

**Identification de *Meloidogyne  
chitwoodi* et/ou *Meloidogyne  
fallax* par analyse  
morphobiométrique et  
biomoléculaire**

---



### 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 de l'ANSES : 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 15 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 des versions de la méthode.

n° méthode	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
NS/04/07			04/11/2003	Mai 2014
MOA024 partie C version 1 consultation	1 <sup>er</sup> mars 2014	31 mars 2014	x	x
MOA024 partie C version 1a	x	x	Mai 2014	

## SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>3</b>
<b>PRÉAMBULE .....</b>	<b>5</b>
OBJET DES MÉTHODES OFFICIELLES.....	5
GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES.....	5
LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS.....	5
ÉCHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON .....	5
MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES .....	6
CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE .....	6
OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE .....	7
REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION.....	7
<b>ORIGINE DE LA MÉTHODE .....</b>	<b>8</b>
<b>PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRÉCÉDENTE.....</b>	<b>9</b>
MODIFICATIONS .....	9
AMELIORATIONS.....	9
<b>DESCRIPTION DE LA MÉTHODE.....</b>	<b>10</b>
1.  OBJET.....	10
2.  DOMAINE D'APPLICATION .....	10
3.  PRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA METHODE.....	11
4.  MATERIEL ET CONSOMMABLES .....	12
4.1.  IDENTIFICATION MORPHOBIOMETRIQUE .....	12
4.1.1.  MATERIEL.....	12
4.1.2.  CONSOMMABLES ET PETITS MATERIELS .....	12
4.2.  IDENTIFICATION PAR AMPLIFICATION GENIQUE.....	12
4.2.1.  MATERIEL.....	12
4.2.2.  CONSOMMABLES .....	12
5.  VERIFICATION DU GENRE .....	14
6.  REPARTITION DES INDIVIDUS POUR L'ANALYSE MORPHOBIOMETRIQUE ET BIOMOLECULAIRE .....	15
7.  IDENTIFICATION MORPHOBIOMETRIQUE.....	15
7.1.  PRINCIPE.....	15
7.2.  MODE OPERATOIRE DETAILLE .....	15
7.2.1.  PRISE D'ANALYSE.....	15
7.2.2.  MONTAGE DES PREPARATIONS MICROSCOPIQUES .....	16
7.2.3.  IDENTIFICATION DE L'ESPECE (EXAMEN MICROSCOPIQUE A FORT GROSSISSEMENT) .....	17
7.2.3.1.  CAS DES LARVES DE STADES L2 .....	17
7.2.3.2.  CAS DES FEMELLES ET MÂLES .....	19
7.2.4.  FORMULATION DU RESULTAT MORPHOBIOMETRIQUE.....	20
8.  IDENTIFICATION PAR AMPLIFICATION GENIQUE .....	21
8.1.  PRISE D'ANALYSE .....	21
8.2.  CONTROLES ET TEMOINS .....	21

8.3.	EXTRACTION D'ADN .....	22
8.4.	AMPLIFICATION D'ADN .....	22
8.4.1.	TESTS PCR SPECIFIQUES .....	23
8.4.1.1.	TEST JMV1/JMV2 (D'APRÈS WISHART <i>ET AL.</i> 2002).....	23
8.4.1.2.	TEST CLEAR® DETECTIONS .....	23
8.4.2.	TEST PCR UNIVERSELLE .....	24
8.5.	ÉLECTROPHORESE .....	25
8.6.	REVELATION .....	25
8.7.	CONSERVATION DES RESULTATS .....	25
8.8.	INTERPRETATION DES RESULTATS .....	25
8.8.1.	VALIDATION DES CONTROLES .....	25
8.8.2.	INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'ANALYSE BIOMOLECULAIRE .....	25
8.8.3.	FORMULATION DU RESULTAT DE L'ANALYSE BIOMOLECULAIRE .....	27
9.	INTERPRETATION ET FORMULATION DU RESULTAT FINAL POUR UN ECHANTILLON.....	28
10.	ÉLIMINATION DES MATERIELS BIOLOGIQUES SUSCEPTIBLES D'ÊTRE CONTAMINANTS.....	29
11.	CONSERVATION DES RELIQUATS DE MATERIELS BIOLOGIQUES UTILISES .....	29
<b>LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELÉS PAR LA MÉTHODE .....</b>		<b>30</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>		<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>31</b>

## PRÉAMBULE

### 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, 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'accréditation ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

### ÉCHANTILLONNAGE 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 (ou critique) est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés ou dont la qualité peut affecter directement le résultat.

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.

Toute 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).

<b>Volume</b>	<b>volume &lt; à 10 mL</b> : EMT = ± 10% <b>volume ≥ à 10 mL</b> : EMT = ± 5 %
<b>Masse</b>	EMT = 10%
<b>pH</b>	EMT = 0,3 u
<b>Température</b>	<b>incubateur</b> : EMT = ± 3°C <b>réfrigérateur</b> : 5°C et EMT = ± 4°C <b>congélateur</b> : ≤ -18°C <b>congélateur froid intense</b> : ≤ -65°C
<b>Longueur</b>	EMT = 10%
<b>Temps</b>	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, l'agriculture, et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clés 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. À 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 constatée.

## ORIGINE DE LA MÉTHODE

La présente méthode a été rédigée par l'unité de nématologie du Laboratoire de la santé des végétaux. Les éléments techniques décrits dans cette méthode sont principalement basés sur des éléments de publications avec des adaptations pour leur optimisation. Une clé d'identification des stades L2 par morphobiométrie a été spécifiquement développée ; elle permet d'identifier les individus typiques des deux espèces recherchées. Les outils PCR temps réel (non publiés) sont commercialisés par la société Clear@Detections et ont été validés au LSV.

Le contenu scientifique de la présente méthode a fait l'objet d'une revue par des pairs scientifiques (voir remerciements) , l'unité « Développement de méthodes et analyses » du laboratoire en a également effectué une revue dans le cadre de l'harmonisation des méthodes officielles produites par le laboratoire.



## PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRÉCÉDENTE

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: la 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

Partie Biologie moléculaire :

Les nématodes du genre *Meloidogyne*, quel que soit leur stade de développement (femelles, mâles et deuxième stade larvaire) sont analysés par PCR.

La technique d'extraction d'ADN ainsi que les outils d'identification biomoléculaire ont été modifiés :

- la première étape de l'extraction d'ADN a été remplacée par un broyage mécanique à l'aide de billes de verre pour les stades filiformes ou à l'aide de piston pour le stade femelle ;
- Le test PCR utilisé en premier lieu est le test développé par Wishart *et al.* (2002) en PCR conventionnelle. En cas de résultat positif avec ce premier test pour au moins une des deux espèces cibles, la présence de la ou les espèce(s) identifiée(s) est vérifiée par un test PCR temps réel.

### AMELIORATIONS

Partie Morphobiométrie :

La technique d'identification morphobiométrique est plus détaillée :

- o une clé d'identification morphologique pour les larves de stade 2 est présentée.
- o des précisions sont apportées sur l'identification des femelles et des mâles.

