

Département de Zoologie Agricole et Forestière, Institut National Agronomique,  
El Harrach, Algérie; \* UMR INRA/ENSAR, Biologie des Organismes et des Populations  
appliquée à la Protection des Plantes (BiO3P), B.P. 35327, 35653 Le Rheu, France

## DIFFÉRENCIATION DE QUELQUES ESPÈCES DE NÉMATODES À KYSTES DES CÉRÉALES ET DES GRAMINÉES PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'ACÉTATE DE CELLULOSE

par

A. MOKABLI, S. VALETTE\* et R. RIVOAL\*

**Résumé.** Par électrophorèse sur gels d'acétate de cellulose, nous avons tenté de caractériser des populations de quatre espèces de nématodes à kystes des céréales et des graminées *Heterodera avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons* et *H. mani*. Trois enzymes (estérase, malate déshydrogénase et phosphoglucose isomérase) ont pu être révélées sur 15 testées. Les profils isoenzymatiques, plus ou moins polymorphes, ont assuré la différenciation spécifique, voire intraspécifique, des populations à partir d'aliquots de 25 femelles blanches.

**Summary.** *Differentiation of some species of cereal and graminaceous cyst nematodes by cellulose acetate electrophoresis.* Electrophoresis on cellulose acetate plates was used to characterize populations of four species of cereal and graminaceous cyst nematodes *Heterodera avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons* and *H. mani*. Three enzymes (esterase, malate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase) out of 15 were revealed. The isozyme patterns, more or less polymorphic, have enabled the specific, even intraspecific, differentiation of populations from aliquots of 25 white females.

Les nématodes à kystes des céréales et des graminées tels qu'*Heterodera avenae*, *H. mani* et *H. latipons* sont largement répandus dans le monde entier (Ritter, 1982). *Heterodera filipjevi*, décrit sous le nom de *Bidera filipjevi*, est de découverte plus récente et paraît localisé dans l'Europe de l'Est et au Proche Orient (Madzhidov, 1981; Rumpfenhorst *et al.*, 1996; Subbotin *et al.*, 1996). Plus particulièrement dans les zones circum-méditerranéennes, *H. avenae* et *H. latipons* sont suspectés d'occasionner des pertes non négligeables aux cultures de blé et d'orge (Sikora, 1987; Mor *et al.*, 1992; Philis, 1996).

L'usage de variétés résistantes permet de lutter efficacement contre ces pathogènes, mais nécessite une identification précise des espèces

et des pathotypes en cause. Cette identification est difficile pour les espèces concernées en raison de leurs ressemblances morphologiques. Les critères de différenciation phénotypiques, biométriques et à base de réactions d'hôtes différentiels, sont en outre d'étude fastidieuse et difficile à mettre en oeuvre. C'est pourquoi les recherches s'orientent de plus en plus vers des techniques rapides et plus significatives, basées en particulier sur le polymorphisme de l'ADN ou de ses produits d'expression, protéines et isoenzymes (Burrows, 1990; Bossis, 1991; Bekal *et al.*, 1997; Molinari *et al.*, 1997).

L'étude du polymorphisme enzymatique s'est révélée performante aussi bien pour la caractérisation taxonomique que pour la structuration

génétiq ue des populations (Fine, 1985; Hoelzel, 1992). Ainsi, les mobilités électrophorétiques différentes de plusieurs enzymes (estérases, malate déshydrogénase, superoxyde dismutase, ...) permettent d'identifier aisément plusieurs espèces de *Meloidogyne* (Esbenshade et Triantaphyllou, 1985). A l'échelle intraspécifique, Bergé *et al.* (1981) ont également différencié les quatre pathotypes d'*H. avenae* d'après les fréquences alléliques des isoestérases. L'étude du polymorphisme estérasique a montré des structurations génétiques inter et intra-parcellaires (Bossis et Rivoal, 1989). Lasserre *et al.* (1996) ont plus récemment mis en évidence une variation des fréquences alléliques au locus estérase de populations naturelles d'*H. avenae* résultant du contournement de la résistance de l'avoine cv. Panema, dans des expérimentations de longue durée.

