

# Hybridation entre *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) et *G. pallida* (Stone)

Didier MUGNIERY (\*)

I.N.R.A., Laboratoire de Recherches de la Chaire de Zoologie,  
E.N.S.A., 65 rue de Saint-Brieuc, Rennes, France.

## RÉSUMÉ

L'hybridation entre *Globodera rostochiensis* et *G. pallida* s'effectue très aisément. Les pourcentages de réussite des croisements inter et intraspécifiques sont équivalents.

Les hybrides formés possèdent un stylet et des boutons basaux du type *G. pallida*, mais la forme des lèvres et du disque péri-oral est du type *G. rostochiensis*.

Les larves hybrides envahissent les racines de pomme de terre. Les hybrides du type ♀ *G. pallida* × ♂ *G. rostochiensis* meurent au stade L<sub>2</sub> sans avoir mué. Les hybrides du type ♀ *G. rostochiensis* × ♂ *G. pallida* se développent très lentement mais ne donnent que des mâles infertiles et pas de femelles. Quel que soit le sens du croisement, le blocage au stade L<sub>2</sub> est la règle dans les racines des variétés résistantes à *G. rostochiensis*.

## ABSTRACT

### *Hybridization between Globodera rostochiensis (Wollenweber) and G. pallida (Stone)*

In order to produce hybrids between *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* avoiding ambiguity, virgin females must be obtained, which after fertilization can develop eggs under optimum conditions. This can be achieved by development of a female from a single larva placed on potato plant grown on agar in a Petri dish. Under these conditions, there were no problems in hybridization encountered: inter- and intraspecific crosses approached 100% success. Phenotypically, hybrid larvae were characterized by a stylet like *G. pallida* and lips and perioral disc like *G. rostochiensis*. After hatching, larvae penetrated potato roots. Hybrids of ♀ *G. pallida* × ♂ *G. rostochiensis* died in the L<sub>2</sub> stage without molting. Hybrids of ♀ *G. rostochiensis* × ♂ *G. pallida* developed very slowly, producing non-fertile males but no females. Whatever crosses were made, hybrids did not develop on roots of varieties resistant to Race A of *G. rostochiensis*. These results invalidate those previously obtained on hybridizing these species but confirm the validity of the specific status of *G. pallida*.

---

(\*) Avec la collaboration technique de Madeleine OGER.

En nématologie, la description des espèces est classiquement basée sur la morphologie et la morphométrie des différents stades larvaires et adultes des animaux. Chez les *Meloidogyne* (Heteroderidae), ces critères sont insuffisants (Netscher, 1978) et Bergé et Dalmasso (1975) tentent de pallier cette insuffisance par l'utilisation de critères biochimiques. Chez les *Heloderida* et les *Globodera*, les critères morphologiques et morphométriques gardent leur valeur. Cependant la distinction entre *G. rostochiensis* Wollenweber et *G. pallida* Stone n'a été possible qu'après analyse très fine de morphologie (Stone, 1975, 1977), de morphométrie (Green, 1971 ; Stone, Rowe & Kempton, 1976) et étude comparative d'électrophorèse (Trudgill & Carpenter, 1971 ; Trudgill & Parrott, 1972).

Le critère de base demeure cependant l'incapacité de deux espèces à engendrer des descendants viables et féconds. Parrott (1972) ne parvient pas à hybrider *G. rostochiensis* et *G. pallida*, mais obtient, dans quelques cas rares, des résultats positifs. Cette ambiguïté dans les résultats de cet auteur peut être imputée à la technique utilisée : méthode de Yeates (1970) pour l'obtention de femelles vierges, conditions d'élevage particulièrement défavorables à la formation des œufs. Ces méthodes reprises par Franco et Evans (1978) conduisent à la même incertitude.

Une technique d'élevage simple ne présentant aucun de ces inconvénients ayant été mise au point (Mugniery & Person, 1976), l'étude de l'hybridation entre ces deux espèces était possible et est donnée ici.

