

# Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*

Ahmed JANATI \*, Jean-Baptiste BERGÉ \*\*  
A.C. TRIANTAPHYLLOU \*\*\* et Antoine DALMASSO \*\*

\* Actuellement : Direction de la Recherche Agronomique, Station de Phytôtrie, B.P. 415, Rabat, Maroc

\*\* INRA Station de Recherches sur les Nématodes, 123 boulevard Francis Meilland, Antibes, France,

\*\*\* Department of Genetics, North Carolina State University, Raleigh, NC 27650, USA

## RÉSUMÉ

Soixante-quinze populations de *Meloidogyne*, provenant de nombreux pays et continents, ont été examinées pour le polymorphisme de leurs isoestérases. Des différences bien marquées sur les isoestérases b (Bergé & Dalmasso, 1976) permettent l'identification des espèces avec un degré de sûreté jamais atteint. Tandis que les isoestérases  $\beta$  (révélées seulement avec le naphthyl-1 acétate) ont montré une certaine variabilité chez *M. incognita*, davantage chez *M. arenaria* et aucune chez *M. javanica* et quelques formes non identifiées.

## SUMMARY

*New data on isoesterase polymorphism in Meloidogyne spp. : application to the taxonomy of some species of this genus*

The isoesterase composition of females from 75 populations of *Meloidogyne* from 35 countries was determined using polyacrylamide gel electrophoresis of one to ten female extracts. Two types of isoesterases, b and  $\beta$ , were recognized after coloration of gels with 1-naphthylacetate. The distribution of b isoesterases is species specific and stable among populations of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*, but some variations were detected among populations of *M. arenaria*. This pattern of b esterases is considered a reliable taxonomic character for identification of *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica*. Eleven populations out of the 75 studied did not show a recognizable pattern of b esterases and may be undescribed species. The distribution of  $\beta$  isoesterases showed the most variability among populations of *M. arenaria* but less among *M. incognita* populations. The same  $\beta$  isoesterases were present in all populations of *M. javanica*, and the pattern was very stable among several populations of undescribed species. The stability of isoesterases distribution within the three recognized species is discussed.

La détermination des espèces du genre *Meloidogyne* a toujours posé des problèmes aux spécialistes. Que les critères utilisés soient morphologiques, caryotypiques ou portent sur la gamme d'hôtes, il existe des populations originales qu'il est difficile de ranger dans l'une ou l'autre des espèces. Excepté pour les caractères caryotypiques, il est difficile de déterminer ce qui appar-

tient à la génétique de l'animal et ce qui revient aux influences du milieu. C'est pourquoi on s'est adressé aux isoenzymes et aux protéines de structure pour tenter de donner une nouvelle base phylogénétique à la systématique des *Meloidogyne* (Dickson, 1969; Hussey, Sasser & Huisinigh, 1972; Dalmasso & Bergé, 1978). Cette méthodologie se prête bien à une telle étude,

---

*This work was conducted using the nematode collections and research facilities at the "INRA, Station de Recherches sur les Nématodes", Antibes, France and at North Carolina State University, Raleigh, NC, USA. Partial support was provided by the International Meloidogyne Project Contract No. AID/ta-C-1234 and by the National Science Foundation Grant DEB-7917386.*

Ce travail a été effectué sur les élevages de *Meloidogyne* appartenant à l'INRA, Station de Recherches sur les Nématodes, Antibes (France) et à la North Carolina State University, Raleigh, N.C., USA.

car on connaît assez convenablement les relations existant entre les gènes et les enzymes (Dickinson & Sullivan, 1975). En se basant sur plusieurs systèmes enzymatiques on a pu montrer qu'il est possible de différencier les espèces *M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica* (Dalmasso & Bergé, 1978). Ces méthodes permettent aussi de mesurer la diversité génétique au sein d'une espèce (Janati, 1979).

