

Phyt.

MARQUAGE DIRECT DE *HEMICYCLIOPHORA PARADOXA* PAR LE PHOSPHORE RADIOACTIF. UTILISATION POUR L'ÉTUDE DES DÉPLACEMENTS DES NÉMATODES PHYTOPARASITES DANS LE SOL

PAR

MICHEL LUC, PAUL LESPINAT¹⁾ et BERNARD SOUCHAUD

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer - Abidjan - Côte d'Ivoire

Les auteurs décrivent une méthode de marquage direct du nématode *Hemicycliophora paradoxa* par trempage 24 heures dans une solution de ³²PO₄H₃. Le marquage est effectif et résiste à des lavages répétés à l'eau.

Les animaux ainsi marqués sont utilisés pour étudier leur déplacement dans une tranche de sol de 0,5 cm d'épaisseur, en repérant, grâce à un dispositif original, les variations d'intensité de la radioactivité de ce sol à des temps et des localisations différents.

Les résultats obtenus confirment les observations antérieures sur la présence dans le sol où est cultivé du mil à chandelle, plante-hôte du nématode, d'un facteur favorisant et orientant les déplacements de *H. paradoxa*. Cette confirmation prouve la valeur de la nouvelle méthode mise au point qui possède certains avantages sur les techniques classiques d'étude des déplacements des nématodes dans le sol.

L'utilisation des éléments marqués dans les études concernant les nématodes parasites des plantes est à la fois récente et peu fréquente (Dropkin, 1966). Les rares travaux qui s'y rapportent peuvent se classer en trois groupes:

- usage du ¹⁴C pour caractériser les acides aminés excrétés par les nématodes (Rothstein, 1963; Miller, 1964; Myers, 1965)
- usage du ¹⁴C pour tenter d'élucider le mode d'action des nématicides (Brown & Dunn, 1965)
- usage du ³²P pour étudier l'absorption de cet élément par la plante et la part qui entre dans le métabolisme du parasite (Dropkin & King, 1956; Hunter, 1958; Oteifa, Barrada & El Gindi, 1958; Oteifa & El Gindi, 1962 a, 1962 b; Peterburgskii & Bodrova, 1958). Une application ingénieuse de ce type d'expérimentation a permis à Sprau et Süß (1962) de démontrer le parasitisme de *Longidorus maximus* (Bütschli) envers la betterave: l'alimentation phosphorée de plants de betterave poussant dans un sol infesté par *L. maximus* est partiellement assurée, par arrosage des feuilles, à l'aide de ³²P; la radioactivité des nématodes à la fin de l'expérience prouve leur nutrition aux dépens de la plante, donc leur parasitisme.

¹⁾ Mis à la disposition de l'ORSTOM par le Commissariat à l'Énergie Atomique.

30 SEP. 1969

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire
 N° : 13423
 Cote : B

68

But de l'étude:

Dans toutes les expériences concernant les nématodes faites à l'aide de ^{32}P les animaux se retrouvaient marqués par absorption du phosphore contenu dans les tissus du végétal parasité. Sauf dans le cas des travaux de Sprau et Süß (1962), le marquage en lui-même ne constituait pas le but final des opérations.

Par contre les expériences relatées dans cet article ont eu pour but de tenter le marquage direct d'un nématode ectoparasite, *Hemicycliophora paradoxa* Luc, par trempage dans une solution contenant du ^{32}P . Puis, si ce marquage pouvait être réalisé, de repérer les déplacements en masse de *H. paradoxa* dans des tranches minces de sol en notant les variations, dans le temps et dans l'espace, de la radioactivité émise par les nématodes qui y avaient été placés.

En effet les expériences faites à ce jour sur les déplacements ou migrations des nématodes phytoparasites hors de la plante appartiennent à deux types et présentent des inconvénients différents:

— ou bien on opère dans un sol naturel (ou reconstitué) et l'on est obligé d'arrêter l'expérience à un temps "t" pour extraire les nématodes de différentes fractions de sol et les dénombrer. Notes le déplacement à des temps t, t1, t2, etc... exigera donc de nombreuses répétitions.

