

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTEGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

**COLLECTE DE NEMATODES ENTOMOPATHOGENES INDIGENES EN VUE DE LEUR UTILISATION EN
LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES INSECTES SOUTERRAINS AU MAROC**

Y. BEN SEDDIK ⁽¹⁾, A. BOUTALEB JOUTEI ⁽¹⁾, S. AMIRI ⁽¹⁾ & A. BLENZAR ⁽²⁾

⁽¹⁾ Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, Maroc

⁽²⁾ Faculté des Sciences de Meknès – Université Moulay Ismaïl, Maroc
benseddikyousséf@gmail.com

RESUME

L'objectif de l'étude a été de mettre en évidence la présence naturelle des nématodes entomopathogènes (NEP) dans trois régions du Maroc : Saïs, Moyen Atlas et Gharb. La présence de nématodes a été recherchée dans 70 échantillons de sol. Cinq échantillons ont été positifs par rapport à la présence des NEP. Trois contenaient des nématodes Heterorhabditidae et deux des nématodes Steinernematidae. Les sols où les NEP, ont été trouvés diffèrent considérablement au niveau de leurs textures, pH et teneurs en matières organiques.

Mots-clés : Maroc, nématodes entomopathogènes, Heterorhabditidae, Steinernematidae.

ABSTRACT

ISOLATION OF INDIGENOUS ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES FOR USE AS BIOLOGICAL CONTROL AGENTS AGAINST SOIL-DWELLING PESTS IN MOROCCO.

A survey was carried out in three Moroccan regions: Saïs, Middle Atlas and Gharb. The aim of the survey was to look at the natural occurrence of entomopathogenic nematodes (EPN) in Morocco. Seventy soil samples were tested for the presence of EPN. Five soil samples were positives for EPN detection: 3 samples contained Heterorhabditidae nematodes and 2 others contained Steinernematidae nematodes. Soils where EPN were found differ as regards their characteristics on texture, pH and organic matter contents.

Keywords: Morocco, entomopathogenic nematodes, Heterorhabditidae, Steinernematidae.

INTRODUCTION

Les némaodes entomopathogènes (NEP) des genres *Steinernema* et *Heterorhabditis* sont des pathogènes obligatoires infectant un grand nombre d'insectes passant une partie plus ou moins importante de leur cycle de vie dans le sol. Ces nématodes sont naturellement et mutuellement associés avec des bactéries des genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* avec lesquelles ils forment des symbioses (Adams *et al.*, 2006). La seule forme de ces nématodes capable de survivre et de persister à l'extérieur de l'hôte est le troisième stade appelé « larve infestante » (Glazer, 1996). Cette larve porte dans son intestin des cellules des bactéries symbiotiques (Poinar, 1966). Quand le nématode trouve un hôte convenable, il le pénètre afin de gagner l'hémolymphe. La pénétration se fait à travers des ouvertures naturelles (bouche, anus), les blessures ou à travers le tégument dans le cas du genre *Heterorhabditis* (Lewis *et al.*, 2006). Une fois, le nématode dans l'hémolymphe de l'hôte, il libère les cellules bactériennes qui provoquent la mort de l'hôte après environ 48 heures par septicémie (Mauléon *et al.*, 2005). Les bactéries libérées produisent des antibiotiques qui inhibent la colonisation du cadavre de l'hôte par d'autres microorganismes. Ces bactéries favorisent aussi la croissance et le développement des nématodes via la fourniture des nutriments résultant de la digestion des tissus de l'hôte (Mauléon *et al.*, 2005).

Les NEP sont largement présents dans les sols mondiaux. Leur abondance et leur distribution sont tributaires des facteurs abiotiques tels que les propriétés chimiques (pH, éléments minéraux, etc.) et physiques des sols (texture), l'humidité, la température, les radiations solaires, etc. et des facteurs biotiques comme la disponibilité des hôtes, la compétition interspécifique et les ennemis naturels.

Au Maroc, aucune étude n'a vérifié la présence naturelle des NEP indigènes. Cette étude est cependant d'importance car elle présente des perspectives très intéressantes au niveau mondial par rapport à l'utilisation de ces organismes comme agents de lutte biologique contre plusieurs insectes nuisibles. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude a été d'isoler des nématodes indigènes en vue de les utiliser par la suite lors d'essais de lutte biologique contre des insectes souterrains.