Dans le cas des *Meloidogyne* on a montré qu'il existe, dans les conditions naturelles, peu de variabilité. On observe que *M. arenaria* a une diversité génétique plus élevée que *M. incognita* et surtout que *M. javanica*. Parmi les enzymes étudiées, il est apparu que l'identification pouvait se faire par le polymorphisme des isoestérases qui est un moyen pratique, sûr et peu coûteux. Les populations précédemment étudiées étaient essentiellement européennes ou circum-méditerranéennes. Dans le présent travail nous avons examiné les isoestérases de souches de *Meloidogyne* qui proviennent de diverses régions du monde.

Plusieurs des populations examinées ont déjà fait l'objet de publications antérieures relatives à leur gamme d'hôtes (Sasser, 1980), à leur caryotype (Triantaphyllou, 1962, 1963, 1981) et à leur polymorphisme biochimique (Dalmasso & Bergé, 1978; Janati, 1979) où des informations complémentaires pourront être trouvées.

## Matériel et méthodes

Les populations sont maintenues suivant des modalités propres à chaque laboratoire, mais toujours sur tomate.

Les estérases sont extraites à partir d'un, quatre ou dix individus femelles. Ces dernières sont broyées dans des tubes microhématocrites dans 5 µl d'eau distillée contenant 20% de saccharose. Après centrifugation à 9 000 g pendant quinze minutes le surnageant est récupéré en évitant de prendre la couche lipidique.

L'électrophorèse est effectuée sur gel à 7% de polyacrylamide (Maurer, 1971), en plaques de 0,4 mm d'épaisseur, modifiée par le fait que la solution tampon mère est de 1,49 M de Tris, c'est-à-dire 18 g/100 cm<sup>3</sup>. Les estérases sont

colorées par la méthode classique au 1-naphtylacétate (Brewer & Singh, 1970).

## Résultats et discussion

Il existe deux types d'estérases qui se révèlent au 1-naphtylacétate, les plus intensément colorées sont les estérases b; elles hydrolysent également le 2-naphtylacétate. Elles seraient codées par un locus (Bergé & Dalmasso, 1976). Les estérases β sont par contre peu colorées lorsque ce substrat est employé et ne sont pas visibles avec le 2-naphtylacétate. L'utilisation du tampon Tris à faible concentration se traduit par une meilleure résolution des bandes et un déplacement relatif différent de ces dernières. En effet, à forte concentration de Tris, on trouve chez *M. arenaria* deux estérases b à des Ef de 0,36 et 0,38, comme chez *M. javanica*. Dans ce nouveau système, les deux bandes de *M. arenaria* ont des Ef de 0,58 et 0,61, alors que ceux de *M. javanica* sont de 0,59 et 0,62 en plus de l'estérase b à 0,49.

La nomenclature des différentes bandes observées et de leurs Ef est donnée au tableau 1 et à la figure 1.

### ESTÉRISE B

On reconnaît assez clairement les espèces d'après les estérases b, tous les *Meloidogyne* identifiés comme étant *M. incognita* d'après les critères habituels présentent une seule bande b que l'on appellera b 0,49 d'après sa mobilité électrophorétique. De même, les *M. javanica* ont trois bandes identiques, b 0,49 - b 0,59 et b 0,62, la première est plus intensément colorée que les deux autres. La situation de *M. arenaria* est plus complexe, on peut en effet révéler une, deux ou trois bandes, b 0,54 - b 0,58 et 0,61, suivant les populations. Dans cette espèce les bandes b se distribuent en trois phénotypes, b 0,58 ou b 0,58 - b 0,61 ou b 0,54 - b 0,58 - b 0,61. Enfin, b 0,61 est toujours plus visible que b 0,58 ou b 0,54.

On observe donc déjà pour les estérases b une variation intraspécifique chez *M. arenaria*

Tableau I

Caractéristiques morphologiques, biologiques et génétiques des populations de *Meloidogyne* étudiées.Collections : R = Raleigh ; A = Antibes. Nomenclature des espèces : A = *arenaria* ;I = *incognita* ; J = *javanica*. Nomenclature des biotypes suivant Sasser, (1980).*Morphological, biological and genetic characters of some populations of Meloidogyne.*Collections : R = Raleigh ; A = Antibes. Species : A = *arenaria* ; I = *incognita* ; J = *javanica*.*Biotypes according to Sasser (1980).*

