

Développement embryonnaire de *Globodera rostochiensis* et *G. pallida* en fonction de la température, en conditions contrôlées et naturelles

Marianne LANGESLAG * ⁽¹⁾, Didier MUGNIERY * et Guy FAYET ** ⁽²⁾

* INRA, Laboratoire de Recherches de la Chaire de Zoologie,
Domaine de la Motte-au-Vicomte, B.P. 29, 35650 Le Rheu et ** Unité de Calcul ENSA,
65 rue de Saint-Brieuc 35042 Rennes Cedex.

RÉSUMÉ

Une méthode permettant de suivre l'embryogenèse *in vitro* de *Globodera rostochiensis* et *G. pallida* est décrite. Grâce à cette méthode, il est possible d'étudier l'effet de la température sur la durée de l'embryogenèse. Ceci est réalisé pour quelques populations des deux espèces d'origines géographiques différentes. Chacune est caractérisée par un seuil de développement qui lui est propre. Par l'intermédiaire des températures cumulées, il est possible de suivre totalement le développement de ces espèces dans les conditions naturelles.

SUMMARY

Embryonic development of Globodera rostochiensis and G. pallida as influenced by temperature under controlled and natural conditions

The *in vitro* embryogenesis of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* can be observed through a method consisting of placing zygotes from the womb of the females on a simple gelose medium, which makes it possible to observe the different phases of the embryogenesis up to the stage L 2.

The influence of temperature on the duration of embryogenesis was studied on three populations of *G. pallida* and two populations of *G. rostochiensis* which differs in geographical origins. For each of them, the threshold temperature for growth and the thermal constant were calculated as well as the range of variation of these two criteria. It is shown that each population gets specific reactions.

It is possible with a low margin of error and through cumulative temperatures to observe the whole developmental cycle of this nematode under natural conditions, provided that the temperature is not too high when eggs are developing.

L'étude de l'effet de la température sur la durée de développement de *Globodera rostochiensis* (Woll.) et *G. pallida* Stone a montré qu'il était possible de suivre le développement des stades endoradiculaires de ces nématodes depuis la pénétration dans les racines jusqu'à la copulation par le biais des températures cumulées (Mugniery, 1978a). Cette méthode s'est révélée extrêmement utile pour la mise en pra-

tique d'une lutte culturale fondée sur une récolte hâtive effectuée avant maturation des femelles (Mugniery, 1978b).

Cependant, l'effet de la température sur la fin du cycle, c'est-à-dire depuis la fécondation jusqu'à la fin du développement des larves infestantes néoformées n'était pas connu. L'objet des travaux relatés ci-dessous est de combler cette lacune et d'étudier l'action de la tempé-

⁽¹⁾ Adresse actuelle : Université d'Agriculture, Wageningen, Pays-Bas.

⁽²⁾ Avec la collaboration technique de Madeleine OGER.

rature sur la durée de l'embryogenèse pour voir dans quelle mesure elle est utilisable dans les conditions naturelles.

Effet de la température au laboratoire

L'embryogenèse se déroulant exclusivement à l'intérieur des femelles, l'observation directe est impossible. Il convient d'extraire les œufs de l'utérus et de les faire évoluer sur un milieu convenable. Les rares expérimentations effectuées jusqu'alors sont dues à Sosa Moss (1966) qui a observé toute l'embryogenèse d'*Heterodera avenae* en plaçant les œufs en goutte pendante dans du liquide de Ringer. Cette méthode, valable pour l'observation de quelques individus, est peu pratique quand il s'agit de suivre individuellement plusieurs centaines d'œufs. Une méthode nouvelle a donc été mise au point, qui est adaptable à d'autres nématodes à kystes, tels *H. carotae*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'obtention des œufs s'effectue à partir de femelles élevées en masse sur pommes de terre cultivées en pots. Dès l'apparition des femelles sur les racines, on passe le sol et les racines broyées à l'éluutriateur de Kort (Oostenbrink, 1960). Les femelles sont triées directement à partir du refus de tamis, puis écrasées ensemble délicatement.