MATERIEL ET METHODES

ELEVAGE DE *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDOPTERA : PYRALIDAE)

Afin d'isoler les NEP à partir du sol, un élevage de la grande teigne des ruches *G. mellonella* a été effectué. Cet élevage a été réalisé dans des boîtes aérées en plastique (25*15*12 cm), contenant un milieu nutritif artificiel dont la composition est : 100 cl de son, 50 cl de farine de maïs, 15 cl de farine de blé, 5 cl de lait en poudre, 15 cl de glycérine, 35 cl de miel et 3 cuillères de levures de boulanger. L'élevage a été maintenu dans une étuve où la température et l'humidité relative étaient respectivement fixées à 28,5 °C et 34,5 %. Dans ces conditions, le cycle de développement de l'insecte dure environ 2 mois. A la fin de chaque cycle, les larves de dernier stade de la teigne ont été récupérées afin de les utiliser comme appât pour capturer des nématodes.

ECHANTILLONNAGE DU SOL

A l'aide d'une tarière, des échantillons du sol ont été prélevés entre 5 et 30 cm de profondeur à côté de plusieurs espèces végétales (olivier, blé tendre, jachère, etc.). Chaque échantillon d'environ 300 g de sol a été mis dans une boîte en plastique (10*10*6 cm³) contenant les informations inhérentes à l'échantillon en question. Les échantillons sont ramenés au laboratoire en les gardant à l'obscurité et la fraîcheur.

TECHNIQUE *GALLERIA*-TRAP

Cinq chenilles du dernier stade de *G. mellonella* ont été placées dans chaque boîte contenant un échantillon de sol. Les boîtes ont été fermées, inversées afin d'obtenir un meilleur contact entre le

sol et les chenilles et déposées dans une étuve à l'obscurité à 20 °C. Après 7-8 jours d'incubation, les boîtes ont été ouvertes et les chenilles de *G. mellonella* vivantes et mortes ont été récupérées. La couleur noirâtre et l'odeur putride indiquent que les chenilles sont mortes d'une façon naturelle, elles sont alors écartées de celles présentant une couleur rouge plus ou moins foncée, ou une couleur jaune, et qui sont supposées être vivantes et attaquées par les larves infestantes de NEP. Les chenilles rouges ou jaunes ont été déposées dans le dispositif de récolte des larves infestantes des NEP.

RECOLTE ET STOCKAGE DES NEP

Le dispositif de récolte des larves infestantes des NEP est aussi appelé le piège de White (White, 1927). La face supérieure d'une petite boîte de Pétri (85*10 mm²) est placée dans une large boîte de Pétri (135*17.5 mm²). Ensuite, la face supérieure de la petite boîte est couverte par un papier filtre sur lequel les chenilles mortes de *G. mellonella* sont disposées. Puis, de l'eau distillée est versée dans la grande boîte de Pétri de façon à ce que la solution atteigne les extrémités du papier filtre. L'ensemble est alors maintenu à l'obscurité et à la température ambiante à 20 °C. Une fois que les larves infestantes commencent à migrer vers l'eau distillée, elles sont récoltées et lavées plusieurs fois en utilisant des tamis de mailles convenables. Ensuite les nématodes sont stockés au réfrigérateur à 8 °C.

ANALYSES DU SOL

Afin de déterminer l'effet des caractéristiques physico-chimiques du sol sur la présence des NEP, des analyses du sol, ont été réalisées avec les échantillons positifs.

MESURES MORPHOMETRIQUES

Les mesures morphométriques ont été réalisées sur les larves infestantes fixées entre lame et lamelle selon la méthode de Seinhorst (1964 in Elidrissi 2003). Les mesures de 20 larves infestantes pour chaque isolat ont été effectuées avec un microscope optique en utilisant un oculaire morphométrique. Les mesures portent sur la longueur du corps (L), la largeur maximale du corps (L_{max}), la longueur de la queue (LQ) et le rapport longueur du corps/ longueur de la queue (c).

RESULTATS

NEMATODES ENTOMOPATHOGENES ISOLEES ET CARACTERISTIQUES DES SITES D'ISOLEMENT

Durant l'étude, 70 échantillons ont été prélevés dans trois régions marocaines : Saïs (54 échantillons), Moyen Atlas (6 échantillons) et Gharb (10 échantillons). La technique *Galleria*-trap a révélé la présence de NEP dans 5 échantillons : 3 isolats contenaient des Heterorhabditidae et 2 isolats des Steinernematidae (figures 1, 2, 3, 4 et 5).



