



Identification morphobiométrique de *Ditylenchus dipsaci* et *D. destructor*

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété du ministère chargé de l'agriculture, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique de la méthode.

| n° méthode | Consultation publique | | Validité | |
|--|-----------------------|-----------|----------------|-----------------------------|
| | Début | Fin | Début | Fin |
| NS./97/02 version a NG./97/03 version a et NG./97/04 version a | - | - | 1997 | Septembre 2010 ¹ |
| MOA 013 partie B version 1a | Juillet 2010 | Août 2010 | Septembre 2010 | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

¹ La nouvelle méthode est immédiatement applicable (le délai de 18 mois ne s'applique donc pas), les clés d'identification donnés par les anciennes méthodes étant insuffisamment précises et pouvant conduire à des résultats erronés.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| PREAMBULE | 4 |
| Objet des méthodes officielles | 4 |
| Glossaire, abréviations et documents connexes | 4 |
| Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus..... | 4 |
| Échantillonnage et échantillon | 4 |
| Modification des méthodes officielles | 4 |
| Considérations d'ordre métrologique..... | 5 |
| Obligations réglementaires et limites de responsabilité | 5 |
| Revue des méthodes officielles, amendement et modification | 6 |
| ORIGINE DE LA METHODE | 7 |
| PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE..... | 8 |
| Modifications | 8 |
| Améliorations | 8 |
| DESCRIPTION DE LA METHODE | 9 |
| 1. Objet | 9 |
| 2. Domaine d'application | 9 |
| 3. Produits et consommables | 9 |
| 4. Matériel | 9 |
| 5. Mode opératoire | 10 |
| 6. Formulation des résultats | 10 |
| 7. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants | 10 |
| 8. Conservation des reliquats de matériels utilisés..... | 11 |
| LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE | 12 |
| REMERCIEMENTS..... | 12 |
| BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE | 13 |
| ANNEXE | 14 |

PREAMBULE

OBJET DES MÉTHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation...). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.

Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABRÉVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.

Certains documents (composition de milieux et tampons...) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSÉES AUX LABORATOIRES AGRÉÉS OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ÉCHANTILLONNAGE ET ÉCHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.

L'échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.

Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES MÉTHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle...).

Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.

Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.

Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Tout autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDÉRATIONS D'ORDRE MÉTROLOGIQUE

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes).

| | |
|--------------------|--|
| Volume | volume < à 10 mL : EMT = ± 10% Volume ≥ à 10 mL : EMT = ± 5 % |
| Masse | EMT = 10% |
| pH | EMT = 0,3 u |
| Température | incubateur : EMT = ± 3°C réfrigérateur : 5°C et EMT = ± 4°C congélateur : ≤ -18°C congélateur froid intense : ≤ -65°C |
| Longueur | EMT = 10% |
| Temps | EMT = 10% |

OBLIGATIONS RÉGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITÉ

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique ...).

Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.

Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'alimentation, de l'agriculture, et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES MÉTHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Les méthodes officielles sont revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

La présente méthode a été rédigée par la station de nématologie du Laboratoire national de la protection des végétaux. Elle remplace les premières versions rédigées en 1997 (NS./97/02 version a, NG./97/03 version a et NG./97/04 version a).

Des remerciements sont adressés à l'ensemble des agents de la station de nématologie pour leur participation active à la correction du document.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par le pôle méthodologie du LNPV.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: le version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

MODIFICATIONS

Les chapitres « identification » des 3 versions précédentes (NS./97/02 version a, NG./97/03 version a et NG./97/04 version a) sont regroupés dans la présente version.

AMÉLIORATIONS

Les chapitres « identification » des 3 versions précédentes (NS./97/02 version a, NG./97/03 version a et NG./97/04 version a) sont détaillés dans la présente version.

DESCRIPTION DE LA METHODE

1. Objet

Cette méthode s'applique à l'identification morphobiométrique de *Ditylenchus dipsaci* et *D. destructor*.

Elle est généralement mise en œuvre suite à une détection de ce nématode sur sol ou organes végétaux dont les modalités de réalisation sont décrites dans la MOA 013 partie A.

2. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Nématodes isolés en suspension dans de l'eau.

Grandeur de l'objet soumis à l'analyse.

L'analyse porte sur 10 individus minimum de stade L4 ou femelles, ou sur la totalité d'entre eux lorsque l'échantillon est constitué de moins de 10 individus.

Précautions particulières à prendre.

Le délai maximal entre la réception de l'extrait et le début effectif de l'identification ne doit pas dépasser 10 jours, l'échantillon devra pendant ce temps être conservé au réfrigérateur.

