



Organisation des Nations Unies
pour l'alimentation
et l'agriculture



Convention internationale pour la protection des végétaux
Protéger les ressources végétales contre les organismes nuisibles

NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES 27

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC

NIMP 27
ANNEXE 8

FRE

PD 8: *Ditylenchus dipsaci* et *Ditylenchus destructor*

Produit par le Secrétariat de la Convention internationale
pour la protection des végétaux (CIPV)

Cette page est intentionnellement laissée vierge

NIMP 27

Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

PD 8: *Ditylenchus dipsaci* et *Ditylenchus destructor*

Adoptée en 2015; publiée en 2015

TABLE DES MATIÈRES

1.	Informations relatives à l'organisme nuisible	3
1.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	3
1.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	4
2.	Données taxonomiques	4
3.	Détection.....	5
3.1	Hôtes et symptômes	5
3.1.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	5
3.1.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	9
3.2	Extraction du nématode.....	10
3.2.1	Extraction à partir de bulbes ou d'ail.....	10
3.2.2	Extraction à partir de terre ou de matériel végétal	10
4.	Identification.....	11
4.1	Identification morphologique	12
4.1.1	Préparation des spécimens	12
4.1.2	Caractères morphologiques utiles à la diagnose.....	12
4.2	Identification moléculaire	15
4.2.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	16
4.2.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	16
4.2.3	Extraction de l'ADN.....	16
4.2.4	Analyse PCR-PLFR ITS-ARNr pour <i>D. dipsaci</i> et <i>D. destructor</i>	17
4.2.5	Analyse PCR avec marqueur SCAR pour <i>D. dipsaci</i>	17
4.2.6	Analyse PCR 18S et ITS1 spécifique de <i>D. dipsaci</i>	18
4.2.7	Analyse PCR 5.8S ADNr spécifique de <i>D. dipsaci</i>	19
4.2.8	Analyse PCR 5.8S ADNr et ITS spécifique de <i>D. dipsaci</i>	19
4.2.9	Analyse PCR avec marqueur SCAR pour <i>D. dipsaci</i>	20
4.2.10	Témoins employés dans les analyses moléculaires.....	20
4.2.11	Interprétation des résultats de la PCR classique.....	21
5.	Données à conserver	21
6.	Points de contact pour tout complément d'informations.....	21
7.	Remerciements	21

8. Références	22
9. Figures	27

1. Informations relatives à l'organisme nuisible

Les espèces appartenant au vaste genre *Ditylenchus* Filipjev, 1936, sont réparties dans le monde entier et sont, pour la plupart, mycétophages. Cependant, le genre compte aussi un petit nombre d'espèces considérées comme des organismes nuisibles très importants de certains végétaux supérieurs (Sturhan et Brzeski, 1991). Il convient de signaler que certains végétaux (par exemple, la betterave, la luzerne et le trèfle) sont attaqués par *Ditylenchus dipsaci* et par *Ditylenchus destructor*, mais qu'il est rare que les deux espèces soient présentes simultanément sur un même végétal (Andrássy et Farkas, 1988).

1.1 *Ditylenchus dipsaci*

D. dipsaci sensu lato (s.l.), ou nématode des tiges, attaque plus de 1 200 espèces végétales sauvages ou cultivées. Un grand nombre d'adventices et de graminées comptent parmi les hôtes du nématode et sont susceptibles de jouer un rôle important dans sa survie en l'absence de végétaux cultivés. Les analyses morphologiques, biochimiques, moléculaires et caryologiques de différentes populations et races de *D. dipsaci s.l.* ont fait apparaître qu'il s'agissait d'un complexe comprenant au moins 30 «races d'hôtes», ayant chacune une gamme d'hôtes limitée. Jeszke *et al.* (2013) ont scindé ce complexe en deux groupes. Le premier rassemble les populations diploïdes caractérisées par leur taille «normale», qui sont nommées *D. dipsaci sensu stricto (s.s.)*, et il comprend la plupart des populations signalées jusqu'à aujourd'hui. Le deuxième groupe rassemble les polyploïdes et comprend actuellement *Ditylenchus gigas* Vovlas *et al.*, 2011 (*D. dipsaci* dit «race géante» qui parasite *Vicia faba* (fève)); *D. weischeri* Chizhov *et al.*, 2010 (qui parasite *Cirsium arvense* (cirse des champs)); et trois *Ditylenchus* spp. non décrites appelées D, E et F, associées à des espèces végétales des Fabaceae, des Astéraceae et des Plantaginaceae, respectivement (Jeszke *et al.*, 2013). Sur l'ensemble de ces espèces, seules *D. dipsaci s.s.* et la variante morphologiquement plus grande *D. gigas* sont des organismes nuisibles des végétaux d'importance économique. Le présent protocole comprend des informations permettant de distinguer *D. dipsaci s.s.* de *D. gigas*.

D. dipsaci vit essentiellement comme un endoparasite dans les parties aériennes des végétaux (tiges, feuilles et fleurs), mais il attaque aussi les bulbes, les tubercules et les rhizomes. Ce nématode est véhiculé par les semences chez *V. faba*, *Medicago sativa* (luzerne), *Allium cepa* (oignon), *Trifolium* spp. (trèfle), *Dipsacus* spp. (cardère) et *Cucumis melo* (melon) (Sousa *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2005). Une caractéristique particulièrement importante est que les larves du quatrième stade peuvent supporter longtemps, parfois 20 ans voire davantage, la dessiccation (Barker et Lucas, 1984). Ces nématodes dans un état cryptobiotique s'agglutinent pour former des masses laineuses quand le tissu végétal commence à sécher (figure 1). La «laine» peut souvent être observée sur les semences, à l'intérieur des gousses fortement infestées, et sur les débris végétaux secs (par exemple, ceux qui restent dans les champs après la récolte). La présence de larves du quatrième stade infectieuses sur les semences et le matériel végétal sec joue un rôle important dans la dissémination passive du nématode sur de longues distances. Le nématode à l'état sec peut survivre à un passage dans le tube digestif de cochons et de bovins, sur ou dans des semences infectées (Palmisano *et al.*, 1971).

D. dipsaci est considéré comme un organisme nuisible des végétaux supérieurs, cependant, Viglierchio (1971) a signalé qu'une population californienne de *D. dipsaci* d'*Allium sativum* (ail) pouvait se reproduire sur des fungi du sol (*Verticilium* et *Cladosporium*) en conditions de laboratoire.

On sait que *D. dipsaci* peut véhiculer extérieurement des pathogènes bactériens des végétaux (*Clavibacter michiganensis* sous-esp. *insidiosus* (syn. *Clavibacter michiganensis* sous-esp. *insidiosum*, *Corynebacterium insidiosum*), cause du flétrissement bactérien).

Selon l'Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP) (2013a), *D. dipsaci* est présent dans les régions suivantes (hors interceptions): Europe, Asie, Afrique, Amérique du Nord, Amérique centrale et Caraïbes, Amérique du Sud et Océanie.

1.2 *Ditylenchus destructor*

D. destructor, ou nématode de la maladie vermiculaire de la pomme de terre, attaque exclusivement, ou presque, les parties souterraines des végétaux (par exemple, tubercules, rhizomes et parties souterraines identiques à des tiges). L'espèce est quasi cosmopolite, commune dans les régions tempérées et responsable de fortes baisses de production dans les cultures de pommes de terre et de houblon (OEPP, 2013a). La gamme d'hôtes du nématode est vaste, puisqu'elle comprend plus de 90 espèces végétales, dont des plantes ornementales, des végétaux cultivés et des adventices. *Solanum tuberosum* (pomme de terre) est le végétal hôte principal, les tubercules étant envahis par une pourriture humide ou une pourriture sèche qui se dissémine sur les autres tubercules entreposés. Dans certaines conditions, les organismes responsables de la pourriture humide peuvent considérablement endommager les tubercules, mais aussi tuer les nématodes. *D. destructor* ne peut survivre que lorsque le tubercule est envahi par des organismes provoquant une pourriture sèche. Rojankovski et Ciurea (1986) ont dénombré 55 espèces de bactéries et de fungi associées à *D. destructor* dans les tubercules de *S. tuberosum*, les plus communes étant *Fusarium* spp.

Parmi les autres hôtes habituels, on trouve *Ipomoea batatas* (patate douce), les iris bulbeux (hybrides et sélections dérivés de *Iris xiphium* et *Iris xiphioides*), *Taraxacum officinale* (pissenlit), *Humulus lupulus* (houblon), *Tulipa* spp. (tulipe), *Leopoldia comosa* (muscari à toupet), *Hyacinthus orientalis* (jacinthe), *Gladiolus* spp. (glâieul), *Dahlia* spp. (dahlia), *Coronilla varia* et *Anthyllis vulneraria* (vesce), *Beta vulgaris* (betterave à sucre, betterave fourragère et betterave), *Calendula officinalis* (souci), *Daucus carota* (carote), *Petroselinum crispum* (persil) et *Trifolium* spp. (trèfle rouge, trèfle blanc et trèfle hybride) (Sturhan et Brzeski, 1991). En l'absence de végétaux supérieurs, *D. destructor* se reproduit facilement sur le mycélium de quelque 70 espèces de fungi, et l'on sait qu'il peut détruire les hyphes de champignons cultivés (Sturhan et Brzeski, 1991). L'espèce est capable de survivre à la dessiccation et aux basses températures, mais elle ne forme pas de masse laineuse comme le fait *D. dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936. Cependant, elle passe l'hiver sous la forme d'œufs, ce qui fait que ces derniers jouent un rôle plus vital chez *D. destructor* que chez *D. dipsaci*. Dans les plants de pomme de terre et les bulbes de fleurs, *D. destructor* fait partie des organismes nuisibles réglementés dans de nombreux pays (Sturhan et Brzeski, 1991). *D. destructor* a été signalé sur *Arachis hypogaea* (arachide) en Afrique du Sud, mais l'on considère aujourd'hui qu'il s'agit d'une espèce distincte, *Ditylenchus africanus* Wendt, Swart, Vrain et Webster, 1995, proche de *D. destructor* sur les plans morphologique et morphométrique.

Selon l'OEPP (2013a), *D. destructor* est présent dans les régions suivantes (hors interceptions): Europe, Asie, Afrique australe, Amérique du Nord, Amérique du Sud et Océanie.

2. Données taxonomiques

Nom: *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936

Synonymes: Les synonymes de l'espèce type *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 sont énumérés dans Siddiqi (2000)

Classement taxonomique: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Noms communs: Stem nematode, stem and bulb eelworm (anglais) (Sturhan et Brzeski, 1991), nématode des tiges (bulbes) (français)

Note: *D. dipsaci* est aujourd'hui considéré comme un complexe d'espèces composé d'un grand nombre de races et populations biologiques se distinguant principalement par leurs préférences en matière de végétaux hôtes. En conséquence, 13 espèces nominales au total ont été établies comme étant synonymes de *D. dipsaci* et 30 races biologiques ont été différenciées, essentiellement sur la base de leur gamme d'hôtes, et ont généralement été nommées en fonction du végétal hôte principal.

Nom: *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945

Synonymes: Aucun

Classement taxonomique: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Noms communs: Tuber-rot eelworm, potato rot nematode (anglais) (Sturhan et Brzeski, 1991), maladie vermiculaire de la pomme de terre (français)

De Ley et Blaxter (2003) ont élaboré le système de classification le plus récent, en conjuguant les observations morphologiques, les résultats des études morphologiques et l'analyse cladistique.

3. Détection

D. dipsaci et *D. destructor* provoquent tous les deux les symptômes identiques ci-après qui permettent leur détection: gonflement, déformation, coloration anormale et développement chétif des parties aériennes des végétaux et nécrose ou pourriture des bulbes et des tubercules (Thorne, 1945).

Ditylenchus dipsaci

D. dipsaci illustre le principe de l'adaptation parasitaire par son aptitude à envahir le parenchyme solide en provoquant une lyse enzymatique de la couche pectique, ou lamelle moyenne, séparant deux parois cellulaires adjacentes, ce qui aboutit à la séparation et à l'arrondissement des cellules. Ce phénomène explique l'aspect luisant typique ou la texture farineuse des tissus infestés, qui rappelle la chair d'une pomme trop mûre (Southey, 1993).

Selon Vovlas *et al.* (2011), l'infestation de *V. faba* par *D. gigas* (nématode géant des tiges et des bulbes) entraîne le gonflement et la déformation des tissus caulinaires, ou bien des lésions qui virent au brun rougeâtre puis au noir. Dans les cas d'infestations graves, les semences sont sombres, déformées et plus petites que les semences saines et elles présentent des petites taches en surface. Les hôtes autres que *V. faba* sont *Lamium purpureum*, *Lamium album*, *Lamium amplexicaule*, *Ranunculus arvensis*, *Convolvulus arvensis* et *Avena sterilis*.

Ditylenchus destructor

D. destructor attaque généralement les parties souterraines des végétaux (tubercules et stolons de la pomme de terre, rhizomes de la menthe, et racines du houblon et du lilas), entraînant une coloration anormale et un pourrissement des tissus végétaux. Les parties aériennes sont parfois elles-aussi infectées, ce qui entraîne le rabougrissement, l'épaississement et l'ébranchage de la tige et le rabougrissement, l'enroulement et une coloration anormale des feuilles (par exemple, en ce qui concerne la pomme de terre) (Sturhan et Brzeski, 1991). Cependant, le plus souvent, les parties aériennes des végétaux ne présentent aucun symptôme d'infection.