— ou bien on suit le déplacement individuel des nématodes dans un milieu transparent (agar-agar par exemple), mais les observations en ce cas ne peuvent être que limitées et il n'est pas certain que les observations faites correspondent exactement à ce qui se passe dans la nature, ces milieux ayant une structure fort différente de celle du sol.

Suivre au contraire le déplacement en masse de nématodes marqués, placés dans une couche mince de sol naturel, par les variations d'intensité de la radioactivité émise en différents points du dispositif à différents temps, permet d'éviter ces divers inconvénients et de donner une image réelle, dans des conditions aussi proches que possible de celle de la nature, des migrations d'un nématode que l'on pourra soumettre à différents stimuli.

Techniques utilisées:

Marquage: Les populations de *H. paradoxa* sont maintenues dans des pots contenant du sol préalablement stérilisé où pousse du mil à chandelle (*Pennisetum typhoidenum*). Elles sont extraites à l'éluatrieur de Seinhorst (1956, 1962); par décantation, lavage et passage sur filtres de type Oostenbrink (1960) on obtient une suspension très propre de nématodes dans l'eau. Cette suspension est ensuite dosée à 5.000 individus pour 25 cc d'eau déminéralisée.

On ajoute à cette suspension 25 cc d'une solution contenant 0,2 mCi de $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$, sans entraîneur. Notons que le matériel utilisé (verrerie et plexiglas) est „silicladé" *).

*) Le „Siliclad" est un produit inerte fabriqué par Clay-Adams qui, appliqué sur une surface propre et lisse, empêche l'adhérence des liquides.

Lors des essais de marquage les nématodes ont été laissés de 4 à 24 h dans la solution radioactive. La période retenue, en fonction de la mortalité et de l'importance du marquage, a été de 24 h. Toutes les expériences ont été faites à une température de 22-24° C.

La réalité du marquage des nématodes a été démontrée par les deux expériences suivantes:

Expérience 1: Une suspension de 5.000 nématodes est laissée 24 h dans la solution de 50 cc d'eau déminéralisée contenant 0,2 mCi de $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$.

Après 24 h la suspension est déposée sur un tamis en toile d'acier inoxydable à mailles de 45-50 μ recouvert d'un filtre de cellulose, type Oostenbrink: les nématodes sont retenus à ce moment sur le filtre. L'ensemble tamis et filtre est placé dans 50 cc d'eau déminéralisée pendant 18 h. Après ce laps de temps les nématodes vivants ont passé à travers l'ensemble filtre-tamis et se retrouvent en suspension dans l'eau. Cette suspension est laissée à décanter; on mesure ensuite séparément la radioactivité des nématodes, contenus dans le plus petit volume d'eau possible (1 cc environ) et celle du reste de la solution.

Les résultats sont donnés dans le Tableau I. Chaque nombre représente la moyenne de six comptages, chaque suspension ayant été divisée en trois lots comptés chacun deux fois cinq minutes pour plus de précision. Les compteurs utilisés sont du type GM 13 AP7. Le bruit de fond est déduit des chiffres bruts et la radioactivité exprimée en nombre de désintégrations par minute (dés/min.).

TABLEAU I

Suspension	Radioactivité des nématodes (en dés/min.)	Radioactivité de l'eau de la suspension (en dés/min.)
n° 1	3.454	891
n° 2	3.683	1.538
n° 3	4.386	766
n° 4	3.034	1.618

On constate donc qu'après passage, donc frottement très accentué, au travers de l'ensemble tamis-filtre les nématodes restent assez fortement marqués.

D'autre part la technique utilisée nécessitant le passage actif des nématodes à travers le filtre et le tamis, les nématodes morts restent sur ces derniers et seule la radioactivité des nématodes vivant à la fin de l'expérience est prise en considération.

Les chiffres concernant la radioactivité du liquide de suspension sont assez variables, beaucoup plus que ceux concernant les nématodes eux-mêmes. Cela peut provenir du fait que la suspension, même considérée comme très propre, contient toujours, en quantité variable, de fins débris organiques fixant très facilement le ^{32}P .

