difco, 0127-01) est appelé milieu supplémenté.

Le milieu est préparé en deux fractions de volumes égaux. L'une contient l'agar dans de l'eau bouillante. L'autre, qui contient tous les autres éléments dans de l'eau à la température ambiante, est ajustée à pH 5 à l'aide d'HCl 0,1 N. Puis les deux fractions sont mélangées. Après l'autoclavage mentionné plus loin, le pH du mélange est de 5,5, valeur optimale selon FUJIWARA et OJIMA (1954).

Le milieu encore liquide est réparti dans deux séries de tubes de 18 × 180 en pyrex. La série I reçoit 10 cm³ de milieu par tube. Chaque tube de la série II contient un moule en deux parties (bague et tube) et reçoit 15 cm³ de milieu (croquis A et B de la fig. 3). Les tubes des deux séries sont bouchés par un coton cardé puis autoclavés à 110°C pendant 20 minutes.

Les tubes de la série I sont refroidis sur des supports adaptés afin de donner des tubes de gélose inclinée (en hachures sur le croquis A de la fig. 2). Les tubes de la série II sont refroidis verticalement. En salle stérile, à l'aide de pinces, le moule est enlevé, successivement la bague et le tube. Il subsiste un manchon de gélose (en hachures sur le croquis C de la fig. 3).

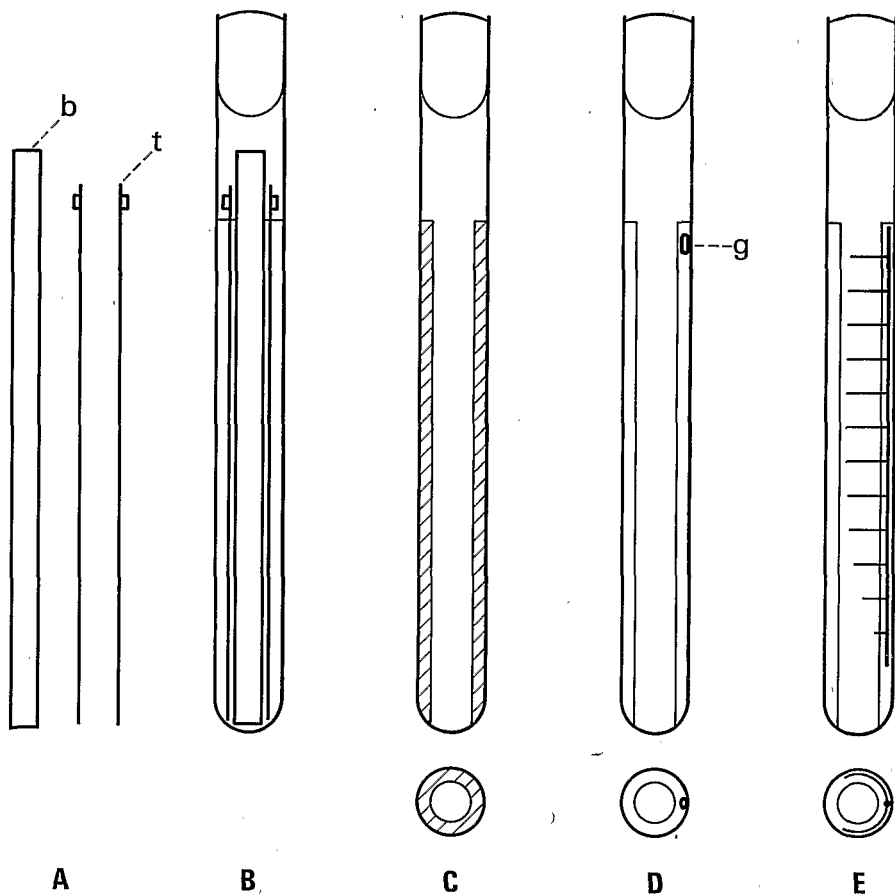


FIG. 3. — Culture axénique de racines excisées de riz sur gélose en manchon
 Les états A, B, C, D, E sont décrits dans le texte. Pour chacun des états C, D, E a été représentée une vue de dessus du tube, bouchon enlevé (b : bague ; g : graine ; t : tube)