3.1 Hôtes et symptômes

3.1.1 *Ditylenchus dipsaci*

Selon Sturhan et Brzeski (1991), les principaux végétaux hôtes de *D. dipsaci* appartiennent aux familles énumérées ci-après. Gramineae: *Avena sativa* (avoine), *Secale cereale* (seigle), *Zea mays* (maïs), *Triticum aestivum* (blé); Liliaceae: *A. cepa*, *A. sativum*, *Tulipa* spp.; Leguminosae: *M. sativa*, *Vicia* spp., *Pisum sativum*, *Trifolium* spp.; Solanaceae: *S. tuberosum*, *Nicotiana* spp.; Cruciferae: *Brassica campestris*; et Amarilidaceae: *Narcissus* spp. Parmi les autres hôtes, on trouve *D. carota*, *Fragaria* spp. (fraise), *B. vulgaris*, *H. orientalis*, *Allium ampeloprasum* (poireau), *Phlox drummondii*, *Phlox paniculata*, *Dianthus* spp. (œillet), *Apium graveolens* (céleri), *Hydrangea* spp., *Lens culinaris* (lentille), *Brassica napus* (colza), *Petroselinum crispum* et *Helianthus annuus* (tournesol).

Au cours d'une même saison, diverses générations de *D. dipsaci* peuvent se succéder sur un végétal hôte. En cas de mort des parties infectées, du fait des dommages provoqués par l'organisme nuisible, les nématodes abandonnent le végétal hôte avant que celui-ci ne dépérisse complètement. En l'absence de végétaux hôtes, les nématodes peuvent pénétrer dans des végétaux non hôtes et s'y nourrir pendant

un certain temps, mais ne peuvent pas s'y reproduire (Andrássy et Farkas, 1988). Les symptômes les plus fréquents de l'infestation par *D. dipsaci* sont des plants chétifs et chlorosés; des tiges, des pétioles et des fleurs épaissis, étiolés, porteurs de gales et déformés; et, dans les bulbes et les rhizomes, des lésions nécrotiques et une pourriture apparaissant souvent sous la forme d'anneaux bruns quand les bulbes sont tranchés. *D. dipsaci* peut aussi infester les semences, par exemple de *Phaseolus vulgaris* (haricot mange-tout, haricot commun ou haricot vert), *V. faba*, *Allium* spp. et *M. sativa*. En général, les semences de petite taille ne présentent pas de symptômes d'infestation mais les semences plus volumineuses peuvent avoir une peau rétractée parsemée de taches de coloration anormale.

3.1.1.1 Symptômes caractéristiques sur Gramineae

Avena sativa* et *Secale cereale (McDonald et Nicol, 2005). Les feuilles se déforment, les tiges s'épaississent, les talles sont produites en nombre anormal et la plante est petite, buissonnante et chétive. S'agissant des cultures de *S. cereale*, *D. dipsaci* est présent essentiellement dans les sols légers et pauvres en humus et, naturellement, dans les zones où le seigle est produit régulièrement. Les premiers signes d'infestation peuvent être observés dès la fin de l'automne, mais ils sont plus visibles au printemps. La présence dans le champ de seigle de plusieurs plaques de plantes moins développées que les autres signale les dégâts provoqués par l'organisme nuisible. Étant donné que les plants d'*A. sativa* infestés poussent plus lentement, leur couleur verte ressort dans le champ qui blondit. Lorsqu'il est infesté, *T. aestivum* présente les mêmes symptômes que les autres céréales, et il est attaqué par *D. dipsaci* seulement en Europe centrale et orientale (Rivoal et Cook, 1993).

Zea mays est un hôte peu apprécié de *D. dipsaci* mais l'invasion des tissus caulinaires des jeunes plants provoque une nécrose de ces tissus et entraîne la mort des plants de maïs ou leur chute avant la récolte (Rivoal et Cook, 1993). Les feuilles des plants infestés sont craquantes et enroulées comme un tire-bouchon. Les entre-nœuds sont raccourcis, la base des tiges devient creuse, et les plants les plus développés se cassent et versent.

3.1.1.2 Symptômes caractéristiques sur Liliaceae

***Allium cepa*, *Allium sativum* et *Allium cepa* var. *aggregatum* (échalote)**. Chez la plupart des *Allium* spp., une conséquence caractéristique de l'infestation de *D. dipsaci* est la déformation des feuilles et des bulbes (figures 2, 3 et 4). La base des jeunes plants enfle et les feuilles se déforment. Les bulbes infectés plus âgés présentent un gonflement des écailles et des fissures ouvertes qui apparaissent souvent sur le plateau racinaire du bulbe (Potter et Olthof, 1993). *A. cepa* attaqué par *D. dipsaci* prend un aspect givré dû à la dissolution des cellules par le nématode lorsque celui-ci se nourrit (Ferris et Ferris, 1998). Les bulbes infestés tendent à pourrir facilement pendant l'entreposage (Bridge et Hunt, 1986). Les écailles internes du bulbe sont généralement plus fortement attaquées que les écailles externes. Au fur et à mesure que la saison avance, le bulbe devient plus mou et, en coupe transversale, présente un brunissement des écailles en cercles concentriques. En revanche, *D. dipsaci* ne produit pas de déformation des feuilles ou de gonflement chez *A. sativum*, mais provoque le jaunissement et la mort des feuilles (Netscher et Sikora, 1990). Mollov *et al.* (2012) ont signalé pour la première fois *D. dipsaci* chez *A. sativum* au Minnesota, aux États-Unis. Les symptômes sur la partie aérienne des végétaux étaient le développement chétif et la chlorose et, sur les bulbes, la nécrose, un développement insuffisant et une déformation. Sur *Allium* spp., les feuilles peuvent présenter de petites protubérances («spickels») (c'est-à-dire des boursouflures semblables à des cloques sur la surface foliaire). Aucun symptôme n'est observé sur les semences d'*Allium* infesté.

***Tulipa* spp.** (Southey, 1993). Les symptômes d'une attaque de *D. dipsaci* sur tulipe, qu'il s'agisse de la plante en croissance ou du bulbe, sont très différents des symptômes observés sur *Narcissus* spp. En plein champ, c'est à la floraison que l'infestation est la plus facile à détecter. Le premier signe est l'apparition d'une lésion pâle ou violacée sur un côté de la tige, immédiatement au-dessous de la fleur, qui s'incline en direction de la lésion. La lésion grandit, l'épiderme se fond – révélant en-dessous le tissu relâché typique – et les dégâts s'étendent vers le bas et souvent vers le haut jusque sur les pétales. Quand les attaques sont graves, ces lésions se développent vers le bas des tiges à partir des aisselles des feuilles et peuvent provoquer des déformations pendant la croissance. Les infestations commencent à la base des nouveaux bulbes, qui se développent comme des bourgeons latéraux à la

base des anciennes tiges. L'infection est visible et sensible lorsque l'on enlève les écailles brunes externes, car les écailles charnues externes présentent des taches molles grises ou brunes. Les bulbes infectés ne présentent pas d'anneaux bruns comme le font les bulbes de narcisse et de jacinthe.

3.1.1.3 Symptômes caractéristiques sur *Leguminosae*

***Medicago sativa*.** *D. dipsaci* est le plus important nématode nuisible de *M. sativa*. Les sols lourds et les périodes de fortes pluies ou les zones irriguées par asperseurs sont propices aux infestations. La présence de plants blancs («White flagging») due à l'appauvrissement en chlorophylle foliaire est souvent une caractéristique des cultures infestées dans des conditions d'humidité excessive (Griffin, 1985). Dans les champs infestés, on observe fréquemment des plaques irrégulières où les plants sont clairsemés. Les symptômes typiques de l'attaque du nématode sont le gonflement basal, le rabougrissement et la torsion des tiges et des feuilles, le raccourcissement des entre-nœuds et la formation de nombreux bourgeons axillaires entraînant un tallage anormal, qui donne à la plante un aspect buissonnant (McDonald et Nicol, 2005). Parfois, les plants infestés ne se développent pas suffisamment pour permettre la production de foin (Ferris et Ferris, 1998) et, souvent, ne parviennent pas à produire de fleurs (McDonald et Nicol, 2005). *D. dipsaci* prédispose la luzerne aux attaques de *Phytophthora megasperma*. Les dégâts provoqués par *D. dipsaci* sont aggravés par l'invasion d'autres nématodes saprophages (espèces *Rhabditis*, *Cephalobus* et *Panagrolaimus*) sur les végétaux malades et cassés, ce qui accélère aussi la mort de ces derniers (Andrássy et Farkas 1988). Aucun symptôme n'est observé sur les semences de *Medicago* infesté.

Trifolium spp. (Cook et Yeates, 1993). Les symptômes sont très semblables à ceux de *M. sativa* qui viennent d'être décrits, sauf en ce qui concerne le trèfle rouge et le trèfle blanc. L'organisme nuisible envahit le trèfle rouge plus particulièrement par temps pluvieux et frais. De vastes plaques rondes de végétaux malades apparaissent dans le champ; les végétaux sont plus touchés par la maladie à l'intérieur de la plaque, et sont fréquemment flétris en son centre. Les bases des végétaux sont gonflées comme des bulbes et les feuilles sont craquantes, racornies et parcourues de nervures visiblement épaisses. Au moment de l'initiation florale, les futurs bourgeons floraux sont gonflés comme des gales et une gale florale peut contenir à elle seule 5 000 nématodes (Courtney, 1962). Les tiges de trèfle blanc infectées par *D. dipsaci* sont courtes et gonflées, les bourgeons sont en touffes et les parties infestées brunissent en été ou en automne. Les feuilles sont plus étroites que d'habitude mais leurs pétioles sont plus épais et plus courts. Les bourgeons floraux sont gonflés à la base (Andrássy et Farkas, 1988).

3.1.1.4 Symptômes caractéristiques sur *Solanaceae*

***Solanum tuberosum*.** *D. dipsaci* produit une pourriture en forme d'entonnoir qui pénètre plus profondément dans le tubercule que la pourriture superficielle provoquée par *D. destructor*. Les tiges et les feuilles sont envahies par le nématode, ce qui entraîne le développement chétif typique du plant, associé à une importante déformation des tiges et des pétioles (Evans et Trudgill, 1992).

Nicotiana spp. (Johnson, 1998). Les larves infectieuses (quatrième stade) pénètrent dans les feuilles et les tiges des jeunes plants de tabac par temps humide et provoquent la formation de petits renflements jaunes (gales) qui peuvent se répandre jusqu'à 40 cm, voire davantage, au-dessus du sol. Au fur et à mesure que les gales se multiplient, les tissus végétaux commencent à mourir prématurément. Les feuilles des étages inférieurs peuvent tomber et celles des étages supérieurs jaunir. Les gales finissent par pourrir, arrêtant la croissance des plants infectés. Enfin, notamment par temps frais et humide et sur des sols lourds, les tiges malades se rompent et les végétaux versent.

3.1.1.5 Symptômes caractéristiques sur *Cruciferae*

Les plants matures de *B. campestris* attaqués par *D. dipsaci* peuvent développer une grave pourriture du collet.

3.1.1.6 Symptômes caractéristiques sur *Amarilidaceae*

***Narcissus* spp.** (Southey, 1993). Les symptômes typiques sont des boursoufflures jaune pâle semblables à des cloques (spickels) sur les feuilles, et des anneaux concentriques bruns qui peuvent être observés sur les coupes transversales des bulbes (figures 5 et 6). Quand les bulbes sont coupés en longueur, on peut constater que la nécrose a commencé à leur sommet et s'est diffusée vers le bas. Les gonflements sont particulièrement apparents avant la floraison, quand les feuilles sont en plein développement. En cas d'attaque modérée, il est plus facile de sentir les gonflements entre le pouce et l'index que de les voir. Dans les bulbes secs peu touchés par l'attaque de *D. dipsaci*, on peut détecter l'infection en tranchant le bulbe juste en-dessous de son sommet. Un examen attentif lors des premiers stades de l'infestation révèle la présence de zones spongieuses brillantes, où les cellules ont été dissociées. Une nécrose brune ne tarde pas à prendre la suite.

3.1.1.7 Symptômes caractéristiques sur d'autres hôtes

***Fragaria* spp.** *D. dipsaci* est la seule espèce de *Ditylenchus* considérée comme un agent pathogène du fraisier (Brown *et al.*, 1993). Les dégâts qui apparaissent sont des feuilles petites et déformées et des pétioles courts, épais et tordus.

Famille des Asparagaceae, sous-famille des Scilloideae (jacinthes) et autres bulbes (Southey, 1993). Les symptômes sur les bulbes sont les mêmes que chez *Narcissus* spp. mais, en général, aucune boursoufflure distincte n'est visible sur les feuilles. Le feuillage peut présenter des stries jaune pâle, des déformations et, souvent, un léger gonflement. Les bulbes des autres liliacées présentent habituellement les mêmes symptômes que ceux des jacinthes. Les symptômes de l'infestation sur Amaryllidaceae sont identiques à ceux que l'on observe chez *Narcissus* spp.; par exemple, *Galanthus* spp. et *Nerine* spp. présentent des boursoufflures sur les feuilles et des anneaux concentriques bruns dans les bulbes.

Beta vulgaris* et *Daucus carota (Cooke, 1993). Le mode d'alimentation de *D. dipsaci* entraîne la mort du bourgeon central des plants de semis (aboutissant à la formation de multiples collets); les cotylédons et les feuilles peuvent se tordre, gonfler et se déformer; et des gales peuvent se développer sur les feuilles ou les pétioles des plants un peu plus âgés. Plus tard dans la saison, l'alimentation de l'organisme nuisible aux dépens des collets peut provoquer une pourriture connue sous le nom de pourriture du collet. Celle-ci apparaît en premier lieu sous la forme de pustules grisâtres surélevées, généralement parmi les cicatrices foliaires. La pourriture se développe ensuite vers l'extérieur et vers le bas et s'étend sur le dos de la racine de carotte, si bien que le collet se détache quand il est tiré. Chez *D. carota*, il peut exister d'autres symptômes tels que des feuilles étalées et une coloration anormale du sommet de la racine principale. Les symptômes se manifestent principalement sur la racine et la tige de la plante, de 2 à 4 cm au-dessus et en dessous de la surface du sol. Une infestation importante entraîne la mort des feuilles et la pourriture du collet, notamment en automne (figure 7).