Les critères pris en compte pour la formulation du résultat final après identifications morphobiométrique et biomoléculaire sont présentés.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Les nématodes visés sont des organismes nuisibles de quarantaine et, par voie de conséquence, soumis à la réglementation européenne (directive 2000/29/CE).

Remarque : la partie moléculaire de cette méthode est liée à la méthode officielle d'analyse MOA 022 « Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques » : elle ne peut être appliquée qu'en respectant les préconisations de cette méthode officielle.

### 1. Objet

La présente méthode vise à permettre d'identifier *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax* par analyses morphobiométrique et biomoléculaire du deuxième stade larvaire (stade L2), ainsi que des stades mâle et femelle.

### 2. Domaine d'application

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

Les échantillons analysés par le laboratoire sont des nématodes isolés à partir d'extraits issus de sols, racines, bulbes, tubercules ou rhizomes, pouvant contenir des larves infectieuses (stade L2), des femelles ou des mâles de *Meloidogyne* sp ou des individus isolés envoyés par un laboratoire tiers.

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

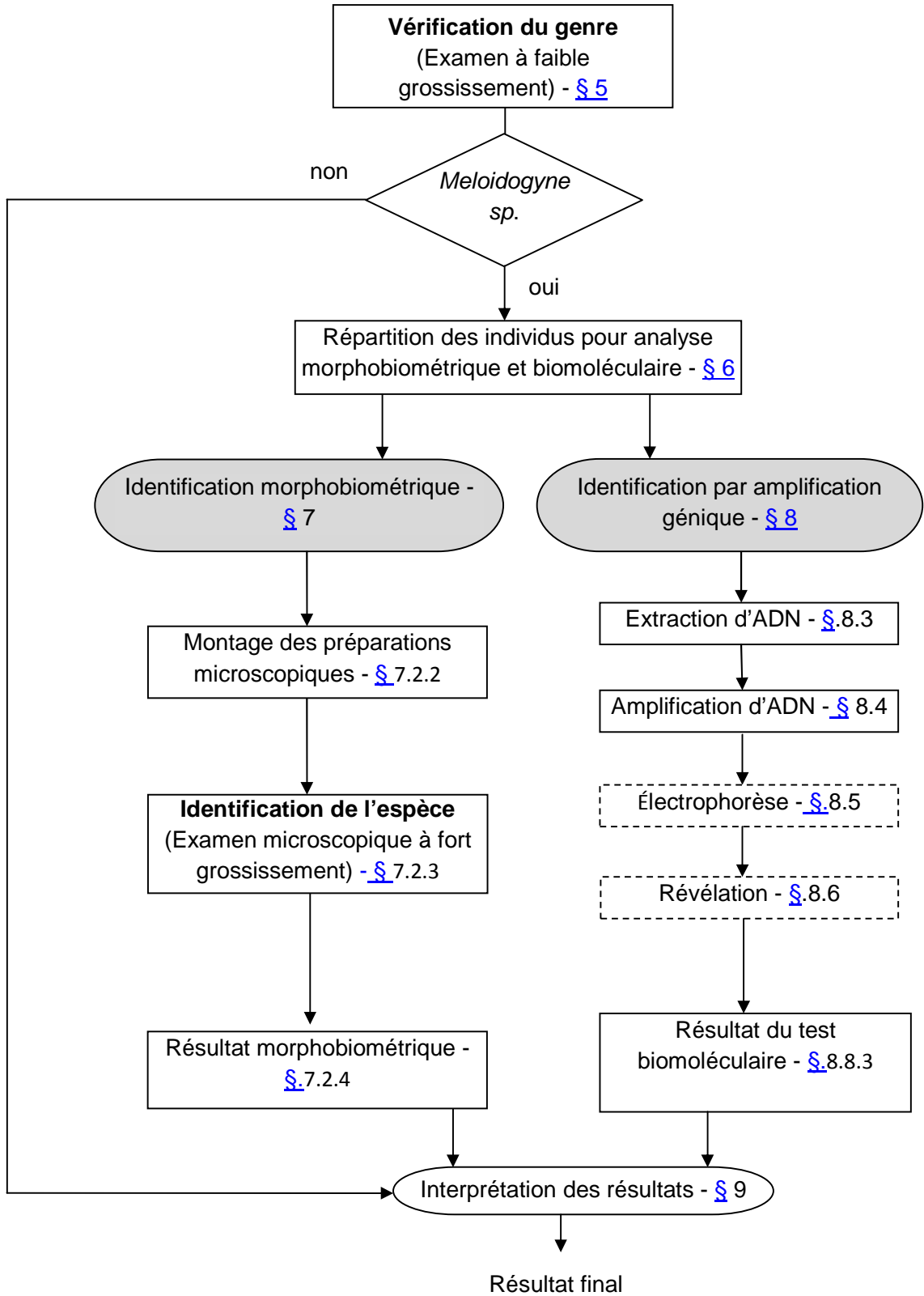
L'analyse est réalisée sur des individus du genre *Meloidogyne* présents dans un extrait brut d'environ 20 à 30 mL ou préalablement isolés (par exemple femelles issues de tubercules de pomme de terre conditionnées en microtubes)

#### Précautions particulières à prendre.

Les extraits peuvent être conservés quelques jours au froid positif en attendant leur analyse.

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.

3. Présentation schématique de la méthode



## 4. Matériel et consommables

### 4.1. Identification morphobiométrique

#### 4.1.1. Matériel

- Microscope stéréoscopique (loupe binoculaire) avec éclairage épiscopique et diascopique, grossissement de l'ordre de 16 à 60X.
- Microscope photonique haute définition (grossissements de l'ordre de X16 à X1000).

#### 4.1.2. Consommables et petits matériels

- Cellule de lecture,
- Cil monté sur aiguille ou tout autre instrument adapté pour la manipulation des nématodes filiformes,
- Pinceau ou tout autre instrument adapté pour la manipulation des nématodes renflés,
- Micro-scalpel ou aiguille de seringue,
- Huile d'immersion,
- Lames porte-objet et lamelles couvre-objet,
- Microtubes,
- Pissette d'eau courante,
- Platine chauffante,
- Tampon d'extraction ADN (§ 4.2.2.),
- Vernis, lut.

### 4.2. Identification par amplification génique

#### 4.2.1. Matériel

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de biologie moléculaire (pipettes, centrifugeuses, agitateur, bain-marie, cuves d'électrophorèse, système de prise de vue de gel d'électrophorèse, etc.), le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Broyeur de tissu oscillant pour microtubes d'environ 2 mL (par exemple Tissulyser, Qiagen®) ou matériel équivalent,
- Appareil de PCR conventionnelle et appareil de PCR temps réel.

#### 4.2.2. Consommables

En règle générale, le manipulateur doit veiller (soit par l'utilisation de produits et consommables dits de qualité biologie moléculaire, soit par un nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, dans les produits ou les consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies ainsi que la conservation en cours d'utilisation. À défaut, le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

Les marques de réactifs indiquées dans ce paragraphe ne sont pas prescriptives. Elles correspondent aux réactifs utilisés par le LNR pour la caractérisation et la validation de la présente méthode.