Code population	Origine	Collection (1)	Espèce (2)	Biotypes (3)	Caryotype 2n	Phénotype n°
E 139-1	Sénégal	R	Sp	—	—	1
E 82	Nigéria	R	Sp	—	36	1
468	Séville (Espagne)	A	Sp	—	36	2
E 179	Porto Rico	R	Sp	—	> 38	2
E 481	Australie	R	Sp	—	40-42	2
E 428	Portugal	R	Sp	—	36	2
	Calissane (France)	A	I	—	40-43	3
	Prilly (Suisse)	A	I	—	40-43	3
	Isolnita (Roumanie)	A	I	—	40-43	3
	Côte d'Ivoire	A	I	—	40-43	3
	Tabouassant (Maroc)	A	I	—	40-43	3
E 337	Argentine	R	I	3	36	3
E 199	Brésil	R	I	1	42	3
E 139	Sénégal	R	I	1	43	3
E 324	Salvador	R	I	1	42	3
E 237	Equador	R	I	4	45	3
E 140	Sénégal	R	I	1	—	3
E 36	Panama	R	I	1	40-42	3
E 26	Salvador	R	I	3	42-43	3
63	Tennessee (USA)	R	I	4	36-39	3
E 487	Birmanie	R	I	1	36-40	3
E 2	Guadeloupe	R	I	1	42-43	3
E 301	Porto Rico	R	I	2	33-34	4
488	Ga. (USA)	R	I	1	44	4
E 437	Sri Lanka	R	I	4	42-46	5
E 103	Pérou	R	I	4	41-42	6
E 269	Trinidad	R	I	1	44	6
E 116	Thaïlande	R	A	2	36	7
E 16	Corée	R	A	2	38	7
E 574	Chili	R	A	2	40-42	7
E 604	Chili	R	A	2	40-42	7
E 444	Salvador	R	A	2	36	7
E 321	Colombia	R	A	2	37	8
352	Flo. (USA)	R	A	1	54	8
E 482	Australie	R	A	2	54	8
64	N. Carolina (USA)	R	A	2	54	9
E 256	Equador	R	A	2	43-44	10
	Monteux (France)	A	A	—	54	11
E 432	Brésil	R	A	2	43-44	11
E 5	Guadeloupe	R	A	2	53	11
	Le Grau du Roi (France)	A	A	—	54	12
E 195	Colombie	R	A	2	54	13
	Morbio (Suisse)	A	A	—	—	13
	Chateauneuf du Pape (France)	A	A	—	—	13
	Saint Laurent des Arbres (France)	A	A	—	—	13
	Sémentine (Suisse)	A	A	—	—	14
	St Pol de Léon (France)	A	A	—	—	14
E 790	Iran	R	A	2	52	15
E 581	N. Carolina (USA)	R	A	2	50-52	15
E 630	Iran	R	A	2	51-53	15
	Ain Taoujdate (Maroc)	A	A	—	—	16

TABLEAU I (suite)

	Cagnes-sur-Mer (France)	A	A	—	54	16
E 334	Argentine	R	A	2	53-54	16
E 455	Turquie	R	A	2	50-52	16
E 335	Argentine	R	A	2	54	16
E 93	Brésil	R	J	—	42	18
E 121	Brésil	R	H	—	42	18
E 394	Chypre	R	J	—	45-46	18
E 414	Chypre	R	J	—	45-56	18
77-2	N. Carolina (USA)	R	J	—	48	18
E 596	Argentine	R	J	—	46	18
E 419	Rodhésie	R	J	—	44	18
E 213	Philippines	R	J	—	47	18
	Abou Dhabi	A	J	—		18
	Brétigny (France)	A	J	—	45	18
	Cagnes-sur-Mer (France)	A	J	—	45	18
	Le Lude (France)	A	J	—	45	18
	Irak	A	J	—		18
	Oulidia (Maroc)	A	J	—		18
	Rabat (Maroc)	A	J	—	45	18
E 252	Brésil	R	Sp	—	54	19
E 191	Brésil	R	Sp	—	52-54	19
E 189	Brésil	R	Sp	—	53	19
E 192	Suriname	R	Sp	—	54	19
E 662	Inde	R	Sp	—	36	17

