

# Étude de l'action des champignons prédateurs sur divers nématodes du sol en microscopie électronique à balayage\* (SEM)

Mohamed Mouldi B'CHIR

*I.N.A.T, 43 avenue Charles-Nicolle, Tunis, Tunisie.*

## RÉSUMÉ

Les mécanismes de piégeage et les organes de reproduction ont été étudiés, en microscopie électronique à balayage, chez quatre espèces de champignons prédateurs : *Arthrobotrys irregularis*, *A. oviformis*, *Candelabrella musiformis* et *Dactylaria candida*. Les proies étaient constituées par divers nématodes du sol : *Meloidogyne* sp., *Globodera rostochiensis*, *Aphelenchus avenae* et divers rhabditides. Les résultats de ces observations et les perspectives d'utilisation de ces champignons sont discutés.

## SUMMARY

### *Scanning electron micrographs of interactions between predatory fungi and soil nematodes*

Scanning electron microscopy has been used to visualize the trapping mechanisms and reproductive organs of four species of nematode trapping fungi : *Arthrobotrys irregularis*, *A. oviformis*, *Candelabrella musiformis* and *Dactylaria candida* with several soil nematodes : *Meloidogyne* sp, *Globodera rostochiensis*, *Aphelenchus avenae*, and *Rhabditoidea* spp. The results obtained, and the future prospects for using these fungi to control nematodes is discussed.

La plupart des sols tunisiens mis en culture sous abris plastiques sont encore en équilibre biologique et il doit être possible de maintenir cet équilibre en introduisant des champignons prédateurs de nématodes dans les sols infestés par les *Meloidogyne*. Pour connaître avec plus de précision le comportement de ces champignons, leurs mécanismes de piégeage et leurs organes de reproduction ont été étudiés, chez quatre espèces, en microscopie électronique à balayage.

L'introduction de la microscopie électronique à balayage pour l'étude de la morphologie des nématodes revient à Green (1967). Cette technique fût largement utilisée par la suite par plusieurs auteurs dont De Grisse (1977), Clark et Stone (1975), B'Chir (1979 a, b) et Corbett et Clark (1982). La microscopie électronique à balayage a été aussi utilisée pour l'étude des champignons prédateurs par Courtesy et Nordbring-Hertz (1972) et Estey et Tzean (1976).

L'étude des mécanismes de piégeage de ces champignons en microscopie électronique à balayage constitue l'objet de cet article.

## Matériel et méthodes

Les quatre espèces de champignons étudiées sont des hyphomycètes prédateurs provenant de la station de recherches sur les nématodes d'Antibes. Il s'agit de *Arthrobotrys irregularis* (commercialisé en France par les laboratoires Royal Champignon sous le nom de "Royal 350") *A. oviformis*, *Dactylaria candida* et *Candelabrella musiformis*.

Ces souches de champignons sont élevées en milieu stérile sur gélose à 5% dans lequel on introduit diverses populations de nématodes (larves de *Meloidogyne*, femelles d'*Aphelenchus avenae*, divers Rhabditides et kystes de *Globodera*). Les organes de capture se forment 48 heures après l'introduction des nématodes et le piégeage commence aussitôt.

On prélève les nématodes piégés, et on les place dans l'eau sur les petits tamis démontables décrits par De Grisse (1973). Ces tamis sont alors plongés, pendant une heure, dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans une solution tampon, pendant 12 heures, à 4° ; les nématodes sont ensuite fixés pen-

\* Cet article a été présenté au XVI<sup>e</sup> Symposium international de la Société Européenne des Nématologistes, St Andrews, Ecosse, août 1982.

