

Méthode d'estimation des populations de *Meloidogyne* dans le sol

Yves DEMEURE
Caspar NETSCHER
Laboratoire de Nématologie
Centre ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal

RÉSUMÉ

Les auteurs proposent une méthode pour estimer le nombre de *Meloidogyne* présents dans un sol.

Cette méthode, en combinant élutriation, centrifugation, tamisage et aspersion, permet d'extraire les juvéniles de deuxième stade, les œufs isolés et les masses d'œufs, à partir de sols contenant une forte proportion de sable et cependant peu perméables (argiles colmatant facilement).

Les résultats obtenus sont comparés avec ceux donnés, pour les mêmes sols, par la méthode de GOORIS et D'HERDE (1972).

SUMMARY

The authors present a method for estimating the number of *Meloidogyne* in soil.

This method combining elutriation, centrifugation, sieving and mistifying allows to extract second stage juveniles, isolated eggs and eggs-masses of *Meloidogyne*, from soil containing a heavy proportion of sand and however not very permeable (easily warping clay).

The results obtained are compared with those obtained, for the same soils, with the method of GOORIS and D'HERDE (1972).

INTRODUCTION

Pour de nombreuses raisons, il serait essentiel de pouvoir évaluer, de façon la plus exacte possible, le niveau d'infestation d'un sol par *Meloidogyne*. Ceci permettrait, entre autre, de déterminer les seuils d'infestation critiques d'un sol, c'est-à-dire, d'une part le taux de populations au-dessus duquel des dommages sont à attendre pour une culture donnée et, d'autre part, le taux au-dessous duquel les *Meloidogyne* n'auront qu'une incidence économique négligeable. On pourrait également connaître de cette façon l'effet immédiat de différentes techniques culturales (rotations, assollements, dessiccation, etc.) sur les populations de *Meloidogyne*.

Bien que ces nématodes représentent un facteur limitant pour de nombreuses cultures des pays chauds et en particulier pour les cultures maraîchères de la zone intertropicale, aucune méthode entièrement

satisfaisante n'existe à ce jour pour connaître le niveau de l'infestation d'un sol. Ceci est dû en partie au fait que les *Meloidogyne* sont dans le sol sous différentes formes (en ce qui concerne la biologie des *Meloidogyne* voir : DE GUIRAN & NETSCHER, 1970). Ils peuvent, en effet, être :

— Soit à l'état de larves de deuxième stade actives ou non actives (quiescentes ?) ;

— Soit sous forme d'œufs isolés ou d'œufs agglomérés en masses d'œufs.

Ces œufs ne sont pas tous viables et parmi ceux qui le sont, certains peuvent être dans un état quiescent. Les masses d'œufs elles-mêmes sont le plus souvent encore enchassées dans des débris de racines ou accolées à des grains de sable (cf. *infra*).

Les méthodes existantes pour l'extraction d'une telle nématofaune du sol sont loin d'être au point.

Parmi les appareils d'extraction les meilleurs, on peut citer l'élutriateur de SEINHORST (1956) ; mais s'il permet d'extraire du sol un pourcentage très satisfaisant des larves actives de deuxième stade, par contre, il ne permet de récupérer ni les larves non actives ni les œufs isolés, ni les masses d'œufs.

Récemment GOORIS et D'HERDE (1972) ont mis au point une méthode permettant d'extraire les différentes formes de *Meloidogyne* présentes dans le sol. Si cette méthode donne de très bons résultats en Europe, elle est, par contre, difficilement utilisable au Sénégal. En effet, les sols de cette région contiennent une fraction sable (entre 2 mm et 0,2 mm) fort importante (cf. tabl. III) qui, à une certaine étape du procédé d'extraction, supprime toute possibilité de séparation par tamisage de la fraction organique et de la fraction minérale. La seule solution est d'effectuer préalablement une décantation afin d'éliminer cette fraction minérale grossière. Mais celle-ci risque d'éliminer également des masses d'œufs.

