

IDENTIFICATION MORPHOMETRIQUE ET MOLECULAIRE DE QUELQUES POPULATIONS TUNISIENNES D'*HETERODERA AVENAE* ASSOCIÉES AUX CÉRÉALES

N. Namouchi-Kachouri¹ et M.M. B'Chir²

¹ Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, 2049 Ariana, Tunisie

² Institut National Agronomique de Tunisie, 1082 le Belvédère, Tunisie

Résumé. Nous avons tenté d'identifier et de caractériser six populations tunisiennes de différents étages climatiques d'*Heterodera avenae* associées aux céréales par des techniques morphométrique et moléculaire. L'étude morphométrique a montré l'existence de l'espèce *H. avenae* dans la plupart des régions prospectées quoiqu'une légère variabilité a été notée au sein de la population Béja. L'analyse par les enzymes de restriction (*AluI* et *RsaI*) de l'ADN ribosomal n'a pas révélé de polymorphisme intraspécifique dans les différentes populations d'*H. avenae* étudiées. Néanmoins, cette technique a permis de déceler, pour la première fois, l'espèce *Heterodera bordecalis* dans la région de Béja. Ce travail a démontré l'utilité d'une étude combinée entre les méthodes classiques et moléculaires pour pouvoir confirmer certaines variabilités morphométriques relevées au sein des populations étudiées.

Summary. Morphometric and molecular identification of some *Heterodera avenae* populations associated with cereals in Tunisia. Attempts were made to identify and characterize six Tunisian populations of *Heterodera avenae* associated with cereals but from different bio-climates, using morphometric and molecular techniques. The morphometric study demonstrated the occurrence of the species *H. avenae* in most of the sampled areas although some slight variability was noticed within the Béja population. RFLP analysis of rDNA using two enzymes (*AluI* and *RsaI*) didn't show any intraspecific polymorphism within *H. avenae* populations. Nevertheless, this technique revealed for the first time the presence of the species *Heterodera bordecalis* in one of the sampled region (Béja). This study demonstrated the utility of a combination of molecular and classical methods for the confirmation of morphometric variability noticed within the populations studied.

Les nématodes à kystes des céréales et des graminées *Heterodera* forment l'un des plus importants groupes de nématodes avec onze espèces décrites (Wouts *et al.*, 1995; Subbotin *et al.*, 1999). *Heterodera avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons* et *H. bordecalis* sont les principales espèces inféodées aux céréales (Ritter, 1982; Rivoal et Cook, 1993). *Heterodera avenae* est l'espèce la plus commune et la plus répandue de par le monde. Elle a été signalée dans de nombreux continents ou pays comme l'Australie, le Canada, Israël, l'Afrique du Sud, le Japon et la plupart des pays Européens (Kort, 1972), l'Inde (Sharma and Swarup, 1984; Sikora, 1988), l'Asie de l'Ouest et le Pakistan (Sikora, 1988) et l'Arabie Saoudite (Ibrahim *et al.*, 1999). *Heterodera avenae* a été aussi décelée dans différents pays d'Afrique du Nord: en Algérie (Scotto la Massèse, 1961; Lamberti *et al.*, 1975; Mokabli *et al.*, 2001), au Maroc (Franklin, 1951; Rammah, 1994) et en Tunisie (Pagliano, 1925; Delanoue, 1953; Ritter, 1959; Sikora, 1988; Kachouri et B'Chir, 1997). La plupart des travaux qui lui sont consacrés sont limités à l'Europe, l'Australie, le Canada et l'Inde (Swarup et Sosa-Moss, 1990). Aucun travail relatif à l'identification morphométrique et moléculaire des populations tunisiennes d'*H. avenae* n'a été entrepris jusqu'à maintenant.

Les techniques émergentes telles que l'électrophorèse et le séquençage de l'ADN ont suscité une attention par-

ticulière en nématologie (Evans, 1995). La technique PCR-RFLP a été utilisée pour l'identification de plusieurs autres espèces d'*Heterodera* telles que *H. cruciferae*, *H. glycines*, *H. trifolii*, *H. schachtii*, *H. goettingiana* et *H. zaeae* (Szalanski *et al.*, 1997), pour différencier les nématodes à kyste de la pomme de terre, *Globodera pallida* et *Globodera rostochiensis* (Fleming et Powers, 1998) et aussi pour séparer les espèces du groupe *H. avenae* (Bekal *et al.*, 1997; Subbotin *et al.*, 1999; Rivoal *et al.*, 2003). Subbotin *et al.* (1999) ont pu mettre en évidence l'existence d'un polymorphisme intraspécifique au sein des populations d'*H. avenae*. Cette hétérogénéité est due à l'existence au moins de deux types de régions de l'ITS: type A correspond à la plupart des populations européennes, type B à la population indienne et leur combinaison (type A+B) aux populations françaises.

