

Maintenance of nematodes collections at ANSES – Plant Health Laboratory

F. Ollivier, G. Anthoine

ANSES – Plant Health Laboratory, Nematology Unit, Domaine de la Motte – BP 35327,
35653 LE RHEU cedex, FRANCE

EPPO Workshop, Wageningen, The Netherlands, 06/09/2017

Common principles for nematodes collection

- Needs for reference materials : validation, research, proficiency tests, positive controls for routine testing.

- Unique identification code

Code	Description	Demandeur	Form	Date All.	Statut	Créateur	Date
01.01.0000	Détection Helicotylenchus + Tylenchomorphus	LEV NEMATOLOGE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0001	Détection Heterodera	LEV NEMATOLOGE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0002	Détection de l'axe entomique	FREDON PAULA	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0003	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0004	Détection de l'axe entomique	ALPES CÔTE D'AZUR	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0005	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0006	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0007	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0008	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0009	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0010	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0011	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0012	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0013	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0014	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0015	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0016	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0017	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0018	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0019	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0020	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0021	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0022	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0023	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0024	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0025	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0026	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0027	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0028	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0029	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0030	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0031	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0032	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0033	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0034	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0035	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0036	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0037	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0038	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0039	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0040	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0041	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0042	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0043	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0044	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0045	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0046	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0047	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0048	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0049	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	
01.01.0050	Détection de l'axe entomique	DRAPF SIAL PROYONCE	1050017	1050017	Acceptable	Fabrice	

- Selection of the appropriate multiplication method

- Selection of specific/ appropriate host

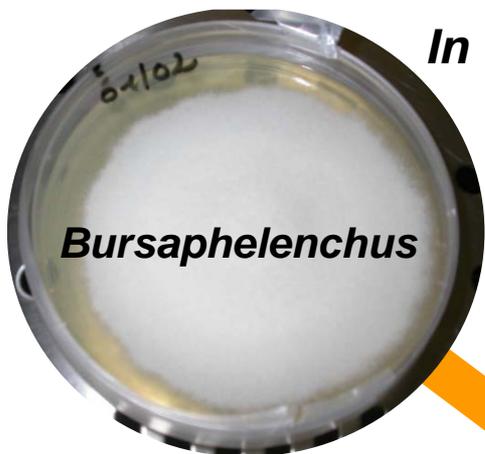


In vivo



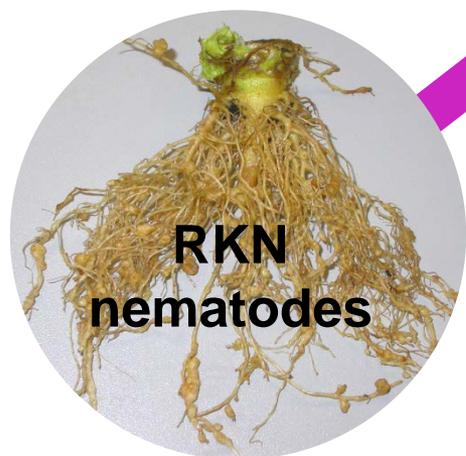
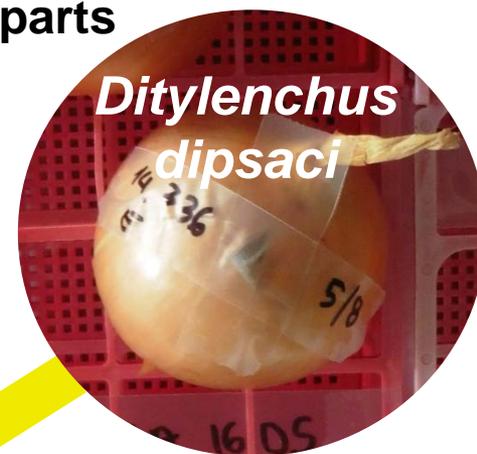
In vitro