Expérience 2: Les nématodes après trempage pendant 24 h dans une solution de $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$ sont lavés sur un entonnoir en verre fritté par 250 cc d'eau déminéralisée. On laisse au-dessus des nématodes 25 cc de l'eau de lavage. Les nématodes

sont ensuite remis, par agitation, en suspension dans ces 25 cc d'eau et la radioactivité de la suspension mesurée. On filtre de nouveau la suspension qui est lavée une deuxième fois par 250 cc d'eau. On procède ainsi à dix lavages successifs.

La courbe semi-logarithmique suivante (Fig. 1) donne les résultats des comptages en dés/min. pour deux solutions dont l'une est dix fois plus radioactive que l'autre. Les courbes, à échelles différentes pour qu'elles soient plus aisément com-

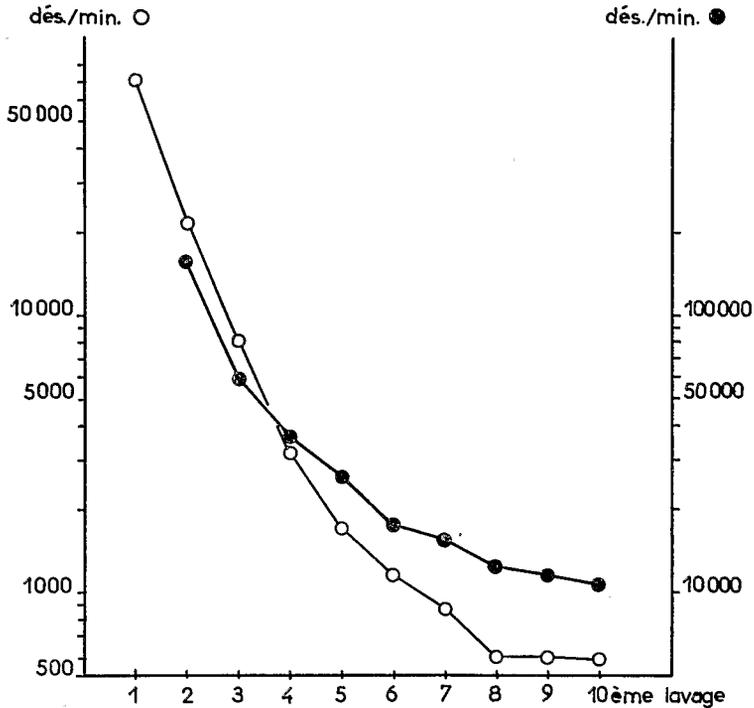


Fig. 1. Décroissance de la radioactivité de deux suspensions de *Hemicycliophora paradoxa* au cours de 10 lavages successifs à l'eau déminéralisée. (En ordonnée logarithmique: radioactivité en dés/min.; à gauche échelle de la solution de faible radioactivité (○); à droite échelle de la solution de radioactivité dix fois plus forte (●). En abscisse: lavages successifs.)

parables, ont la même allure et on peut constater qu'après une décroissance rapide de la radioactivité au cours des premiers lavages, celle-ci se stabilise au huitième lavage environ. Ceci est particulièrement net pour la courbe correspondant à la solution de radioactivité faible.

Il y a donc tout lieu de penser que la radioactivité mesurée à partir de ce 8ème lavage représente celle du ^{32}P fixé par les nématodes.

Dispositif pour l'étude des déplacements dans le sol:

Pour repérer le déplacement éventuel de nématodes marqués dans le sol, le dispositif suivant a été finalement adopté après de nombreux essais.

