

# Détermination du sexe de *Globodera rostochiensis* Woll. et influence des niveaux d'infestation sur la pénétration, le développement et le sexe de ce nématode.

Didier MUGNIERY \* et Guy FAYET \*\*<sup>1</sup>

\* INRA, Domaine de la Motte-au-Vicomte, B.P. 29, 35650 Le Rheu, France

\*\* ENSA, Unité de Calcul, 65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex, France

## RÉSUMÉ

L'étude de la pénétration, du développement et du quotient sexuel de *Globodera rostochiensis* est effectuée après dissection des racines de végétaux cultivés en boîtes de Pétri. Il est montré qu'il existe une influence du niveau d'inoculum sur la pénétration. De plus, que ce soit chez un hôte partiellement résistant, pomme de terre cv. Astarté, ou chez un hôte non résistant, tomate cv. St Pierre, deux facteurs opposés agissent sur les larves ayant pénétré : d'une part, plus celles-ci sont nombreuses, plus elles induisent la formation de cellules géantes nécessaires à leur développement ; d'autre part, plus la compétition est forte, plus le développement est difficile. On ne peut admettre un déterminisme sexuel du type classique. Seule l'hypothèse d'épigénie est envisageable. Il est alors montré que ces deux facteurs, à effets opposés, agissent également sur le phénotype sexuel des nématodes développés.

## SUMMARY

*Sex determination in Globodera rostochiensis Woll. and influence of inoculum level on penetration, development and sex of this nematode*

The effects of inoculum levels on invasion, development and sex ratio of *Globodera rostochiensis* were studied on dissected roots of seedlings grown in Petri dishes. On two particular hosts, invasion, development and sex differentiation depend strictly upon level of infestation. Invasion is under dependence of intraspecific competition, and the dependence for development can be considered as the result of two factors acting in opposite directions. The more numerous the nematodes, the more effect they have in inducing formation of giant cells which allow the nematode to develop. This effect is counter-balanced by intraspecific competition as shown with a partially resistant potato cv. Astarté and a susceptible tomato cv. St Pierre. Results indicated that the conventional sex determination cannot be operative and epigeny is the only possibility. It was also shown that these two factors act to select the sexual phenotypes in the same way.

La densité de nématodes présents dans les racines d'une plante-hôte est un facteur prédominant de leur développement et de l'expression de leur sexe. Chez les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*, la compétition intraspécifique conduit à la formation de mâles au détriment des femelles (Triantaphyllou, 1960). Chez les nématodes à amphimixie obligatoire, à une augmentation de compétition correspond généralement un quotient sexuel \* de plus en plus élevé chez la population développée

par mortalité préférentielle des larves pré-femelles (*Heterodera schachtii*, Kerstan, 1969). Quand le déterminisme sexuel est strictement épigénique (*Globodera pallida*), la compétition conduit de manière préférentielle à un choix phénotypique sexuel mâle et à un blocage du développement chez les larves infestantes L2 (Mugniery & Fayet, 1981) ; cependant, chez cette espèce, on observe qu'une très légère compétition favorise plus le développement et le choix du phénotype femelle que l'absence totale de toute compétition (Mugniery, 1981).

L'objet de cette note est d'étudier ce phénomène chez une espèce très voisine, *Globodera rostochiensis*, espèce amphimictique obligatoire (Williams, 1957), chez laquelle le déterminisme sexuel est controversé.

\* Le terme « quotient sexuel », qui traduit l'expression anglaise « sex ratio » se définit comme le rapport entre le nombre de mâles et le nombre de femelles.

(<sup>1</sup>) Avec la collaboration technique de Madeleine Oger.

### Matériel et méthode

L'espèce étudiée est *Globodera rostochiensis*, originaire d'Ecosse, pathotype RO 1. Les larves infestantes L2 sont obtenues après mise en éclosion dans de l'exsudat radiculaire de pomme de terre d'un grand nombre de kystes. Les larves écloses sont prélevées au hasard et déposées sur racines de plante-hôte cultivée sur milieu gélosé en boîte de Petri, selon la méthode décrite par Mugniery & Person (1976). Cette méthode est choisie parmi d'autres car elle permet un très bon contrôle de la pénétration et du développement des nématodes avec une perte minime.

