Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTERE 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**
**Bureau des semences et de la santé des végétaux**

Adresse : 251 rue de Vaugirard
75 732 PARIS CEDEX 15
Suivi par : Olivier Dufour
Tél : 01.49.55.81.64
Courriel institutionnel : bssv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Réf. Interne : BSSV/2010-08-019
MOD10.21 C 12/05/10

**NOTE DE SERVICE**

**DGAL/SDQPV/N2010-8236**

**Date: 13/08/2010**

| | |
|---|---|
| Date de mise en application : | immédiate |
| Abroge et remplace : | Méthodes NS./97/02 version a, NG./97/03 version a et NG./97/04 version a |
| Date d'expiration : | Sans objet |
| Date limite de réponse : | Sans objet |
| Nombre d'annexes : | 2 : parties A et B |
| Degré et période de confidentialité : | aucune |

**Objet :** Méthode d'analyse MOA013 parties A et B pour la détection et l'identification du genre *Ditylenchus* sur sols, substrats et organes végétaux.

**Références** : Article R 202 du code rural, décret 2006-7 du 4 Janvier 2006 relatif aux laboratoires nationaux de référence, ainsi qu'à l'agrément et à la reconnaissance des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux, et modifiant le code rural, arrêté ministériel du 19 décembre 2007 fixant les conditions générales d'agrément des laboratoires d'analyses dans le domaine de la santé publique vétérinaire et de la protection des végétaux

**Résumé :** Publication de la méthode officielle MOA013 pour la détection et l'identification du genre *Ditylenchus* sur sols, substrats et organes végétaux .

**Mots-clés** : Méthode officielle - analyses - détection - identification – *Ditylenchus* – sol - végétaux.

**Destinataires**

**Pour information** :

DRAAF-SRAL
DAF-SPV
LNPV
Laboratoires agréés

*Ditylenchus dipsaci* et *destructor* sont des parasites de quarantaine en Europe (directive 2000-29/CE Annexe II partie A chapitre II) et de lutte obligatoire en France (arrêté du 31 juillet 2000).

La présente note a pour objet la publication officielle de la méthode de détection et d'identification des nématodes du genre *Ditylenchus* sur sols, substrats et organes végétaux.

La partie A de la méthode présentée en annexe donne la méthodologie de préparation des échantillons et d'extraction des nématodes filiformes sur sols, de substrats, et d'organes végétaux en vue d'une détection visuelle du genre *Ditylenchus*. Elle repose sur les caractéristiques de taille (tamisage), de densité (élutriation, centrifugation) et de mobilité des nématodes (migration).

La partie B de la méthode également présentée en annexe donne les modalités d'identification morphobiométrique de *Ditylenchus dipsaci* et *D. destructor* après extraction.

La présente méthode officielle MOA013 parties A et B version 1a en annexe de cette note de service remplace les précédentes méthodes publiées :

- Bulbes, graines, détection de Ditylenchus dipsaci (nématode des bulbes et des tiges) et identification morphologique (NG./97/03 version a) ;
- Bulbes, cormus à fleurs, tubercules, détection de *Ditylenchus destructor* (maladie vermiculaire de la pomme de terre) et identification morphologique (NG./97/04 version a) ;
- Sols, détection de *Ditylenchus dipsaci* (nématodes des bulbes et des tiges) et identification morphologique (NS./97/02 version a).

**L'ingénieur en chef des Ponts,**
**des Eaux et des Forêts**
**Adjoint à la Sous-Directrice**
**de la Qualité et de la Protection des Végétaux**

**Robert TESSIER**

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

# Détection du genre *Ditylenchus* sur sols, substrats et organes végétaux (bulbes, rhizomes, caïeux, cormus, tubercules, graines)

**Réf. : MOA 013 partie A version 1a**

## 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 | |
|---|---|---|---|---|
| Numéro de la version | Début | Fin | Début | Fin |
| NS./97/02 version a NG./97/03 version a et NG./97/04 version a | - | - | 1997 | Septembre 2010 + 3 mois[1] |
| MOA 013 partie A version 1a | Juillet 2010 | Août 2010 | Septembre 2010 | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

[1] Le délai de mise en œuvre obligatoire de la nouvelle méthode est raccourci et porté à 3 mois (et non 18 mois) du fait des modifications mineures apportées aux anciennes méthodes.