***Phlox paniculata* et autres végétaux ornementaux** (Southey, 1993). Sur phlox, les pousses infestées présentent des tiges épaissies et cassantes typiques et des entre-noeuds raccourcis qui ont tendance à se fendre. Une caractéristique unique, propre à cet hôte, est le gaufrage et la réduction du limbe des feuilles supérieures, dont les plus hautes peuvent se réduire à de minces filaments. Parmi les exemples de végétaux signalés comme étant des hôtes qui présentent des malformations pendant la croissance, un gonflement et divers autres symptômes caractéristiques, on trouve les espèces et cultivars suivants: *Anemone*, *Calceolaria*, *Cheiranthus*, *Gypsophila*, *Helenium*, *Heuchera*, *Lychnis*, *Lysimachia* et *Penstemon* (Roberts, 1981). Edwards (1937) a fait état sur *Primula* spp. de symptômes tels que: développement chétif, malformation foliaire, pourriture et coulure (échec de la floraison). Les végétaux ligneux sont rarement attaqués, mais *Hydrangea* peut être infestée par *D. dipsaci*, qui provoque une déformation des pousses non ligneuses, un gonflement des pétioles et des nervures principales et un gaufrage prononcé des limbes. Les feuilles gaufrées constituent généralement le premier signe de l'infection. Une autre plante ligneuse, *Yucca smaliana*, présente une déformation des feuilles et des boursoufflures semblables à des cloques.

3.1.2 *Ditylenchus destructor*

Selon Sturhan et Brzeski (1991), *D. destructor* parasite essentiellement les tubercules (par exemple, pomme de terre et dahlia), les bulbes (par exemple, iris bulbeux, tulipe et glaïeul) et les végétaux cultivés pour leurs racines (par exemple, betterave à sucre et carotte). Il est capable de détruire les hyphes d'*Agaricus hortensis* (champignon cultivé). Parmi les autres hôtes, il faut citer *I. batatas*, *A. sativum*, *P. vulgaris*, *Angelica sinensis* (angélique chinoise «dong quai» ou «ginseng de la femme»), *Panax ginseng* (ginseng), *Taraxacum officinale*, *Begonia* spp. et les bulbes d'*Erytronium denscanis* (érythron dent-de-chien, lis dent-de-chien).

***Solanum tuberosum* et *Dahlia* spp.** Aucun symptôme n'est visible pendant la période de croissance. Le nématode pénètre habituellement dans les tubercules de pomme de terre par les stolons. La plupart des nématodes se trouvent sur la limite entre les parties qui brunissent et les parties non endommagées. Si un petit échantillon de cette zone du tubercule est prélevé et placé dans l'eau, la masse de minuscules nématodes est visible même avec une simple loupe. Les premiers symptômes de l'infection de *D. destructor* sont de petites taches blanches, crayeuses ou de couleur pâle qui peuvent être observées juste en-dessous de la peau du tubercule (Brodie, 1998). Ensuite, ces taches grandissent et s'assombrissent (en passant par le gris et le brun foncé avant de devenir noires), et acquièrent une texture spongieuse (figure 8). Il s'agit essentiellement des conséquences de l'invasion secondaire par des bactéries, des fungi et des nématodes saprophytes (Brodie, 1998). Sur les tubercules fortement infestés, il y a des zones légèrement déprimées typiques, avec une peau craquelée, ridée et papyracée. La peau n'est pas attaquée, mais elle devient fine et craquante tandis que les tissus sous-jacents sèchent et se rétractent (Brodie, 1998). Enfin, il peut arriver que des tubercules entiers se momifient. Ces tubercules flottent dans l'eau (figure 9). Par comparaison, la peau de *S. tuberosum* infesté par *D. dipsaci* n'est généralement pas craquelée. Les nématodes continuent à se reproduire dans les tubercules après la récolte et peuvent parfois pulluler. Les symptômes sont susceptibles d'être plus visibles après l'entreposage. Les tubercules infestés sont généralement touchés par des infections secondaires de fungi, de bactéries et de nématodes libres.

***Beta vulgaris*.** L'infestation se traduit par des lésions nécrotiques sombres sur les racines et les rhizomes. Dallimore et Thorne (1951) ont signalé des symptômes identiques à ceux de la pourriture du collet. Dans le cas des betteraves à sucre, outre une baisse de rendement, la teneur en sucre sera réduite.

***Daucus carota*.** L'infestation entraîne le fendillement transversal de la peau de la carotte et la formation de taches blanches dans le tissu cortical. Le déclenchement d'infections secondaires par des fungi et des bactéries dans ces zones peut aussi provoquer un phénomène de putréfaction. Ces dégâts sont facilement observables sur une section transversale de la carotte. Le nématode poursuit son activité destructrice pendant l'entreposage hivernal et les carottes deviennent impropres à la consommation.

***Iris* spp. et *Tulipa* spp.** (Southey, 1993). L'infestation se manifeste par des marques linéaires grisâtres qui remontent sur les écailles charnues externes à partir du plateau racinaire. Au fur et à mesure de la progression de l'infestation, les dégâts s'étendent, pénètrent dans les tissus du bulbe et entraînent un pourrissement secondaire fibreux et sec qui aboutit à l'effondrement du bulbe. Des anneaux concentriques bruns sont visibles sur la coupe transversale des bulbes infestés. Le jaunissement et le dépérissement du feuillage constituent des symptômes secondaires dus à l'altération du bulbe, puis à l'arrêt du fonctionnement des racines.

L'infestation par *D. destructor* de bulbes de variétés ornementales de *Liatris spicata* («Gayflower», «Blazing Star» ou «Button Snakeroot») entreposés au froid en Afrique du Sud s'est manifestée par une pourriture noirâtre et par la présence de nématodes vivants, à différents stades de développement, dans le tissu situé à proximité des parties putréfiées (Van der Vegte et Daiber, 1983).

3.2 Extraction du nématode

3.2.1 Extraction à partir de bulbes ou d'ail

Pour extraire les nématodes, les écailles infectées des bulbes (écailles internes essentiellement) ou les caïeux d'ail sont coupés en petits morceaux et sont placés dans un conteneur (par exemple, une boîte de Pétri) avec de l'eau du robinet à température ambiante. Pour l'obtention d'une suspension claire, les morceaux peuvent être déposés sur un support consistant en un tamis à mailles de 200 à 250 µm recouvert d'un papier filtre (technique de la boîte d'Oostenbrink). Après 1 heure au moins, on peut observer les nématodes avec une loupe binoculaire (au moins 40× de grossissement).

3.2.2 Extraction à partir de terre ou de matériel végétal

La méthode de l'entonnoir de Baermann constitue une technique de référence en ce qui concerne l'extraction de nématodes à partir de terre ou de matériel végétal (bulbes, racines, épluchures de pomme de terre et semences). Un entonnoir est équipé à l'extrémité de son tube d'un tuyau en caoutchouc fermé par une pince de serrage à ressort ou à vis. L'entonnoir est placé sur un support et est rempli quasiment à ras bord d'eau du robinet. La terre ou le tissu végétal coupé en petits morceaux est placé dans une mousseline ou du papier absorbant, qui est ensuite replié pour enfermer le matériel puis est délicatement immergé dans l'eau de l'entonnoir. Les nématodes actifs passent à travers le tissu ou le papier et tombent au fond du tube de l'entonnoir. Après un délai de quelques heures, ou le lendemain, une petite quantité d'eau contenant les nématodes est relâchée et observée au microscope (Flegg et Hooper, 1970).

Une variante de la technique consiste à remplacer l'entonnoir par une boîte. Les agrégats de terre sont émiettés et les cailloux et débris végétaux éliminés. La terre (50 ml) est répandue régulièrement sur un cercle de papier absorbant simple épaisseur, placé sur un tamis en plastique à larges mailles posé dans un conteneur en plastique. De l'eau est versée dans le conteneur jusqu'à ce que toute la terre soit humide mais non immergée. Le conteneur est recouvert d'un couvercle de grande boîte de Petri pour limiter l'évaporation de l'eau. Ce dispositif est laissé en place pendant au moins 24 heures, après quoi la terre est jetée et la suspension de nématodes est versée du conteneur dans une boîte pour être examinée à l'aide d'un microscope à dissection. La terre peut être remplacée par du tissu végétal finement haché (Kleynhans, 1997).

La technique de brumisation de Seinhorst applicable aux bulbes et aux racines diffère de la méthode de l'entonnoir de Baermann dans la mesure où la sève des végétaux et les produits de la décomposition toxique sont lavés. Cette technique est à utiliser de préférence à la méthode de l'entonnoir de Baermann lorsque l'on examine des végétaux tels que *Narcissus* spp. Avec cette méthode, on place un entonnoir de Baermann ou une boîte d'Oostenbrink dans un brouillard ou une brume d'eau afin d'éviter le manque d'oxygène. Le brouillard est produit par des asperseurs qui diffusent de l'eau sur le matériel végétal ou en l'air afin que les gouttelettes retombent doucement sur le matériel végétal. Les nématodes vivants quittent le tissu végétal et sont entraînés dans l'entonnoir ou le filtre, où ils se déposent. Les nématodes sont recueillis une fois toutes les 24 à 48 heures dans un bécher en verre. Pour ce faire, on ouvre la pince de serrage à vis située en bas du tube de l'entonnoir ou en recueillant les spécimens sur un tamis à mailles de 20 à 25 µm. L'extraction peut se poursuivre pendant quatre semaines au maximum. Cette technique est décrite par Hooper (1986).

Une autre méthode d'extraction de *Ditylenchus* spp. à partir de matériel végétal a été adaptée d'une description d'Oliveira *et al.* (2013). Le matériel végétal est coupé en morceaux de 1 cm qui sont déposés dans des récipients de 500 ml remplis d'eau du robinet. Deux trous sont percés dans les couvercles de ces récipients, l'un qui communique avec le tube d'une pompe pour aquarium et l'autre qui tient lieu d'évent. Pendant 72 heures, le matériel est aéré en permanence par la pompe. La suspension obtenue est versée sur un tamis à mailles de 1 000 µm pour permettre l'élimination des débris végétaux, puis un tamis à mailles de 38 µm pour permettre l'extraction des nématodes de la suspension. Cette méthode, qui assure l'aération de la suspension, évite le pourrissement du matériel végétal, de sorte que la prolifération des agents bactériens et fongiques qui en sont responsables est très réduite et un grand nombre de nématodes restent vivants. L'agitation produite par l'aération de la

suspension contenant le matériel végétal permet de déloger davantage de nématodes du tissu racinaire et favorise une estimation nettement plus précise du degré d'infestation.

Les nématodes peuvent aussi être extraits à partir de matériel végétal par la méthode de Coolen et D'Herde (1972). Le matériel végétal est lavé, coupé en morceaux de 0,5 cm environ, et des portions de 5 g sont mises à macérer dans 50 ml d'eau du robinet à l'intérieur d'un mélangeur ménager réglé à la vitesse minimale pendant 1 minute. L'inconvénient de cette méthode est que les grands spécimens de nématodes, notamment les spécimens adultes de *D. dipsaci*, peuvent être coupés en morceaux dans le mélangeur. La suspension de nématodes et de fragments de tissu est filtrée sur un tamis à mailles de 750 µm placé au-dessus d'un tamis à mailles de 45 µm. Le résidu sur le tamis à mailles de 45 µm est recueilli et placé dans deux tubes de 50 ml pour centrifugeuse. Une quantité approximative de 1 ml de kaolin est ajoutée dans chaque tube, le mélange est soigneusement agité puis centrifugé à 3 000 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant est décanté et une solution de sucrose (de densité 1,13 g/cm³) est ajoutée dans les tubes. Le mélange est soigneusement agité puis centrifugé à 1 750 tours/minute pendant 1 minute. Le surnageant est filtré sur un tamis à mailles de 45 µm, le résidu est recueilli et les nématodes sont examinés.

L'analyse de légumes secs et autres légumineuses aux fins de la détection de *D. dipsaci* est une procédure en deux étapes, à savoir: 1) le trempage d'une certaine quantité de semences dans de l'eau aérée, pendant toute une nuit, et 2) l'extraction à partir d'une portion de semences ayant subi le trempage, par brumisation pendant trois jours. La présence de nématodes dans l'eau de trempage et dans l'extrait de brouillard est déterminée au moyen d'un tamisage des fractions aqueuses provenant de chacune des deux étapes, suivi d'une observation microscopique pour identification. Le processus demande environ sept jours, mais il peut être ramené à trois jours si l'on élimine la deuxième étape (c'est-à-dire l'extraction par brumisation). La procédure modifiée consiste à faire tremper les légumes secs toute une nuit dans de l'eau aérée, puis à procéder à un tamisage et à une observation microscopique pour identification.

Pour extraire des nématodes à partir de terre, la méthode ci-après peut être utilisée (d'après Kleynhans, 1997). La terre (250 ml) est filtrée sur un tamis à larges mailles (2 mm) posé sur un seau de 5 litres. De l'eau du robinet est ajoutée pour obtenir un volume de 5 litres. La suspension est brassée, puis laissée à reposer 30 secondes avant d'être filtrée sur un tamis à mailles de 45 µm. La procédure est répétée deux fois avec le sol contenu dans le seau, mais le temps de repos est ramené à 20 secondes puis à 10 secondes. Le résidu déposé sur le tamis à mailles de 45 µm est transféré dans des tubes de 50 ml pour centrifugeuse. Si la solution dans les tubes est très sableuse, on peut y ajouter 5 ml de kaolin (et mélanger soigneusement) pour favoriser le dépôt des nématodes. Les tubes sont centrifugés à 1 750 tours/minute pendant 7 minutes. Le surnageant est décanté dans chaque tube puis jeté. Une solution de sucre (450 g/litre d'eau) est versée dans les tubes et le mélange de sucre et de terre est soigneusement secoué avant d'être centrifugé encore une fois à 1 750 tours/minute pendant 3 minutes. Le surnageant est filtré sur un tamis à mailles de 45 µm et le résidu qui contient les nématodes est recueilli dans un bécher pour examen. Il s'agit d'une technique élémentaire et, en fonction de la compétence du technicien et du type de sol, jusqu'à 40 pour cent des nématodes peuvent être perdus. Les autres méthodes susceptibles d'être employées pour extraire des nématodes à partir de terre sont la technique de Cobb modifiée par Flegg et la méthode de l'élutriateur d'Oostenbrink (OEPP, 2013c). Hooper *et al.* (2005) décrivent différentes méthodes d'extraction qui sont adaptées à la taille, à la densité et à la mobilité des nématodes.