Des doses variables d'inoculum sont utilisées par racine : 1, 3, 5, 10, 15 larves. Deux plantes-hôtes sont utilisées : tomate cv. St Pierre et pomme de terre cv. Astarté. Avec la tomate, les larves L2 sont déposées sur la racine pivotante quand celle-ci atteint 1 à 2 cm. Avec la pomme de terre, les larves sont déposées exclusivement sur des grosses racines, d'un diamètre minimum de 1 mm pour éviter au mieux les problèmes créés directement par la compétition intraspécifique (Mugniery & Fayet, 1981). Les boîtes de Petri sont conservées à l'obscurité pour la pomme de terre, sous 16 h de photopériode pour la tomate. La température moyenne est de 18-20°.

Juste avant la sortie des premiers mâles, les racines sont examinées et disséquées s'il y a lieu. La population est alors répartie en trois groupes : mâles, femelles et larves bloquées. Pour les mâles et femelles, il s'agit de tout individu L3 âgé, L4, adulte chez lequel le sexe est identifiable sans erreur. Pour les L2 et L3, il s'agit de larves dont le développement est arrêté avant extériorisation phénotypique du sexe : ce sont pour la majorité des animaux de stade L2.

Les résultats sont analysés au moyen du test  $2 \hat{I}$  (Arbonnier, 1966), choisi par rapport au test  $X^2$  pour ses propriétés de parfaite décomposition additive. Suivant l'ordre chronologique des événements, nous considérons successivement la pénétration des larves, leur développement et le rapport des sexes des adultes, figuré par le quotient sexuel  $\sigma / \varphi$ .

### Résultats

*G. rostochiensis* sur pomme de terre cv. ASTARTE (Tab. 1)

#### Pénétration

Il n'y a pas, entre niveaux différents d'inoculum, de différence significative :  $2 \hat{I} = 2,26$  pour 3 ddl. Le pourcentage moyen de pénétration se situe donc vers 73%.

Tableau 1

Influence du niveau d'infestation sur la pénétration, le développement et le quotient sexuel de *G. rostochiensis* sur deux hôtes différents

*Influence of inoculum level on penetration, development and sex ratio of G. rostochiensis on two different hosts*

	Pomme de terre cv. Astarté				Tomate cv. Saint-Pierre				
	1	3	5	10	1	3	5	10	15
Inoculum (par racine)									
Pénétration (%)	75 a	75 a	70 a	72 a	85 a	85 ab	77 bc	75 c	74 c
Blocage (%)	68 a	61 ab	51 bc	48 c	19 a	10 b	4 c	15 a	21 a
Quotient sexuel $\sigma/\varphi$ observé	1,478 ab	3,000 a	2,480 ab	1,425 b	0,101 a	0,077 a	0,254 c	0,105 ab	0,210 bc
Limite du quotient sexuel :									
minimum	0,167	0,279	0,321	0,281	0,068	0,058	0,176	0,064	0,114
maximum	9,347	12,737	9,200	5,500	0,589	0,415	0,695	0,754	1,056

Les lettres a, b, c indiquent les classes présentant des différences significatives au niveau 5%.

*Figures bearing the same letters are not significantly different (level 5%).*

*Développement*

Pour juger du développement, nous analysons le rapport existant entre larves bloquées et nématodes présents dans les racines. Le nombre de larves non développées, pratiquement toutes bloquées au stade L2, est très important. La différence globale est hautement significative ( $2 \hat{I} = 19,23$  pour 3 ddl). Le blocage diminue quand le niveau d'inoculum croît, mais de façon très légère car l'analyse deux par deux, par ordre croissant d'inoculum, ne révèle jamais de différences significatives. On remarquera que la plus petite différence se situe entre les inoculum cinq et dix larves par racine.