Un cadre de plexiglas de 5 mm d'épaisseur et de dimensions intérieures 100 ×

M. LUC *et al.*: Usage du ^{32}P pour l'étude des déplacements.

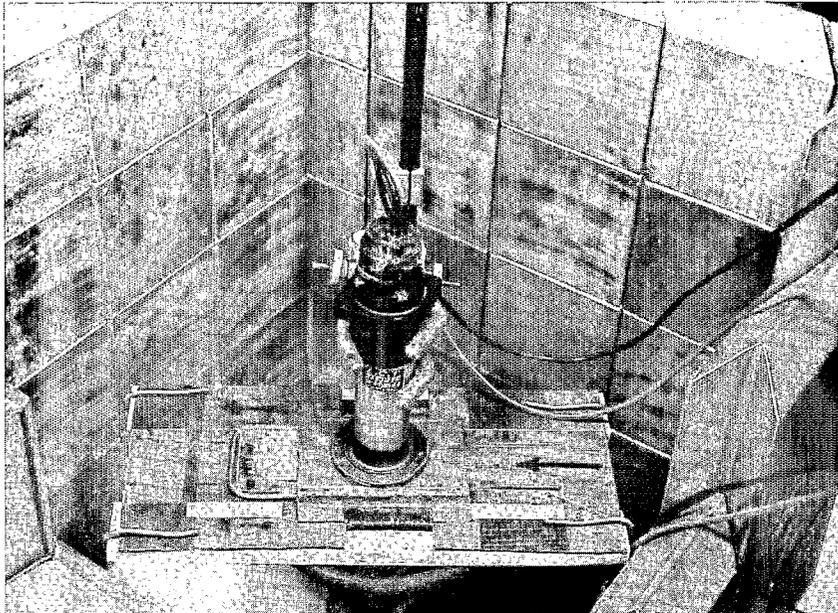


Fig. 2. Vue plongeante sur le dispositif. On distingue le compteur supérieur, le tunnel et la plaque contenant le sol.

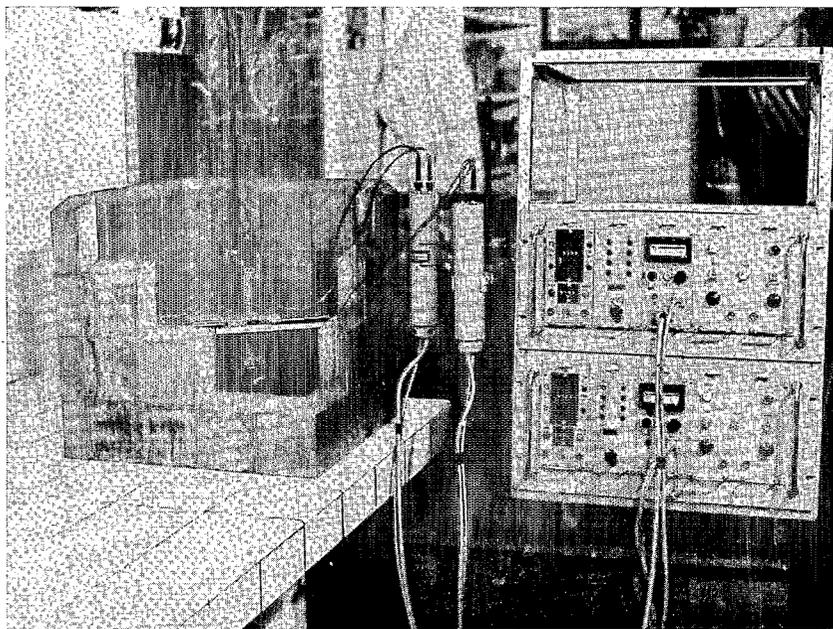


Fig. 3. Vue générale de l'installation.

30 mm est fermé sur une face par une feuille de polyéthylène de 2/100 mm d'épaisseur; le sol naturel, ou stérilisé par la chaleur, est placé sur cette face, légèrement tassé, son humidité contrôlée (environ 7%). Si une infestation par les nématodes doit avoir lieu, la suspension contenant ceux-ci est homogénéisée, puis le faible volume de celle-ci (environ 1 cc) est déposé goutte à goutte suivant une ligne précise, repérée, sur toute la largeur de la plaque. La feuille de polyéthylène est repliée sur le dessus de la plaque et scellée.