#### - Eau Ultra Pure de qualité biologie moléculaire

- **Tampon d'extraction d'ADN** : Tris HCl 10mM pH=8,0 ; EDTA 1mM ; Nonidet P40 1% ; protéinase K 100µg/mL tampon final (d'après Ibrahim *et al.*, 1994).

**- Mastermix commercial**

La présente méthode a été caractérisée et validée avec les Mastermix *LC FastStart DNA Master Plus SYBR Green I* et *LightCycler® 480 SYBRGreen I Master* de la société Roche Diagnostics pour la PCR temps réel et avec la Taq MP Biomedical (ref. EPTQD925) lors de l'évaluation de la méthode par PCR conventionnelle.

D'autres mélanges réactionnels prêts à l'emploi et contenant certains réactifs nécessaires à la réalisation de master mix de PCR (tampon de polymérase, polymérase à ADN, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, etc.) peuvent être utilisés sous réserve de démontrer préalablement qu'ils permettent d'obtenir, pour cette méthode, des niveaux de performances au moins équivalents à ceux qui sont cités.

**- Oligonucléotides**

Nématodes cibles	Amorces	Séquence 5' → 3'
<i>M. chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>	<b>JMV1</b>	GGA TGG CGT GCT TTC AAC
	<b>JMV2</b>	TTT CCC CTT ATG ATG TTT ACC C
	<b>Amorces Clear®Detections <i>M. chitwoodi</i></b>	Les séquences des amorces ne sont pas publiées ; des solutions prêtes à l'emploi peuvent être commandées auprès de la société Clear®Detections*
	<b>Amorces Clear®Detections <i>M. fallax</i></b>	
<b>Tous nématodes</b>	<b>18S</b>	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT
	<b>26S</b>	TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG

\*Clear®Detections, Binnenhaven 5, 6709PD Wageningen, The Netherlands ou contact sur le site internet : <http://www.cleardetections.com/en>

**- ADN polymérase thermostable et tampon de polymérase**

N'importe quelle polymérase à ADN peut être utilisée dès lors que les résultats obtenus sont au moins équivalents à ceux obtenus avec la Taq MP Biomedical (ref. EPTQD925) lors de l'évaluation de la méthode par PCR conventionnelle et/ou à ceux obtenus avec les Mastermix *LC FastStart DNA Master Plus SYBR Green I* et *LightCycler® 480 SYBRGreen I Master* de la société Roche Diagnostics pour la PCR temps réel.

Dans ce cas, le tampon de polymérase utilisé sera celui commercialisé avec la polymérase à ADN associée.

Ces réactifs peuvent être déjà compris dans un Mastermix commercial.

**- Chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>)**

Ce réactif peut être, dans certains cas, déjà intégré dans un Mastermix commercial ou dans le tampon de la Taq Polymerase.

**- Désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs)**

Les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) peuvent être déjà intégrés dans un Mastermix commercial.

**- Consommables à usage unique nécessaires à l'analyse**

Pistons adapté à la forme du microtube 2 mL

Billes de verre de 1 mm et 3 mm de diamètre.

## 5. Vérification du genre

L'analyse porte sur l'ensemble des nématodes présents dans l'extrait ou des individus isolés.

1 - Transvaser la suspension à analyser dans une cellule de lecture.

2 - Rechercher le genre faisant l'objet de l'analyse (stéréomicroscope).

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 1).
- femelle : 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; œufs toujours à l'extérieur de la femelle dans une masse gélatineuse (figures 2 et 3).
- 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 3).



Figure 1: Larve de *Meloidogyne* sp.

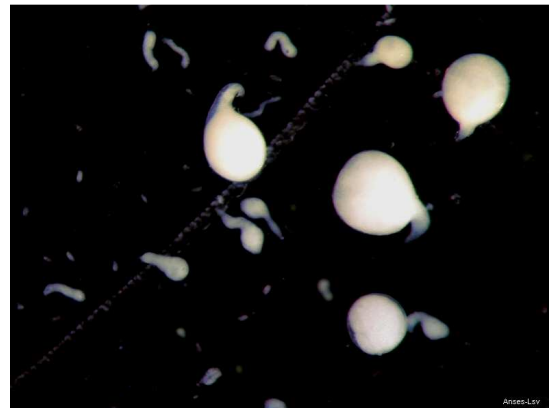


Figure 2: Femelles de *Meloidogyne* sp. (Anses-LSV)



Figure 3: Mâle et femelle de *Meloidogyne* sp.

**3** - Les nématodes du genre *Meloidogyne* détectés sont ensuite « pêchés » à l'aide d'un cil (larves et mâles) ou d'un pinceau (femelles) et déposés dans un peu d'eau dans un verre de montre ou tout contenant équivalent. Ils seront utilisés pour la réalisation des analyses d'identification morphologique et biomoléculaire.

## 6. Répartition des individus pour l'analyse morphobiométrique et biomoléculaire

Les individus isolés préalablement sont conditionnés par stade en microtubes contenant environ 100µL de tampon d'extraction pour l'identification biomoléculaire (§ 8).

On conditionne par tube au maximum : 10 L2 ou 1 femelle ou 1 mâle. La prise d'analyse est alors soit immédiatement soumise à extraction d'ADN, soit conservée au froid négatif jusqu'à l'extraction d'ADN.

Le tableau 1 ci-dessous décrit le nombre d'individus à répartir entre l'analyse biomoléculaire et l'analyse morphologique.

**Tableau 1 :** Répartition du nombre d'individus à traiter en analyse biomoléculaire et morphologique

Stades	Nombre d'individus disponibles	Nombre d'individus à analyser	
		Analyse biomoléculaire	Analyse morphobiométrique
L2	1 à 10	totalité	0
	11 à 19	10	totalité – 10
	20 et +	totalité – 10 (min 50 si possible)	10
Femelles blanches et mâles	si ♀ translucides* uniquement (0 ♀ blanche)	0	totalité (min. 5 si possible)
	1 à 4/sexe	totalité	0
	5 à 8	4	totalité - 4
	9 et +	entre 5 et 20	min. 4

\* Les femelles translucides sont vides et ne contiennent plus ou peu d'ADN ; aucun résultat ne pourra être obtenu lors d'un test PCR.

Si tous les stades sont présents dans l'échantillon, on réalise les analyses (morphologique et biomoléculaire) sur chacun d'eux.

## 7. identification morphobiométrique

### 7.1. Principe

L'analyse repose sur l'examen morphobiométrique de différents stades du nématode (stade L2, femelle et mâle).

### 7.2. Mode opératoire détaillé

#### 7.2.1. Prise d'analyse

L'analyse porte sur un minimum de 10 larves, 5 femelles et 5 mâles par échantillon chaque fois que cela est possible.

