

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA019 - Version 2

Février 2019

Détection des nématodes du genre *Globodera*

Laboratoire de la Santé des Végétaux – Unité de Nématologie

Laboratoire national de référence « Nématodes phytoparasites sur toutes matrices »



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	Date	Principales modifications
MOA019 version 1a			Version initiale
v2*	mineures	Consultation	<p>Modifications mineures suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none">• Mise au format Anses avec modification du code identifiant (suppression du « O »)• § 1 : précision concernant le domaine d'application : la présente méthode ne s'applique pas aux substrats organiques• § 4 : logigramme : ajout du cas d'une zone périnéale indéterminée (cas d'un kyste fortement abîmé)• § 7.1 : suppression du volume minimum de sol• § 7.2 : précision concernant les conditions de stockage des organes végétaux périssables• § 7.3 : précision concernant les conditions de stockage des kystes après détection• § 8.1 et 8.2 : détails concernant le volume ou la taille de l'échantillon analysé. Suppression du volume inférieur recommandé.• § 8.1.1 : suppression de la partie concernant l'utilisation d'un récipient pour mesurer le volume de sol.• § 8.1.2 : suppression du paragraphe concernant la prise d'essai• § 8.1.2 : précisions concernant la quantité maximale analysable de sol selon les appareils utilisés <p>Précision pour l'appareil de Fenwick et les élutriateurs de Kort et de Seinhorst : l'apport d'eau est maintenu jusqu'au débordement d'une eau claire</p> <p>Pour le Schuiling: modification de la quantité maximale analysable</p>



Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
			<p>Remarque sur le nettoyage des appareils semi automatisés : obligation d'un cycle « à blanc » entre chaque échantillon dans le cas d'analyses officielles</p> <ul style="list-style-type: none"> • § 8.2.2 : précision concernant le protocole d'analyse de racines non tubérisées • § 8.3 : reformulation des méthodes de préparation de l'extrait • § 8.3.2 : précision concernant la préparation de l'échantillon (émiettage) avant mise en œuvre de la méthode de séparation des kystes à l'acétone (variante 2) • § 8.4 : modification de la légende de la Figure 1 : le terme « fenêtre vulvaire » est remplacé par « zone périnéale » modification de la mise en forme des deux étapes de tri des kystes • § 8.5 : en cas de détection de kystes de <i>Globodera</i> sp., ceux-ci sont adressés à un laboratoire réalisant l'analyse d'identification • § 9.2 : ajout de « sp. » dans la formulation d'un résultat négatif : « <i>Globodera</i> sp. non détecté » • § 10 : ajout d'éléments concernant la caractérisation des performances de la méthode • Annexe I : Simplification des modalités d'évaluation des performances d'un nouvel appareil Le taux de détection minimum des kystes de <i>Globodera</i> s'applique à chaque échantillon contaminé. Il ne s'agit plus d'un taux moyen calculé à partir de tous les échantillons contaminés par <i>Globodera</i> sp. • Suppression de l'obligation de mentionner le volume et le nombre d'unités analysés sur le rapport d'analyse • Suppression du paragraphe « conservation des reliquats d'échantillons et des produits analysés » • Suppression des détails concernant la préparation des échantillons d'autocontrôles

* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du 20/09/2017 au 20/10/2017 sur le site internet de l'Agence.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux – Unité de Nématologie

Laboratoire National de Référence : Nématodes phytoparasites sur toutes matrices

Adresse : Domaine de la Motte au Vicomte

BP 35327

35653 Le Rheu Cedex

France

Tél : +33(0)2 99 30 90 35

Contact : rennes.lsv@anses.fr



Sommaire

Avant-propos	4
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1 Objet et domaine d'application	8
2 Documents de référence	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	8
5 Réactifs et consommables	10
6 Appareillage et matériels	10
7 Échantillons	11
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	11
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	11
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	12
8 Mode opératoire	12
8.1 Extraction de kystes à partir de sols, supports de culture et produits terreux hors substrats organiques	12
8.1.1 Préparation des échantillons pour analyse	12
8.1.2 Extraction.....	12
8.2 Extraction de kystes à partir d'organes végétaux souterrains.....	14
8.3 Récupération et préparation de l'extrait	14
8.3.1 Récupération de l'extrait.....	14
8.3.2 Séchage et remise en suspension de l'extrait sec (étape facultative)	15
8.4 Tri et lecture.....	16
8.5 Conditionnement des kystes.....	18
9 Résultats	19
9.1 Contrôle de la validité des résultats	19
9.2 Formulation du résultat	19
10 Caractéristiques de performance de la méthode	20
Annexe I : Qualification d'un nouvel équipement et contrôles périodiques	21
Bibliographie	22



Introduction

Les nématodes à kystes du genre *Globodera* sont des parasites obligatoires présentant une grande spécificité d'hôte. La plupart des espèces sont inféodées aux Solanacées, alors que d'autres se développent sur Astéracées et Rosacées.

