

L'élevage monoxénique d'*Heterodera schachtii* sur crucifères et son application pour la sélection des plantes résistantes

Joachim MÜLLER

Biol. Bundesanstalt, Institut für Nematologie,
Topphaideweg 88, 4400 Münster/Westf., Allemagne (R.F.A.)

RÉSUMÉ

Une méthode d'élevage monoxénique d'*Heterodera schachtii* Schmidt, 1871 sur colza est décrite. Les larves sont désinfectées dans un appareil spécial et introduites dans des boîtes de Petri contenant des racines excisées sur un milieu nutritif gélosé. Quelques centaines de kystes peuvent être produits dans une boîte.

Des hybrides de *Raphanus sativus* sont sélectionnés pour leur résistance à *H. schachtii* dans des conditions aseptiques. Les larves pénètrent non seulement dans les plantules sensibles mais aussi dans les plantules résistantes. Douze jours après l'inoculation, les parties postérieures des mâles et des femelles se trouvent en dehors du tissu cortical et peuvent être distinguées. Par contre, dans les plantules résistantes, il ne se développe que des mâles.

SUMMARY

Monoxenic culture of Heterodera schachtii on cruciferous plants and its application in testing for resistance.

A method is described for the monoxenic culture of *H. schachtii* Schmidt, 1871 on rape. Larvae were extracted from desinfected cysts and are surface sterilized with a special apparatus using 0.02% HgCl₂ for 3 min. They are introduced into plastic Petri dishes containing excised roots of rape on an agar culture medium. Nematode development could be observed directly. Larvae broke through the cortex seven days after inoculation and after ten to twelve days males and females could be distinguished. After 28 days at 25 °C larvae of the second generation appeared. It was possible to produce several hundred cysts per Petri dish.

Using sterile larvae extracted from monoxenic cultures, *Raphanus sativus*-hybrids were tested for resistance under aseptic conditions. Larvae penetrated susceptible seedlings as well as resistant ones. In susceptible host tissue males and females developed and appeared outside the cortex whereas in resistant host tissue production of males was only observed. Twelve days after inoculation resistant seedlings were selected and then grown in a non-sterile medium. The described method permits a rapid testing for resistance, avoiding the disadvantages of pot experiments and allowing direct observation of resistance mechanisms.

Une rotation bien conduite est un des plus importants moyens pour éviter les pertes provoquées par *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871 dans la culture de la betterave sucrière. De cette manière on peut assurer un rendement convenable dans les zones contaminées à condition qu'un plan d'assolement de quatre à cinq ans soit respecté. Cette restriction pourrait être évitée par la culture de variétés de betterave sucrières résistantes à ces nématodes. En cherchant des sources de résistance on a constaté que *H. schachtii* ne se reproduit pas sur *Beta patellaris*, *B. procumbens* et *B. webbiana* (She-

pherd, 1959). Jusqu'à présent il n'a cependant pas été possible d'introduire cette résistance dans les variétés de betterave sucrière cultivée.

Par des cultures dérobées d'espèces appartenant aux crucifères, l'infestation des sols avec *H. schachtii* peut être encore augmentée. Des variétés de *Brassica napus*, *B. campestris*, *Sinapis alba* et *Raphanus sativus* ont été cultivées de plus en plus pendant ces dernières années et ont rendu les problèmes encore plus ardues. Si l'on parvenait toutefois à développer parmi ces crucifères des variétés résistantes à ces nématodes, il serait possible de réduire l'infestation par

H. schachtii plus vite qu'avec un assolement normal. Des premiers succès ont été obtenus au cours d'essais préliminaires (Baukloh, 1976).

