

Méthode d'analyse

En santé des végétaux

Référence : M-GEVES/SV/MO/005

Version : 1

Mai 2021

Qualité sanitaire : Détection de *Botrytis cinerea*, sur semences de Chanvre et Tournesol

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 de *Botrytis cinerea*, sur semences de Chanvre et Tournesol; M-GEVES/SV/MO/005, 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	6
3. Objet et domaine d'application	7
4. Termes, sigles et définitions	7
5. Principe de la méthode	7
6. Réactifs	8
7. Matériel	8
8. Echantillons	8
8.1. <i>Taille, conditionnement</i>	8
8.2. <i>Conservation</i>	8
8.3. <i>Critères d'acceptation</i>	8
9. Mode opératoire	8
10. Résultats	11
11. Devenir des reliquats d'échantillon après analyse	11
12. Annexes	12
12.1. <i>Milieu Malt Agar avec Streptomycine</i>	12
12.2. <i>Bibliographie</i>	12
12.3. <i>Crédits (photos)</i>	12

1. Introduction

Cette méthode est basée sur la méthode ISTA 7-003 pour la détection de *Botrytis cinerea*, sur semences de tournesol.

1.1. Validation de la méthode

Cette méthode a été mise au point par l'ISTA. Il n'existe pas de rapport de validation.

Des résultats complémentaires ont été obtenus par la participation du GEVES à un essai interlaboratoire d'aptitude organisé par l'ISTA sur la méthode ISTA 7-003.

1.2. Caractéristiques de performance de la méthode

Sensibilité analytique : ND

Spécificité analytique : description morphologique

Sensibilité diagnostique : 100%

Spécificité diagnostique : 100%

Justesse : 100%

Répétabilité : conforme en quantitatif, avec valeurs significatives à 5% en quantitatif sur échantillon moyennement contaminé.

Reproductibilité : conforme en qualitatif et en quantitatif selon ISO5725.

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 tournesol et de chanvre vis-à-vis de *Botrytis cinerea*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de semences contaminées par *Botrytis cinerea*.

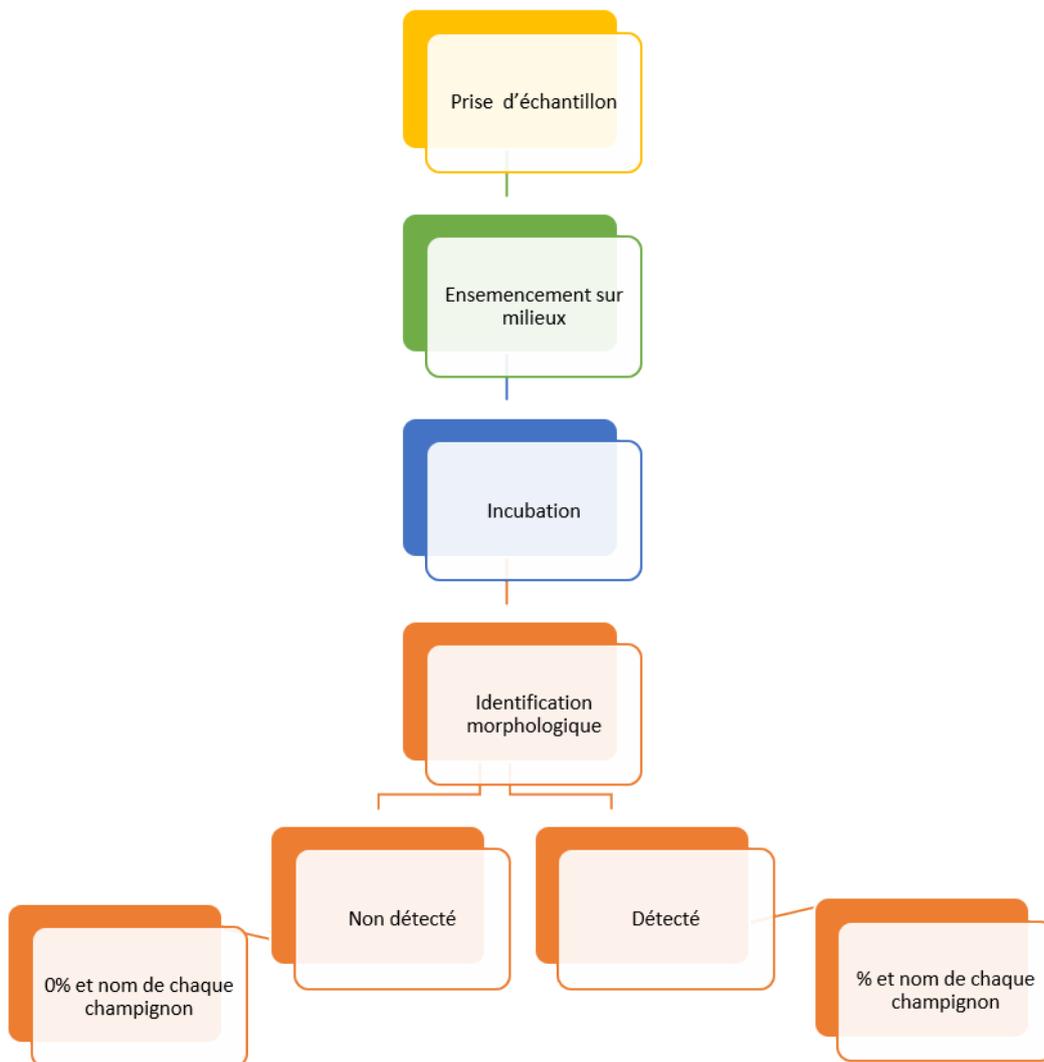
Cette méthode s'applique pour les espèces Tournesol et Chanvre.