Le support d'acétate de cellulose a été choisi pour sa facilité d'utilisation et peut être employé dans des laboratoires disposant d'équipements limités. De plus, de faibles quantités de matériels biologiques sont nécessaires. Ainsi, des espèces de *Meloidogyne* ont été identifiées, à partir d'un seul individu, en révélant simultanément trois systèmes enzymatiques (Davies et Beadle, 1995). Dans cette présente étude, cette technique a été appliquée pour discriminer les quatre espèces de nématodes à kystes des céréales et des graminées *H. avenae* Wollenweber, *H. mani* Mathews, *H. filipjevi* Madzhidov et *H. latipons* Franklin selon le polymorphisme enzymatique.

## Matériel et méthodes

Les populations de nématodes à kystes sont fournies dans le Tableau I. Les analyses ont été effectuées à partir des femelles blanches produites sur le même hôte, *Triticum aestivum* L. cv. Arminda, à l'exception d'*H. mani* (R2) qui a été multiplié sur *Lolium perenne* L. cv. Tetrone, évitant ainsi d'introduire une hétérogénéité phénotypique due à la plante hôte. Ces femelles ont été conservées au congélateur à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

L'équipement d'électrophorèse est fourni par les Laboratoires Helena (P.O. Box 752, Beaumont, TX 77704-0752, USA). Les gels d'acétate de cellulose Titan ® III (Catalog # 3033) sont de dimensions 76 mm x 76 mm.

Pour chaque population, 25 femelles introduites dans un tube Eppendorf sont écrasées dans 25  $\mu\text{l}$  de tampon d'extraction à l'aide d'un piston en matière plastique. Le tampon d'extraction des estérase (EST) et phosphoglucose isomérase (PGI) est composé de Tris HCl 0,1 M pH=8,0, Triton X-100 dilué au 1/10, l'ensemble est mélangé à la proportion 1:1 (v/v). Le tampon d'extraction de la malate déshydrogénase (MDH) est composé de Tris HCl 0,01 M pH=7,5, EDTA 1 mM; Dithiothreitol 0,5 mM; Mercaptoéthanol 1 mM.

Un aliquot de 5  $\mu\text{l}$  de chaque population est déposé dans un puits de la plaque de résine, auquel est ajouté 1,5  $\mu\text{l}$  de xylène de cyanol pour visualiser le front de migration dans la cuve d'électrophorèse. Le tampon d'humidification et de migration des gels est composé de Tris 24 mM, glycine 0,19 M. La migration se fait à 200 V, dans un réfrigérateur à  $7^{\circ}\text{C}$ , pendant une heure.

Les solutions de révélation des enzymes figurent dans le manuel de méthodologie pour l'analyse des allozymes (Hebert et Beaton, 1989). La solution de révélation de l'estérase (EST) est composée de 2 ml de Tris maléate 0,1 M pH=5,3, 200  $\mu\text{l}$  d' $\alpha$ -naphtyl acétate 27 mM et de fast red TR saturé. La malate déshydrogénase est révélée à l'aide d'une solution contenant 1 ml de Tris HCl 0,1 M pH=8, 1,5 ml de NAD 3 mM, acide L malique 0,1 M, MTT 24 mM, PMS 6,3 mM. Pour révéler la phosphoglucose isomérase (PGI), on utilise une solution composée de 1 ml de Tris HCl 0,1 M pH=8, 1,5 ml de NAD 3 mM, fructose 6 phosphate 66 mM, MTT 24 mM, PMS 6,3 mM et deux unités de glucose 6 phosphate déshydrogénase. Les révélations sont réalisées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes.

Quinze enzymes ont été testées: aconitase, alcaline phosphatase, alcool déshydrogénase,

TABLEAU I - Origine des populations de nématodes à kystes (Heterodera) des céréales et des graminées étudiées.