# 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. Présentation schématique de la méthode ..... 10
4. Matériel et consommables ..... 10
5. Mode opératoire ..... 11
   5.1. Extraction à partir du sol ..... 11
   5.2. Extraction à partir des substrats et organes végétaux ..... 12
      5.2.1. Prise d'analyse ..... 12
      5.2.2. Récupération des nématodes ..... 12
   5.3. Lecture de l'extrait ..... 13
6. Préparation, conditionnement des nématodes pour identification ..... 14
7. Formulation des résultats ..... 14
8. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants ..... 14
9. Conservation des reliquats de matériels utilisés ..... 14

**LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE** ..... **15**

**REMERCIEMENTS** ..... **15**

**BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE** ..... **16**

# PREAMBULE

## OBJET DES METHODES 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, ABREVIATIONS 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 IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES 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.

## ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

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 METHODES 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.

## CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

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

## OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

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 de l'alimentation, 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 METHODES 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

Cette méthode regroupe les parties « détection du genre *Ditylenchus* » des versions précédentes (NS./97/02 version a, NG./97/03 version a et NG./97/04 version a)
Une partie des informations a été transférée dans la méthode officielle d'analyse générale MOA 012 relative à l'extraction, la détection et l'identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites. Cette dernière sera appelée dans le document sous l'appellation « MOA 012 ».

## AMELIORATIONS

Il a été pris en compte l'utilisation de la méthode en routine :
- Utilisation d'un seul tamis de 20 µm pour la récupération
- Réduction possible du temps de migration

# DESCRIPTION DE LA METHODE

## 1. Objet

Cette méthode permet d'extraire les nématodes filiformes à partir de sols, de substrats, et d'organes végétaux en vue d'une détection visuelle du genre *Ditylenchus*. Elle repose sur les caractéristiques de taille (tamisage), de densité (élutriation, centrifugation) et de mobilité des nématodes (migration).

## 2. Domaine d'application

**Objets susceptibles d'être soumis à analyse.**

La méthode s'applique :
- aux sols, supports de culture et déchets terreux ayant ou non porté des cultures,
- aux organes végétaux hôtes (tubercules, bulbes, cormus, caïeux, graines, feuilles et tiges…)

**Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse.**

Les échantillons non hôtes tels que les systèmes racinaires de végétaux ne sont pas analysés.

