

## **Méthode d'analyse**

En santé des végétaux

Référence : M-GEVES/SV/MO/001

Version : 1

Novembre 2020

# Détection de *Ditylenchus dipsaci* sur semences de Luzerne

**Groupement d'études et de contrôle des variétés et des semences (GEVES) – Laboratoires de l'unité technique détection de bioagresseurs**

**Laboratoire National de Référence : Nématodes phytopathogènes « Nématodes réglementés non de quarantaine sur semences vraies, plants de fraisiers et bulbes du genre *Allium* »**

Ce document est la propriété du GEVES. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle doit faire l'objet d'une autorisation expresse. En cas d'accord, toute reproduction devra s'accompagner de la citation de la source mentionnée de la façon suivante :

Méthode d'analyse en santé des végétaux, Détection de *Ditylenchus dipsaci* sur semences de Luzerne ; M-GEVES/SV/MO/001, 1 ; Novembre 2020.

## Historique de la méthode

Modification majeure : une modification majeure est une modification qui porte sur le domaine d'application de la méthode, sur un point critique de la méthode et qui peut avoir une influence sur la qualité du résultat dans la mesure où elle modifie les critères de performance de la méthode. Avant de valider une modification majeure, une étape de validation partielle ou totale est nécessaire.

Modification mineure : une modification mineure est une modification qui n'influence pas les critères de performance de la méthode. Il s'agit de modification de type correction mineure, précision, reformulation. Une modification mineure ne nécessite pas de validation.

Tableau récapitulatif

Version	Date	Type de modification	Principales modifications
1	Novembre 2020		Création

## Sommaire

<b>1. Introduction</b>	<b>4</b>
1.1. Validation de la méthode	4
1.2. Caractéristiques de performance de la méthode par SE-PCR sur semences de luzerne	4
1.3. Caractéristiques de performance de la méthode par filtration sur semences de luzerne	4
1.4. Caractéristiques de performance de la méthode de viabilité pour <i>D. dipsaci</i> sur nématode isolé	5
<b>2. Avertissements et précautions de sécurité</b>	<b>6</b>
<b>3. Objet et domaine d'application</b>	<b>7</b>
<b>4. Termes, sigles et définitions</b>	<b>7</b>
<b>5. Principe de la méthode</b>	<b>7</b>
<b>6. Réactifs</b>	<b>10</b>
<b>7. Matériel</b>	<b>10</b>
<b>8. Echantillons</b>	<b>11</b>
8.1. Taille, conditionnement	11
8.2. Conservation	11
8.3. Critères d'acceptation	11
Les échantillons doivent être conformes aux exigences du point 8.1.	11
Si le volume fourni est supérieur ou inférieur, prendre contact avec l'expéditeur pour avoir un échantillon conforme.	11
<b>9. Mode opératoire</b>	<b>11</b>
9.1. Détection	11
<b>10. Résultats</b>	<b>20</b>
10.1. Expression des résultats	20
<b>11. Devenir des reliquats d'échantillon après analyse</b>	<b>20</b>
<b>12. Annexes</b>	<b>21</b>
12.1. Kit, Mix et programme PCR	21
12.2. Solution d'Eosine Y à 0.5%	21
12.3. Bibliographie	22
12.4. Crédits (photos)	22

## 1. Introduction

Cette méthode permet d'évaluer la qualité sanitaire vis-à-vis de *Ditylenchus dipsaci* (ORNQ selon le règlement 2016/2031 du parlement européen et du conseil, listé dans l'annexe IV partie A du règlement (UE) 2019/2072), d'un lot de semences de luzerne.

Cette méthode est basée sur la méthode MOA013 parties A et B (ou ISTA 7-031, ORGEUR *et al.* 2019)

### 1.1. Validation de la méthode

Cette méthode a été validée dans le cadre du projet CASDAR DITYLUZ. Le test de viabilité, ainsi que la méthode adaptée par le GEVES de la MOA013 ou ISTA 7-031 pour sa partie filtration et détection, ont été mis au point et validés par études des critères de performance. Le rapport technique est disponible sur demande.

### 1.2. Caractéristiques de performance de la méthode par SE-PCR sur semences de luzerne

Source : Validation par EILV

Sensibilité analytique : 1 *D. dipsaci* dans un échantillon d'analyse relatif à une prise d'essai d'environ 100g.

Spécificité analytique des amorces : 88%

Sensibilité diagnostique : 100%

Spécificité diagnostique : 100% lors de l'EILV et 80% sur un set d'échantillons négatifs en comparaison avec la détection par morphobiométrie. Prévoir une description morphologique en cas de résultat PCR positif

Exactitude : 87.5%

Répétabilité : 100%

Reproductibilité : 100%

\*vérification échantillons positifs : la PCR étant très sensible, des résidus d'ADN de nématode peuvent être amplifiés alors qu'il n'y a plus aucun individu présent. Une confirmation morphologique est donc nécessaire.

### 1.3. Caractéristiques de performance de la méthode par filtration sur semences de luzerne

Sensibilité analytique : 5 *D. dipsaci* dans un échantillon d'analyse relatif à une prise d'essai d'environ 100g

Spécificité analytique : description morphologique de l'individu

Sensibilité diagnostique : 98.75%

Spécificité diagnostique : 100%

Exactitude : 99.17%

Répétabilité : 98%

Reproductibilité : 99

#### **1.4. Caractéristiques de performance de la méthode de viabilité pour *D. dipsaci* sur nématode isolé**

Sensibilité analytique : 1 *D. dipsaci* dans un échantillon de nématodes isolés

Spécificité analytique : description morphologique

Sensibilité diagnostique : 100%

Spécificité diagnostique : 100%

Exactitude : 100%

Répétabilité : 100%

Reproductibilité : 100%

## **2. Avertissements et précautions de sécurité**

S'agissant d'une méthode de laboratoire, il est du ressort de l'utilisateur de la présente méthode d'appliquer cette méthode dans le respect des bonnes pratiques de laboratoires. L'utilisateur est responsable de l'application des règles d'hygiène et de sécurité en conformité avec la réglementation en vigueur.