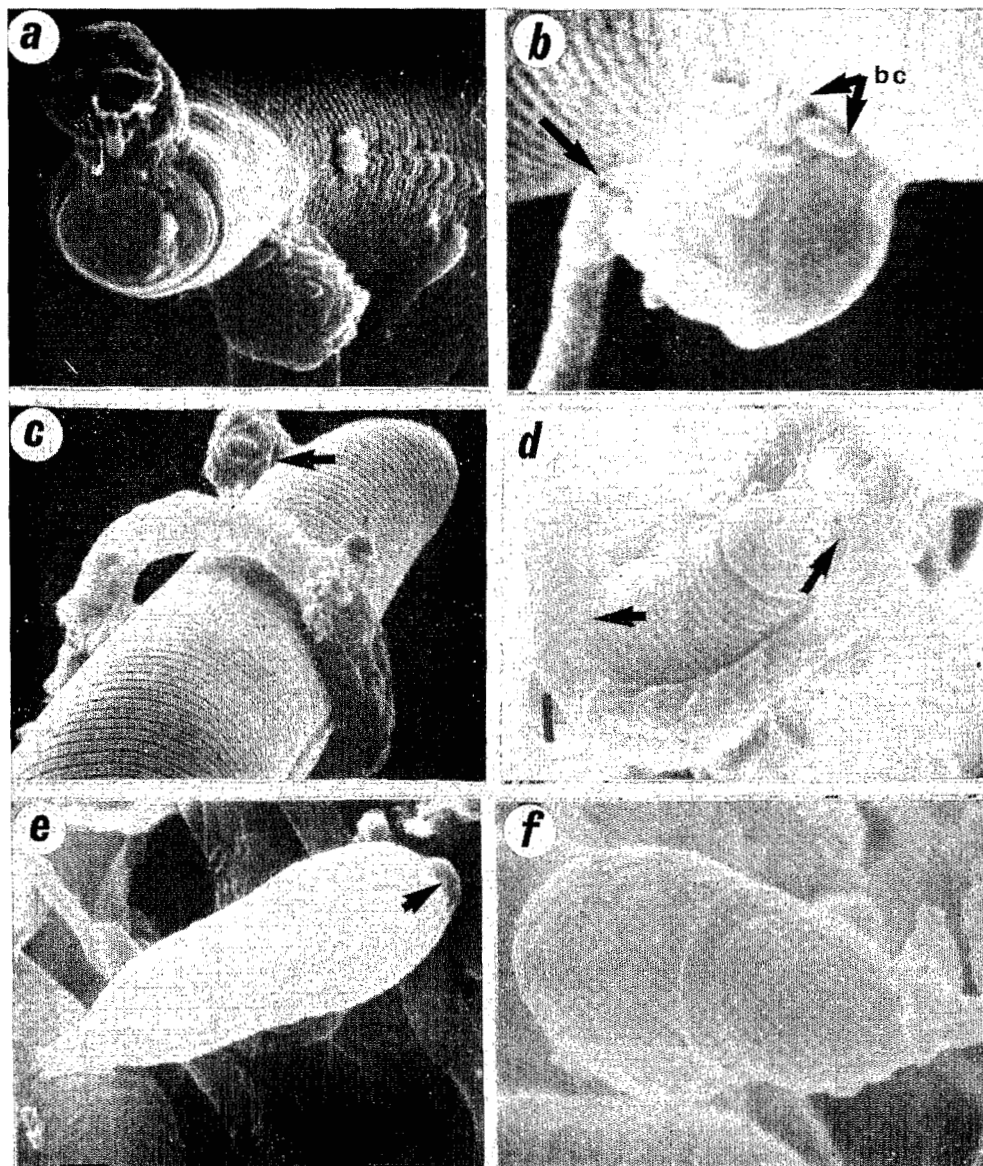


Fig. 1. a : Vue apicale d'une larve de *Meloidogyne* capturée par deux boutons adhésifs.  $\times 4\ 460$ . (*D. candida*); b : Détail de (a) notez la fragilité du pédoncule, qui se casse facilement (flèche) ; ce piège capture aussi les bactéries (bc),  $\times 8\ 340$  ; c : Larve de *Meloidogyne* capturée par un anneau non constricteur et un bouton adhésif (flèche) détachés du mycelium,  $\times 4\ 050$  (*D. candida*); d : Larve de *Meloidogyne* venant d'être capturée par un anneau non constricteur, celui-ci est collé à la proie en deux points (flèches)  $\times 4\ 580$  (*D. candida*); e : Conidie monocellulaire de *D. candida* avec une expansion caractéristique au niveau de l'apex (flèche)  $\times 4\ 140$  ; f : Conidie bicellulaire de *A. irregularis*  $\times 2\ 580$ .