4. Identification

L'identification morphologique de *Ditylenchus* spp. s'applique seulement aux spécimens adultes et repose de préférence sur l'examen, à la fois de mâles et de femelles d'une espèce de nématode donnée, avec un microscope à fort grossissement. Des lames bien montées devraient permettre d'identifier avec certitude les spécimens adultes de *D. dipsaci* et de *D. destructor*, par simple examen morphologique. L'identification morphologique de larves de *Ditylenchus* dans un échantillon ne devrait être utilisée que pour confirmer la présence de l'espèce dans l'échantillon. Étant donné que des *Ditylenchus* spp. mycophages contaminent fréquemment le matériel végétal en putréfaction, il faut être attentif à ce

risque d'erreur lors de l'identification des spécimens, que ce soit dans les échantillons végétaux ou dans les échantillons de terre.

4.1 Identification morphologique

L'identification de *D. dipsaci* et de *D. destructor* devrait de préférence être fondée sur des méthodes morphologiques. Les méthodes moléculaires mises au point pour identifier ces espèces peuvent être utilisées lorsque le niveau d'infestation est faible ou lorsque seules des larves sont présentes. Les méthodes moléculaires peuvent être appliquées à des adultes endommagés ou atypiques, ainsi qu'à tous les stades de développement, notamment les stades larvaires, qui ne se prêtent pas à une identification morphologique.

4.1.1 Préparation des spécimens

Les montages temporaires permettant, soit une identification rapide, soit une étude des caractéristiques plus faciles à observer chez des spécimens non fixés, sont préparés comme suit (Kleynhans, 1997):

- Des spécimens vivants sont transférés dans une petite goutte d'eau sur une lame en verre.
- La lame est brièvement chauffée sur une lampe à alcool, en même temps que l'on contrôle fréquemment l'activité des nématodes. Le chauffage devrait cesser dès que les spécimens cessent de se mouvoir.
- Une lamelle est appliquée et scellée au moyen de la pose d'un vernis à ongles sur le contour. Quand le vernis est sec, la lame portant les spécimens est prête à être examinée.

Pour la microscopie optique, les nématodes vivants sont extraits de la terre ou du matériel végétal, tués par une chaleur modérée (65–70 °C), fixés dans de l'alcool formolé acétique (fixateur AFA) (35% d'eau distillée, 10% de formol à 40%, 5% d'acide acétique glacial, 50% d'alcool à 95%) (Andrássy, 1984), transférés dans du glycérol (Hooper *et al.*, 2005) et montés dans de la glycérine anhydre entre deux lamelles couvre-objet selon la description de Seinhorst (1959) et Goodey (1963).

Lorsque l'identification est faite au moyen de la microscopie optique, un grossissement de 500× à 1 000× (objectif à immersion dans l'huile) associé à une microscopie à contraste d'interférence différentielle est recommandé.

4.1.2 Caractères morphologiques utiles à la diagnose

Les clés d'identification applicables aux espèces *Ditylenchus* peuvent être consultées dans Viscardi et Brzeski (1993) et Brzeski (1998). Une clé permettant de distinguer *Ditylenchus* spp. des autres genres de Tylenchida et Aphélenchida est présentée dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1. Clé permettant de distinguer *Ditylenchus* spp. des autres genres de Tylenchida et Aphélenchida

1	Orifice de la glande pharyngienne dorsale situé près de la base du stylet; bulbe médian arrondi, ovoïde ou absent	Tylenchida – 2
	Orifice de la glande pharyngienne dorsale situé dans le bulbe médian; bulbe médian, très visible, généralement oblong	Aphélenchida
2	Partie antérieure de l'œsophage (procorpus) et bulbe médian non fusionnés en une seule unité; stylet jamais exceptionnellement long	3
	Procorpus s'élargissant progressivement et fusionné avec le bulbe médian; stylet très long, dont la base est souvent située dans la partie antérieure du bulbe médian	Autres genres
3	Femelle adulte vermiforme	4

	La femelle adulte est un parasite sessile sacciforme ou pyriforme sur les racines	Autres genres
4	Bulbe médian valvulaire	5
	Bulbe médian sans valve ¹	Autres genres
5	Glandes pharyngiennes contenues à l'intérieur du bulbe basal, ne se superposant pas ou se superposant légèrement à l'intestin; armature céphalique rarement visible; stylet faible à modérément fort	6
	Glandes pharyngiennes en lobe, se superposant à l'intestin; armature céphalique forte; stylet massif	Autres genres
6	Un seul ovaire prodelphe; vulve en position postérieure	7
	Deux ovaires, amphidelphes; vulve en position légèrement post-équatoriale	Autres genres
7	Femelle non renflée; chez la femelle, glande utérine «crustaformia» en quadricolumelle formée de quatre rangées de quatre cellules chacune; chez le mâle, bourse enveloppant au moins un tiers de la queue	<i>Ditylenchus</i>
	Femelle renflée; crustaformia formée de plus de 20 cellules	Autres genres

Source: Adapté de Heyns (1971) et Siddiqi (2000).

¹ Quelques espèces de *Ditylenchus* qui ne parasitent pas les végétaux n'ont pas de bulbe médian valvulaire.

D. africanus, *D. destructor*, *D. dipsaci*, *D. gigas* et *D. myceliophagus* sont identiques sur les plans morphologique et morphométrique, mais peuvent être distingués les uns des autres par les caractères ci-après (tableau 2), sous réserve que l'on puisse mesurer et examiner à la fois des mâles et des femelles.

4.1.2.1 Description de *Ditylenchus dipsaci*

D'après Sturhan et Brzeski (1991), Wendt *et al.* (1995) et Brzeski (1998). On trouvera des informations et des illustrations dans la figure 10.

Mesures (critères décrits dans OEPP (2013b)). (*Ex* Avoine, *Avena sativa* L., d'après Blake, 1962, dans Hooper, 1972.) ($n = 48 \text{♀}$): $L = 1,3 \text{ mm} \pm 0,009$; $a = 62 \pm 5,6$; $b = 15 \pm 1,4$; $c = 14 \pm 2,1$; $V = 80 \pm 1,5$. ($n = 23 \text{♂}$): $L = 1,3 \text{ mm} \pm 0,017$; $a = 63 \pm 11,3$; $b = 15 \pm 1,7$; $c = 14 \pm 2,1$; $T = 72$.

Morphologie générale. Corps au repos droit ou quasiment droit. Champ latéral à quatre incisures. Tête dans le prolongement de la partie adjacente du corps sans solution de continuité (figure 10B). Stylet long de 10 à 13 μm chez la femelle, de 10 à 12 μm chez le mâle. Cône du stylet haut comme la moitié environ de la longueur du stylet, boutons arrondis et bien développés. Bulbe médian musculaire, avec des renflements des parois du lumen de 4 à 5 μm de long (figure 10A). Bulbe basal décalé ou se superposant à l'intestin sur quelques micromètres. Pore excréteur à l'opposé de la partie postérieure de l'isthme ou du bulbe glandulaire. Partie post-vulvaire du sac utérin occupant la moitié environ, ou légèrement plus, de la distance vulve–anus (figure 10D). Chez le mâle, la bourse enveloppe les trois quarts de la queue. Spicules de 23 à 28 μm de long. Chez les individus des deux sexes, queue conique à extrémité pointue.

Caractères morphologiques utiles à la diagnose. Le nombre d'incisures latérales (quatre) (figure 10F), le stylet comparativement long, la longueur du sac postvulvaire et la queue à extrémité pointue

(figure 10D) constituent les caractères distinctifs de cette espèce (Andrássy, 2007). *D. dipsaci* peut être distingué de *D. gigas* par le fait que le corps des femelles est plus court (1,0–1,7 contre 1,6–2,2 mm) et que la distance vulve–anus est plus longue (202–266 contre 132–188 µm) (Vovlas *et al.*, 2011). En vue latérale, le spicule est plus incurvé chez *D. dipsaci* que chez *D. destructor* (figure 10C). Voir Karssen et Willemsen (2010) pour tout complément d'informations sur le spiculum et son utilisation pour l'identification de *D. dipsaci* et *D. destructor*. Il convient de noter que la semence de *V. faba* contient principalement des larves au quatrième stade.

4.1.2.2 Description de *Ditylenchus destructor*

D'après Sturhan et Brzeski (1991) et Brzeski (1998). On trouvera des informations et des illustrations à la figure 11.

Mesures (d'après Goodey, 1952, sur divers végétaux supérieurs hôtes). ($n = 237$ ♀♀): L = 1,07 (0,69–1,89) mm; a = 32 (18–49); b = 7 (4–12); c = 17 (9–30); V = 80 (73–90). ($n = 231$ ♂♂): L = 0,96 (0,76–1,35) mm; a = 35 (24–50); b = 7 (4–11); c = 14 (11–21); T = 65 (40–84).

Morphologie générale. Les adultes de *D. destructor* sont de minuscules animaux vermiformes de 0,8 à 1,4 mm de long, 23 à 47 µm de large et légèrement arqués ventralement. Chez l'adulte, des variations morphométriques considérables existent selon le végétal hôte et l'âge. L'aspect général des mâles et des femelles est analogue. Le champ latéral présente six incisures (figure 11F), qui se réduisent à deux dans les régions du cou et de la queue. Cuticule et tête finement annelés, tête souvent plus étroite que la partie voisine du corps, environ quatre anneaux peuvent être discernés sur la tête par microscopie électronique à balayage (Wendt *et al.*, 1995). Stylet de 10 à 12 µm de long, mais des spécimens porteurs de stylets de 14 µm ont été décrits à l'occasion. Cône du stylet haut comme 45 à 50 pour cent de la longueur du stylet, boutons distincts, arrondis et penchés en arrière. Bulbe médian musculaire, avec des renflements des parois du lumen (ou valve) d'environ 3 µm de long. Le bulbe postérieur se superpose à l'intestin sur une courte distance du côté dorsal du corps, mais des spécimens présentant un bulbe glandulaire décalé peuvent être observés à l'occasion (figure 11A). Pore excréteur à l'opposé des glandes œsophagiennes. Sac postvulvaire s'étendant sur les trois quarts environ de la distance vulve–anus (figure 11E). Œufs deux fois plus longs que larges (Andrássy, 2007). Lèvres de la vulve épaisses et saillantes (figure 11B). Ovaire antérieur étiré, atteignant parfois la région de l'œsophage. Partie postvulvaire du sac utérin égale à 40 à 98 pour cent de la distance vulve–anus, et ne fonctionnant pas comme une spermathèque (figure 11E). Chez le mâle, la bourse entoure la queue sur 50 à 90 pour cent de sa longueur. Spicules de 24 à 27 µm de long. La forme du spiculum de *D. dipsaci* est différente de celle de *D. destructor* car, chez ce dernier, il y a un tumulus ventral dans la zone du calomus (Figure 12) (Karssen et Willemsen, 2010). Testicule étiré allant quasiment jusqu'à la base de l'œsophage. Chez les individus des deux sexes, queue conique, longue de trois à cinq fois la largeur du corps au niveau de l'anus, généralement incurvée ventralement et à extrémité arrondie.

Caractères morphologiques utiles à la diagnose. *D. destructor* est analogue à *D. dipsaci*, mais s'en distingue par le champ latéral qui présente six incisures (figure 11F), le sac postvulvaire plus long et l'extrémité de la queue finement arrondie (figure 11D). Sur le plan morphologique, *D. destructor* se distingue de *D. africanus* essentiellement par la longueur du stylet, même si les fourchettes de longueur peuvent se superposer légèrement, et par la longueur du spicule, ce qui signifie que des mâles doivent être présents dans la population. Étant donné que la technologie fondée sur la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est suffisamment sensible pour mettre en évidence des différences entre des genres étroitement apparentés, Wendt *et al.* (1995) ont utilisé les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (PLFR) pour distinguer *D. destructor* de *D. africanus*. En vue latérale, le spicule est moins incurvé chez *D. dipsaci* que chez *D. destructor* (figure 11C).

Observations. Les caractères décrits ci-dessus peuvent varier et il est quasiment impossible d'identifier l'espèce à partir d'un spécimen unique. Il est recommandé d'examiner au moins un mâle et une femelle. Chez le mâle, par exemple, les incisures peuvent à l'occasion se réduire à quatre près de la queue et présenter un aspect semblable à celui de *D. dipsaci*.

Tableau 2. Comparaison des caractéristiques de *Ditylenchus africanus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus gigas* et *Ditylenchus myceliophagus* utiles à la diagnose.

Caractères	<i>D. destructor</i> (d'après Hooper, 1973)	<i>D. africanus</i> (d'après Wendt <i>et al.</i> , 1995)	<i>D. myceliophagus</i> (d'après Hesling, 1974)	<i>D. gigas</i> (d'après Vovlas <i>et al.</i> , 2011)	<i>D. dipsaci</i> (d'après Hooper, 1972)
Longueur du corps chez la femelle (mm)	0,8–1,9	0,7–1,1	0,6–1,4	1,6–2,2	1,0–1,7
Nombre de lignes latérales	6	6–15	6	4	4
Forme de l'extrémité de la queue	Arrondie	Arrondie	Arrondie	Pointue à finement arrondie	Pointue
c (longueur du corps/longueur de la queue) chez la femelle	14–20	8,8–16,9	8,2–17	15,7–27,6	11–20
Bulbe postérieur	Court, se superposant dorsalement	Court, se superposant dorsalement	Court, se superposant dorsalement	Se superposant légèrement	Ne se superposant pas
Longueur du stylet (μm) chez la femelle	10–14	8–10	7–8	10,5–13,0	10–12
PUS/distance vulve– anus (pourcentage) ¹	53–90	37–85	30–69	Environ 50 ²	40–70
Longueur du spiculum (μm)	24–27	17–21	15–20	23,5–28	23–28
Longueur de la bourse (en pourcentage de la longueur de la queue)	50–70	48–66	20–55	72–76	40–70
Préférences en matière d'hôtes ³	Végétaux supérieurs et mycélium de fungi	Arachides et fungi	Mycélium de fungi	Végétaux supérieurs	Végétaux supérieurs et fungi

¹ PUS, partie postvulvaire du sac utérin.² Valeur calculée à partir de la description de l'espèce.³ Caractéristique utile en cas de critères morphologiques non probants.