En particulier il est attiré l'attention sur le travail en condition d'exposition à des semences traitées. L'utilisateur de la présente méthode, conscient des risques associés, s'engage à s'assurer du port d'équipements de protection individuelle et/ou d'utilisation d'équipements de protection collective en fonction des risques associés aux produits de traitement appliqués sur les semences.

A l'issue des essais, il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente méthode de s'assurer de l'élimination des déchets dans le respect des obligations légales a minima et en visant à limiter au maximum l'impact de l'activité sur l'environnement.

Dans le cas où la méthode nécessite l'emploi de matériel, l'utilisation de tout matériel doit être faite dans le respect des prescriptions du fabricant.

### 3. Objet et domaine d'application

Cette méthode permet de déterminer la qualité sanitaire d'échantillons de semences de luzerne vis-à-vis de *Ditylenchus dipsaci*. Elle est appliquée sur semences de luzerne non traitées dans le cadre de la certification. Cet organisme est classé ORNQ (organisme réglementé non-quarantaine). La méthode est basée sur un pré-screening optionnel (SE-PCR). La détection par filtration et identification morphologique peut être réalisée en première intention ou pour confirmation de résultat SE-PCR positif. Les résultats sont exprimés en nombre de nématodes (individus) de *D. dipsaci* pour un échantillon analysé.

Cette méthode a été validée sur l'espèce luzerne (*Medicago sativa*) pour sa partie détection par SE-PCR, filtration, identification morphologique et viabilité.

En cas de semences traitées par un procédé physique ou de biocontrôle, la détection peut être suivie d'un test de viabilité des nématodes (uniquement pour *D. dipsaci*).

Cette méthode n'est pas adaptée sur semences traitées par un produit chimique.

### 4. Termes, sigles et définitions

ORNQ : Organisme Réglementé Non de Quarantaine

SE-PCR : Seed Extract PCR. Méthode de pré-screening, détection des pathogènes des semences à l'aide d'outils moléculaires. Tests de détection par PCR d'extraits de semences (SE-PCR) qui combinent l'extraction d'acide nucléique (ARN ou ADN de l'échantillon) et de la PCR.

### 5. Principe de la méthode

La méthode peut être décrite de la façon suivante :

SE-PCR (Optionnelle) : mise en macération d'une prise d'essai de l'échantillon de semences durant une nuit, filtration et collecte de l'ensemble de la population de nématodes pour détection par PCR en temps réel. En cas de résultat positif, une seconde analyse pour confirmation de la présence des individus est réalisée sur le reliquat de l'échantillon.

Filtration, observation morphologique : macération, filtration et identification morphologique des nématodes.

En cas de détection, estimation de la viabilité des nématodes par coloration (optionnelle).

Workflow de la détection par SE-PCR et confirmation par identification morpho biométrique et viabilité. (Le détail des étapes résumé par une loupe accompagné par un renvoi au figures X et Y est à retrouver plus loin.)