Originaires des Andes, les espèces *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* ont été introduites en Europe au cours du XIX^e siècle. La pomme de terre est la principale plante hôte de ces nématodes, mais on recense également la tomate et l'aubergine. Ces nématodes peuvent provoquer d'importantes diminutions de rendement ainsi que des pertes d'ordre qualitatif en cas de fortes attaques. Dans ce cas, les symptômes de « piqûres » visibles sur tubercules peuvent rendre la production non commercialisable.

Sa forme de conservation, le kyste, lui permet de survivre pendant plusieurs années, même en l'absence de plante hôte. C'est également cette forme enkystée qui peut être disséminée sur de longues distances par transport passif, via notamment du matériel végétal ou du sol contaminé.

G. pallida et *G. rostochiensis* sont réglementées au sein de l'Union Européenne et au niveau international (EPPO, 2017).



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.

Elimination des matériels susceptibles d'être contaminants : le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.



1 Objet et domaine d'application

La présente méthode décrit les modalités de détection des formes enkystées appartenant au genre *Globodera*, dont les espèces *Globodera pallida* et *G. rostochiensis*, les nématodes à kystes de la pomme de terre.

La méthode s'applique à tout sol, support de culture ou produit terreux (hors substrats organiques tels que la tourbe, les fibres de coco, terreaux), ainsi qu'aux organes végétaux souterrains tels que les bulbes, caïeux, rhizomes, tubercules et racines.

2 Documents de référence

- [1] MOA 012 – Extraction, détection et identification morphobiométrique des nématodes phytoparasites.
- [2] PM 7/119 (1) Nematode extraction. (2013) EPPO Bull, 43: 471–495.
- [3] PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. (2013) EPPO Bull, 43: 119–138 (*en cours de révision*).
- [4] Rapport d'évaluation des méthodes de détection des kystes de *Globodera* sp. à partir de sols. LSV-Unité de Nématologie, janvier 2011
- [5] Rapport complémentaire d'évaluation des méthodes de détection des kystes de *Globodera* sp. à partir de sols. LSV-Unité de Nématologie, juin 2017

