

Méthode d'analyse

En santé des végétaux

Référence : M-GEVES/SV/MO/001

Version : 2.0

Septembre 2026

Détection de *Ditylenchus dipsaci* sur semences de luzerne (*Medicago sativa*)

Groupe d'étude 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* »

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété du GEVES. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée : GEVES, Méthode d'analyse en santé des végétaux, Détection de *Ditylenchus dipsaci* sur semences de luzerne ; M-GEVES/SV/MO/001, v. 2.0 ; ©2026

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 1 - Récapitulatif des différentes versions de la méthode.

Version	Date	Type de modification	Principales modifications
1.0	Novembre 2020	/	Création
1.1	Avril 2021	Mineure	Ajout de l'option d'utilisation du sac de croissance à l'étape trempage.
1.2	Février 2023	Mineure	Indication que l'étape de confirmation de la viabilité peut être réalisée par le LNR et modifications éditoriales apportant des précisions à la méthode.
2.0	Septembre 2026	Majeure	Suppression de l'étape de confirmation de la viabilité. Modification de la composition du NPC de la SE-PCR.

Sommaire

1. Introduction	4
1.1. Validation de la méthode.....	4
2. Avertissements et précautions de sécurité	5
3. Objet et domaine d'application	5
4. Termes, sigles et définitions	5
5. Principe de la méthode	6
6. Réactifs et Matériels	6
6.1. Généralités.....	6
6.2. Réactifs	7
6.2.1. Pré-screening SE-PCR	7
6.2.2. Identification morphobiométrique.....	7
6.3. Matériels.....	7
6.3.1. Extraction des nématodes	7
6.3.2. Pré-screening SE-PCR	8
6.3.3. Identification morphobiométrique.....	8
7. Echantillons	8
7.1. Taille, conditionnement	8
7.2. Conservation	8
7.3. Critères d'acceptation	8
8. Mode opératoire.....	9
8.1. Extraction des nématodes.....	9
8.2. Pré-screening SE-PCR (optionnel)	10
8.2.1. Préparation du filtrat.....	10
8.2.2. SE-PCR	11
8.3. Etape identification morphobiométrique.....	13
9. Résultats.....	15
10. Reliquats d'échantillon après analyse.....	15
11. Bibliographie.....	16
12. Crédits (photos)	16

1. Introduction

Ditylenchus dipsaci est un nématode endoparasite migratoire qui se nourrit du parenchyme de tiges ou de bulbes. Ce nématode est capable d'attaquer plus de 1 200 espèces végétales dont la luzerne (Castagnone *et al.*, 2013). Les symptômes engendrés par ce nématode se caractérisent par des gonflements, une déformation des parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs), l'apparition de nécroses à la base des tiges et un nanisme de la plante.

D. dipsaci a été déclaré organisme réglementé non de quarantaine (ORNQ) sur semences de luzerne par le règlement d'exécution (UE) 2019/2072. Il est donc interdit d'introduire ou de faire circuler des semences de luzerne contaminées par *D. dipsaci* sur le territoire de l'Union Européenne (RE (UE) 2016/2031). Pour éviter la propagation de ce nématode, la méthode officielle présentée ici peut être appliquée pour établir l'état sanitaire de semences de luzerne vis-à-vis de *D. dipsaci*.

L'étape d'identification morphobiométrique de cette méthode correspond à la méthode ANSES MOA013 parties A et B et à la méthode ISTA 7-031. Les étapes de pré-screening SE-PCR et évaluation de la viabilité ont été mise au point lors du projet CASDAR DITYLUZ (Orgeur *et al.*, 2021).

1.1. Validation de la méthode

Les critères de performance de cette méthode sont présentés dans le **Tableau 2**.

Les critères de performance de l'étape de pré-screening SE-PCR ont été évalués lors du projet CASDAR DITYLUZ (2017). La sensibilité analytique de cette étape après l'extraction des nématodes est de 1 *D. dipsaci* ce qui est conforme à l'attendu vis-à-vis du seuil de tolérance indiqué dans le RE 2019/2072 (seuil à 0). La spécificité analytique de cette étape est de 97.2 % pour l'inclusivité (1 nématode cible non détecté sur 36 testés) et de 88.2 % pour l'exclusivité (6 nématodes non-cible détectés sur 51 testés). Ces résultats indiquent que la SE-PCR peut générer des résultats faux négatif/positif. Cependant, le risque d'un résultat final faux positif est limité par la mise en place d'une analyse de confirmation par identification morphobiométrique. La sensibilité diagnostique, spécificité diagnostique, exactitude, accordance et concordance ont été évaluées lors d'un EILV au sein du projet DITYLUZ et ont toutes un niveau de 100 %.