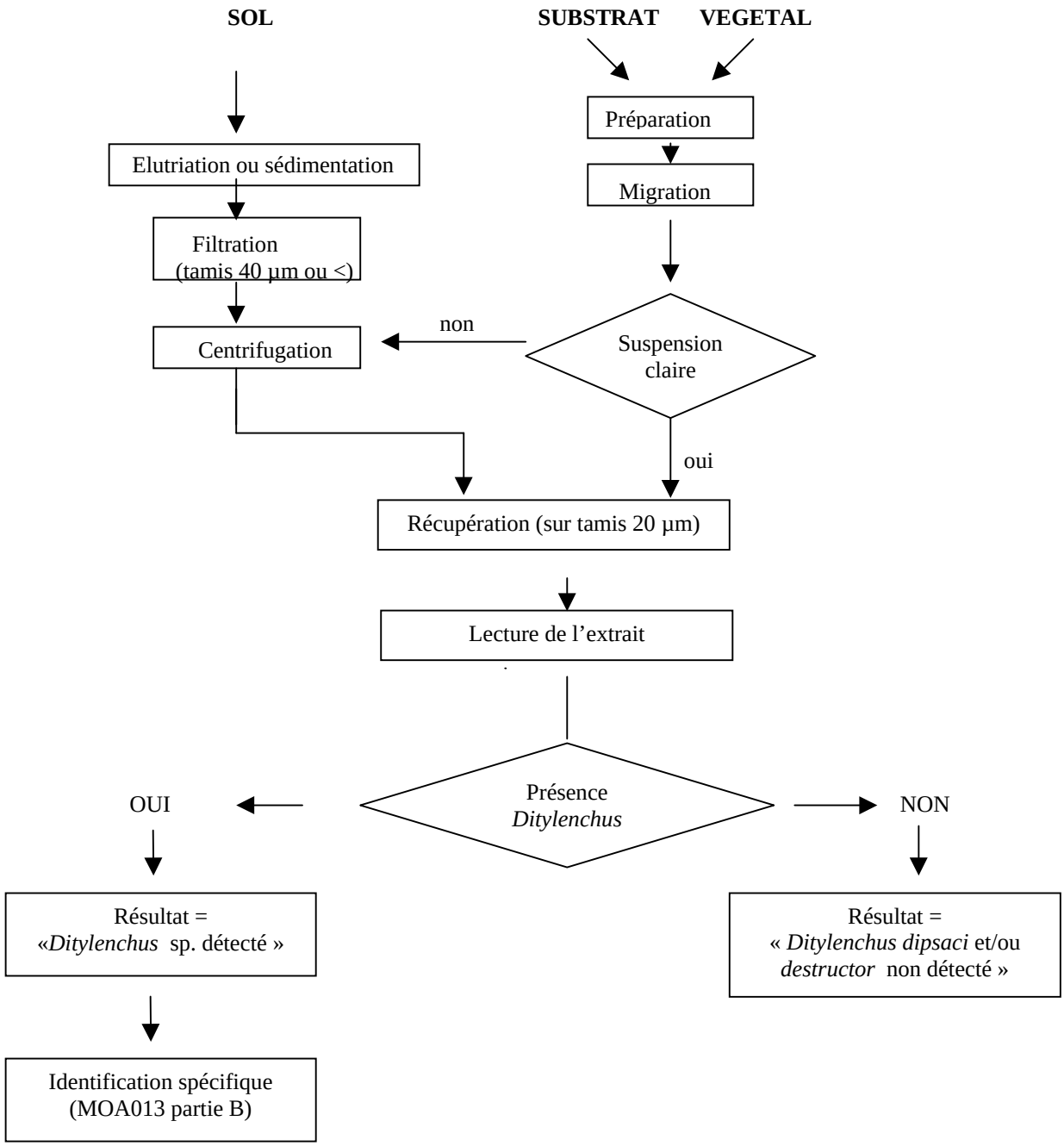
**Grandeur de l'objet soumis à l'analyse.**

La taille de l'échantillon à analyser est indiquée dans le chapitre 5. Elle est adaptée à chaque matrice.

**Précautions particulières à prendre.**

La conservation au froid positif des échantillons végétaux est recommandée si le délai entre la réception et l'extraction est estimé à plus de 24 heures.
Les échantillons peuvent ainsi être stockés plusieurs semaines dans la mesure où la matrice supporte la conservation (sols, graines sèches…).Dans le cas contraire (parties aériennes, bulbes…), les échantillons sont à analyser dans les meilleurs délais.

## 3. Présentation schématique de la méthode




## 4. Matériel et consommables

Le maillage des tamis spécifié dans la présente méthode ne fait pas l'objet d'exigences métrologiques. Il convient cependant de s'assurer du bon état des tamis.
De même, les volumes spécifiés ne font pas l'objet d'exigences métrologiques.

**Prise d'essai**

- Récipients gradués d'au moins 300 ml

**Extraction à partir de sols**

- Malaxeur
- Récipients adaptés pour méthode par gravité ou
- Elutriateur ou tout autre équipement donnant des résultats équivalents
- Eau courante
- Tamis de mailles de 1 mm à 40 µm

**Extraction à partir d'organes végétaux**

- Broyeur à couteaux
- Filtre papier ou filtre à lait
- Cuvettes plastiques ou autres récipients de capacité adaptée
- Tamis de mailles 40 µm

**Centrifugation**

- Centrifugeuse à rotor libre avec bols de grande capacité à fond hémisphérique
- Kaolin
- Solution de sulfate de magnésium (densité environ 1,18) ou solutions de propriété équivalente (voir chapitre 1.2.1.3. de la MOA 012 ainsi que le répertoire des recettes REP 001**)**
- Cuillère, spatule, système d'homogénéisation (fouet, vibreur…)
- Pissettes d'eau du robinet et pissettes de sulfate de magnésium

**Récupération, lecture**

- Microscope stéréoscopique (loupe binoculaire)
- Tamis de mailles de 20 µm
- Récipients pour extrait
- Coupelles d'observation
- Pissettes (eau du robinet)

# 5. Mode opératoire

## 5.1. Extraction à partir du sol

Vider la totalité de l'échantillon reçu dans une cuvette.
Eliminer manuellement les débris végétaux et cailloux.
Emietter et homogénéiser l'échantillon manuellement.
Effectuer un prélèvement d'environ 300 millilitres ou de la totalité de l'échantillon si son volume est inférieur.

