

**Méthode d'analyse en santé des végétaux**

**RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA072- Version 01**

Décembre 2023

# **Détection de nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.) et/ou faux nématodes à galles (*Nacobbus* spp.) par extraction enzymatique et par morphologie sur organes végétaux souterrains non ligneux**

**Laboratoire de la santé des végétaux, Unité de nématologie**

**Laboratoire national de référence « nématodes phytopathogènes\* »**

\*tous nématodes sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire

## Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

*Une modification est qualifiée de majeure* lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

*Une modification est qualifiée de mineure* si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
NS/04/06 version a	/	2006	Version initiale : Sols et organes végétaux souterrains - détection de <i>Meloidogyne fallax</i> Karszen, 1996 et de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> Golden, O'bannon, Santo & Finley, 1980 (nématodes à galles)
ANSES/LSV/ MA072	Mineure	18/12/2023	Révision de la partie digestion enzymatique de N.S./04/06 : <ul style="list-style-type: none"> <li>- reformulation des étapes de la méthode sans modifications</li> <li>- pas de modification des solutions (références et dilution)</li> <li>- clarification de l'étape de centrifugation</li> <li>- clarification de la détection des différentes formes</li> <li>- précisions apportées pour <i>Meloidogyne enterolobii</i> et <i>Nacobbus aberrans</i> *</li> <li>- ajout de l'obligation de prendre et conserver des photos des échantillons positifs</li> </ul> <p style="font-size: small; margin-top: 10px;">* Ces taxons étaient déjà prélevés dans la NS/04/06 sans être les espèces cibles (<i>M. enterolobii</i> n'étant pas différentiable des autres <i>Meloidogyne</i> spp. en détection et <i>Nacobbus aberrans</i> ayant des individus de taille bien plus importante que les <i>Meloidogyne</i> spp. et de formes semblables).</p>

\* La version 01 a fait l'objet d'une consultation du 23/10/2023 au 30/11/2023 sur le site internet de l'Agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

## Avant-propos

La présente méthode a été optimisée et validée par :

### **Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Nématologie**

Laboratoire National de Référence : « nématodes phytopathogènes\* »

\* tous nématodes sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté ministériel en vigueur désignant les laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique phytosanitaire

Adresse :     Domaine de la Motte au Vicomte  
                  BP 35327  
  
                  35653 LE RHEU Cedex  
  
                  France

Contact : [rennes.lsv@anses.fr](mailto:rennes.lsv@anses.fr)

## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Consommables et réactif</b> .....	<b>11</b>
5.1 Extraction .....	11
5.2 Détection .....	11
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>12</b>
6.1 Extraction .....	12
6.2 Détection .....	12
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>13</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	13
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>13</b>
8.1 Extraction par digestion enzymatique .....	13
8.1.1 Préparation des échantillons pour analyse.....	13
8.1.2 Agitation.....	14
8.1.3 Tamisage et récupération.....	14
8.1.4 Centrifugation.....	15
8.1.5 Récupération de la centrifugation et conditionnement .....	15
8.2 Détection par morphologie.....	16
8.2.1 Détection de formes renflées .....	16
8.2.2 Détection de formes libres.....	18
8.2.3 Conditionnement des nématodes.....	19
<b>9. Résultats</b> .....	<b>19</b>
9.1 Résultats pour détection de formes renflées .....	19

9.2 Résultats pour détection de formes libres.....	20
<b>10. Caractéristiques de performance de la méthode.....</b>	<b>20</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>21</b>

## Introduction

Les « nématodes à galles » du genre *Meloidogyne* et les « faux nématodes à galles » du genre *Nacobbus* sont des nématodes phytoparasites polyphages. Ces nématodes ont la particularité de former des galles sur les racines et tubercules des végétaux qui peuvent causer d'importantes altérations du système racinaire. Les conséquences sont une diminution de la croissance végétale, des jaunissements, des flétrissements entraînant une baisse de rendement.

*M. chitwoodi* et *M. fallax* sont présents en Europe et sont considérés comme des espèces de nématode les plus nuisibles en milieu agricole dans cette région en raison de leurs larges gammes d'hôtes (Karszen, 2002) composées de nombreuses familles végétales (den Nijs et al., 2004). Leurs gammes d'hôtes incluent notamment les légumes-racines et beaucoup de plantes cultivées de la famille des solanacées, en particulier la tomate. Une fois le stade adulte atteint, les femelles deviennent sédentaires et s'alimentent via une cellule géante formant une galle sur les racines ou tubercules.