qui apparemment n'existe pas chez les deux autres espèces. Onze populations sur les 75 étudiées ne suivent pas ce schéma général, soit parce qu'elles présentent des formes isoestérasiques b non identifiées dans les travaux antérieurs, soit parce qu'une de ces isoestérases s'ajoute à des isoenzymogrammes déjà connus, soit enfin parce qu'il y a dans le même individu deux formes alléliques déjà connues, mais qui jusqu'à maintenant n'avaient pas été trouvées ensembles. Quatre populations qui proviennent d'Espagne, du Portugal, d'Australie et de Porto-Rico, illustrent le premier cas, elles ont b 0,41 - b 0,45 (phénotype 2). Elles sont assez voisines de deux autres populations provenant du Nigéria et du Sénégal qui semblent homozygotes avec un phénotype b 0,45 (phénotype 1). La deuxième exception à la ligne générale est représentée par le phénotype 17 qui appartient à une population provenant d'Inde et qui présente les bandes b 0,45 - b 0,58 - b 0,61.

Toutes ces populations, mis à part celle provenant d'Australie, ont un nombre de chromosomes de  $2n = 36$  ou  $38$  (Triantaphyllou, 1981), mais on trouve également ce nombre de chro-

mosomes dans les populations présentant un phénotype d'isoestérases appartenant aux espèces bien définies. Enfin, le dernier type d'exception est représenté par quatre populations, dont trois proviennent du Brésil et d'un hôte commun, le café. Le phénotype des isoestérases b de ces populations est b 0,61 - b 0,62 (phénotype 17), la première isoestérase a le même Ef qu'une de celles présentes chez *M. arenaria*, tandis que la deuxième a un Ef identique à une isoestérase b de *M. javanica*.

On observe le même phénomène pour une population de l'Inde, mais avec b 0,59 - b 0,62. Ces dernières populations semblent appartenir à des espèces non décrites.

#### ISOESTÉRASES $\beta$

On a pu donner une interprétation génétique des bandes b (Dalmasso & Bergé, 1978 ; Janati, 1979), car on arrive à obtenir les différents phénotypes avec une seule femelle. Il n'en est pas de même pour les isoenzymes  $\beta$  pour lesquelles la situation est moins claire d'autant plus que