*Quotient sexuel*

Il n'y a pas de différence significative globale ( $2 \hat{I} = 7,18$  pour 3 ddl) dans la répartition des sexes des larves développées ( $2 \hat{I}$  à 5% = 7,81 pour 3 ddl). Le fait que nous soyons très proches du seuil 5% nous conduit à examiner l'existence éventuelle de différences entre inoculum. De fait, les quotients sexuels des inoculum trois et dix larves par racine sont significativement différents ( $2 \hat{I} = 5,09$  pour 1 ddl) et le maximum d'explication est fourni en regroupant les inoculum une et dix larves, trois et cinq larves par racine : la différence entre groupe est hautement significative ( $2 \hat{I} = 6,88$  pour 1 ddl).

*G. rostochiensis sur tomate cv. ST PIERRE (Tab. 1)**Pénétration*

On constate une différence globale hautement significative :  $2 \hat{I} = 15,78$  pour 4 ddl. La tendance générale observée est une diminution du pourcentage de pénétration avec l'augmentation de l'inoculum.

*Développement*

On constate également une différence globale hautement significative :  $2 \hat{I} = 29,56$  pour 4 ddl. Le pourcentage de larves non développées diminue de une à cinq larves par racine puis augmente par la suite.

*Quotient sexuel*

Il existe une différence hautement significative :  $2 \hat{I} = 17,16$  pour 4 ddl. La tendance générale observée est une augmentation du quotient sexuel avec l'augmentation de l'inoculum avec deux pics marqués à cinq et quinze larves par racine due, surtout à cinq larves par racine, à un fort effectif de mâles (Tab. 2).

**Discussion**

Avec les deux plantes-hôtes testées, on observe une évolution caractéristique des trois paramètres

Tableau 2

Répartition des stades non développés et développés de *G. rostochiensis* sur deux hôtes différents et à plusieurs niveaux d'infestation. Comparaison avec un quotient sexuel théorique compris entre 0,321 et 0,415  
*Numbers of developed and undeveloped individuals of G. rostochiensis on two different hosts at several inoculation levels.*

*Comparison with theoretical numbers which should be obtained with a sex ratio comprised between 0.321 and 0.415*

	<i>Pomme de terre cv. Astarté</i>				<i>Tomate cv. Saint-Pierre</i>				
Inoculum (par racine)	1	3	5	10	1	3	5	10	15
Effectif total	238	261	255	260	205	201	200	200	255
Larves non pénétrées	59	66	76	74	30	31	46	51	66
Larves bloquées	122	119	92	89	33	17	6	23	39
♂	34	57	62	57	13	11	30	12	26
♀	23	19	25	40	129	142	118	114	124
Nombre théorique de									
♂	57-71	63-78	61-77	62-78	49-62	48-60	48-60	48-60	61-77
♀	181-167	198-183	194-178	198-182	156-143	153-141	152-140	152-140	194-178

étudiés : pénétration, développement et quotient sexuel.

Chez la pomme de terre cv. Astarté, le niveau d'inoculum n'influe pas sur la pénétration qui, somme toute, est loin d'être optimale. Cela est probablement dû au fait qu'avec la taille des racines inoculées, il n'y a pas surpopulation locale pour l'établissement des larves.

Chez la tomate où c'est la racine pivotante qui est inoculée et dont le diamètre est notoirement inférieur à celui des racines de pommes de terre, il y a de toute évidence surpopulation locale. Cette surpopulation a pour effet d'éjecter des larves qui, par la suite, ne pénètrent plus dans les racines.

Pour le développement des larves établies dans les racines, on observe un phénomène très inattendu. Chez le cv. Astarté, les larves se développent d'autant mieux qu'elles sont plus nombreuses dans les racines. On constate la même chose chez la tomate jusqu'à cinq larves par racine. Puis tout se passe comme si à partir d'un certain seuil, cinq larves chez le cv. St Pierre, la compétition intervenait pour limiter le développement, phénomène d'ailleurs commun chez d'autres Heteroderidae (*H. schachtii*, Kerstan, 1969). Par contre, le phénomène inverse, dit de stimulation, n'a été montré que chez *G. pallida* (Mugniery, 1981). On peut essayer d'expliquer ce phénomène de la manière suivante. On sait que le développement des larves n'est possible que quand l'hôte répond aux enzymes des larves par la fabrication de cellules géantes, consécutive à une forte activité de l'AIA (Giebel, 1974). Comme chez les cultivars Astarté et St Pierre jusqu'à cinq larves par racine, il existe une forte corrélation positive entre niveau d'inoculum et pourcentage de nématodes développés, cela signifie que les larves exercent quantitativement sur l'hôte une stimulation d'induction de fabrication de cellules géantes ou de non répression d'AIA d'autant plus forte qu'une plus grande quantité d'enzymes est injectée dans le végétal. Ce phénomène s'observe jusqu'au seuil critique où il est contrebalancé par la compétition dont l'effet est inverse. Ce seuil est d'autant plus bas chez la tomate que la compétition est intense étant donné le faible diamètre des racines inoculées (Ellenby, 1954 ; Mugniery & Fayet, 1981).