## Matériel et méthodes

Une population de *G. pallida*, race E, originaire de Saint-Malo et trois populations de *G. rostochiensis*, race A, originaires de Noirmoutier, de l'île de Ré et des Pays-Bas, sont utilisées. Elles sont désignées respectivement par les sigles suivants : GP (Sm), GR (N), GR (Ré), GR (NL).

Les femelles vierges sont obtenues en disposant une seule larve du deuxième stade sur une racine de pomme de terre hôte, cultivée sur gélose en boîte de Petri selon la technique décrite

par Mugniery et Person (1976). La virginité des femelles obtenues est assurée.

Pour obtenir les mâles, on dépose plusieurs centaines de larves de deuxième stade des souches désirées sur les racines d'une pomme de terre cultivée dans les mêmes conditions. Les mâles sont récupérés 20 jours plus tard (température moyenne 20°) en plaçant gélose et racines dans un récipient plein d'eau.

La mise en contact des partenaires est réalisée en déposant un seul mâle par femelle vierge. L'opération n'est effectuée que quand la taille et l'aspect des femelles sont subjectivement corrects et de toutes façons, après l'apparition de la matrice gélatineuse externe.

Les kystes obtenus sont placés individuellement dans des récipients contenant de l'exsudat radiculaire de pomme de terre ou de l'acide picrolonique à 0,6 M (Clarke & Shepherd, 1966). Les larves écloses sont, soit réutilisées sur pommes de terre cultivées dans les mêmes conditions que précédemment, soit tuées à l'eau chaude (65-70°) et fixées dans le T.A.F. (Courtney, Polley & Miller, 1955) et déshydratées après passage dans du polyéthylène glycol (Rivoal, 1974).

Les individus parentaux sont élevés sur les cultivars Roseval ou Bintje. Les hybrides sont testés sur les mêmes cultivars et sur Maryke et Alcmaria, résistants à la race A de *G. rostochiensis*.

## Fécondation

### RÉSULTATS

Les résultats des croisements intra et interspécifiques sont présentés au tableau 1. Étant donné le pourcentage très élevé de réussite dans les croisements interspécifiques, il n'a pas été jugé nécessaire d'augmenter substantiellement le nombre de couples testés. L'échec d'un seul croisement intraspécifique est dû à l'absence d'attractivité sexuelle de la femelle utilisée et le pourcentage d'échec relativement important de 30% des croisements ♀ GP (Sm) × ♂ GR (NL) est dû à l'âge trop avancé des mâles utilisés car, pour des raisons techniques, ceux-ci ont été récupérés trop tardivement.

Tableau 1

Résultat des croisements  
intraspécifique et interspécifique  
chez *G. rostochiensis* et *G. pallida*

Results of interspecific and intraspecific crosses  
of *G. rostochiensis* and *G. pallida*

Croisement	Nombre de couples	Nombre de femelles fécondées	% de réussite
♀ GP (Sm) × ♂ GP (Sm)	17	16	94
♀ GR (N) × ♂ GR (N)	19	19	100
♀ GP (Sm) × ♂ GR (N)	11	10	91
♀ GP (Sm) × ♂ GR (NL)	20	14	70
♀ GP (Sm) × ♂ GR (Ré)	13	12	92
♀ GR (N) × ♂ GP (Sm)	32	29	91

L'origine des souches utilisées est donnée entre parenthèses : Sm = Saint-Malo ; N = Noirmoutier ; NL = Pays-Bas ; Ré = Ile de Ré.