L'étape d'identification morphobiométrique présente un taux de récupération de 64 % pour des échantillons faiblement contaminés (entre 5 et 10 nématodes par échantillons). Les critères de performance de l'étape d'identification morphobiométrique ont été évalués lors du projet européen TESTA (2015). La sensibilité analytique de cette étape a été évaluée à 5 *D. dipsaci*. La spécificité de la méthode n'est pas applicable car la reconnaissance de *D. dipsaci* s'appuie sur des critères morphobiométriques permettant la distinction, individu par individu, de *D. dipsaci* par rapport à d'autres nématodes. La sensibilité diagnostique, spécificité diagnostique, exactitude, accordance et concordance ont été évaluées lors d'un EILV au sein du projet TESTA et présentent des niveaux satisfaisants ≥ 98 %.

Tableau 2 - Niveaux des critères de performance de la méthode. NA : non applicable.

		Etape de pré-screening SE-PCR	Etape d'identification morphobiométrique
Sensibilité analytique		1 <i>D. dipsaci</i>	5 <i>D. dipsaci</i>
Spécificité analytique	Inclusivité	97.2 %	NA
	Exclusivité	88.2 %	
Sensibilité diagnostique		100 %	98.8 %
Spécificité diagnostique		100 %	100 %
Exactitude		100 %	99.2 %
Accordance		100 %	98 %
Concordance		100 %	98 %

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 laboratoire. L'utilisateur est responsable de l'application des règles d'hygiène et sécurité en conformité avec la réglementation en vigueur.

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 applicable sur semences de luzerne non traitées uniquement. Elle est applicable pour tout contrôle officiel visant à détecter *D. dipsaci* sur semences de luzerne.

4. Termes, sigles et définitions

ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Ct:	Cycle threshold (Cycle seuil)
EILV :	Essai Inter-Laboratoire de Validation
GEVES :	Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences
ISTA :	International Seed Testing Association
NA :	Non Applicable
NEC :	Negative Extraction Control
NPC :	Negative Process Control
NR :	Non Réalisé
NTC :	Non-Template Control
ORNQ :	Organisme Réglementé Non de Quarantaine
PAC :	Positive Amplification Control
PPC :	Positive Process Control
RE :	Règlement d'Exécution
SE-PCR :	Seed Extract PCR, permet la détection de bioagresseur sur un extrait de semences.
Tm:	Temperature melt (Température de fusion)
UE :	Union Européenne

5. Principe de la méthode

La méthode peut être décrite comme suit (**Figure 1**) :