3. Produits et consommables

Eau courante
Lames et lamelles couvre-objet
Lut ou vernis ou produit équivalent
Huile d'immersion

4. Matériel

Petit matériel :

Verrerie courante de laboratoire
Pipette, cil monté sur aiguille ou matériel équivalent
Pissette d'eau

Gros matériel :

Optique :
- microscope stéréoscopique (loupe binoculaire) à éclairage diascopique, à faible grossissement (x 6 à x 60).
- microscope photonique à fort grossissement (x 16 à x 1000).

5. Mode opératoire

Après détection (voir MOA013 partie A), les nématodes du genre *Ditylenchus* sont montés entre lame et lamelle selon le procédé décrit dans la **MOA 012 chapitre 1.3.2.1**.

Les individus sont ensuite observés au microscope photonique à fort grossissement pour l'identification.

Les caractères distinctifs de *D. dipsaci* et *destructor* sont regroupés dans le tableau 1 ci-après, où figure également *D. myceliophagus*. Ce dernier est une espèce de *Ditylenchus* qui se nourrit de mycélium de champignon. Il est fréquemment observé et peut prêter à confusion.

Les *Ditylenchus* examinés appartiennent à l'espèce *dipsaci* ou *destructor* si l'ensemble des critères observés par individu sont conformes à ceux figurant dans le tableau pour l'espèce considérée.

Si un seul des critères observés est différent de ceux indiqués dans le tableau l'individu n'appartient pas à l'espèce recherchée.

Tableau 1. Critères d'identification des femelles et des larves L4 de *Ditylenchus*

| | Larves et femelles | | | Femelles |
|-------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|---|
| | Longueur du stylet | Forme de la queue | Nombre de lignes latérales | Longueur du sac post vulvaire / distance vulve anus |
| <i>D. dipsaci</i> | [10 - 12 µm] | courte et pointue | 4 | ≈ 1/2 |
| <i>D. destructor</i> | [10 - 13 µm] | extrémité émoussée | 6 | ≈ 2/3 |
| <i>D. myceliophagus</i> | [6 - 9 µm] | extrémité émoussée | 6 | ≈ 1/2 |

Les illustrations des trois différentes espèces sont présentées en annexe.

6. Formulation des résultats

Le résultat est exprimé sous forme qualitative :

Pour chaque espèce recherchée, la formulation du résultat est le nom de l'espèce *Ditylenchus dipsaci* ou *Ditylenchus destructor* selon le cas, suivie de la mention « détecté » ou « non détecté ».

7. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le reliquat de l'extrait observé est susceptible d'être contaminant.

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ce risque pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement : traitement des effluents, destruction contrôlée des déchets.

8. Conservation des reliquats de matériels utilisés

Il n'y a pas d'exigences particulières concernant la conservation des reliquats de matériels utilisés sauf spécifications contraires de la Direction générale de l'Alimentation au sein du Ministère chargé de l'agriculture.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

| Référence | Titre |
|-------------------------|---|
| MOA 012 | Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites |
| MOA 013 partie A | Détection du genre <i>Ditylenchus</i> sur sols, substrats et organes végétaux (bulbes, rhizomes, caïeux, cormus, tubercules, graines) |
| GLO 001 | Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV |

REMERCIEMENTS

Le Laboratoire national de la protection des végétaux remercie :

- l'INRA BIO 3 P Le Rheu ;
- le GEVES Beaucouzé
- l'IRD Fort de France
- l'INRA Sophia Antipolis

pour l'expertise qu'ils ont mobilisée lors de la revue de la présente méthode.

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

BRZESKI M.W., 1991. Review of the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Anguinidae). *Revue Nematol.* 14 (1) : 9-59.

ESCUER M., 1998. Nematodo del género *Ditylenchus* de interés fitopatológico. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24: 773-786.

HESLING J.J., 1974. *Ditylenchus myceliophagus*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. set 3, n° 36. C.A.B International, Wellington, U.K..