En salle stérile, des graines de riz, traitées comme dans le cas de la plante entière servent à la mise en place de l'hôte dans les tubes selon deux procédés. Dans le premier procédé, la graine est mise à germer en boîte de Petri sur gélose à 1 p. 100, non nutritive, stérile. Après 5-6 jours de germination, la partie distale de la racine (10 mm) est prélevée au scalpel, puis cet explant est déposé dans un tube de gélose inclinée (croquis B de la fig. 2). Dans le second procédé, la graine est déposée soit sur la gélose d'un tube de gélose inclinée (croquis C de la fig. 2) soit insérée entre la gélose et la paroi d'un tube de gélose en manchon (croquis D de la fig. 3). La germination se fait à l'étuve à 28°C à l'obscurité. Huit jours au maximum après le dépôt de la graine, les racines sont sectionnées en dessous du collet à l'aide d'un scalpel spécial puis la partie aérienne et la graine sont éliminées.

Les tubes sont replacés verticalement à l'étuve à 28°C à l'obscurité.

Inoculation

Des masses d'œufs d'*Heterodera oryzae* sont recueillies sur des racines de riz de l'élevage d'entretien cinq semaines après l'inoculation des plantes par des juvéniles du second stade.

Elles sont placées tout d'abord dans une solution contenant 5 p.p.m. de 2-éthoxy-éthyl mercure (abréviation EEM) et 0,3 M de NaCl. Le sel inhibe, durant le temps de stérilisation, les éclosions qui diminueraient l'inoculum. Après huit jours, la solution est remplacée par une solution EEM, sulfate de streptomycine (abréviation SS), NaCl (5 p.p.m., 0,1 p. 100, 0,3 M). Deux jours après ce dernier changement, les masses d'œufs sont rincées de leur sel par un passage de 3 heures dans la solution EEM, SS (5 p.p.m., 0,1 p. 100). Puis les masses d'œufs sont rincées plusieurs fois à l'eau stérile et introduites individuellement dans les tubes contenant l'hôte.

Dans un tube avec plante entière (fig. 1), la masse d'œufs est déposée à la surface du sable lors de la mise en place du tamis. Sur gélose inclinée (fig. 2) la masse d'œufs est déposée à proximité des racines sur la gélose. Sur gélose en manchon (fig. 3), la masse d'œufs est insérée entre verre et gélose contre la racine.

RÉSULTATS

Stérilité

La stérilité est évaluée directement dans les tubes de culture. Pour chacune des trois méthodes (plante entière, gélose inclinée et gélose en manchon) environ 800 tubes, préparés en plusieurs fois, ont été examinés.

Les graines stérilisées donnent de 5 à 20 p. 100 (selon les lots) de contaminations pour la plupart fongiques. Les genres *Helminthosporium* et *Curvularia*, dont certaines espèces sont des parasites du riz, sont fréquemment rencontrés.

Après stérilisation, les masses d'œufs provenant de l'élevage d'entretien réalisé sur terre donnent de 20 à 50 p. 100 des tubes contaminés. Celles qui proviennent de l'élevage d'entretien réalisé sur sable et solution nutritive donnent après stérilisation de 0 à 10 p. 100 de tubes contaminés. D'une masse d'œufs non stérilisée éclosent en moyenne 227 juvéniles ($n = 60$, extrêmes : 39-455). Après stérilisation la moyenne est de 89 juvéniles ($n = 60$, extrêmes : 0-319).

A côté de ces contaminations dues aux apports (graines et masses d'œufs) d'autres contaminations, essentiellement fongiques peuvent se produire ultérieurement, surtout pour les tubes contenant une plante entière, gardés en serre. Dix semaines après la mise en place de l'hôte dans les tubes, ces contaminations peuvent atteindre 50 p. 100 ou plus des tubes bouchés avec du coton hydrophile normal ou du coton cardé, alors qu'elles n'atteignent qu'environ 5 p. 100 des tubes bouchés avec du coton hydrophile imprégné au cuivre.

Développement de la plante entière

La partie aérienne de la plantule atteint le tamis vers le 13^e jour et commence à s'enrouler sur elle-même à son contact. Vers la huitième semaine (croquis H de la fig. 1), la partie aérienne, longue de 25-30 cm comprend 2-3 feuilles et le système racinaire, long d'environ 4 cm, comprend

environ de 4 à 6 racines. Ces longueurs correspondent environ au 1/3 de celles qui sont observées dans l'élevage d'entretien, en pots.