*M. enterolobii* est majoritairement présent dans des pays de l'hémisphère sud tout en étant présent sur tous les continents, excepté en Antarctique (EPPO, 2023). En Europe, cette espèce est présente en conditions naturelles au Portugal et sous serre en Suisse. Cette espèce est en transit dans des végétaux et de nombreux pays européens font état de signalements d'interceptions dont la France. Cette espèce est considérée comme particulièrement agressive (EPPO, 2016). Le développement de femelles dans des galles est similaire à celui de *M. chitwoodi* et *M. fallax* décrit ci-dessus.

*N. aberrans* est présent uniquement aux Etats Unis et en Amérique latine (EPPO, 2023) en parasitant de nombreuses plantes agricoles ou adventices causant des galles sur les racines similaires à celles provoquées par les nématodes du genre *Meloidogyne*. Des introductions aux Pays Bas (de Bruijn, 1968) et Royaume Uni (Franklin, 1959) ont été signalées sous serre mais son implantation n'a jamais été constatée en Europe. Cette espèce parasite plus de 84 espèces de plantes cultivées ou adventices appartenant à 18 familles botaniques (Manzanilla-López et al., 2002). On peut le trouver sur de nombreuses plantes cultivées d'importance telles que la pomme de terre, la tomate, la betterave, le haricot, la carotte ou encore le chou.

## Avertissements et précautions de sécurité

**Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.**

**Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.**

## 1. Objet et domaine d'application

### Objet

La méthode décrite ici permet d'extraire les formes libres (L2 et mâles) et les stades renflés (L3, L4 et femelles matures) des nématodes du genre *Meloidogyne* spp. notamment *M. chitwoodi*, *M. fallax* et *M. enterolobii* et de *Nacobbus aberrans* à partir d'organes végétaux souterrains non-ligneux, comme des racines, bulbes, tubercules ou rhizomes (BTR). L'extraction de ces organismes est obtenue par digestion enzymatique qui entraîne la dégradation des tissus végétaux (dont cellulose et pectine).

### Domaine d'application

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

Les échantillons analysés par le laboratoire sont des organes végétaux non ligneux souterrains, comme des racines, bulbes, tubercules ou rhizomes, pouvant contenir des larves, des femelles ou des mâles de *Meloidogyne* spp. ou de *Nacobbus* spp..

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

La taille de l'échantillon analysé par cette méthode n'est pas critique car le volume de la solution enzymatique est à adapter en fonction du volume de l'échantillon. L'échantillon doit cependant être préparé sous forme de prises d'essais (*cf point 8.1.1*) et selon la matrice, constitué d'un nombre défini d'unités (*cf point 7.1*).

#### **Précautions particulières à prendre**

Les prises d'essai peuvent être conservées quelques jours au froid positif en attendant leur analyse avant toute forme de dégradation (dessèchement, pourriture, ...).

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures, équipements, etc.) visant à éviter tout risque de contamination d'un échantillon par un autre et de dissémination dans l'environnement.

## 2. Documents de référence

Aucun document.

### 3. Termes, sigles et définitions

Afin d'éviter toute mauvaise interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Termes ou sigles pouvant être rencontrés dans le texte :

