

# LNPV

Laboratoire

National de la

Protection des

Végétaux

Sols et organes végétaux souterrains

détection de *Meloidogyne fallax*

Karssen, 1996

et de *Meloidogyne chitwoodi*

Golden, O'bannon, Santo & Finley, 1980

(nématodes à galles)

Réf.: Méthode N.S./ 04 / 06 version a

**Laboratoire de référence :**

LNPV Unité de Nématologie à

Rennes

Domaine de la Motte au Vicomte -

B.P. 29

35653 LE RHEU cedex

Sols et organes végétaux souterrains  
**DETECTION DE *Meloidogyne fallax* et de *Meloidogyne chitwoodi***  
**(NEMATODES A GALLES)**

**SOMMAIRE**

<b>1. OBJET</b> .....	<b>3</b>
<b>2. DOMAINE D'APPLICATION</b> .....	<b>3</b>
<b>3. DEFINITIONS</b> .....	<b>3</b>
<b>4. LOGIGRAMME DE DECISION</b> .....	<b>4</b>
<b>5. EXTRACTION</b> .....	<b>4</b>
A PARTIR DU SOL .....	4
5.1.1 Principe .....	4
5.1.2 Produits et consommables.....	4
5.1.3 Appareillage.....	5
5.1.4 Echantillonnage .....	5
5.1.5 Mode opératoire.....	5
A PARTIR DES ORGANES VEGETAUX SOUTERRAINS .....	6
5.1.6 Extraction par broyage .....	6
5.1.7 Extraction par digestion enzymatique(racines, organes de réserves).....	7
<b>6. LECTURE</b> .....	<b>8</b>
APPAREILLAGE .....	8
PRODUITS ET CONSOMMABLES .....	8
MODE OPERATOIRE .....	8
<b>7. PREPARATION, CONDITIONNEMENT DES NEMATODES POUR EXPEDITION</b> .....	<b>8</b>
<b>8. EXPRESSION DES RESULTATS</b> .....	<b>8</b>
<b>9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>9</b>

Sols et organes végétaux souterrains  
**DETECTION DE *Meloidogyne fallax* et de *Meloidogyne chitwoodi***  
**(NEMATODES A GALLES)**

---

### **Avertissements**

#### *Précautions de sécurité pour les manipulateurs et pour l'environnement*

Les sols peuvent être porteurs d'éléments traumatisants tels que des morceaux de verre ou de métal, potentiellement contaminés par l'agent du tétanos; en conséquence, les personnes amenées à les manipuler doivent agir avec précaution et, impérativement, être vaccinées.

#### *Cadre réglementaire*

Les nématodes visés sont des organismes nuisibles de quarantaine et, par voie de conséquence, soumis à des réglementations européennes (directives 2000/29 CE, 95/44 CE et 97/46 CE) et nationales (Code rural) que les laboratoires chargés de détection et d'identification s'engagent à respecter.

## **1. Objet**

Cette méthode s'applique à la détection des nématodes à galles *Meloidogyne fallax* et *Meloidogyne chitwoodi* sous leur forme filiforme ou renflée. Elle doit être utilisée pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des contrôles phytosanitaires pour ces parasites en surveillance du territoire, à l'importation et à l'exportation.

## **2. Domaine d'application**

La méthode s'applique :

