

Méthode d'analyse

En santé des végétaux

Référence : M-GEVES/SV/MO/002

Version : 1

Mai 2021

Qualité sanitaire : Détection d'*Alternaria linicola*, *Colletotrichum linicola*, *Botrytis cinerea*, *Boeremia exigua*, *Fusarium* spp. sur semences de Lin

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

**Laboratoire National de Référence : Champignons phytopathogènes « Champignons réglementés non de
quarantaine sur semences vraies, plants de fraisiers, griffes d'asperge et bulbes du genre Allium »**

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété du GEVES. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée : Méthode d'analyse en santé des végétaux, Qualité sanitaire : Détection d'*Alternaria linicola*, *Colletotrichum linicola*, *Botrytis cinerea*, *Boeremia exigua*, *Fusarium* spp. sur semences de Lin; M-GEVES/SV/MO/002, 1 ; Mai 2021.

Historique de la méthode

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

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

Tableau récapitulatif

Version	Date	Type de modification	Principales modifications
1	Mai 2021		Création

Sommaire

1. Introduction	4
1.1. <i>Validation de la méthode</i>	4
1.2. <i>Caractéristiques de performance de la méthode</i>	4
2. Avertissements et précautions de sécurité	5
3. Objet et domaine d'application	6
4. Termes, sigles et définitions	6
5. Principe de la méthode	6
6. Réactifs	7
7. Matériel	7
8. Echantillons	7
8.1. <i>Taille, conditionnement</i>	7
8.2. <i>Conservation</i>	7
8.3. <i>Critères d'acceptation</i>	7
9. Mode opératoire	7
10. Résultats	12
11. Devenir des reliquats d'échantillon après analyse	12
12. Annexes	13
12.1. <i>Milieu Malt Agar avec Streptomycine</i>	13
12.2. <i>Bibliographie</i>	13
12.3. <i>Crédits (photos)</i>	13

1. Introduction

Cette méthode est basée sur la méthode ISTA 7-007 pour la détection d'*Alternaria linicola*, *Colletotrichum linicola* (anciennement *C lini*) et *Botrytis cinerea* sur semences de lin.

1.1. Validation de la méthode

Cette méthode a été mise au point et validée par le GEVES pour l'ISTA.

Le rapport de validation : Grimault et al, 2013 est disponible :

<https://www.seedtest.org/upload/prj/product/ISTAMethodValidationReportsVolume2013.pdf>

Lors de cette validation, seules les détections d'*Alternaria linicola*, *Colletotrichum linicola* et *Botrytis cinerea* étaient concernées. Des résultats complémentaires ont été obtenus par la participation du GEVES à un essai interlaboratoire d'aptitude organisé par l'ISTA.

Cette méthode est également adaptée à la détection de *Boeremia exigua* (anciennement *Phoma exigua*) et *Fusarium* spp.

1.2. Caractéristiques de performance de la méthode

Sensibilité analytique : ND

Spécificité analytique : description morphologique

Sensibilité diagnostique : 100% pour *Alternaria linicola*, *Colletotrichum linicola* et *Botrytis cinerea*

Spécificité diagnostique : 100% pour *Alternaria linicola*, *Colletotrichum linicola* et *Botrytis cinerea*

Justesse : 100% pour *Alternaria linicola*, *Colletotrichum linicola* et *Botrytis cinerea*

Répétabilité : conforme selon ISO 5725

Reproductibilité : conforme selon ISO 5725

2. Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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

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

3. Objet et domaine d'application

Cette méthode permet de déterminer la qualité sanitaire d'échantillons de semences de lin vis-à-vis d'*Alternaria linicola*, *Colletotrichum lini*, *Botrytis cinerea*, *Boeremia exigua*, *Fusarium* spp.. Les résultats sont exprimés en pourcentage de semences contaminées par chaque champignon.