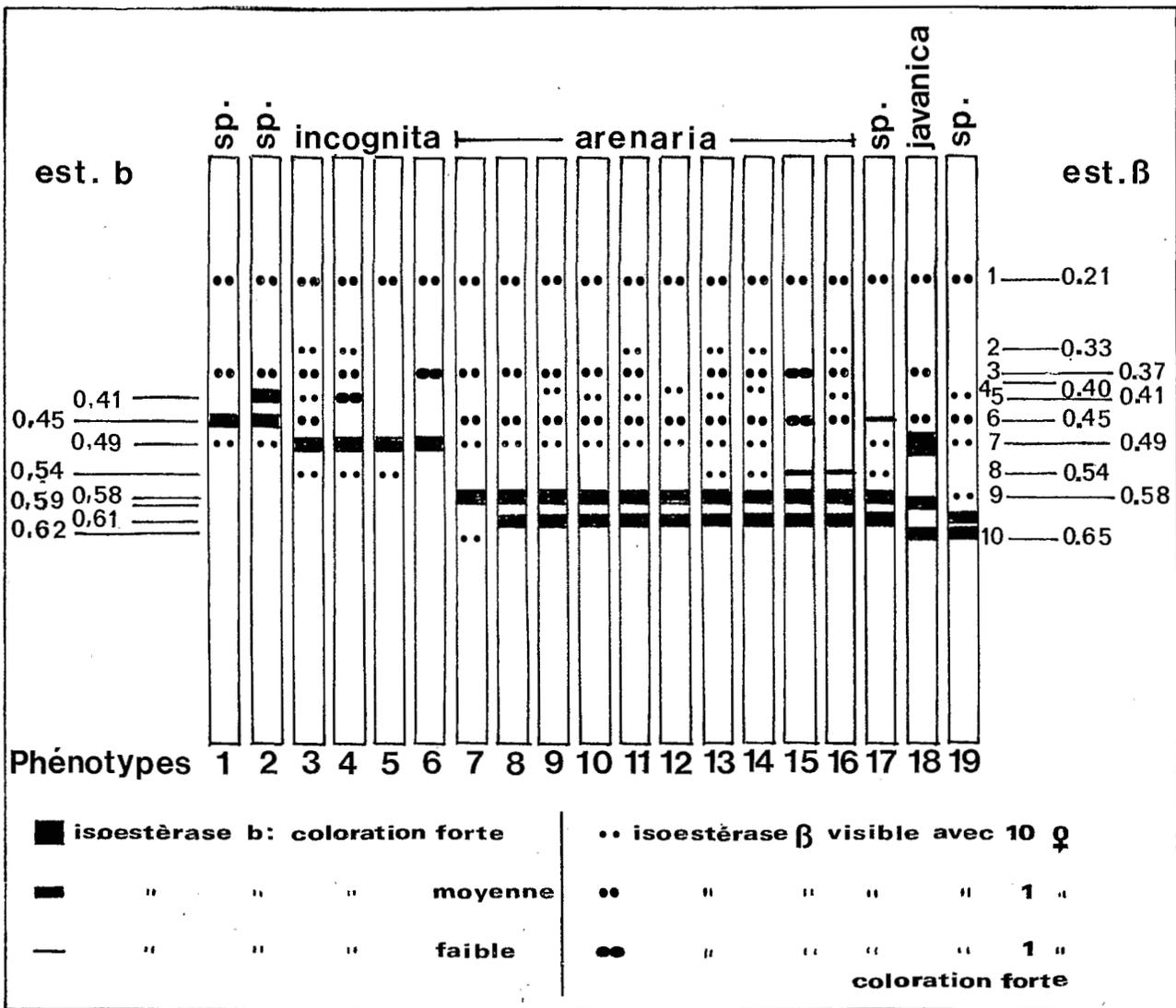


Fig. 1. Représentation schématique des dix-neuf isoestérases, phénotypes de *Meloidogyne*.

*Isoenzymograms representing the nineteen phenotypes observed.*

si certaines d'entre elles sont visibles avec un seul individu ( $\beta_1 - \beta_3$  et  $\beta_6$ ), les autres ne sont révélées qu'avec dix femelles. Qualitativement ceci n'est pas gênant dans la mesure où ces dix individus sont clonés du fait de la reproduction à parthénogenèse mitotique de ces espèces, mais l'interprétation quantitative est plus difficile à faire, car on peut toujours se demander si des bandes non visibles avec dix individus n'auraient pas pu être révélées en utilisant un nombre plus

élevé de femelles. Les différents phénotypes  $\beta$  observés sont récapitulés à la figure 1. Ils sont en fait plus nombreux et diversifiés que les phénotypes b (18 et 9 respectivement). Cette diversité ne se fait pas au hasard et les bandes b et  $\beta$  semblent assez fortement corrélées; ceci implique que les phénotypes  $\beta$  présents chez *M. incognita* ne se retrouvent pas chez *M. javanica* ni chez *M. arenaria*, cependant les bandes  $\beta$  de *M. javanica* se retrouvent dans trois populations

de *M. arenaria*, mais les bandes  $\beta_3$  et  $\beta_6$  de ces dernières sont très colorées et présentent peut-être une accumulation de bandes qui manquent dans ces populations par rapport à d'autres de la même espèce. Cette corrélation entre b et  $\beta$  se retrouve également dans les populations appartenant à des espèces non décrites.

D'autres variations se retrouvent aussi au niveau intraspécifique.