On a donc réalisé ainsi un dispositif étanche permettant d'inclure une tranche de sol mince (5 mm) entre deux feuilles de polyéthylène pour lesquelles l'absorption du rayonnement β est peu importante.

Sur toute la longueur des plaques une échelle graduée de 1/2 cm en 1/2 cm permet le repérage précis de l'endroit où doit se faire le comptage.

Les plaques sont disposées sur une feuille de plomb de 3 mm d'épaisseur où une échelle de même type a été également gravée et qui comporte une fenêtre de $0,5 \times 3$ cm. Au dessus de la plaque et étroitement accolé à celle-ci est disposé un tunnel en feuille de plomb comportant également une fenêtre de $0,5 \times 3$ cm, située exactement vis à vis de l'autre. En face de chaque fenêtre on place un compteur GM 13 AP7. Il y a donc deux compteurs qui agissent simultanément l'un en face de l'autre. Ce que nous nommons „comptage” dans le corps de l'article correspond, en fait, à la somme des résultats donnés par les deux compteurs.

La plaque contenant le sol et les nématodes marqués coulisse ainsi dans un tunnel en plomb. Le dispositif entier (plaque, tunnel et compteurs) est disposé dans une enceinte de briques de plomb (Figs 2 & 3).

Pour mesurer le déplacement des nématodes les comptages ont lieu, à différents temps, de 1/2 cm en 1/2 cm, en faisant coulisser la plaque de sol en face des fenêtres du tunnel de plomb. Le comptage dure de deux à cinq minutes suivant le type d'expérience.

Le bruit de fond dans chaque expérience est déterminé par plusieurs comptages de longue durée (1/4 à 1 heure) sur des plaques témoins. Il n'a jamais été supérieur à 30 dés/min.

Expérimentation: Les deux expériences relatées ci-après n'avaient pour but que de démontrer la validité de résultats obtenus par cette nouvelle méthode en confirmant les observations déjà faites par l'un des auteurs (Luc 1961, 1962) à l'aide de techniques classiques.

Ces travaux avaient, entre autre, démontré que la culture d'une plante-hôte, en l'occurrence le mil à chandelle, apporte au sol un facteur thermolabile susceptible d'activer les mouvements et d'attirer le nématode *Hemicyclophora paradoxa*.

Expérience 3: Deux séries de quatre plaques sont préparées:

— série A: les plaques sont remplies de sol de mil naturel provenant du même pot de culture.

— serie B: les plaques sont remplies du même sol de mil, mais stérilisé par la chaleur.

Sur deux plaques de chaque série on dépose, à l'extrémité et sur toute la largeur, une suspension de 5.000 *H. paradoxa* marqués dans 1 cc d'eau déminéralisée.

Sur les deux autres plaques on dépose, de la même façon et au même endroit, 1 cc de l'eau de suspension, sans nématodes. Ces plaques servent de témoin pour mesurer la diffusion propre éventuelle du ^{32}P restant dans la solution.

Les comptages ont lieu tous les jours pendant six jours et sont effectués de $\frac{1}{2}$ cm en $\frac{1}{2}$ cm. On néglige toutefois les deux premiers centimètres car l'eau