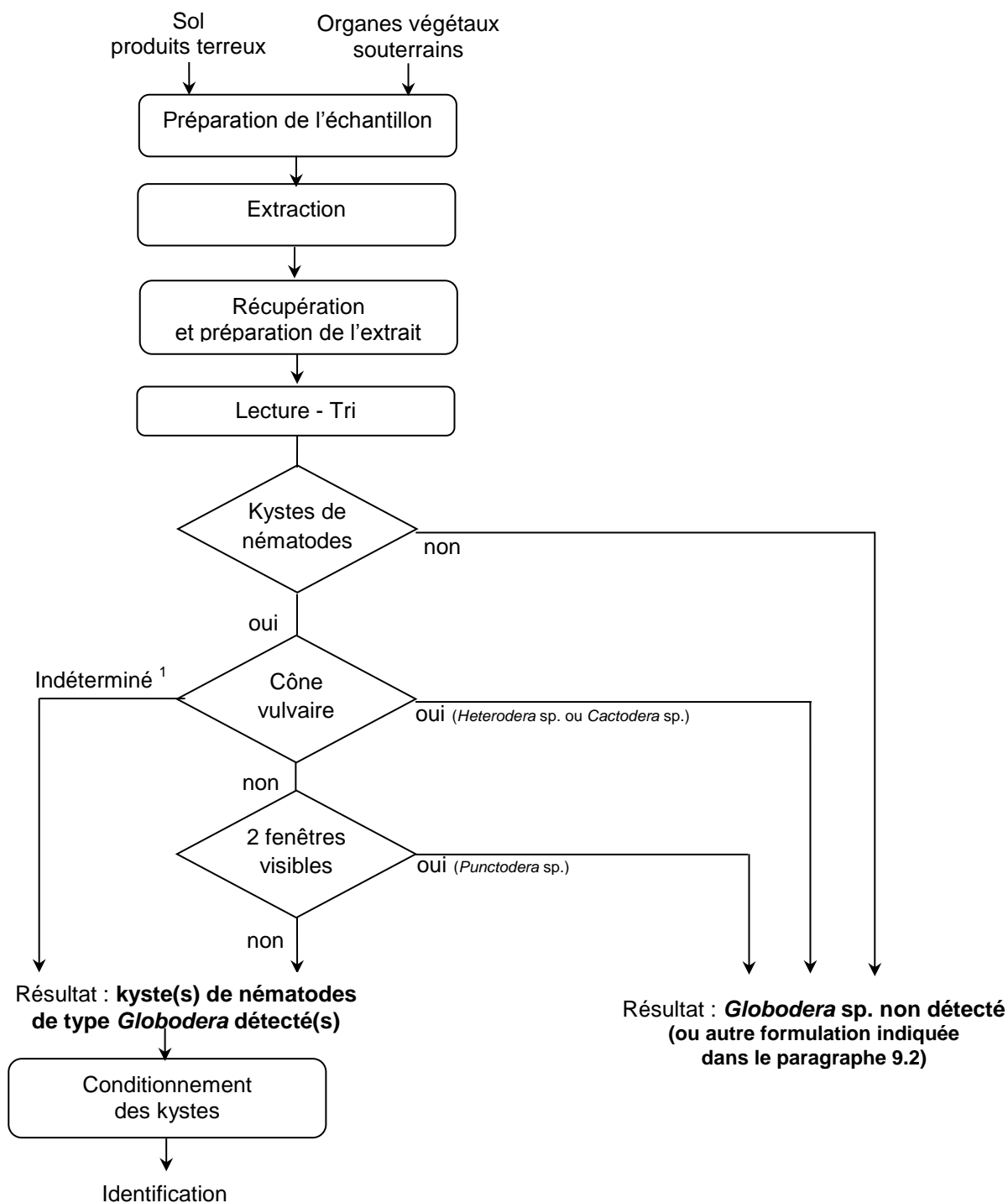
3 Termes, sigles et définitions

Afin de limiter les problèmes d'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...).

4 Principe de la méthode

Les kystes sont séparés des autres fractions de l'échantillon à partir de leur densité (inférieure à 1 pour les kystes secs, légèrement supérieure à 1 pour les kystes humides) et/ou de leur taille (comprise entre 250 et 600 µm) et de leur forme.

Le principe de la méthode est représenté par le schéma ci-après :



¹ Cas de kystes dont la zone périnéale est fortement abîmée



5 Réactifs et consommables

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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.

- eau du robinet,
- microtubes d'environ 1,5 mL,
- filtres papier.

Et selon la technique choisie :

- produit dispersant de type liquide à vaisselle (variante 1),
- bandes de papier buvard blanc (variante 1),
- acétone (récupération et préparation de l'extrait selon variante 2).

6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie 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.

Petit matériel

- pissette,
- pinceau ou aiguille montée.

Et, selon la technique choisie :

- cristallisoir (*variante 1*),
- fiole jaugée de 200 à 500 mL et verrerie courante de laboratoire (récupération et préparation de l'extrait selon *variante 2*).

Tamis

- Tamis de maille 250 µm (tamis de récupération des kystes)

Et selon le produit analysé et la technique choisie :

- Tamis de maille 4 mm (cas de la détection à partir de sols),
- Tamis spécifiques intégrés aux extracteurs (maille 1 à 2 mm),
- Tamis de maille 1 mm (cas de la détection à partir d'organes végétaux souterrains),
- Tamis de maille 800 µm (facultatif, préparation de l'extrait).



Le maillage des tamis ne fait pas l'objet d'exigences métrologiques. Il convient cependant de s'assurer du bon état des tamis.

Des contrôles portent sur les tamis de récupération (maille 250 µm) :

- vérification à vue avant chaque utilisation : absence de perforations ou de déchirures de la toile, étanchéité de l'encollage ou du sertissage sur l'armature,
- contrôle à la loupe des points précédents avant la première mise en service, puis périodiquement.

Cet examen permet de détecter des micro perforations et des irrégularités éventuelles de la toile. Les tamis endommagés sont réparés lorsque cela est possible, sinon ils sont réformés.

Gros matériel

- stéréomicroscope équipé d'un éclairage épiscopique, grossissement G X 25 à G X 40.