Seuls les œufs à une ou deux cellules sont conservés. Après désinfection dans une solution de streptomycine à 1%, ils sont déposés en boîte de Petri sur un milieu gélosé à 10% comportant 8‰ de chlorure de sodium et 0,25 ‰ de sulfate de streptomycine. Les œufs groupés manuellement sont recouverts d'une lamelle et les boîtes de Petri immédiatement placées dans des enceintes obscures climatisées. La température régnant dans la boîte de Petri est contrôlée par une sonde thermique reliée à un potentiomètre enregistreur.

Les souches de nématodes étudiées sont : *G. pallida* (Pa 3), origines St Malo, Kermat et Béziers ; *G. rostochiensis* (RO 1), origines Noirmoutier et Ré.

Pour la souche Pa 3 St Malo, les températures utilisées sont 24,4°, 20,3°, 18,0°, 15,6°, 11,5°.

Pour toutes les autres souches, les températures sont 24,4°, 20,2°, 17,4°, 15,6° et 13,2°.

MESURES ET RÉSULTATS

Les œufs sont suivis individuellement dès le début de chaque expérimentation. L'embryogenèse correspond aux descriptions de Sosa Moss (1966). Comme l'indique cet auteur, il est difficile de noter avec précision les différentes phases de développement, hormis la « mue » L_1 et le début de mobilité de l'embryon qui se situe en fin de gastrulation. Nous n'avons pas noté la « mue L_1 » car, selon la position de la larve, cette mue, d'une durée de 24 h à environ 20°, n'est pas observable pour tous les œufs. Nous avons donc conservé uniquement comme repère le début de mobilité de l'embryon, ce qui correspond à une incertitude d'observation de l'ordre de deux heures à 20°.

Nous n'avons pas noté, pour chaque œuf, la fin du développement des larves L_2 infestantes, car nous n'avons pas pu trouver de critère sûr et stable pour la caractériser.

Pour chaque souche, la figure 1 donne à chacune des températures étudiées les courbes de fréquences des durées de développement observées depuis le stade d'origine « une à deux cellules » jusqu'au stade embryon mobile. A l'aide de ces résultats, nous avons tracé les courbes cumulées de durées de développement que nous avons comparées à divers modèles préétablis. Nous avons retenu le modèle logistique car il s'adapte très bien aux résultats expérimentaux. La figure 2 donne un exemple d'ajustement pour *G. pallida* St Malo à 20,3°.

Cet ajustement nous a permis de calculer la médiane de chaque courbe de durée de développement. On peut alors définir la relation entre température et durée médiane de développement ⁽¹⁾, ce qui permet de représenter graphique-

⁽¹⁾ La relation entre durée de développement (t) et température (θ) est classiquement de type hyperbolique $t = 1 / A\theta + B$; $-B / A$ est l'abscisse de l'asymptote parallèle à l'axe des ordonnées et représente le seuil de développement ; $1/A$ est la constante thermique. Dans la pratique, on étudie la régression entre θ et $1/t$ qui est de forme linéaire $1/t = A\theta + B$ l'inverse de la constante thermique, A, correspond à la droite de régression et B à l'ordonnée à l'origine.