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

- Isolat de référence de *Botrytis cinerea* ou semences d'un échantillon contaminé par *Botrytis cinerea*
- Disques blancs Ø 85 mm Whatman N° 1 (3 disques par boîtes) ou Disques oranges Ø 85 mm (2 disques par boîtes) fourni par GE Healthcare (référence 3645)
- Milieu Malt-Agar avec Streptomycine (MA)

7. Matériel

- Boites 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 5 semences (non traitées pour le tournesol) ou 10 semences (traitées pour le tournesol et traitées / non traitées pour le chanvre) espacées dans les boîtes contenant 3 (ou 2 en fonction du type de buvard) disques de buvard préalablement humidifiés à saturation. La quantité d'eau osmosée à ajouter est à adapter en fonction des conditions du laboratoire.
- 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, de *Botrytis cinerea*
 - Déposer un implant du pathogène au milieu d'une boîte gélosée.
 - Ou déposer un nombre suffisant de semences d'un échantillon contaminé pour obtenir des colonies de *Botrytis cinerea*
 - Incuber dans les conditions des échantillons
- Lecture :
 - Reconnaissance du pathogène et validation de l'essai d'après les souches ou semences témoins d'analyse, par critères visuels, observation à l'œil nu puis observation des fructifications à la loupe binoculaire. ou morphologie des spores au microscope
 - Dès le cinquième jour, il est possible d'observer à l'œil nu une pourriture molle des germes qui se recouvrent d'un mycelium gris cendré (Fig. 1 et 2) à partir duquel se forment des conidiophores branchus parfois très denses, en arbuscule avec des spores hyalines. Vus sous la loupe, les conidiophores sont de teinte claire, brillants, très flexueux (Fig 3 et 4). Sur ces conidiophores se forment des conidies hyalines, unicellulaires, ovoïdes de 8-10µm x 10-12 µm qui peuvent être observées sous le microscope (Fig.5). Le mycelium est faiblement coloré et apparaît souvent tortueux, en forme de ruban. Montées dans du bleu de méthylène, les spores apparaissent colorées en bleu. En vieillissant, les colonies mycéliennes s'étendent sur le buvard et la sporulation est plus abondante. Des sclérotés grisâtres, souvent aplatis peuvent être présents sur le substrat ou sur la graine elle-même.



Fig. 1. Semences de chanvre contaminées par *Botrytis cinerea*



Fig. 2. Semences de tournesol contaminées par *Botrytis cinerea*

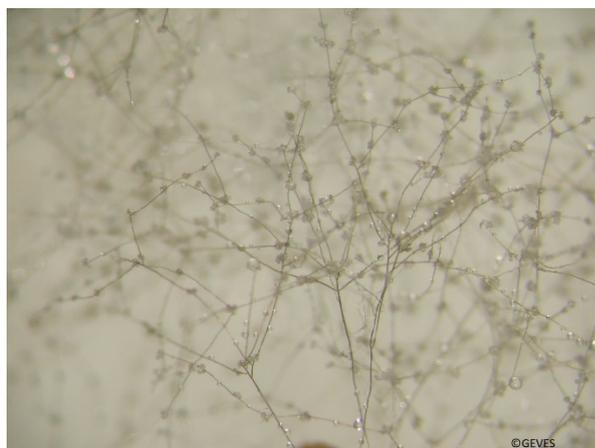


Fig. 3. Mycelium de *Botrytis cinerea* vu à la loupe binoculaire



Fig. 4 Conidiophores et conidies de *Botrytis cinerea* vus à la loupe binoculaire



Fig. 5 Conidiophores et conidies de *Botrytis cinerea* vus au microscope © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

- Attention : sont comptées semences contaminées par *Botrytis cinerea* :
 - Si présence d'un seul conidiophore avec arbuscule même sans fructifications sur le tégument ou la plantule
 - Si présence du mycélium cloisonné et contourné sans conidiophores ni fructifications

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% de semences contaminées par *Botrytis cinerea*. Dans le cas d'un résultat positif, le rapport doit indiquer le % de semences contaminées par *Botrytis cinerea*.

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. Semences de chanvre contaminées par *Botrytis cinerea* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 2. Semences de tournesol contaminées par *Botrytis cinerea* © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 3. Mycelium de *Botrytis cinerea* vu à la loupe binoculaire © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 4 Conidiophores et conidies de *Botrytis cinerea* vus à la loupe binoculaire © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.

Fig. 5 Conidiophores et conidies de *Botrytis cinerea* vus au microscope © GEVES – Novembre 2019 Tous droits réservés.