**Homogénéisation**
Vider le prélèvement à analyser dans le bol d'un malaxeur.
Ajouter de l'eau et homogénéiser la suspension jusqu'à obtention d'une boue fluide.

**Sédimentation**
Méthodes susceptibles d'être utilisées :

-Méthode dite « des seaux » ou technique de COBB (DALMASSO, 1966) (TAYLOR, 1968) et dérivés : voir principe et description de la manipulation dans le **chapitre** 1.2.1.1. de la MOA 012 **.**

-Méthode Oostenbrick :

Le brassage est effectué dans un élutriateur qui permet l'utilisation d'un courant d'eau ascendant continu selon la méthode décrite dans le **chapitre** 1.2.1.2. de la MOA 012 .
Comme dans la méthode des seaux, les nématodes sont finalement retenus sur un tamis de 40 µm.

**Centrifugation**
Deux centrifugations successives sont réalisées :
- la première à l'eau permet d'éliminer les particules légères avec le surnageant, les nématodes sont retenus dans le culot,
- la seconde au sulfate de magnésium permet de mettre en suspension les nématodes dans le surnageant.
Voir principe et description de la manipulation dans le chapitre 1.2.1.3. de la MOA 012

## 5.2. Extraction à partir des substrats et organes végétaux

### 5.2.1. Prise d'analyse

Les nématodes présents dans les substrats ou dans les organes végétaux sont placés en milieu aqueux pour leur permettre de migrer hors de ces supports selon la méthode Baermann modifiée décrite dans le chapitre 1.2.2.2 de la MOA 012.

Quelle que soit la matrice, laisser les nématodes migrer pendant au moins 24 heures.

**Graines, substrats**
L'extraction est faite sur la totalité de l'échantillon reçu avec un volume maximal de 400 millilitres.
Intercaler un tissu type essuie tout ou filtre à lait entre l'échantillon et le tamis pour les substrats et les graines sales.
Dans le cas de graines qui absorbent beaucoup d'eau, rajouter de l'eau après quelques heures.

**Bulbes, caïeux, cormus, rhizomes, tubercules**
L'extraction est faite sur la totalité de l'échantillon reçu avec un maximum de 200 unités.
Prélever une tranche par organe (si possible le plateau dans le cas des bulbes).
Les bulbilles sont analysées en l'état.
Les tranches ainsi prélevées sont mises à migrer après un léger broyage.
Les bulbilles sont également broyées (entières) avant migration.

**Feuilles et tiges**
L'extraction est faite sur un prélèvement réalisé sur la totalité de l'échantillon reçu avec un maximum de 200 unités.
Choisir dans la mesure du possible les parties jeunes ou avec symptômes.

**Cas particulier de l'ail**
La quantité maximale à analyser est de 200 têtes d'ail.
Après un lavage au jet pour éliminer la terre adhérente, l'échantillon est placé dans un récipient de volume suffisant pour permettre une immersion de toutes les têtes dans l'eau.

### 5.2.2. Récupération des nématodes

**Après migration sur tamis**
Enlever le tamis et filtrer l'eau de la cuvette sur un tamis de récupération de maille 20 µm.
Transférer le produit retenu par le tamis dans un récipient pour extrait à l'aide d'un jet de pissette d'eau.

*Si la suspension obtenue est sale* : procéder à une centrifugation de l'extrait obtenu au sulfate de magnésium (d=1,18) + kaolin, 2 min à 900 g.
Récupérer les nématodes par filtration du surnageant sur un tamis de 20 µm. Transférer le produit retenu par le tamis dans un récipient pour extrait à l'aide d'un jet de pissette d'eau.

**Après trempage (cas de l'ail)**

Brasser le contenu du récipient et enlever les têtes d'ail.
Passer l'eau du récipient à travers 2 tamis superposés de mailles respectives 1 mm et 40 µm maximum.
Le produit récupéré sur le tamis de 40 µm est soit :
- centrifugé comme indiqué ci-dessus. Les nématodes sont alors récupérés par filtration du surnageant sur un tamis de 20 µm.
- mis en migration selon méthode Baermann modifiée décrite chapitre 1.2.2.2 de la MOA 012.