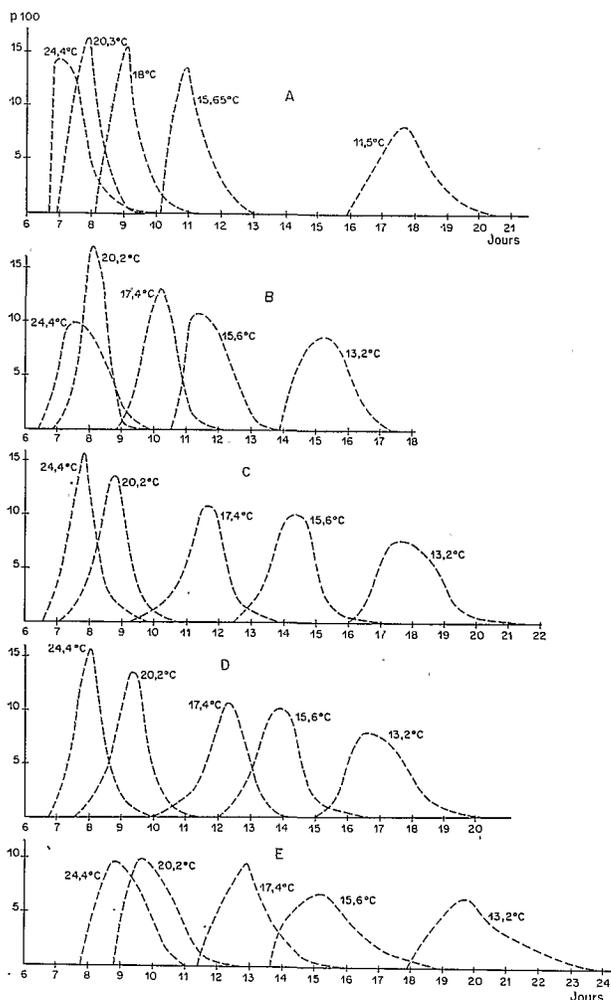


Fig. 1. Fréquence des durées de développement jusqu'à l'apparition du stade « embryon mobile » à diverses températures.

Frequency of the periods of development up to the occurrence of the "mobile embryo" stage at different temperatures.

- *G. pallida*, A : St Malo ; B : Kermat ; C : Béziers.
- *G. rostochiensis*, D : Ré ; E : Noirmoutier.

ment les courbes de vitesse de développement (Fig. 3).

Comme la mortalité enregistrée à 24,4° est beaucoup plus élevée que celles observées par ailleurs, affectant préférentiellement les jeunes embryons mobiles (Tab. 2), on peut considérer qu'il s'agit d'une température proche de la température létale. Les régressions données au tableau 1 ne tiennent pas compte de cette température.

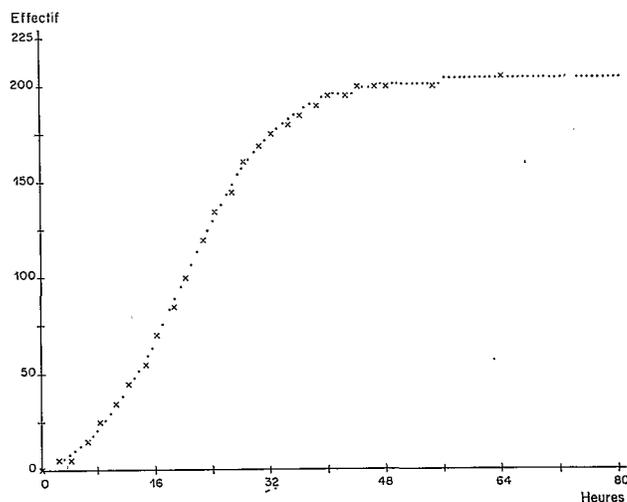


Fig. 2. Exemple d'ajustement au modèle logistique d'une courbe de fréquence cumulée des dates d'apparition du stade « embryon mobile » (cas de *G. pallida* St Malo, 20,3°).

Example of adjustment to the logistic model of a cumulative frequency curve of the dates of occurrence of the "mobile embryo" stage (case of *G. pallida* St Malo, 20.3°).

DISCUSSION

Chaque souche peut être caractérisée par son seuil de développement et sa constante thermique⁽¹⁾. On remarquera que les constantes thermiques exprimées en degrés-jours sont extrêmement voisines (Tab. 1). Seule la souche Noirmoutier se distingue par une constante thermique supérieure à celle des autres souches. Par contre, les seuils de développement paraissent plus différents, mais nous n'avons pas développé le test de signification de ces différences. Cependant, on peut estimer l'étendue de la variabilité intra-populations. Pour cela, nous supposons que les individus les plus rapides le sont à toutes les températures, les plus lents également. On découpe chaque courbe de fréquences cumulées des durées de développement en tranches d'égale importance. Pour chaque fraction de population, on calcule, par la régression entre la température et l'inverse de la durée de développement, le seuil de développement et la constante thermique. On obtient donc ainsi les bornes extrêmes de ces deux critères pour chaque population (Tab. 1).