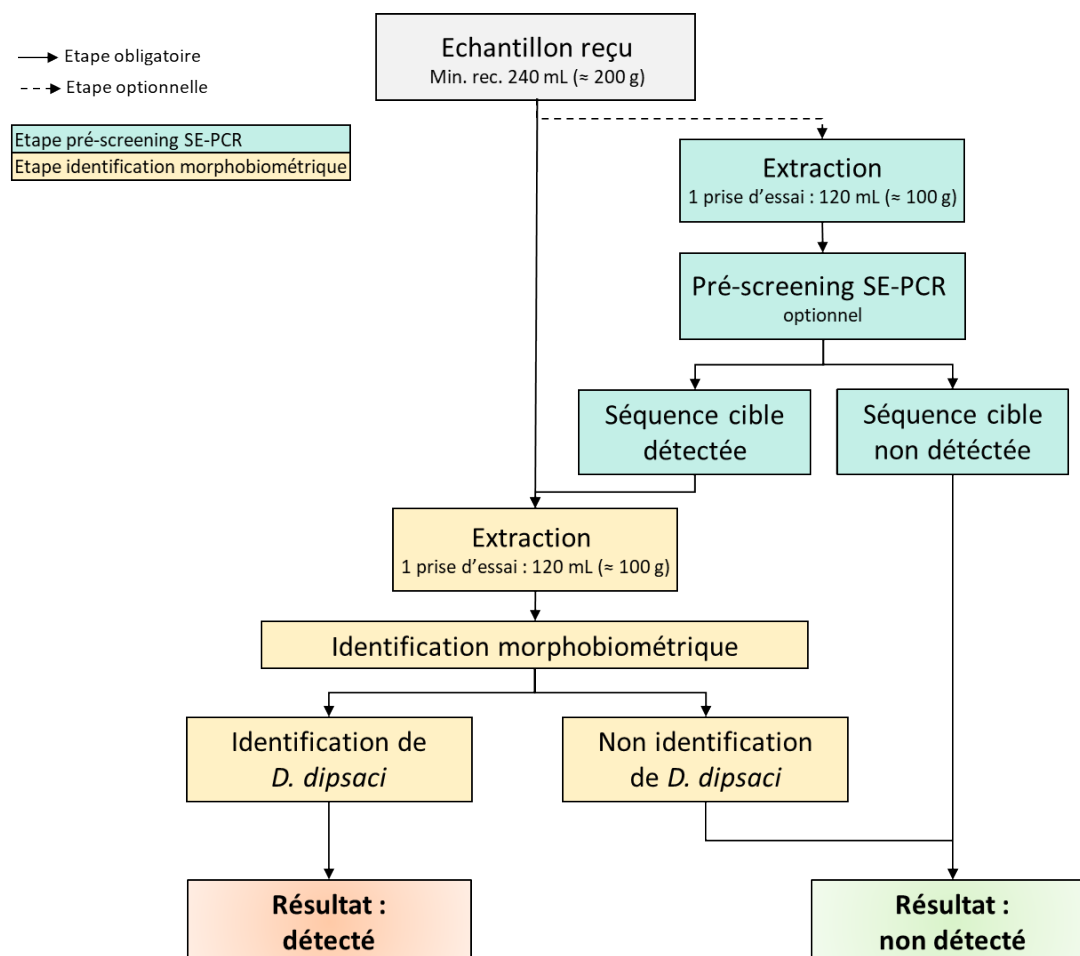


Figure 1 - Principe de la méthode de détection de *D. dipsaci* sur semences de luzerne.

La méthode est divisée en deux étapes différentes :

- Etape pré-screening SE-PCR (optionnel)
- Etape identification morphobiométrique

Elle peut être réalisée des deux façons suivantes :

- Extraction d'une prise d'essai puis identification morphobiométrique.
- Extraction d'une prise d'essai puis pré-screening SE-PCR. Si le résultat SE-PCR est positif, réaliser une extraction sur une seconde prise d'essai puis une identification morphobiométrique.

6. Réactifs et Matériels

6.1. Généralités

Le matériel de mesure utilisé doit respecter les considérations métrologiques présentées dans le **Tableau 3**. Les recommandations du fournisseur concernant les conditions de stockage et de conservation des réactifs ou du matériel doivent être suivies.

Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des réactifs ou matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cependant, des réactifs ou matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Tableau 3 – Considérations métrologiques concernant le matériel et les réactifs utilisés dans cette méthode.

Paramètre		Ecart maximal toléré
Volume	< 10mL	± 10 %
	≥ 10 mL	± 5 %
Masse		± 10 %
pH		± 0.3
Température	Incubateur	± 3 °C
	Réfrigérateur	5°C (± 4 °C)
	Congélateur	≤ -18 °C
	Serre/module climatique	± 5°C
Longueur		± 10 %
Temps		± 10 %

6.2. Réactifs

6.2.1. Pré-screening SE-PCR

- Eau ultra pure de qualité suffisante pour une utilisation en biologie moléculaire (utilisée comme Non-Template Control (NTC) et dans le mix qPCR)
- Amorces DITunif et DITdipR
- Mix qPCR : GoTaq qPCR Master Mix 2X (Promega)*
- ADN de *D. dipsaci* (utilisé comme Positive amplification control (PAC))
- Eau utilisée pour l'extraction des nématodes (Negative process control (NPC))
- 1 *D. dipsaci* dans un microtube contenant 1 mL d'eau (Positive process control (PPC))
- Eau

6.2.2. Identification morphobiométrique

- Eau
- Huile à immersion pour observation au microscope
- Individus de référence de *Ditylenchus dipsaci* montés entre lames et lamelles lutés

6.3. Matériels

6.3.1. Extraction des nématodes

- Bassine
- Contenant pour filtration (tamis à mailles de 250 µm, ou sac de croissance non tissé pour plantation pépinière ou contenant équivalent s'il est démontré qu'il conduit au même résultat) pour retenir semences et débris
- Papier filtre de type essuie tout
- Tamis à mailles de 20 µm (± 3 µm)
- Pissette ou douchette
- Coupelle striée en verre

6.3.2. Pré-screening SE-PCR

- Adaptateur + filtre Pluristrainer® 10 µm (± 3 µm)
- Tube Falcon 50 mL
- Pompe à vide
- Micropipettes (P1000)
- Pipettes Pasteur
- Microtube
- Bécher en verre avec bec verseur
- Kit Macherey-Nagel® Genomic DNA from tissue (NucleoSpin Tissue, protocole pour « animal tissue »), ou Kit Qiagen® DNeasy Blood & Tissue (Purification de l'ADN total de tissus animal spin-column protocol) *
- Concentrateur (type Concentrator Plus Eppendorf®)
- Centrifugeuse (11 000 g)
- Thermocycleur temps réel, technologie Sybr green

6.3.3. Identification morphobiométrique

- Loupe binoculaire
- Microscope avec objectif X 100
- Lames et lamelles
- Coupelle striée en verre
- Cil monté
- Pique (pour écarter les poussières)

** les réactifs d'autres fournisseurs peuvent être utilisés, si le laboratoire a vérifié et confirmé leur performance avec ces autres matériels/réactifs au préalable.*

7. Echantillons

7.1. Taille, conditionnement

L'échantillon doit être envoyé dans un contenant fermé de façon étanche pour éviter la perte des semences.