Après 24 heures, filtrer l'eau de la cuvette sur un tamis de maille 20 µm puis récupérer le produit obtenu dans un récipient pour extrait.

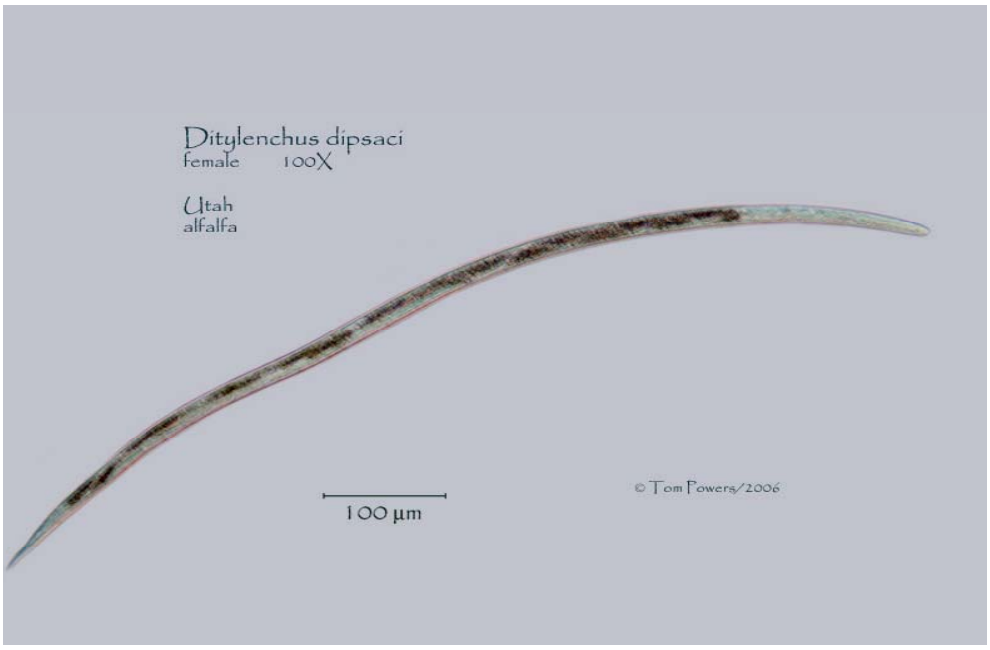
## 5.3. Lecture de l'extrait

Placer les extraits en coupelles d'observation pour examen à la loupe binoculaire sous lumière diascopique pour identification du genre.
Les personnes chargées de la lecture doivent savoir reconnaître les principaux genres de nématodes phytoparasites.

Les critères caractéristiques du genre *Ditylenchus* sont les suivants :

**Critères généraux :**
- Nématode long et fin, habitus droit ou légère courbure, locomotion ondulante
- Limite oesophageo-intestinale droite
- Stylet trapu et court, peu visible à la loupe, présence de boutons basaux
- Queue courte et pointue
- Tête aplatie, dans le prolongement du corps, faiblement sclérotisée

**Critères liés au sexe :**
- Chez la femelle : vulve postérieure, un seul ovaire
- Chez le mâle : spicules légèrement courbes, présence d'une bursa



## 6. Préparation, conditionnement des nématodes pour identification

Si l'observation de l'extrait a mis en évidence la présence de nématodes du genre *Ditylenchus* :
⬧ soit le laboratoire réalise l'identification spécifique (voir MOA 013 partie B identification de *Ditylenchus*),
⬧ soit le laboratoire envoie l'extrait à un laboratoire tiers (sauf disposition contraire, ce laboratoire est le laboratoire national de référence) pour identification de l'espèce.
Dans ce dernier cas, conditionner l'extrait dans un récipient étanche, résistant au transport.
Identifier le contenant de manière indélébile et l'expédier, sous emballage résistant, pour l'identification spécifique.

## 7. Formulation des résultats

Le résultat s'exprime sous forme qualitative :
⬧ dans le cas d'une analyse ne révélant pas la présence de nématodes du genre *Ditylenchus* par une phrase telle que :
« ***Ditylenchus dipsaci* et/ou *destructor* non détecté** » selon la ou les espèces demandées.