Tableau 1
 Caractéristiques de la régression température — inverse de la durée de développement
 de quelques souches de nématodes à kystes
 Characteristics of the regression between temperature and the inverse of the developmental duration
 of some strains of cyst nematodes

	Degrés de liberté	Coefficient de corrélation	Seuil de développement	Constante thermique
	Degrees of freedom	Correlation coefficient	Development threshold	en degrés-jours Thermal constant in degrees-days
<i>G. pallida</i>				
Saint-Malo	2	1,000	4,5 (4,3-4,7)	123 (111-142)
Kermat	2	0,999	5,3 (5,3-6,2)	121 (103-132)
Béziers	2	0,994	6,8 (6,4-7,4)	120 (99-140)
<i>G. rostochiensis</i>				
Noirmoutier	2	0,997	6,3 (5,9-6,5)	141 (124-172)
Ré	2	0,999	5,9 (5,7-6,1)	126 (112-143)

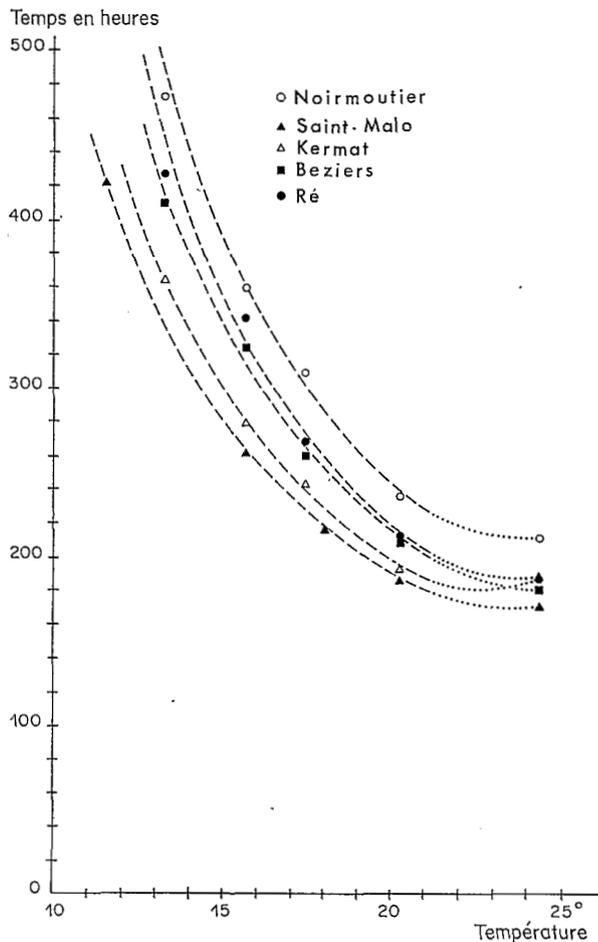


Fig. 3. Vitesse de développement des œufs jusqu'au stade « embryon mobile » calculée à partir de la médiane des courbes de fréquences observées.

Rate of egg development up to the "mobile embryo" stage calculated from the median of the frequency curves observed.

Dans ces conditions, on constate qu'on ne peut pas dissocier les deux souches de *G. rostochiensis* étudiées. Par contre, les trois souches de *G. pallida* présentent des intervalles de seuils de développement qui ne se recoupent pas, ce qui permet de considérer que leurs seuils de développement sont effectivement différents.

Il est intéressant de remarquer que l'action de la température sur les œufs est comparable à celle qu'elle exerce sur les stades endoradiculaires : *G. rostochiensis* (Noirmoutier) et *G. pallida* (St Malo) ont des seuils de développement endoradiculaires respectivement de 6,2° et 3,9° (Mugniery, 1978a) contre 6,3° et 4,5° pour le développement embryonnaire. De même, la souche Ré a un développement endoradiculaire un peu plus rapide que la souche Noirmoutier (Mugniery, en préparation) et l'on constate une différence de développement embryonnaire correspondante.

Les considérations géographiques peuvent expliquer en partie les différences constatées : St Malo et Kermat correspondent à des biotopes beaucoup plus nordiques que Béziers ; Noirmoutier et Ré correspondent à des biotopes semblables et l'identité de leurs zéros de développement semble normale. Mais les pratiques culturales peuvent amplifier les facteurs géographiques ; St Malo et Kermat correspondent à des biotopes semblables, mais à St Malo, les récoltes sont toujours effectuées précocément (90 jours de végétation au lieu de 130 à 150 jours pour Kermat). La souche St Malo semble s'être particulièrement bien adaptée à ces pratiques et l'on peut penser qu'il s'agit d'un résultat direct

de pression de sélection, analogue à celui observé par Hominick (1976) chez les populations écossaises.