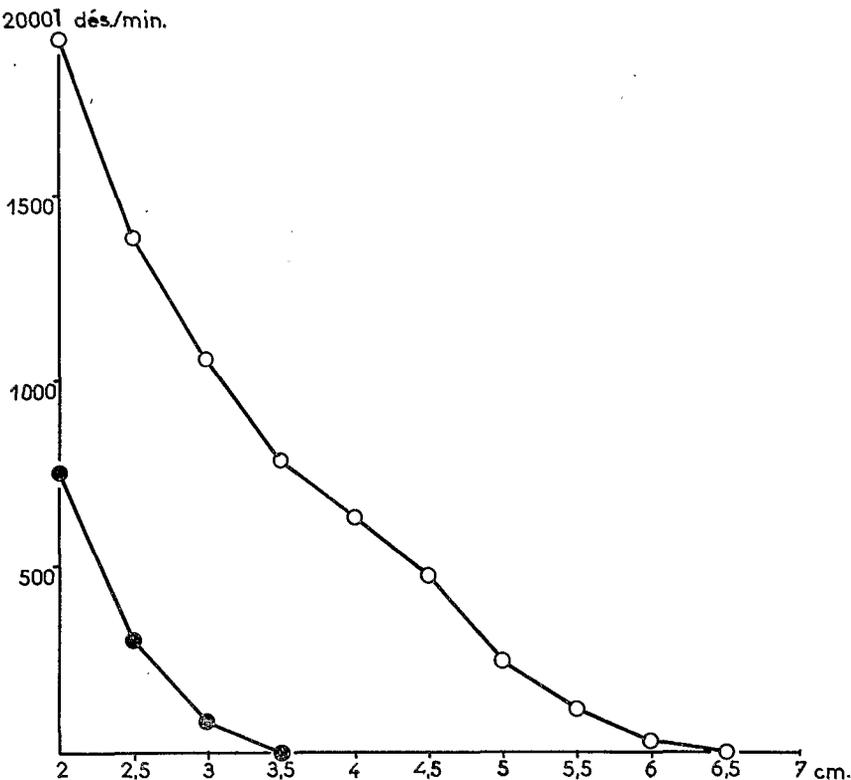


Fig. 4. Déplacements comparés de *Hemicycliophora paradoxa* dans de la terre de mil (O) et dans de la terre stérilisée (●), après 6 jours. (En ordonnée: radioactivité en dés./min. En abscisse: distance en cm à partir de la ligne de dépôt des nématodes).

ayant tenu en suspension les nématodes a pu permettre un déplacement passif de nématodes par sa diffusion dans le sol.

Les résultats sont donnés par les courbes de la Figure 4 où chaque point est la moyenne de deux comptages effectués chaque fois sur 2 plaques (4 comptages). Les chiffres retenus correspondent au nombre de désintégrations par minute enregistrées après soustraction du bruit de fond et des chiffres obtenus sur les plaques témoin, pratiquement négligeables. Il a été également tenu compte de la décroissance de radioactivité du phosphore.

Les courbes figurées correspondent aux résultats après six jours. On voit que les nématodes ont migré plus loin et en plus grand nombre dans la terre de mil naturelle que dans cette même terre privée de son facteur attractif par stérilisation à la chaleur. Il y a donc eu activation des mouvements des nématodes.

Expérience 4: Trois plaques sont remplies de terre de mil naturelle (TM) et de terre de mil stérilisée (TS) disposées en „tranche napolitaine”, de la façon suivante en partant d'une extrémité: 2 cm de TS, 1 cm TM, 1 cm TS, 1 cm TM etc...