Dans ce présent travail, nous avons réalisé une étude morphométrique et utilisé la technique PCR-RFLP pour identifier quelques populations d'*Heterodera* présentes dans les principales zones céréalières de Tunisie.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel biologique. Les kystes utilisés ont été prélevés sous loupe binoculaire sur des racines de plants de blé provenant des six localités suivantes: Mateur (M), Béja

(B), Kef (Kf), Kairouan (K), Zaghouan (Z) et Séliana (S) (Fig.1). L'analyse morphométrique a porté sur 20 kystes et 20 larves L₂ prélevés dans chaque population. Les larves L₂ ont été isolées à partir de ces mêmes kystes.

Microscopie optique. Les cônes vulvaires sont montés dans un milieu à base de 2% glycérine-agar selon Correia et Abrantes (1997). Les larves collectées sont tuées sous une faible flamme puis transférées dans une solution de formaldéhyde à 4%, et montées dans une goutte de glycérol. Les spécimens sont examinés au microscope optique type LEICA Diaplan. 22 critères morphométriques relatifs aux kystes, cônes vulvaires et stade larvaire (L₂) sont mesurés (Tableaux I et II). Une classification hiérarchique ascendante de ces paramètres a été effectuée en utilisant le programme STATISTICA (version 5.1, édition 97).

Observation au microscope électronique à balayage (SEM). Les différentes populations tunisiennes d'*Heterodera* ont fait l'objet de plusieurs observations au microscope électronique à balayage. Les individus ont été fixés selon Eisenback (1985). Les fixateurs utilisés sont le glutaraldéhyde à 4% et le tétr oxyde d'osmium à 2%. La déshydratation est réalisée par une série de bains successifs d'alcool à 30, 50, 75, 95 et 100%. Le CO₂ a été utilisé comme fluide de transition. Les nématodes, ainsi préparés, sont observés en microscopie électronique à balayage (type Zeiss DSM 940 SEM).

Extraction de l'ADN. Chaque kyste prélevé est placé dans un tube Eppendorf contenant une solution de 10 µl d'eau bi-distillée stérilisée et 8 µl worm lyse buffer



Fig. 1. Localisation des sites de collecte des populations Tunisiennes d'*Heterodera avenae*: Mateur (1), Béja (2), Zaghouan (3), Kef (4); Séliana (5), Kairouan (6).

(125 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 3.75 mM MgCl₂, 2.5 mM DTT, 1.125% Tween20, 0.025% gélatine). Le kyste est ensuite écrasé avec un micro-homogénéisateur Vibro Mixer (Zürich, Switzerland) pendant 2 à 2.5 min, puis additionné de 2 µl de protéinase K (600 µg/ml) (Promega Benelux, Leiden, The Netherlands) et incubé à 65 °C pendant 1 heure puis à 95 °C pendant 10 min (Subbotin *et al.*, 1999). La suspension d'ADN est alors centrifugée à 16000 tr/mn pendant 1min puis stockée à -20 °C. De chaque population, 2 kystes ont été analysés séparément.

Préparation du mélange PCR. Le mélange PCR est constitué de 25.2 µl ddH₂O, 5 µl 10X PCR Taq-buffer contenant 25 mM de MgCl₂, 10 µl 5X Q-solution, 1 µl dNTPs (10 mM chacun) (Taq PCR Core Kit, Qiagen, Germany), 0.3 µl amorce AB 28, 0.3 µl amorce TW 81 à une concentration de 1 µg/µl chacune (synthétisées par Life technologies Merelbeke, Belgique), 0.2 µl Taq-polymerase (Taq PCR Core Kit, Qiagen, Germany) auquel on ajoute 8 µl de la suspension d'ADN. Les séquences des amorces utilisées sont:

AB28 (5'ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT3') et TW81 (5'GTTTCCGTAGGTGAACCTGC3') selon Joyce *et al.* (1994). Les tubes sont alors placés dans un thermocycleur GeneE (New brunswick Scientific, Wetzembeck-Oppem, Belgium), selon le programme décrit par Ferris *et al.* (1994): 4 min à 94 °C, 10 cycles de 1 min à 94 °C, 2 min à 57 °C, 2 min à 72 °C; 25 cycles de 1 min à 94 °C, 1.5 min à 57 °C, 2 min à 72 °C et enfin 10 min à 72 °C.