4.2 Identification moléculaire

S'il y a lieu, il est possible de procéder à une identification moléculaire des espèces *D. dipsaci* ou *D. destructor*, notamment lorsque des espèces trompeuses sont susceptibles d'être présentes (par exemple, *D. myceliophagus*, *D. africanus* ou *D. gigas*) et que l'observation morphologique ne permet pas de les distinguer avec certitude de l'espèce ciblée.

Dans ce cas, la solution contenant les spécimens de nématodes devrait de préférence être conservée au froid (c'est-à-dire être réfrigérée), mais pas plus de quelques jours, avant l'extraction de l'ADN.

Dans le présent protocole de diagnose, les méthodes (et notamment la mention des noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et/ou reproductibilité initialement obtenus. L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnose n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

4.2.1 *Ditylenchus dipsaci*

Diverses approches moléculaires de l'identification de *D. dipsaci* ont été mises au point.

L'hybridation de Southern (Wendt *et al.*, 1993) et l'électrophorèse (Tenente et Evans, 1997; Palazova et Baicheva, 2002) ont été employées pour étudier le concept de races au sein de l'espèce *D. dipsaci* et la diversité génétique parmi les espèces de *Ditylenchus*.

Les approches moléculaires ont également été examinées de manière approfondie, que ce soit à des fins d'identification spécifique, essentiellement par PCR ou PCR-PLFR, ou à des fins de détection de variations dans les populations, par analyse de séquences (Leal-Bertioli *et al.*, 2000; Zouhar *et al.*, 2002).

Six analyses moléculaires (PCR, PCR-PLFR) publiées peuvent être employées pour identifier *D. dipsaci*; elles sont décrites dans les sections 4.2.4 à 4.2.9. La spécificité de chaque analyse est précisée dans la description, de même que le genre et l'espèce du nématode qui a servi à évaluer chacune des analyses.

L'analyse moléculaire de séquences de l'ADN ribosomique (ADNr), en particulier certaines régions (la région de l'espace intergénique transcrit (ITS)1-5.8S-ITS2, le fragment D2–D3 du gène *s8S*, la petite sous-unité 18S, le gène mitochondrial partiel du *cytochrome c oxidase I* (ADN mitochondrial (ADNmt)) et les séquences du gène *hsp90* (ADN nucléaire (ADNn)), permet de distinguer clairement *D. gigas* de *D. dipsaci* s.s. (Vovlas *et al.*, 2011).

4.2.2 *Ditylenchus destructor*

La diagnose moléculaire de *D. destructor* repose sur une analyse PCR-PLFR ou le séquençage de la région ITS du gène de l'ARNr.

Wendt *et al.* (1993) ont montré que l'analyse PCR-PLFR de la région ITS permettait de distinguer *D. destructor* parasitant la pomme de terre de deux races de *D. dipsaci* et de *D. myceliophagus*. Ils ont publié les profils PLFR servant à la diagnose de ces trois espèces. *D. africanus* peut être distingué de *D. destructor* par une combinaison des caractères suivants: PLFR générés par sept enzymes de restriction sur la région ITS de l'ADNr.

Ji *et al.* (2006) ont obtenu les profils PLFR de plusieurs populations de *D. destructor* prélevées sur patate douce et ont mis en évidence des différences dans leurs profils PLFR.

Powers *et al.* (2001) ont séquencé pour la première fois la région ITS1 chez *D. dipsaci*, mais on trouve actuellement dans la base de données GenBank plus de 50 entrées correspondant à des séquences de fragments d'ARNr de *D. destructor* recueillis en différents lieux et sur différents végétaux hôtes.

4.2.3 Extraction de l'ADN

On transfère dans un microtube plusieurs larves ou adultes pour en extraire l'ADN. L'extraction de l'ADN est décrite par Webster *et al.* (1990).

4.2.4 Analyse PCR-PLFR ITS-ARNr pour *D. dipsaci* et *D. destructor*

Cette analyse a été mise au point par Wendt *et al.* (1993).

Méthode

Les amorces universelles de l'ITS ARNr (décrites dans Vrain *et al.* (1992)) employées dans l'analyse sont les suivantes:

18S: 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'

26S: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'

Les amplicons mesurent 900 paires de bases (pb) lorsqu'il s'agit de *D. dipsaci* et *D. myceliophagus*, et 1 200 pb lorsqu'il s'agit de *D. destructor*.

On obtient l'amplification en suivant les recommandations du fabricant de kits PCR contenant la Taq ADN polymérase, les nucléotides et le tampon de réaction.

Les paramètres du thermocyclage PCR¹ sont les suivants: un premier cycle de 1,5 minute à 96 °C, 30 secondes à 50 °C et 4 minutes à 72 °C; 40 cycles de 45 secondes à 96 °C, 30 secondes à 50 °C et 4 minutes à 72 °C suivis d'un cycle final de 45 secondes à 96 °C, 30 secondes à 50 °C et 10 minutes à 72 °C. À l'issue de l'amplification de l'ADN, on prélève 2–5 µl du produit pour le faire migrer sur du gel d'agarose à 1%. Le reste est conservé à –20 °C pour être employé dans l'analyse PLFR. Il faut utiliser plusieurs enzymes de restriction pour distinguer *D. destructor* et *D. dipsaci* d'autres espèces de *Ditylenchus*; par exemple, *HaeIII*, *HpaII*, *HinfI* et *RsaI* (Wendt *et al.*, 1993). Les longueurs des fragments de restriction générés par ces enzymes utiles à la diagnose figurent dans le tableau 3.

Tableau 3. Longueur approximative (pb) des fragments PLFR de l'ITS-ARNr d'espèces de *Ditylenchus*, générés par quatre enzymes de restriction

Enzyme	<i>D. destructor</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. gigas</i> ¹	<i>D. africanus</i>
Produit de la PCR avant restriction	1 200	900	900	900	1 000
<i>HaeIII</i>	450, 170	450, 200	900	800, 200	650, 540
<i>HpaII</i>	1 000	900	320, 200, 180	600, 200	950
<i>HinfI</i>	780, 180	630, 310	440, 350, 150	350, 150	450, 340, 150, 130, 100
<i>RsaI</i>	600, 250, 170	900	450, 250, 140	490, 450	690, 450

Source: Wendt *et al.* (1993, 1995).

pb, paire de bases; ITS, espaceur intergénique transcrit; PCR, amplification en chaîne par polymérase; PLFR, polymorphisme de longueur des fragments de restriction; ARNr, ARN ribosomique.

¹ Appelé dans la publication d'origine *D. dipsaci* race géante.

4.2.5 Analyse PCR avec marqueur SCAR pour *D. dipsaci*

Cette analyse PCR d'une région amplifiée de séquence caractérisée (marqueur SCAR), mise au point par Esquibet *et al.* (2003), a été conçue comme une analyse spécifique d'espèce, permettant d'identifier *D. dipsaci* et de différencier la race normale et la race géante. Elle a été évaluée avec *D. myceliophagus* (une population), la race normale de *D. dipsaci* (11 populations provenant de

¹ Les paramètres du thermocyclage PCR sont les paramètres décrits dans l'article d'origine (Wendt *et al.*, 1993). L'amélioration des thermocycleurs et des réactifs pour PCR peut conduire à la révision de ces paramètres .

différents lieux et différents végétaux hôtes) et *D. dipsaci* race géante, décrite sous le nom de *D. gigas* par Vovlas *et al.* (2011) (11 populations provenant de différents lieux et isolées sur *V. faba*).

Méthode

Les amorces spécifiques de *D. dipsaci* qui sont employées sont les suivantes:

D. dipsaci (race normale):

H05: 5'-TCA AGG TAA TCT TTT TCC CCA CT-3'

H06: 5'-CAACTG CTA ATG CGT GCT CT-3'

D. dipsaci (race géante, décrite sous le nom de *D. gigas* par Vovlas *et al.* (2011)):

D09: 5'-CAA AGT GTT TGA TCG ACT GGA-3'

D10: 5'-CAT CCC AAA ACA AAG AAA GG-3'

La taille de l'amplicon est approximativement égale à 242 pb s'agissant de *D. dipsaci* (race normale) et 198 pb s'agissant de *D. dipsaci* (race géante). Aucune amplification n'est observée quand l'un ou l'autre couple d'amorces est utilisé avec des espèces ou des races non ciblées (Esquibet *et al.*, 2003).

Le mélange de réaction pour la PCR (10 µl) est composé comme suit: 1,5 mM de MgCl₂, 250 µM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dNTP), 690 nM de chaque amorce pour la PCR duplex (H05-H06) ou (D09-D10), ou bien 500 nM de chaque amorce pour la PCR multiplex (H05-H06-D09-D10) et 0,5 U de Taq ADN polymérase. Les paramètres du thermocyclage sont les suivants: une dénaturation initiale de 3 minutes à 94 °C; 30 cycles de 1 minute à 94 °C, 1 minute à 59 °C et 1 minute à 72 °C suivis d'une phase finale d'élongation de 10 minutes à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

4.2.6 Analyse PCR 18S et ITS1 spécifique de *D. dipsaci*

Cette analyse mise au point par Subbotin *et al.* (2005) a été conçue comme une analyse spécifique d'espèce, permettant d'identifier *D. dipsaci* s.s. (race normale seulement). Elle a été évaluée avec *D. destructor* (une population), *D. dipsaci* race normale (18 populations provenant de différents végétaux hôtes et différents lieux) et *Ditylenchus* sp. (12 populations provenant de différents lieux et différents végétaux hôtes).

Méthode

Les amorces spécifiques de *D. dipsaci* qui sont employées sont les suivantes:

ADNr2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

DitNF1: 5'-TTA TGA CAA ATT CAT GGC GG-3'

La taille de l'amplicon est approximativement égale à 263 pb s'agissant de *D. dipsaci* s.s. (la race géante, appelée par la suite *D. gigas*, est exclue). Aucune amplification n'est observée avec les espèces non ciblées.

Le mélange de réaction pour la PCR (25 µl) est composé comme suit: 1× prélevé de tampon PCR 10× contenant 15 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP, 60 nM de chaque amorce et 1 U de Taq ADN polymérase. La PCR est réalisée dans un thermocycleur 96 puits à effet Peltier (PTC100, MJ Research²) réglé selon les paramètres suivants: cycle initial de 4 minutes à 94 °C; 35 cycles de

² Dans le présent protocole de diagnose, les méthodes (et notamment la mention des noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et/ou reproductibilité initialement obtenus. L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnose n'implique aucune approbation de ceux-ci à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate .

15 secondes à 94 °C, 30 secondes à 57 °C et 30 secondes à 72 °C suivis d'une phase finale d'élongation de 10 minutes à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

4.2.7 Analyse PCR 5.8S ADNr spécifique de *D. dipsaci*

Cette analyse mise au point par Marek *et al.* (2005) a été conçue comme une analyse spécifique d'espèce, permettant d'identifier *D. dipsaci*. Elle a été évaluée avec *D. dipsaci* (trois populations européennes provenant de différents végétaux hôtes) et des populations de genres non visés (*Globodera pallida*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Rhabditis* spp.).

Méthode

Deux couples d'amorces spécifiques ont été mis au point pour identifier *D. dipsaci*, mais le plus sensible (10 picogrammes (pg) d'ADN cible détectés) est le suivant:

PF1: 5'-AAC GGC TCT GTT GGC TTC TAT-3'

PR1: 5'-ATT TAC GAC CCT GAG CCA GAT-3'

La taille de l'amplicon obtenu avec ce couple d'amorces est d'environ 327 pb s'agissant de *D. dipsaci*.

Le mélange de réaction pour la PCR (25 µl) est composé comme suit: tampon Taq 1×, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 10 pmol de chaque amorce (couple d'amorces PF1-PR1) et 1,5 U de Taq ADN polymérase (Fermentas²). L'analyse PCR a été mise au point avec un thermocycleur 96 puits à effet Peltier (PTC200, MJ Research²) réglé selon les paramètres suivants: 3 minutes à 94 °C; 30 cycles de 2 minutes à 94 °C, 30 secondes à 62 °C et 2 minutes à 72 °C suivis d'une phase finale d'élongation de 10 minutes à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

4.2.8 Analyse PCR 5.8S ADNr et ITS spécifique de *D. dipsaci*

Cette analyse mise au point par Kerkoud *et al.* (2007) a été conçue comme une analyse spécifique d'espèce, permettant d'identifier *D. dipsaci*. Elle a été évaluée avec *D. dipsaci* (dix populations provenant de différents végétaux hôtes et différents lieux), *D. africanus*, *D. destructor*, *D. myceliophagus*, *Aphelenchoides ritzemabosi* (une population de chaque espèce) et *Ditylenchus* sp. (selon le document mais l'espèce est aujourd'hui décrite sous le nom de *D. gigas*) (dix populations provenant de différents lieux et isolées sur *V. faba*).

Méthode

Deux couples d'amorces spécifiques sont employés, l'un pour identifier seulement *D. dipsaci* et l'autre pour identifier *D. gigas* et *D. dipsaci*. L'emploi des deux couples d'amorces permet de séparer *D. gigas* de *D. dipsaci*. Les amorces sont les suivantes:

Premier couple d'amorces:

DdpS1: 5'-TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3'

ADNr2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

La taille de l'amplicon est d'environ 517 pb s'agissant de *D. dipsaci*. Aucun amplicon n'est observé avec les espèces non ciblées, notamment *D. gigas*.