Et selon le produit analysé et la technique choisie :

- enceinte chauffée ($T < 35 \text{ °C}$) et/ou ventilée (équipement facultatif utilisable pour le séchage des échantillons de sols et des extraits),
- bac de lavage pour les organes végétaux souterrains,
- hotte (récupération et préparation de l'extrait selon *variante 2*)
- appareil d'extraction pour les sols, supports de culture et produits terreux:
 - ✓ appareil de Fenwick,
 - ✓ centrifugeuse de Schuiling,
 - ✓ élutriateur de Kort,
 - ✓ élutriateur de Seinhorst,
 - ✓ tout autre appareil de performance au moins équivalente.

Des contrôles doivent être réalisés pour valider un nouvel appareil d'extraction. De plus, des contrôles périodiques sont réalisés sur les appareils d'extraction afin de s'assurer de la fiabilité du dispositif d'analyse (cf. Annexe I).

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que l'analyse puisse être réalisée, l'échantillon doit avoir été conditionné par l'expéditeur dans un sachet ou un récipient fermé et référencé.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Dans l'intervalle entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse, les sols, supports de culture et produits terreux sont conservés à température ambiante, inférieure à 35 °C. Les températures plus élevées sont proscrites pour éviter l'altération du contenu larvaire des kystes, nécessaire à l'identification.



Durant cette même période, les organes végétaux souterrains périssables sont maintenus à une température permettant de garantir leur conservation.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Pendant l'analyse, les reliquats d'échantillons sont à conserver dans les mêmes conditions qu'avant analyse (paragraphe 7.2), et ce, jusqu'à la fin de l'analyse, y compris jusqu'à l'identification éventuelle de l'espèce, si détection de kystes de type *Globodera*.

Dans l'attente d'une analyse d'identification, les kystes détectés appartenant au genre *Globodera* sont conservés à sec et à température ambiante, inférieure à 35°C.

8 Mode opératoire

8.1 Extraction de kystes à partir de sols, supports de culture et produits terreux hors substrats organiques

Dans le cadre d'analyses réglementaires la totalité de l'échantillon reçu est analysée conformément aux notes de services *Globodera* en vigueur.

8.1.1 Préparation des échantillons pour analyse

Le cas échéant, les cailloux et gros débris végétaux sont éliminés et les mottes réduites. Un tamis de maille 4 mm peut être utilisé pour parfaire la préparation.

Pour les extractions avec l'appareil de Fenwick ou la centrifugeuse de Schuiling, les échantillons à analyser doivent être secs (séchage préalable des échantillons à l'air libre ou dans une enceinte ventilée à une température inférieure à 35 °C). En cas d'utilisation d'une enceinte ventilée, la ventilation doit être modérée : les kystes secs sont très légers et peuvent être emportés par les courants d'air.

8.1.2 Extraction

L'un ou l'autre des appareils suivants peut être employé. Ces matériels sont décrits dans la méthode d'analyse MOA 012.

La quantité maximale de sol analysable par les appareils décrits ci-après peut varier en fonction du type de sol extrait ainsi que des caractéristiques de l'appareil utilisé, notamment en fonction de ses dimensions. Seule la quantité maximale analysable de sol des appareils standardisés est donnée à titre indicatif.

Fractionnement de l'échantillon lors de l'extraction

Si le volume de l'échantillon à analyser est supérieur à la quantité maximale analysable de l'appareil, l'échantillon est fractionné et passé en plusieurs fois dans l'extracteur jusqu'à épuisement (regroupement des fractionnements voir paragraphes 8.3.1 et 8.5).



◆ **Appareil de Fenwick**

L'appareil est rempli d'eau à ras bord. Le sol séché est entraîné à l'aide d'un jet d'eau au travers du tamis supérieur de maille 1 à 2 mm, puis vers un entonnoir qui plonge dans le corps de l'appareil. Les kystes flottent et sont entraînés par débordement dans la collerette de récupération, sous laquelle est placé un tamis de 250 µm.

L'apport d'eau est maintenu jusqu'à épuisement de l'échantillon et au débordement d'une eau claire.

La quantité maximale de sol analysable est de 250 mL (OEPP, PM7/119)

◆ **Centrifugeuse de Schuiling**

Le sol séché est versé dans la cuve contenant de l'eau. Le brassage disperse l'échantillon, les éléments les plus légers (kystes et matière organique) flottent et sont filtrés par un cylindre grillagé central de maille 1 à 2 mm. Le produit est ensuite recueilli sur un tamis de 250 µm, rincé au jet pour éliminer les particules terreuses les plus fines collées aux éléments de l'extrait, puis passé dans l'appareil de séparation associé à la centrifugeuse (colonne d'Arvo) à la sortie duquel est placé un tamis de 250 µm, ceci afin de faciliter l'observation de l'extrait.