Une fois l'ADN amplifié, 5 µl du produit PCR sont prélevés, déposés sur un gel d'agarose à 1% puis migrés pendant 45 min à 100 mA. Le gel est ensuite coloré dans une solution de bromure d'ethidium pendant 20 min. Selon l'intensité des bandes d'ADN obtenues, on passe à la digestion enzymatique.

Préparation de la PCR-RFLP. Pour les six populations tunisiennes, la digestion du produit PCR a été faite par les deux enzymes de restriction *AluI* et *RsaI* spécifiques de l'espèce *H. avenae* (Subbotin *et al.*, 1999) et selon les instructions du fabricant (MBI Fermentas GMBH, Germany). Après une incubation de 12 heures dans un bain-marie à 37 °C, les échantillons sont récupérés puis centrifugés pendant 1min à 16000 tr/min. Ten µl de l'ADN amplifié sont prélevés de chaque tube et déposés pour migration sur un gel d'agarose à 1.5% pendant 45 min à 100 mA. Le gel est ensuite coloré dans une solution de bromure d'ethidium puis photographié sous rayons UV. Ces procédures d'amplification et de digestion ont été répétées trois fois pour confirmer les résultats.

RÉSULTATS

Les clichés au microscope optique de kystes, de larves libres et enchorionnées, au microscope électronique à

balayage des champs latéraux et des structures céphaliques des larves de 2^{ème} stade (L₂) sont fournis dans la figure 2. Les mensurations effectuées sur les kystes et les larves L₂ sont données dans les tableaux I et II.