Figure 1 : Larves infestantes de l'isolat 1
Figure 1 : infesting larva of sample 1



Figure 2 : Larves infestantes de l'isolat 2
Figure 2 : infesting larva of sample 2



Figure 3 : Larves infestantes de l'isolat 3
Figure 3 : infesting larva of sample 3



Figure 4 : Larves infestantes de l'isolat 4
Figure 4 : infesting larva of sample 4

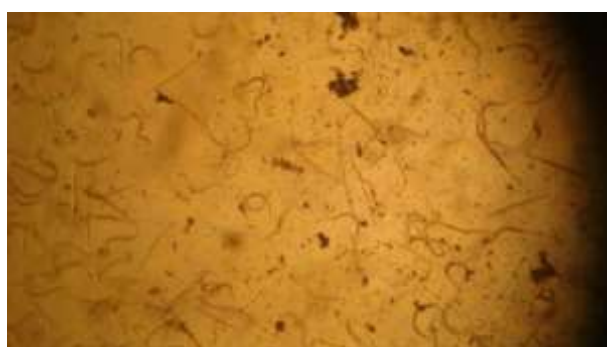


Figure 5 : Larves infestantes de l'isolat 5
Figure 5 : infesting larva of sample 5

Les NEP détectés, ont été isolés essentiellement dans le Saïs (quatre isolats) et le Moyen Atlas (un seul isolat). Ces NEP ont été trouvés dans les sols existants sous des arbres d'olivier, caroubier, vigne et pommier. Quatre isolats ont été détectés dans des sols recevant des intrants (fertilisation, irrigation, traitements phytosanitaires, travail du sol, etc.). Alors qu'un seul isolat a été collecté d'un sol de caroubier n'ayant reçu aucun traitement (tableau I).

Tableau I : Espèces végétales et régions où les NEP ont été collectés

Table I: Plant species and regions in which NEP have been collected

Isolat	Famille des NEP	Espèces végétales	Régions	Caractère du site
1	Heterorhabditidae	Olivier	Saïs	verger
2		Vigne	Saïs	vignoble
3		Olivier	Saïs	verger
4	Steinernematidae	Caroubier	Saïs	naturel
5		Pommier	Moyen Atlas	verger

ANALYSE DU SOL

Les analyses des sols ont révélé des différences en ce qui concerne les caractéristiques physico-chimiques (texture, pH et matière organique ; tableau II).

Tableau II : Analyse des sols où les NEP ont été isolés
Table II : Analyses of soils from which NEP have been isolated

Profondeur (cm)	5-30	5-30	5-30	5-30	5-30
Sable %	14.2	77.5	39.4	50.1	12.5
Limon %	62.3	0.7	32.6	31.1	52.6
Argile %	23.5	21.8	28.0	18.8	34.9
pH	7.61	7.85	7.59	7.45	7.45
Matière Organique %	1.63	1.07	3.76	6.99	5.81
Présence des NEP	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5

MESURES MORPHOMETRIQUES

Les tableaux III et IV présentent les mesures morphométriques des larves infestantes des NEP isolés :

Tableau III : Mesures morphométriques des larves infestantes des isolats des Heterorhabditidae
Table III : Morphometric measures of infesting larvae from Heterorhabditidae isolates

Mesure	L (μm)	L _{max} (μm)	LQ (μm)	c
Isolat 1	607,20 \pm 34,68	28,98 \pm 3,43	87,46 \pm 3,02	6,9
Isolat 2	692,76 \pm 26,71	32,08 \pm 1,71	98,15 \pm 1,57	7
Isolat 3	704,83 \pm 25,55	34,24 \pm 1,60	98,23 \pm 1,42	7,2

Tableau IV : Mesures morphométriques des larves infestantes des isolats des Steinernematidae
Table IV : Morphometric measures of infesting larvae from Steinernematidae isolates

Mesure	L (μm)	L _{max} (μm)	LQ (μm)	c
Isolat 4	866,98 \pm 50,52	30,36 \pm 2,45	70,98 \pm 1,16	12,2
Isolat 5	511,29 \pm 62,72	20,61 \pm 1,89	53,04 \pm 2,90	9,6

DISCUSSION

Les NEP ont été isolés dans des sols qui diffèrent au niveau de leurs textures. Les isolats 1, 3 et 5 ont été collectés des sols caractérisés par la dominance d'éléments lourds comme du limon et de l'argile. L'isolat 2 a été collecté d'un sol où le sable est le plus dominant (77,5 %). Tandis que l'isolat 4 a été trouvé dans un sol caractérisé par une égalité de proportion entre les éléments lourds et les éléments légers (tableau II). Cela a aussi été constaté dans des essais de laboratoire qui ont montré que la texture et la structure, affectent de façon différente les NEP (Shapiro-Ilan *et al.*, 2000 ; Susurluk, 2006).