BTR : Bulbes, Tubercules, Rhizomes

EMT : Erreur Maximale Tolérée

Forme libre : nématode filiforme ayant une capacité de déplacement

Forme renflée : nématode globuleux sédentarisé sans capacité de déplacement

L2, L3, L4 : larves de second, troisième et quatrième stades

MgSO<sub>4</sub> : sulfate de magnésium

Froid positif : température d'environ 5°C EMT=+/- 4°C

## 4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est représenté dans le logigramme ci-dessous :

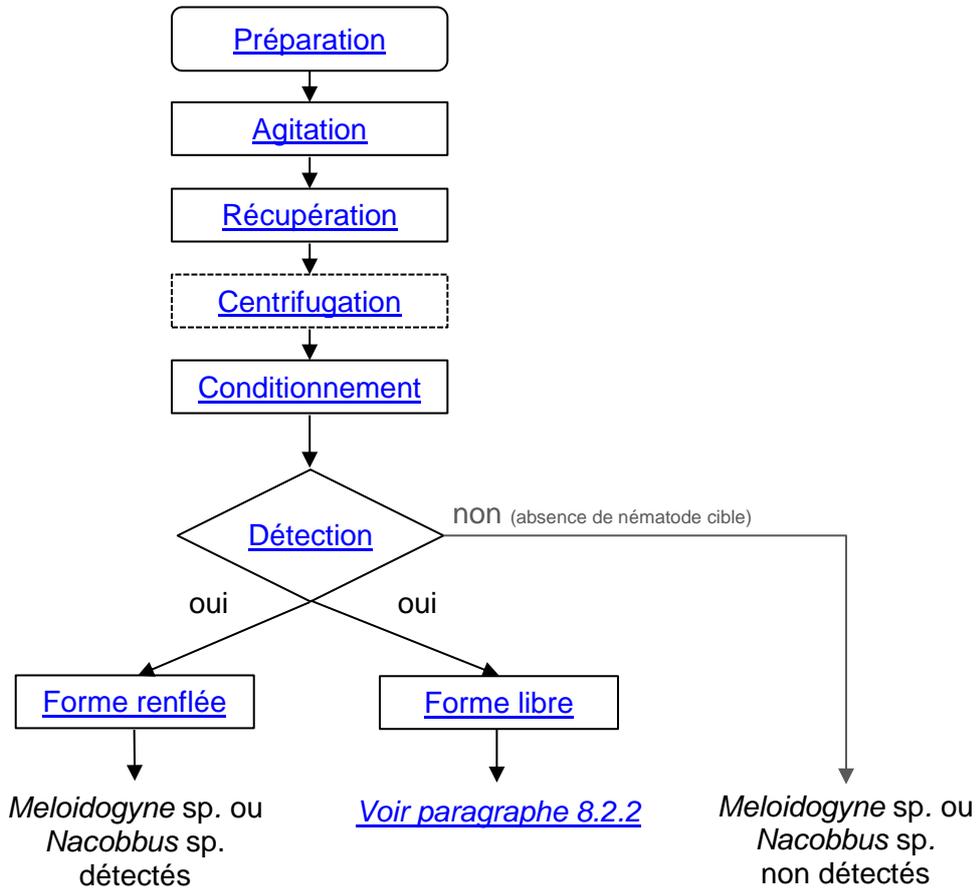


Figure n° 1 : Logigramme de la méthode officielle

## 5. Consommables et réactif

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 5.1 Extraction

- Eau
- Solution de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (densité d'environ 1,18) ou solutions à propriété équivalente
- Kaolin
- Solution enzymatique (voir proportion ci-dessous).

**Tableau n° 1 : Préparation du mélange enzymatique**

Composants	Composition	Pour 1L de solution	Pour 5L de solution
Pectinex®	15%	150 mL	750 mL
Celluclast®	30%	300 mL	1500 mL
Eau	55%	550 mL	2750 mL

Des risques d'irritations ou d'allergies liés à l'utilisation des enzymes peuvent être présents. Il est recommandé à l'opérateur, le port d'un masque, de lunettes et de gants lors de la préparation et l'utilisation du mélange enzymatique.

#### Remarques

- Stockage des enzymes ou du mélange enzymatique au froid positif,
- Après la date de péremption des enzymes, possibilité d'utilisation tant que les végétaux sont correctement digérés en constatant une bonne dégradation de la matière (excepté la peau ou l'enveloppe externe),
- En cas de présence de moisissures à la surface du mélange, possibilité de filtrer la solution avant utilisation et conservation du mélange tant que les végétaux sont correctement digérés.

### 5.2 Détection

- Eau

## 6. Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 6.1 Extraction

- Agitateur (exemple : orbital, magnétique, ...)
- Enceinte réfrigérée à 5°C EMT=+/- 4°C pour stockage au froid positif
- Récipients avec couvercle pour agitation
- Tamis de récupération de mailles d'environ 160 µm ou 40 µm et 20 µm
- Tamis de criblage de mailles d'environ 600 à 1000 µm
- Support d'égouttage
- Ciseaux
- Centrifugeuse
- Récipients de centrifugeuse d'une capacité adaptée au volume des échantillons (par exemple 0,5 à 1 litre pour des échantillons d'environ 200 pelures)
- Balance ou autre équipement permettant un équilibrage des bols de centrifugation
- Cuillère, spatule, système d'homogénéisation (fouet, vibreur...)
- Pissettes

### 6.2 Détection

- Loupe binoculaire avec système d'éclairage et équipé de fond clair et/ou noir, grossissement de l'ordre de 16X à 60X,
- Système d'acquisition d'images permettant de visualiser les nématodes, lors d'analyses officielles,
- Cellule de lecture de préférence avec marquage au fond subdivisé (boite de Petri ou équivalent),
- Instrument adapté pour la manipulation et la collecte des nématodes filiformes (cil monté sur une baguette, aiguille d'acupuncture ou autre ...),
- Pinceau fin ou tout autre instrument adapté pour la manipulation et la collecte des nématodes renflés,
- Petit matériel de paille (pissettes, tubes, marqueurs ...).