### 7.2.2. Montage des préparations microscopiques

#### ▪ Stades L2 et mâles

- Déposer une goutte d'eau sur une lame.
- Prélever à l'aide d'un cil les nématodes devant faire l'objet de l'identification spécifique et les déposer dans la goutte d'eau.
- Tuer les nématodes à l'aide d'une source de chaleur (de préférence plaque chauffante à environ 60°C).
- Contrôler la présentation des nématodes dans la goutte (disposer au centre et au fond de la goutte).
- Déposer une lamelle couvre-objet sur la goutte (éventuellement, chauffer légèrement la lamelle pour éviter la condensation sur celle-ci).
- Éliminer l'excès d'eau à l'aide d'un papier filtre.
- Sertir la lamelle (vernis, lut, etc.).

#### ▪ Femelles

- Prélever les femelles à l'aide d'un pinceau.
- Déposer les femelles sur une plaque en plastique mou (morceau de couvercle de boîte de Petri par exemple).
- Couper la tête à l'aide d'un micro-scalpel ou d'une aiguille de seringue afin de vider le contenu de la femelle.
- Couper l'extrémité vulvaire.
- Déposer les extrémités vulvaires dans une goutte d'eau sur une lame.
- Contrôler leur présentation (partie externe positionnée vers le haut).
- Déposer une lamelle couvre-objet, éliminer l'excès d'eau et sertir.



### 7.2.3. Identification de l'espèce (examen microscopique à fort grossissement)

Déposer une goutte d'huile d'immersion sur la préparation et l'observer à fort grossissement.

#### 7.2.3.1. Cas des larves de stades L2

La clé présentée ci-dessous permet l'identification d'individus « typiques\* » au stade L2 des espèces *Meloidogyne chitwoodi* et *M. fallax*.

\* individus conformes aux caractéristiques de l'espèce.

1. Longueur de la queue (figure 4) < 40 µm et de la partie hyaline (figure 6) < 8 µm..... *M. artiellia*  
Non ainsi ..... **2**
2. Longueur de la queue > 65 µm, partie hyaline > 19 µm  
et présence de granules au niveau du bulbe médian (figure 5)..... *M. naasi*  
Non ainsi..... **3**
3. Queue déformée (figure 7) et partie hyaline de la queue diffuse (figure 10)..... *M. hapla*  
Non ainsi : queue non déformée et partie hyaline de la queue nette (figure 11) **4**
4. Extrémité de la queue large, à bords parallèles et extrémité arrondie (figure 8)  
et longueur de la partie hyaline entre 13,0 et 13,91 µm..... *M. fallax*  
Non ainsi..... **5**
5. Queue conique avec extrémité arrondie (figure 9)  
et partie hyaline de la queue comprise entre 11,5 et 12,5 µm..... *M. chitwoodi*  
Non ainsi..... *Meloidogyne sp.*

Un résultat d'identification est donné pour chacun des individus observés. Plusieurs résultats différents peuvent être obtenus en cas de mélange d'espèces ou présence d'individus typiques et atypiques.

Le résultat de l'analyse morphobiométrique est une synthèse des résultats obtenus par individu (10 si possible).

Pour mettre en œuvre la clé d'identification, les critères suivants sont observés (crédits photos Anses-LSV) :

- Longueur de la queue : distance entre l'anus et l'extrémité de la queue

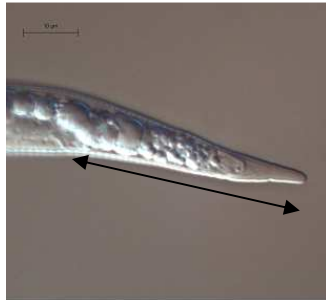


Figure 4: Longueur de la queue

- Granules au niveau de la partie antérieure du bulbe médian



Figure 5: Granules au niveau du bulbe

- Longueur de la partie hyaline de la queue : distance entre la fin de la zone opaque de la queue et l'extrémité de la queue.

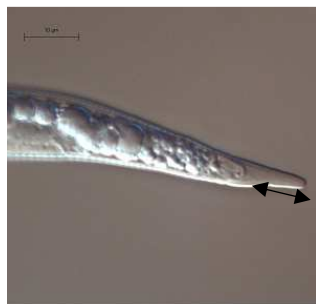


Figure 6: Partie hyaline de la queue

- Aspect de l'extrémité de la queue

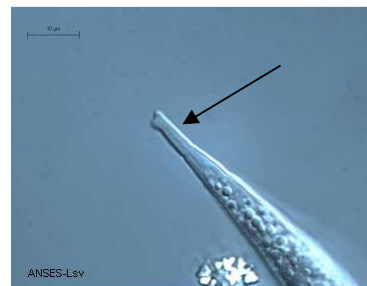


Figure 7: Queue déformée

- Aspect de l'extrémité de la queue.

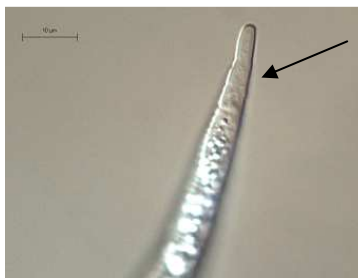


Figure 8: Queue large avec bords parallèles et extrémité arrondie



Figure 9: Queue conique avec extrémité arrondie

- Aspect de la partie hyaline.



Figure 10: Partie hyaline diffuse

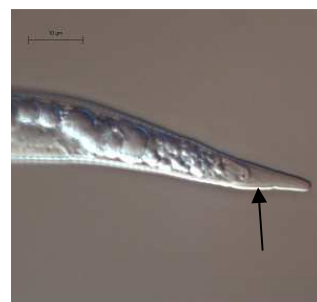


Figure 11: Partie hyaline nette

7.2.3.2. Cas des femelles et mâles

Les individus (femelles et mâles) sont observés en utilisant les critères discriminants ci-dessous.

Tableau 2 : Critères discriminants

- 1- figures périnéales des **femelles** présentant des granulations dans la zone terminale de la queue, arc dorsal arrondi, forme générale ronde : **figure 12**..... ***Meloidogyne hapla***
  
- 2- figures périnéales des **femelles** présentant des champs latéraux fortement marqués : **figure 13**..... ***Meloidogyne javanica***
  
- 3- **mâles** présentant un chapeau de la tête en forme de pagode chinoise : **figure 14** ***Meloidogyne incognita***

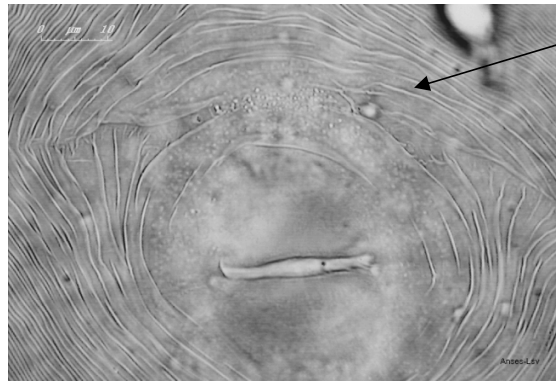


Figure 12: Granulations dans la zone terminale de la queue, arc dorsal arrondi, forme générale ronde (*M. hapla*) (photo Anses-LSV)