Taille de l'échantillon minimum recommandée : 240 mL (soit d'environ 200 g)

Taille d'une prise d'essai : 120 mL (soit environ 100 g)

La prise d'essai peut être mesurée à l'aide d'un récipient pré-calibré.

7.2. Conservation

Dès sa réception, l'échantillon doit être conservé à environ 10 °C de façon étanche.

7.3. Critères d'acceptation

Il est de la responsabilité du préleveur de fournir un échantillon représentatif du lot de semences à analyser. L'échantillon doit être en parfait état de conservation et contenu dans un sachet fermé sans humidité.

Cette méthode est applicable sur semences non traitées uniquement, elle n'a pas été validée sur semences traitées avec l'application d'un produit (semences pelliculées/colorées).

8. Mode opératoire

8.1. Extraction des nématodes

1. Si le pré-screening SE-PCR est réalisé : préparer un NPC en ajoutant de l'eau dans une bassine vide. Ce NPC devra suivre les mêmes étapes que la prise d'essai testée.
2. Faire une prise d'essai correspondant à un volume de 120 mL (environ 100 g) de semences de luzerne.
3. Déposer la prise d'essai dans le contenant choisi (tamis à mailles de 250 µm ou sac de croissance fermé avec des agrafes). Intercaler un papier filtre de type essuie tout entre l'échantillon et le contenant pour retenir le maximum de particules. Déposer le contenant (avec papier filtre et semences) dans une bassine et recouvrir les semences d'eau.
4. Laisser les bassines ainsi pendant environ 24 h à température ambiante.
5. Retirer le contenant (tamis ou le sac de croissance) rincer le contenant et les semences brièvement avec de l'eau à l'aide d'un jet de pissette ou d'une douchette au-dessus la bassine (**Figure 2A et B**).
6. Eliminer le contenant et filtrer tout le macérât de la bassine sur un tamis à mailles de 20 µm (**Figure 2C**). Rincer la bassine et verser l'eau de rinçage sur le tamis de 20 µm.
7. Rincer minutieusement l'intérieur du tamis à mailles de 20 µm et récupérer le filtrat dans un bécher en verre avec bec verseur pour effectuer le pré-screening PCR (**Figure 2D**), ou dans une coupelle striée en verre pour effectuer l'identification morphobiométrique.

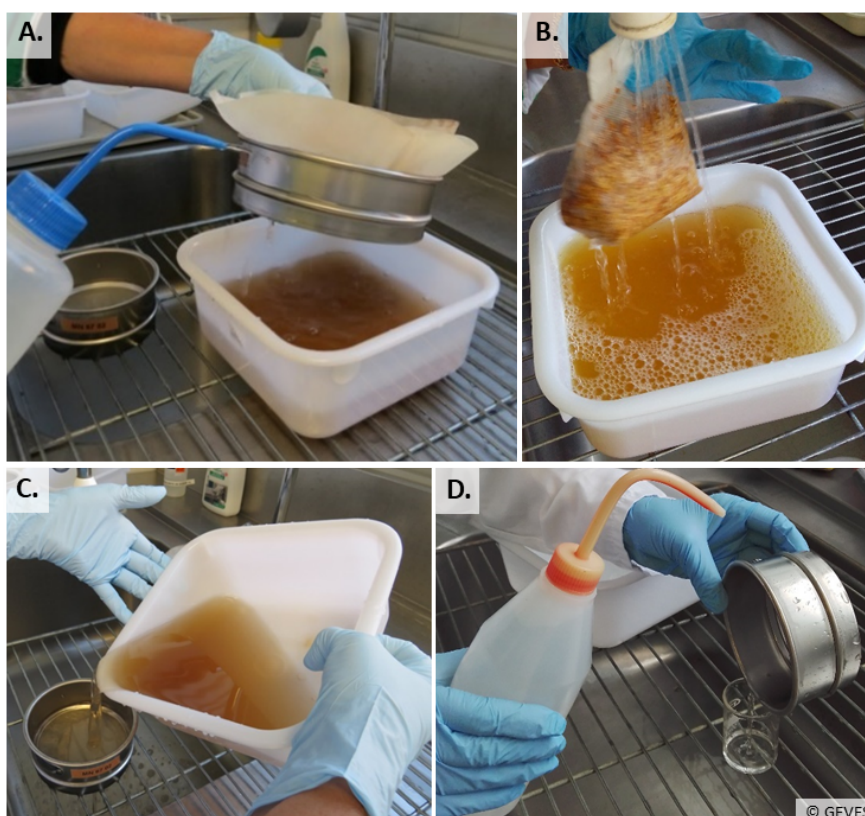


Figure 2 - Photographie du rinçage et de la filtration du macérât. Rinçage du contenant (tamis (A) ou du sac de croissance (B)) au-dessus de la bassine, filtration du macérât sur un tamis à mailles de 20 µm (C) puis rinçage du tamis à mailles de 20 µm et récupération du filtrat (D). Crédit photo : © GEVES.