⬧ dans le cas d'une analyse révélant la présence de nématodes du genre *Ditylenchus* par une phrase telle que :
« ***Ditylenchus sp*. détecté** »

## 8. Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Les risques de contamination sont liés à la présence du parasite dans :
⬧ les reliquats d'échantillons et emballages,
⬧ les effluents d'analyses.
Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement : traitement des effluents, destruction contrôlée des déchets.

## 9. 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 B** | Identification morphobiométrique du genre *Ditylenchus* |
| **REP 001** | Répertoire des recettes en vigueur au LNPV |
| **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

DALMASSO A. (1966) Méthode simple d'extraction des Nématodes du sol. *Revue d'écologie biologie du sol*, tome 3, 473-478.

EVANS K., TRUGDILL D.L. and WEBSTER J.M. (1993) Extraction, identification and control of parasitic nematodes. In: Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture, CAB International, Wallington, U.K., 648p.

FORTUNER R. (1982) On the genus *Ditylenchus Filipjev*,1936 (Nematoda :Tylenchidae) *Revue de Nematologie*. 5 (1), 17-38

HOOPER D.J. (1986) Extraction of free-living stages from soil. In: J.F SOUTHEY (ED.) Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. London, ADAS Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 202p.

MERNY G., LUC M. (1969).les techniques d'échantillonnage des peuplements de nématodes dans le sol. In : LAMOTTE M. (ED.), BOURLIERE F. (ED.) Problème d'écologie : l'échantillonnage des peuplements animaux des milieux terrestres. Paris : Masson, 1969, p.237-273.

TAYLOR A.L. (1968) Echantillonnage des sols et des végétaux pour la recherche des nématodes In : Introduction à la recherche sur les nématodes phytoparasites. Manuel FAO pour l'étude des nématodes phytoparasites et les moyens de lutte. Rome, 1968, 135p.

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.

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DE L'ALIMENTATION
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

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

**Réf. : MOA 013 partie B version 1a**

**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 | |
|---|---|---|---|---|
| Numéro de la version | 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 ..... 5
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 METHODES 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, ABREVIATIONS 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 IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES 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.

## ECHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

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 METHODES 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.

## CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

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

## OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

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 METHODES 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.

## AMELIORATIONS

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 mycelium 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 |
| ***D. dipsaci*** | [10 - 12 µm] | courte et pointue | 4 | ≈ 1/2 |
| ***D. destructor*** | [10 - 13 µm] | extrémité émoussée | 6 | ≈ 2/3 |
| ***D. myceliophagus*** | [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 *Ditylenchus* 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..