Tableau 2

Mortalité des œufs en fonction de la température. Cas de *G. pallida* Saint-Malo

Egg mortality as influenced by temperature. Case of G. pallida

Température Temperature	24,4°	20,3°	18°	15,6°	11,5°
Effectif total Total number	285	203	225	215	238
Avant le stade embryon mobile Before the mobile embryo stage (%)	3,4	3,3	8,5	3,4	5
Après le stade embryon mobile After the mobile embryo stage (%)	15,6	1,4	2,4	2,2	1,5

Effets des températures dans les conditions naturelles

Il est intéressant, dans le cadre de la lutte intégrée, de voir si les résultats obtenus au laboratoire sont transposables dans les conditions naturelles, comme cela est le cas pour le développement des stades endoradiculaires (Mugniery, 1978a).

Pour cela, il est nécessaire de partir de la date de fécondation, puisque celle-ci est prévisible par le biais des constantes thermiques. Cependant, entre la date de fécondation et la présence des premiers zygotes, il existe un temps de latence, dû à la ponte des ovocytes et à la maturation des spermatozoïdes dans la spermathèque (Shepherd, Clark & Kempton, 1973).

Pour déterminer ce temps de latence, nous avons placé un mâle de *G. pallida* St Malo sur une femelle vierge de la même espèce, sur racine de pomme de terre en boîte de Petri, selon la méthode de Mugniery et Person (1976). Le mâle a été laissé huit heures puis enlevé ; 30 femelles ont été fécondées de la sorte et à intervalles réguliers, disséquées, pour s'assurer de l'évolution du développement embryonnaire. A

20,3°, il faut compter une latence de l'ordre de trois jours. La somme des températures s'effectuera donc au bout de trois jours dans les conditions naturelles.

De plus, les durées de développement calculées ne correspondent qu'à l'intervalle zygote, œuf à deux cellules - embryon mobile. Des observations nous ont permis de constater que le stade embryon mobile se situe à un peu moins de la moitié du développement embryonnaire. Nous estimerons donc que le développement embryonnaire total demandera en degrés - jours deux fois la constante thermique et 2,5 jours, ce qui correspond à 300° J pour Noirmoutier et 280° J pour les autres populations.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sur des parcelles infestées, deux plants complets de pomme de terre sont prélevés régulièrement, analysés isolément par broyage - centrifugation. Dès l'apparition des stades adultes, les femelles sont toutes récupérées et broyées ensemble délicatement pour estimer la fin du développement embryonnaire.

Une thermosonde enregistreuse, ou une sonde reliée à un potentiomètre, est placée à 13 cm de profondeur.

Les expérimentations ont eu lieu à l'île de Ré en 1977 et 1978, à Noirmoutier en 1976 et à Rennes en 1977 avec une population de St Malo. Pour cette dernière expérimentation, sept dates de plantation ont été retenues pour pouvoir suivre sept évolutions de populations à l'aide d'une seule série de relevés thermiques. Les dates théoriques de fin de développement ont été calculées suivant les données ci-dessus.

RÉSULTATS

On trouvera au tableau 3 les dates d'apparitions observées et théoriques de la fin de l'embryogenèse. Bien que les observations aient été faites une fois par semaine, parfois deux fois, il existe certaines ambiguïtés sur l'apparition du stade adulte et sur la fin du développement. Ces cas sont indiqués par la présence d'un intervalle de temps.

Tableau 3

Comparaison des dates de fin de développement de *G. pallida* et *G. rostochiensis* déterminées par l'analyse et estimées par les températures cumulées
 Comparison between the dates of the end of development for *G. pallida* and *G. rostochiensis* as determined by the calculation and by the cumulative temperatures

	<i>Plantation</i>	<i>Stade adulte</i>	<i>Fin de développement embryonnaire</i>	
	Planting time	Adult stage	Observé	Théorique
			End of embryonic development Observed	Calculated
<i>G. rostochiensis</i>				
Ré	4-03-77	19.04	1.06	29.05
	25-06-77	12-19.04	2-9.08	6.08
	10-03-78	18.04	23-30.05	26.05
	7-07-78	21-26.07	9.08	11.08
Noirmoutier	20-02-76	29-30.04	1.06	30.05
<i>G. pallida</i>				
Rennes (souche St Malo)	8-04-77	25.05	21-24.06	21-06
	15-04-77	27.05	24.06	24.06
	22-04-77	31.05	28.06-1.07	28.06
	29-04-77	2.06	1-5.03	30.06
	6-05-77	5.06	1-5.07	2.07
	13-05-77	9.06	5-8.07	5.07
	20-05-77	14-17.06	8-12.07	10.07