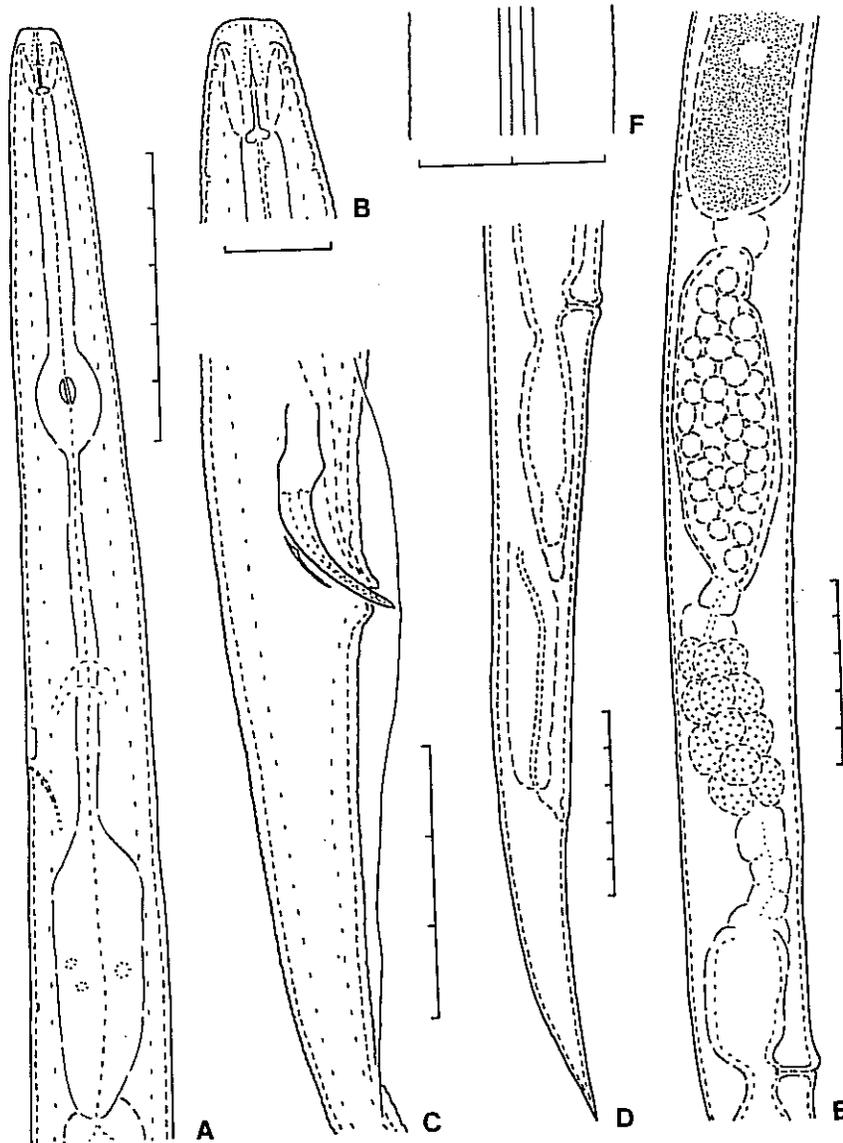
HOOPER D.J., 1972. *Ditylenchus dipsaci*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. set 1, n° 14 C.A.B International, Wellington, U.K..

HOOPER D.J., 1973. *Ditylenchus destructor*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. set 2, n° 21 C.A.B International, Wellington, U.K..

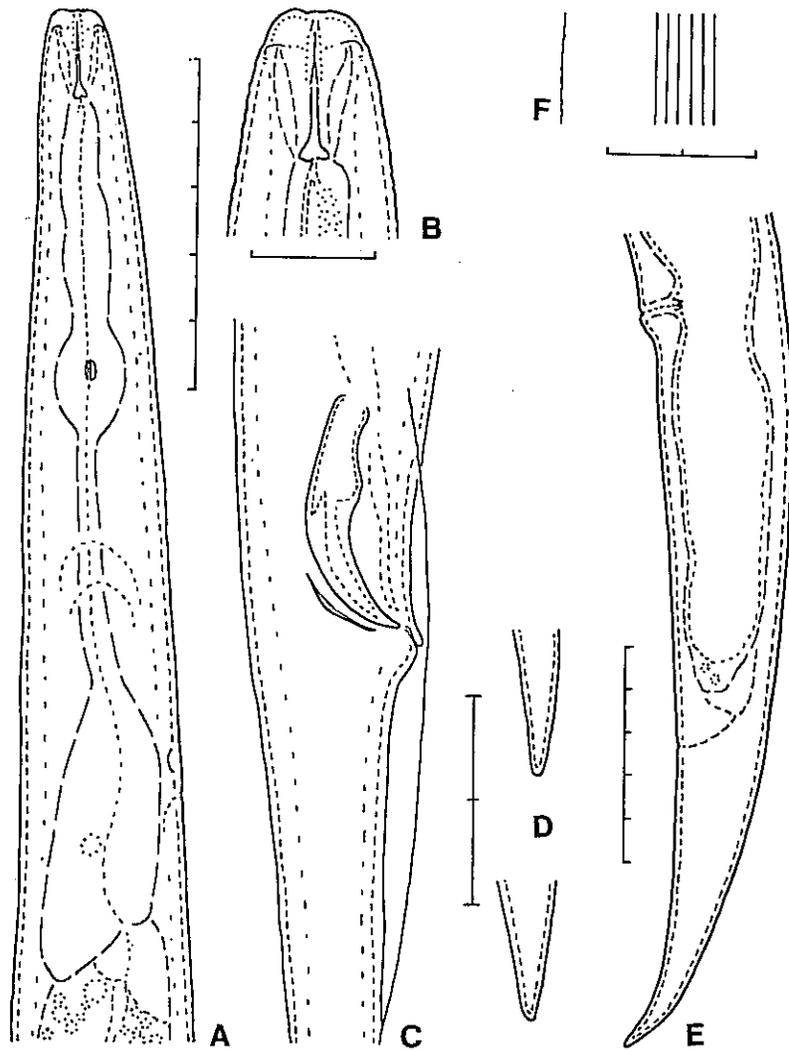
STURHAN D., BRZESKI M.W., 1991. Stem and bulb Nematodes, *Ditylenchus* spp. In: NICKLE R.N.(Ed) Manual of agricultural nematology, 1035 p.