DE GUIRAN (1966) a obtenu de bons résultats en Basse-Côte d'Ivoire en plaçant des échantillons de sol dans l'extracteur à brouillard de SEINHORST (1950). Cette méthode n'est utilisable que si on travaille avec des sols qui percolent bien, comme c'est le cas en Basse-Côte d'Ivoire. Par contre, avec des échantillons de sol du Sénégal, les essais se sont soldés par un colmatage complet des tamis par les argiles bien que celles-ci soient en faible proportion (cf. tabl. III). En résumé, en ce qui concerne tout au moins les sols

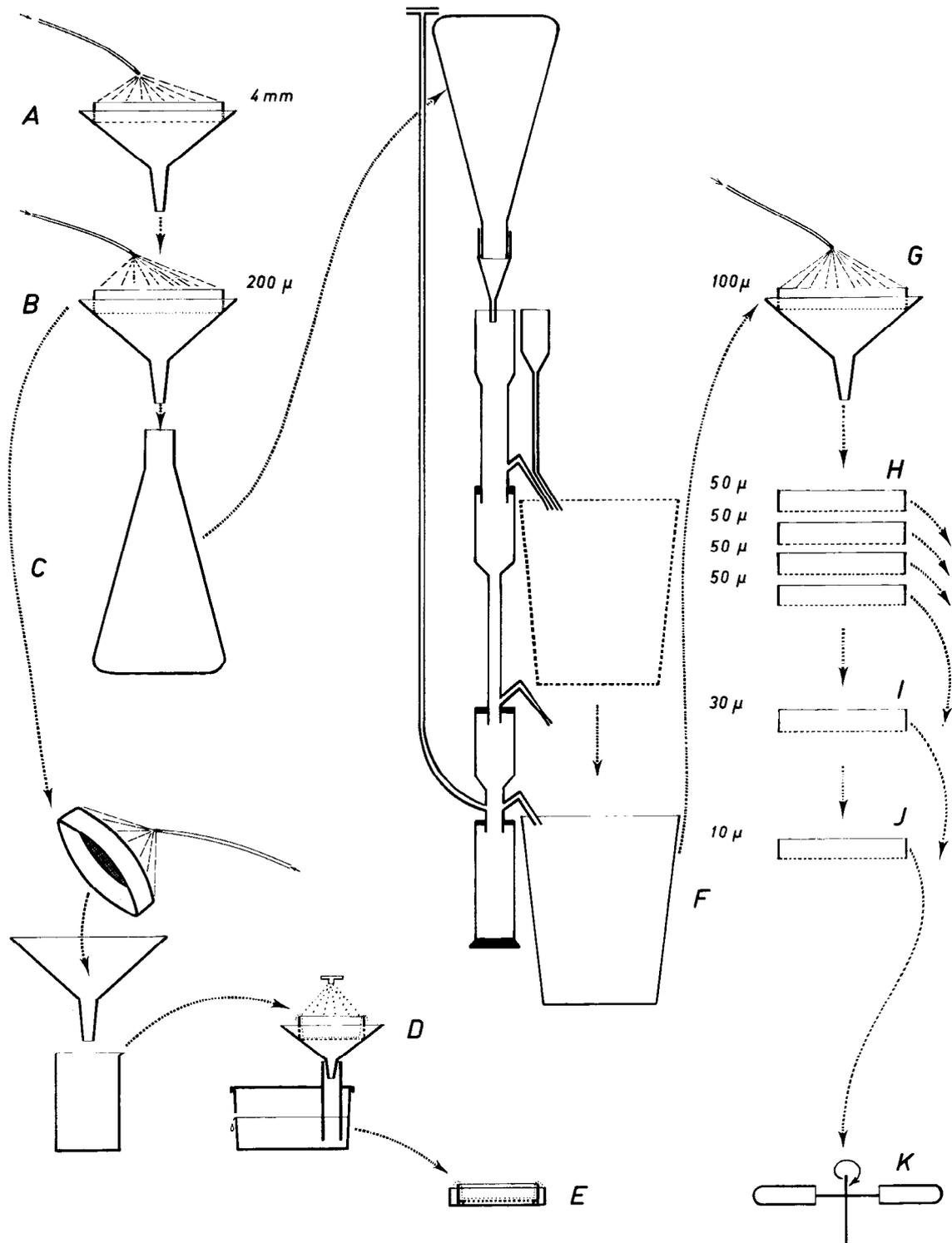


Fig. 1. — Représentation schématique de la méthode d'extraction décrite

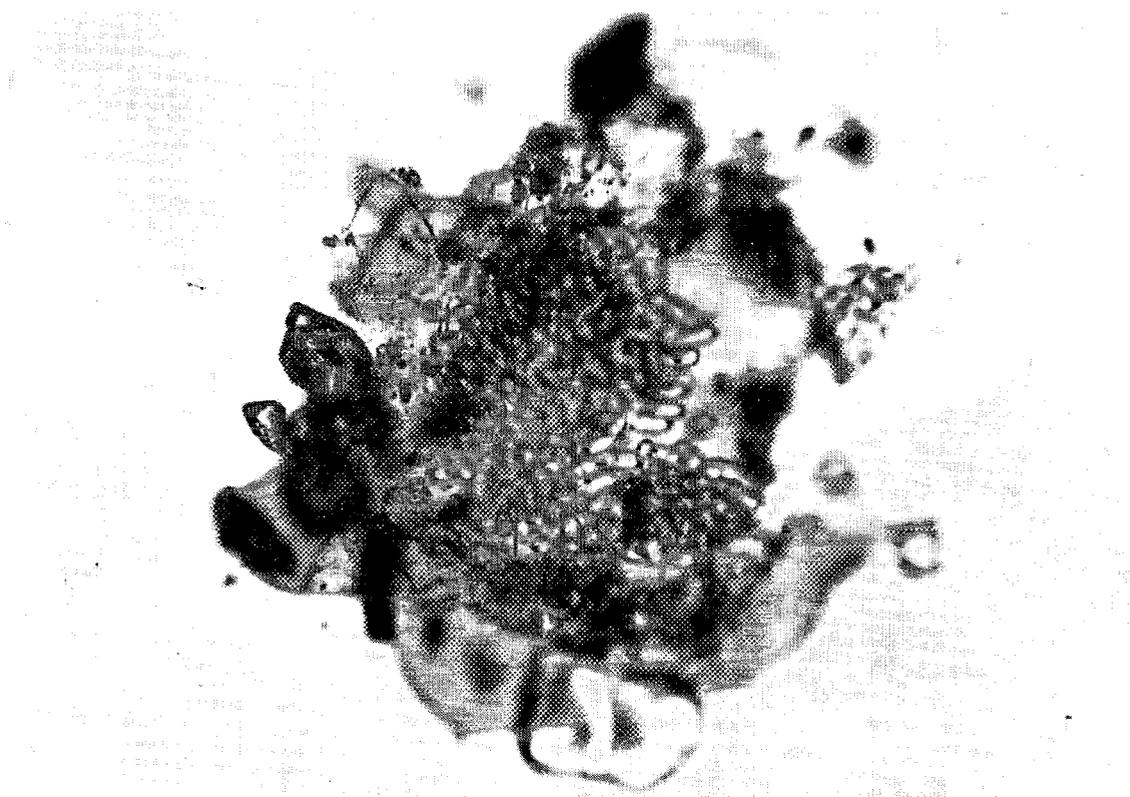


Fig. 2. — Masse d'œufs de *Meloidogyne* agglomérée à des particules minérales.