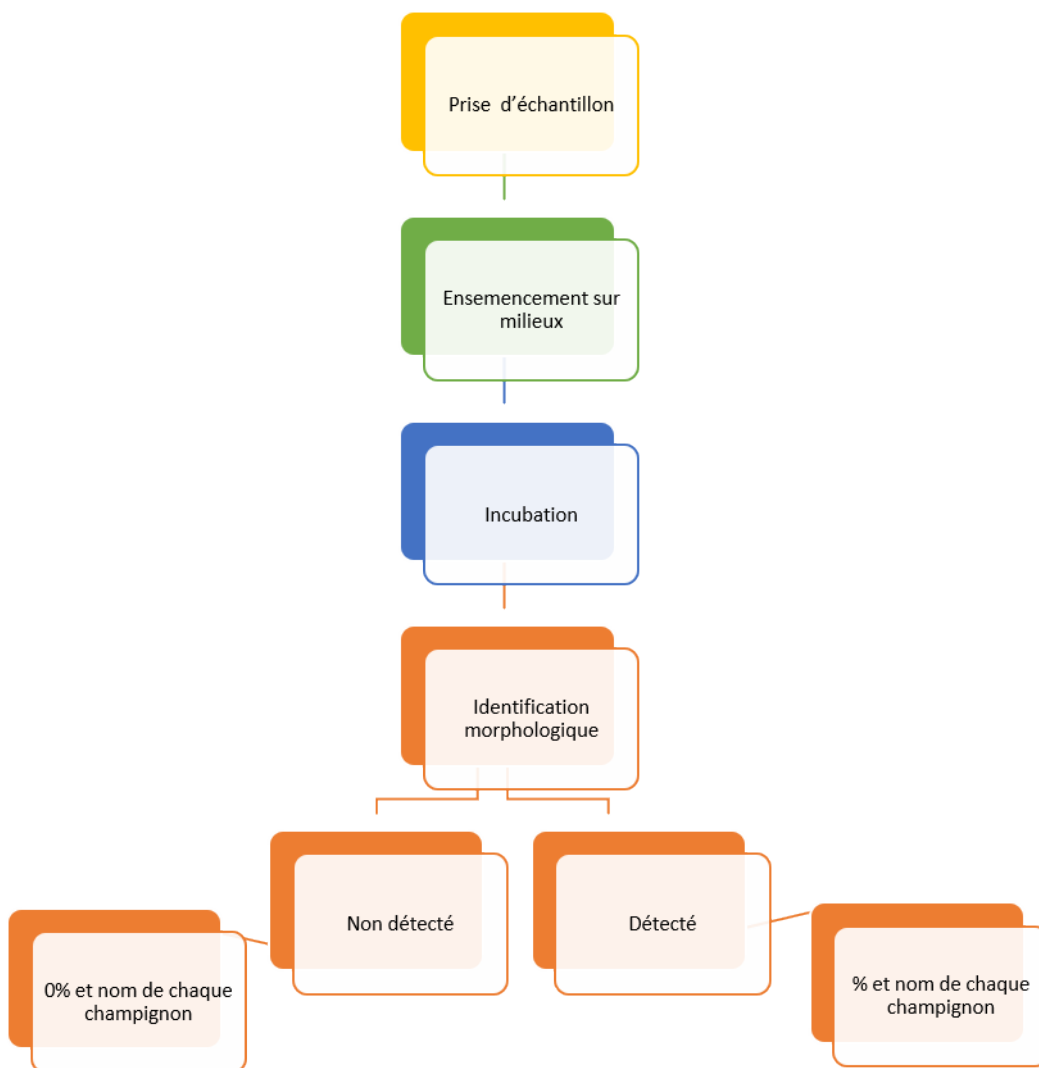
Cette méthode s'applique pour l'espèce Lin (*Linum usitatissimum*).

4. Termes, sigles et définitions

ISTA : règles internationales pour les essais de semences

5. Principe de la méthode

La méthode peut être décrite de la façon suivante : ensemencement sur milieu des semences, incubation et identification morphologique



6. Réactifs

- Isolats de référence d'*Alternaria linicola*, *Colletotrichum lini*, *Botrytis cinerea*, *Boeremia exigua*, *Fusarium* spp.
- Milieu Malt-Agar avec Streptomycine (MA)