a : "Head on" view of *Meloidogyne* larvae caught by two adhesive knobs,  $4\ 460 \times$ , (*D. candida*); b : Detail of (a) note slender support stalk and delicate connection between stalk and knob (arrow) bacteria are also caught (bc),  $8\ 340 \times$ ; c : Anterior end of *Meloidogyne* larvae caught by both detached non constricting ring and knob (arrow),  $4\ 050 \times$ , (*D. candida*); d : Recently captured *Meloidogyne* larva by a non-constricting ring. Prey head is held at two points (arrows),  $4\ 580 \times$ , (*D. candida*); e : One-celled conidia of *D. candida*. Apex's expansion characterize this conidium (arrow),  $4\ 140 \times$ ; f : Two celled conidium of *A. irregularis*,  $2\ 580 \times$ .

dant une heure dans un mélange d'acide osmique à 1% et d'une solution saturée de chlorure de mercure dans l'eau (six volumes d'eau pour un volume de chlorure de mercure).

Les spécimens fixés sont deshydratés dans un dessiccateur à acétone selon la technique de Sitte (1962) et ensuite par un passage par le point critique avec du CO<sub>2</sub> liquide suivant la technique de Sayre et Wergin (1979). Les nématodes ainsi traités sont collés à sec sur un support et métallisés avec de l'or avant d'être étudiés avec un microscope électronique à balayage « Cambridge », type 96113-2 A.

## Résultats

### MÉCANISMES DE CAPTURE

Les quatre espèces d'hyphomycètes prédateurs étudiées possèdent des systèmes de capture différents :

*Dactylaria candida* présente essentiellement deux systèmes : des boutons adhésifs (Fig. 1a, b) et des anneaux non-constricteurs (Fig. 1c, d). Les boutons adhésifs se fixent sur différentes parties du corps de la proie grâce à une substance adhésive visible sur ces organes (Fig. 1 b). Le pédoncule mycélien portant ces boutons est particulièrement fragile et se casse facilement lorsqu'un nématode est piégé, mais le bouton lui-même ne se décollera pas de la proie, et finit par entraîner sa mort (Fig. 1 b, c). La substance adhésive ne semble pas avoir une action spécifique et capture même des bactéries (Fig. 1, b) ce qui expliquerait une observation de Mankau sur la diminution de l'efficacité du piégeage en milieu riche en bactéries (Mankau, comm. pers.) Les anneaux non-constricteurs ne piègent que les nématodes dont le diamètre est inférieur à leur propre diamètre (Fig. 1 c, d) ; ce mécanisme de capture n'est pas exclusivement mécanique car l'anneau se colle à la cuticule du nématode en un ou deux points (Fig. c, d) généralement au niveau de la région céphalique.

*Candelabrella musiformis* utilise des branches adhésives, associées à des spires contractiles en forme d'anneaux (Fig. 2 a, b, c). Les branches adhésives sont des simples expansions mycéliennes qui enserrant la proie (Fig. 2 a). Les spires contractiles en forme d'anneau rappellent celles de *Monacrosporium doedycoides* (B'Chir, 1972), mais elles sont, dans ce cas, beaucoup plus simples, formant un anneau ouvert (Fig. 2 c 1) qui se resserre au contact de la proie (Fig. 2 c 2) et l'envahit par la suite avec un bulbe infectieux (Fig. 2 b). Le champignon quitte ensuite le nématode vidé de son contenu par les orifices naturels (Fig. 2 d).