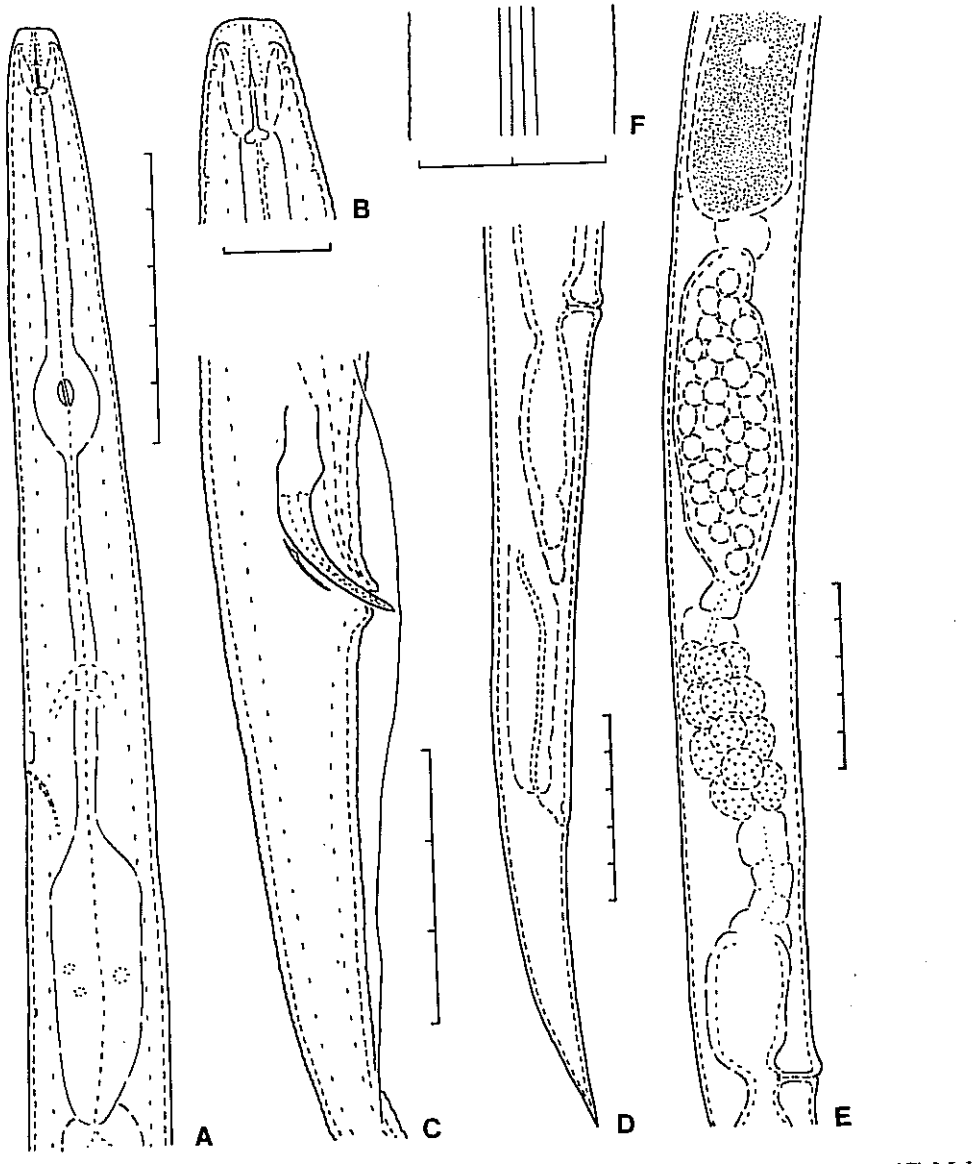
HOOPER D.J., 1972. *Ditylenchus dipsaci*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. set 1, n° 14 C.A.B International, Wellington, U.K..

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..

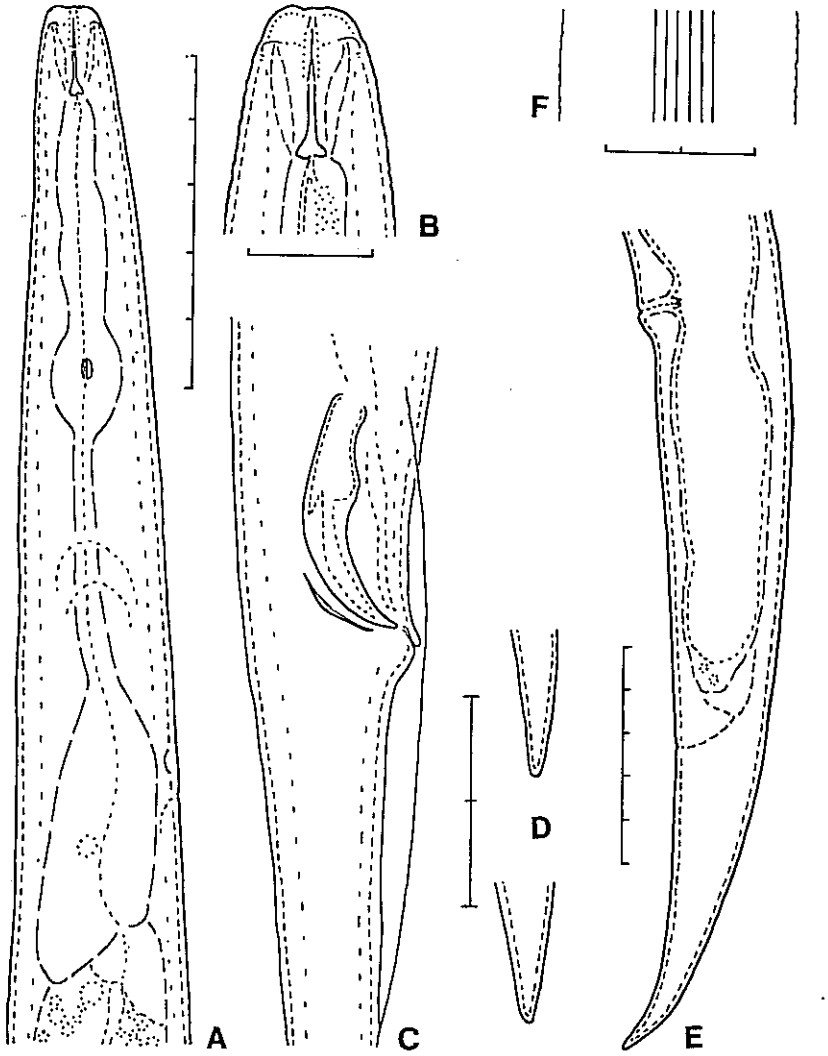
STURHAN D., BRZESKI M.W., 1991. Stem and bulb Nematodes, *Ditylenchus* spp. In: NICKLE R.N.(Ed) Manual of agricultural nematology, 1035 p.