7. Matériel

- Boîtes de Petri 90mm
- Etuve capable d'opérer à 20°C +/- 2°C

8. Echantillons

8.1. Taille, conditionnement

Taille : 400 semences

8.2. Conservation

Conservation : 5-10°C +/-2°C

8.3. Critères d'acceptation

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

9. Mode opératoire

- Prise d'échantillon si l'échantillon soumis est supérieur à 400 semences :
 - Verser la totalité de l'échantillon dans une grande coupelle.
 - Faire un échantillonnage à la cuillère sur l'échantillon : à l'aide d'une spatule prélever des petites portions de semences, au minimum à 5 points opposés dans la coupelle au hasard.
 - Prendre des portions suffisantes de semences pour constituer un sous échantillon de taille exigée.
 - Les verser dans une coupelle plus petite.
- Ensemencement :
 - Déposer 10 semences (non traitées) ou 20 semences (traitées) espacées dans les boîtes de MA.
- Incubation :
 - Incuber les boîtes à 20°C pendant 7 jours (semences non traitées) ou 9 jours (semences traitées) à l'obscurité. La durée d'incubation peut être prolongée sans dépasser 10 jours d'incubation (semences non traitées) et 12 jours (semences traitées) sinon il y a un risque de contamination croisée entre semences.
- Témoins positifs d'analyse :

- Repiquer une souche, issue de la collection de référence, des pathogènes correspondants
- Déposer un implant du pathogène au milieu de la boîte gélosée.
- Incuber dans les conditions des échantillons
- Lecture :
 - Reconnaissance du pathogène et validation de l'essai d'après les souches des témoins positifs d'analyse, par critères visuels, observation à l'œil nu puis observation des fructifications à la loupe binoculaire ou morphologie des spores au microscope
 - Sur Malt-Agar les colonies mycéliennes de *Botrytis cinerea* sont blanches au début, grisâtres en vieillissant (Fig. 1), à 5 jours les cultures sont rases et peu sporulées.



Fig. 1. Semence de lin contaminée par *Botrytis cinerea*

A 7 jours le mycélium cloisonné et contourné est plus abondant. A ce stade, les plantules sont souvent détruites par pourriture molle. Vus sous la loupe, les conidiophores en arbuscules sont de teinte claire, brillants, très flexueux (Fig. 2).



Fig. 2. Mycelium et conidies de *Botrytis cinerea*

Sur ces conidiophores, se forment des conidies (spores) hyalines, unicellulaires, ovoïdes de 8-10µm x 10-12 µm qui peuvent être observées sous le microscope (Fig. 3).

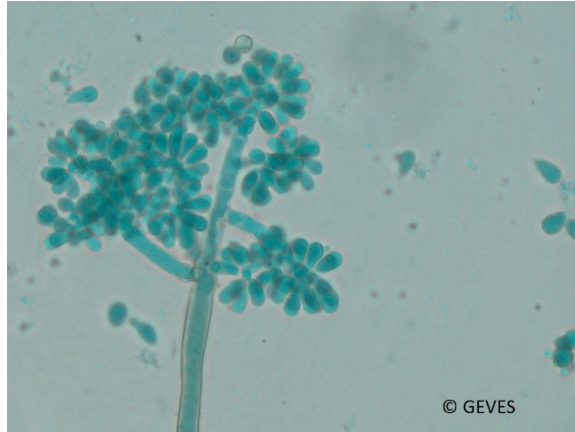


Fig. 3. Conidiophore et conidies de *Botrytis cinerea*

Le mycélium est faiblement coloré et apparaît souvent tortueux. Montées dans du bleu de méthylène, les spores apparaissent colorées en bleu. Des sclérotés grisâtres, souvent aplatis peuvent être présentes dans le substrat ou sur la graine elle-même.

- Les colonies mycéliennes d'*Alternaria linicola* sont vert grisâtre à vert olive (Fig. 4).



Fig. 4. Semences de lin contaminées par *Alternaria linicola*

Le mycélium produit peu de spores à l'obscurité. L'identification porte essentiellement sur l'aspect du mycélium et les symptômes sur les hypocotyles et cotylédons. Les conidiophores sont simples, septés et produisent une seule spore à leur extrémité. Les spores sont brunes, allongées, effilées avec un filament apical parfois branchu (Fig. 5).