The strains of nematodes used are coming from Saint-Malo = Sm; Noirmoutier = N; Netherland = NL; Island of Ré = Ré.

importantes de réussite entre croisements inter et intraspécifiques. Ces différences sont infirmées dans nos résultats. Cette absence d'identité dans les résultats est certainement due à la technique très particulière utilisée par ces auteurs, consistant à isoler des femelles présumées vierges sur un bloc de gélose où s'effectuera la fécondation : détachées de leur support alimentaire, les femelles peuvent perdre une partie ou la totalité de leurs possibilités d'attirer les mâles. Le fait que le pourcentage de réussite des croisements intraspécifiques n'atteigne, selon le sens du croisement, que 43 et 65% pour Parrott et 21% et 36% pour Franco et Evans, confirme largement ce point de vue.

Il en résulte que, dans des conditions assurantes de façon certaine la virginité des femelles et proches des conditions naturelles puisque les femelles restent sur leur support alimentaire, les croisements interspécifiques s'effectuent avec la même facilité que les croisements intraspécifiques.

### Description des hybrides

Les critères morphologiques et morphométriques utilisés par Stone (1972), pour distinguer les larves de deuxième stade de *G. rostochiensis* et de *G. pallida* sont basés essentiellement sur

### DISCUSSION

Les résultats donnés par Parrott (1972), Franco et Evans (1978) indiquent des différences très

Tableau 2

Moyenne et écart-type de quelques mesures de larves L<sub>2</sub> de *G. rostochiensis*, *G. pallida* et de leurs hybrides.

Table 2

Mean and standard deviation of larval measurements of *G. rostochiensis* and *G. pallida* and their hybrids.

	Caractère spécifique Longueur du stylet	Caractères indicatifs		
		Longueur totale	Longueur de la queue	Distance entre bulbe médian et pore excréteur
GP (Sm)	23,5 ± 0,9 (74)	463 ± 28 (74)	49,5 ± 3,8 (71)	38,9 ± 3,5 (72)
GR (N)	21,3 ± 0,8 (81)	472 ± 21 (81)	50,6 ± 3,2 (72)	34,0 ± 2,9 (81)
♀ GP (Sm) × ♂ GR (N)	23,5 ± 0,8 (208)	468 ± 23 (208)	51,1 ± 3,1 (189)	33,9 ± 4,5 (207)
♀ GR (N) × ♂ GP (Sm)	23,3 ± 0,9 (266)	457 ± 25 (266)	50,1 ± 3,0 (248)	31,4 ± 3,8 (248)

Le chiffre entre parenthèses indique le nombre d'individus mesurés.

The number between brackets is the number of larvae measured.