En ce qui concerne  $\beta_1$ , on remarque qu'elle est présente chez tous les individus quelle que soit la population ou l'espèce étudiée (Fig. 1). A l'exception des quatre populations à phénotype 19, associées au café, d'une souche de *M. incognita* et d'une de *M. arenaria*, tous les autres individus possèdent la bande  $\beta_3$ . L'isoestérase  $\beta_6$  est présente dans toutes les populations de *M. arenaria* et *M. javanica*, ainsi que dans 72,2% de celles de *M. incognita*. Trois phénotypes en sont démunis (4, 5 et 6), alors que dans les deux populations possédant le phénotype 4, il semblerait qu'on la retrouve au niveau de la bande  $\beta_5$  qui est plus intense. Enfin, elle est absente dans les phénotypes possédant la bande b 0,45 (1 et 2). De toutes les populations étudiées, une seule ne possède qu'une estérase  $\beta$  révélable avec un seul individu (E 437, provenance Sri Lanka, phénotype 5). Chez *M. arenaria* trois populations (E 790, E 581 et E 630) présentent les bandes  $\beta_3$  et  $\beta_6$ , plus intensément colorées que ces mêmes bandes dans les autres populations (phénotype 15). L'analyse du système  $\beta$  est certainement très incomplète. Dans l'état actuel de la technique il est difficile d'estimer le nombre de loci ou d'allèles qui participent au codage de ces estérases; on ne peut que décrire les phénotypes.

#### DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

Si on ne tient compte que des isoestérases b et  $\beta$  qui apparaissent avec un individu, le nombre de phénotypes totaux est de quatorze pour les 75 populations étudiées et en prenant en considération toutes les isoestérases  $\beta$  on peut différencier dix-neuf phénotypes. Ce nombre, pour plusieurs des espèces étudiées, concerne au moins deux loci, il est relativement faible si on le compare aux 41 phénotypes pour deux loci d'estérases trouvés chez quinze populations

régionales de *Culex pipiens pipiens* (Pasteur & Sinègre, 1975) et aux onze phénotypes pour un locus analysé dans une population d'*Heterodera avenae* (Bergé *et al.*, 1981). Apparemment donc, la diversité génétique chez *Meloidogyne* est très faible, ceci pourrait s'expliquer par une divergence récente des différentes espèces. Entre autre, le monomorphisme absolu de *M. javanica* semble indiquer que ses populations ont été les dernières à s'individualiser et représenteraient donc une espèce relativement récente, par contre la diversité des populations de *M. arenaria*, qui porte à la fois sur les isoestérases b et  $\beta$ , indiquerait que cette espèce est certainement apparue avec *M. incognita* dont le polymorphisme ne porte que sur l'isoestérase  $\beta$ . Si on étudie la fréquence des phénotypes on remarque qu'il y en a qui sont très fréquents (Tab. 2), ainsi chez *M. incognita*, 66,2% des populations sont du phénotype 1 (b 49 -  $\beta_1$  -  $\beta_2$  -  $\beta_3$  -  $\beta_5$  -  $\beta_6$  -  $\beta_8$ ). Chez *M. arenaria* le problème est différent, car si on ne tient compte que des isoestérases  $\beta$  qui se révèlent sur un individu, on s'aperçoit encore ici qu'il existe un phénotype (b 58 - b 61 -  $\beta_1$  -  $\beta_3$  -  $\beta_6$ ) qui est plus fréquent que les autres. Cependant, si on tient compte de toutes les bandes d'isoestérases  $\beta$ , on n'observe pas de différence très élevée dans la fréquence des divers phénotypes et la décroissance des fréquences du phénotype le plus représenté vers le phénotype le plus rare est plus régulière que chez *M. incognita*. Ceci laisse supposer que la diversité génétique est certainement plus élevée chez *M. arenaria* que chez *M. incognita* et si on admet que la vitesse de mutation de ces protéines est identique on en déduit que *M. arenaria* s'est différencié avant *M. incognita*.