ANNEXE

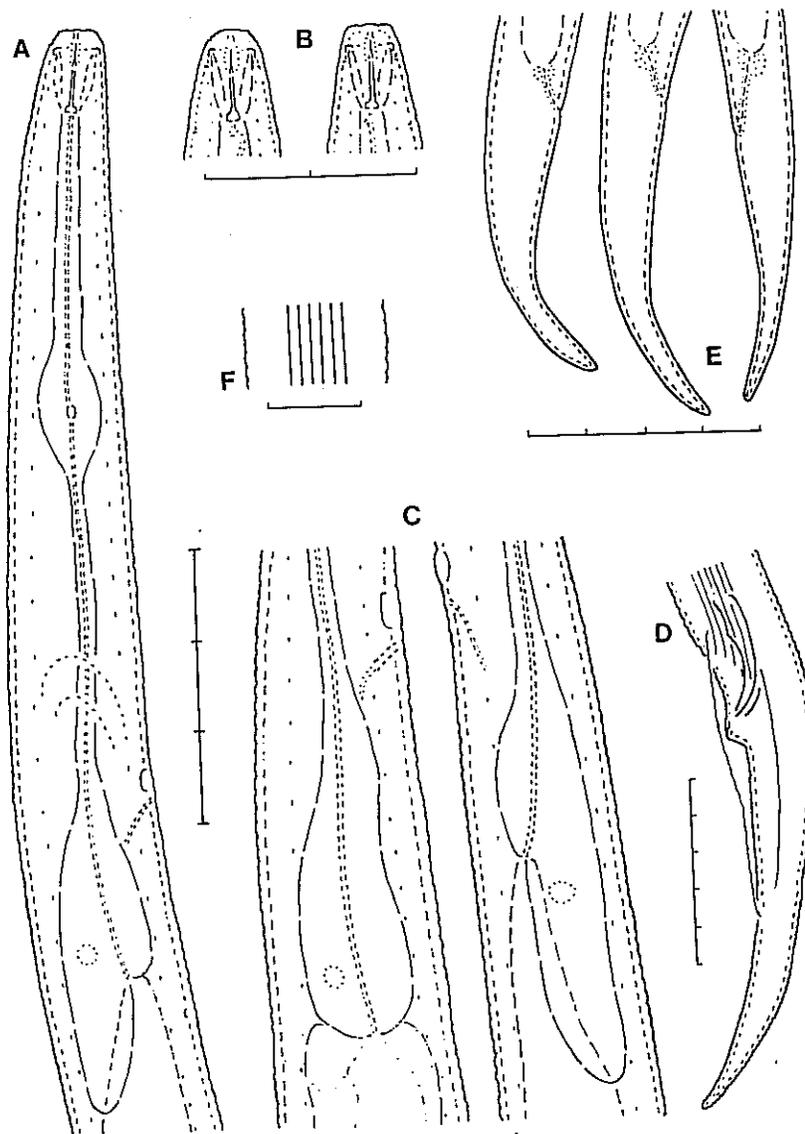
Illustrations (d'après Sturhan D. et Brzeski M.W., 1991):



Ditylenchus dipsaci : (A) région oesophagienne, (B) tête, (C) Mâle : spicules, (D) partie postérieure de la femelle, (E) système reproducteur de la femelle, (F) champs latéraux
 Echelles : 1 graduation = 10 μ m



Ditylenchus destructor : (A) région oesophagienne, (B) tête, (C) Mâle : spicules, (D) extrémité de la queue, (E) partie postérieure de la femelle, (F) champs latéraux.
 Echelles : 1 graduation = 10 μ m



Ditylenchus myceliophagus : (A) région oesophagienne, (B) têtes, (C) partie postérieure de l'oesophage, (D) Mâle : spicules et queue, (E) extrémités de queue, (F) champs latéraux
 Echelles : 1 graduation = 10 μ m

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

**Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr**

Ce document est édité par :

**Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr**

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.