Jusqu'à présent on a effectué la sélection des plantes résistantes en plein champ ou en serre, en utilisant comme substrat du sol infesté. Seuls Johnson et Viglierchio (1969) ont testé la résistance de *Beta palellaris*, *B. procumbens* et *B. webbiana* en cultures stériles. Ils ont obtenu le même résultat que Shepherd (1958) qui a fait les essais dans le sol, ce qui montre que la résistance subsiste dans des conditions aseptiques. La sélection en culture stérile a toutefois des avantages, car elle exige très peu de temps et offre la possibilité d'observer le mécanisme de résistance directement. Dans cet exposé l'élevage monoxénique d'*H. schachtii* sur le colza est décrit. En utilisant des larves stériles obtenues à partir de telles cultures, diverses espèces de crucifères peuvent être testées dans des conditions aseptiques pour leur résistance à *H. schachtii*.

Matériels et méthodes

CULTURE ASEPTIQUE DES RACINES DE COLZA

En plein champ on a constaté une forte multiplication d' *H. schachtii* sur le colza (Talatshian, 1974). C'est pourquoi notre choix s'est porté sur cette très bonne plante hôte pour l'élevage monoxénique d'*H. schachtii*. Des graines de colza (*Brassica napus* « Diamant ») ont été désinfectées pendant une heure dans du sulfate de streptomycine à 1 %, puis pendant 20 minutes dans du chlorure mercurique à 0,2 %, puis rincées plusieurs fois dans de l'eau stérile avant d'être placées sur un milieu gélosé non nutritif à 0,6 %. A une température de 20 °C les plantules ont été, après 4 jours, assez longues pour être coupées au collet. Les racines ainsi séparées de la plante ont été transférées dans des boîtes de Petri, à raison de 5 à 10 par boîte, sur le milieu employé par Dropkin et Boone (1966) pour la culture aseptique des racines de tomates. Après 2 à 3 autres jours ces racines avaient développé des radicelles et étaient infestées avec des larves stériles d'*H. schachtii*.

INOCULATIONS STÉRILES

Des kystes d'*H. schachtii* collectés à la main un à un étaient désinfectés pendant 5 minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium et rincés dans de l'eau stérile. Pour faire éclore les larves, les kystes ont été mis dans un entonnoir (Fig. 1). Les larves écloses étaient désinfectées entre deux filtres dans un appareil qui a déjà été décrit et qui avait également donné de bons résultats pour la désinfection de *Pratylenchus* spp. et de *Meloidogyne* spp. (Müller, 1970). L'application de chlorure de mercure à 0,02 % pendant 3 minutes s'est montrée efficace pour la désinfection d'*H. schachtii*. Les larves désinfectées pouvaient être introduites directement de l'appareil dans les boîtes de Petri.

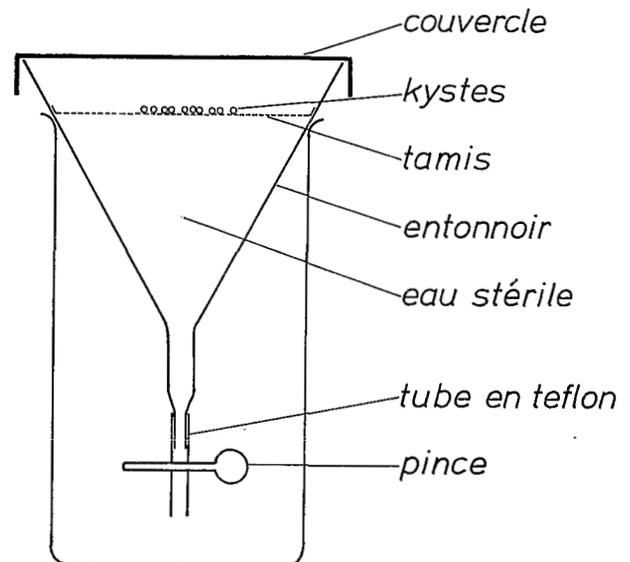


Fig. 1 : Entonnoir pour l'extraction des larves stériles
Funnel for the extraction of sterile larvae.

La désinfection des larves n'est nécessaire qu'une seule fois pour l'aménagement des cultures. Pour l'inoculation des cultures suivantes des kystes provenant d'un élevage monoxénique sont mis dans un entonnoir stérile (Fig. 1). Les larves qui viennent d'éclore peuvent être enlevées chaque jour et inoculées aux racines excisées. Il n'est pas nécessaire d'ajouter des racines d'une plante hôte ni des substances favorisant l'éclosion des larves.