DISCUSSION

Les dates théoriques et observées correspondent en général assez bien. Il faut cependant remarquer que nous avons sélectionné parmi d'autres résultats ceux d'expérimentations pendant lesquelles les températures maxima relevées dans le sol ne dépassent pas ou peu 21-22°. Quand les températures maximales du sol atteignent 25-30°, le calcul thermique est strictement inapplicable car on atteint la partie des courbes de la figure 3 où les durées de développement présentent une tendance à s'accroître à nouveau. Dans ces conditions, les dates théoriques sont très en avance sur les dates observées.

CONCLUSION

L'objectif de cette étude, qui était d'apprécier le niveau d'évolution des populations des *Globo-dera* dans les conditions naturelles sans avoir à procéder à des analyses de laboratoire, semble atteint : que ce soit pour le développement endo-radriculaire ou embryonnaire, les températures

cumulées permettent, avec une marge d'erreur qui est celle de l'observation, d'apprécier à tout moment à quel niveau du cycle les populations de nématodes sont parvenues ; ceci à condition que les températures du sol ne dépassent pas un certain seuil, d'environ 22°.

Il est évident qu'une récolte pratiquée après la ponte des premiers œufs ne peut, en théorie, arrêter leur évolution puisqu'elle est indépendante de l'organisme maternel. La pratique montre que dans certains cas, on aboutit néanmoins à une destruction totale de la génération en formation (Mugniery, 1978b). Cela signifie qu'il existe obligatoirement des facteurs à seuil, telle l'humidité relative, qui, en dessous d'une certaine limite, peuvent intervenir pour arrêter brutalement l'embryogenèse.

Une autre conclusion évidente est l'existence d'écotypes à caractéristiques particulières. Au vu de ces résultats, on peut supposer que chaque population isolée constitue un écotype dont on ne peut prévoir les réactions avant de les avoir étudiées. Chacun de ces écotypes s'est adapté, à partir de sa variabilité d'origine, aux conditions climatiques locales et on peut voir qu'il

existe entre écotypes des différences très marquées. Par la suite, les pratiques agricoles sont intervenues comme pression de sélection pour laminer les populations et ne laisser subsister que celles parfaitement adaptées à l'ensemble des exigences climatiques et agronomiques du biotope considéré.

RÉFÉRENCES

HOMINICK, W. M. (1976). Adaptation of *Heterodera rostochiensis* to low heat accumulation during the growth of early potatoes in Ayrshire. *XIIIth intern. Nemat. Symp., Dublin, 5-11 sept. 1976* : 43-45.

MUGNIERY, D. (1978 a). Vitesse de développement, en fonction de la température, de *Globodera rostochiensis* et *G. pallida* (Nematoda : Heteroderidae). *Revue Nématol.*, 1 : 3-12.

MUGNIERY, D. (1978 b). Lutte culturale contre les nématodes à kystes de la pomme de terre, *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) et *G. pallida* (Stone) et perspective de lutte intégrée. *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 10 : 187-203.

MUGNIERY, D. & PERSON, F. (1977). Méthode d'élevage de quelques nématodes à kystes du genre *Heterodera*. *Sci. Agron., Rennes*, 217-220.

OOSTENBRINK, M. (1960). Estimating nematode populations by some selected methods. In : Sasser, J. N. & Jenkins, W. R. (Eds) *Nematology*. Chapel Hill, The University of North Carolina Press, 480 p.

SHEPHERD, A. M. CLARK, S. A. & KEMPTON, A. (1973). Spermatogenesis and sperm ultrastructure in some cyst nematodes, *Heterodera* spp. *Nematologica*, 19 : 551-560.

SOSA MOSS, C. (1966). Contribution à l'étude d'un nématode phytoparasite, *Heterodera avenae* Woll. *Thèse Fac. Sci., Paris*, 149 p.

Accepté pour publication le 9 septembre 1981.