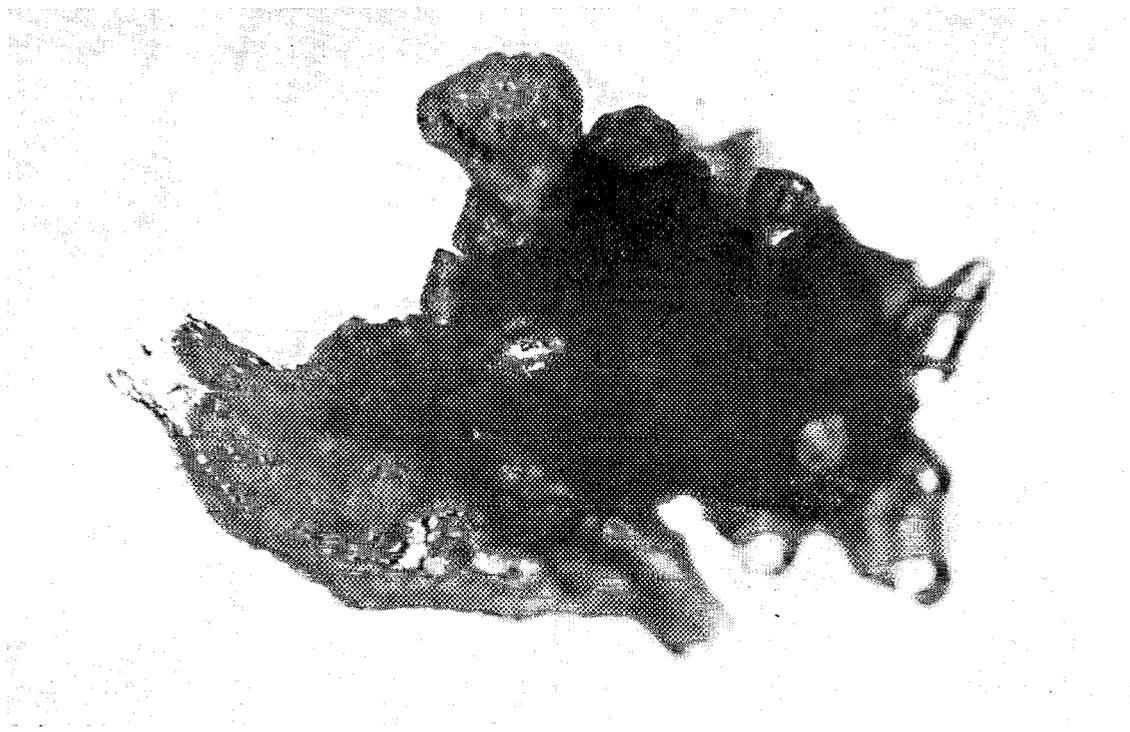


Fig. 3. — Masse d'œufs de *Meloidogyne* accrochée à un fragment de racine et agglomérée à des particules minérales.

testés du Sénégal, la fraction sable rend difficilement utilisable la méthode de GOORIS et D'HERDE, et la fraction argileuse ne permet pas d'utiliser celle de DE GUIRAN.

Il était donc nécessaire de mettre au point une technique d'extraction adaptée aux caractéristiques des sols sénégalais étudiés, caractéristiques qui ne doivent pas être exceptionnelles en zone sahélienne.

TECHNIQUE D'EXTRACTION

Description de la méthode (cf. fig. 1)

Un échantillon de sol de 250 cm³ est lavé successivement sur tamis de 4 mm (A) et sur tamis de 200 µm (B). Pour effectuer un lavage efficace on utilise un jet d'eau en éventail qui présente une forte pression et un débit réduit.

Le refus du tamis A (particules organiques et minérales de grandes tailles) est éliminé.

Le refus du tamis B (fraction organique et fraction minérale supérieures à 200 µm est conservé et placé sur un tamis (D) à grande maille muni d'un filtre de cellulose de type «kleenex». Ce tamis est disposé dans un extracteur à brouillard de SEINHORST (1950) (précipitation : 100 cm d'eau environ par 24 heures). L'eau qui percole à travers l'échantillon entraîne les larves de *Meloidogyne* dans un récipient muni d'un trop plein, relevé périodiquement (tous les cinq jours). La suspension obtenue subit un passage sur «kleenex» (E) et est récupérée dans une boîte de Petri afin de comptage.