L'extrait obtenu avec la centrifugeuse de Schuiling peut ne pas être passé dans la colonne d'Arvo, si l'extrait obtenu est déjà suffisamment propre pour être observé directement.

La quantité maximale de sol analysable par la centrifugeuse de Schuiling (Fabricant : Volkens & Zonen) est d'environ 400 mL ou 500 g

◆ **Élutriateur de Kort et élutriateur de Seinhorst**

La colonne de l'appareil est remplie d'eau et alimentée dans sa partie inférieure. L'échantillon est entraîné par un jet d'eau au travers du tamis supérieur de maille 1 à 2 mm vers un entonnoir qui plonge dans le corps de l'appareil. Les kystes de densité inférieure à 1 (kystes secs) ou de densité légèrement supérieure à 1 (kystes humides) flottent ou sont entraînés par le flux d'eau ascendant. Ils sont ensuite conduits par débordement dans la collerette de récupération, sous laquelle est placé un tamis de 250 µm.

L'apport d'eau est maintenu jusqu'à épuisement de l'échantillon et au débordement d'une eau claire.

La quantité maximale de sol analysable par le Seinhorst semi-automatisé (Fabricant : Meku) est d'environ 150 à 200 mL.

La quantité maximale de sol analysable par le Kort est dépendante de la taille de l'appareil.

◆ **Autres techniques**

L'utilisation d'autres appareils d'extraction est possible sous réserve d'être reconnus ou vérifiés comme ayant des performances au moins équivalentes aux matériels précédents.



Nettoyage des tamis et des appareils d'extraction:

- Le nettoyage des tamis et des appareils d'extraction doit être réalisé avec le plus grand soin après chaque utilisation.
- Avec les appareils d'extraction semi-automatisés (Centrifugeuse de Schuiling, Élutriateur de Seinhorst Meku) le déclenchement d'un cycle d'extraction entre les échantillons ("extraction à blanc") est recommandé pour réduire les risques de contamination. Cette étape est obligatoire dans le cas des analyses officielles.

8.2 Extraction de kystes à partir d'organes végétaux souterrains

L'analyse est réalisée sur un maximum de 200 unités, sauf mention particulière du demandeur.

Bulbes, tubercules, caïeux, rhizomes, racines tubérisées

Le produit à analyser est lavé par trempage et brossage dans de l'eau.

Cette opération peut être réalisée dans tout contenant d'un volume suffisant.

Racines non tubérisées

Les racines sont lavées par trempage dans de l'eau puis un jet d'eau fort est appliqué sur le système racinaire afin de détacher les kystes éventuellement présents sur les racines (cas des racines de plantes hôtes de *G. pallida* et *G. rostochiensis*)

L'eau issue du lavage est passée sur un tamis de 250 µm pour récupérer les kystes. La mise en place d'un tamis de 1 mm sur le tamis de récupération permet d'éliminer les débris végétaux les plus gros (fragments d'épiderme, radicelles,...).

8.3 Récupération et préparation de l'extrait

8.3.1 Récupération de l'extrait

La fraction retenue sur le tamis de 250 µm est rincée à l'aide d'un jet d'eau pour éliminer les particules terreuses ou organiques les plus fines.

L'extrait est ensuite disposé sur un filtre papier. Le tri peut être réalisé immédiatement à partir de l'extrait humide (paragraphe 8.4).

Remarque : Lorsque la taille d'un échantillon de sol a nécessité son fractionnement pour l'extraction (cf. paragraphe 8.1.2), les extraits obtenus peuvent être regroupés, si leur volume n'est pas trop important, dans un ou plusieurs tamis de récupération.



8.3.2 Séchage et remise en suspension de l'extrait sec (étape facultative)

L'extrait récupéré sur le papier filtre peut être mis à sécher à l'air libre ou dans une enceinte ventilée en respectant les dispositions décrites dans le paragraphe 7.2. Afin de parfaire la séparation des kystes et donc de faciliter l'étape de tri, l'extrait sec est ensuite remis en suspension selon l'une des méthodes décrites ci-après :

Variante 1 : séparation des kystes par flottation dans un cristalliseur (cf. MOA012 § 2.3.2)

Une bande de papier buvard est disposée dans un cristalliseur, contre la paroi verticale, en faisant chevaucher légèrement les extrémités.