L'interprétation de l'évolution du quotient sexuel est beaucoup plus délicate. Tout peut dépendre en effet de l'hypothèse de départ que l'on adopte quant au déterminisme sexuel, soit génétiquement déterminé selon un quotient sexuel quelconque mais donné (Bridgeman & Kerry, 1980), soit totalement épigénétique (Den Ouden, 1960 ; Trudgill, 1967).

Si l'on suppose une détermination sexuelle du type classique, il faut adopter, pour le quotient sexuel de la population avant pénétration, une

valeur vraisemblable qui n'est pas nécessairement 1, (*Heterodera glycines*, Evans & Fox, 1977). Pour cela, au tableau 1, nous avons indiqué les valeurs minimum et maximum du quotient sexuel de la population utilisée en supposant que les larves n'ayant pas pénétré et les larves bloquées sont toutes respectivement femelles ou mâles. La fourchette admissible a donc comme bornes le maximum des quotients sexuels minima et le minimum des quotients sexuels maxima. Avec les deux plantes-hôtes utilisées, cette fourchette se situe donc entre 0,321 et 0,415. Ceci correspond à une population comportant 24 à 30% d'individus à génotype masculin pour 76 à 70% d'individus à génotype féminin. Il est clair que la répartition classique des sexes — 50% de mâles, 50% de femelles — est rejetée.

Pour chaque dose d'inoculum, nous avons, au tableau 2, indiqué l'effectif total utilisé, la répartition des nématodes trouvés dans les racines et le nombre théorique de mâles et de femelles que l'on aurait dû trouver si le quotient sexuel de la population inoculée avait été compris entre 0,321 et 0,415.

Dans le cas du cv. Astarté, il est clair que seul l'inoculum de cinq larves par racine produit le nombre attendu de mâles. Ceci indique donc que toutes les larves bloquées et n'ayant pas pénétré sont pré-femelles. Pour les autres inoculum et surtout à une larve par racine, il y a un léger déficit en mâles, montrant qu'une faible partie des larves pré-mâles n'est pas rentrée dans les racines et/ou ne s'y est pas développée. Dans la tomate cv. St Pierre, le phénomène observé est inverse. Le déficit en mâles est toujours très important. Il y a également un déficit, mais plus faible, en femelles sauf à trois larves par racine. Ceci indique donc que pour cet inoculum, toutes les larves bloquées et n'ayant pas pénétré sont mâles. A cinq larves par racine, le déficit en femelles ne peut pas être comblé si l'on suppose que les larves bloquées sont toutes pré-femelles. On assiste donc, prioritairement, à partir de cinq larves par racine, à un déficit de pénétration chez les larves pré-femelles qui va s'accroissant jusqu'à quinze larves par racine, car l'addition des larves n'ayant pas pénétré et des femelles donne en plein dans la fourchette possible du nombre de femelles. Ceci indique donc qu'à partir de trois larves par racine, les larves pré-femelles pénètrent de moins en moins bien dans les racines, mais s'y développent bien. En complément, les larves pré-mâles rentrent de mieux en mieux mais ne se développent que très mal. Pour une évidente raison de continuité, nous admettons que, pour l'inoculum une larve par racine, il y a prioritairement déficit de pénétration des femelles et blocage des larves pré-mâles.

Quand on confronte les deux interprétations de développement de larves sexuellement pré-déterminées, on constate qu'il existe une complète contradiction qu'aucun élément biologique connu ou soupçonné ne permet d'expliquer.