Les systèmes de capture peuvent apparaître aussi, directement sur les conidies (Fig. 2 e) comme l'a déjà

signalé Mankau (1961). Les bactéries peuvent adhérer aux spires contractiles de *C. musiformis* (Fig. 2 b) et la polyvalence de ce système de capture peut être démontrée par la diversité des nématodes piégés : larves de *Meloidogyne* (Fig. 2 a, b, c), femelles d'*Aphelenchus avenae* (Fig. 2 e), Rhabditides (Fig. 2 d).

*Arthrobotrys* spp. : les deux espèces d'*Arthrobotrys* capturent les nématodes grâce à un réseau de mailles adhésives (Fig. 3 a, b, c, d) qui immobilise la proie avant de l'envahir au moyen d'un bulbe infectieux (Fig. 3 b). Les mailles adhésives sont circulaires chez *A. irregularis* (Fig. 3 c) et en forme d'anses semi-circulaires chez *A. oviformis* (Fig. 3 a, d). La substance adhésive ne s'observe que sur les fragments de l'organe de capture en contact avec la proie (Fig. 3, c, d).

Les mailles du réseau adhésif peuvent engluier diverses bactéries (Fig. 3, b, c) et capturer des nématodes très différents : larves de *Meloidogyne* (Fig. 3 c) ; larves de *Globodera rostochiensis* (Fig. 3 f), Rhabditides (Fig. 3 a, d).

### ORGANES DE REPRODUCTION

Les hyphomycètes prédateurs se reproduisent par conidies dont la morphologie et la disposition sur le conidiophore présentent une importance systématique.

*Dactylaria candida* possède des spores pluricellulaires (Cooke & Godfrey, 1964) disposées en bouquet sur le conidiophore. Au microscope électronique à balayage on a pu observer chez cette espèce des conidies unicellulaires et bicellulaires avec une expansion caractéristique sur l'apex (Fig. 1 e).

*Candelabrella musiformis* se caractérise par des spores bicellulaires portées par un conidiophore geniculé en forme de candélabre (Fig. 2 f).

*Arthrobotrys* spp. possèdent également des conidies bicellulaires avec une cellule proximale moins développée que la cellule distale (Fig. 1 f). Les conidies sont disposées sur un conidiophore simple ou ramifié (Fig. 3 e).

## Discussion

Cette étude nous a permis de visualiser dans l'espace l'architecture de divers systèmes de capture et leur fonctionnement en présence de nématodes. Une substance adhésive a pu être mise en évidence sur tous les organes de capture, montrant ainsi que même les pièges mécaniques agissent par une adhésion irréversible. Cette substance couvre la surface interne des organes de capture, essentiellement aux points de contact avec la proie (Fig. 1 d, Fig. 3 c, d).