Le cristalliseur est rempli d'eau à un niveau correspondant aux trois quarts de la hauteur de la bande.

L'extrait sec est trituré pour obtenir un produit de texture fine, puis versé dans le cristalliseur.

Lorsque l'extrait est riche en grosses particules (graines, fragments de racines par exemple), il peut être versé préalablement sur un tamis de 800 µm disposé sur le cristalliseur afin de parfaire la séparation des kystes.

La suspension est brassée délicatement pour disperser les éléments de l'extrait, puis laissée au repos jusqu'à l'immobilité des particules flottantes.

Une goutte de dispersant est alors déposée au centre du cristalliseur pour repousser les particules flottantes vers la bande de buvard.

Enfin, la bande est retirée du cristalliseur, et placée sur un support adapté (planchette par exemple) en vue du tri des kystes.

Variante 2 : Séparation des kystes à l'acétone.

L'extrait sec et préalablement émietté est placé dans une fiole à col long (type fiole jaugée) remplie pour partie d'acétone. Après agitation, le remplissage de la fiole est complété par ajout d'acétone jusqu'à 1 cm environ du bord. Le surnageant situé dans la partie supérieure de la fiole est versé sur un filtre papier et le dépôt au fond de la fiole éliminé. Cette préparation permet d'obtenir un extrait présentant une faible quantité d'éléments organiques résiduels (sédimentation de la majorité des débris organiques au fond de la fiole) et séchant rapidement (grande volatilité de l'acétone). Ainsi, l'extrait peut être lu rapidement.

Remarques :

- La séparation des kystes avec de l'acétone doit être effectuée sous hotte.
- L'utilisation de l'acétone est recommandée pour les sols riches en matière organique.



8.4 Tri et lecture

La bande ou le filtre supportant l'extrait est disposé sous le stéréomicroscope pour rechercher les kystes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera* (Figure 1).

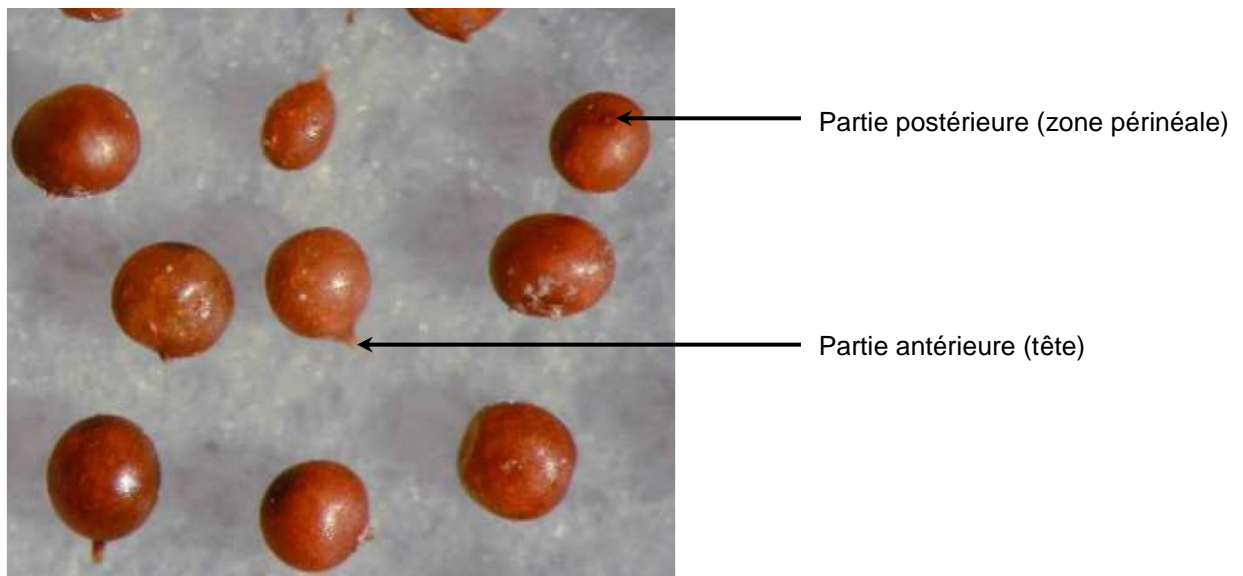


Figure 1 – Kystes de *Globodera* (photo Laboratoire de la Santé des Végétaux)

Cet examen peut être réalisé en 2 temps :

1^{ère} étape : Examen à grossissement faible ou moyen

Les kystes de nématodes sont séparés des autres éléments de l'extrait en utilisant par exemple un pinceau ou une aiguille montée.