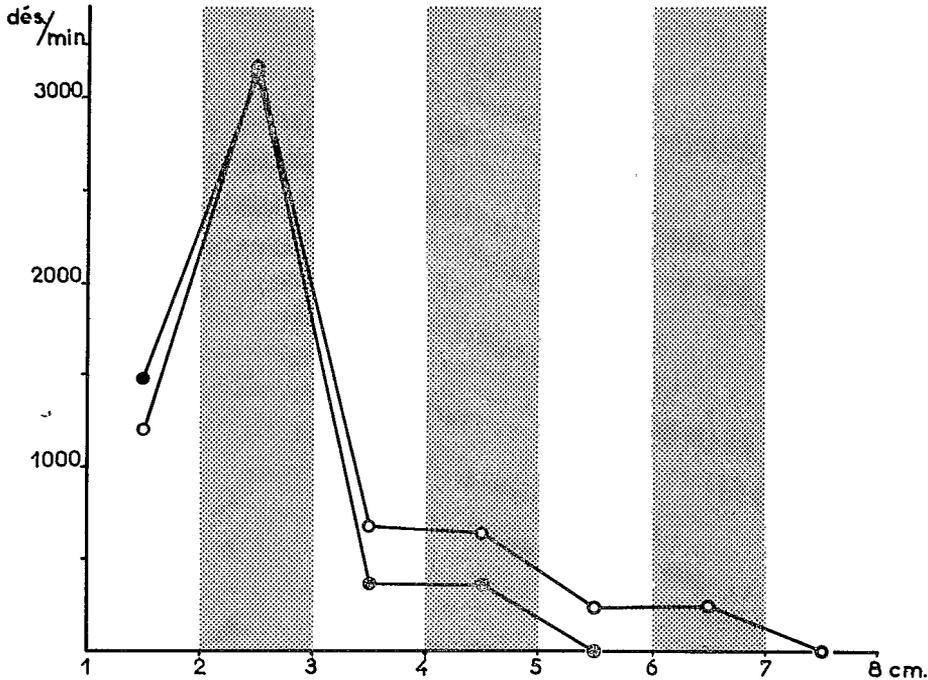


Fig. 5. Déplacement de *Hemicyclophora paradoxa* dans une plaque comportant alternativement des bandes de terre de mil (en grisé) et de terre stérilisée, après 6 jours (●) et 12 jours (○). (En ordonnée: radioactivité en dés/min. En abscisse: distance, en cm, à partir de la ligne de dépôt des nématodes).

Les nématodes sont disposés à l'extrémité de la plaque. La radioactivité de la première bande après la ligne de dépôt n'est pas mesurée car il y a dans cette zone diffusion de l'eau et entraînement possible de nématodes. La radioactivité totale de chaque bande de 1 cm, est mesurée par deux comptages effectués chacun sur $1/2$ cm de large, chaque jour, pendant 12 jours. Les résultats des deux comptages sont ensuite confondus.

Trois plaques témoins de même type recevant le même nombre de nématodes, mais tués par la chaleur, servent à mesurer la diffusion du phosphore et le bruit de fond.

Les résultats sont donnés par les courbes de la Figure 5 pour 6 et 12 jours. Chaque point est la moyenne des comptages effectués sur les 3 plaques après

soustraction de la radioactivité des plaques témoins (diffusion et bruit de fond) et en tenant compte de la décroissance naturelle de radioactivité pendant l'expérience.

Seuls les résultats enregistrés dans les deux premières bandes sont significatifs; ceux concernant les bandes le plus éloignées de la zone de départ n'ont qu'une valeur indicative.

L'allure des courbes (Fig. 5), bien différente de celles de la Fig. 4, montre cependant que les facteurs apportés au sol par la culture du mil ne provoquent pas seulement une activation des mouvements des nématodes mais également leur attraction, car ils ont tendance à se concentrer électivement dans les bandes correspondant au sol de mil naturel.

CONCLUSIONS

Les résultats enregistrés ne sont pas nouveaux (Luc, 1961) mais leur confirmation prouve la valeur d'une technique qui, elle, est nouvelle et qui pourra être utilisée avec profit pour d'autres schémas expérimentaux.

Les avantages du marquage direct des nématodes par le phosphore radioactif en vue de l'étude des déplacements des nématodes dans le sol sont les suivants:

- possibilité d'utiliser le sol, milieu naturel,
- possibilité de situer les nématodes, en masse, à des temps différents sans être obligé de détruire le dispositif expérimental donc d'effectuer de nombreuses répétitions,
- manipulations soigneuses mais relativement simples et excluant les imprécisions inévitables apportées par l'élutriation du sol et le passage sur tamis, lors des techniques classiques.

Les résultats observés sont toutefois légèrement altérés par le fait que la radioactivité mesurée peut provenir non seulement des nématodes vivants mais aussi de nématodes morts durant l'expérience et de traînées laissées sur les particules de sol pendant le déplacement. Cependant, dans les expériences relatées, cette radioactivité parasite ne peut infléchir les résultats que dans un sens contraire à la démonstration attendue et obtenue.

SUMMARY

Direct labelling of Hemicyclophora paradoxa by radioactive phosphorus, used for studying nematode movements in soils

The authors describe a new method for directly labelling the nematode *Hemicyclophora paradoxa* by plunging specimens for 24 hours in a solution of $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$. The labelling is effective and persists when nematodes are repeatedly rinsed with water.