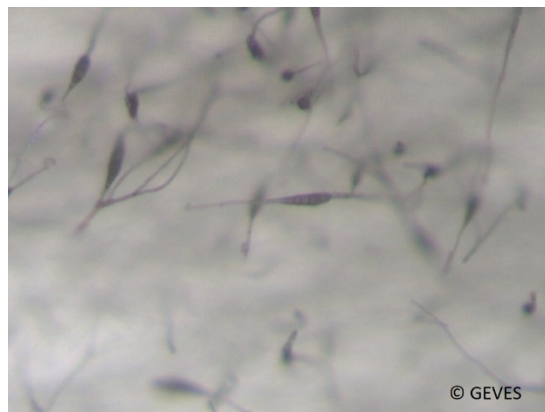


Fig. 5. Conidies d'*Alternaria linicola*

Elles mesurent 150-300x17-24 μ m et présentent une légère constriction au niveau des cloisons. Sur Malt-Agar, les plantules contaminées présentent des nécroses rougeâtres sur l'hypocotyle et les cotylédons.

- Les colonies de *Colletotrichum linicola* sont d'abord gris clair, puis prennent une teinte plus noirâtre (Fig. 6) en raison de la formation de grandes soies noires dans les acervules (Fig. 7).

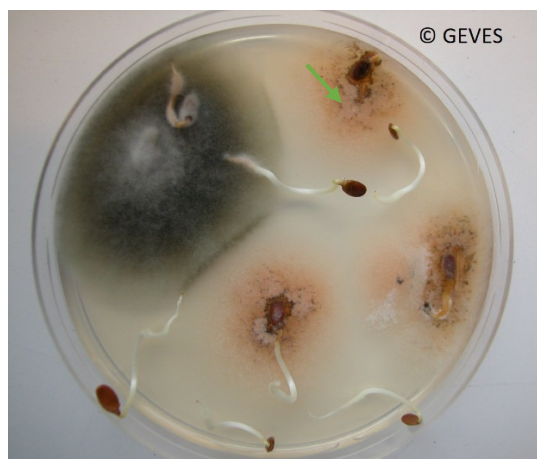


Fig. 6. Semences de lin contaminées par *Colletotrichum linicola*

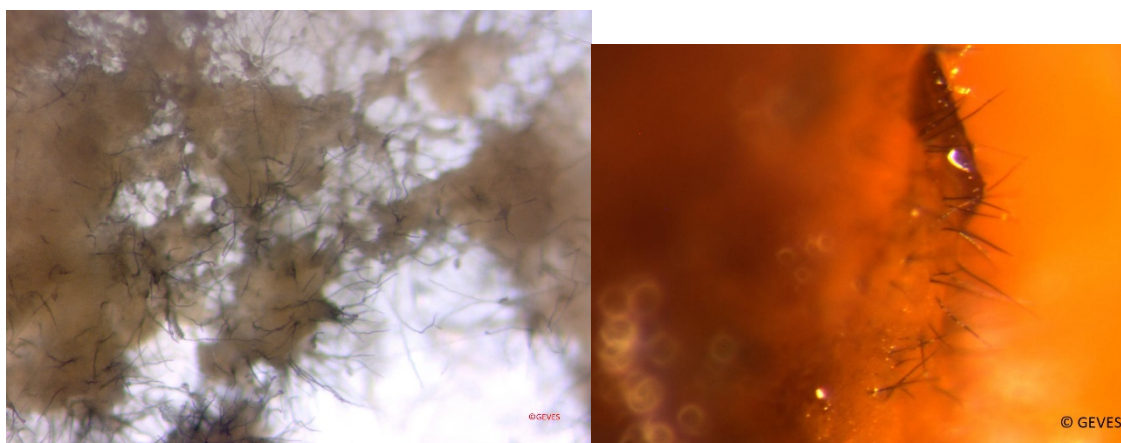


Fig. 7. Soies et acervules de *Colletotrichum linicola*

Les acervules produisent des spores en très grand nombre, qui s'agglomèrent en masses mucilagineuses rose-orangé. Les spores sont hyalines, non cloisonnées, ovoïdes ou cylindriques et arrondies à leur extrémité. Elles mesurent 11-21x3-4 μ m, les soies 150x4 μ m

- Les colonies mycéliennes de *Fusarium* spp. sont généralement roses avec un mycélium blanc ou jaune aérien plus au moins développé (Fig. 8 et 9).