Les kystes sont reconnus à partir de divers critères :

- la taille : comprise entre 250 à 600 μm ,
- la forme : globuleuse, plus ou moins sphérique,
- la présence d'une tête (cf. Figure 1),
- la couleur : très variable, du jaune paille au brun foncé,
- l'aspect : mat, sans ornements visibles. Les ornements sont fréquentes sur graines.
- présence d'une certaine élasticité (appréciée en exerçant une légère pression avec une aiguille montée).

2^{ème} étape : Examen à plus fort grossissement (Figures 2 et 3)

Les kystes précédemment triés sont réexaminés pour éliminer les kystes des genres *Heterodera*, *Cactodera* et *Punctodera*. Cet examen porte principalement sur la zone périnéale (partie postérieure des kystes située à l'opposé de la tête).



Important: les kystes ne sont en aucun cas disséqués pour faciliter la reconnaissance du genre car l'identification de l'espèce serait ensuite impossible.

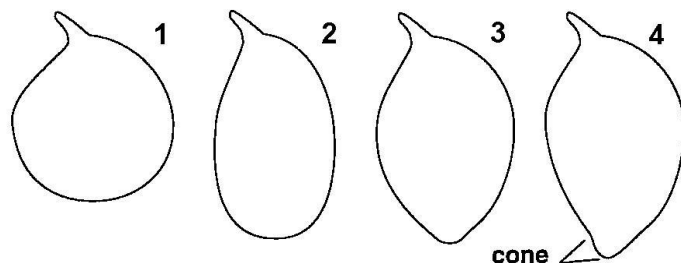


Figure 2 – Formes de kystes de nématodes (d'après Wouts et Baldwin, 1998)

- 1- Sphérique, sans cône (*Globodera*)
- 2- Ovoïde, sans cône (*Punctodera*)
- 3- Citriforme avec cône peu proéminent (*Heterodera* ou *Cactodera*)
- 4- Citriforme avec cône proéminent (*Heterodera*)

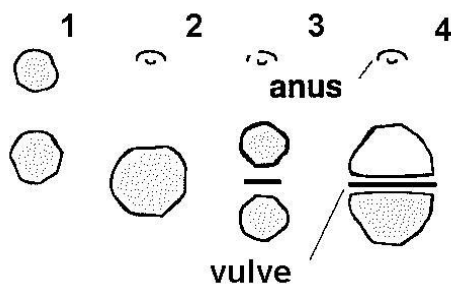


Figure 3 – Zones périnéales des kystes (d'après Wouts et Baldwin, 1998)

- 1 : Fenêtres vulvaire et anale circulaires (*Punctodera*)
- 2 : Fenêtre vulvaire circulaire et fenêtre anale non visible (*Globodera* et *Cactodera*),
- 3 : Fenêtre vulvaire bifenestrée et fenêtre anale non visible (*Heterodera*),
- 4 : Zone vulvaire ambifenestrée et fenêtre anale non visible (*Heterodera*).



Les critères de décision appliqués aux kystes de nématodes détectés sont définis dans le tableau ci-dessous :

	Caractéristiques	Genre
Kystes conservés	Absence de cône vulvaire et Présence d'1 seule fenêtre circulaire visible	<i>Globodera</i> ou Indéterminé ²
	Zone périnéale non caractérisée	Indéterminé ²
Kystes éliminés	Présence d'un cône vulvaire plus ou moins proéminent	<i>Heterodera</i> ou <i>Cactodera</i>
	Absence de cône vulvaire et Présence de 2 fenêtres circulaires visibles et nettement distinctes (fenêtre vulvaire et fenêtre anale)	<i>Punctodera</i>

² Les kystes dont la zone périnéale ne peut pas être caractérisée nettement sont considérés comme susceptibles d'appartenir au genre *Globodera* et traités comme tels (demande d'identification et formulation du résultat correspondante)

8.5 Conditionnement des kystes

Les kystes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera*, détectés précédemment, sont placés à l'aide d'un pinceau dans un microtube référencé au numéro de l'échantillon.

Le contenu du microtube est séché à l'air libre ($T < 35\text{ °C}$). Le microtube est ensuite fermé et transmis pour identification du genre et de l'espèce des kystes détectés. Si besoin, le microtube contenant les kystes est alors conditionné dans un emballage rigide résistant pour envoi.