8.2. Pré-screening SE-PCR (optionnel)

Les étapes suivantes sont à réaliser uniquement si l'étape de pré-screening SE-PCR est réalisée. Sinon, passer directement à l'étape d'identification morphobiométrique (8.3).

8.2.1. Préparation du filtrat

Les étapes détaillées ici doivent également être réalisées pour le NPC.

1. Filtrer le liquide récolté avec un filtre PluriStainer® de 10 µm muni d'une pompe à vide (**Figure 3A**). Rincer minutieusement le béccher en verre et répéter l'opération de rinçage une fois. Lorsque l'ensemble du liquide est filtré, fermer l'entrée d'air avec le bouchon rouge (**Figure 3B**).
2. Ajouter 500 µL d'eau sur le filtre PluriStainer® à l'aide d'une micropipette. Remettre en suspension la population de nématodes à l'aide d'une pipette Pasteur (**Figure 3C**) en rejetant et aspirant plusieurs fois l'eau puis transférer le contenu dans un microtube (**Figure 3D**).
3. Répéter l'opération 1 avec un nouvel ajout de 500 µL d'eau et transférer l'eau dans le microtube.
4. Stocker les microtubes (échantillons et contrôles) au congélateur ou passer directement à l'étape de SE-PCR.

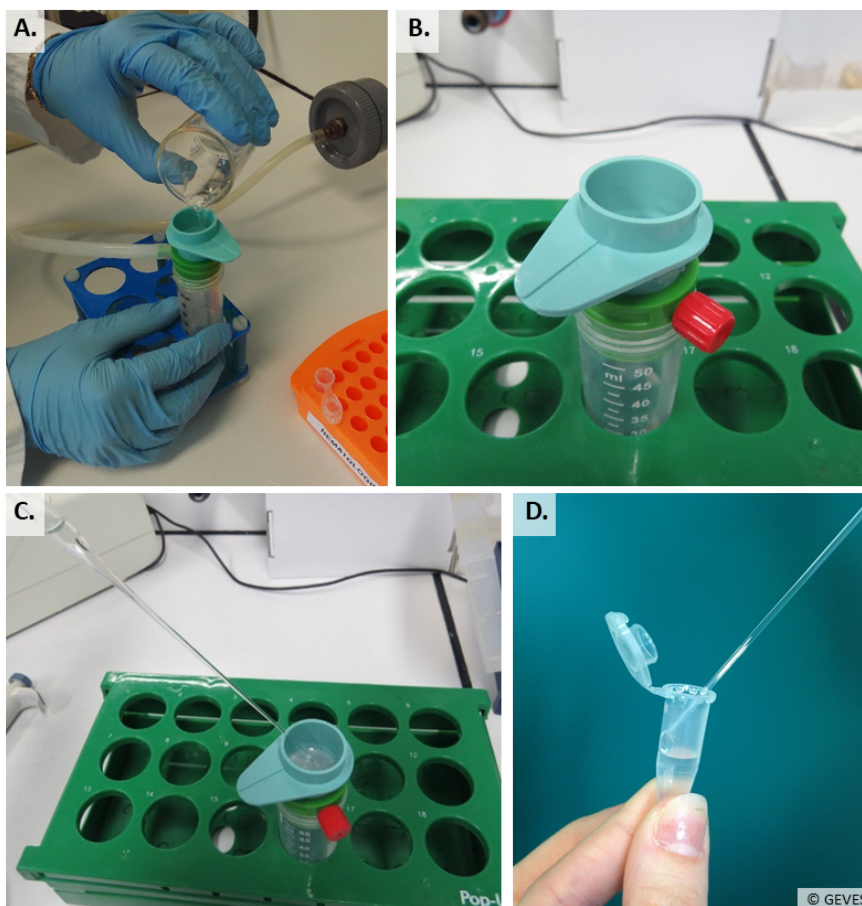


Figure 3 - Photographie des étapes de concentration des nématodes. Filtration du liquide récolté avec un filtre PluriStainer® (A), fermeture du bouchon (B), remise en suspension des nématodes (C) puis dépôt des nématodes en microtube (D). Crédit photo : © GEVES.

8.2.2. SE-PCR

Durant cette étape, les contrôles suivants présentés dans le **Tableau 4** seront utilisés.

Tableau 4 – Contrôles à mettre en place lors de l'étape de pré-screening SE-PCR. Les contrôles PPC et PAC peuvent être conservés au congélateur.