# ANNEXE

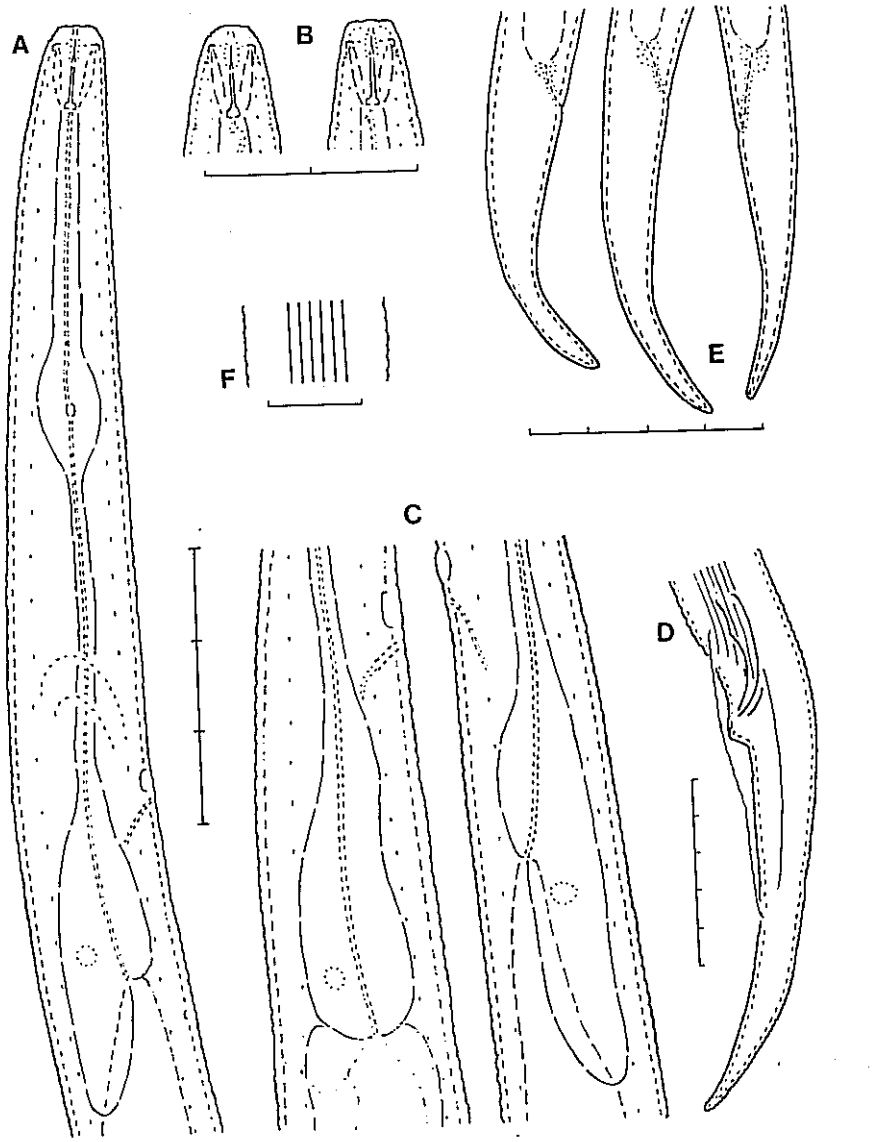
**Illustrations** (d'après Sturhan D.et Brzeski M.W., 1991)**:**




***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 µm




***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 µm




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

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.