Remarque : Lorsque plusieurs extraits sont obtenus à partir d'une même prise d'essai (cf paragraphe 8.1.2 : fractionnement de l'échantillon lors de l'extraction), les kystes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera* détectés dans chacun des extraits sont regroupés dans un seul microtube.



9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

En cas de doute, le kyste sera considéré comme susceptible d'appartenir au genre *Globodera* et une identification sera mise en œuvre.

9.2 Formulation du résultat

- Absence de kystes appartenant au genre *Globodera*

Le résultat est exprimé par une phrase semblable à :

« ***Globodera* sp. non détecté** »

ou par une formulation appropriée lorsque la demande est clairement identifiée, par exemple :

« ***Globodera pallida* non détecté** »,

« ***Globodera rostochiensis* non détecté** » ou

« ***Globodera pallida* et *Globodera rostochiensis* non détectés** ».

- Présence de kystes de nématodes susceptibles d'appartenir au genre *Globodera*

Le résultat est exprimé par une phrase semblable à :

« **Kyste(s) de nématodes de type *Globodera* détecté(s)** »

Dans le cadre d'analyses officielles, ce résultat est accompagné obligatoirement d'une mention précisant que *la présence définitive du genre Globodera sera confirmée par l'analyse d'identification*. Cette analyse permettra de rechercher la présence éventuelle des espèces *G. pallida* et *G. rostochiensis*.

Si le laboratoire ne réalise pas cette dernière analyse, *l'envoi des kystes au laboratoire chargé de leur identification est indiqué sur le rapport d'analyse*.



10 Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée dans le tableau ci-dessous est extraite du rapport de validation de méthode d'analyse et du rapport complémentaire établis par le LNR (janvier 2011 et juin 2017).

Matériel d'extraction Critères de Performance	Centrifugeuse de Schuiling (Volkers & Zonen) + colonne d'Arvo	Elutriateur de Kort	Elutriateur de Seinhorst semi automatisé (Meku)	Appareil de Fenwick
Taux moyen de détection des kystes du genre <i>Globodera</i>	91,2 %	97,8%	95,4%	80,8%
Spécificité	100%	100%	100%	100%
Sensibilité	100%	100%	100%	ND
Exactitude	100%	100%	100%	ND

ND : pas de données disponibles



Annexe I : Qualification d'un nouvel équipement et contrôles périodiques

Des contrôles sont réalisés pour qualifier un nouveau dispositif de détection, un nouvel équipement d'extraction ou un nouvel opérateur.

Des contrôles périodiques annuels sont réalisés, de préférence en début de campagne d'analyses, pour s'assurer du maintien de la fiabilité du dispositif d'analyse et de la compétence des opérateurs.

Les contrôles peuvent prendre la forme de participation à des essais inter laboratoires d'aptitude ou d'autocontrôles organisés par le laboratoire.

Les autocontrôles consistent en l'analyse d'échantillons de sols ayant un statut connu : échantillons sains (exempts de kystes de *Globodera* sp.) et échantillons contaminés par un nombre connu de kystes de *Globodera* sp..

Les résultats d'un autocontrôle sont considérés conformes lorsque les deux exigences suivantes sont respectées :

- taux de détection des kystes de *Globodera* (nombre total de kystes détectés rapporté au nombre total de kystes apportés dans les échantillons contaminés) au moins égal à 60 % pour chaque échantillon contaminé par *Globodera* sp.,
- kystes de *Globodera* non détectés dans les témoins sains.

Note : En cas de besoin, des kystes du genre *Globodera* peuvent être fournis par l'unité de Nématologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



Bibliographie

Bellvert, J., Crombie, K. and Horgan, F. G. (2008) Effect of sample size on cyst recovery by flotation methods: Recommendations for sample processing during EU monitoring of potato cyst nematodes (*Globodera* spp.). EPPO Bulletin, 38: 205–210.

EPPO (2017) EPPO Global Database (available online). <https://gd.eppo.int> [consulté le 18-07-2017]

Subbotin S.A., Mundo-Ocampo M. and Baldwin J.G. (2010). Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae). Nematology Monographs and Perspectives, Vol. 8A (Series editors: Hunt D.J., Perry R.N.). Leiden, The Netherlands, Brill p.351.

Wouts, W.T. and Baldwin J.G. (1998) Taxonomy and identification. In: The cysts nematodes, Sharma, S.B. (ed), p 88.