Dans le cas de l'épigénie, les larves infestantes ne sont pas déterminées sexuellement (Trudgill, 1967). Il ne peut donc y avoir de pénétration différentielle comme cela existe dans certains cas chez d'autres nématodes (*H. oryzae*, Cadet, Merny & Reversat, 1975). Le problème du développement peut être expliqué selon l'hypothèse énoncée ci-dessus : phénomène de stimulation de fabrication de cellules géantes proportionnel au nombre de nématodes présents dans les racines et phénomène de compétition dont l'effet est opposé. Dans cette hypothèse, l'évolution du quotient sexuel chez la pomme de terre cv. Astarté peut parfaitement s'expliquer : à faible inoculum, l'induction de fabrication des cellules géantes serait très faible, le développement est réduit et les rares nématodes qui se développent induiraient la fabrication de cellules géantes de taille réduite qui permet seulement le développement des larves en mâles (Ross & Trudgill, 1969). Si l'inoculum augmente, le développement est meilleur car la compétition n'est pas encore intervenue. Mais l'effet de stimulation est encore faible et c'est surtout vers le sexe mâle que les nématodes évoluent. L'effet stimulation augmentant, le surplus de nématodes pouvant enfin se développer peut le faire vers le phénotype femelle. Avec la tomate St Pierre, le phénomène est à peu près semblable. Bien que ce cultivar soit un hôte bien meilleur que la pomme de terre Astarté, une certaine proportion de larves, non soumises à la compétition, ne parviendrait pas à induire la fabrication des cellules géantes nécessaires à leur développement : ces larves restent bloquées. Quand on élève le niveau d'inoculum, cette induction croît et, comme avec la pomme de terre cv. Astarté, le quotient sexuel augmente (cinq larves par racine), puis diminue (10 larves par racine). Au-delà, la compétition intraspécifique devient suffisamment forte pour masquer l'effet de stimulation et le quotient sexuel augmente à nouveau, conséquence surtout d'une diminution du nombre de femelles formées : leur proportion par rapport aux nématodes inoculés passe en effet de 57% à 49% entre dix et quinze larves par racine.

### Conclusion

La démonstration du caractère épigénique du sexe de *G. rostochiensis* est faite par épuisement successif de toutes les hypothèses possibles. Aucune possibilité de pénétration différentielle de larves pré-déterminées comme chez *H. oryzae* (Cadet, Merny

& Reversat, 1975), aucune possibilité de blocage différentiel de larves pré-déterminées comme chez *H. schachtlii* (Kerstan, 1969) ne peuvent, seules ou ensemble, expliquer les résultats observés chez la pomme de terre cv. Astarté et chez la tomate St Pierre. On doit donc admettre le caractère épigénique du sexe comme Trudgill (1967), quels qu'aient pu être les résultats de Bridgeman & Kerry (1980). Ces derniers trouvent un quotient sexuel de 1 sur des populations de *G. rostochiensis* développées dans la tomate cv. Moneymaker après inoculation des plantules avec une ou deux larves. En dehors du fait que seule 30% de la population initiale ait été retrouvée, ce qui signifie qu'on ignore le sexe des 70% restants, le fait de trouver un quotient sexuel de 1 ne démontre nullement une répartition mendélienne du sexe. Avec des populations épigéniques, on peut observer de tels rapports (Mugniery, 1981 ; Mugniery & Fayet, 1981) et avec des populations où il y a égalité de mâles et de femelles, on peut observer des quotients sexuels chez les nématodes développés très différents de 1 (Kerstan, 1969).

Dès lors, on peut expliquer les variations observées de développement et de rapport des sexes par la résultante de deux effets contraires : un effet de stimulation d'induction de cellules géantes qui varie dans le même sens que le nombre de larves présentes dans les racines, un effet de compétition intraspécifique qui limite le développement et favorise plus le développement des larves vers le sexe mâle que vers le sexe femelle. Si ce dernier effet est assez bien connu (Ross & Trudgill, 1969), le premier ne l'est pas en nématologie, alors qu'il est souvent la règle en mycologie et en bactériologie. Montré chez *G. rostochiensis* et précédemment chez *G. pallida* (Mugniery, 1981), il serait intéressant de savoir s'il n'existe pas également chez des nématodes à déterminisme sexuel classique. Il sera également intéressant de savoir si diverses souches de *G. rostochiensis* présentent, et avec la même intensité, ce caractère de stimulation sur les hôtes étudiés et sur d'autres.