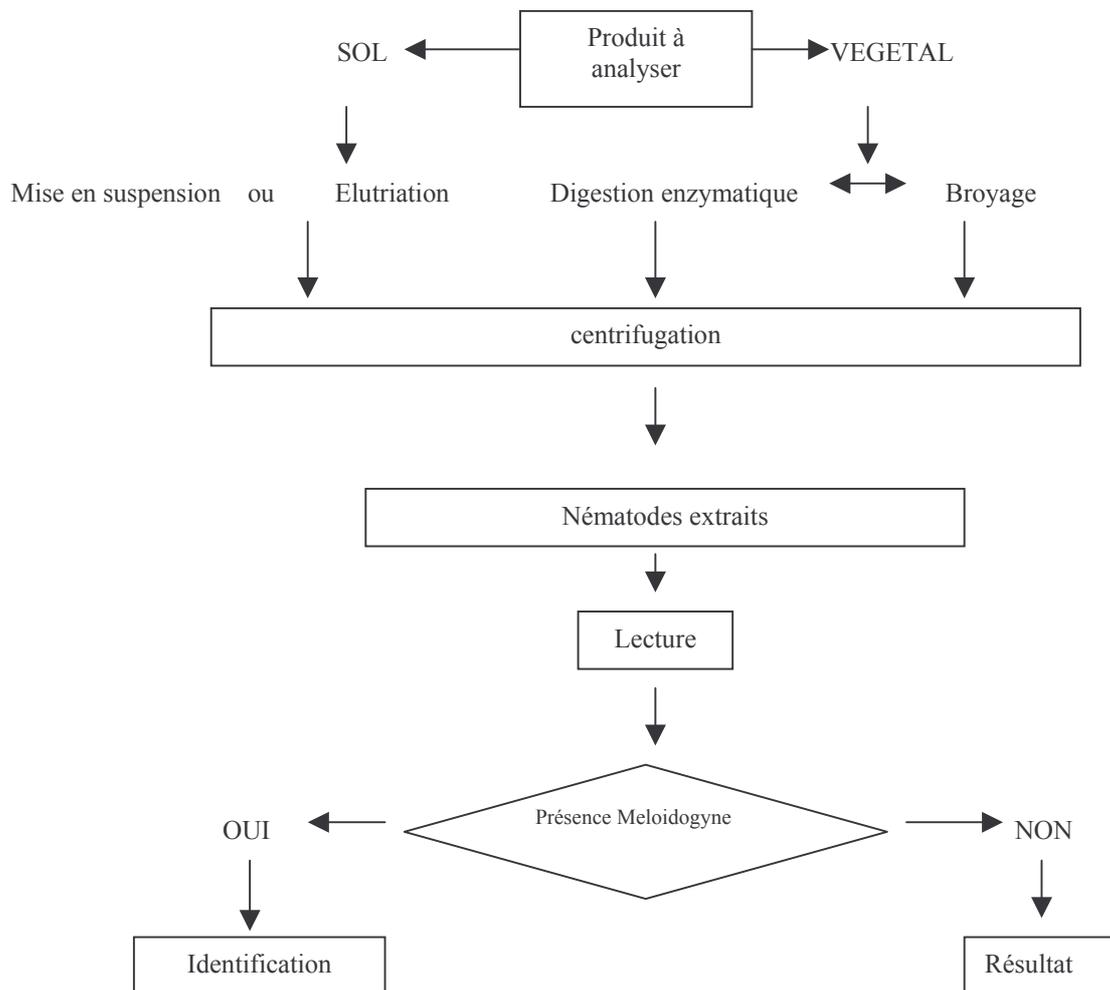
- aux sols, supports de culture et déchets terreux ayant ou non porté des cultures,
- aux organes végétaux souterrains hôtes (racines, tubercules...)

## **3. Définitions**

Formes filiformes: deuxième stade larvaire (L2) et mâles.

Formes renflées: stades immobiles dans le végétal L3, L4 et femelles.

## 4. Logigramme de décision



## 5. Extraction

### A partir du sol

#### 5.1.1 Principe

La technique décrite permet d'extraire les nématodes filiformes du genre *Meloidogyne* à partir d'un sol en vue d'une détection visuelle pour les séparer du reste de la nématofaune. Elle repose sur les caractéristiques de taille (tamisage) et de densité des nématodes (élutriation, centrifugation).

#### 5.1.2 Produits et consommables

- Eau courante
- Kaolin
- Solution de MgSO<sub>4</sub> (densité d'environ 1,18) ou solutions à propriété équivalente
- Récipients pour extraits

- Papier absorbant

### **5.1.3 Appareillage**

- Balance EMT (précision au gramme)
- Malaxeur
- Elutriateur ou tout autre équipement donnant des résultats équivalents
- Centrifugeuse
- Tamis de mailles de l'ordre de 4 mm, 1 mm, 40 µm et 20µm (au plus)
- Support d'égouttage
- Bols de centrifugeuse grande capacité
- Cuillère, spatule, système d'homogénéisation (fouet, vibreur...)
- Pissettes
- Cuvettes plastiques ou seaux de capacité adaptée

### **5.1.4 Echantillonnage**

Vider la totalité de l'échantillon reçu dans une cuvette.  
Éliminer manuellement les débris végétaux et cailloux.  
Émietter et homogénéiser l'échantillon par brassage manuel.  
Prélever environ 1000 g de l'échantillon lorsque cela est possible.