Deuxième couple d'amorces:

DdpS2: 5'-CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT-3'

ADNr2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

La taille de l'amplicon est d'environ 707 pb s'agissant de *D. dipsaci* et *D. gigas*.

Le mélange de réaction pour la PCR (20 µl) est composé comme suit: 1,5 mM de tampon d'amplification avec une concentration finale de MgCl₂ de 5 mM, 200 µM de chaque dNTP, 0,5 µM de chaque amorce (dans la PCR simplex avec DdpS1-ADNr2 ou DdpS2-ADNr2; dans la PCR duplex, la concentration finale de l'amorce DdpS1 est de 0,5 µM, alors que celles de DdpS2 et ADNr2 sont de 1 µM) et 1 U de Taq ADN polymérase (MP Biomedicals²). La PCR a été mise au point dans un thermocycleur 96 puits à effet Peltier (GeneAmp 9600 PCR System, Perkin Elmer²) réglé selon les paramètres suivants: 1 minute à 94 °C; 40 cycles de 30 secondes à 94 °C, 30 secondes à 60 °C et 45 secondes à 72 °C suivis d'une phase finale d'élongation de 10 minutes à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

4.2.9 Analyse PCR avec marqueur SCAR pour *D. dipsaci*

Cette analyse PCR avec marqueur SCAR mise au point par Zouhar *et al.* (2007) a été conçue comme une analyse spécifique d'espèce, permettant d'identifier *D. dipsaci*. Elle a été évaluée seulement avec *D. dipsaci* (dix populations européennes provenant de différents végétaux hôtes).

Méthode

Deux couples d'amorces spécifiques ont été conçus pour identifier *D. dipsaci*:

Premier couple d'amorces:

DIT_2 sens: 5'-GCA ATG CAC AGG TGG ATA AAG-3'

DIT_2 antisens: 5'-CTG TCT GTG ATT TCA CGG TAG AC-3'

La taille de l'amplicon obtenu avec ce couple d'amorces est d'environ 325 pb s'agissant de *D. dipsaci*.

Deuxième couple d'amorces:

DIT_5 sens: 5'-GAA AAC CAA AGA GGC CGT AAC-3'

DIT_5 antisens: 5'-ACC TGA TTC TGT ACG GTG CAA-3'

La taille de l'amplicon obtenu avec ce couple d'amorces est d'environ 245 pb s'agissant de *D. dipsaci*.

Le mélange de réaction pour la PCR (25 µl) est composé comme suit: tampon PCR 1× (Fermentas²), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 10 pmol de chaque amorce (du couple DIT_2 ou DIT_5), 1,5 U de Taq ADN polymérase (Fermentas²) et 50 ng d'ADN matrice. La PCR est réalisée dans un thermocycleur 96 puits à effet Peltier (PTC200, MJ Research²), avec les paramètres suivants: 3 minutes à 94 °C; 30 cycles de 1 minute à 94 °C, 30 secondes à 60 °C et 1 minute à 72 °C suivis d'une phase finale d'élongation de 10 minutes à 72 °C. Les produits de la PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

4.2.10 Témoins employés dans les analyses moléculaires

Pour que les résultats des analyses soient considérés comme fiables, des témoins adaptés – qui dépendront du type d'analyse réalisée et du degré de certitude requis – devraient être intégrés dans chaque série d'isolements d'acide nucléique et d'amplifications d'acide nucléique de l'organisme nuisible ciblé ou de l'acide nucléique ciblé. Un acide nucléique témoin positif, un témoin d'amplification négatif et un témoin d'extraction négatif sont, au minimum, les témoins qui devraient être employés.

Acide nucléique témoin positif. Ce témoin sert à contrôler l'efficacité de l'amplification (sans tenir compte de l'extraction). On peut employer de l'acide nucléique déjà préparé (stocké) du nématode ciblé.

Témoin d'amplification négatif («no template control»). Ce témoin doit être utilisé dans toute PCR classique pour écarter les faux positifs dus à une contamination pendant la préparation du mélange de réaction. L'eau de qualité PCR qui a été utilisée dans le mélange de réaction est ajoutée à l'étape de l'amplification.

Témoin d'extraction négatif. Ce témoin sert à détecter une contamination pendant l'extraction de l'acide nucléique. Le témoin comprend l'extraction d'acide nucléique puis l'amplification du tampon d'extraction seulement. Il est recommandé d'employer de multiples témoins quand on s'attend à ce qu'un grand nombre d'échantillons soient positifs.

4.2.11 Interprétation des résultats de la PCR classique

La PCR spécifique d'un agent pathogène sera jugée valide seulement si les deux critères suivants sont remplis:

- Le témoin positif produit un amplicon de la taille correcte, c'est-à-dire correspondant à l'espèce de nématode ciblée
- Aucun amplicon de la taille correcte, correspondant à l'espèce de nématode ciblée, n'est produit avec le témoin d'extraction négatif et le témoin d'amplification négatif.

5. Données à conserver

Les données et les éléments à consigner et à conserver sont énumérés dans la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Lorsque les résultats du diagnostic peuvent porter préjudice à d'autres parties contractantes, les données et les éléments probants (par exemple, spécimens conservés ou montés sur lames, photographies de caractères morphologiques distinctifs, extraits d'ADN et photographies de gels, selon le cas) devraient être conservés pendant au moins un an.

6. Points de contact pour tout complément d'informations

Un complément d'informations sur le présent protocole peut être obtenu auprès des organismes suivants:

Biosystematics Division, ARC-PPRI, Private Bag X134, Queenswood, 0121 République d'Afrique du Sud (Antoinette Swart; courriel: SwartA@arc.agric.za).

Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, États-Unis (Sergei Subbotin; courriel: subbotin@ucr.edu).

Charlottetown Laboratory – Potato Diseases, Canadian Food Inspection Agency, 93 Mount Edward Rd, Charlottetown PEI, C1A 5T1, Canada (Harvinder Bennypaul; courriel: bennypaulhs@inspection.gc.ca).

Une demande de révision d'un protocole de diagnose peut être présentée par les organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), les organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) ou les organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) par l'intermédiaire du Secrétariat de la CIPV (ippc@fao.org), qui la communique au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic.

7. Remerciements

Le présent protocole a été élaboré par Antoinette Swart (Nematology Unit, Biosystematics Division, ARC-PPRI, République d'Afrique du Sud), Eliseo Jorge Chaves (INTA-Estación Experimental de Balcarce, Laboratorio de Nematología, Argentine) et Renata C.V. Tenente (EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnología, Brésil).

Les techniques moléculaires ont été décrites par Sergei Subbotin (Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, États-Unis).

Les nématologistes dont les noms sont énumérés ci-après ont contribué à améliorer le protocole par leurs observations:

- Harvinder Bennypaul (Canadian Food Inspection Agency, Canada)

- Johannes Hallmann (Julius Kühn-Institut, Allemagne)
- Mikhail Pridannikov (Center of Parasitology, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russie)
- P. Castillo (Instituto Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Espagne).

8. Références

Le présent Protocole de diagnostic fait également référence aux Normes Internationales pour les Mesures Phytosanitaires (NIMP). Les NIMP sont publiées sur le Portail International Phytosanitaire, à la page: <https://www.ippc.int/fr/core-activities/standards-setting/ispms/>.

- Andrássy, I.** 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). In *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, pp. 24–25. Stuttgart (Allemagne), Gustav Fischer Verlag. 509 pp.
- Andrássy, I.** 2007. Free-living nematodes of Hungary (Nematoda Errantia) II. In *Pedazoologica Hungarica No. 4*, pp. 145–154. Budapest, Hungarian Natural History Museum and Systematic Zoology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences. 496 pp.
- Andrássy, I. et Farkas, K.** 1988. *Kertészeti növények fonálféreg kártevői*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó. pp. 181–198. 418 pp.
- Barker, J.R. et Lucas, G.B.** 1984. Nematode parasites of tobacco. In W.R. Nickle, (sous la direction de). *Plant and insect nematodes*, pp. 213–242. New York, Marcel Dekker Inc. 925 pp.
- Bridge, J. et Hunt, D.** 1986. Nematodes. In *Pest control in tropical onions*, pp. 65–77. Londres, Tropical Development and Research Institute and Office of Overseas Development Administration, Tropical Development and Research Institute. 109 pp.
- Brodie, B.B.** 1998. Potato. In K.R. Barker, G.A. Pederson et G.L. Windham, (sous la direction de) *Plant and nematode interactions*, pp. 567–594. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Brown, D.J.F., Dalmasso, A. et Trudgill, D.L.** 1993. Nematode pests of soft fruits and vines. In K. Evans, D.L. Trudgill et J.M. Webster, (sous la direction de) *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 427–462. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 656 pp.
- Brzeski, M.W.** 1998. *Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe*. Varsovie, Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences. 397 pp.
- Chizhov, V.N., Borisov, B.A. et Subbotin, S.A.** 2010. A new stem nematode, *Ditylenchus weischeri* sp.n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of *Cirsium arvense* (L) Scop. in the Central Region of the Non-Chernozem Zone of Russia. *Russian Journal of Nematology*, 18: 95–102.
- Cook, R. et Yeates, G.W.** 1993. Nematode pests of grassland and forage crops. In K. Evans, D.L. Trudgill et J.M. Webster, (sous la direction de) *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 305–350. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 656 pp.
- Cooke, D.** 1993. Nematode parasites of sugarbeet. In K. Evans, D.L. Trudgill et J.M. Webster, (sous la direction de) *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 133–169. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 656 pages.
- Coolen, W.A. et D'Herde, C.J.** 1972. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*. Gand (Belgique), Ministry of Agriculture, State Agricultural Research Centre. 77 pp.
- Courtney, W.D.** 1962. Stem nematode of red clover in the Pacific Northwest. *Bulletin of the Washington State Agricultural Experiment Station*, 640: 1–17.
- Dallimore, C.E. et Thorne, G.** 1951. Infection of sugar beets by *Ditylenchus destructor* Thorne, the potato rot nematode. *Phytopathology*, 41: 872–874.

- De Ley, P. et Blaxter, M.** 2003. A new system for Nematoda: Combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematological Monographs and Perspectives*, 2: 1–21.
- Edwards, E.E.** 1937. On the eelworm disease of primulas caused by *Anguillula dipsaci*, Kühn. *Journal of Helminthology*, 15: 221–232.
- Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Andaloussi, F.A. et Caubel, G.** 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: Development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome*, 46: 1077–1083.
- Evans, K. et Trudgill, D.L.** 1992. Pest aspects of potato production Part 1. The nematode pests of potato. In P.M. Harris, (sous la direction de) *The potato crop*, 2^e édition, pp. 438–475. London, Chapman and Hall. 909 pp.
- Ferris, J.M. et Ferris, V.R.** 1998. Biology of plant parasitic nematodes. In K.R. Barker, G.A. Pederson et G.L. Windham, (sous la direction de) *Plant and nematode interactions*, pp. 21–36. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Filipjev, I.N.** 1936. On the classification of the Tylenchinae. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 3: 80–82.
- Flegg, J.J.M. et Hooper, D.J.** 1970. Extraction of free-living stages from soil. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, Technical Bulletin 2, pp. 5–22. Londres, Ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation. 148 pages.
- Goodey, J.B.** 1952. The influence of the host on the dimensions of the plant parasitic nematode, *Ditylenchus destructor*. *Annals of Applied Biology*, 30: 468–474.
- Goodey, J.B.** 1963. *Soil and freshwater nematodes*. Harpenden (Royaume-Uni), Nematology Department, Rothamsted Experimental Station, et Londres, Methuen et Co. Ltd. 544 pp.
- Griffin, G.D.** 1985. Nematode parasites of alfalfa, cereals and grasses. In W.R. Nickle, (sous la direction de) *Plant and insect nematodes*, pp. 243–322. New York, Marcel Dekker Inc. 925 pp.
- Hesling, J.J.** 1974. *Ditylenchus myceliophagus*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 3, No. 36. St Albans (Royaume-Uni), Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 pages.
- Heyns, J.** 1971. A guide to the plant and soil nematodes of South Africa. Cape Town, A.A. Balkema. 233 pp.
- Hooper, D.J.** 1972. *Ditylenchus dipsaci*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 1, No. 14. St Albans (Royaume-Uni), Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) 4 pp.
- Hooper, D.J.** 1973. *Ditylenchus destructor*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 2, No. 21. St Albans (Royaume-Uni), Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) 4 pp.
- Hooper, D.J.** 1986. Extraction of nematodes from plant tissue. In J.F. Southey, (sous la direction de) *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, Reference Book 402, 6^e édition, pp. 51–58. Londres, Ministère de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation. 202 pp.
- Hooper, D.J., Hallmann, J. et Subbotin, S.A.** 2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In M. Luc, R.A. Sikora et J. Bridge, (sous la direction de). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2^e édition, pp. 53–86. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 871 pp.
- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. et Obrepalska-Stęplowska, A.** 2013. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland. (Brève communication.) *Journal of Phytopathology*, 162: 61–67.
- Ji, L., Wang, J.C., Yang, X.L., Huang, G.M. et Lin, M.S.** 2006. [PCR-RFLP patterns for differentiation of three *Ditylenchus* species.] *Journal of Nanjing Agricultural University*, 29: 39–43 (en chinois).
- Johnson, C.S.** 1998. Tobacco. In K.R. Barker, G.A. Pederson et G.L. Windham, (sous la direction de). *Plant and nematode interactions*, pp. 487–522. Madison, WI, American Society of

- Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Karssen, G. et Willemsen, N.M.** 2010. The spiculum: An additional useful character for the identification of *Ditylenchus dipsaci* and *D. destructor* (Nematoda: Anguinidae). *Bulletin OEPP* 40: 211–212.
- Kerkoud, M., Esquibet, M. et Plantard, O.** 2007. Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 323–332.
- Kleynhans, K.P.N.** 1997. *Collecting and preserving nematodes*. A manual for a practical course in nematology by SAFRINET, the southern African (SADC) LOOP of BioNET-INTERNATIONAL, ARC. Pretoria, Plant Protection Research Institute. 52 pages.
- Kühn, J.** 1857. Über das Vorkommen von Anguillulen in erkrankten Blütenköpfen von *Dipsacus fullonum* L. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 9: 129–137.
- Leal-Bertioli, S.C.M., Tenente, R.C.V. et Bertioli, D.J.** 2000. ITS sequence of populations of the plant-parasitic nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologia Brasileira*, 24: 83–85.
- Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P. et Havranek, P.** 2005. Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia*, 42: 49–56.
- McDonald, A.H. et Nicol, J.M.** 2005. Nematode parasites of cereals. In M. Luc, R.A. Sikora et J. Bridge, (sous la direction de). *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*, 2^e édition, pp. 131–192. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 896 pp.
- Molloy, D.S., Subbotin, S.A. et Rosen, C.** 2012. First report of *Ditylenchus dipsaci* on garlic in Minnesota. *Plant Disease*, 96: 1707.
- Nemapix.** 1999. J.D. Eisenback et U. Zunke, (sous la direction de). *A journal of nematological images*, Vol. 2. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- Nemapix.** 2000. J.D. Eisenback et U. Zunke, (sous la direction de). *A journal of nematological images*, Vol. 1, 2^e édition. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- Nemapix.** 2002. J.D. Eisenback et U. Zunke, (sous la direction de). *A journal of nematological images*, Vol. 3. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- Netscher, C. et Sikora, J.W.** 1990. Nematodes in vegetables. In M. Luc, R.A. Sikora et J. Bridge, (sous la direction de). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2^e édition, pp. 237–283, Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 896 pp.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2013a. PQR: EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. Available at <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm>
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2013b. *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. Document technique de l'OEPP n° 1056 (Rev. 4). En ligne à l'adresse http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf.
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2013c. Extraction des nématodes. Norme OEPP PM 7/119(1). *Bulletin OEPP*, 43: 471–485.
- Oliveira, R.D.L., Santin, Â.M., Seni, D.J., Dietrich, A., Salazar, L.A., Subbotin, S.A., Mundo-Ocampo, M., Goldenberg, R. et Barreto, R.W.** 2013. *Ditylenchus gallaeformans* sp.n. (Tylenchida: Anguinidae): A neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomataceae. *Nematology*, 15: 179–196.
- Palazova, G. et Baicheva, O.** 2002. Electrophoretic studies of *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 from two hosts: *Allium sativum* and *Allium cepa*. *Experimental Pathology and Parasitology*, 5: 39–40.

- Palmisano, A.M., Tacconi, R. et Trotti, G.C.** 1971. Sopravvivenza di *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev Nematoda: tylenchidae) al processo digestivo nei suini, equini e bovini. *Redia*, 52: 725–737.
- Potter, J.W. et Olthof, T.H.A.** 1993. Nematode pests of vegetable crops. In K. Evans, D.L. Trudgill et J.M. Webster, (sous la direction de). *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 171–208. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 656 pp.
- Powers, T.O., Szalanski, A.L., Mullin, P.G., Harris, T.S., Bertozzi, T. et Griesbach, J.A.** 2001. Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology*, 33: 191–194.
- Rivoal, R. et Cook, R.** 1993. Nematode pests of cereals. In K. Evans, D.L. Trudgill et J.M. Webster, (sous la direction de). *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 259–304. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 656 pp.
- Roberts, H.** 1981. New or unusual host-plant records for plant-parasitic nematodes, 1977–80. *Plant Pathology*, 30: 182.
- Rojankovski, E. et Ciurea, A.** 1986. Contributions to the study of interactions between the potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* Thorne, and fungi in the potato disease complex. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 22: 101–106.
- Seinhorst, J.W.** 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67–69.
- Siddiqi, M.R.** 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2^e édition. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 864 pp.
- Sikora, R.A., Greco, N. et Silva, J.F.V.** 2005. Nematode parasites of food legumes. In M. Luc, R.A. Sikora et J. Bridge, (sous la direction de). *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*, 2^e édition, pp. 259–318. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 896 pp.
- Sousa, A.I., Gomes, V.F. et Tenente, R.C.V.** 2003. Tratamento físico aplicado as sementes de melao (*Cucumis melo* L.), importadas da Holanda, na erradicação de *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936. *Nematologia Brasileira*, 27: 223–225.
- Southey, J.F.** 1993. Nematodes of ornamental and bulb crops. In K. Evans, D.L. Trudgill et J.M. Webster, (sous la direction de). *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 463–500. Wallingford (Royaume-Uni), CAB International. 656 pp.
- Sturhan, D. et Brzeski, M.W.** 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In W.R. Nickle, (sous la direction de). *Manual of Agricultural Nematology*, pp. 423–464. New York, Marcel Dekker Inc. 1064 pp.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D. et Moens, M.** 2005. Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the ITS-rDNA. *Phytopathology*, 95: 1308–1315.
- Tenente, R.C.V. et Evans, A.A.F.** 1997. Electrophoresis of proteins from several races of *Ditylenchus dipsaci* recovered from dried infested courgette tissue. *Nematologia Brasileira*, 21: 84–91.
- Thorne, G.** 1945. *Ditylenchus destructor*, n. sp., the potato rot nematode, and *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936, the teasel nematode (Nematoda: Tylenchidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 12: 27–33.
- Van der Vegte, F.A. et Daiber, K.C.** 1983. A preliminary report on the occurrence of *Ditylenchus destructor* on the ornamental *Liatris spicata* and efforts to eradicate the former. *Proceedings of the 6th Symposium and General Meeting of the Nematological Society of Southern Africa*.
- Vigliierchio, D.R.** 1971. Race genesis in *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica*, 17: 386–392.
- Viscardi, T. & Brzeski, M.W.** 1993. DITYL: Computerized key for species identification of *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Fundamental and Applied Nematology*, 16: 389–392.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J.E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B.B., Subbotin, S.A. et Castillo, P.** 2011. *Ditylenchus gigas* n.sp. parasitizing broad bean: A new stem

- nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology*, 60: 762–775.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, A.C., Levesque, A.C. et Hamilton, R.I.** 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 563–573.
- Webster, J.M., Anderson, R.V., Baillie, D.L., Beckenbach, K., Curran, J. et Rutherford, T.** 1990. DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. *Revue de Nématologie*, 13: 255–263.
- Wendt, K.R., Swart, A., Vrain, T.C. et Webster, J.M.** 1995. *Ditylenchus africanus* sp.n. from South Africa: A morphological and molecular characterization. *Fundamental and Applied Nematology*, 18: 241–250.
- Wendt, K.R., Vrain, T.C. et Webster, J.M.** 1993. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology*, 25: 555–563.
- Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J. et Ryšánek, P.** 2007. Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plant hosts. *Plant Soil and Environment*, 53: 97–104.
- Zouhar, M., Marek, M., Licinio, J. et Ryšánek, P.** 2002. Using point mutations in rDNA for differentiation of biotypes of *Ditylenchus dipsaci* from the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 38 (Special 2): 358–360.

9. Figures



Figure 1. Semence de *Vicia faba* infectée par *Ditylenchus dipsaci* (la «laine» de nématodes est bien visible).
Photo: avec l'aimable autorisation de G. Caubel, Nemapix (1999).



Figure 2. *Allium sativum* infecté par *Ditylenchus dipsaci*.
Photo: avec l'aimable autorisation de G. Caubel, Nemapix (1999).



Figure 3. Jeunes plants d'*Allium cepa* infectés par *Ditylenchus dipsaci*.

Photo: avec l'aimable autorisation de E. Hennig, State Plant Health and Seed Inspection Service, Torun, Pologne.



Figure 4. Bulbe d'ail infecté par *Ditylenchus dipsaci*.
Photo: avec l'aimable autorisation de G. Caubel, Nemapix (2002).



Figure 5. *Narcissus* spp. infectées par *Ditylenchus dipsaci*.
Photo: avec l'aimable autorisation de G. Caubel, Nemapix (1999).

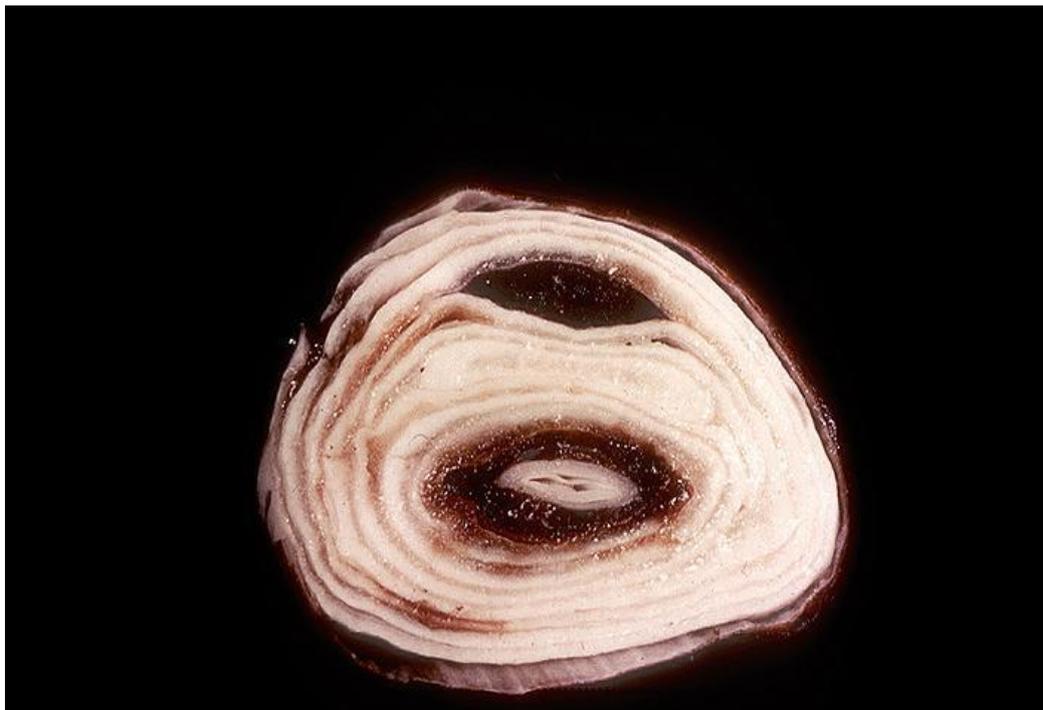


Figure 6. Coupe transversale de bulbe de *Narcissus* sp. infecté par *Ditylenchus dipsaci*.
Photo: avec l'aimable autorisation de C.W. Laughlin, Nemapix (2002).

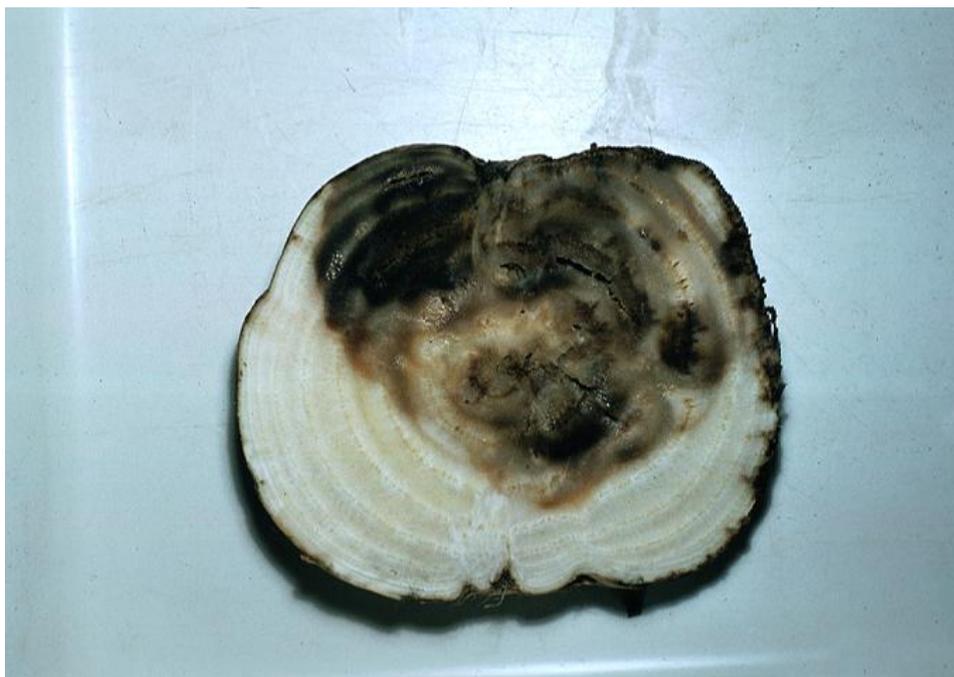


Figure 7. Coupe transversale de betterave sucrière infectée par *Ditylenchus dipsaci*.
Photo: avec l'aimable autorisation de C. Hogger, Nemapix (1999).



Figure 8. Coupe transversale de pomme de terre saine et de pomme de terre infectée par *Ditylenchus destructor*.
 Photo: avec l'aimable autorisation de S. Ayoub, Nemapix (2000).

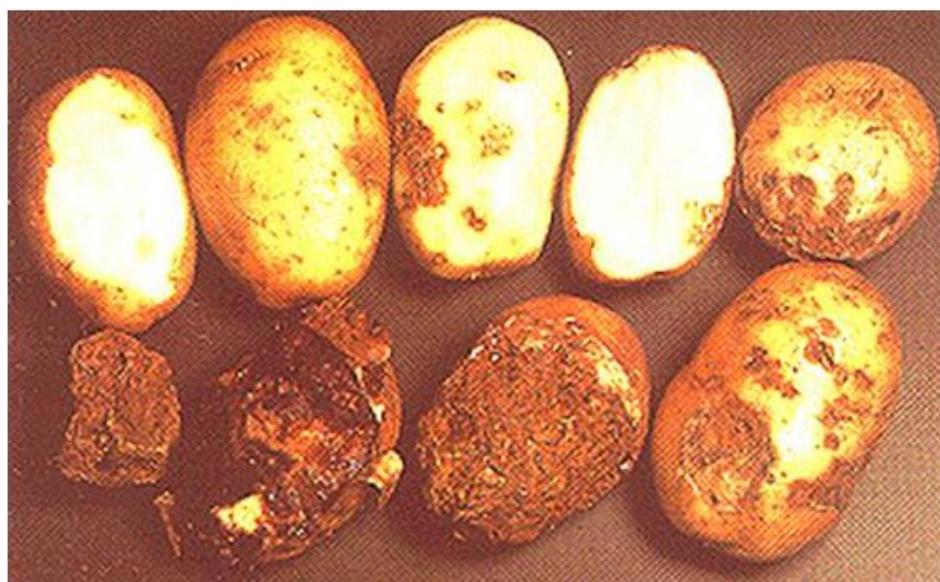


Figure 9. Pommes de terre à divers stades d'infestation par *Ditylenchus destructor*.
 Photo: avec l'aimable autorisation de H. Andersen.