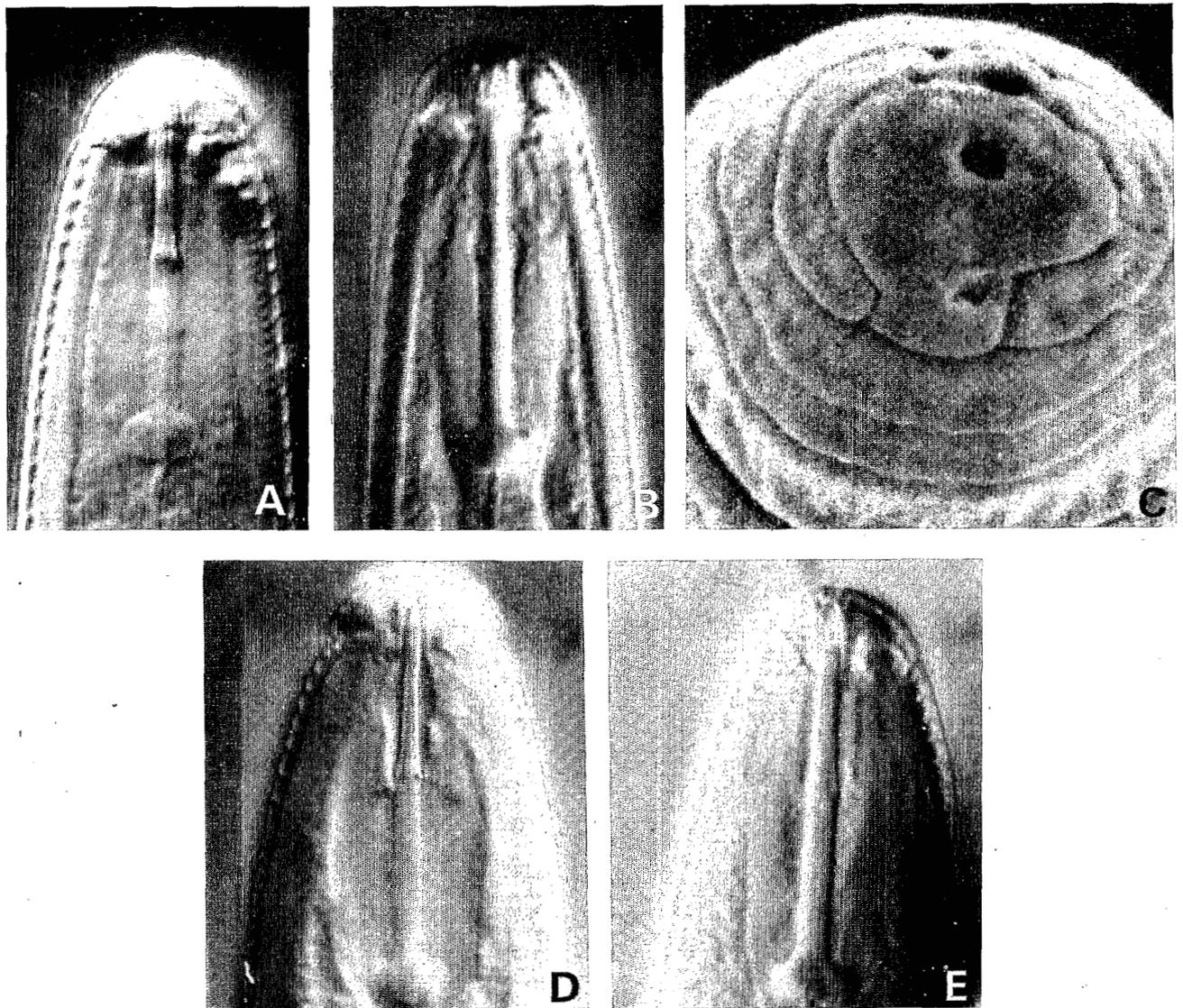


Fig. 1. *Globodera rostochiensis*. A : Forme des boutons basaux du stylet. Hybride *G. rostochiensis* ♀ × *G. pallida* ♂. B : Forme des boutons basaux du stylet. C : Lèvres et disque péri-oral. *Globodera pallida*. D : Boutons basaux du stylet. Hybride *G. pallida* ♀ × *G. rostochiensis* ♂. E : Boutons basaux du stylet.

*Globodera rostochiensis*. A : Shape of stylet knobs. Hybrid *G. rostochiensis* ♀ × *G. pallida* ♂. B : Shape of stylet knobs. C : Lips and peri-oral disc. *Globodera pallida*. D : Stylet knobs. Hybrid *G. pallida* ♀ × *G. rostochiensis* ♂. E : Stylet knobs.

la forme des boutons basaux, la longueur du stylet et l'aspect des lèvres et du disque péri-oral examiné au microscope électronique à balayage. D'autres mensurations peuvent être utilisées : longueur totale, longueur de la queue, distance séparant le bulbe médian du pore excré-

teur. Ces deux premières mensurations ne sont qu'indicatives car leurs variabilités sont trop grandes (Øydvin, 1973) ; la dernière semble être plus une caractéristique de souche que d'espèce (Bouwman & Ross, 1972).

Tous ces critères ont été mesurés chez les lar-

ves de deuxième stade parentales et hybrides, les premiers étant qualifiés de spécifiques, les autres d'indicatifs.

