

REFERENCES

- BROWN, R. R. & KERRY, B. R. (1986). *Principles and practice of nematode control in crops*. Sydney, Academic Press, XIV + 447 p.
- DRECHSLER, C. (1937). Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia*, 29 : 447-552.
- DRECHSLER, C. (1941). Predaceous fungi. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 16 : 265-290.
- ESSER, R. P. (1983). *Monacrosporium lysipagum* infecting egg masses of *Meloidogyne acrita*. *J. Nematol.*, 11 : 282-288.
- DE GUIRAN, G. (1967). Coloration des nématodes dans les tissus végétaux par le bleu coton à froid. *Nematologica*, 12 : 646-647.

Accepté pour publication le 23 mars 1990.

DISCRIMINATION ENTRE *HETERODERA CAROTAE* ET *H. CRUCIFERAE* PAR L'ÉLECTROPHORÈSE (SDS PAGE) DE PROTÉINES SOLUBLES EXTRAITES À PARTIR DE KYSTES INDIVIDUALISÉS

Michel Bossis

INRA, Laboratoire de Recherches de la Chaire de Zoologie, B.P. 29, 35650 Le Rheu, France.

En culture légumière de plein champ, les infestations simultanées par plusieurs espèces de nématodes phytoparasites, sont fréquentes. Ainsi, dans les régions productrices de carottes où diverses crucifères entrent dans la rotation culturale, les sols peuvent être infestés par des kystes de *Heterodera carotae* Jones, 1950 et de *H. cruciferae* Franklin, 1945 en mélange. La reconnaissance spécifique est alors très difficile. Outre l'utilisation de tests biologiques qui permettent de déceler les parasites sur les racines de leur plante hôte respective (technique longue à mettre en œuvre), l'identification peut se faire par la morphométrie des juvéniles (Wouts & Weischer, 1977), mais les critères pris en compte, notamment la mesure de la partie hyaline de la queue, présentent des variations intraspécifiques importantes et les recouvrements interspécifiques sont possibles. De plus cela représente un travail particulièrement long. Pour pallier ces difficultés, une technique plus discriminante a été recherchée. Parmi les techniques biochimiques utilisables en taxonomie (Hussey, 1979), l'électrophorèse s'est avérée être un outil performant (Bergé & Dalmaso, 1985). L'électrophorèse de protéines dénaturées provenant de kystes individualisés a été utilisée.

Matériel et méthode

Différentes populations françaises (cinq pour *H. carotae* et quatre pour *H. cruciferae*) sont élevées en chambre climatisée à 20-22 °C, sur leur plante hôte respective : *Daucus carota* cv. Nandor pour *H. carotae* et *Brassica oleracea* cv. Brutor pour *H. cruciferae*.

Après lavage à l'eau distillée, le kyste est placé dans un tube de 1,1 mm de diamètre contenant une solution

de Tris HCl à 0,01Ml⁻¹ (PH 7.4) et de Chaps à 20 gl⁻¹. Après broyage et centrifugation à 5 000 g pendant 3 min, on ajoute 5 µl d'une solution de dithioérytritol à 0,15Ml⁻¹ et de SDS à 100 gl⁻¹ et on centrifuge à 10 000 g pendant 10 min. Les protéines sont alors dénaturées par trempage des tubes au bain-marie à 100 °C pendant 5 min. Avant utilisation, le surnageant est mélangé à 10 µl d'une solution de saccharose à 200 gl⁻¹.

La technique électrophorétique employée est celle de Laemmli (1970), avec gel de concentration à 4 % et de séparation à 12,5 %, d'une épaisseur de 0,5 mm. La migration est contrôlée par le déplacement du bleu de bromophénol.

La coloration au nitrate d'argent est réalisée selon la technique décrite par Heukeshoven et Dernick (1985) et modifiée par Damerval *et al.* (1987). Le Rf des bandes discriminantes est calculé par rapport à la migration du bleu de bromophénol.

Résultats

Au niveau intraspécifique, on ne décèle pas de différences discriminantes au sein des populations.