Espèce	Code	Lieu	Pays ou Région
<i>H. avenae</i>	Fr1	Villasavary	France
	Fr4	S <sup>t</sup> Christophe le Jajolet	France
	E42*	Tiaret	Algérie
<i>H. mani</i>	R2	Soullans	France
<i>H. filipjevi</i>	A26**	Karnobat	Bulgarie
	E88	Puschkin	Russie
	E49**	Torralba de Calatrava	Espagne
<i>H. latipons</i>	HI	?	Proche-Orient

\*) Cette population a été appelée Dahmouni dans une précédente publication (Bekal *et al.*, 1997).

\*\*) Ces deux populations de type "Gotland" ont été intégrées dans l'espèce *H. filipjevi* sur des bases biométriques et génétiques (Bekal, 1997; Bekal *et al.*, 1997).

estérase, isocitrate déshydrogénase, glucose 6 déshydrogénase, glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase, glycérol 3 phosphate déshydrogénase, hexokinase, leucine aminopeptidase, malate déshydrogénase, mannose phosphate isomérase, peptidase, phosphoglucose isomérase, phosphoglucomutase.

Pour la lecture des gels on a établi les mobilités électrophorétiques par le calcul de la valeur  $R_f$  (Rapport au front), qui est le rapport entre la distance de migration de chaque bande et la distance parcourue par le front de migration (Hoelzel, 1992).

## Résultats

Sur les quinze systèmes enzymatiques testés, seulement trois (estérase: EST, malate déshydrogénase: MDH, phosphoglucose isomérase: PGI) ont été révélés pour les différentes espèces de nématodes à kystes des céréales et des graminées (Figs. 1, 2). Pour la plupart des populations testées et pour les trois enzymes, l'électrophorèse a révélé un polymorphisme qui se traduit par un nombre élevé de bandes ou isozymes, à mobilité distincte. L'intensité des bandes traduit vraisemblablement la fréquence des allèles représentés.

### Estérase (EST)

Les quatre espèces de nématodes à kystes se distinguent par le nombre de bandes spécifiques révélées. Le polymorphisme enzymatique le plus élevé est manifesté par les populations d'*H. avenae* (Fr1, E42 et Fr4) qui présentent huit bandes, s'étageant de 0,12 à 0,61  $R_f$ . La population Fr4 se différencie manifestement de Fr1 et E42 par la présence exclusive de la bande à 0,44. Le représentant R2 d'*H. mani* est monomorphe avec un seul isozyyme à 0,69. Les trois populations assimilées à *H. filipjevi* (A26, E88, E49) présentent également un polymorphisme important avec sept bandes s'étageant de 0,07 à 0,63  $R_f$ . A26 se démarque des deux autres par la révélation de deux bandes 0,07 et 0,15. *H. latipons* (HI) présente un phénotype estérasique original avec quatre bandes s'étageant de 0,36 à 0,78  $R_f$ .

### Malate déshydrogénase (MDH)

Chez *H. avenae*, cette enzyme est révélée uniquement pour les populations E42 et Fr4 avec cinq bandes s'étageant de 0,15 à 0,56  $R_f$ . E42 se différencie à nouveau de Fr4 par la révélation exclusive des deux bandes 0,15 et 0,25. Le

système MDH est polymorphe chez *H. mani* (R2) avec cinq bandes s'étageant de 0,07 à 0,56 R<sub>f</sub>. Il est par contre monomorphe chez les deux populations A26 et E88 d'*H. filipjevi* où il est seulement révélé (bande à 0,40 R<sub>f</sub>). Une seule bande (0,18 R<sub>f</sub>) est aussi observée pour *H. latipons* (HI). Aucune bande n'est révélée chez les populations Fr1 d'*H. avenae* et E49 d'*H. filipjevi*.