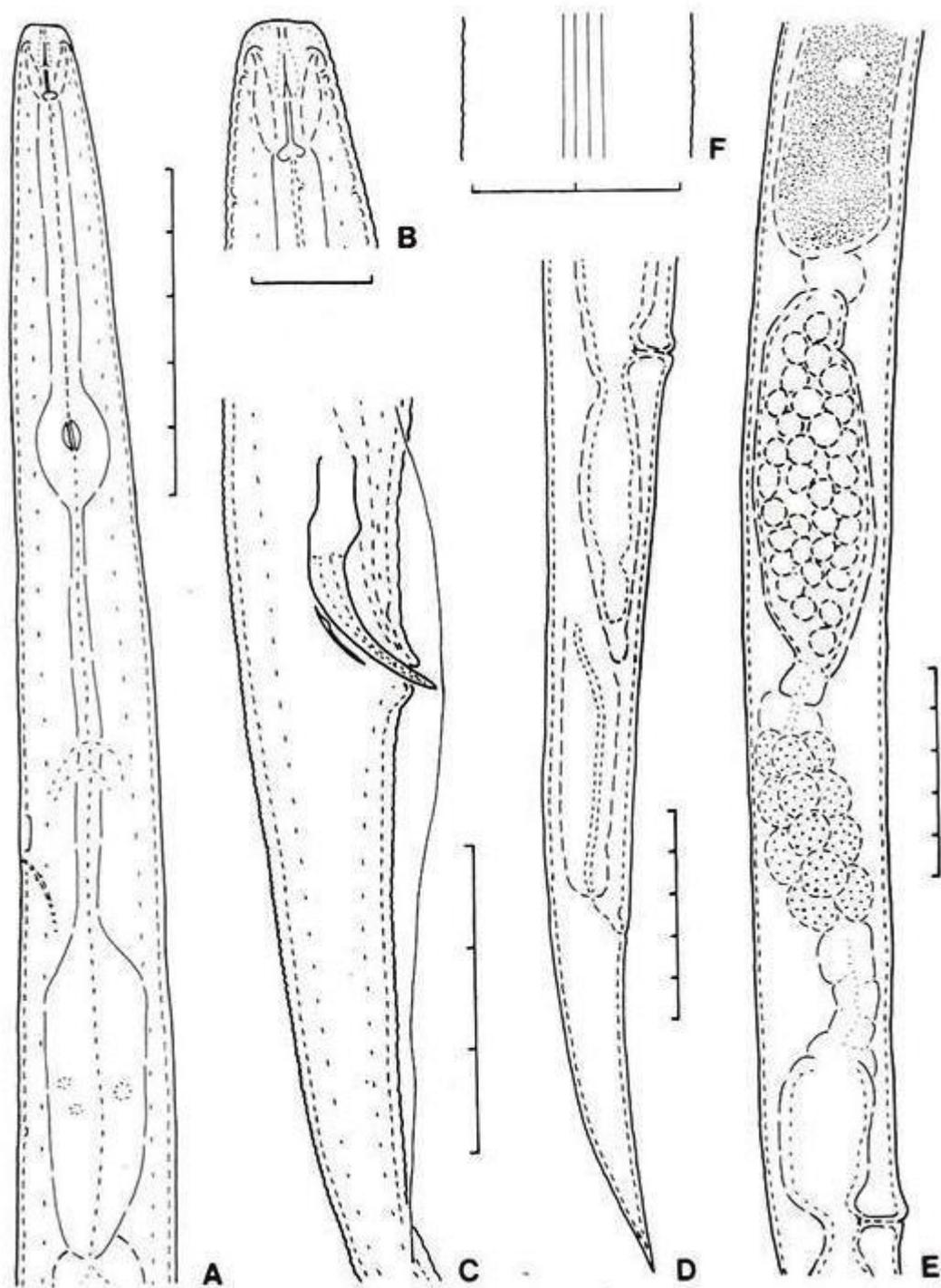


Figure 10 *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 (d'après Sturhan et Brzeski, 1991). A) femelle, région œsophagienne; B) femelle, tête; C) mâle, région du spicule; D) femelle, région postérieure; E) femelle, partie du système reproducteur; F) champ latéral au niveau du milieu du corps. Une unité sur l'une ou l'autre échelle = 10 µm.

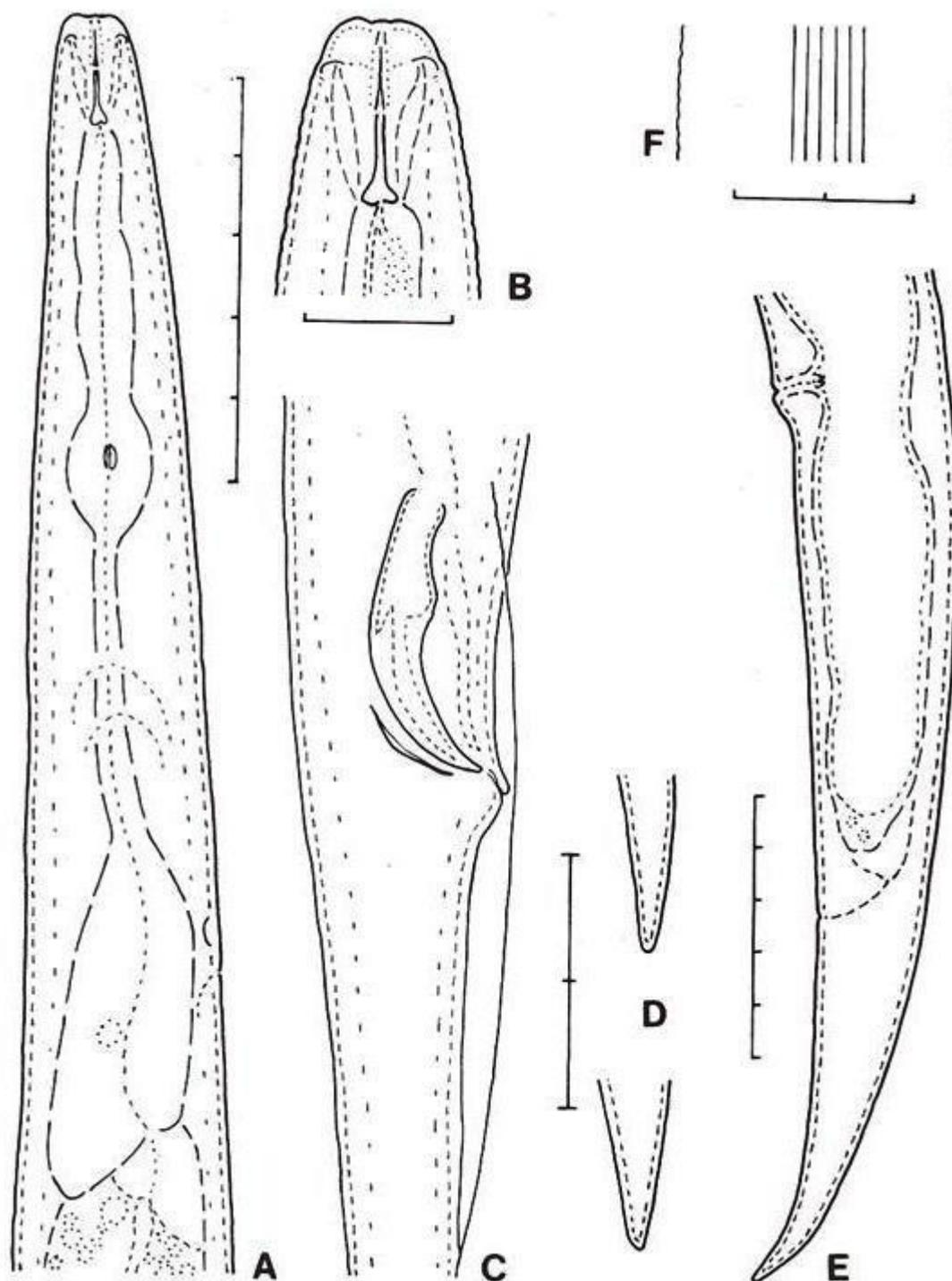


Figure 11. *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (d'après Sturhan et Brzeski, 1991). A) femelle, région œsophagienne; B) femelle, tête; C) mâle, région du spicule; D) extrémités des queues de deux femelles; E) femelle, région postérieure; et F) champ latéral au niveau du milieu du corps. Une unité sur l'une ou l'autre échelle = 10 µm.

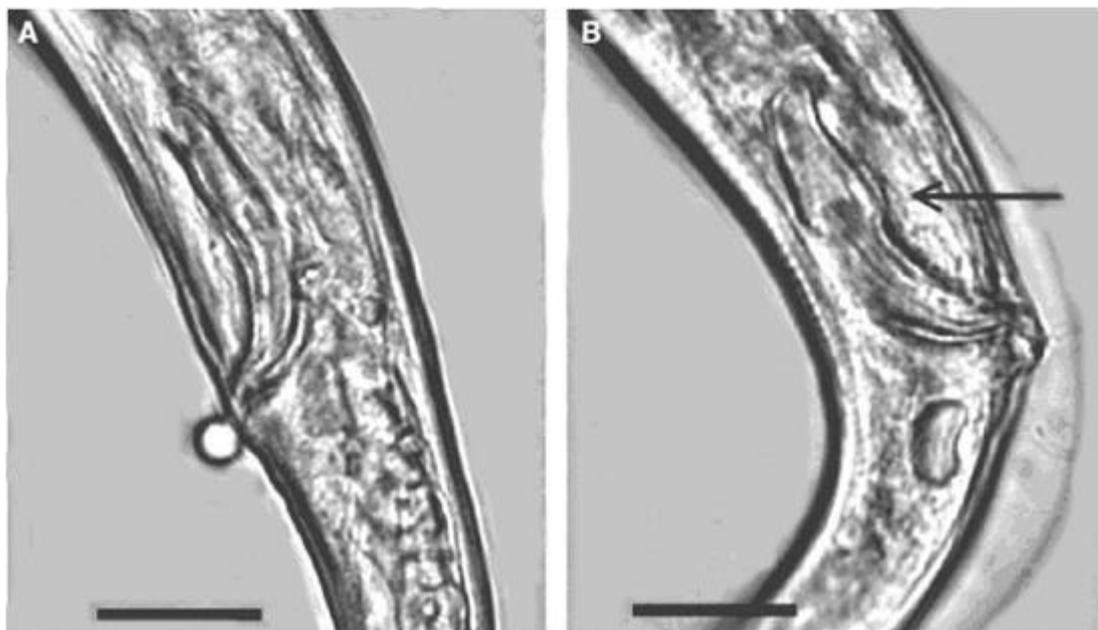


Figure 12. Spiculum de *Ditylenchus*: A) *D. dipsaci* et B) *D. destructor*. Flèche = tumulus. Barre d'échelle = 12 μ m. Photo: avec l'aimable autorisation de Karssen et Willemsen (2010).

Étapes de la publication

Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme

2006-04 À sa première session (2006), la CMP ajoute le thème au programme de travail (Nématodes, 2006-008).

2004-11 Le Comité des normes (CN) ajoute le sujet: *Ditylenchus destructor* / *D. dipsaci* (2004-017).

2010-07 Le projet est présenté au Groupe technique sur les protocoles de diagnose (GTPD), pendant sa réunion.

2013-04 Consultation d'experts.

2013-06 Le projet est présenté au GTPD, pendant sa réunion.

2014-05 Le CN approuve le projet en vue de la consultation des membres (2014_eSC_May_11).

2014-07 Consultation des membres.

2015-04 Le GTPD approuve le projet en vue de sa présentation au CN (2015_eTPDP_Apr_03).

2015-06 Le CN approuve la transmission pour la période de notification des protocoles de diagnose (2015_eSC_Nov_02).

2015-08 Le CN adopte le protocole de diagnose au nom de la CMP (aucune objection formelle reçue).

NIMP 27. Annexe 8 *Ditylenchus dipsaci* et *Ditylenchus destructor* (2015). Rome, CIPV, FAO.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2016-02.

Cette page est intentionnellement laissée vierge

CIPV

La Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV) est un accord international sur la santé des végétaux qui vise à protéger les plantes cultivées et sauvages en prévenant l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles. Les voyages et les échanges internationaux n'ont jamais été aussi développés qu'aujourd'hui. Cette circulation des personnes et des biens à travers le monde s'accompagne d'une dissémination des organismes nuisibles qui constituent une menace pour les végétaux.

Organization

- ◆ La CIPV compte plus de 180 parties contractantes.
- ◆ Chaque partie contractante est rattachée à une Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) et dispose d'un Point de contact officiel de la CIPV.
- ◆ Neuf organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) agissent pour faciliter la mise en œuvre de la CIPV dans les pays.
- ◆ La CIPV assure la liaison avec les organisations internationales compétentes pour aider au renforcement des capacités régionales et nationales.
- ◆ Le Secrétariat est fourni par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).



Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome (Italie)
Tél: +39 06 5705 4812 - Télécopie: +39 06 5705 4819
Courriel: ippc@fao.org - Site Internet: www.ippc.int