## RÉSULTATS

Le tableau 2 indique pour les critères spécifiques et indicatifs les dimensions des larves du deuxième stade parental GP (Sm) et GR (N) et des larves résultant de leurs croisements. A la figure 1 sont représentées les formes types des stylets et boutons basaux de ces deux parents et de leurs hybrides ainsi que la forme des lèvres et du disque péri-oral de l'un des hybrides.

## DISCUSSION

Les parents utilisés ne diffèrent des paratypes mesurés par Stone (1972) que par le critère longueur totale. Ils sont par contre strictement semblables pour les autres critères : longueur du stylet, forme des boutons basaux et forme des lèvres et du disque péri-oral (non reproduite ici car publiée par Rivoal, 1974).

Les hybrides produits présentent un phénotype mixte. Par certains caractères, longueur du stylet et forme des boutons basaux, ils s'apparentent au type *pallida*. Par contre, l'aspect ovale du disque péri-oral et des lèvres correspond exactement au type *rostochiensis*. De même, le critère distance du bulbe médian au pore excréteur rapproche les hybrides du groupe *rostochiensis*, mais les écarts-types calculés montrent qu'on ne peut se fier à ce seul caractère.

Les hybrides présentent donc en définitive un aspect composite, mais pour les critères spécifiques, ils sont semblables à l'un ou l'autre parent. Examinés au microscope classique, ils sont indiscernables du type *pallida*. Examinés au microscope à balayage, ils sont indiscernables du type *rostochiensis*.

### Devenir des hybrides

Les larves hybrides provenant des croisements GP (Sm)  $\times$  GR (N) ont été mises en éclosion et déposées sur racine de pomme de terre cul-

tivée sur gélose en boîte de Petri pour étudier leur comportement et leur devenir.

## RÉSULTATS

L'éclosion des larves hybrides se fait dans la proportion de 65% du contenu viable du kyste. Les kystes provenant du croisement ♀ GR (N)  $\times$  ♂ GP (Sm) contiennent 57% d'œufs morts alors que le pourcentage n'est que de 5% pour le croisement inverse. Est considéré comme viable tout œuf contenant une larve infestante en fin de développement. Les œufs morts ont un aspect noirâtre et on ne peut distinguer aucune structure à l'intérieur du chorion. Il n'a pas été possible de déterminer à quel niveau de l'embryogenèse ces œufs hybrides meurent.

Le nombre moyen d'œufs viables par kyste est de 150, pour les deux types de croisements réalisés.

Les larves hybrides pénètrent normalement dans les racines de pomme de terre. Sur cultivars Maryke et Alcmaria, résistant à la race A de *G. rostochiensis*, elles meurent au stade L<sub>2</sub> sans avoir mué.

Sur cultivars Bintje ou Roseval, hôte des parents, leur devenir dépend du sens du croisement. Les hybrides ♀ GP (Sm)  $\times$  ♂ GR (N) meurent bloqués au stade L<sub>2</sub>. Les hybrides ♀ GR (N)  $\times$  ♂ GP (Sm) se développent très lentement. A 20°, tous les stades intermédiaires sont retardés et les premiers mâles libérés n'apparaissent que vers 33 jours. Les femelles avortent généralement au stade L<sub>3</sub> ou L<sub>4</sub>. Sur 575 larves testées, une seule femelle demeurée vierge, à ovaire rudimentaire, s'est formée, son rapport de Granek est de 6,3, proche du type *rostochiensis*. Trente-sept mâles ont été utilisés isolément pour des croisements en retour sur les femelles parentales GP (Sm) et GR (N). Tous les couples formés sont restés stériles.

## DISCUSSION

Les kystes résultant d'hybridations contiennent un nombre réduit d'œufs viables et dans certains cas une proportion importante d'œufs morts. Les populations parentales élevées dans les mêmes conditions donnent des kystes con-

tenant une moyenne de 300 œufs viables et une proportion très faible d'œufs morts. Pour un certain nombre d'œufs hybrides en formation, on doit assister à des accidents d'appariements chromosomiques entraînant la mort de l'embryon formé ; il n'en reste pas moins que beaucoup parviennent à franchir une barrière génétique qui doit être encore très faible.