## 7. Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons sont issus d'un lot de BTR, d'un lot de végétaux avec racines ou directement d'une prise d'essai (ex : pelures de tubercules ou racines). Dans le cas de tubercules, un échantillon est composé d'environ 200 unités devant être toutes prélevées et faisant l'objet d'une seule analyse.

Une prise d'essai, doit être représentative de l'échantillon initial et ne doit pas présenter de dégradations (ex : dessèchement, pourriture, ...).

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Avant extraction, les prises d'essai sont conservées au froid positif (*cf. point 1*).

Avant détection, les extraits sont conservés au froid positif.

### 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Il n'y a pas d'exigence particulière concernant la conservation des reliquats d'échantillon.

## 8. Mode opératoire

### 8.1 Extraction par digestion enzymatique

#### 8.1.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les racines préparées en tronçons d'environ 1 cm constituent la prise d'essai. Cette préparation doit être réalisée sur les parties racinaires de chaque végétal élémentaire. Il est conseillé de privilégier des racines sans dégradation apparente (ex : dessèchement) et si possible avec des symptômes visibles (galles).

Les BTR, et organes racinaires protubérants, préparés sous forme de pelures constituent la prise d'essai. Une pelure par unité doit être prélevée (ex : une pelure par tubercule de pomme de terre). La taille et l'épaisseur des pelures peuvent différer selon le contexte de l'analyse :

- si plusieurs analyses d'organismes pathogènes sont réalisées sur les tubercules, comme dans le cas de pelures réalisées dans le cadre de la surveillance de bactérioses réglementées, les prises d'essais peuvent être constituées par ces pelures déjà prélevées,
- si l'analyse est spécifique à la recherche de nématodes phytoparasites : les pelures (une par unité végétale), de taille d'environ 2 cm par 4 cm, sont réalisées et dans la mesure du possible avec une épaisseur d'environ 2 mm afin d'augmenter la capacité de détection (Viaene et al., 2007).

Cas particulier des légumes racines (type carottes, scorsonères, ...) : il est conseillé de prélever l'intégralité des racines et de prélever également une pelure par légume.

### 8.1.2 Agitation

Placer la prise d'essai à analyser dans un récipient de capacité adaptée au volume, ajouter la solution enzymatique de manière à recouvrir complètement la prise d'essai puis fermer le récipient avec un couvercle.

Mettre le récipient en agitation jusqu'à une digestion des tissus végétaux permettant la séparation des nématodes et du végétal (*a minima* environ 8 h pour des pelures, dans l'idéal une nuit complète, et *a minima* environ 4 h pour des petites racines).

### 8.1.3 Tamisage et récupération

**A noter : la recherche des formes à cibler dépend du périmètre d'agrément du laboratoire.**

#### **Extraction des formes renflées uniquement**

Verser le produit de la digestion sur un tamis de criblage (*cf. point 6.1*) posé sur un tamis de 160 µm. Laver le contenu du tamis de criblage par un courant d'eau faible et triturer les débris retenus pour faciliter le passage de la suspension issue de la digestion. Évacuer le tamis de criblage et rassembler avec de l'eau, ou d'une solution de MgSO<sub>4</sub>, le contenu du tamis de 160 µm.

*NB : le contenu du tamis de criblage est éliminé et traité de façon appropriée pour éviter tout risque de dissémination.*

Si l'extrait obtenu est suffisamment clair après le tamisage et ne nécessite pas une subdivision pour une lecture optimale, la centrifugation n'est pas indispensable. L'extrait est alors transféré avec de l'eau directement dans un récipient pour la lecture.

Sinon, après s'être assuré de l'absence d'eau lors de l'étape de rassemblement, transférer le contenu du tamis de 160 µm dans un récipient pour la centrifugation **à l'aide d'un jet de pissette de MgSO<sub>4</sub>**.

#### **Extraction des formes renflées et filiformes**

Verser le produit de la digestion sur un tamis de criblage (*cf. point 6.1*) posé sur un tamis de 40 µm. Laver le contenu du tamis de criblage par un courant d'eau faible et triturer les débris retenus pour faciliter le passage de la suspension issue de la digestion. Évacuer le tamis de criblage et rassembler avec de l'eau, ou d'une solution de MgSO<sub>4</sub>, le contenu du tamis de 40 µm.

*NB : le contenu du tamis de criblage est éliminé et traité de façon appropriée pour éviter tout risque de dissémination.*

Après s'être assuré de l'absence d'eau lors de l'étape de rassemblement, transférer le contenu du tamis de 40 µm dans un récipient pour la centrifugation **à l'aide d'un jet de pissette de MgSO<sub>4</sub>**.

**Contrairement à la récupération sur un tamis de 160 µm, la centrifugation est indispensable lors d'une récupération sur tamis de 40 µm** afin de garantir une bonne lisibilité lors de la détection en raison du grand nombre de particules récupérées.