La suspension qui traverse le tamis B est récupérée dans l'Erlenmayer (C) et placé sur un élutriateur de SEINHORST. La vitesse de courant est réglée à 100 cm³/mn. Après élutriation (20 mn + 10 mn), le contenu de l'élutriateur, sauf celui du cylindre terminal, est récupéré dans un même récipient (F) et passé sur une série de sept tamis d'ouvertures respectives :

- 100 µm : 1 tamis
- 50 µm : 4 tamis
- 30 µm : 1 tamis
- 10 µm : 1 tamis

Le refus des quatre tamis de 50 µm et des tamis de 30 µm et 10 µm sont récupérés dans un même tube à centrifugation (K). Les nématodes sont disjoints des particules de sol selon la technique de la double centrifugation mise au point par COOLEN et D'HERDE (1972). Les *Meloidogyne* sont ensuite comptés directement.

Discussion

Le refus du tamis B (ouverture : 200 µm) est constitué de particules organiques et minérales (GOORIS & D'HERDE, 1972) comprises entre 0,2 et 4 mm. Le tamis B retient également les masses d'œufs. Il a été montré par coloration de ce refus à la fuschine acide (GOODEY, 1937) que les masses d'œufs de *Meloidogyne* peuvent être libres (fig. 2) ou accrochées à des fragments de racines (fig. 3) mais que, dans les deux cas, elles forment des agrégats avec les particules minérales du sol.

Le lavage de l'échantillon de sol sur le tamis B présente l'intérêt d'éliminer les éléments argileux du sol. Le refus du tamis B pourra alors être placé dans un extracteur à brouillard de SEINHORST sans risque de colmatage des filtres.

Par contre, la suspension qui traverse le tamis B contient la quasi totalité des larves de deuxième stade et des œufs isolés de *Meloidogyne* présents dans le sol. En effet, le nombre de larves et d'œufs isolés qui ne traversent pas ce tamis ne correspond qu'à 0,2-0,3% de leur nombre total (pourcentage évalué après élutriation du refus du tamis B).

L'élutriation du contenu de l'Erlenmayer C permet de séparer les larves et les œufs isolés des plus grosses particules en suspension ; ces dernières sédimentent, en effet, dans le cylindre terminal de l'élutriateur.

L'utilisation d'un courant ascendant de 100 cm³/mn permet de récupérer la presque totalité des larves de stade II et des œufs isolés (tabl. I).

TABLEAU I
EXTRACTION PAR ASPERSION DU CONTENU
DU CYLINDRE TERMINAL DE L'ÉLUTRIATEUR

Vitesse du courant ascendant dans l'élutriateur			
50 cm ³ /mn		100 cm ³ /mn	
Popu- lation totale	Population dans le cylindre terminal de l'élutriateur en pourcentage de la population totale	Popu- lation totale	Population dans le cylindre terminal de l'élutriateur en pourcentage de la population totale
5 350	1%	17 500	0,3%
26 500	0,8%		

Donc, l'utilisation d'un courant ascendant de 100 cm³/mn permet de négliger les individus qui sédimentent dans le cylindre terminal de l'élutriateur.

Le récipient F permet de récupérer le contenu de l'élutriateur et les nématodes sont alors dans une suspension de particules fines limoneuses et argileuses.

L'ensemble des tamis H, I et J permet la récupération des larves et des œufs isolés (tabl. II) en laissant passer les particules argileuses (< 0,2 µm).

TABLEAU II
NOMBRE DE LARVES DE DEUXIÈME STADE
ET D'ŒUFS ISOLÉS
RÉCUPÉRÉS SUR LES DIFFÉRENTS TAMIS
PAR ÉLUTRIATION

Tamis	Larves de 2 ^e stade	Œufs isolés
tamis G : 100 µm	20	0
4 tamis H : 50 µm	3 700	60
tamis I : 30 µm	490	3 580
tamis J : 10 µm	160	0

Une double centrifugation sera nécessaire afin d'obtenir une suspension propre de nématodes.

D'une façon générale, on peut considérer que les quatre tamis de 50 μm (H) permettent de récupérer 85% des larves et qu'en y ajoutant le tamis de 30 μm (I) la récupération des œufs isolés sera de 98%.