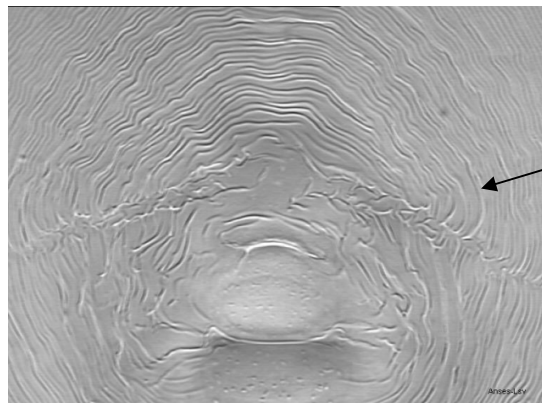


Figure13: Champs latéraux fortement marqués (*M. javanica*) (photo Anses-LSV)

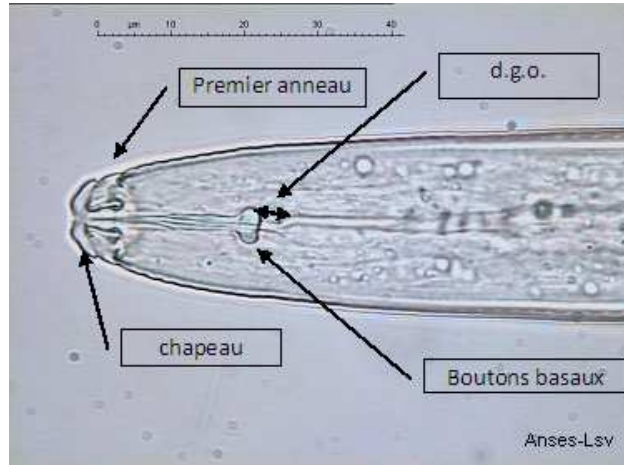


Figure 14: Différents critères de la tête des mâles et chapeau en pagode chinoise (*M. incognita*) (photo Anses-LSV)

Si pour tous les individus observés, un des critères est discriminant :

Indiquer en conclusion : **M. « nom de l'espèce » détectée** (si identifiée selon critères 1, 2, 3), et **M. chitwoodi** et **M. fallax** non détectés,

Si seulement quelques individus observés présentent des critères discriminants :

Indiquer en conclusion : **M. « nom de l'espèce » détectée** (si identifiée selon critères 1, 2, 3), et **M sp. détecté pour les individus non discriminés**,

Si pour tous les individus observés, aucun des critères n'est discriminant :

Indiquer en conclusion: **Meloidogyne sp. détecté**.

Une indication peut être rajoutée sur l'espèce morphologiquement la plus proche

#### 7.2.4. Formulation du résultat morphobiométrique

Le résultat final de l'identification morphobiométrique est une synthèse des différentes identifications mises en œuvre (larves de stade L2, femelles et mâles).

Plusieurs résultats positifs différents peuvent être obtenus pour un même échantillon si:

- plusieurs espèces sont présentes dans l'échantillon
- présence d'individus typiques et atypiques d'une même espèce

Résultats possibles lors de la mise en œuvre de l'identification morphobiométrique :

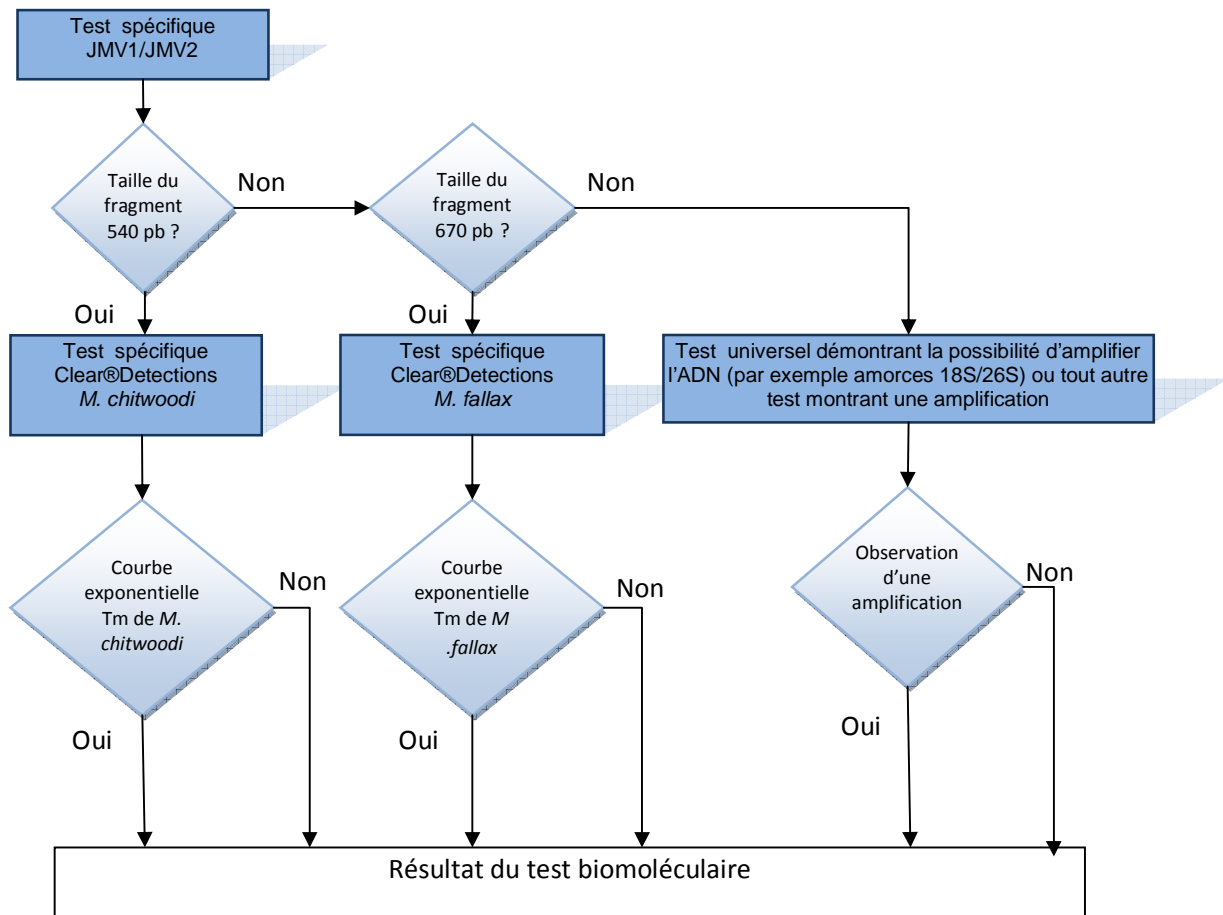
- *Meloidogyne* sp.
- *Meloidogyne chitwoodi*
- *Meloidogyne fallax*
- *Meloidogyne* autres que *M. chitwoodi* et *M. fallax*

## 8. Identification par amplification génique

### 8.1. Prise d'analyse

L'analyse est réalisée sur le ou les individus qui auront été prélevés et conditionnés préalablement selon les modalités décrites au § 6.