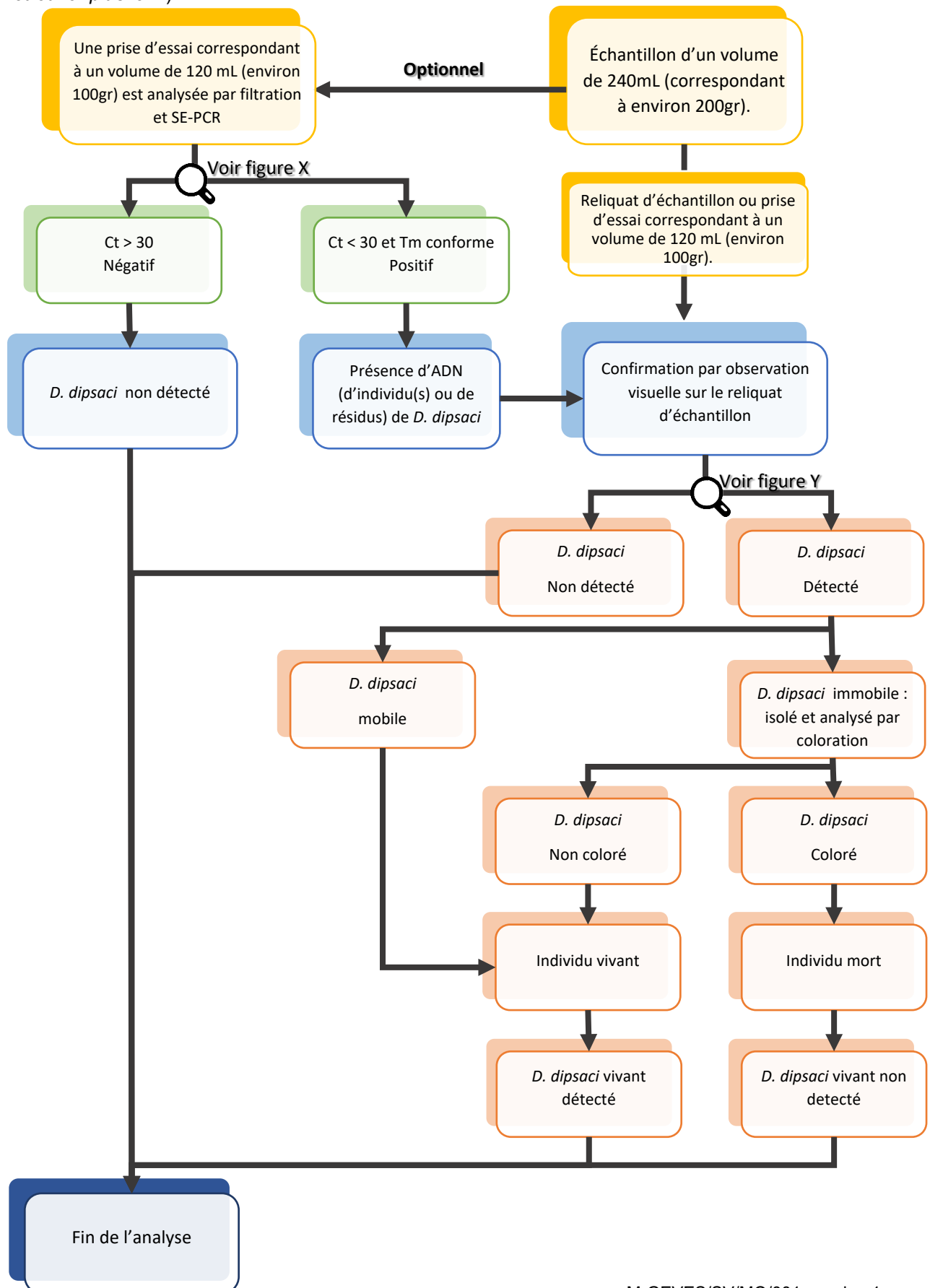




Figure X

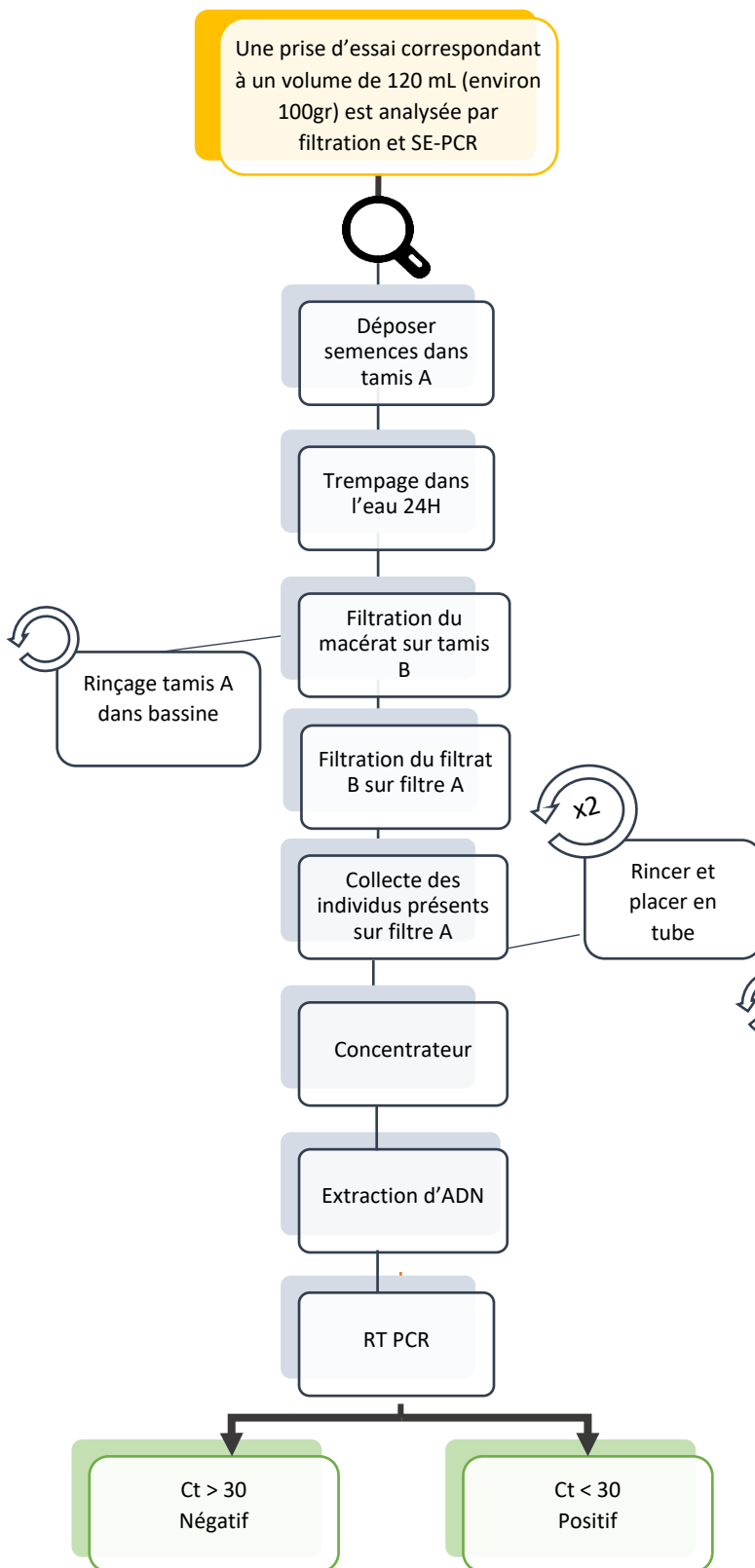
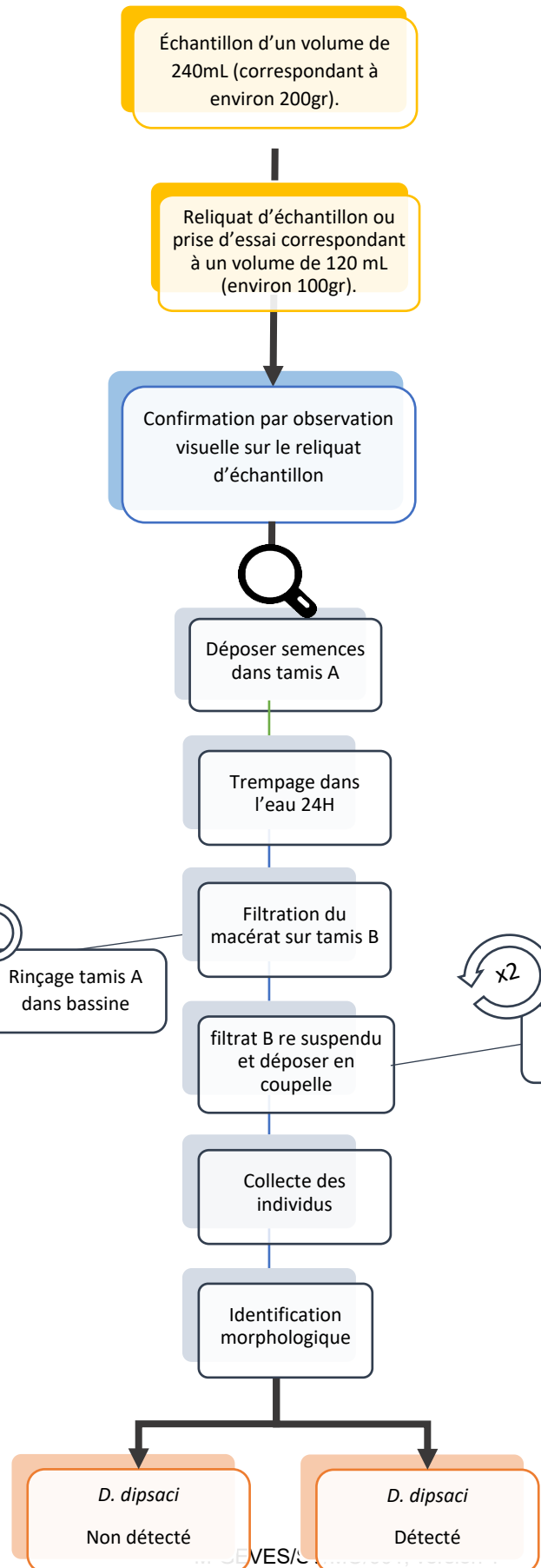