SÉLECTION DES CRUCIFÈRES RÉSISTANTES

La multiplication d'*H. schachtii* a été observée sur diverses variétés et hybrides de *Raphanus sativus*. Les graines ont été désinfectées comme décrit pour le colza, mises à germer en boîte de Petri sur gélose à 0,6% non nutritive, et ensuite transférées sur un milieu nutritif de Dropkin et Boone (1966) à raison d'une plantule par boîte. Après 2 jours 100 larves ont été introduites par boîte et les cultures étaient maintenues à 25 °C sous éclairage. La pénétration ainsi que le développement des larves étaient observés chaque jour. Pour l'interprétation définitive on a déterminé douze jours après l'inoculation les nombres de mâles et de femelles par plantule. Il est possible ensuite de continuer à cultiver des plantes résistantes en condition non stérile.

Résultats.

ELEVAGE MONOXÉNIQUE SUR LE COLZA

Pénétration des larves

Le pouvoir des larves de gagner les racines et d'y pénétrer est influencé par l'âge du milieu gélosé. Un milieu qui vient d'être coulé n'absorbe pas la gouttelette infestante. Dans ce cas, les nématodes éprouvent une grande difficulté à s'en dégager pour gagner l'hôte et ils périssent avant que l'eau se soit évaporée; par contre, les larves introduites cinq à sept jours après la préparation du milieu atteignent les racines en quelques heures. La plupart des animaux envahissent la racine dans sa partie distale. Beaucoup de larves pénètrent toutefois à quelque distance de l'apex et même dans l'hypocotyle et peuvent s'y développer jusqu'au stade femelle. La phase active de la pénétration ne durait que 10 à 15 minutes. Quelques larves ne pénétraient qu'à demi, la partie postérieure restant hors de la racine (Fig. 2,A).

Développement des nématodes et réaction des tissus végétaux

Pendant les deux premiers jours, les larves ont montré peu de changement; la réaction de la racine était, par contre, très nette. Après la pénétration de plusieurs larves l'apex présentait une faible hypertrophie, produisait des poils

absorbants très longs et s'arrêtait de croître (Fig. 2c). Sept jours plus tard, à 25 °C, les larves avaient augmenté de volume et la partie postérieure se trouvait en dehors de la racine (Fig. 2d). Après 10 jours des mâles étaient nettement visibles dans la cuticule du stade précédent (Fig. 2e). Après 13 jours on pouvait observer de jeunes femelles fécondées. Les larves de la génération suivante se trouvaient après 28 jours dans les kystes encore blancs. On a pu produire plus que 500 kystes dans une boîte de Petri.

SÉLECTION DES CRUCIFÈRES RÉSISTANTES

Dropkin et Webb (1967) décrivent trois particularités qui caractérisent les racines de tomates résistantes attaquées par *Meloidogyne* spp. : 1. nécroses; 2. absence des galles; 3. pénétration réduite des larves. Les *Heterodera* n'induisant généralement pas de galles, les différences entre racines sensibles et résistantes ne peuvent porter que sur la formation des nécroses et l'intensité de la pénétration.

Les plantules d'hybrides de *Raphanus sativus* examinées produisaient de faibles nécroses après l'attaque par les larves. Toutefois, des réactions semblables étaient également observées dans des racines de variétés sensibles de colza; par conséquent, ce symptôme est sans valeur pour l'évaluation de la résistance. On n'a pas constaté non plus de différences en ce qui concerne le nombre des larves ayant pénétré dans les crucifères examinées. Il n'est donc pas possible de caractériser des plantes résistantes à *H. schachtii* aussi rapidement qu'avec des racines de tomates résistantes attaquées par *Meloidogyne incognita*. C'est pourquoi il faut déterminer l'aptitude d'une plante comme hôte pour *H. schachtii* par le développement du nématode même. Etant donné qu'à 25 °C les larves augmentent tellement de volume qu'elles se trouvent après sept jours partiellement en dehors du tissu cortical, il est possible d'observer directement leur développement. Après 10 à 12 jours mâles et femelles peuvent être facilement distingués. On s'aperçoit que dans des racines résistantes, le développement des femelles est très faible ou nul tandis que le nombre de mâles peut être très élevé. Ce critère permet une séparation des plantes résistantes et sensibles après douze jours au maximum.