Au niveau interspécifique, quatre différences principales permettent l'identification aisée de chaque espèce (Fig. 1). On note une bande de Rf : 0,40, assez ténue, présente chez *H. carotae* et absente chez *H. cruciferae*. Une deuxième différence facile à repérer existe pour la bande de Rf : 0,46 qui est présente pour chacune des espèces, mais de forte intensité pour *H. carotae* alors qu'elle est faible pour *H. cruciferae*. Inversement, la bande Rf : 0,49 est plus intense chez *H. cruciferae* que

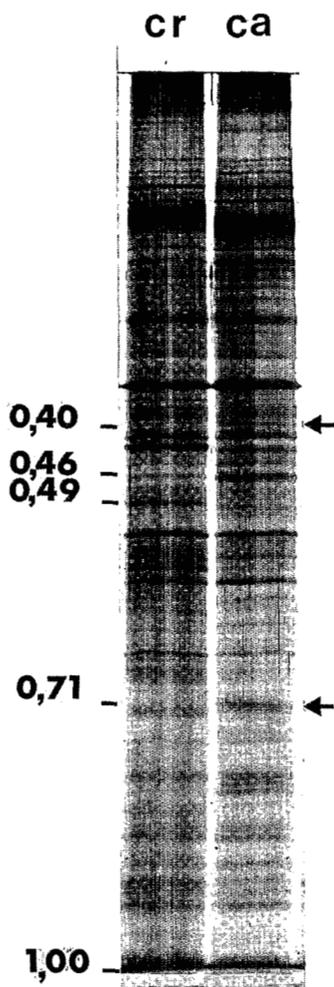


Fig. 1. Électrophoréogrammes de protéines dénaturées provenant de kystes individualisés (cr = *Heterodera cruciferae*; ca = *Heterodera carotae*).

chez *H. carotae*. Enfin, une autre bande de Rf : 0,71 est spécifique de *H. carotae*. D'autres différences mineures existent, tant au niveau des Rf qu'au niveau de l'intensité de certaines bandes, mais elles sont si ténues qu'elles ne pourraient réellement être estimées que sur des migrations plus longues et ne semblent pas présenter d'intérêt supplémentaire pour la discrimination des deux espèces.

Sur 482 kystes broyés individuellement, 466 ont donné des protéinogrammes suffisamment riches pour que l'identification de l'espèce soit possible sans la moindre ambiguïté, soit une efficacité de 96,7 %.

Discussion

En utilisant des protéines natives et la coloration au naphthalène black, Trudgill et Carpenter (1971) ne

décelaient que quinze bandes pour des kystes de *H. carotae* et une vingtaine au total pour les différentes espèces analysées, ce qui est insuffisant pour pouvoir séparer électrophorétiquement ces deux espèces. Les résultats de Greet et Firth (1977) et ceux de Franco (1979) sont de même nature. Avec une technique SDS PAGE et une coloration au bleu de Coomassie, il est possible de détecter jusqu'à 47 bandes pour *H. schachtii* (Pozdol & Noel, 1984). L'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS PAGE) avec coloration au nitrate d'argent, qui est utilisée ici, est encore plus discriminante puisqu'elle permet d'obtenir plus de 60 bandes nettes, dont au moins quatre peuvent servir à l'identification spécifique de *H. carotae* et *H. cruciferae*. L'emploi de cette technique de coloration au nitrate d'argent donne des nuances de couleur qui facilitent le repérage des bandes de même nature. Pour une grande partie du gel, les bandes sont nettes; toutefois la concentration des molécules les plus petites se fait assez mal dans la zone inférieure.