Figure Y



## 6. Réactifs

Individus de référence de *Ditylenchus dipsaci* montés entre lames et lamelles lutées pour observation des individus sous microscope.

- Témoins d'analyse de la SE-PCR :
  - o Negative process control (NPC) (Témoin sain) : 1 nématode saprophyte dans un tube Eppendorf® contenant 1mL d'eau subissant le processus de séchage, extraction d'ADN et PCR.
  - o Positive process control (PPC) (Témoin positif d'extraction d'ADN) : 1 *D. dipsaci* dans un tube Eppendorf® contenant 1mL d'eau (cf après étape de filtration) subissant le processus de séchage, extraction d'ADN et PCR. Prévoir deux témoins PPC (soit deux tubes distincts).
  - o **NB : deux témoins supplémentaires sont ajoutés à l'étape PCR.**
    - Positive amplification control (PAC) (Témoin positif PCR) : ADN de *D. dipsaci*
    - Non-Template Control (NTC) (Témoin négatif PCR)– Nucleic acid-free water
- Kit Macherey-Nagel Genomic DNA from tissue (NucleoSpin Tissue, protocole pour « animal tissue »)\*.
- Kit PCR : GoTaq qPCR Master Mix 2X (Promega)\*
- Amorces :       DITunif : CTG TAG GTG AAC CTG C  
                      DITdipR : GAC ATC ACC AGT GAG CAT CG
- Solution d'EosineY à 0,5% : solubilisée dans de l'éthanol à 96%.
- Huile à immersion pour observation microscope x100.

\* : les réactifs d'autres fournisseurs peuvent être utilisés, si le laboratoire vérifie et confirme leur performance

## 7. Matériel

- Bassine
- Tamis A : 250µm (±10 µm) pour retenir semences et débris
- Tamis B : 20µm (±3 µm) pour retenir *Ditylenchus dipsaci*
- Filtres A : Adaptateur + filtre Pluristrainer ®10µm (±3 µm) pour retenir *Ditylenchus dipsaci*
- Tube Falcon 50mL
- Pompe à vide
- Pipette P1000
- Tube type Eppendorf ®1.5mL
- Concentrateur (type Concentrator Plus Eppendorf (capable de concentrer sous vide l'ADN)
- Centrifugeuse (capable de centrifuger à au moins 11 000g)
- Thermocycleur temps réel, Technologie Sybr green
- Loupe Binoculaire
- Microscope objectif X100 avec l'huile à immersion
- Lames et lamelles

## 8. Echantillons

### 8.1. Taille, conditionnement

#### Prescreening par SE-PCR

L'échantillon fourni doit être équivalent à un volume de 240mL (correspondant à environ 200g).

Une prise d'essai correspondant à un volume de 120 mL (environ 100g) mesuré à l'aide d'un récipient pré-calibré est analysée par SE-PCR pour la luzerne. Le reliquat est placé dans ce même contenant afin de s'assurer qu'il reste bien 120 mL (environ 100g). Ce reliquat pourra ainsi être utilisé en cas de confirmation visuelle conformément au mode opératoire par méthode morpho biométrique suivant l'étape « Confirmation après pre screening ».