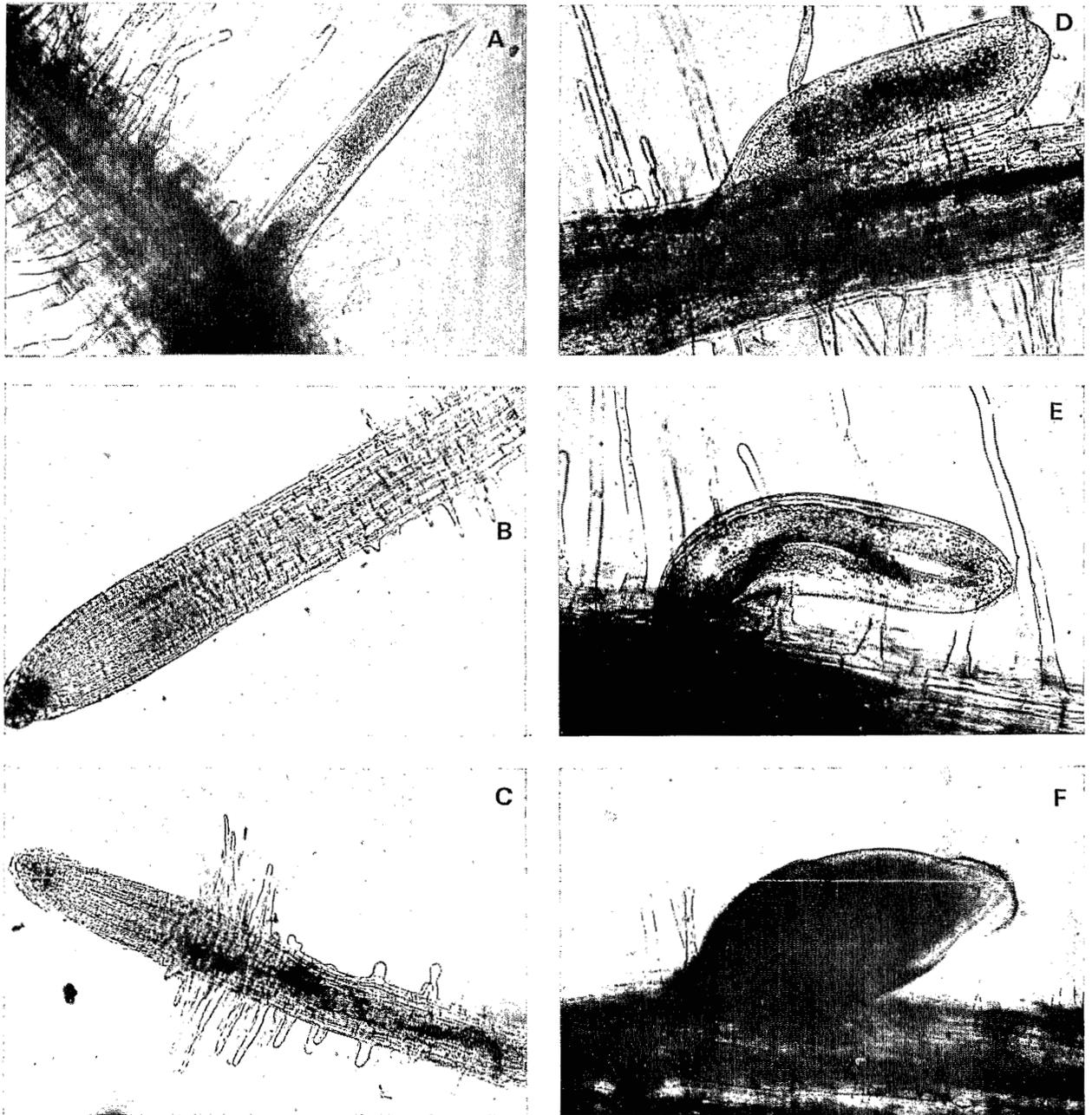


Fig. 2. A : Larve n'ayant pénétré que partiellement quatre jours après l'inoculation ; B : Apex normal d'une racine de colza ; C : Apex parasité par *H. schachtii* un jour après l'inoculation ; D : Développement d'*H. schachtii* sept jours après l'inoculation ; E : Mâle d'*H. schachtii* dix jours après l'inoculation ; F : Femelles d'*H. schachtii* dix jours après l'inoculation.

A : Partially penetrated larva four days after inoculation ; B : Normal root tip of a rape root ; C : Root tip parasitized by *H. schachtii* one day after inoculation ; D : Development of *H. schachtii* seven days after inoculation ; E : Male of *H. schachtii* ten days after inoculation ; F : Female of *H. schachtii* ten days after inoculation.

Discussion.

Jusqu'à présent l'élevage monoxénique d'*H. schachtii* n'a été décrit que sur la betterave sucrière. Moriarty (1964) s'est servi d'un milieu liquide tandis que Polychronopoulos et Lownsbery (1968) ont cultivé des plantules de betterave en sol stérile. Dans les deux cas une observation directe des nématodes n'est pas possible. Seuls Johnson et Viglierchio (1969) ont élevé *H. schachtii* sur un milieu stérile gélosé et ils ont fait des observations très étendues sur le développement du nématode dans différentes conditions. La culture des racines de betterave demandait un milieu assez compliqué. Le colza, utilisé comme plante hôte dans nos essais, proliférait très bien sur le milieu de Dropkin et Boone (1966) même après sa stérilisation à la chaleur. Il se développait même régulièrement une deuxième génération du nématode, qui permettait d'obtenir quelques centaines de kystes dans une boîte de Petri. Les cultures pouvaient être gardées à 10 °C durant des mois et ainsi il y avait toujours un stock de nématodes stériles.