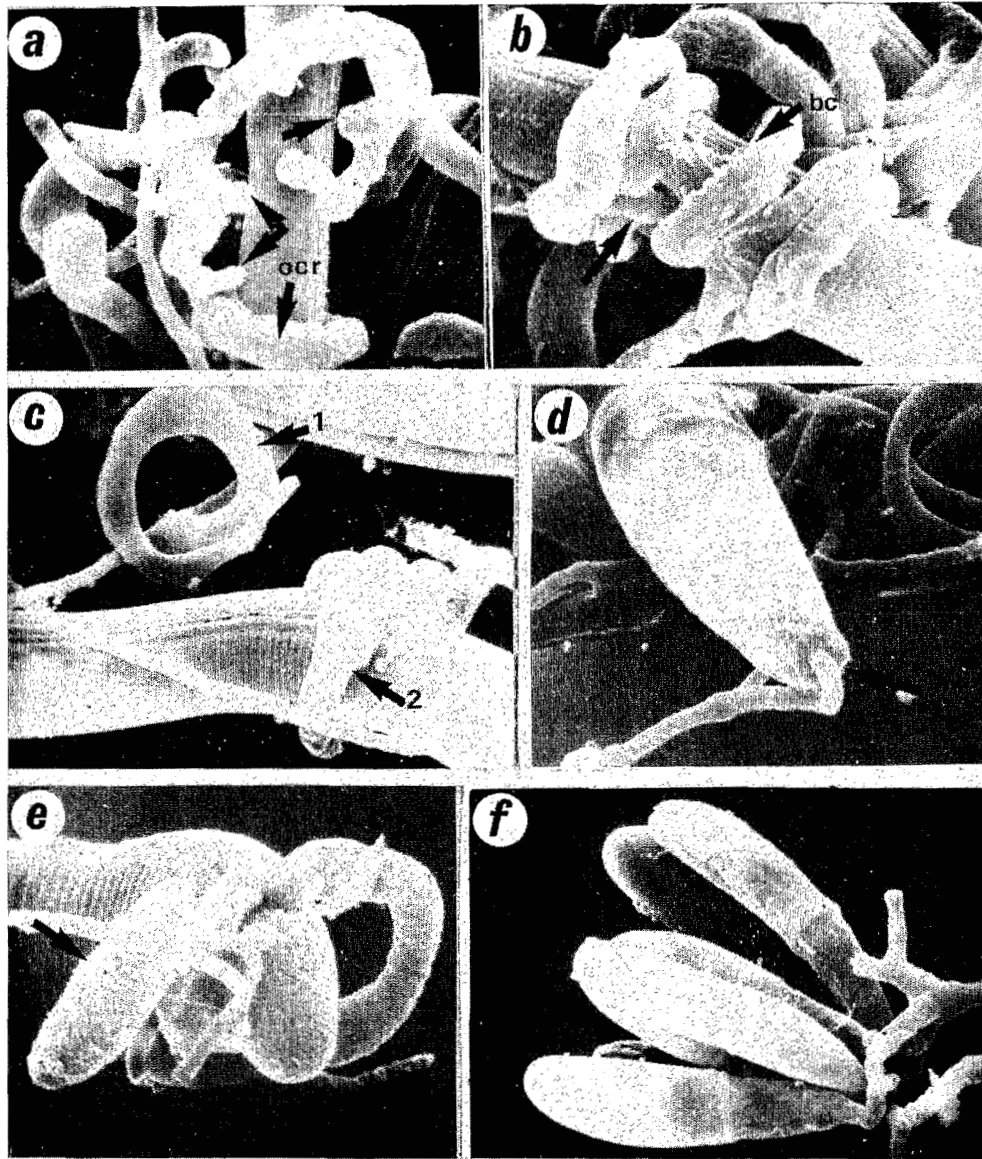


Fig. 2. *Candelabrella musiformis*. a : Larve de *Meloidogyne* capturée par des branches adhésives (flèches) et par une spire contractile (o.c.r),  $\times 1\ 440$  ; b : Nématode capturé par un ensemble de spires contractiles. Notez le bulbe infectieux qui pénètre dans le corps de la proie (flèche), et les bactéries collées sur les spires (bc),  $\times 2\ 080$  ; c : Les spires contractiles, au repos (1) et en action (2),  $\times 1\ 580$  ; d : Une hyphe nourricière quittant la proie par l'ouverture buccale (flèche),  $\times 1\ 470$  ; e : Spire contractile formée à partir d'une conidie (flèche) piégeant *Aphelenchus avenae* par la queue,  $\times 2\ 150$  ; f : Conidiophore en forme de candélabre portant des conidies bicellulaires,  $\times 1\ 560$ .

a : *Meloidogyne* larvae trapped by adhesive branches (arrows) and open-constricting ring (o.c.r),  $1\ 440 \times$  ; b : Nematode trapped by open-constricting rings. Note a post-infection bulbe entered into the body (arrow) and bacteria on the traps (bc),  $2\ 080 \times$  ; c : Open-constricting rings ; normal ring (1), and ring triggered by nematode (2),  $1\ 580 \times$  ; d : Assimilative hyphae left prey from oral aperture  $1\ 470 \times$  ; e : Open-constricting ring formed on conidium (arrow) catching *Aphelenchus avenae* tail,  $2\ 150 \times$  ; f : Candelabrum-like conidiophore with two celled conidia.  $1\ 560 \times$ .