Le tamis de 100 μm d'ouverture (G) est utilisé dans le but de retenir des particules relativement volumineuses, mais peu denses, qui n'ont pu sédimenter dans le cylindre terminal de l'élu triateur. Pour certains sols ce tamis est indispensable. Un lavage de ce tamis par un jet en éventail dispensera de récupérer le refus de ce dernier.

En conclusion, le nombre de nématodes contenu dans un échantillon de 250 cm^3 correspond au nombre d'individus (larves de deuxième stade et œufs isolés) comptés après centrifugation (K) et au nombre de larves issues des masses d'œufs après passage à l'asperseur (D).

Le graphique (fig. 4) représente l'allure de cette extraction à l'asperseur pour quatre types de sols (tabl. III), infestés de façon variable. Chaque point est la moyenne de six répétitions.

L'examen de ces résultats montre que la presque totalité des individus est récupérée après 15 jours. Ces nombres représentent en effet de 94,6% à 97,2% de ceux récupérés après 25 jours, temps considéré comme maximum. Des chiffres identiques ont été obtenus, grâce à la méthode décrite plus haut, par DE GUIRAN (non publié).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette nouvelle technique d'extraction a été testée pour quatre types de sol du Sénégal sur lesquels sont situées la plupart des cultures maraîchères.

Leur analyse granulométrique est donnée au tableau III.

TABLEAU III
ANALYSE GRANULOMÉTRIQUE
DES QUATRE TYPES DE SOL DU SÉNÉGAL
SUR LESQUELS
LA NOUVELLE MÉTHODE D'EXTRACTION
A ÉTÉ TESTÉE

Granulométrie	Types de sol			
	A	B	C	D
Humidité	0,45	0,50	2,90	1,35
Argile	2,54	5,84	11,18	7,37
Limon fin	3,05	3,30	7,62	2,29
Limon grossier	8,77	0,99	2,48	4,64
Sable fin	37,21	62,00	40,28	57,11
Sable grossier	49,33	27,10	31,36	26,65

On constate que dans les quatre sols, la fraction sable grossier est toujours importante (30 à 50%); par contre la fraction fine (argile, limon) est plus variable.

Pour chacun de ces sols on a évalué le niveau d'infestation selon la méthode de GOORIS et D'HERDE et selon la méthode décrite ci-dessus.

Pour chacune des deux méthodes, six répétitions ont été effectuées sur des sols homogénéisés manuellement. Les résultats sont donnés au tableau IV qui comporte la moyenne et la dispersion du nombre de *Meloidogyne* présents :

\bar{X} : moyenne du nombre de *Meloidogyne* (6 répétitions) ;

CV : coefficient de variabilité (dispersion en pourcentage de la moyenne).

TABLEAU IV
NOMBRE DE *MELOIDOGYNE*
(colonne de gauche)
ET COEFFICIENTS DE VARIATIONS
(colonne de droite)
OBTENUS PAR LES DEUX MÉTHODES COMPARÉES
POUR QUATRE TYPES DE SOLS DU SÉNÉGAL

	Méthode de Gooris et d'Herde		Nouvelle méthode	
	\bar{X}	CV	\bar{X}	CV
Sol A	1 050	93%	5 300	33%
Sol B	1 730	56%	3 900	17%
Sol C	6 770	37%	11 080	20%
Sol D	203	75%	860	27%

Les chiffres obtenus par la méthode d'extraction décrite sont nettement plus élevés que ceux obtenus par la méthode de GOORIS et D'HERDE. Ils donnent donc une meilleure estimation du niveau d'infestation avec une dispersion plus faible.

La dispersion importante observée avec la méthode DE GOORIS et D'HERDE peut s'expliquer par le fait que cette méthode ne peut être utilisée qu'avec des échantillons de sol petits, donc peu représentatifs (10 g ou 100 g de sol suivant la puissance de la centrifugeuse utilisée) lorsque la population de Nématodes est relativement faible.