#### Détection directe par méthode morpho biométrique

Un volume maximum de 120mL soit environ 100g pour la luzerne est demandé.

### 8.2. Conservation

Conservation : 5-10°C +/-2°C

### 8.3. Critères d'acceptation

Les échantillons reçus doivent être en bon état de conservation, sans humidité. Ils sont présentés en sachet intact pour éviter la perte de semences et les risques de contamination croisée.

Les échantillons doivent être conformes aux exigences du point 8.1.

Si le volume fourni est supérieur ou inférieur, prendre contact avec l'expéditeur pour avoir un échantillon conforme.

## 9. Mode opératoire

### 9.1. Détection

#### 9.1.1. Pre-screening par SE-PCR (sur luzerne)

- Prise d'essai correspondant à un volume de 120 mL (environ 100g) mesuré à l'aide d'un récipient pré-calibré
- Dépôt de l'échantillon étiqueté dans le tamis A,
  - o Intcaler un filtre de type essuie tout, entre l'échantillon et le tamis pour retenir le maximum de particules,
  - o Poser dans une bassine et recouvrir les semences d'eau.
- Migration pendant environ 24h à température ambiante.
- Filtrations :
  - o Retirer le tamis A contenant les semences et rincer les parois intérieures, extérieures et le dessous du tamis A au-dessus la bassine (Fig.1)



Fig. 1. Rinçage du tamis A au-dessus de la bassine

- o Eliminer les semences.
- o Filtrer tout le macérât sur tamis B (Fig.2)



Fig. 2. Filtration du macérât dans le tamis B

- o Rincer minutieusement l'intérieur du tamis et récupérer le contenu dans une coupelle en verre avec bec verseur. (Fig.3)

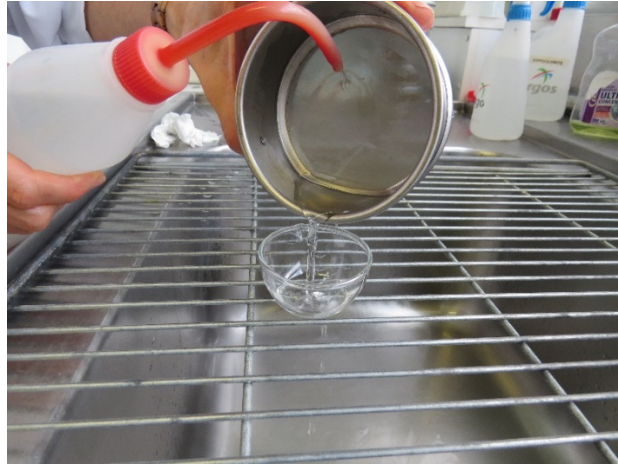


Fig. 3. Rinçage du tamis B et récupération du filtrat B dans une coupelle en verre

- o Filtrer le filtrat B sur filtre A à l'aide de la pompe à vide (Fig.4)

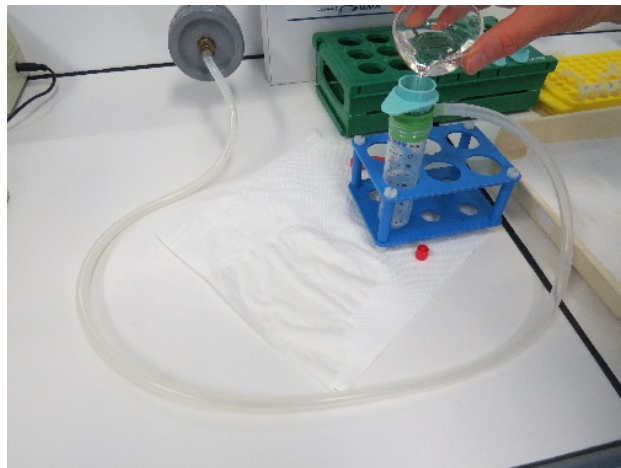


Fig. 4. Filtration du filtrat B dans le filtre A (Adaptateur + PluriStainer® + pompe à vide)

- o Rincer minutieusement la coupelle en verre et répéter une fois l'opération de rinçage.
- o Une fois l'ensemble du liquide filtré, fermer l'entrée d'air avec le bouchon rouge. (Fig.5)



Fig. 5. Pose du bouchon pour favoriser l'herméticité ©GEVES – Juin 2020 Tous droits réservés.

- o Remettre en suspension la population de nématodes dans 500 $\mu$ L d'eau à l'aide d'une pipette P1000 (Fig6)

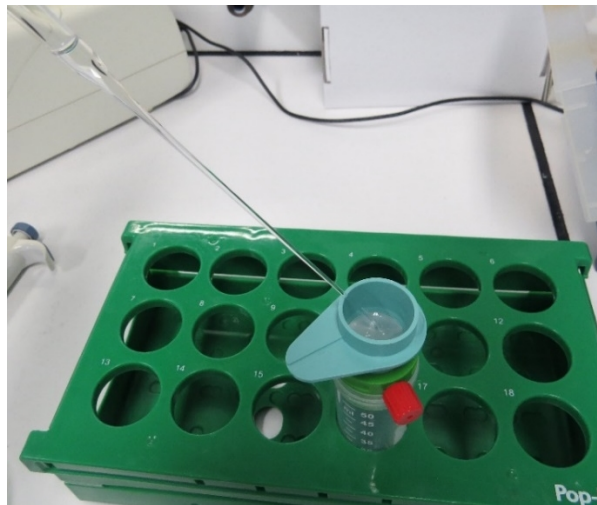


Fig. 6. Mise en suspandre la population de nématodes collectée sur le filtre A.