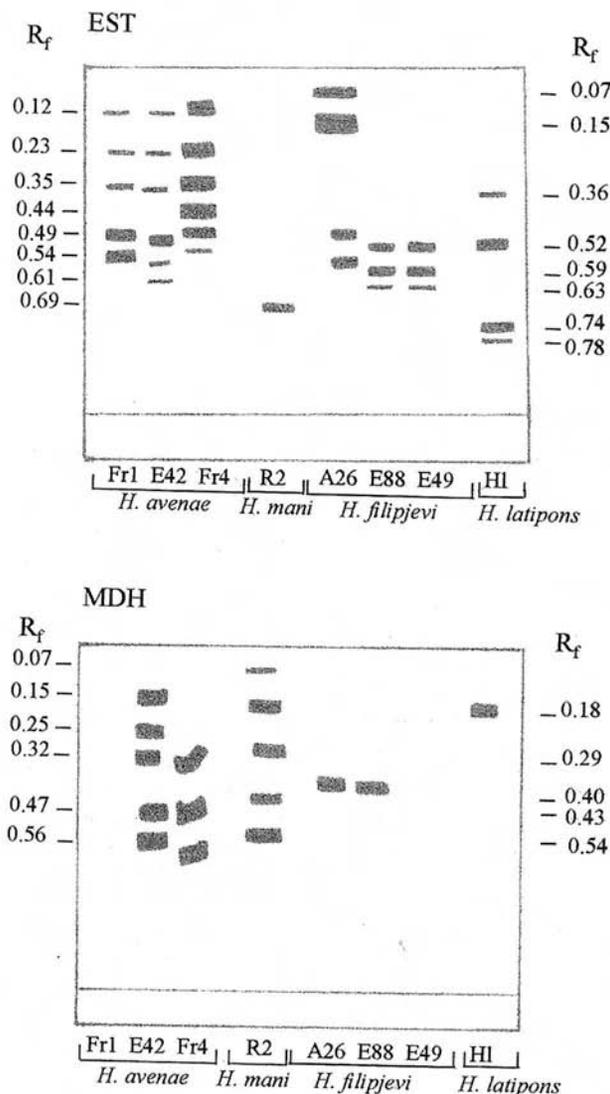


Fig. 1 - Zymogrammes d'estérase (EST) et de malate déshydrogénase (MDH) de populations d'*Heterodera avenae* (Fr1, E42, Fr4), d'*H. mani* (R2), d'*H. filipjevi* (A26, E88, E49) et d'*H. latipons* (HI). R<sub>f</sub>-Rapport au front.

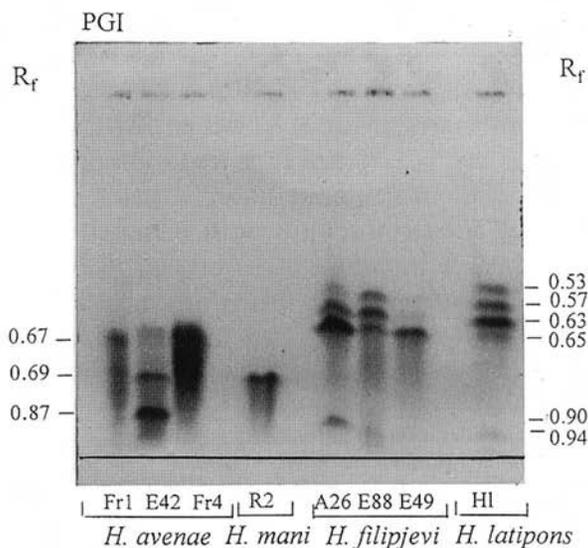


Fig. 2 - Visualisation d'isozymes de phosphoglucose isomérase (PGI) à partir de populations d'*H. avenae* (Fr1, E42, Fr4), d'*H. mani* (R2), d'*H. filipjevi* (A26, E88, E49) et d'*H. latipons* (HI). R<sub>f</sub>-Rapport au front.