Shepherd (1959) considère une plante comme résistante, si son tissu ne permet pas un développement des femelles ou si l'on trouve seulement très peu de kystes. Johnson et Viglierchio (1969) rapportent que dans les betteraves sauvages *Beta patellaris*, *B. procumbens* et *B. webbiana*, qu'on considère comme résistantes, les larves qui ont pénétré ne meurent pas tout de suite. Beaucoup de larves atteignent le troisième stade et une partie se développe en mâles. La résistance à *H. schachtii* n'est donc pas un caractère absolu. Pour la sélection il faut choisir aussi des plantes qui portent peu de kystes parce que des plantes complètement libres de nématodes sont très rares. Il faut se demander toutefois combien de kystes peuvent être tolérés sur une plante résistante. Baukloh (1976) accepte deux kystes comme limite tandis que Shepherd (1959) considère une plante avec 10 kystes comme encore résistante. Pour fixer cette marge il est nécessaire de tenir compte de nombreux facteurs, comme par exemple la quantité d'inoculum, l'inoculation à partir de kystes ou de larves, la quantité et la qualité du substrat utilisé. La saison elle-même peut influencer sur le résultat et est une des

causes de variation du nombre de kystes obtenus dans un essai en pots (Shepherd, 1958). Cette variation est encore augmentée par des erreurs techniques qui se produisent pendant l'extraction des kystes. C'est pourquoi une plante classée comme résistante peut se révéler sensible dans d'autres conditions d'essai.