A partir de 8-10 semaines et dans un pourcentage de tubes croissant avec le temps apparaît une chlorose tardive. La mort du plant intervient au bout de 12 semaines environ. Les dates d'apparition de la chlorose et de la mort du plant ne sont pas modifiées par des changements de concentration du milieu minéral (de 1/1 à 10/1).

Développement des racines excisées

Sur gélose inclinée, avec milieu normal, un explant donne une racine qui se développe à la surface de la gélose. Les ramifications sont courtes, de faible diamètre, et incluses dans la gélose (croquis D de la fig. 2).

Sur gélose inclinée, avec milieu supplémenté, un explant croît d'abord sur quelques centimètres à la surface de la gélose en ne donnant que des ébauches de ramifications. Ensuite il gagne le contact de la paroi du tube et développe à partir de ce moment de nombreuses ramifications (croquis E de la fig. 2).

Sur gélose inclinée, avec milieu supplémenté, une graine donne après germination plusieurs racines. La plupart d'entre elles se développent au contact de la paroi du tube ; une ou deux se développent à la surface de la gélose. Le développement (diamètre, ramifications) est meilleur au contact de la paroi du tube qu'à la surface de la gélose (croquis F de la fig. 2).

Sur gélose en manchon, avec milieu supplémenté, une graine donne, après germination, plusieurs racines, toutes situées au contact de la paroi du tube. Ces racines présentent une bonne croissance et de nombreuses ramifications (croquis E de la fig. 3, pour simplifier une seule racine est figurée).

En milieu supplémenté est observé une coloration brune des racines qui n'apparaît pas en milieu normal. Elle débute par les parties les plus anciennes vers 4-6 semaines, puis s'étend environ jusqu'au tiers de la longueur des racines. Des modifications diverses du milieu (nature et concentration du sucre, concentration de la supplémentation) n'empêchent pas l'apparition de cette coloration.

Développement du parasite sur plante entière

La pénétration des juvéniles, éclos, à partir de la masse d'œufs, dans la plante est évaluée en colorant les racines par le bleu coton à froid (de GUIRAN, 1966). Cette pénétration peut atteindre 60 juvéniles par plante 15 jours après l'inoculation. Elle est très variable, en relation vraisemblablement avec le nombre variable de juvéniles qui éclosent à partir d'une masse d'œufs.

La plupart des juvéniles pénétrés se développent jusqu'au stade adulte. Cependant on observe que la taille des kystes et le volume de la matière mucilagineuse de la masse d'œufs sont inférieurs à ceux qui sont obtenus dans l'élevage d'entretien. Les œufs obtenus (kystes ou masses d'œufs) donnent des juvéniles viables susceptibles d'infester à nouveau la plante hôte.

Développement du parasite sur racines excisées

Sur gélose inclinée avec milieu normal (croquis D de la fig. 2), aucune pénétration n'est observée. Sur gélose inclinée avec milieu supplémenté et explant (croquis E de la fig. 2), de rares pénétrations sont observées sur la partie de la racine qui se développe au contact de la paroi du tube. Sur gélose inclinée avec milieu supplémenté et germination directe (croquis F de la fig. 2), on observe également de rares pénétrations dans les racines qui se développent au contact de la paroi du tube, mais jamais dans celles situées à la surface de la gélose.

Sur gélose en manchon avec milieu supplémenté (croquis E de la fig. 3), la pénétration obtenue est très importante. Elle atteint 50 juvéniles par tube chaque fois que l'inoculum libéré par la masse d'œufs est assez élevé.

Sur plante entière, la pénétration n'est pas localisée en un point précis des racines. Par contre, sur racines excisées, le contact des juvéniles avec les racines se produit presque exclusivement au niveau de la zone subapicale des racines. Lors des comptages après coloration, la plupart des juvéniles pénétrés sont trouvés dans la partie distale de la racine sur 1 à 2 cm.

Les juvéniles pénétrés dans les racines excisées poursuivent rarement leur développement jusqu'au stade adulte. Dans des tubes de gélose en manchon qui présentaient une pénétration de l'ordre de 50 juvéniles, on obtenait au maximum 8-10 femelles.