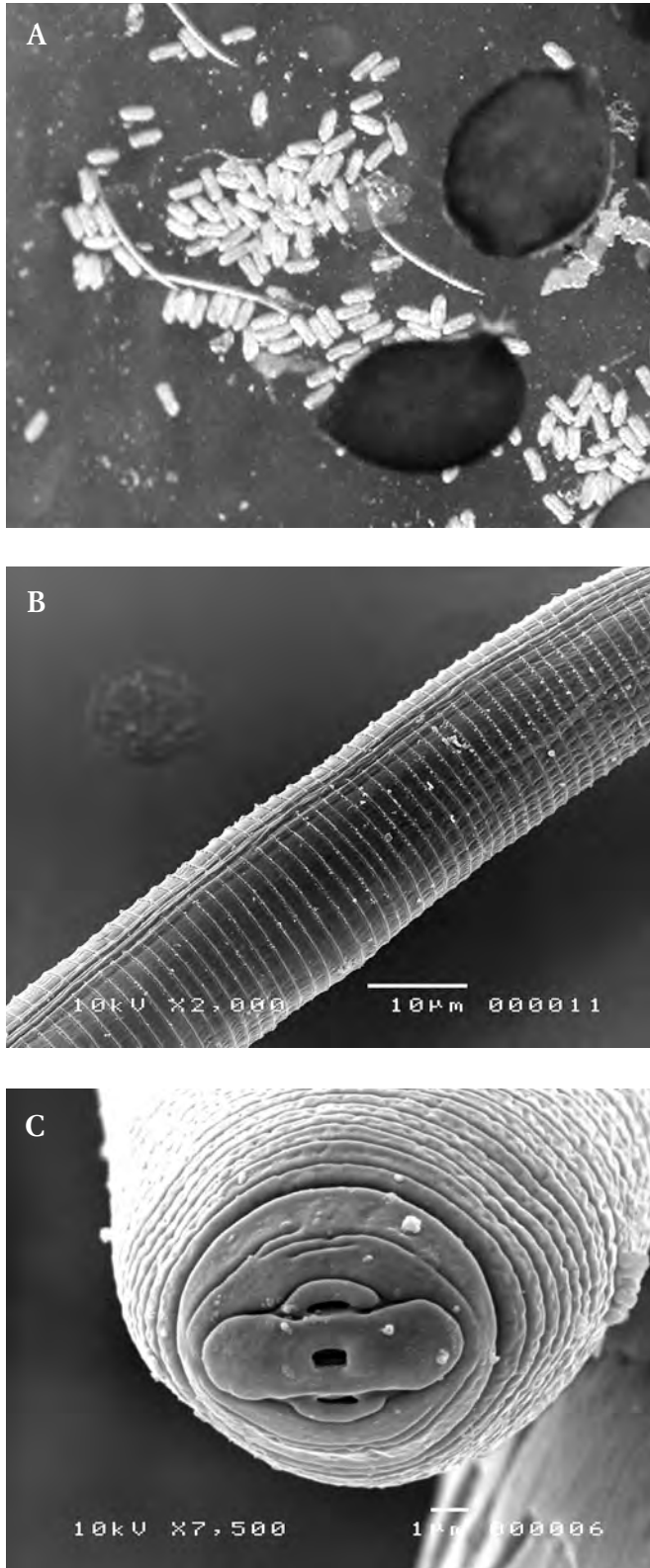


Fig. 2. Photographies d'*H. avenae*. A: Kystes, larves libres et enchorionnées (x 30); B: Champs latéraux de larve de 2^{ème} stade (x 2000); C: structure céphalique de larve de 2^{ème} stade (x 7500).

Observations morphologiques. Les kystes de toutes les populations étudiées sont citrifformes, de couleur brun foncé (Fig. 2A). Les cônes vulvaires présentent des bullae très développés et l'absence de sous-pont. Les larves L₂ montrent quatre champs latéraux (Fig. 2B). La structure céphalique de la juvénile L₂ présente un disque périoral réniforme flanqué latéralement de deux amphides et bordé du bourrelet elliptique (Fig. 2C). Ces structures caractéristiques d'*H. avenae* ont été déjà signalées par Rivoal (1974).

Données morphométriques. Les études morphométriques sur les larves L₂ indiquent une longueur de queue comprise entre 59 et 75 µm et une moyenne de longueur de la partie hyaline ne dépassant pas 1.6 fois la longueur du stylet sauf pour la population de Béja où ce rapport est de 1.66. La structure du cône vulvaire des kystes montre une fente vulvaire étroite de 8.5 µm en moyenne (Tableaux I et II) et des bullae assez développés.

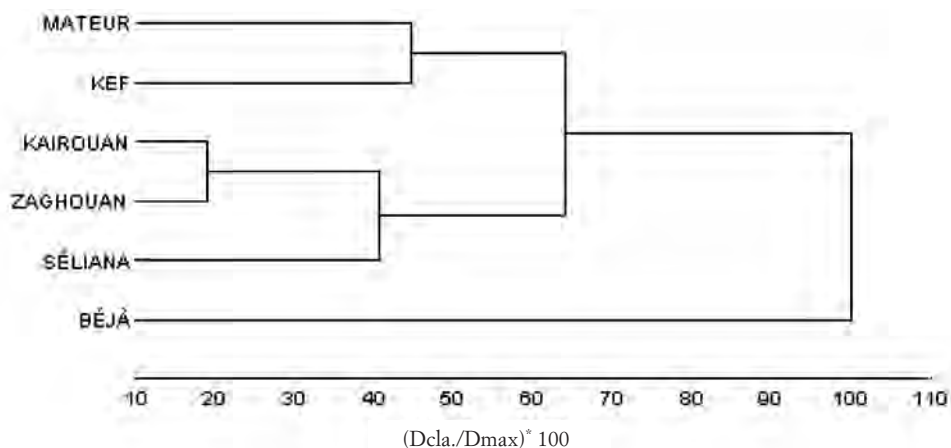
L'analyse par classification hiérarchique ascendante utilisant la méthode du saut minimum (single linkage) de 22 caractères morphométriques de kystes et juvéniles (L₂) fait distinguer la population de Béja du reste des populations (Fig. 3A). L'analyse de ces mêmes caractères par la méthode 1-rPerson distance maximum (complete linkage) sépare les populations en deux groupes comprenant Mateur, Kef et Béja d'une part, Kairouan, Séliana et Zaghuan d'autre part (Fig. 3B).