The nematodes thus labelled are used to study their migration in a layer of soil 0,5 cm. thick. A device is described which permits the tracing of the nematodes by measurements of the variation of radioactivity at different places and at different moments in the layer of soil.

The results obtained confirm former experiments in which the presence of a factor in pearl-millet soil, inducing both activity and attraction of *Hemicyclophora paradoxa*, had been demonstrated.

The results of the experiment prove the value of the new technique which has some advantage over the classic methods for studying nematode movements in soils.

BIBLIOGRAPHIE

- BROWN, K. F. & DUNN, C. L. (1965). The uptake of carbon-14 labelled ethylene dibromide nematocide by *Ditylenchus dipsaci* (Kühn). *Nematologica* **11**, 353-360.
- DROPKIN, V. H. (1966). Prospects for the use of radiations and isotopes in nematology, in: *Isotopes and Radiation in Plant Pathology*. Int. atom. Energy Agency, Vienna, 53-59.
- DROPKIN, V. H. & KING, R. C. (1956). Studies on plant parasitic nematodes homogeneously labelled with radiophosphorus. *Exp. Parasit.* **5**, 464-480.
- HUNTER, A. H. (1958). Nutrient absorption and translocation of phosphorus as influenced by the root knot nematode (*Meloidogyne incognita acrita*). *Soil Sci.* **86**, 245-250.
- LUC, M. (1961). Note préliminaire sur le déplacement de *Hemicycliophora paradoxa* (Nematoda: Criconematidae) dans le sol. *Nematologica* **6**, 95-106.
- (1962). Sur l'orientation du déplacement de *Hemicycliophora paradoxa* dans le sol. *C.R. hebdomadaire. Séanc. Acad. Sci., Paris* **254**, 3124-3126.
- MILLER, C. W. (1964). Alanine synthesis in the nematode *Aphelenchoides ritzemabosi*. *Phytopathology* **54**, 1177.
- MYERS, R. F. (1965). Organic substances discharged by plant-parasitic nematodes. *Phytopathology* **55**, 429-437.
- OOSTENBRINK, M. (1960). Estimating nematode populations by some selected methods. In: *Nematology*, J. N. Sasser & W. R. Jenkins ed., Univ. N. Carol. Press, Chapel Hill, U.S.A., XV + 480 pp.
- OTEIFA, B. A., BARRADA, Y. & EL GINDI, D. M. (1958). An approach for using labelled radioactive phosphorus in physico-pathological studies of plant nematode diseases. *Proc. 2nd Unit. Nat. intern. Conf. Peaceful Uses atom. Energy, Geneva*, **27**, 48-50.
- OTEIFA, B. A. & EL GINDI, D. M. (1962a). Influence of subsequent infections with root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, on P^{32} absorption and translation in tomato plants. *Nematologica* **7**, 8.
- & — (1962b). Influence of parasitic duration of *Meloidogyne javanica* (Treub) on host nutrient uptake. *Nematologica* **8**, 216-220.
- PETERBURGSKII, A. V. & BODROVA, I. M. (1958). [Some questions on root nutrition and physiology of plants infected by gall nematodes] (en russe). *Dokl. Mosk. sel.-Khoz. Akad. K. A. Timiryazeva* **36**, 232-239.
- ROTHSTEIN, M. (1963). Nematode biochemistry. III Excretion products. *Comp. Biochem. Physiol.* **9**, 51-59.
- SEINHORST, J. W. (1956). The quantitative extraction of nematodes from soil. *Nematologica* **1**, 249-267.
- (1962). Modifications of the elutriation method for extracting nematodes from soil. *Nematologica* **8**, 117-128.
- SPRAU, F. & SÜSS, A. (1962). Über die Möglichkeit eines Nachweises des parasitischen Charakters freilebender Nematoden für bestimmte Wirtspflanzenarten mit Hilfe von Radioisotopen. *Nematologica* **7**, 301-304.