CONCLUSION

La méthode décrite permet une évaluation du niveau d'infestation d'un sol par *Meloidogyne* meilleure que par les méthodes classiques, tout en n'employant qu'un matériel courant dans les laboratoires de nématologie. Ainsi, l'élu triateur de SEINHORST, utilisé au Laboratoire de Nématologie de l'ORSTOM à Dakar, pourrait être remplacé par tout appareil fondé sur le même

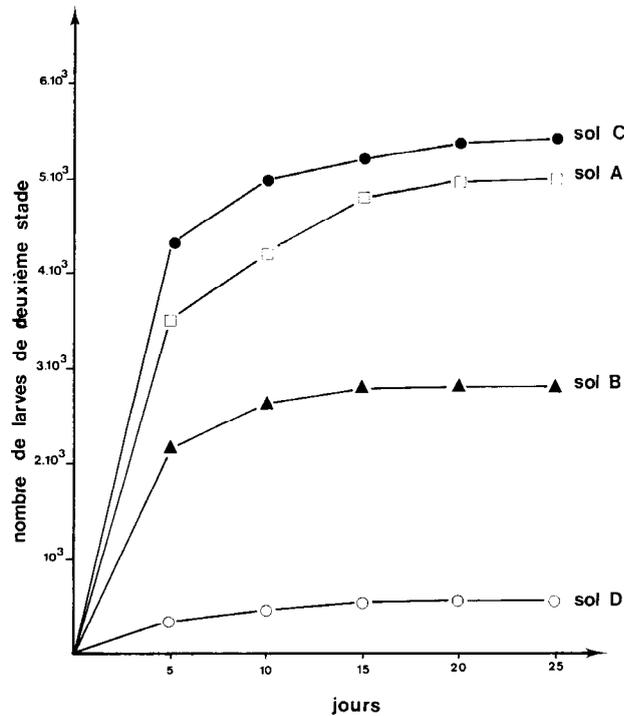


Fig. 4. — Nombres cumulés de larves de 2^e stade, issues des masses d'œufs, après 5, 10, 15, 20, 25 jours dans un extracteur à brouillard de Seinhorst

principe, à savoir une colonne d'eau parcourue par un courant ascendant qui permet de séparer les Nématodes des particules plus denses.

Bien que les résultats finaux ne soient obtenus qu'après un laps de temps relativement long (15 jours à l'aspersion), le temps de manipulation lui-même est relativement court: avec une batterie de six éluutriateurs et une centrifugeuse contenant quatre tubes, deux personnes peuvent effectuer au minimum 40 extractions par jour.

Cette méthode permet de plus, comme nous l'avons vu, de différencier dans les comptages les larves de deuxième stade libres dans le sol, de celles issues des masses d'œufs et des œufs isolés. Cette possibilité de la méthode sera exploitée au cours d'études ultérieures concernant « la phase sol » du cycle des *Meloidogyne*.

Manuscrit reçu au S.C.D. le 31 août 1973.

BIBLIOGRAPHIE

GOODEY (T.) — 1937 — Two methods for staining nematodes in plant tissues. *J. Helm.*, **15**, 137-144.

GOORIS (J.), D'HERDE (C. J.) — 1972 — A method for the quantitative extraction of eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. from soil. State Nematology and Entomology Research station, Ghent, 35 p.

GUIRAN (G. DE) — 1966 — Infestation actuelle et infestation potentielle du sol par les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **262**, 1754-1756.

GUIRAN (G. DE), NETSCHER (C.) — 1970 — Les nématodes du genre *Meloidogyne*, parasites de cultures tropicales. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.*, **11**, 151-185.

SEINHORST (J. W.) — 1950 — De betekenis van de toestand van de grand voor het optreden van aanstasting door het stengelaaltje. *Tijdschr. Pl. Ziekt.*, **56**, 291-349.

SEINHORST (J. W.) — 1956 — The quantitative extraction of nematodes from soil. *Nematologica*, **1**, 249-267.

SEINHORST (J. W.) — 1962 — Modifications of the elutriation method for extracting nematodes from soil. *Nematologica*, **8**, 117-128.