Données moléculaires. L'amplification des régions de l'ITS de l'ADN ribosomal par les amorces AB28 et TW81 a produit un seul fragment d'environ 1060 bp pour les populations de Zaghuan (Z), Séliana (S), Kairouan (K), Kef (Kf), Mateur (M) et Béja (B) (Fig. 4). La digestion du produit PCR par les deux enzymes de restriction *AluI* et *RsaI* a distingué la population Béja des cinq autres populations (Fig. 5). Les tailles approximatives des fragments de restriction des régions de l'ITS de l'ADNr obtenus par ces deux enzymes sont, pour la population Béja, de l'ordre de 180 et 880 bp pour *AluI* et 1040 bp pour *RsaI* et correspondent à *H. hordecalis*. Pour les cinq autres populations, les tailles des fragments sont de l'ordre 560 et 500 bp pour *AluI* et 720 et 320 bp pour *RsaI*, et correspondent à *H. avenae* (Subbotin *et al.*, 1999). Aucun polymorphisme infraspécifique n'a pu être révélé au sein des populations (Z, M, S, K et Kf) étudiées.

DISCUSSION

Nos résultats démontrent l'existence en Tunisie des deux espèces de nématodes à kystes des céréales, *H. avenae* et *H. hordecalis*, qui se distinguent plus particulièrement par la structure du cône vulvaire de leurs kystes. Le cône vulvaire montre des bullae développés associés à un pont vulvaire étroit pour *H. avenae* alors que pour *H. hordecalis*, cette structure est formée de

A



B

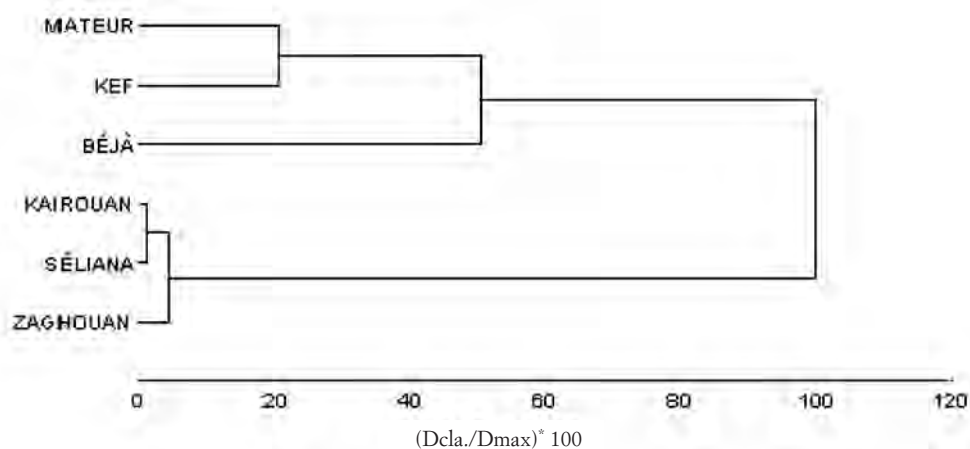


Fig. 3. Dendrogrammes de la classification hiérarchique des six populations tunisiennes du groupe *H. avenae* basée sur 22 caractères morphométriques des kystes et des juvéniles (L_2): A) Distances Euclidiennes; B) Coefficients de corrélation 1- rPearson.