Diversity of nematodes collection

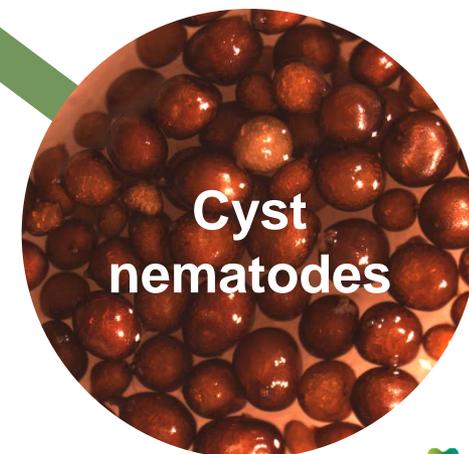


In vitro collection

On plant parts



Under greenhouse conditions



Nematodes collection

***In vitro* collection**



In vitro nematode collection

For plant parasitic and fungivorous species



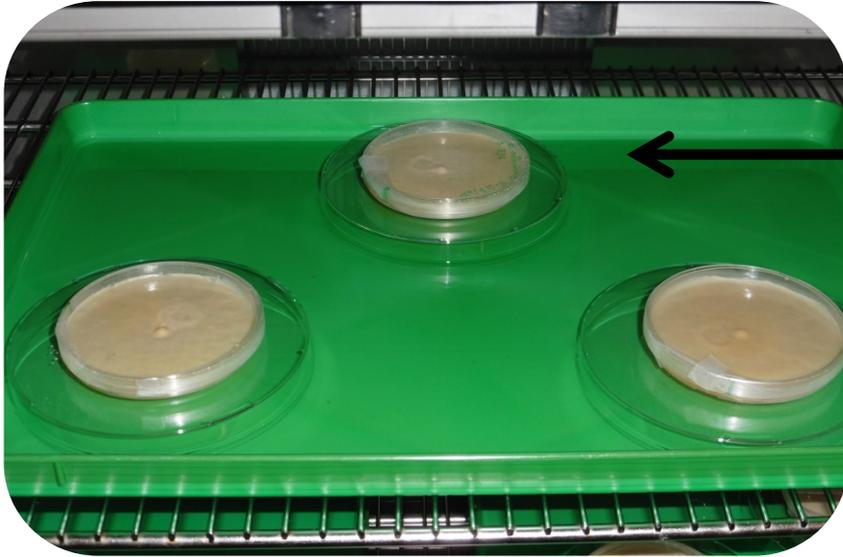
Mycelium of non sporulent
Botryotinia fuckeliana
Previous *Botrytis cinerea*



Incubation : 20° C

In vitro nematode collection

Management of risk of contamination : avoid contamination by mites



Plates floating on a mix of water and detergent : mites don't swim in it !

- Individual plate sealed in a plastic bag
- Storage at 15 ° C
- Regular check of status (no contamination, multiplication of nematodes, identification)

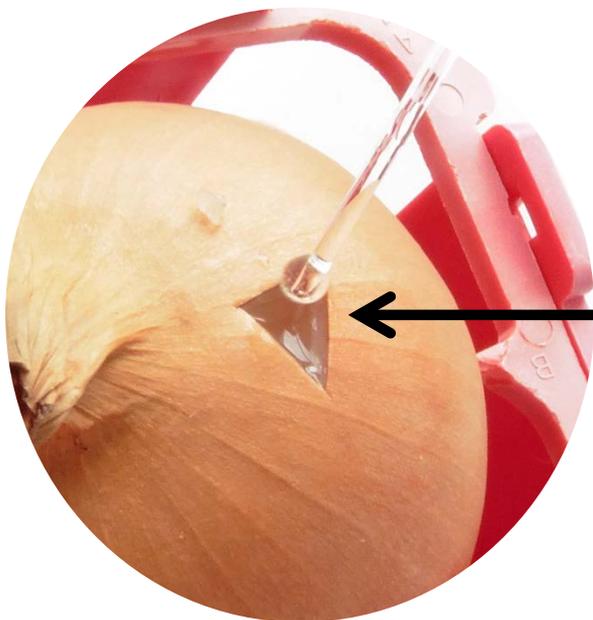


Nematodes collection

Plant parts collection



Maintenance of nematodes on bulbs – *Ditylenchus dipsaci*



Inoculation of healthy onions :
few drops of nematodes
suspension are loaded in a well

Inoculation point is sealed by first
leaves and adhesive tape

Inoculated onions are incubated at
20 ° C



Maintenance of nematodes on bulbs – Recovery of nematodes



Nematodes collected by *Oostenbrink* dish method



Pieces of onions dried in a ventilated rack.