#### 8.1.4 Centrifugation

*NB : Cette étape est facultative si le contenu récupéré sur le tamis de 160 µm respecte les conditions de lisibilité évoquées dans le point 8.1.3.*

Compléter *a minima* 1/3 du récipient de centrifugation (la taille du récipient doit être adaptée à la quantité de matière récupérée dans les tamis de 160 µm ou 40 µm) avec la solution de MgSO<sub>4</sub> et ajouter du kaolin (la quantité de kaolin doit permettre d'obtenir un culot stable, exemple environ 9 g pour un récipient de diamètre d'environ 8.6 cm).

Rincer si nécessaire les parois du récipient de centrifugation avec la pissette de MgSO<sub>4</sub>.

Homogénéiser la suspension avec une spatule ou un fouet. Utiliser un ustensile propre pour chaque échantillon afin d'éviter toute contamination inter-échantillon.

Equilibrer 2 à 2 les récipients de centrifugation et centrifuger la suspension avec une force comprise entre environ 900 et 1800 g pour une durée comprise entre environ 2 et 4 min. La vitesse et le temps de centrifugation ne sont pas critiques mais doivent permettre d'obtenir un culot stable.

#### 8.1.5 Récupération de la centrifugation et conditionnement

Vider le surnageant sur un tamis de 20 µm, préalablement rincé, posé sur un support.

Rassembler les particules retenues par le tamis de 20 µm avec de l'eau en évitant toute projection du contenu du tamis.

Transférer à l'aide d'un jet de pissette d'eau le contenu du tamis de 20 µm dans un récipient pour la lecture.

*NB : Que la suspension ait été centrifugée ou non, elle peut être conservée à température ambiante si la lecture est faite le jour de l'extraction. Sinon, la suspension est conservée au froid positif.*

## 8.2 Détection par morphologie

L'analyse porte sur l'ensemble des nématodes présents dans l'extrait issu de l'étape 8.1.

Transférer l'extrait dans une cellule de lecture et l'observer sous la loupe binoculaire (stéréomicroscope) ou observer directement dans le contenant si sa forme le permet.

### 8.2.1 Détection de formes renflées

Rechercher les formes renflées de nématodes du genre *Meloidogyne* et *Nacobbus* selon les critères morphologiques suivants :

- ***Meloidogyne* spp.** : lors d'une observation **en fond noir**, les femelles matures ont un corps blanc, globuleux ou en forme de poire, taille de 295 à 4250  $\mu\text{m}$ , parfois allongé, avec un cou plus ou moins long (Fig. 2); selon la maturité, une masse gélatineuse contenant les œufs, à l'extérieur de la femelle, peut être présente. Les derniers stades larvaires (L4), ou femelle immature, sont moins globuleuses et un peu plus petites, avec un corps blanc plus ou moins renflé selon le stade de maturité (Fig. 2 et Fig. 3).

Nb : les femelles peuvent se dégrader avec le temps en se vidant jusqu'à devenir transparentes et peuvent donc ne pas être « blanches » lors de la détection.