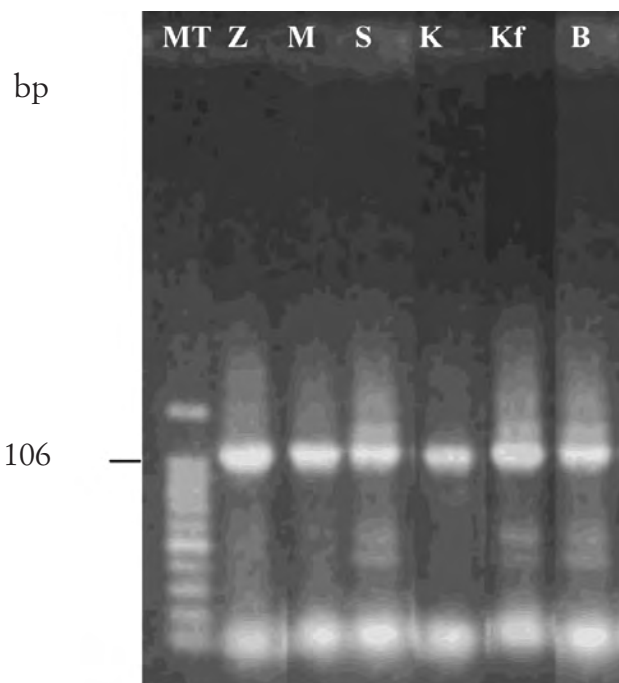


Fig. 4. Produit d'amplification (PCR) de l'ADNr des différentes populations d'*Heterodera* des céréales: Zaghouan (Z), Mateur (M), Kairouan (K), Séliana (S), Kef (Kf) et Béja (B). MT: Marqueur de taille 100 bp ADN.

bullae très peu développés ou absents, un sous-pont assez profond et une zone vulvaire plus large (Mulvey, 1972; Wouts *et al.*, 1995). L'hypothèse de mélange des deux espèces dans la population Béja est renforcée aussi bien par les différences morphométriques fournies par nos résultats qui correspondent à la description d'*H. hordecalis* (Andersson, 1974). La classification hiérarchique ascendante appliquée sur les différents critères morphométriques a fait distinguer la population de Béja par l'existence d'*H. hordecalis* qui pourrait néanmoins se trouver également en mélange avec *H. avenae* dans les populations de Mateur et Kef.

Les résultats de l'analyse moléculaire par PCR-RFLP portant sur un nombre réduit de kystes ont permis d'identifier *H. avenae* de type B (Subbotin *et al.*, 1999) dans les populations Kairouan, Kef, Mateur, Séliana et Zaghouan et *H. hordecalis* dans celle de Béja. Nos résultats confirment en outre la congruence des différences morphométriques et génétiques dans le complexe des nématodes à kystes des céréales qui assurent une identification des espèces impliquées (Bekal *et al.*, 1997; Subbotin *et al.*, 1999; Rivoal *et al.*, 2003).

Comparé à d'autres études phylogénétiques utilisant les techniques du polymorphisme de l'ADN ribosomal (Bekal *et al.*, 1997; Subbotin *et al.*, 1999; Rivoal *et al.*,

2003), le nombre d'enzymes de restriction utilisé dans notre travail est faible; néanmoins les deux enzymes utilisées ont pu différencier *H. avenae* d'*H. hordecalis*. L'utilisation d'un plus grand nombre d'endonucléases pourrait détecter la présence d'autres espèces de nématodes à kystes si elles existent en Tunisie et révéler un