### Phosphoglucose isomérase (PGI)

*H. mani* se distingue nettement d'*H. avenae* avec une seule bande (0,69 R<sub>f</sub>) contre trois pour la seconde espèce (0,67, 0,69 et 0,87 R<sub>f</sub>). Les populations d'*H. filipjevi* et d'*H. latipons* présentent un polymorphisme isoenzymatique voisin, avec trois ou quatre bandes s'étageant de 0,53 à 0,65 de R<sub>f</sub>. A26 pourrait se démarquer des deux autres populations de l'espèce *H. filipjevi* et d'*H. latipons* par la bande surnuméraire à 0,90 R<sub>f</sub>. Par contre, la bande 0,94 se retrouve chez *H. filipjevi* (E88) et chez *H. latipons* (HI).

### Discussion

L'interprétation des zymogrammes est difficile, en particulier lorsqu'ils sont obtenus à partir d'aliqouts de populations à reproduction amphimictique telles que les *Heterodera*, qui y font rassembler des génotypes homozygotes et hétérozygotes. Ces derniers présentent en outre

deux ou trois bandes, pour un seul locus, selon la structure monomère (EST) ou dimère (MDH, PGD) des enzymes révélés (Pasteur *et al.*, 1987). L'électrophorèse sur gel d'acétate de cellulose révèle pour les systèmes enzymatiques estérase et malate déshydrogénase un polymorphisme beaucoup plus important que celui révélé par isofocalisation en gel de polyacrylamide qui a été appliqué préalablement à un nombre équivalent ou supérieur de nématodes à kystes des céréales (Ibrahim et Rowe, 1995; Romero *et al.*, 1996). L'analyse de femelles individuelles et des fréquences alléliques donnerait une meilleure interprétation de la structure génétique de la population échantillonnée (Bossis et Rivoal, 1989; Lasserre *et al.*, 1996). Elle permettrait de vérifier si la différenciation intraspécifique observée chez *H. avenae* et chez *H. filipjevi*, en particulier pour l'estérase, résulte réellement de fréquences alléliques ou de la production inégale d'enzymes par des femelles de taille différente. L'étude limitée à 25 individus pourrait ne pas être forcément représentative de la diversité totale intraspécifique. Une possible dérive génétique pourrait naître dans les populations d'élevage mené depuis plusieurs générations.

Il est cependant manifeste que la révélation de ces trois enzymes assure une nette différenciation des espèces de nématodes à kystes des céréales et des graminées. Peu coûteuse et facile à mettre en oeuvre, cette technique s'avère utile pour l'identification de ces espèces dans les pays qui ne sont pas encore équipés en matériel d'analyse moléculaire.

**Remerciements.** Les auteurs tiennent à remercier Olivier Plantard pour ses critiques et suggestions lors de la préparation de cette communication.

### Littérature citée

BEKAL S., 1997. Etude de la variabilité phénotypique et génétique dans le complexe des nématodes à kystes des céréales en vue de la sélection de la résistance