Les kystes présentent un taux d'éclosion très proche de celui mesuré par Mugniery (1978 a) pour *G. pallida*. Les parents appartenant à l'autre espèce GR (N) éclosent beaucoup mieux : 85%.

Selon le sens du croisement, le développement des hybrides est différent, mais de toute façon nul si l'hôte est résistant à *G. rostochiensis*, race A. Quand le développement est possible sur *S. tuberosum* — cas du croisement ♀ GR (N) × ♂ GP (Sm) — il est très retardé et ceci pour tous les stades larvaires. A 20°, les mâles parentaux GP (Sm) et GR (N) sortent des racines respectivement au bout de 17 et 15 jours après pénétration des larves infestantes (Mugniery, 1978 b). Les hybrides ♀ GR (N) × ♂ GP (Sm) exigent deux fois plus de temps et ne donnent pratiquement que des mâles. Il a d'ailleurs été souvent nécessaire d'extraire manuellement des racines des mâles formés qui ne parvenaient pas à se libérer eux-mêmes. Leur comportement sexuel est normal. Ils sont attirés par les femelles vierges de *G. rostochiensis* et *G. pallida* mais le croisement n'est pas fertile.

Les femelles du stade L<sub>4</sub> restent profondément dans les tissus végétaux, y grandissent peu et, sans exception, ne parviennent pas à saillir des racines où elles finissent par mourir.

## Conclusion

La distinction spécifique faite par Stone (1972) entre *G. rostochiensis* et *G. pallida* est confirmée car si ces deux espèces sont interfécondées, elles donnent cependant des hybrides F<sub>1</sub> à viabilité réduite et à descendance nulle. Selon le sens du croisement, les larves hybrides meurent au stade L<sub>2</sub> ou parviennent lentement jusqu'au stade mâle. La barrière génétique existant entre ces deux espèces doit cependant être très faible car

les croisements interspécifiques se font avec la même facilité que les croisements intraspécifiques. Les larves éclosent dans l'acide picrolonique avec les mêmes difficultés que *G. pallida*. Elles possèdent des caractéristiques de chacune des deux espèces et en particulier un stylet de type *pallida* et des lèvres de type *rostochiensis*. La distance bulbe médian-pore excréteur est très proche de celle qui caractérise *G. rostochiensis*.

Les résultats acquis en laboratoire mais dans des conditions proches des conditions naturelles peuvent avoir un impact dans le domaine agronomique. En effet, étant donné l'hétérozygotie naturelle des *Globodera* due à leur amphimixie obligatoire et la fécondité importante de chaque femelle, il n'est pas exclu que sur un grand nombre d'hybrides formés, quelques-uns ne puissent franchir cette barrière génétique et donner descendance à des individus féconds et viables. Or, dans les conditions naturelles, l'hybridation se réalise certainement : de nombreux foyers français et étrangers sont en effet contaminés par les deux espèces que l'on peut retrouver sur le même végétal. Les risques d'hybridation sont probablement atténués par le fait que l'attractivité sexuelle des femelles est plus forte pour les mâles de leur propre espèce que pour les autres (Parrott, Berry & Farrel, 1976). C'est surtout à la suite de la culture d'une variété résistante à *G. rostochiensis* que les possibilités d'hybridation sont maximales et c'est dans ce cas que le problème devra être suivi avec le maximum d'attention.