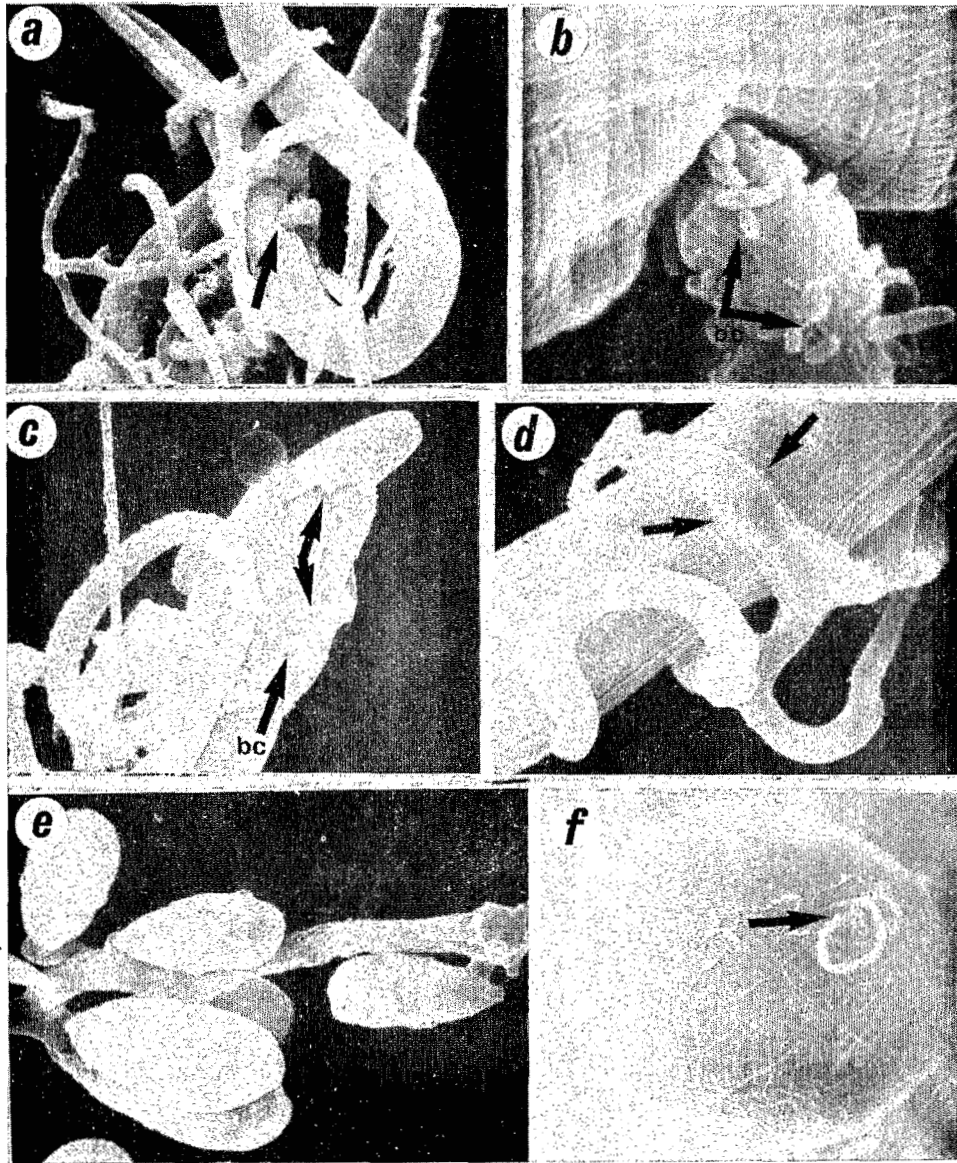


Fig. 3. a : Nématodes immobilisés par un grand réseau de mailles adhésives alors qu'un bulbe infectieux pénètre dans le corps de l'un d'eux (flèche),  $\times 970$ , (*A. oviformis*); b : Détail de (a) montrant le bulbe infectieux portant des bactéries (bc),  $\times 7\,400$ ; c : Une larve de *Meloidogyne* capturée au niveau de la tête par des mailles adhésives (flèches) de forme circulaire. Notez la présence de bactéries (bc),  $\times 1\,550$ , (*A. irregularis*); d : Réseau tridimensionnel de mailles adhésives semi-circulaires capturant un Rhabditide par la queue. Notez la substance adhésive liant la surface de contact du piège avec la proie (flèches),  $\times 1\,950$ , (*A. oviformis*); e : Extrémité de conidiophore ramifié de *A. oviformis* portant des conidies bicellulaires,  $\times 1\,850$ ; f : Un kyste de *Globodera rostochiensis* enveloppé par le mycelium de *A. irregularis*, avec une larve du deuxième stade piégée (flèche),  $\times 120$ .

a : Nematodes immobilized by a large adhesive net, with a post-infection bulb entering the body of one of the preys (arrow),  $970 \times$  (*A. oviformis*); b : Detail of (a) showing the post-infection bulb with several bacteria on it (bc)  $7\,400 \times$ ; c : An anterior end of *Meloidogyne* larva trapped by a hop-like adhesive net (arrows). Note the presence of bacteria (bc)  $1\,550 \times$ , (*A. irregularis*); d : Three dimensional adhesive net trapping the tail of a rhabditid. Note the presence of adhesive substance coating inner surface of net (arrow),  $1\,950 \times$ , (*A. oviformis*); e : Typical conidiophores of *A. oviformis* with two-celled conidia,  $1\,850 \times$ ; f : Cyst of *Globodera rostochiensis* wrapped in colonizing hyphae of *A. irregularis*, with a larva trapped by net (arrow),  $120 \times$ .