Nom		Composition	Etapes à suivre
PPC	Positive process control	1 <i>D. dipsaci</i> dans un microtube contenant 1 mL d'eau	Séchage, extraction d'ADN puis qPCR. Toujours utiliser 2 PPC pour une analyse
NPC	Negative process control	Eau de macération ayant subi le même processus que l'échantillon testé	Séchage, extraction d'ADN puis qPCR
NEC*	Negative extraction control	Tampon de lyse utilisé dans le kit d'extraction d'ADN	qPCR
PAC	Positive amplification control	ADN de <i>D. dipsaci</i>	qPCR
NTC	Non template control	Eau ultra pure utilisée pour le mélange de qPCR	qPCR

* : contrôle optionnel.

8.2.2.1 Séchage des nématodes

1. Sécher les microtubes (échantillons, PPC et NPC) au concentrateur (environ 30 °C pendant 5 h) jusqu'au séchage complet.

8.2.2.2 Extraction d'ADN

1. Réaliser une extraction d'ADN selon les instructions du kit d'extraction choisi (kit Macherey-Nagel Genomic DNA from tissue (NucleoSpin Tissue, protocole pour « animal tissue »), kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Purification de l'ADN total de tissus animal spin-column protocol) ou autre kit si le laboratoire vérifie et confirme sa performance en préalable).
2. Les extraits peuvent être conservés au congélateur ou testés en qPCR immédiatement.

8.2.2.3 qPCR

Les amorces de cette qPCR ont été développées par Jeszke *et al.*, 2015. De manière générale les contrôles doivent être préparés et manipulés séparément des échantillons pour éviter toute contamination croisée.

1. Réaliser la qPCR sur l'ADN extrait des échantillons et l'ensemble des contrôles à l'aide des amorces DITunif et DITdipR (**Tableau 5**). Les exemples des concentrations, du volume du mix et du programme PCR sont présentés dans les **Tableaux 6** et **7**. Tous les échantillons et contrôles en solution pure sont analysés en duplicat.

Tableau 5 – Amorces utilisées pour la qPCR DITunif-DITdipR.

Ces amorces ont été développées par Jeszke *et al.*, 2015.

Nom de la qPCR	Nom de l'amorce	Séquence (5'→3')
DITunif-DITdipR	DITunif	CTGTAGGTGAACCTGC
	DITdipR	GACATCACCAGTGAGCATCG

Tableau 6 – Exemple de mélange réactionnel pour la qPCR DITunif-DITdipR avec le master mix GoTaq qPCR 2X de Promaga®. La composition du mélange peut être adaptée à l'exception des concentrations finales d'amorces qui doivent être respectées.

	Concentration finale	Volume pour 1 tube
H ₂ O Nuclease Free	-	6.4 µL
MasterMix *	1X	10 µL
DITunif	0.2 µM	0.8 µL
DITdipR	0.2 µM	0.8 µL
Matrice (ADN extrait)	-	2 µL
Volume total	-	20 µL

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

Tableau 7 – Exemple de programme à suivre pour la qPCR DITunif-DITdipR.

Température	Durée	Nombre de cycles
95°C	5 min	1
95°C	15 sec	40
60°C	1 min	
Melt curve 72-92°C		

8.2.2.4 Interprétation des résultats de qPCR

Toute valeur Ct doit être accompagnée d'une courbe exponentielle pour être prise en compte. La valeur du Ct doit être fixée au-dessus du bruit de fond (background). La détermination du Ct peut être faite automatiquement avec le logiciel associé au thermocycleur ou manuellement.

- Vérifier d'abord la conformité des contrôles selon le **Tableau 8** pour pouvoir interpréter les résultats des échantillons. Les valeurs Ct et Tm Melt Curve indiquées sont celles qui ont été appliqués lors 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.
- Les résultats qPCR pour les échantillons sont analysés selon la règle de décision présentée dans le **Tableau 9**.
- Pour un échantillon donné :
 - Si les 2 puits sont positifs, il faudra confirmer le résultat positif qPCR par une identification morphobiométrique.
 - Si les 2 puits sont négatifs : le résultat final de l'analyse est négatif (*Ditylenchus dipsaci* non détecté).
 - Si un seul puit est positif : faire une reprise de la qPCR pour l'échantillon concerné. En cas de résultats discordants lors de la reprise (un puit positif sur 2), le résultat qPCR est positif et devra être confirmé par une identification morphobiométrique.

Tableau 8 – Règles de décision concernant les résultats qPCR des contrôles.

Contrôle	Ct	Tm Melt curve	Interprétation
PAC	≤ 30	≈ 82°C	Conforme
	Autres résultats		Non-conforme
NTC	> 30 ou Undetermined		Conforme
	Autres résultats		Non-conforme
PPC	≤30	≈ 82°C	Conforme
	Autres résultats		Non-conforme
NPC	> 30 ou Undetermined		Conforme
	Autres résultats		Non-conforme
NEC	> 30 ou Undetermined		Conforme
	Autres résultats		Non conforme

Tableau 9 – Règle de décision concernant les résultats qPCR des échantillons.