Schéma de mise en œuvre des tests PCR



### 8.2. Contrôles et témoins

Des échantillons de référence doivent être inclus en cours de processus analytique pour valider les différentes étapes de la méthode. Les contrôles à produire au cours de l'analyse sont, au minimum, les suivants :

- un contrôle négatif de processus : tampon d'extraction ADN seul conditionné et testé selon les mêmes modalités que celles pour l'échantillon à analyser ;
- un témoin positif de PCR : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN de chacune des cibles ; ce témoin permet de vérifier que la réaction de PCR s'est déroulée de façon correcte et a permis une amplification des échantillons contenant la cible ;
- un témoin négatif de PCR : il contient tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté ; cela permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de PCR ;

- un témoin négatif de spécificité : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ADN non cible ; cela permet de vérifier l'absence de réaction croisée au cours de la réaction de PCR. Ce type de témoin n'est pas nécessaire pour le test universel 18S-26S.

Selon les tests PCR, les extraits d'ADN à inclure seront issus des espèces suivantes :

	PCR spécifiques	PCR universelle
Témoin positif de PCR (A+)	<i>M. chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>	<i>M. chitwoodi</i> ou <i>M. fallax</i>
Témoin négatif de spécificité	Une espèce de <i>Meloidogyne</i> sp. autre que la ou les cible(s).	

Ces contrôles permettent de vérifier le bon fonctionnement des étapes d'extraction d'ADN et de PCR (amplification de l'ADN de *M. chitwoodi* et/ou *M. fallax* pour le contrôle positif et absence de contamination pour les contrôles négatifs).

### 8.3. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN résulte de l'action successive d'un broyage mécanique (billes de verre ou piston) et d'un traitement chimique (protéinase K).  
Pour ce faire,

#### Cas des formes filiformes :

- Ajouter des billes de verre de diamètres différents (1 bille de 3 mm et environ 100µL de billes de 1 mm de diamètre) au microtube contenant les nématodes.
- Placer sous agitation pendant environ 40 secondes à une fréquence d'environ 30 coups par seconde (microtubes préalablement décongelés).

#### Cas des formes renflées :

- Broyer les individus préalablement conditionnés en microtubes à l'aide d'un piston à usage unique.

#### Puis dans tous les cas :

- Placer les microtubes au bain-marie (entre 50 et 60°C) pendant au moins une heure, pour optimiser l'activité de la protéinase K.
- Si les ADN obtenus sont transférés en plaque pour la dénaturation de la protéinase K, centrifuger brièvement les microtubes pour précipiter les débris cellulaires et transférer le surnageant.
- Procéder à un nouveau traitement thermique des microtubes à environ 95°C pendant environ 10 min (dénaturation de la protéinase K).
- Si la dénaturation de la protéinase K a eu lieu dans les microtubes, centrifuger brièvement les microtubes pour précipiter les débris cellulaires avant de pipeter l'ADN.

### 8.4. Amplification d'ADN

Chaque extrait d'ADN est testé en duplicat.

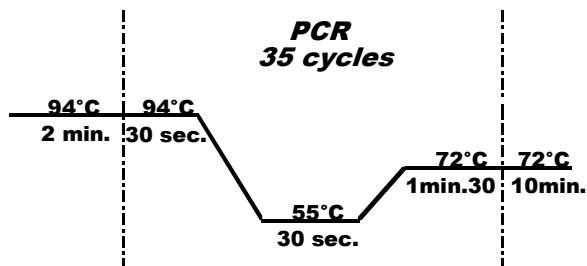
8.4.1. Tests PCR spécifiques

8.4.1.1. Test JMV1/JMV2 (d'après Wishart *et al.* 2002)

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

Réactifs	Test JMV1/JMV2 Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	25 µL
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl <sub>2</sub> (prendre en compte le MgCl <sub>2</sub> éventuellement présent dans le tampon Taq)	1,5 mM
Amorces	JMV1 : 0,2 µM JMV2 : 0,2 µM
dNTPs	0,2 mM
Taq DNA polymérase	1 unité
Eau ultra pure	Qsp 20 µL
Extrait ADN	5 µL

Appliquer le programme d'amplification suivant :

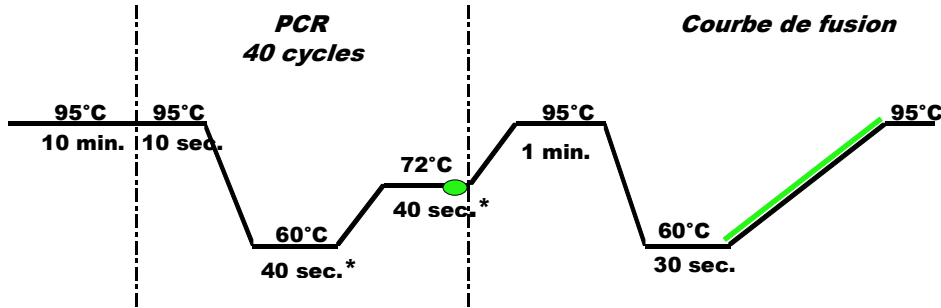


8.4.1.2. Test Clear@Detections

Les tests étant des simplex, la PCR réalisée dépend de la cible à identifier. L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

Réactifs	Test Clear@Detections Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	20 µL
Mastermix	1X
Primer mix 10X ( <i>M. chitwoodi</i> ou <i>M. fallax</i> )	1X
Eau ultra pure	Qsp 17 µL
Extrait ADN	3µL

Appliquer le programme suivant pour le LC 480 (Roche Diagnostics) :



\* 20 secondes pour le LC 2.0 (Roche Diagnostics)

La fluorescence du SYBR Green est mesurée ponctuellement à la fin de chaque cycle et en continu pendant la courbe de fusion (symbolisée en vert sur le programme ci-dessus).

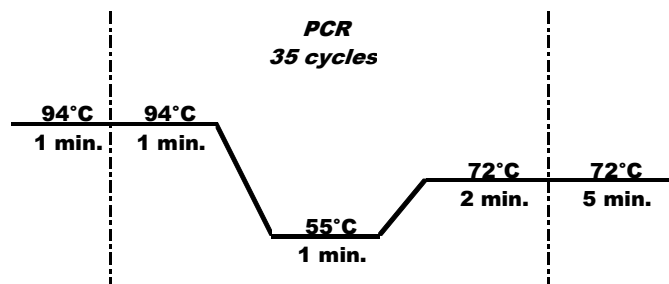
### 8.4.2. Test PCR universelle

Ce test est réalisé lorsque le test spécifique JMV1/JMV2 ne génère aucune d'amplification ou ne génère pas d'amplification correspondant aux cibles recherchées (voir logigramme décisionnel présenté dans le point 8.1).

L'amplification d'ADN est réalisée dans les conditions suivantes :

Test 18S-26S	
Réactifs	Concentration finale par tube de réaction
Volume réactionnel total	30 µL
Tampon Taq DNA polymérase	1 X
MgCl <sub>2</sub> (prendre en compte le MgCl <sub>2</sub> éventuellement présent dans le tampon Taq)	1,5 mM
Amorces	18S : 0.6 µM
	26S : 0.6 µM
dNTPs	0.1 mM
Taq DNA polymérase	0,6 unité
Eau ultra pure	Qsp 25 µL
Extrait ADN	5 µL

Appliquer le programme d'amplification suivant :





Dans le cas des tests par PCR conventionnelle (JMV1 et test universel), réaliser les trois opérations décrites dans les paragraphes 8.5 à 8.7.