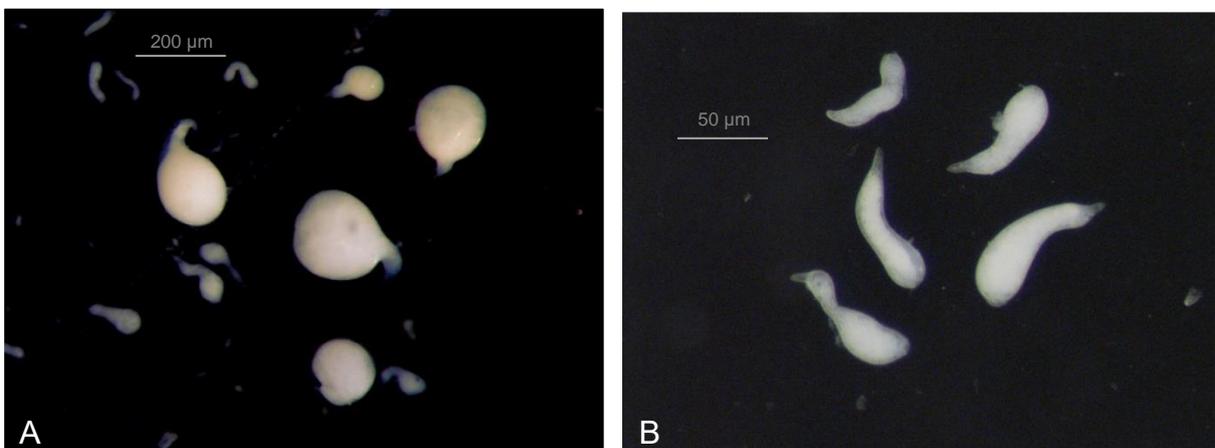
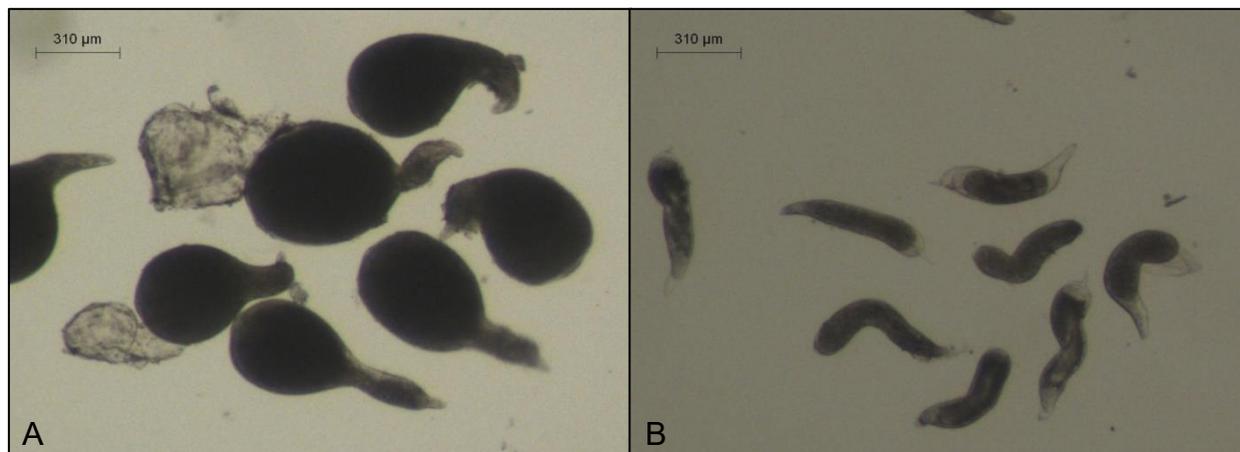


Figure n° 2 : Observation de femelles de *Meloidogyne* spp. à la loupe sur fond noir.

A : femelles matures (globuleuse) et immature (plus petite et plus ou moins filiforme).

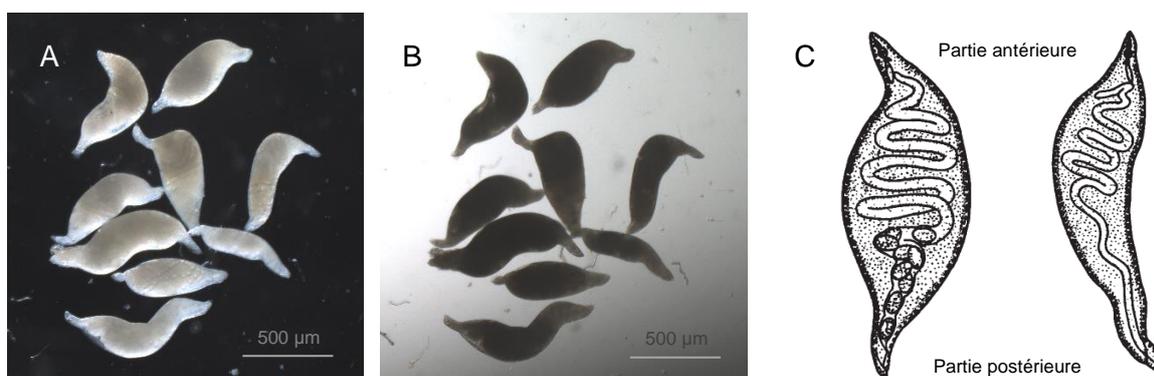
B : femelles immatures. (© Anses – LSV)



**Figure n° 3 : Observation de femelles de *Meloidogyne* spp. à la loupe sur fond clair.**  
 A : femelles matures. B : femelles immatures. (© Anses – LSV)

- ***Nacobbus* spp.** : Lors d'une observation en fond noir, les femelles matures ressemblent fortement au dernier stade larvaires de *Meloidogyne* spp. (ou femelle immature) mais de plus grande taille (généralement de l'ordre de 800 µm à 1,5 mm). Le corps est également blanc et plus ou moins renflé selon la maturité de la femelle, mais non globuleux/sphérique (Fig.4).

Nb : les femelles ont une sensibilité osmotique relativement élevée nécessitant une prise en charge rapide, par le LNR, de l'extrait en cas de détection (cf. point 8.2.3).