Ct	Tm Melt curve	Interprétation
≤30	T° ± 1°C du Tm PPC	Résultat qPCR positif
Autres résultats		Résultat qPCR négatif

8.3. Etape identification morphobiométrique

Si le pré-screening SE-PCR n'a pas été effectué : passer à l'étape **8.3 point 2**. Sinon, suivre toutes les étapes indiquées ci-dessous.

- Effectuer une extraction de nématodes sur une deuxième prise d'essai de l'échantillon (120 mL soit environ 100 g) en suivant les étapes indiquées au **8.1**. Le filtrat sera récupéré dans une coupelle striée en verre.
- Observer l'ensemble de la coupelle à la loupe binoculaire et détecter des nématodes suspects correspondants aux critères généraux suivant (**Figure 4**) :
 - Nématode long et fin, habitus droit ou légère courbure.
 - Locomotion ondulante dans le cas de nématodes vivants.
 - Limite oesophageo-intestinale droite ou légèrement oblique.
 - Stylet trapu et court, peu visible à la loupe, présence de boutons basaux. La présence du stylet peut être plus facilement repérée sous microscope inversé.
 - 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 courbés, présence d'une bursa.

S'il n'y a pas de nématode suspect, l'ensemble de la coupelle est observé en double lecture. Si après une double lecture aucun nématode suspect n'est détecté, le résultat final de l'analyse sera négatif (*D. dipsaci* non détecté).

- En cas de présence d'au moins un nématode suspect, prélever le nématode à l'aide d'un cil monté et réaliser un montage du nématode entre lame et lamelle en suivant ces étapes :
 - Déposer une petite goutte d'eau sur la lame.
 - Déposer le nématode suspect à observer dans la goutte d'eau.
 - Déposer délicatement la lamelle sur la goutte d'eau.
 - Vérifier à la loupe que le nématode est bien entre lame et lamelle.
 - Luter la lamelle avec du vernis.

4. Observer les nématodes suspects sous microscope et repérer les critères morphobiométriques suivants :

- a. Longueur du stylet : 10 à 12 μm
- b. Forme de la queue : courte et pointue
- c. Nombre de lignes latérales : 4 (caractère parfois non visible selon la position du nématode, non pris en compte si non visible)
- d. Sur individu femelle : Longueur du sac post vulvaire / distance vulve-anus : = $\frac{1}{2}$

Si l'individu possède l'ensemble des critères morphobiométriques ou tous les critères morphobiométrique et que les lignes latérales ne sont pas visibles : le résultat final de l'analyse sera positif (*D. dipsaci* détecté). Si l'individu ne possède pas l'un ou plusieurs de ces critères morphobiométriques, le résultat final de l'analyse sera négatif (*D. dipsaci* non détecté).