Ces inconvénients dus aux méthodes peuvent être évités si le test de résistance est effectué dans des conditions d'asepsie. La qualité de la suspension de larves introduite est constante, la quantité peut en être dosée précisément, le substrat et les conditions culturales peuvent être reproduits en toutes saisons. L'évaluation ne demande que peu de temps et, par suite du comptage direct, la variation due aux erreurs techniques est faible. De plus, le résultat de l'essai peut être obtenu après deux semaines tandis qu'il faut attendre environ neuf semaines pour l'obtenir dans un essai en pots (Baukloh, 1976). Une évaluation plus rapide comme dans le cas de la sélection de tomates résistantes à *Meloidogyne* spp. ne semble pas possible pour *H. schachtii*. Selon Shepherd (1959) des plantes résistantes sont toujours pénétrées par des larves. Nous n'avons constaté aucune réaction d'hypersensibilité. Talatschian (1974) n'a pas trouvé non plus de différences essentielles entre la pénétration dans le colza et dans une variété de *Raphanus sativus*. C'est pourquoi l'évaluation d'un essai ne peut être effectué avant qu'il soit possible de distinguer les mâles et les femelles. C'est le cas environ douze jours après l'inoculation.

Baukloh (1976) pense, à cause des résultats de ses hybridations, que la résistance de *Raphanus sativus* est transmise par un gène dominant. De ce fait, il pourrait être possible, comme avec le nématode doré de la pomme de terre, que cette résistance verticale soit sans valeur après la multiplication des pathotypes qui brisent la résistance. Cependant un plan d'assolement dans lequel des crucifères résistantes comme culture dérobée alterneraient avec la betterave sucrière sensible, diminuerait ce danger. Il y a donc une bonne chance de réduire l'infestation des sols par la culture des crucifères résistantes et de maintenir leur résistance verticale par une rotation avec la betterave sucrière.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie M. Lein, Kleinwanzlebener Saatzucht A. G., qui a mis à sa disposition des graines de *Raphanus sativus*.

RÉFÉRENCES

- BAUKLOH, H. (1976). Untersuchung zur Wirtspflanzeneignung der Kruziferen gegenüber dem Rüben-nematoden, *Heterodera schachtii* (Schmidt), unter besonderer Berücksichtigung der Resistenzzüchtung. *Dissert., Georg-August-Universität zu Göttingen*, 72 pp.
- DROPKIN, H. V. & BOONE, W. R. (1966). Analysis of host-parasite relationships of root-knot nematodes by single larvae inoculations of excised tomato roots. *Nematologica*, 12 : 225-236.
- DROPKIN, H. V. & WEBB, R. E. (1967). Resistance of axenic tomato seedlings to *Meloidogyne incognita acrita* and to *M. hapla*. *Phytopathology*, 57 : 584-587.
- JOHNSON, R. N. & VIGLIERCHIO, D. R. (1969). Sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*) reared on axenic *Beta vulgaris* root explants. I. Selected environmental factors affecting penetration. *Nematologica*, 15 : 129-143.
- MORIARTY, F. (1964). The monoxenic culture of beet eelworm (*Heterodera schachtii* Schm.) on excised roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Parasitology*, 54 : 289-293.
- MÜLLER, J. (1970). Ein einfaches Verfahren zur Oberflächensterilisierung von Nematoden. *Nematologica*, 16 : 154-155.
- POLYCHRONOPOULOS, A. G. & LOWNSBERY, B. F. (1968). Effect of *Heterodera schachtii* on sugar beet seedlings under monoxenic conditions. *Nematologica*, 14 : 526-534.
- SHEPHERD, A. M. (1958). Experimental methods in testing for resistance to beet eelworm, *Heterodera schachtii* Schmidt. *Nematologica*, 3 : 127-135.
- SHEPHERD, A. M. (1959). The invasion and development of some species of *Heterodera* in plants of different host status. *Nematologica*, 4 : 253-267.
- TALATSCHIAN, P. (1974). Wirtspflanzeneignung verschiedener Stoppelfrüchte für phytoparasitäre Nematoden unter besonderer Berücksichtigung von *Heterodera schachtii*. *Dissert., Justus Liebig-Universität Giessen*, 84 pp.

Accepté pour publication le 5 Août 1977.