#### Conclusion

On peut essayer de faire des corrélations entre les différents caractères étudiés. Comme on peut s'y attendre, les meilleures se rencontrent entre les isoestérases et plus particulièrement les isoestérases b et les caractères morphologiques spécifiques (type de figure périnéale et aspect du caryotype). Par contre il n'y a pas de corrélations évidentes entre caractères biologiques

Tableau 2

Fréquence de chaque phénotype par rapport à l'ensemble des populations ou rapportée à l'espèce

*Phenotype frequency according to the different populations or species*

Phénotypes	% par rapport aux phénotypes totaux	% par rapport aux phénotypes de		
		<i>M. incognita</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>M. javanica</i>
1	2,7			
2	5,3			
3	21,3	66,2		
4	2,7	9,5		
5	1,3	4,8		
6	2,7	9,5		
7	6,7		17,2	
8	4,0		10,3	
9	1,3		3,5	
10	1,3		3,5	
11	4,0		10,3	
12	4,0		3,5	
13	5,3		13,8	
14	2,7		6,9	
15	4,0		10,3	
16	6,7		17,2	
17	1,3		3,5	
18	20,1			100
19	5,3			

(gamme d'hôtes : biotypes au tableau 2), caryotypiques et isoestérases  $\beta$  ou/et b. Ceci se comprend aisément dans la mesure où les systèmes génétiques analysés ne sont pas les mêmes. Ainsi, s'il existe une corrélation entre les phénotypes des isoestérases et les gammes d'hôtes au niveau interspécifique, on n'en observe aucun au niveau intraspécifique.

En bref, si les caractères traditionnels (morphologie, hôtes) permettent de distinguer quelques grands groupes évolutifs, on pourra pousser beaucoup plus loin les caractérisations chez les *Meloidogyne* en utilisant l'identification isoenzymatique. Les analyses du système  $\beta$  ont été réalisées avec plusieurs femelles, ce qui a pu introduire quelques distorsions dans certains résultats. On peut cependant penser parvenir à des résultats sur un individu isolé par des améliorations techniques et déceler ainsi directement la diversité des isoestérases  $\beta$  au sein même des populations naturelles et caractériser des clones.

## RÉFÉRENCES

- BERGÉ J. B. & DALMASSO A. (1976). Variations génétiques associées à un double mode de reproduction parthénogénétique et amphimictique chez le nématode *Meloidogyne hapla*. *C.r. heb. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 282, D : 2087-2090.
- BERGÉ J. B., DALMASSO A., PERSON F., RIVOAL R. & THOMAS D. (1981). Isoestérases chez le nématode *Heterodera avenae*. I. Polymorphisme chez différentes races françaises. *Revue Nématol.*, 4 : 99-105.
- BREWER G. J. & SINGH C. F. (1970). *An introduction to isozyme techniques*. London & New-York, Acad. Press, 186 p.
- DALMASSO A. & BERGÉ J. B. (1978). Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp. : Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. *J. Nematol.*, 10 : 323-332.
- DICKINSON W. J. & SULLIVAN D. T. (1975). *Gene enzyme systems in Drosophila*. Berlin, Springer Verlag, 163 p.
- DICKSON D. W. (1969). The application of disc electrophoresis on studying the taxonomy of species of *Meloidogyne* and other nematode genera. *Ph. D. Thesis, North Carolina State Univ., Raleigh*, 100 p.

- HUSSEY R. S., SASSER J. N. & HUISINGH D. (1972). Disc electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *J. Nematol.*, 4 : 183-189.
- JANATI A. (1979). Contribution à l'étude des estérases chez les *Meloidogyne* (Nematoda, Tylenchida). *Thèse Univ., Montpellier*, 84 p.
- MAURER H. R. (1971). *Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis*. Berlin & New York, W. de Gruyter, 222 p.
- PASTEUR N. & SINEGRE G. (1975). Esterase polymorphism and sensitivity to Dursban organophosphorus insecticide in *Culex pipiens pipiens* populations. *Biochem. Genetics*, 13 : 789-803.
- SASSER J. N. (1980). Root-knot nematodes : A global menace to crop production. *Pl. Dis.*, 64 : 36-41.
- TRIANAPHYLLOU A. C. (1962). Oogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, 7 : 105-113.
- TRIANAPHYLLOU A. C. (1963). Polyploidy and parthenogenesis in the root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. *J. Morphol.*, 113 : 489-499.
- TRIANAPHYLLOU A. C. (1981). Oogenesis and the chromosomes of the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.*, 13 : 95-104.

Accepté pour publication le 28 octobre 1981.