Nordbring-Hertz et Mattiazon (1979) mettent en évidence, sur les organes de capture de *A. oligospora* des lectines qui se combinent aux hydrates de carbone de la cuticule, ce qui expliquerait la spécificité des hyphomycètes prédateurs vis-à-vis des nématodes. L'activité des pièges en forme d'anneau est limitée, cependant, aux nématodes de plus faible diamètre (Cayrol & Frankowski, 1979). Mais comme ces anneaux sont associés aux boutons adhésifs capables de s'attaquer aux proies plus larges, la même espèce de champignon prédateur peut être active contre divers groupes de nématodes comme l'a déjà signalé Barron (1977). La fixation irréversible de ces organes et leur effet paralysant sur la proie expliqueraient la possibilité de piégeage de gros nématodes comme des femelles de Rhabditides.

Bien que certaines bactéries stimulent l'induction des pièges (Cayrol, comm. pers.), la possibilité pour ces organes de capture d'engluier un grand nombre d'entre elles peut diminuer leur efficacité dans les sols où l'activité bactérienne est trop importante. Ce risque est plus grand après l'épandage de la fumure organique qui apporte en plus des éléments fongistatiques ralentissant la croissance mycélienne (B'Chir, non publié). L'introduction des champignons prédateurs dans le sol devrait, par conséquent, précéder celle de la fumure organique.

*A. irregularis*, est actuellement à l'étude, en vue de son utilisation éventuelle dans la lutte contre les *Meloidogyne* qui constituent un important problème sous abris plastiques en Tunisie (B'Chir, 1981).

#### REMERCIEMENTS

Le travail de microscopie électronique a été réalisé à la Faculté Agronomique et à la Faculté des Sciences de Gand (Belgique) ; nous remercions les professeurs Gillard, De Grisse, et Coomans pour leur accueil. Nous remercions MM. Ritter, et Cayrol qui nous ont envoyé diverses souches de champignons prédateurs.