DISCUSSION

Élevage monoxénique sur plante entière

L'hôte présente un développement réduit par rapport à celui qui est observé dans l'élevage d'entretien. Ceci peut être dû soit à un épuisement de la solution nutritive minérale, soit à une autointoxication par les exsudats racinaires soit à une insuffisance de la photosynthèse. Cette dernière est tout d'abord réduite à cause de la faible surface foliaire exposée à la lumière à la suite de l'enroulement de la feuille sur elle-même. D'autre part, il est possible que la diffusion de gaz carbonique de l'extérieur vers l'intérieur du tube à travers le coton soit insuffisante pour alimenter la plante. Tout en gardant à la technique sa simplicité, il serait sans doute possible d'améliorer la croissance de la plante à l'aide des modifications suivantes : augmentation du volume du tube (25 × 250 au lieu de 18 × 180) déroulement de la partie aérienne et augmentation de l'intensité lumineuse et du taux de gaz carbonique.

La pénétration des juvéniles dans les racines puis leur développement jusqu'au stade adulte sont quantitativement semblables à ceux qui sont observés dans l'élevage d'entretien. Cependant les réductions de la taille des femelles et de la quantité de matière mucilagineuse des masses d'œufs indiquent que la plante ainsi cultivée représente un milieu nutritif quantitativement limité. L'amélioration de la croissance de la plante par les moyens préconisés plus haut devrait permettre d'obtenir des animaux de taille normale.

Élevage monoxénique sur racines excisées

La culture de racines excisées de monocotylédones est connue pour présenter un certain nombre de difficultés (TORREY, 1965). Les développements que nous obtenons, considérés sous les aspects de l'accroissement de longueur des racines et de leur degré de ramification paraissent satisfaisants sur milieu supplémenté. Comme ce développement est meilleur au contact de la paroi du tube qu'à la surface de la gélose, on est conduit à admettre qu'il existe une différence qualitative entre ces deux milieux. Cette différence n'est pas liée à l'oxygénation, en effet d'après PRÉVOT (1939) le premier centimètre de gélose est correctement oxygéné par diffusion et dans nos cultures l'épaisseur de gélose n'atteint pas cette valeur. Le comportement de la racine semble avoir pour origine l'existence d'un gradient : substance minérale diffusant à partir du verre de la paroi du tube ou, comme la surface de la gélose se dessèche, concentration saline décroissante depuis la surface de la gélose jusqu'à la paroi du tube.

Nombre des théories concernant la pénétration des nématodes dans les racines de leur hôte considèrent l'existence d'un caractère attractif de ces racines vis-à-vis du nématode (WALLACE, 1963). Les racines qui se développent au contact de la paroi du tube sur gélose en manchon (croquis E de la fig. 3) posséderaient ce caractère puisqu'elles permettent une pénétration importante. Les racines qui se développent également au contact de la paroi du tube sur gélose inclinée (croquis E et F de la fig. 2) paraissent qualitativement semblables aux précédentes mais par contre ne permettent que de rares pénétrations. Il semble que dans ce cas de la gélose inclinée, l'inoculum

soit déficient, soit que l'éclosion des œufs se fasse mal à la surface de la gélose, soit que le passage des juvéniles depuis la surface de la gélose jusqu'au contact de la racine introduise un facteur limitant. En ce qui concerne l'absence de pénétration dans les racines situées à la surface de la gélose (croquis D et F de la fig. 2) plusieurs hypothèses peuvent être émises pour l'expliquer : caractère qualitatif déficient de ces racines en rapport avec leur développement, conditions mécaniques défavorables pour la pénétration ou insuffisance de l'éclosion des masses d'œufs à la surface de la gélose.

La faible proportion des juvéniles qui parviennent au stade adulte indique que les racines sont déficientes. L'analyse ultérieure de ce phénomène peut reposer sur deux alternatives. Ou bien cette déficience n'est qu'une conséquence de la senescence des racines et n'intervient qu'après quelques jours de culture. Dans ce cas, comme la pénétration de l'inoculum est étalée dans le temps (REVERSAT et MERNY, 1973), seuls les juvéniles qui auraient pénétré les premiers parviendraient à achever leur développement. Ou bien cette déficience est permanente. Dans ce cas, le développement de certains d'entre eux pourrait être dû au fait que les exigences vis-à-vis du milieu peuvent différer, dans une certaine mesure, selon les individus. Des cultures généalogiques par l'intermédiaire de masses d'œufs recueillies sur racines excisées permettraient peut être de sélectionner une lignée capable de se développer dans ces conditions. Mais elles pourraient également conduire à une dégénérescence progressive.