- o Récupérer la suspension de nématodes à l'aide d'une pipette pasteur.
- o Transférer le contenu dans un tube Eppendorf ® 1.5ml. (Fig.7).

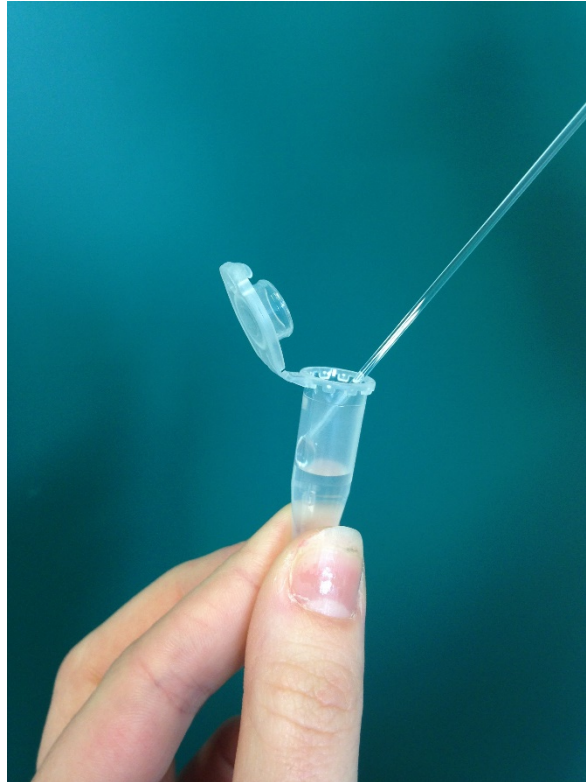


Fig. 7. Dépôt de la suspension de nématodes dans un tube Eppendorf® 1.5mL

- o Répéter l'opération de mise en suspension dans 500µL d'eau à l'aide d'une pipette P1000 et transférer en microtube type Eppendorf® une seconde fois.
  - o Stocker les microtubes type Eppendorf® au congélateur à - 20°C ou passer directement à l'extraction.
  - o Les tubes type Eppendorf® (les échantillons ainsi que les témoins PPC et NPC) sont passés au concentrateur pendant 5h à 30°C, avec le programme V-AQ
- Extraction d'ADN
    - o Selon le kit Macherey-Nagel Genomic DNA from tissue (NucleoSpin Tissue, protocole pour « animal tissue »)
  - Les extraits sont testés en PCR immédiatement ou conservés à -20°C jusqu'à l'étape de PCR.
  - Protocole PCR
    - o Amorces : DITunif et DITdipR
    - o Les concentrations et volumes du mix ainsi que le programme PCR et les témoins PAC (T+ PCR Dd) et NTC (T- Eau PCR) sont indiqués en annexe 1.
    - o Tous les échantillons et témoins sont passés en deux points sur l'extrait non dilué.

- Résultat PCR :
  - o Table de décision des témoins

	Ct	Melt	Résultats et action
Positive amplification control (Témoin positif PCR)	≤30	≈ 82°C	<b>Conforme</b>
	Autres résultats		<b>Non-conforme</b> Validation des résultats positifs et reprise de la PCR sur les échantillons négatifs et les témoins.
Non-Template Control (Témoin négatif PCR)	> 30 ou Undetermined		<b>Conforme</b>
	Autres résultats		<b>Non conforme</b> Validation des résultats négatifs et reprise de la PCR sur les échantillons positifs et les témoins.
Positive process control (PPC -Témoin positif)	≤30	≈ 82°C	<b>Conforme</b>
	Autres résultats		<b>Non-conforme</b> Validation des résultats positifs et reprise de la PCR sur les échantillons négatifs et les témoins
Negative process control (NPC – saprophage)	> 30 ou Undetermined		<b>Conforme</b>
	Autres résultats		<b>Non conforme</b> Validation des résultats négatifs et reprise de la PCR sur les échantillons positifs et les témoins.
Negative process control (Témoin d'extraction réactifs)	>30 ou Undetermined		<b>Conforme</b>
	Autres résultats		<b>Non conforme</b> Validation des résultats négatifs et reprise de la PCR sur les échantillons positifs et les témoins.

- o Après validation des témoins, analyser les résultats des échantillons
  - 2 puits positifs : séquence cible de *Ditylenchus dipsaci* détectée.
  - 2 puits négatifs : *Ditylenchus dipsaci* non détecté

- o Tableau synthétique pour l'interprétation des résultats :

Ct	Melt	Résultats	Résultats – Phrases types
≤30	T° ± 1°C du Tm PPC	+	Résultat positif : Séquence cible de <i>Ditylenchus dipsaci</i> détectée
Autres résultats		-	Résultat négatif : <i>Ditylenchus dipsaci</i> non détecté

- o Les valeurs Ct cut-offs indiqués dans le protocole sont ceux qui ont été appliqués dans les essais de validation de la méthode. Le laboratoire doit vérifier, et modifier le cas échéant, ces valeurs pour assurer la bonne performance de la méthode.



- o En cas de résultats discordants (1 puits positif) il y a une reprise de la PCR sur l'échantillon concerné, les témoins PAC et NTC. En cas de résultats discordants une deuxième fois (un puits positif), le résultat final est positif.
- o En cas de détection de la séquence cible, une confirmation par la méthode de détection par filtration et identification morphobiométrique sera appliquée.