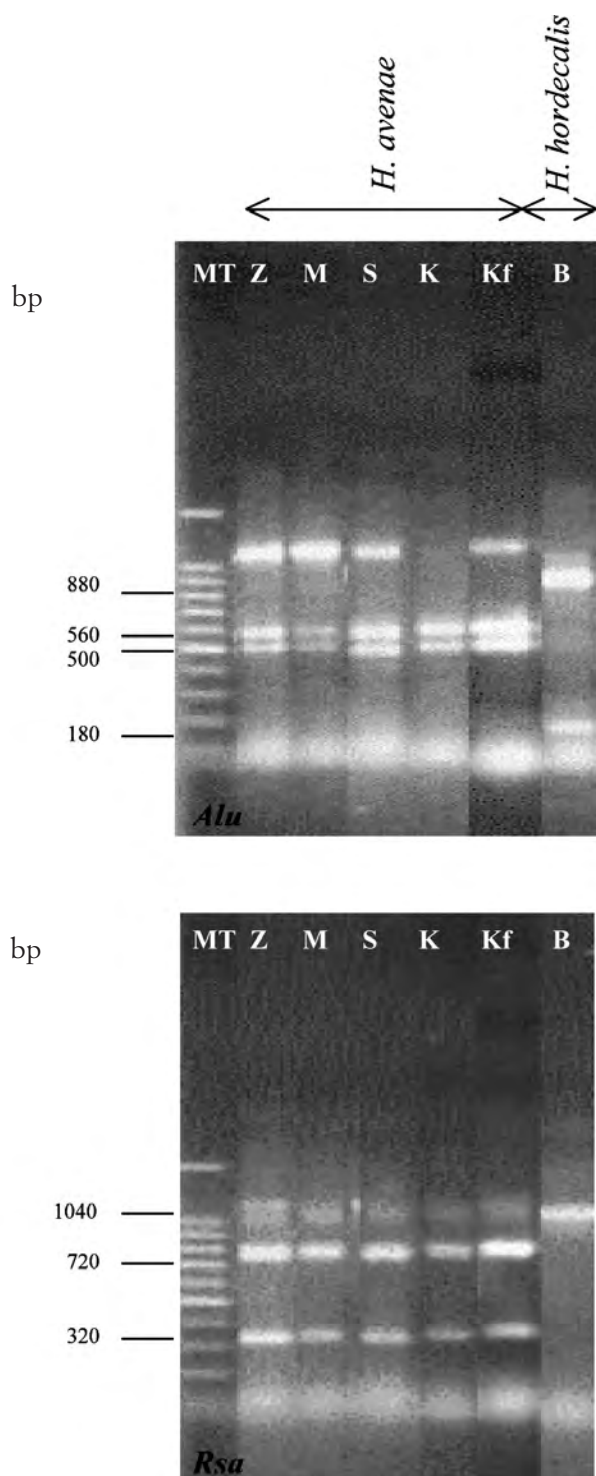


Fig. 5. Patrons PCR-RFLP résultant de la digestion par les deux endonucléases *AluI* et *RsaI* des produits ITS-ADNr amplifiés des populations d'*Heterodera* des céréales: Zaghouan (Z), Mateur (M), Séliana (S), Kairouan (K) et Kef (Kf). *H. hordecalis*: Béja (B). MT: marqueur de taille, 100 bp ADN.

éventuel polymorphisme au sein des populations tunisiennes d'*H. avenae*. L'application de cette technique PCR-RFLP pourrait également évaluer les proportions de chaque espèce *H. avenae* et *H. hordecalis* en mélange dans les populations telles que celle de Béja.

C'est grâce aux techniques de biologie moléculaire que nous avons pu identifier pour la première fois en Tunisie la présence d'*H. hordecalis* dans la région de Béja. Tenant compte de la fiabilité de ces techniques, il serait intéressant de l'élargir à d'autres populations prélevées dans les différentes zones céréalières de notre pays. Des travaux approfondis sur *H. hordecalis* méritent d'être conduits afin de confirmer ces résultats.

REMERCIEMENT

Les auteurs tiennent à remercier Pr. M. Moens et S. A. Subbotin du Centre de Recherche Agricole de Mellebeke (Belgique) ainsi que le Pr. M. Mota de l'Université d'Evora (Portugal) pour leur précieuse aide lors de la réalisation de ce travail.

LITTÉRATURE CITÉE

- Andersson S., 1974. *Heterodera hordecalis* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) a cyst nematode of cereals and grasses in southern Sweden. *Nematologica*, 20: 445-454.
- 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.
- Correia F.J.S. et de O. Abrantes I.M., 1997. An improved technique for mounting *Heterodera* cysts for light microscopy. *Nematologica*, 43: 507-509.
- Delanoue P., 1953. L'anguillulose des céréales. Moyens susceptibles d'en limiter les dégâts en Tunisie. *Tunisie Agricole*, 23 févr.
- Eisenback J.D., 1985. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. Pp. 79-105. In: An Advanced Treatise on *Meloidogyne* (Barker K.R., Carter C.C. and Sasser J.N., eds) Vol. 2. North Carolina State University Graphics, Raleigh, USA.
- Evans K., 1995. Closing the gap between molecular biologists and traditional nematologists. *Nematologica*, 41: 385-394.
- Ferris V.R., Ferris J.M., Faghihi J. et Ireholm A., 1994. Comparisons of isolates of *Heterodera avenae* using 2-D PAGE protein patterns and ribosomal DNA. *Journal of Nematology*, 26: 144-151.
- Fleming C.C. et Powers T.O., 1998. Potato cyst nematode diagnostics: morphology, different hosts and biochemical technique. Pp. 91-114. In: Potato Cyst Nematode, Biology, Distribution and Control (Marks R.J. and Brodie B.B., eds). CAB International, Wallingford, UK.
- Franklin M.T., 1951. *The cyst forming species of Heterodera*. Commonwealth Agricultural Bureaux, England, pp. 147.
- Ibrahim Ahmed A.M., Al Hazmi A.S., Al Yahya F.A. et Alderfasi A.A., 1999. Damage potential and reproduction