#### RÉFÉRENCES

- BARRON, G.L. (1977). *The nematode-destroying fungi*. University of Guelph, Ontario Can. Biol. Public, 140 p.
- B'CHIR, M.M. (1972). *Etude de quelques facteurs écologiques agissant sur l'équilibre biocénotique du compost des cultures de champignon de couche*. DEA. Biol. anim. Fac. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier, 47 p.
- B'CHIR, M.M. (1979a). Description et étude biométrique, morphologique, et biologique de *Aphelenchoides tuzeti* n.sp. (Nematoda : Aphelenchoidea) et discussion des critères spécifiques appliqués au genre *Aphelenchoides*. *Nematologica*, 25 : 22-31.
- B'CHIR, M.M. (1979b). *Contribution à l'étude morphologique, anatomique et bioécologique de quelques espèces du genre Aphelenchoides (Nematoda: Aphelenchoidea)* Thèse Doctorat d'Etat. Univ. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier, 190 p.
- B'CHIR, M.M. (1981). Les principaux facteurs qui déterminent le développement des *Meloidogyne* sous abris plastiques (serres) en Tunisie. *C. r. 6<sup>e</sup> Journ. Phytol. Phytopharm. Cicummédit.*, 25-28 mai, Perpignan : 75-83.
- CAYROL, J.C. & FRANKOWSKI, J.P. (1979). Une méthode de lutte biologique contre les nématodes à galles des racines appartenant au genre *Meloidogyne*. *P.H.M. Revue hortic.*, 193 : 15-23.
- CLARK, S.A. & STONE, A.R. (1975). A simple method of preparing nematodes for scanning electron microscopy using Spurr's low viscosity epoxy resin. *Nematologica*, 21 : 256-258.
- COOKE, R.C. & GODFREY B.E.S. (1964). A key of nematode destroying fungi. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 47 : 61-44.
- CORBETT, D.C.M. & CLARK, S.A. (1982). SEM Studies of *Pratylenchus* spp. *Abstracts XVIIth Int. Symp. of Nematology St Andrews, Scotland, 1982* : 99.
- COURTESY, B. & NORDBRING-HERTZ, B. (1972). Scanning electron micrographs of *Arthrobotrys oligospora*. *Physiol. Plant.*, 26 : 279-284.
- DE GRISSE, A.T. (1973). A method for preparing nematodes and other soft tissues for scanning microscopy. *Meded. Fac. Landbouwet., Gent*, 38 : 1685-1703.
- DE GRISSE, A.T. (1977). De ultrastructuur van het zenuwstelsel in de kop van 22 Soorten planten — parasitaire nematoden, behovende tot 19 genera (Nematoda : Tylenchida). *Thèse d'agrégation, Ryks-univ., Gent*, 420 p.
- ESTEY, R.H. & TZEAN, S.S. (1976). Scanning electron microscopy of fungal nematode-trapping devices. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 66 : 520-522.
- GREEN, C.D. (1967). Preparation of nematodes for examination under the stereoscan electron microscope. *Nematologica*, 13 : 279-282.
- MANKAU, R. (1961). Antagonism to nematode trapping fungi in soil. *Phytopathology*, 51 : 66.
- NORDBRING-HERTZ, B. & MATTIAZON, B. (1979). Action of nematode trapping fungus shows lectin — induced host microorganism interaction. *Nature, Lond.*, 281 : 477-479.
- SAYRE, R.M. & WERGIN, W.P. (1979). The use of SEM to classify and evaluate the parasites and predators of pest nematodes. *Scanning. electron. Microsc.*, 3 : 89-96.
- SITTE P. (1962). Einfaches Verfahren stufenlosen Gewebe. Entwässerung für die elektronenmikroskopische Präparation. *Naturwiss.*, 49 : 402-403.

Accepté pour publication le 1<sup>er</sup> février 1983.