### **5.1.5 Mode opératoire**

#### **Elutriation**

Vider le prélèvement à analyser dans le bol du malaxeur.  
Ajouter de l'eau.  
Homogénéiser la suspension jusqu'à obtention d'une boue fluide.  
Vider la suspension dans un tamis de maille de 4 mm placé à la partie supérieure de l'appareil.  
Effectuer trois sédimentations successives, après brassage énergique, durant un temps suffisant pour permettre la séparation des nématodes.  
Récupérer la suspension contenant les nématodes sur un tamis de 40 µm lui-même surmonté d'un tamis de 1mm pour éliminer les gros débris.  
Vider dans un bol de centrifugation le contenu du tamis de 40 µm.  
Rajouter environ une cuillerée à soupe de kaolin  
Équilibrer les bols deux par deux, puis homogénéiser à l'aide d'une spatule.  
Centrifuger la suspension pendant environ 4 mn à 1800 g.  
Éliminer le surnageant  
Mettre en suspension le culot dans la solution de sulfate de magnésium ou de solutions à propriété équivalente puis homogénéiser à l'aide d'une spatule  
Centrifuger la suspension pendant environ 2 mn à 900 g.  
Récupérer le surnageant sur un tamis de 20 µm (au plus) préalablement mouillé et disposé sur un support d'égouttage au-dessus d'un évier.  
Transférer le contenu du tamis dans un pot de lecture à l'aide d'une pissette.

#### **Mise en suspension :**

Vider le prélèvement à analyser dans le récipient pour mise en suspension.  
Ajouter de l'eau en quantité suffisante.

Opérer trois décantations successives et récupérer les surnageants sur tamis de 40 $\mu$ m  
Centrifuger comme indiqué ci-dessus.

## **A partir des organes végétaux souterrains**

### **5.1.6 Extraction par broyage**

#### 5.1.6.1 Principe

cf. chapitre 41.1

La technique décrite permet d'extraire par broyage des racines, bulbes, tubercules, rhizomes les différents stades présents.

#### 5.1.6.2 Produits et consommables

- Eau courante
- Papier absorbant
- Kaolin
- Solution de MgSO<sub>4</sub> (densité d'environ 1,18) ou solutions à propriété équivalente
- Récipients pour extraits

#### 5.1.6.3 Appareillage

- Balance EMT (précision au gramme)
- Broyeur à couteaux
- Centrifugeuse
- Tamis de mailles de l'ordre 600  $\mu$ m et 20  $\mu$ m (au plus)
- Cuvettes et assiettes plastiques
- Support d'égouttage
- Bols de centrifugeuse grande capacité
- Cuillère, spatule, système d'homogénéisation (fouet, vibreur...)
- Pissettes

#### 5.1.6.4 Echantillonnage

Vider la totalité de l'échantillon reçu dans une cuvette.

Nettoyer les racines, bulbes, tubercules à l'eau, si nécessaire, et prélever une fraction de chaque individu de l'échantillon.

Découper les racines en fragments de 10 à 15 mm environ.

#### 5.1.6.5 Mode opératoire

Vider les fragments à analyser dans le bol du broyeur.

Apporter le volume d'eau nécessaire pour recouvrir le broyat et les couteaux.

Effectuer un broyage à vitesse lente pour libérer les nématodes.

Vider le contenu du bol sur un tamis de 600  $\mu$ m placé au-dessus d'une cuvette

Rincer abondamment les débris retenus par le tamis.

Vider le contenu du tamis dans le broyeur.

Effectuer un broyage à vitesse rapide durant le temps nécessaire pour libérer les nématodes.

Vider le contenu du bol sur le tamis de 600  $\mu$ m comme précédemment.

Passer toute la suspension recueillie dans la cuvette sur un tamis de 20  $\mu$ m (au plus) disposé sur un support d'égouttage.

Récupérer le contenu de ce dernier tamis dans un bol de centrifugation à l'aide d'un jet de pissette.

Rajouter environ une cuillerée à soupe de kaolin

Centrifuger la suspension pendant environ 4 mn à 1800 g.

Éliminer le surnageant

Mettre en suspension le culot dans la solution de sulfate de magnésium

Centrifuger la suspension pendant à 900 g environ pendant 2 mn.

Récupérer le surnageant sur un tamis de 20  $\mu\text{m}$  (au plus) disposé sur un support d'égouttage au-dessus d'un évier.

Transférer le contenu du tamis dans un récipient pour extraits à l'aide d'un jet de pissette.