### 8.5. Électrophorèse

Préparer un gel d'agarose entre 1,5 et 2% environ dans un tampon TAE ou TBE (voir MOA-REP 001). Le marqueur d'ADN (intercalant) peut soit être ajouté dans le gel lors de sa préparation, soit ultérieurement. Une échelle de poids moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposée sur chaque ligne de dépôts afin de définir la taille du fragment obtenu. Faire migrer les produits d'amplification en appliquant un courant électrique.

### 8.6. Révélation

La révélation se fait directement par lecture sur table UV si le marqueur d'ADN a été préalablement incorporé (point 8.5).

Sinon, la révélation est réalisée après immersion dans une solution de marqueur d'ADN (par exemple, le bromure d'éthidium, BET, est souvent utilisé comme marqueur à la concentration de 1 µg/mL). Cette solution doit être protégée de la lumière ; après coloration, rincer si nécessaire le gel à l'eau (sans chlore). Observer le gel sous UV.

Remarques : veiller à la protection des utilisateurs contre les UV (yeux, peau), le BET ou tout autre marqueur d'ADN. Tous les déchets ayant été en contact avec du BET ou tout marqueur d'ADN doivent être éliminés selon une procédure adaptée à ces déchets toxiques.

### 8.7. Conservation des résultats

L'observation de gel sous U.V. ne constitue pas un moyen suffisant pour garantir la traçabilité des résultats. Un équipement adapté fournissant une copie /image fidèle du gel sur un support stable dans le temps et référencé est nécessaire.

### 8.8. Interprétation des résultats

#### 8.8.1. Validation des contrôles

L'analyse est validée si les conditions ci-dessous sont vérifiées :

Type de contrôle	Résultat attendu et devant être observé
Contrôle négatif de processus	<b>NÉGATIF</b>
Contrôle négatif de PCR	<b>NÉGATIF</b>
Contrôle(s) positif(s) de PCR	<b>POSITIF(S)</b>
Contrôle négatif de spécificité (sauf PCR universelle)	<b>NÉGATIF</b>

#### 8.8.2. Interprétation des résultats de l'analyse biomoléculaire

L'interprétation s'entend par prise d'essai.

#### **Pour la PCR conventionnelle :**

L'analyse est qualitative. Quel que soit le test PCR, le résultat d'un puits est :

- négatif lorsqu'aucune amplification n'est observée,
- négatif lorsqu'aucune amplification à la taille attendue n'est observée,
- positif lorsqu'un fragment de taille attendue est observé.

Les tailles de fragments attendues pour les PCR conventionnelles sont les suivantes :

- Les amorces JMV1/JMV2 décrites au point 4.2.2 permettent une amplification spécifique d'un fragment d'environ 540 pb pour *M. chitwoodi* et 670 pb pour *M. fallax*.
- Les amorces 18S et 26S décrites au point 4.2.2 permettent une amplification d'un fragment d'environ 760 pb pour les espèces du genre *Meloidogyne*.

Le résultat d'un test PCR est obtenu en suivant les indications mentionnées dans les tableaux suivants :

- **PCR spécifique JMV1/JMV2**

Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la 2 <sup>ème</sup> amplification, le résultat est interprété comme positif.
-	-	NÉGATIF, test PCR universelle à réaliser ou tout autre test générant une amplification

Remarque : + et - correspondent respectivement à la présence et à l'absence du fragment d'amplification à la taille attendue.

- **PCR universelle 18S-26S :**

Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	POSITIF
-	-	NÉGATIF

Remarque : + et - correspondent respectivement à la présence et à l'absence du fragment d'amplification à la taille attendue.

**Pour la PCR temps réel :**

Les résultats obtenus par PCR temps réel sont traités par une analyse automatique du logiciel. Une analyse de type quantitative permet de déterminer le *crossing-point* (ou *Cp*) et l'analyse des courbes de fusion permet de déterminer la température de fusion (*Tm* : *melting temperature*, ou température à laquelle 50% de l'ADN est passé sous forme simple brin) des produits amplifiés.

Pour qu'un puits soit considéré comme positif, son *Cp* doit être inférieur à 35 dans les conditions d'analyse du LNR, la courbe d'amplification doit être de type exponentiel et le *Tm* doit respecter les conditions définies ci-après :

Les laboratoires détermineront les *Tm* et *Cp* pour chaque couple thermocycleur / pré-mix commercial. Indications sur les valeurs des *Tm* et *Cp* en fonction des cibles et des thermocycleurs obtenues dans les conditions du LNR :

Test PCR \ Cible	LC480	LC2.0
	<i>M. chitwoodi</i>	82.6* ±1°C
<i>M. fallax</i>	82.8* ±1°C	84.2* ±1°C

\*: Valeurs indicatives obtenus dans les conditions d'amplification du LNR

- PCR temps réel *M. chitwoodi* ou *M. fallax*

Analyse		Résultat du test
Puits 1	Puits 2	
+	+	POSITIF
+	-	PCR à refaire. Si au moins 1 positif sur 2 lors de la 2 <sup>ème</sup> amplification, le résultat est interprété comme positif.
-	-	NÉGATIF

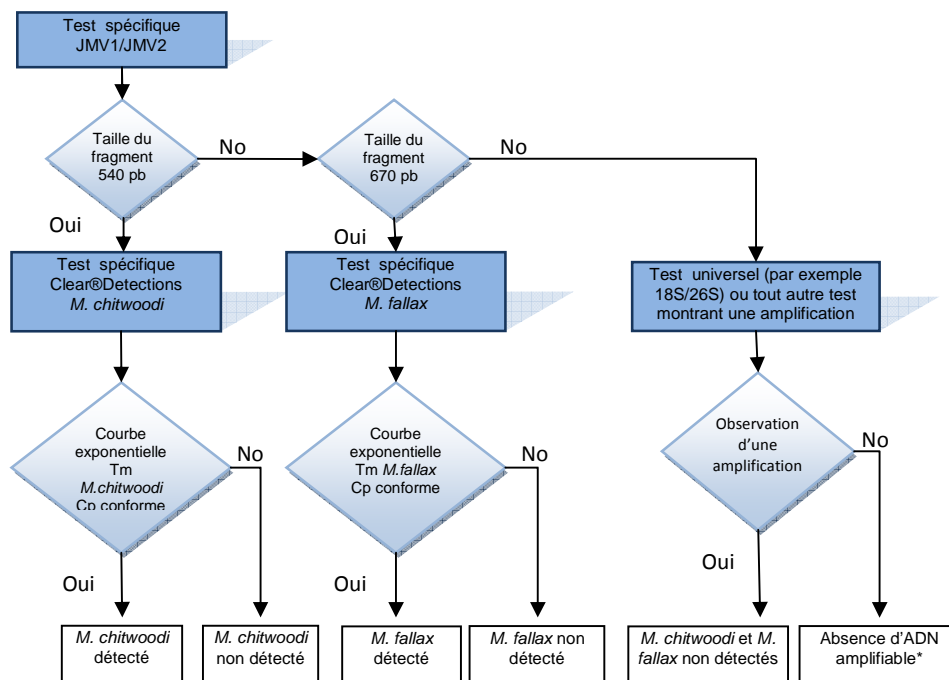
Remarque : + : observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de  $C_p < 35$  et avec un  $T_m$  correspondant à la cible recherchée.