**Figure n° 4 : Femelles matures de *Nacobbus* spp.**  
 A : observations à la loupe binoculaire sur fond noir et B : sur fond blanc, © Anses-LSV  
 schéma C : d'après Sher 1970

## 8.2.2 Détection de formes libres

### ***Meloidogyne* spp. :**

Les principaux critères de distinction du genre *Meloidogyne* sont :

L2 : vermiforme, longueur comprise entre 250 et 600  $\mu\text{m}$ , stylet peu visible, recouvrement œsophagien ventral, présence d'une zone claire au niveau de l'anus, queue pointue souvent fine et présentant une partie hyaline (figure 5 et 6).

Mâle : vermiforme, taille entre 700 et 1900  $\mu\text{m}$ , tête souvent proéminente, forte sclérotisation céphalique; stylet robuste de 13 à 30  $\mu\text{m}$ , recouvrement œsophagien ventral; spicules terminaux et extrémité de la queue arrondie (figure 6).

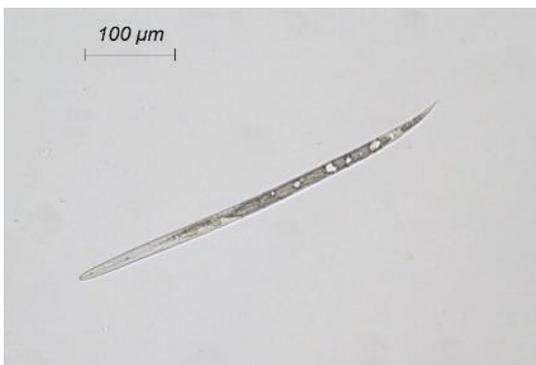


Figure n° 5 : Larve de *Meloidogyne* sp.  
(© Anses - LSV)



Figure n° 6 : Mâle (gauche) et larve (droite) de *Meloidogyne* sp.  
(© Anses - LSV)

### ***Nacobbus* spp. :**

Les stades mobiles de *Nacobbus aberrans* peuvent être confondus avec d'autres nématodes de la famille des *Pratylenchidae*, en particulier les espèces endoparasites. Les principaux critères de distinction du genre *Nacobbus* sont :

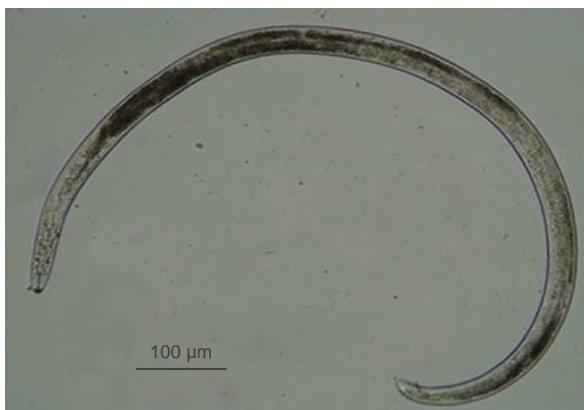
L2 : vermiforme, longueur comprise entre 300 et 380  $\mu\text{m}$ , tête fortement sclérotisée, stylet robuste avec des boutons basaux arrondis, bulbe médian bien développé, recouvrement œsophagien long recouvrant l'intestin dorsalement, extrémité de la queue arrondie (Fig. 7).

Femelle immature vermiforme : vermiforme allongée, longueur de 600 à 900  $\mu\text{m}$ , tête fortement sclérotisée, stylet robuste avec des boutons basaux arrondis, bulbe médian rond, recouvrement œsophagien long recouvrant l'intestin dorsalement, vulve proche antérieurement à l'anus, extrémité de la queue arrondie (Fig. 7).

Mâle : vermiforme, longueur comprise entre 700 et 900  $\mu\text{m}$ , tête fortement sclérotisée, stylet robuste avec des boutons basaux arrondis, bulbe médian bien développé, recouvrement œsophagien long recouvrant l'intestin dorsalement, queue courte arquée entièrement enveloppée par la bursa (Fig. 8).



**Figure n° 7 : Jeune femelle immature (gauche) et larves (droite) de *Nacobbus* sp.**  
(© Anses - LSV)



**Figure n° 8 : Mâle de *Nacobbus* sp.**  
(d'après Tianguistengo-Morales et al., 2017)

### 8.2.3 Conditionnement des nématodes

Si l'observation de l'extrait a mis en évidence la présence de nématodes renflés (*Meloidogyne* sp. et/ou *Nacobbus* sp., mature ou non), les individus sont photographiés (individuellement ou groupés) et les photos archivées en cas de demande du LNR ou des autorités compétentes. Les individus sont ensuite récupérés à l'aide d'un pinceau ou autre ustensile approprié, et placés en microtubes (type Eppendorf 1,5 ou 2 mL environ) dans un peu d'eau (devant a minima recouvrir les individus) et envoyé rapidement au LNR pour identification.