### 5.1.7 Extraction par digestion enzymatique (racines, organes de réserves)

**Étant donné les risques liés à l'emploi des enzymes (pectinases et cellulases), l'usage de gants et de masques est vivement conseillé. De même, les récipients d'agitation doivent être fermés.**

#### 5.1.7.1 Principe

Cf. chapitre 41.1

La technique décrite permet d'extraire par digestion enzymatique (enzymes cellulolytiques et pectinolytiques) les différents stades de *Meloidogyne* qu'ils soient filiformes ou renflés.

Elle permet la libération des nématodes sans broyage et la récupération soit de tous les stades (utilisation d'un tamis de récupération de 40  $\mu\text{m}$ ) ou uniquement les formes renflées (utilisation d'un tamis de récupération de 160  $\mu\text{m}$ )

#### 5.1.7.2 Produits et consommables

- Eau courante
- Solution de  $\text{MgSO}_4$  (densité d'environ 1,18) ou solutions à propriété équivalente
- Kaolin
- Récipients contenant les extraits
- Enzymes (par exemple Celluclast® ou Pectinex®).

#### 5.1.7.3 Appareillage

- Balance EMT (précision au gramme)
- Centrifugeuse
- Agitateur orbital ou magnétique
- Récipients pour agitation
- Tamis de mailles de l'ordre de 600  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$  (au plus)
- Support d'égouttage
- Ciseaux
- Barreaux d'agitation aimantés
- Bols de centrifugeuse de grande capacité
- Cuillère, spatule, système d'homogénéisation (fouet, vibreur...)
- Pissettes

#### 5.1.7.4 Échantillonnage

L'analyse peut être réalisée:

- sur racines (tronçons de 1 à 2 cm).

- sur organes de réserves (par exemple pelures et stolons de tubercules de pomme de terre).

#### 5.1.7.5 Mode opératoire

Placer le produit à analyser dans un récipient de capacité adaptée au volume de l'échantillon. Ajouter le mélange enzymatique de manière à recouvrir le matériel végétal.

Agiter jusqu'à une digestion des tissus permettant la séparation du nématode et du végétal.

Verser le produit de la digestion sur un tamis de 600 µm posé sur un tamis de récupération de 160 µm pour la récupération des formes renflées ou de 20µm (au plus) pour la totalité des nématodes.

Laver le contenu du tamis de 600 µm et triturer les débris retenus pour faciliter le passage de la suspension issue de la digestion.

Récupérer le contenu du tamis de 160 ou 40 µm dans un bol de centrifugation à l'aide d'une pissette contenant la solution de MgSO<sub>4</sub>.

Ajouter une quantité adaptée de kaolin et homogénéiser.

Centrifuger à environ 900 g durant 2 mn.

Tamiser le surnageant sur un tamis de 20 µm (au plus) posé sur un support d'égouttage.

Récupérer dans un récipient pour extraits, à l'aide d'une pissette d'eau.

## 6. Lecture

### Appareillage

- Microscope stéréoscopique
- Cil monté sur aiguille
- Cellule de lecture
- Pissette

### Produits et consommables

- Eau courante

### Mode opératoire

Observer directement dans le récipient pour extraits sous un microscope stéréoscopique ou, si nécessaire, vider l'extrait dans une coupelle de lecture.

Rechercher les nématodes du genre *Meloidogyne*.

## 7. Préparation, conditionnement des nématodes pour expédition

Si l'observation de l'extrait a mis en évidence la présence de nématodes du genre *Meloidogyne*, l'extrait est conditionné dans un récipient étanche, résistant au transport.

Identifier le contenant de manière indélébile et l'expédier, sous emballage résistant, au laboratoire de référence pour confirmation de la détection du genre *Meloidogyne* et l'identification des espèces *chitwoodi* ou *fallax*.

## 8. Expression des résultats

*Meloidogyne* sp. détecté

ou

*Meloidogyne chitwoodi* non détecté  
*Meloidogyne fallax* non détecté

## 9. Références bibliographiques

- K. EVANS, D.L. TRUGDILL and J.M. WEBSTER (1993) Extraction, Identification and Control of Parasitic Nematodes in Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture, CAB International, Wallington, U.K., 1- 59.
- M. ARAYA and E.P. CASTELL-CHEN (1993) Enzymatic Digestion of Roots for Recovery of Root-knot Nematode Developmental Stages. *Journal of Nematology* 25 (4) :590-595

oOo