- : absence de courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de  $C_p < 35$  ou observation d'une courbe d'amplification exponentielle avec une valeur de  $C_p < 35$  mais avec un  $T_m$  différent de celui de la cible recherchée.

8.8.3. Formulation du résultat de l'analyse biomoléculaire

Le résultat de l'analyse biomoléculaire est une synthèse des résultats obtenus par microtubes analysés.

L'interprétation des résultats de l'analyse biomoléculaire est réalisée en suivant le logigramme ci-après :



\* : Si l'ADN est non amplifiable, de nouveaux individus sont analysés par biologie moléculaire, soit à partir du reliquat de l'extrait, soit après une nouvelle extraction de la matrice (si disponible).  
Si l'analyse n'est plus possible (pas assez d'individus, plus de reliquat), le résultat est indiqué comme non exploitable.

**9. Interprétation et formulation du résultat final pour un échantillon**

Le résultat final d'identification de *Meloidogyne chitwoodi* et/ou *M. fallax* résulte de la combinaison des résultats d'identification morphologique et moléculaire.

Tableau 3 : synthèse des analyses et résultats finaux

Résultat d'analyse morphobiométrique		Résultat d'analyse biomoléculaire (1)		Résultat final	
Vérification genre	Identification espèces				
<i>Melo. sp.</i> 0	Néant	Néant		<i>M. chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>	non détectés
	- <i>Meloidogyne sp.</i> - Néant (manque d'individus pour réaliser cette analyse) - <i>Meloidogyne</i> autres que <i>M. chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>	<i>M. chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>	0	<i>M. chitwoodi</i> et <i>M. fallax</i>	non détectés
		<i>M. chitwoodi</i> et ou <i>M. fallax</i>	+	<i>M. chitwoodi</i> et ou <i>M. fallax</i>	détecté(s)
<i>Melo .sp.</i> +	- <i>M. chitwoodi</i>	<i>M. chitwoodi</i>	+	<i>M. chitwoodi</i>	détecté
		<i>M. fallax</i>	0 ou +	<i>M. fallax</i>	(non) détecté <sup>(a)</sup>
		<i>M. chitwoodi</i>	0		(1)
		<i>M. fallax</i>	0 ou +		(1)
	- <i>M. fallax</i>	<i>M. chitwoodi</i>	0 ou +		(1)
		<i>M. fallax</i>	0		(1)
		<i>M. chitwoodi</i>	0 ou +	<i>M. chitwoodi</i>	(non) détecté <sup>(a)</sup>
		<i>M. fallax</i>	+	<i>M. fallax</i>	détecté

0 : test négatif

+ : test positif

<sup>(a)</sup> : Respectivement selon le résultat de l'analyse biomoléculaire

(1) Dans le cas où les résultats morphologiques sont non concordants avec les résultats de biologie moléculaire, ou si aucune amplification n'est obtenue (absence d'ADN amplifiable) les actions suivantes sont menées comme suit :

- de nouveaux individus sont analysés (morphologie et biologie moléculaire). Seuls les résultats des analyses de biologie moléculaire positives sont pris en compte. Deux résultats négatifs en biologie moléculaire pour une même espèce conduisent à un résultat négatif.
- en cas d'absence de résultats en biologie moléculaire lors de la deuxième analyse ou absence de reliquats, le client en est informé et un rapport d'analyse est édité avec pour résultat « *Meloidogyne sp.* détecté ».

Le résultat porté sur le rapport d'analyse sera selon le cas :

- *Meloidogyne chitwoodi* « détecté » ou « non détecté » et/ou *Meloidogyne fallax* « détecté » ou « non détecté »
- *Meloidogyne sp.* « détecté »

Remarque :

Dans le cas où un nématode du genre *Meloidogyne* autre que *M. chitwoodi* et/ou *M. fallax* est détecté, il sera précisé en **commentaire** sur le rapport d'analyse, *Meloidogyne sp.* et /ou le nom de la ou des espèces identifiée(s) par analyse morphobiométrique et/ou biomoléculaire.

## 10. Élimination des matériels biologiques susceptibles d'être contaminants

Les risques de contamination du laboratoire et de son environnement sont liés à la présence du parasite dans :

- les reliquats d'échantillons et contenants,
- 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 le laboratoire et l'environnement : traitement des effluents, destruction contrôlée des déchets.

## 11. Conservation des reliquats de matériels biologiques 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 du Ministère chargé de l'agriculture.

## LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELÉS PAR LA MÉTHODE

Référence	Titre
<b>Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000</b>	Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté <i>Journal officiel n° L 169 du 10/07/2000 p. 0001 – 0022</i>
<b>MOA 022</b>	Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes.
<b>REP 001</b>	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV

## REMERCIEMENTS

Le Laboratoire de la santé des végétaux remercie les personnes suivantes pour l'expertise mobilisée lors de la revue de la présente méthode :

- Didier Mugniéry
- Hervé Marzin
- Philippe Castagnone

Des remerciements sont également adressés à l'ensemble des agents de l'Unité de Nématologie ainsi qu'à l'Unité Développement des Méthodes et Analyses pour leur participation à la mise au point de la méthode ainsi qu'à la correction du document.

## BIBLIOGRAPHIE

**EPPO.** (2009). "PM7/41(2) Diagnostic - *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*." *EPPO Bulletin* 39, 5-17.

**Ibrahim S.K., Perry R.N., Burrows P.R., Hooper, D.J.** (1994). Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of nematology* 26, 412-421.

**Jepson, S. B.** (1987). *Identification of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*.

**Karssen, G.** (2002). *The Plant-Parasitic Nematode Genus Meloidogyne in Europe*. Brill Academic Pub.

**Perry R.N., Moens M., Starr J.L.** (2009). *Root-Knot Nematodes*.

**Clear@Detections.** (2013). Validation Report *Meloidogyne chitwoodi* & *Meloidogyne fallax*- Diagnostic qPCR assays for identification and detection, Version 1.0 (August 2013).

**Wishart J., Phillips, M.S., Blok, V.C.** (2002). Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla*. *Phytopathology*, 92, 884–892.

**Zilstra C. et al.** (1997). A reliable and precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS RFLPs. *Fundamental and applied Nematology*, 20(1), 59-63.

**Zilstra C. et al.** (1995). Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology*, 85, 1231-1237.

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 de la santé des végétaux (ANSES),  
7, rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01**

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

Ce document est édité par :

**Ministère chargé de l'agriculture  
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](http://www.agriculture.gouv.fr)

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.