A des fins d'analyse officielle et si l'observation de l'extrait a mis en évidence la présence de nématodes libres du genre recherché (*Meloidogyne* et/ou *Nacobbus*), ceux-ci sont conditionnés ou traités en adéquation avec la méthode officielle d'identification qui sera mise en œuvre dans la suite du processus analytique de l'échantillon.

## 9. Résultats

### 9.1 Résultats pour détection de formes renflées

En cas de **présence** de nématodes renflés, indiquer :

« *Meloidogyne* sp. ou *Nacobbus* sp. détectés, envoi au LNR pour identification ».

En cas d'**absence** de nématode renflés, indiquer :

« *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, *M. enterolobii* et *Nacobbus aberrans* non détectés ».

## 9.2 Résultats pour détection de formes libres

Le résultat est exprimé par une phrase semblable aux propositions ci-dessous, avec une formulation appropriée lorsque la demande est clairement identifiée :

En cas d'**absence** de nématodes libres des genres *Meloidogyne* et *Nacobbus*, indiquer :

« *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, *M. enterolobii* et *Nacobbus aberrans* non détectés ».

En cas d'**absence** uniquement de formes libres (larve et/ou mâle) de nématode du genre *Meloidogyne*, indiquer :

« *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, *M. enterolobii* non détectés ».

En cas d'**absence** uniquement de formes libres (larve et/ou mâle) de nématode du genre *Nacobbus*, indiquer :

« *Nacobbus aberrans* non détecté ».

En cas de **présence** de nématodes (larve et/ou mâle) du genre *Meloidogyne* ou *Nacobbus*, indiquer :

« *Meloidogyne* sp. détectés » ou « *Nacobbus* sp. détectés », envoi au LNR pour identification .

## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

L'évaluation des performances de cette méthode mesurée avec des échantillons naturellement contaminés n'est pas réalisable. Cependant, afin de définir des ordres de grandeurs des taux de récupération, des expérimentations ont été menées avec des échantillons artificiellement contaminés par des individus ajoutés à des matrices saines.

Tableau n° 2 : Ordres de grandeurs du taux de récupération

Centrifugation	Formes renflées		Formes libres	
	<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>Nacobbus</i> spp.	<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>Nacobbus</i> spp.
Avec	80 %	45 %	34 %	58 %
Sans	79 %	88 %	- *	- *

\* : Données non mesurables car impossibilité de détection des formes libres sans centrifugation.

## Bibliographie

- de Bruijn N. & Stemerding S. (1968) *Nacobbus serendipiticus*, a plant parasitic nematode new to the Netherlands. *Journal of Plant Pathology*, 74, 227–228.
- den Nijs L., Brinkman H., van der Sommen A (2004) A Dutch contribution to knowledge on phytosanitary risk and host status of various crops for *Meloidogyne chitwoodi* Golden et al., 1980 and *M. fallax* Karssen, 1996: an overview. *Nematology* 6: 303-312. <https://doi.org/10.1163/1568541042360492>
- EPPO (2016) "PM 7/103 (2) *Meloidogyne enterolobii*." *EPPO Bulletin* 46(2): 190-201.
- EPPO (2023) Global database consultée le 15/06/2023 <https://gd.eppo.int/>
- Franklin M.T. (1959) *Nacobbus serendipiticus* n. sp., a root-galling nematode from tomatoes in England. *Nematologica*, 4, 286–293.
- Karssen G. (2002) The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* in Europe., Brill Academic Pub (July 1,2002).
- Manzanilla-López R. H., Costilla M. A., Doucet M., Franco J., Inserra R. N., Lehman P. S., Cid del Prado Vera I., Souza R.M., Evans K. (2002) The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 149-228.
- Sher S.A. (1970) Revision of the genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchoidea). *Journal of Nematology*, 2(3), 228.
- Tianguistengo-Morales A., Marban-Mendoza N., Valadez-Moctezuma E., Guerrero-Toledo F., De M., Cabrera-Hidalgo A. (2017) Análisis PCR-RFLP de la región 18S del DNAr de poblaciones de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944. *Revista Mexicana de fitosanidad*. 1. 37-46.
- Viaene N., Mahieu T., De La Peña E. (2007) Distribution of *Meloidogyne chitwoodi* in potato tubers and comparison of extraction methods. *Nematology*, 9(1), 143-150.