CONCLUSION

L'élevage monoxénique du nématode sur la plante entière de riz donne des résultats satisfaisants. Il permet d'envisager d'une part l'étude des relations hôte parasite en l'absence de contaminants et d'autre part l'obtention de kystes et de masses d'œufs dépourvus de contaminants en vue d'études physiologiques.

L'élevage monoxénique sur racines excisées de riz ne permet pas un développement normal du parasite. Mais ce résultat ouvre des perspectives sur l'analyse des exigences nutritionnelles du nématode au cours de son développement.

Reçu pour publication en juillet 1974.

SUMMARY

MONOXENIC CULTURE OF *HETERODERA ORYZAE* ON RICE

A method for axenic culture of the whole rice plant in test tube is described. By inoculating these tubes with sterilized egg masses of *Heterodera oryzae*, a high level of penetration of juveniles in roots is observed. Nearly all these juveniles develop to adult stage, as it is observed in the routine maintenance culture of the nematode. This method allows to obtain germfree cysts and egg masses for physiological purposes.

Another method is described for axenic culture of excised rice roots in test tube. Root growth is the most efficient in contact with the tube wall. A peculiar moulding of the agar medium promote such a root growth. By inoculating these tube with sterilized egg masses of *Heterodera oryzae*, a high level of penetration of juveniles in the roots is observed, but a few number of them develops to adult stage. The possibility of developing this result for nutritional requirement study is discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- FUJIWARA A., OJIMA K., 1954. Physiological studies of plant roots. I. Influence of some environmental conditions on the growth of isolated roots of rice plant and wheat. *Tohoku J. Agric. Research*, 5, 53-61.
- GUIRAN G. de, 1966. Coloration des nématodes dans les tissus végétaux par le bleu coton à froid. *Nematologica*, 12, 646.
- LUC M., BERDON-BRIZUELA R., 1961. *Heterodera oryzae*, n. sp. (Nematoda : Tylenchoidea) parasite du riz en Côte d'Ivoire. *Nematologica*, 6, 272-279.
- MAC RAE I. C., CASTRO T. F., 1967. Root exsudate of the rice plant in relation to akagare, a physiological disorder of rice plant. *Plant soil*, 26, 317-323.
- PITCHER R. S., PATRICK Z. A., MOUNTAIN W. B., 1960. Studies on the host parasite relation of *Pratylenchus penetrans* COBB. to seedlings : I. Pathogenicity under sterile conditions. *Nematologica*, 5, 309-314.
- PRÉVOT A. R., 1939. Le potentiel d'oxydo-réduction chez les bactéries. *Bull. Soc. Philom.*, 208, 394-415.
- REVERSAT G., 1971. *Contribution à l'étude de la biologie d'un nématode phytoparasite : Heterodera oryzae*. Thèse de Docteur Ingénieur. Université Claude-Bernard de Lyon, 1 vol., 52 p.
- REVERSAT G., MERNY G., 1973. Influence de quelques facteurs sur la pénétration du nématode *Heterodera oryzae* dans les racines du riz. *Cah. O. R. S. T. O. M., ser. Biol.*, 21, III-115.
- TORREY J. G., 1965. Physiological bases of organization and development in the root. In : *Encyclopedia of plant physiology*, 15/1, Springer Verlag, Berlin, 1256-1327.
- WALLACE H. R., 1963. *The biology of plant parasitic nematodes*. Edward Arnold L. T. D., London, 1 vol., 280 p.
- YOSHIDA S., OHNISHI Y., KITAGISHI K., 1959. Role of silicone in rice nutrition. *Soil and Plant food*, 5, 127-133.
- ZUCKERMAN B. M., 1971. Gnotobiology. In : *Plant parasitic nematodes*. Edit. B. M. ZUCKERMAN, W. F. MAI and R. A. ROHDE, Academic Press., 2, 159-184.

NOTE TECHNIQUE

ÉLEVAGE MONOXÉNIQUE
DU NÉMATODE *HETERODERA ORYZAE*
SUR LE RIZ

G. REVERSAT

*Laboratoire de Nématologie,
Centre O. R. S. T. O. M. d'Adiopodoumé,
B. P. 20, Abidjan (Côte d'Ivoire)*

Annales de Zoologie - Écologie animale
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, 75007 Paris

13 MAI 1975

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

no B 7543 Bio Sols