Storage of contaminated material.

(anhydrobiotic stage of the nematode).



Nematodes collection

Greenhouse collection



Maintenance of nematodes on plants – RKN nematodes



- Air-conditioned greenhouses, with lighting and automatic shade curtains.
- 7 compartments.
- A total area of 70m².
- Secured containment conditions (restricted access, waste treatment).



Maintenance of nematodes on plants – RKN nematodes



Sowing tomato



Propagation fig tree
(*Ficus carica*)

Maintenance of nematodes on plants – RKN nematodes



M.chitwoodi :
tomato +
Solanum dulcamara



M.hapla :
tomato +
Taraxacum officinale



M.javanica:
tomato +
Ficus carica

Maintenance of nematodes on plants – RKN nematodes

Production of inoculum on highly sensitive host species to increase the yield



Sol. dulcamara
infected by *M.fallax*



Egg masses



Tomato
infected by *M.fallax*

Maintenance of nematodes on plants – RKN nematodes

Preventive measures to avoid cross-contaminations :

Plastic shields



Black polyethylene sheet



During repoting or sampling :
use of a protective red plastic.



Maintenance of nematodes on plants – Cyst nematodes

Cysts inoculation :
fine mesh net
containing the cysts.

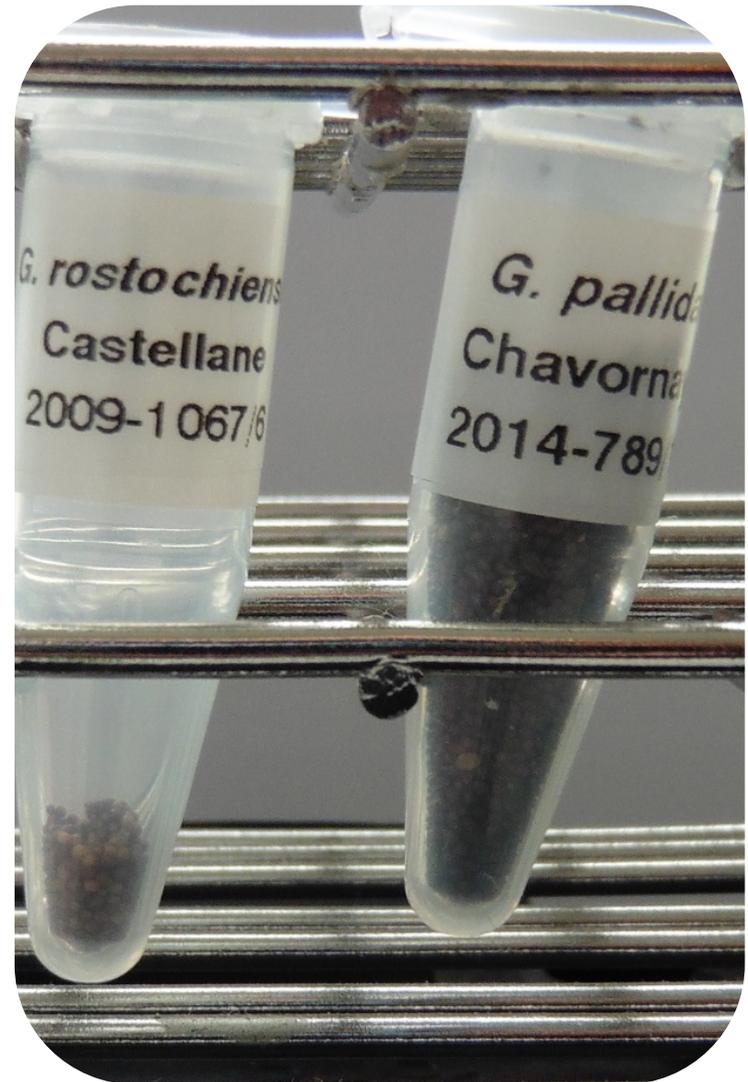
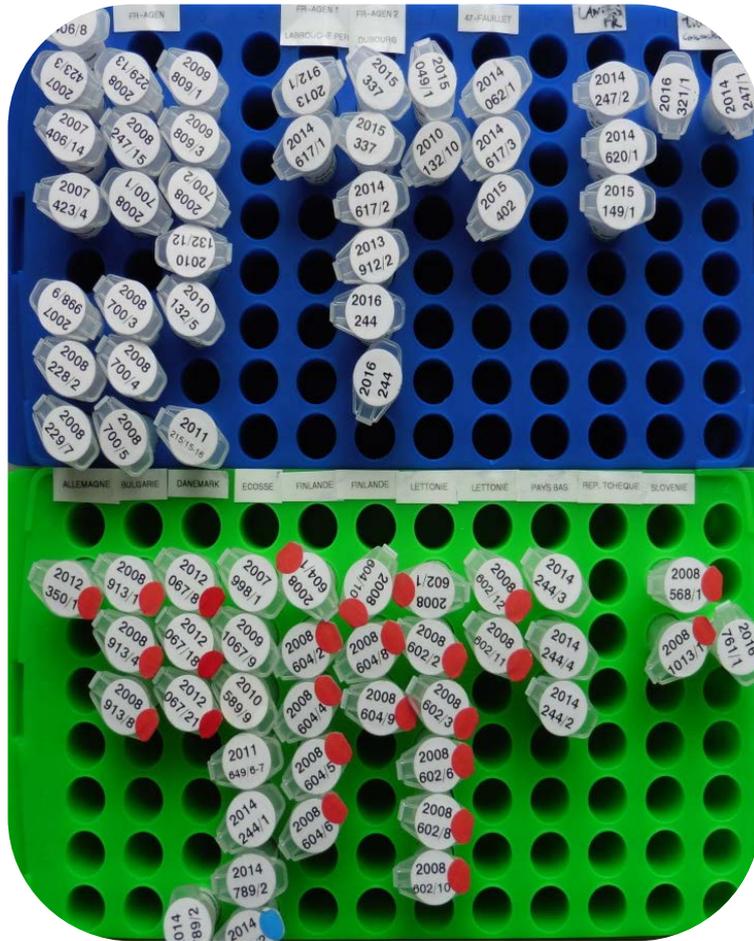


Different host plants



Cyst nematodes - Storage

Rack storage



Nematodes collection – Quality control

Regular checks of status

PCR results

Identification

Species

LSV	ENREGISTREMENT EN0822	Mise en application : 30.11.11
Nématologie	Fiche de suivi d'élevage	

Référence : **16-272** Nématode : *Melo chitwoodi*

DEMANDE	
Date : 30/05/16	Opérateur : F.O.
Réf Lofa : 16-272	Réf expéditeur : 2016.H.N.I.N.T.3503 (idem 16-063)
• Espèce végétale : pomme de terre	• Origine géographique : NL 16-103
Nature du ou des échantillons : Sol ou substrat <input type="checkbox"/> Bulbes, tubercules, ou rhizomes <input checked="" type="checkbox"/> Racines <input type="checkbox"/> Graines <input type="checkbox"/> Bois <input type="checkbox"/> Autres (préciser) : <input type="checkbox"/>	
OBJECTIF DE L'ELEVAGE	
Piégeage <input type="checkbox"/>	Multiplication d'individus pour identification <input type="checkbox"/>
Production de témoins <input type="checkbox"/>	Mise en collection <input checked="" type="checkbox"/>
VALIDATION DE LA DEMANDE	
Date et signature du RS élevages : 30/05/16 F.O.	