Tous les NEP ont été isolés à partir de sols présentant des pH neutres ou légèrement alcalins. Ce résultat est en accord avec ceux de Mauléon *et al.* (2005).

Le plus grand nombre de NEP collectés a été obtenu chez des sols travaillés par l'Homme et où des intrants ont été apportés. Ces apports (fertilisation, traitements phytosanitaires, irrigation, etc.) peuvent agir directement, i.e. via l'amélioration de la structure par le travail du sol ou indirectement, i.e. via les fertilisants qui influencent le pH du sol, sur la présence et la distribution des NEP (Stuart *et al.*, 2006). Ce résultat est paradoxal car Zimmerman & Cranshaw (1990) ont montré que certains pesticides, en plus des nématicides, peuvent être très nocifs pour les NEP.

CONCLUSION

Le présent travail a permis de montrer que les nématodes entomopathogènes (NEP) existent naturellement au Maroc. Ceci a été mis en évidence grâce à l'application de la technique de *Galleria*-trap sur les échantillons du sol collectés dans les régions de Saïs, du Moyen Atlas et de Gharb. Ainsi, de futures expérimentations pourront être réalisées afin d'isoler et d'identifier d'autres nématodes entomopathogènes pour les utiliser dans des expérimentations de lutte contre plusieurs types d'insectes ravageurs souterrains (vers blancs, taupins, vers gris, etc.).

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur vive gratitude, leur profond respect et leur sincère reconnaissance au docteur Patrick Tailliez de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université Montpellier II France, pour son aide précieuse et ses conseils de qualité qui nous ont été très utiles durant toute la durée de l'étude. Nous tenons aussi à remercier les professeurs Ahmed Sekkat et Abdeslam Tahiri, et Messieurs Ali Jouadi et Said Rabeh qui se sont montrés coopératifs et serviables. Nous tenons également à remercier Monsieur Mohamed Haddan pour les cadres des ruches d'abeilles qui nous ont servi pour collecter les larves de la grande teigne des ruches afin d'initier l'élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams B. J., Fodor A., Koppenhofer H. S., Stackbrandt E., Stock S.P. & Klein M.G., 2006. Reprint of « biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens ». *Biological Control*, 38 : 4-21.
- Elidrissi M., 2003. Contribution à l'étude des nématodes phytoparasites et de l'efficience technico-économique de l'utilisation des nématicides sur bananier dans la région du Gharb (Maroc). *Mémoire de troisième cycle en Agronomie. ENA Meknès, Maroc*, 112p.
- Glazer I., 1996. Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6 : 373-378.
- Lewis E. E., Campbell J., Griffin C., Kaya H. & Peters A., 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38 : 66-79.
- Mauléon, H. Boemare N., Denon D., Briand & S. Pages S., 2005. Les nématodes entomopathogènes : Steinernematidae et Heterorhabditidae. Institut national de recherche agronomique France. 31p.
- Poinar Jr. G.O., 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Nematologica*, 12 : 105-108.
- Shapiro-Ilan D. I., McCoy C., Fares A., Obreza T & Dou H., 2000. Effects of Soil Type on Virulence and Persistence of Entomopathogenic Nematodes in Relation to Control of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.*, 29 : 1083-1087.
- Stuart R. J., Barbercheck M. E., Grewal P. S., Taylor R. J. & Hoy C. W., 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models. *Biological Control*, 38 : 80-102.
- Susurluk A., 2006. Effectiveness of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae* against *Tenebrio molitor* (Yellow Mealworm) larvae in different soil type at different temperature. *Turk J. Biol*, 30 : 199-205.
- White G. F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66 : 302-303.
- Zimmerman R. & Cranshaw W. S., 1990. Compatibility of three entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. *J. Econ. Entomol.*, 83 : 97-100.