- of *Heterodera avenae* on wheat and barley under Saudi field conditions. *Nematology*, 1: 625-630.
- Joyce S.A., Reid A., Driver F. et Curran J., 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. Pp. 178-187. In: Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complexes (Burnell A.M., Ehlers R.U. and Masson J.P., eds). *Proceedings of Symposium and Workshop, COST 812 Biotechnology St. Patrick's College, Maynooth, Co. Kildare, Ireland, Luxembourg, European commission, DG XII*.
- Kachouri N.N. et B'Chir M.M., 1997. Distribution of nematodes associated to cereals in Tunisia. *Sixth Arab Congress of Plant Protection*, October 27-31 Beirut, Lebanon.
- Kort J., 1972. Nematode diseases of cereals of temperate climates. Pp. 97-126. In: Economic nematology (Webster J.M., ed.). Academic Press, New York, USA.
- Lamberti F., Greco N. et Zaouchi H., 1975. A nematological survey of date palm and other major crops in Algeria. *FAO Plant Protection Bulletin*, 23: 156-160.
- Mokabli A., Valette S., Gauthier J.P. et Rivoal R., 2001. Influence of temperature on the hatch of *Heterodera avenae* Woll. populations from Algeria. *Nematology*, 3: 171-178.
- Mulvey R.H., 1972. Identification of *Heterodera* cysts by terminal and cone structures. *Canadian Journal of Zoology*, 50: 1277-1292.
- Pagliano T., 1925. Les anguillules en Tunisie. *Tunisie Agricole*, avril-sept.: 125.
- Rammah A., 1994. Cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) in Morocco. *Arab and Near East Plant Protection Newsletter*, 19: 40.
- Ritter M., 1959. Contribution à l'étude des nématodes phytoparasites de la Tunisie. *Annales INRA Tunisie*, 32: 53-78.
- Ritter M., 1982. Importance des nématodes à kystes des céréales. *Bulletin OEPP*, 12 (4): 307-316.
- Rivoal R. et Cook R., 1993. Nematode pests of cereals. Pp. 259-303. In: Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture (Evans K., Trudgill D.L. and Webster J.M., eds). CAB International, Wallingford, U.K.
- Rivoal R., 1974. Observations de caractères morphologiques de quelques espèces d'*Heterodera* au microscope électronique à balayage. *Sciences Agronomiques Rennes*, 43-49.
- Rivoal R., Bekal S., Valette S., Gauthier J.P. et Yahyaoui A., 2003. Genetic and phenotypic diversity in the graminaeous cyst nematode complex, inferred from PCR-RFLP of ribosomal DNA and morphometric analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 227-241.
- Scotto La Massèse C., 1961. Aperçu sur les problèmes posés par les nématodes phytoparasites en Algérie. Pp. 83-109. In: Les Nématodes, Collection Phytosanitaire. *Journées d'Etudes et d'Information*. C.N.R.A., Versailles (France), 10-17 nov.
- Sharma S.B. et Swarup G., 1984. Cyst Forming nematodes of India. *New Delhi, India. Cosmo Publ.*, 1: 150.
- Sikora R.A., 1988. Plant parasitic nematodes of wheat and barley in temperate and temperate semiarid regions – a comparative analysis. Pp. 46-48. In: Nematodes Parasitic to Cereals and Legumes in Temperate Semiarid Regions (Saxena M.C., Sikora R.A. and Srivastava J.P., eds). ICAR-DA, Aleppo, Syria.
- Subbotin S.A., Waeyenberge L. et Moens M., 2000. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology*, 2: 153-164.
- Subbotin S.A., Waeyenberge L., Molokanova I.A. et Moens M., 1999. Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometrics and rDNA-RFLPs. *Nematology*, 1: 195-207.
- Swarup G. et Sosa-Moss C., 1990. Nematode parasites of cereals. Pp. 109-136. In: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture (Luc M., Sikora R.A. and Bridge J., eds). CAB International, Wallingford, U.K.
- Szalanski A., Sui D.D., Harris T.S. et Powers T.O., 1997. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology*, 29: 255-267.
- Wouts W.M. et Sturhan D., 1995. *Heterodera aucklandica* sp. n. (Nematoda: Heteroderidae) from a New Zealand native grass, with notes on the species of the *H. avenae* group. *New Zealand Journal of Zoology*, 22: 199-207.