SUIVI DE L'ELEVAGE		
Date	Opérateur	Observations / interventions
27/06/16	F.O.	Plantation d'une 12 gaine de tubercules à symptômes
Dec 2016	F.O.	Récolte de tubercules (+++) analyse 17-01
		Plantation de Tom Carmello
mars 2017	F.O.	Prélèvement de masses d'œufs testes des larves issues des masses d'œufs isolés : Run PCR 3033 = 100% <i>M. chitwoodi</i>
17/04/17	F.O.	Ransotage des 6 jeunes plants Tom

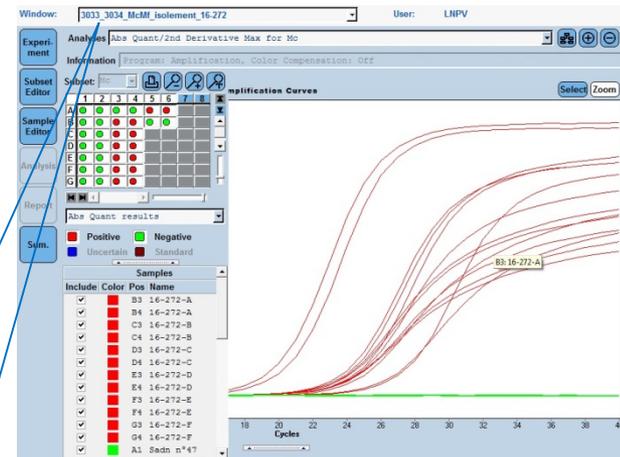
Host plant

Origin

Status check : reference

Maintenance operations

Records for each population



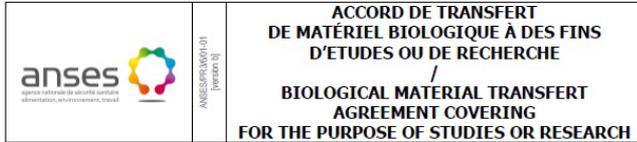
Verification for the presence of parasites :



Nematodes collection – Internal use only ?

No commercial activity, but possibility of exchanges :

Material Transfer Agreement



ENTRE : [Nom de l'établissement + forme juridique] ci-après dénommée [le Cocontractant] Dont le siège social est situé [] Représentée par [Nom du représentant légal et qualité] [] <i>D'une part,</i>	BETWEEN: [name of company +legal form] hereinafter [the contracting party] having its registered office at [address of the registered office] represented by [name of the legal representative and capacity to act] [] <i>Party of the first part</i>
ET : L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ci-après dénommée « ANSES », établissement public administratif, ayant son siège 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort cedex, représentée par [] laboratoire [] dument délégué à l'effet de signer les présentes. <i>D'autre part,</i>	AND: L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail hereinafter "ANSES" a public administrative corporation, having its registered office at 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort cedex - France, represented for the purpose of this agreement by delegation by [] laboratory [] <i>Party of the second part</i>
[le Cocontractant] et l'ANSES étant ci après dénommés individuellement ou collectivement la ou les « Partie(s) ».	[The contracting Party] and ANSES are hereinafter individually referred to as the "Party" and collectively as the "Parties"
PRÉAMBULE L'ANSES a en sa possession du matériel biologique ci-après dénommé MATÉRIEL et les informations correspondantes : le MATÉRIEL est constitué par [] [le Cocontractant] est intéressé par le MATÉRIEL détenu par l'ANSES pour une étude ou recherche sur [définir l'usage précis qui va être fait du matériel].	RECITALS: ANSES has the biological materials, referred to hereinafter as the MATERIALS, and relevant information in its possession. The MATERIALS are comprised of [] [the contracting party] is interested in the MATERIALS in ANSES's possession for a research concerning []

Sampling



Shipping material

Nematodes collection – Current challenge

- Context of limited resources : focus on the main genera and species of interest (regulated nematodes).
- Nematodes collections are needed to support reliable analysis.
- Need for regular exchanges with other collections, to cover diversity.
- In future : Collaborative network ?

Commercial service ?