#### 9.1.2. Détection par identification morpho biométrique

- L'ensemble du reliquat ou l'échantillon reçu doit être analysé en totalité avec un volume équivalent à 120mL correspondant à environ 100g de semence de luzerne.
- Dépôt de l'échantillon étiqueté, dans le tamis A,
  - o Intercaler un filtre de type essuie tout, entre l'échantillon et le tamis pour retenir le maximum de particules,
  - o Poser dans une bassine et recouvrir d'eau.
- Migration pendant environ 24h à température ambiante.
- Filtrations :
  - o Retirer le tamis A contenant les semences et rincer les parois intérieures, extérieures et le dessous du tamis A au-dessus la bassine (Fig.1 voir plus haut)
  - o Jeter les semences dans la poubelle.
  - o Filtrer tout le macérât sur tamis B (Fig.2 voir plus haut)
  - o Rincer minutieusement l'intérieur du tamis et récupérer le contenu dans une coupelle striée.

- Lecture
  - Observer l'ensemble de la coupelle à la loupe binoculaire
  - Détection de nématodes suspects correspondants aux critères généraux suivant (Fig.8):

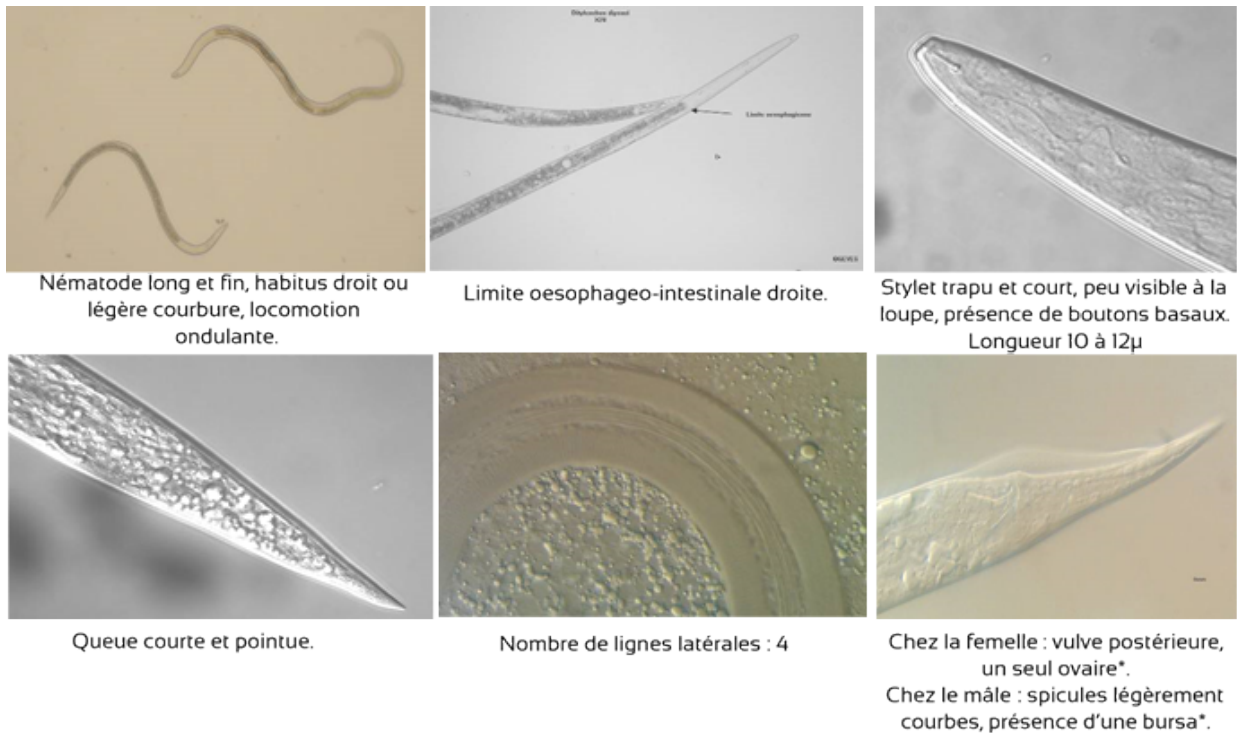


Fig. 8. Critères généraux et morphobiométriques observés sous loupe binoculaire et microscope pour identification de *Ditylenchus dipsaci* (\* non visible au stade L4.)

- Nématode long et fin, habitus droit ou légère courbure,
- Locomotion ondulante.
- Limite oesophageo-intestinale droite.
- Stylet trapu et court, peu visible à la loupe, présence de boutons basaux.
- Queue courte et pointue.
- Tête aplatie, dans le prolongement du corps, faiblement sclérotisée
- Chez la femelle : vulve postérieure, un seul ovaire.\*  
 Chez le mâle : spicules légèrement courbes, présence d'une bursa (cette dernière n'est pas visible au stade L4).
- Si présence d'un nématode non mobile suspect ou absence de nématode suspect, l'ensemble de la coupelle est observé en double lecture.
- Si des nématodes suspects sont détectés un prélèvement des nématodes suspects est réalisé
- N.B / Attention** : si besoin d'évaluer la viabilité, réaliser la coloration avant l'identification (cf étape 9.1.3.).
- Préparer une lame pour observation des critères morphobiométriques sous microscope
  - Déposer une petite goutte d'eau sur la lame.
  - Déposer le nématode suspect à observer dans la goutte d'eau.
  - Déposer délicatement la lamelle dessus.
  - Vérifier à la loupe que le nématode est bien entre lame et lamelle,
  - Luter la lamelle avec du vernis.

- Critères morphobiométriques (Fig.8 voir plus haut) :
  - Longueur du stylet : 10 à 12 $\mu$
  - Forme de la queue : courte et pointue
  - Nombre de lignes latérales : 4 (caractère pas toujours visible selon la position du nématode, et non pris en compte si non visible)
  - Critère uniquement sur femelle : Longueur du sac post vulvaire / distance vulve-anus : =  $\frac{1}{2}$
- Résultat
  - Si l'individu possède l'ensemble des critères morphobiométriques : *Ditylenchus dipsaci* est détecté
  - Si l'individu ne possède pas l'un ou plusieurs de ces critères morphobiométriques : *Ditylenchus dipsaci* est non détecté.