Fig. 8. Semences de lin contaminées par *Fusarium* spp

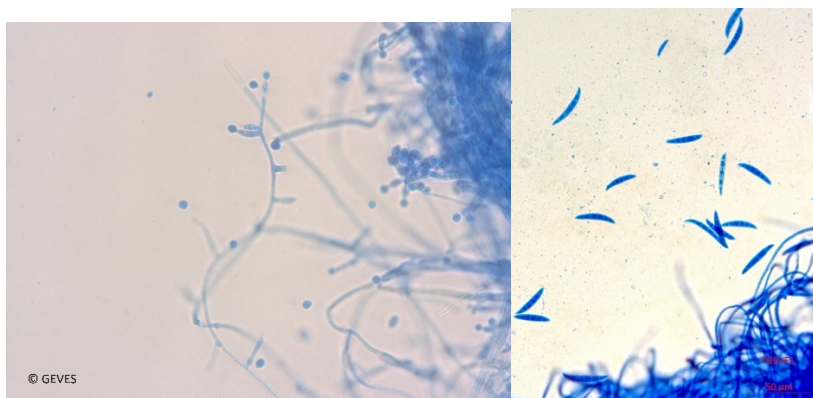


Fig. 9. Conidies de *Fusarium* spp

- Les colonies mycéliennes de *Boeremia exigua* sont duveteuses, étalées (Fig. 10).



Fig. 10. Semences de lin contaminées par *Boeremia exigua*

Elles sont de teintes verdâtres à marron foncé. Une bande plus claire est souvent présente à la périphérie. Les pycnides sont souvent peu nombreuses dans les cultures (Fig. 11).

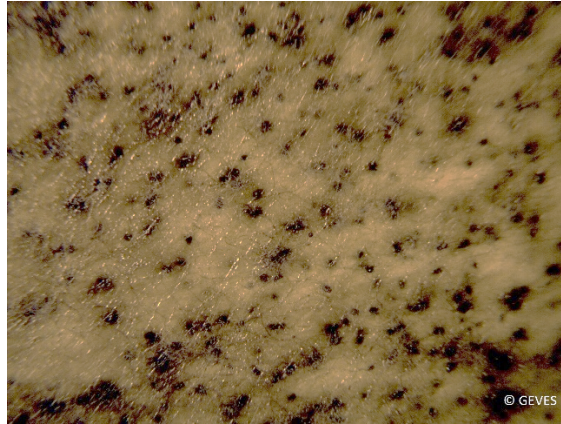


Fig. 11. Pycnides de *Boeremia exigua*

Elles sont de taille variable, souvent accolées les unes aux autres et mesurent 100-300x70-300µm. Les spores sortent des pycnides par l'ostiole, sous la forme d'un exsudat crémeux. Elles sont petites, monocellulaires, mais certaines sont bicellulaires. Elles mesurent 5-8x2,5-4µm. Les graines contaminées donnent naissance à des plantules nécrosées brunâtres.

10. Résultats

Le rapport doit indiquer le nombre de semences testées et la méthode utilisée. Dans le cas d'un résultat négatif (pathogène non détecté), le résultat doit indiquer 0% et le nom du champignon. Dans le cas d'un résultat positif, le rapport doit indiquer le % de semences contaminées par pathogène et indiquer le nom du champignon.

11. Devenir des reliquats d'échantillon après analyse

Les reliquats d'échantillons négatifs doivent être conservés pendant au moins 15 jours après envoi des résultats à 5-10°C à l'obscurité.

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

12. Annexes

12.1. Milieu Malt Agar avec Streptomycine

PRODUITS	(Eau du robinet/osmosée) 1L
Agar bactériologique	17.0g
Malt	10.0g
Streptomycine	50.0mg

Conservation 2 mois à 5°C obscurité

12.2. Bibliographie

<https://www.seedtest.org/upload/prj/product/ISTAMethodValidationReportsVolume2013.pdf>

12.3. Crédits (photos)

Fig. 1. Semence de lin contaminée par *Botrytis cinerea* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 2. Mycelium et conidies de *Botrytis cinerea* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 3. Conidiophore et conidies de *Botrytis cinerea* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 4. Semences de lin contaminées par *Alternaria linicola* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 5. Conidies d'*Alternaria linicola* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 6. Semences de lin contaminées par *Colletotrichum linicola* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 7. Soies et acervules de *Colletotrichum linicola* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 8. Semences de lin contaminées par *Fusarium spp.* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 9. Conidies de *Fusarium spp.* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 10. Semences de lin contaminées par *Boeremia exigua* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 11. Pycnides de *Boeremia exigua* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.