Ceci pose enfin le problème de la méthodologie à utiliser pour les tests de résistance, tant pour la recherche de gènes que pour indiquer le niveau de résistance atteint chez des lignées et clones avancés. Il est évident ici qu'on ne peut considérer le cultivar Astarté comme absolument résistant puisque des femelles s'y forment en quantité non négligeable. Mais si l'on se place en condition de forte compétition, on réduira le nombre de femelles et inversement jusqu'à un certain point. A la lumière des résultats exposés, il faudra choisir une taille d'inoculum se situant entre trois et dix larves par racine, trois si le diamètre des racines est trop faible, dix si l'on a de bonnes raisons de ne pas trop craindre cette compétition.

RÉFÉRENCES

- ARBONNIER, P. (1966). L'analyse de l'Information. Aperçu théorique et application à la loi multinomiale. *Ann. Sci. forest.*, 23 : 950-1009.
- BRIDGEMAN, M.R. & KERRY, B.R. (1980). The sex ratios of cyst-nematodes produced by adding single second-stage juveniles to host roots. *Nematologica*, 26 : 209-213.
- CADET, P., MERNY & G. REVERSAT, G. (1975). Facteurs affectant le déterminisme du sexe chez *Heterodera oryzae* (Nematoda : Tylenchoidea). *Cah. ORSTOM, Sér. Biol.*, 10 : 207-214.
- DEN OUDEN, H. (1960). A note on the parthenogenesis and sex determination in *Heterodera rostochiensis* Woll. *Nematologica*, 5 : 215-216.
- ELLENBY, C. (1954). Environmental determination of the sex ratio of a plant parasitic nematode. *Nature, Lond.*, 174 : 1016.
- EVANS, D.M. & FOX, J.A. (1977). The sex ratio of *Heterodera glycines* at low population density. *J. Nematol.*, 9 : 207-210.
- GIEBEL, J. (1974). Biochemical Mechanisms of Plant Resistance to Nematodes. A Review. *J. Nematol.*, 6 : 175-184.
- KERSTAN, U. (1969). Die Beeinflussung des Geschlechterverhältnisses in der Gattung *Heterodera*. II. Minimallebensraum — Selektive Absterberate der Geschlechter — Geschlechterverhältnis, *Heterodera schachtii*. *Nematologica*, 15 : 210-228.
- MUGNIERY, D. (1981). Influence de l'hôte sur l'expression du sexe chez un nématode phytoparasite, *Globodera pallida* Stone, à déterminisme sexuel épigénétique. *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 294, sér. III : 49-52.
- MUGNIERY, D. & FAYET, G. (1981). Détermination du sexe chez *Globodera pallida* Stone. *Revue Nématol.*, 4 : 41-45.
- MUGNIERY, D. & PERSON, F. (1976). Méthode d'élevage de quelques nématodes à kystes du genre *Heterodera*. *Sci. Agron., Rennes*, 217-220.
- ROSS, G.J.S. & TRUDGILL, D.L. (1969). The effect of population density on the sex ratio of *Heterodera rostochiensis*; a two dimensional model. *Nematologica*, 15 : 601-607.
- TRIANAPHYLLOU, A.C. (1960). Sex determination in *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949, and intersexuality in *M. javanica* (Treub, 1885), Chitwood, 1949. *Annls Inst. phytopath. Benaki, N.S.*, 3 : 12-31.
- TRUDGILL, D.L. (1967). The effect of environment on sex determination in *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 13 : 263-272.
- WILLIAMS, T.D. (1957). Development of isolated female larvae of the potato-root eelworm (*Heterodera rostochiensis* Woll.). *Nature Lond.*, 180 : 1 000.

Accepté pour publication le 22 septembre 1983.