## RÉFÉRENCES

- BERGÉ, J. B. & DALMASSO, A. (1975). Caractéristiques biochimiques de quelques populations de *Meloidogyne hapla* et *Meloidogyne* spp. *Cah. O.R.S.T.O.M., Sér. Biol.*, 10 : 263-271.
- BOUWMAN, L. A. & ROSS, H. (1972). Differentiation between *Heterodera rostochiensis* and an undescribed allied species by female colour, morphometrics and pathogenicity. *Nematologica*, 18 : 265-269.
- CLARKE, A. J. & SHEPHERD, A. M. (1966). Picrolonic acid as a hatching agent for the potato cyst nematode, *Heterodera rostochiensis* Woll. *Nature, Lond.*, 211 : 546.
- COURTNEY, W. D., POLLEY, D. & MILLER, V. L. (1955).

- T.A.F., an improved fixative in nematode technique. *Plant Dis. Repr.*, 39 : 570-571.
- FRANCO, P. J. & EVANS, K. (1978). Mating of british and peruvian populations of potato cyst-nematodes *Globodera* spp. *Nematologica*, 8 : 5-9.
- GREEN, C. D. (1971). The morphology of the terminal area of the round-cyst nematodes *Heterodera rostochiensis* and allied species. *Nematologica*, 17 : 34-46.
- 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* et *G. pallida* et perspectives de lutte intégrée. *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 10 : 187-203.
- MUGNIERY, D. & PERSON, F. (1976). Méthode d'élevage de quelques nématodes à kystes du genre *Heterodera*. *Sci. agron. Rennes*, 1976 : 217-220.
- NETSCHER, C. (1978). Morphological and physiological variability of species of *Meloidogyne* in West Africa and implications for their control. *Meded. Landb Hogeschool Wageningen*, 78-3 : 46 p.
- ØYDVIN, J. (1973). The usefulness of some larval dimensions to distinguish *Heterodera rostochiensis* and *H. pallida*. *Nematologica*, 19 : 435-442.
- PARROTT, D. M. (1972). Mating of *Heterodera rostochiensis* pathotypes. *Ann. appl. Biol.*, 71 : 271-273.
- PARROTT, D. M., BERRY, M. M. & FARRELL, K. M. (1976). Competition between *G. rostochiensis* RO<sub>1</sub> and *G. pallida* Pa<sub>3</sub>. In : Jones, F. G. W. *Nematology Department, Rothamsted Exp. Stn. Rept. for 1975* : 197-198.
- RIVOAL, R. (1974). Observations de caractères morphologiques de quelques espèces d'*Heterodera* au microscope électronique à balayage. *Sci. agron. Rennes* (1974) : 43-45.
- STONE, A. R. (1972). *Heterodera pallida* n. sp. (Nematoda : Heteroderidae), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica*, 18 : 591-606.
- STONE, A. R. (1975). Head morphology of second-stage juveniles of some Heteroderidae (Nematoda : Tylenchoidea). *Nematologica*, 21 : 81-88.
- STONE, A. R. (1977). Recent developments and some problems in the taxonomy of cyst-nematodes with a classification of the Heteroderidae. *Nematologica*, 23 : 273-288.
- STONE, A. R., ROWE, J. A. & KEMPTON, R. A. (1976). Canonical variate analysis of juvenile and cyst measurements of 15 European populations. In : Jones, F. G. W. *Nematology Department. Rothamsted Exp. Stn. Rept. for 1975* : 198-199.
- TRUDGILL, D. J. & CARPENTER, J. M. (1971). Disk electrophoresis of proteins of *Heterodera* species and pathotypes of *Heterodera rostochiensis*. *Ann. appl. Biol.*, 69 : 35-41.
- TRUDGILL, D. J. & PARROTT, D. M. (1972). Disk electrophoresis and larval dimensions of British, Dutch and other populations of *Heterodera rostochiensis*, as evidence of the existence of two species, each with pathotypes. *Nematologica*, 18 : 141-148.
- YEATES, G. W. (1976). Failure of *Heterodera carotae*, *H. cruciferae* and *H. goettingiana* to interbreed in vitro. *Nematologica*, 16 : 153-154.

Accepté pour publication le 15 novembre 1978.