L'intérêt de la technique proposée réside dans la possibilité d'établir des échantillons de protéines suffisamment concentrés directement à partir d'un kyste individualisé. Certes, elle est beaucoup moins performante que la technique bidimensionnelle (Ohms & Heinicke, 1985), appliquée également à l'analyse d'un seul kyste, mais elle est nettement plus simple à mettre en œuvre. On pourra l'utiliser en complément d'une analyse de sol pour laquelle, après extraction et tri des kystes, des électrophoréogrammes individuels peuvent permettre de déterminer s'il y a mélange des deux espèces et, dans l'affirmative, d'estimer le pourcentage de chacune des deux. En cas d'infestation très légère d'une des deux espèces, et selon la précision recherchée, la taille de l'échantillon devra être définie par la consultation d'un abaque de la loi binômiale qui donnera le nombre de kystes individualisés qu'il conviendra d'analyser.

Bien que des différences existent entre les populations de *H. carotae*, notamment dans leur aptitude à provoquer l'apparition de racines secondaires (Bossis & Mugniéry, 1987), la discrimination de variations protéiques entre celles-ci n'est pas possible par cette technique. Ces observations sont semblables à celles de Bakker *et al.* (1988) qui n'ont pas décelé de variations intraspécifiques par une technique SDS PAGE assez similaire, mais qui soulignent le fait que cette technique est mieux reproductible que l'électrophorèse de protéines natives.

Bien entendu, la qualité du protéinogramme dépend du contenu en larves du kyste et l'analyse est impossible lorsque celui-ci est presque vide; c'est là une limite de la technique qui ne permettra pas de déceler des populations très faibles présentes dans des kystes ne contenant plus que quelques larves viables.

REFERENCES

- BAKKER, J., SCHOTS, A., BOUWMAN-SMITS, L. & GOMMERS, F. J. (1988). Species specific and thermostable proteins from second stage larvae of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Phytopathology*, 78 : 300-305.
- BERGÉ, J. B. & DALMASSO, A. (1985). Possibilités et limites de l'utilisation de la variabilité protéique dans la détermination des espèces et races de nématodes à kystes. *Bull. OEPP*, 15 : 151-154.
- BOSSIS, M. & MUGNIÉRY, D. (1987). Variabilité intraspécifique chez *Heterodera carotae* pour l'aptitude à provoquer l'émission de racines secondaires de carottes. *Nematologica*, 33 : 322-327.
- DAMERVAL, C., LE GUILLOU, M., BLAISONNEAU, J. & DE VIENNE, D. (1987). A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. *Electrophoresis*, 8 : 158-159.
- FRANCO, J. (1979). Disc electrophoresis of female proteins of british and peruvian potato cyst-nematode populations, *Globodera* spp. *Nematologica*, 25 : 32-35.
- GREET, D. & FIRTH (1977). Influence of host plant on electrophoretic protein patterns of some round-cyst nematode females and use of larvae to obtain less ambiguous results. *Nematologica*, 23 : 411-415.
- HEUKESHOVEN, J. & DERNICK, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6 : 103-112.
- HUSSEY, R. (1979). Biochemical systematics of nematodes. A review. *Helminth. Abstr. Ser. B*, 48 : 141-148.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.
- OHMS, J. P. & HEINICKE, D. H. (1985). Pathotypen des Kartoffelnematoden. II. Bestimmung der Rassen von *Globodera rostochiensis* durch die Mikro-2D-Electrophorese von Einzelzysten. *Z. Pfl Krankh. Pfl Schutz*, 92 : 225-323.
- POZDOL, R. F. & NOËL, G. R. (1984). Comparative electrophoretic analyses of soluble proteins from *Heterodera glycines* races 1-4 and three other *Heterodera* species. *J. Nematol.*, 16 : 332-340.
- TRUDGILL, D. L. & CARPENTER, J. M. (1971). Disk electrophoresis of proteins of *Heterodera* species and pathotypes of *Heterodera rostochiensis*. *Ann. appl. Biol.*, 69 : 35-41.
- WOUTS, W. M. & WEISCHER, B. (1977). Eine Klassifizierung von fünfzehn in Westeuropa häufigen Arten der Heteroderinae auf Grund von Larvenmerkmalen. *Nematologica*, 23 : 289-310.

Accepté pour publication le 22 mai 1990.