### 9.1.3. Viabilité (uniquement pour *D. dipsaci*)

Il est acquis que tout individu en capacité de nager est considéré comme vivant. Ce test est réalisé uniquement sur les individus immobiles.

- Préparer une solution d'Eosine Y à 0.5% (solubilisée dans de l'éthanol à 96%.)
- Récupérer les nématodes suspects.
- Placer les nématodes dans une lame à concavité contenant une goutte d'éosine Y.
- Laisser incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
- Isoler de nouveau les nématodes dans une goutte d'eau
- Observer au microscope
  - Vérifier si les nématodes sont caractérisés par la présence d'une coloration des tissus (Fig.9).



Fig. 9. Aspect des individus colorés (gauche) ou non (droite) observés sous loupe binoculaire pour vérification de la viabilité de *Ditylenchus dipsaci*

- Coloration rouge : nématode mort
- Absence de coloration : nématode vivant.

## 10. Résultats

Le rapport doit indiquer le poids ou volume de semences testées et la méthode utilisée.

### 10.1. Expression des résultats

Détection :

- Prescreening par SE-PCR
    - Dans le cas d'un résultat négatif (pathogène non détecté), il est indiqué « *Ditylenchus dipsaci* non détecté. »
    - Dans le cas d'un résultat positif (pathogène détecté), il est indiqué « Séquence cible de *Ditylenchus dipsaci* détectée. »
  - Détection par identification morpho biométrique
    - Dans le cas d'un résultat négatif (pathogène non détecté), il est indiqué « *Ditylenchus dipsaci* non détecté. »
    - Dans le cas d'un résultat positif (pathogène détecté), il est indiqué « *Ditylenchus dipsaci* détecté. »
- Viabilité :
    - Dans le cas d'un résultat négatif (pathogène détecté coloré), il est indiqué « *Ditylenchus dipsaci* détecté mort. »
    - Dans le cas d'un résultat positif (pathogène détecté non coloré), il est indiqué « *Ditylenchus dipsaci* détecté vivant. »

## 11. Devenir des reliquats d'échantillon après analyse

Les reliquats d'échantillons positifs en SE-PCR doivent être conservés pendant une durée d'un an à 5-10°C à l'obscurité.

Les reliquats d'échantillons négatifs en SE-PCR doivent être conservés 10 jours après envoi du rapport.

## 12. Annexes

### 12.1. Kit, Mix et programme PCR

- Kit PCR : GoTaq qPCR Master Mix 2X (Promega)

Composition du mix

	Concentration finale	Volume pour 1 tube
H <sub>2</sub> O Nuclease Free	-	6.4 µL
MasterMix	1X	10 µL
DIT unif	0.2 µM	0.8 µL
DIT dipR	0.2 µM	0.8 µL
Matrice (ADN extrait)	-	2µL
Volume total	-	20 µL

- Programme PCR

Température	Durée	Nombre de cycles
95°C	5 min	40 cycles
95°C	15 sec	
60°C	1 min	
Melt curve 60-95°C		

### 12.2. Solution d'Eosine Y à 0.5%

Eosine Y anhydre	0,5 g/L
Ethanol 96%	1L

### 12.3. Bibliographie

ORGEUR G. (2019) DITYLUZ - Acquisition d'outils méthodologiques pour la détection et la quantification du nématode des tiges, *Ditylenchus dipsaci*, sur semences de luzerne (*Medicago sativa* L.). Mise au point d'un test de viabilité et adaptation de l'échantillonnage et de l'échantillon analysé. Restitution CASDAR, Paris, 3 Décembre 2019. ORGEUR G.;

LEDARE L.; BALDWIN T.K.; BRACHET J.; MARREC A.; CHAMAILLE A. and GRIMAULT V. (2019) Dityluz: Developpement of tools for the detection and viability testing of stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*, on alfalfa seeds (*Medicago sativa* L.). Development and assessment of a pest threshold. ISTA congress, India June 2019.

ORGEUR G.; LEDARE L.; BALDWIN T.K.; BRACHET J.; MARREC A.; CHAMAILLE A. and GRIMAULT V. (2018) Dityluz: Developpement of tools for the detection and viability testing of stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*, on alfalfa seeds (*Medicago sativa* L.). Development and assessment of a pest threshold. ESN (European Society of Nematology) congress, Gent, Belgium 11/09/2018.

### 12.4. Crédits (photos)

Fig. 1. Rinçage du tamis A au-dessus de la bassine © GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.

Fig. 2. Filtration du macérat dans le tamis B © GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.

Fig. 3. Rinçage du tamis B et récupération du filtrat B dans une coupelle en verre © GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.

Fig. 4. Filtration du filtrat B dans le filtre A (Adapteur + PluriStainer® + pompe à vide) ©GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.

Fig. 5. Pose du bouchon pour favoriser l'herméticité ©GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.

Fig. 6. Mise en suspender la population de nématodes collectée sur le filtre A. ©GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.

Fig. 7. Dépôt de la suspension de nématodes dans un tube Eppendorf® 1.5mL ©GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.

Fig. 8. Critères généraux et morphobiométriques observés sous loupe binoculaire et microscope pour identification de *Ditylenchus dipsaci* ©GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.

Fig. 9. Aspect des individus colorés (gauche) ou non (droite) observés sous loupe binoculaire pour vérification de la viabilité de *Ditylenchus dipsaci* ©GEVES – Juillet 2020 Tous droits réservés.