- chez le blé dur. Thèse de Doctorat, ENSA de Rennes, France, 130 pp.
- BEKAL S., GAUTHIER J. P. et RIVOAL R., 1997. Genetic diversity among a complex of cereal cyst nematodes inferred from RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer region. *Genome*, 40: 479-486.
- BERGE J. B., DALMASSO A., PERSON F., RIVOAL R. et THOMAS D., 1981. Isoestérases chez le nématode *Heterodera avenae*. I - Polymorphisme chez différentes races françaises. *Revue de Nématologie*, 4: 99-105.
- BOSSIS M., 1991. Discrimination entre *Heterodera carotae* et *H. cruciferae* par l'électrophorèse (SDS PAGE) de protéines solubles extraites à partir de kystes individualisés. *Revue de Nématologie*, 14: 325-327.
- BOSSIS M. et RIVOAL R., 1989. Polymorphisme estérasique chez *Heterodera avenae* Woll.: variations intra et inter-parcellaires. *Nematologica*, 35: 331-339.
- BURROWS P. R., 1990. The use of DNA to identify plant parasitic nematodes. *Nematological Abstracts*, 59: 1-8.
- DAVIES K. G. et BEADLE J. I., 1995. Use of a cellulose acetate electrophoresis system for the simultaneous characterisation of individual root-knot (*Meloidogyne* spp.) females using three isozymes. *Fundamental and applied Nematology*, 18: 549-551.
- ESBENSHADE P. R. et TRIANTAPHYLLOU A. C., 1985. Identification of major *Meloidogyne* species employing enzyme phenotypes as differentiating characters, pp. 135-140. In: *An advanced treatise on Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control, (Sasser J. N. and Carter C. C., eds.), Raleigh, North Carolina, USA.
- FINE J. M., 1985. Méthodes électrophorétiques et immuno-chimiques utilisées dans l'abord de la structure d'une protéine et pour des études comparatives en taxonomie, pp. 15-39. In: *Electrophorèse et taxonomie*, Volume 42 (Goyffon M. et d'Hondt J. L., Eds.). *Société Zoologique de France* 42: 1-314.
- HEBERT P. D. N. et BEATON M. J., 1989. *Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis*: a Helena laboratories, Beaumont, Ontario, 31 pp.
- HOELZEL A. R., 1992. *Molecular genetic analysis of populations. A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, England, 315 pp.
- IBRAHIM S. K. et ROWE J. A., 1995. Use of isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis of nonspecific esterase phenotypes for the identification of cyst nematodes *Heterodera* species. *Fundamental and applied Nematology*, 18: 189-196.
- LASSERRE F., GIGAUT F., GAUTHIER J. P., HENRY J. P., SANDMEIER M. et RIVOAL R. 1996. Genetic variation in natural populations of the cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll.) submitted to resistant and susceptible cultivars of cereals. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 1-8.
- MADZHIDOV A. R., 1981. [*Biddera filipjevi* n. sp. (Heteroderina: Tylenchida) in Tadzhikistan]. *Izvestiya Akademii Nauk Tadzhikskoi SSR, Biologicheskie Nauki*, 2: 40-44.
- MOLINARI S., DE LUCA F., LAMBERTI F. et DE GIORGI C., 1997. Molecular methods for the identification of Longidorid nematodes. *Nematologia Mediterranea*, 25: 55-61.
- MOR M., COHN E. et SPIEGEL Y., 1992. Phenology, pathogenicity and pathotypes of cereal cyst nematodes, *Hetero-*

- dera avenae* and *H. latipons* (Nematoda: Heteroderidae) in Israel. *Nematologica*, 38: 494-501.
- PASTEUR N., PASTEUR G., BONHOMME F., CATALAN J. et BRITTON-DAVIDIAN J., 1987. *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Technique et Documentation* (ed. Lavoisier), Paris, 217 pp.
- PHILIS J., 1996. *Heterodea latipons* and *Pratylenchus thornei* attacking barley in Cyprus. *Nematologia Mediterranea*, 25: 305-309.
- RITTER R., 1982. Importance des nématodes à kystes des céréales. *Bulletin OEPP*, 12: 307-316.
- ROMERO M. D., ANDRES M. F., LOPEZ BRAÑA I. et DELIBES A., 1996. A pathogenic and biochemical comparison of two Spanish populations of the cereal cyst nematode. *Nematologia Mediterranea*, 24: 235-244.
- RUMPENHORST H. J., ELEKCIOGLU H., STURHAN D., ÖZTÜRK G. et ENNELI S., 1996. The cereal cyst nematode *Heterodea filipjevi* (Madzhidov) in Turkey. *Nematologia mediterranea*, 24: 135-138.
- SIKORA R. A., 1987. Plant parasitic nematodes of wheat and barley in temperate and temperate semiarid regions - a comparative analysis, pp. 46-68. In: *Nematodes parasitic to cereals and legumes in temperate semi-arid regions*. Proceedings of a workshop held at Larnaca, Cyprus, 1-5 March.
- SUBBOTIN S. A., RUMPENHORST H. J. et STURHAN D., 1996. Morphological and electrophoretic studies on populations of the *Heterodea avenae* complex from the former USSR. *Russian Journal of Nematology*, 4: 29-38.