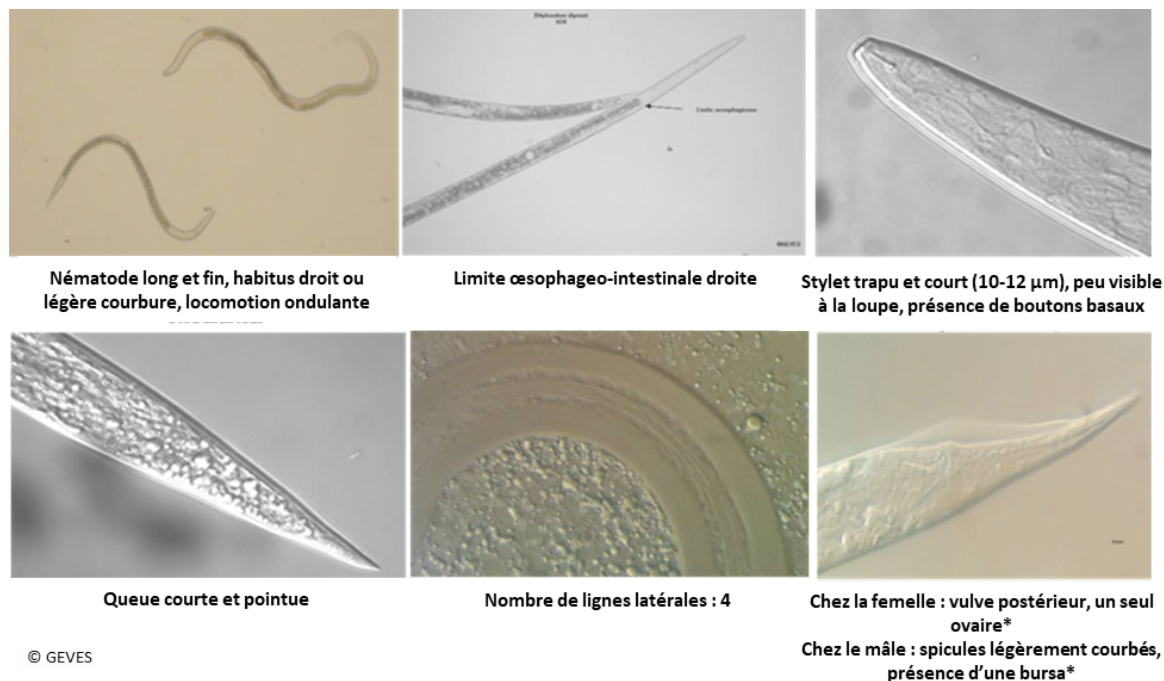


Figure 4 - Critères généraux et morphobiométriques observés sous loupe binoculaire et au microscope pour l'identification de *Ditylenchus dipsaci*. * non visible au stade L4.

Crédit photo : © GEVES.

9. Résultats

Le rapport doit indiquer le poids ou le volume de semences testées et la méthode utilisée. Le résultat final de l'analyse est déterminé selon le **Tableau 10**.

Tableau 10 – Résultat final de l'analyse en fonction des tests effectués et des résultats obtenus. NR : non réalisé.

Résultat pré-screening SE-PCR	Résultat identification morphobiométrique	Indication sur le rapport
-	NR	« <i>Ditylenchus dipsaci</i> non détecté. »
NR	-	
+	-	
NR	+	« <i>Ditylenchus dipsaci</i> détecté. »
+	+	

En cas de résultat positif lors de l'étape de pré-screening SE-PCR, le rapport devra indiquer « Séquence cible détectée. ».

10. Reliquats d'échantillon après analyse

Les reliquats d'ADN des échantillons positifs en SE-PCR doivent être conservés pendant une durée minimale d'un an au congélateur.

Les reliquats de semences des échantillons positifs doivent être conservés pendant une durée minimale d'un an à environ 10 °C.

Les reliquats d'échantillons négatifs doivent être conservés 10 jours après l'envoi du rapport.

11. Bibliographie

Castagnone, P., Gutiérrez, A. E., Esquibet, M., Mugniery, D., Reignault, P., Sarniguet, C., Augustin S., Bréda N., Chauvel B. *et al.*, 2013. Analyse de risque phytosanitaire *Ditylenchus dipsaci* sur luzerne.

Jeszke, A., Dobosz, R., and Obrepalska-Stepiowska, A. 2015. A fast and sensitive method for the simultaneous identification of three important nematode species of the genus *Ditylenchus*. Pest Manag. Sci. 71:243–249.

Orgeur, G., Baldwin, T. K., and Grimault, V. 2021. 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, adaptation de l'échantillonnage. Innov. Agron. INRAE. 84:238–249.

Règlement d'exécution (UE) 2019/2072 du 28 novembre 2019 (journal officiel de l'Union Européenne), version consolidée du 06/07/2026.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/ALL/?uri=CELEX%3A32019R2072>

Règlement (UE) 2016/2031 du 26 octobre 2016 (journal officiel de l'Union Européenne), version consolidée du 06/07/2026.

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32016R2031>

Méthode ANSES MA013 partie A v1a - Détection du genre *Ditylenchus* sur sols, substrats et organes végétaux (bulbes, rhizomes, caïeux, cormus, tubercules, graines) (https://www.anses.fr/en/system/files/ANSES_LSV_MOA013_A_V1a.pdf) et MOA013 partie B v1a - Identification morphobiométrique de *Ditylenchus dipsaci* et *D. destructor* (https://www.anses.fr/en/system/files/ANSES_LSV_MOA013_B_V1a.pdf)

Méthode ISTA 7-031 : Filtration method for detection of *Ditylenchus dipsaci* in *Medicago sativa* (alfalfa); *D. dipsaci* and *D. gigas* in *Vicia faba* (faba bean) seed. (<https://www.seedtest.org/en/international-rules-for-seed-testing/seed-health-methods-product-1014.html>)

12. Crédits (photos)

Figure 2 - Photographie du rinçage et de la filtration du macérat. Rinçage du contenant (tamis (A) ou du sac de croissance (B)) au-dessus de la bassine, filtration du macérat sur un tamis à mailles de 20 µm (C) puis rinçage du tamis à mailles de 20 µm et récupération du filtrat (D). Crédit photo : © GEVES.

Figure 3 - Photographie des étapes de concentration des nématodes. Filtration du liquide récolté avec un filtre PluriStainer® (A), fermeture du bouchon (B), remise en suspension des nématodes (C) puis dépôt des nématodes en microtube (D). Crédit photo : © GEVES.

Figure 4 - Critères généraux et morphobiométriques observés sous loupe binoculaire et au microscope pour l'identification de *Ditylenchus dipsaci*. * non visible au stade L4. Crédit photo : © GEVES.