

Méthode d'analyse

En santé des végétaux

Référence : M-GEVES/SV/MO/003

Version : 1

Mai 2021

Qualité sanitaire : Détection de *Phomopsis* complex sur semences de soja

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 *Phomopsis* complex sur semences de soja; M-GEVES/SV/MO/003, 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>	8
8.3	<i>Critères d'acceptation</i>	8
9	Mode opératoire	9
10	Résultats	12
11	Devenir des reliquats d'échantillon après analyse	12
12	Annexes	13
12.1	<i>Préparation du NaOCl à 1% de Chlore actif</i>	13
12.2	<i>Préparation de Milieu PDA acidifié</i>	13
12.3	<i>Bibliographie</i>	14
12.4	<i>Crédits</i>	14

1 Introduction

Cette méthode a pour objectif de déterminer la présence de champignons du complexe *Phomopsis* sur semences de Soja.

1.1 Validation de la méthode

Cette méthode a été validée dans le cadre de l'ISTA sous la référence 7-016 « Detection of *Phomopsis* complex in *Glycine max* (soybean,) seed ». Elle est effective au 1^{er} Janvier 2020.

La méthode a fait l'objet d'études de validation : ISTA (2003). Comparative evaluation of the Botran-amended blotter and acidified potato dextrose agar assays for the detection of *Phomopsis* seed decay in soybean seed. Method Validation Reports. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.

Elle a été complétée par des résultats d'Essai Interlaboratoire d'Aptitude en 2012 (données du laboratoire)

1.2 Caractéristiques de performance de la méthode

Caractéristiques de performance de la méthode

Sensibilité analytique : ND

Spécificité analytique : description morphologique

Sensibilité diagnostique : 100%

Spécificité diagnostique : 100%

Justesse : ND

Répétabilité : ND

Reproductibilité : ND

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 soja vis-à-vis du complexe *Phomopsis*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de semences contaminées par *Phomopsis* spp.

Cette méthode s'applique pour l'espèce Soja (*Glycine max* (L.) Merr.)

Elle concerne les pathogènes :

Phomopsis phaseoli (Desm.) Sacc., 1915 = *Phomopsis sojae* Lehman, 1922 = *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Lehman) Wehm., 1933 = *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* Athow & Caldwell, 1954 = *Diaporthe caulivora* (Athow & Caldwell) J.M. Santos, Vrandecic & A.J.L. Phillips, 2011

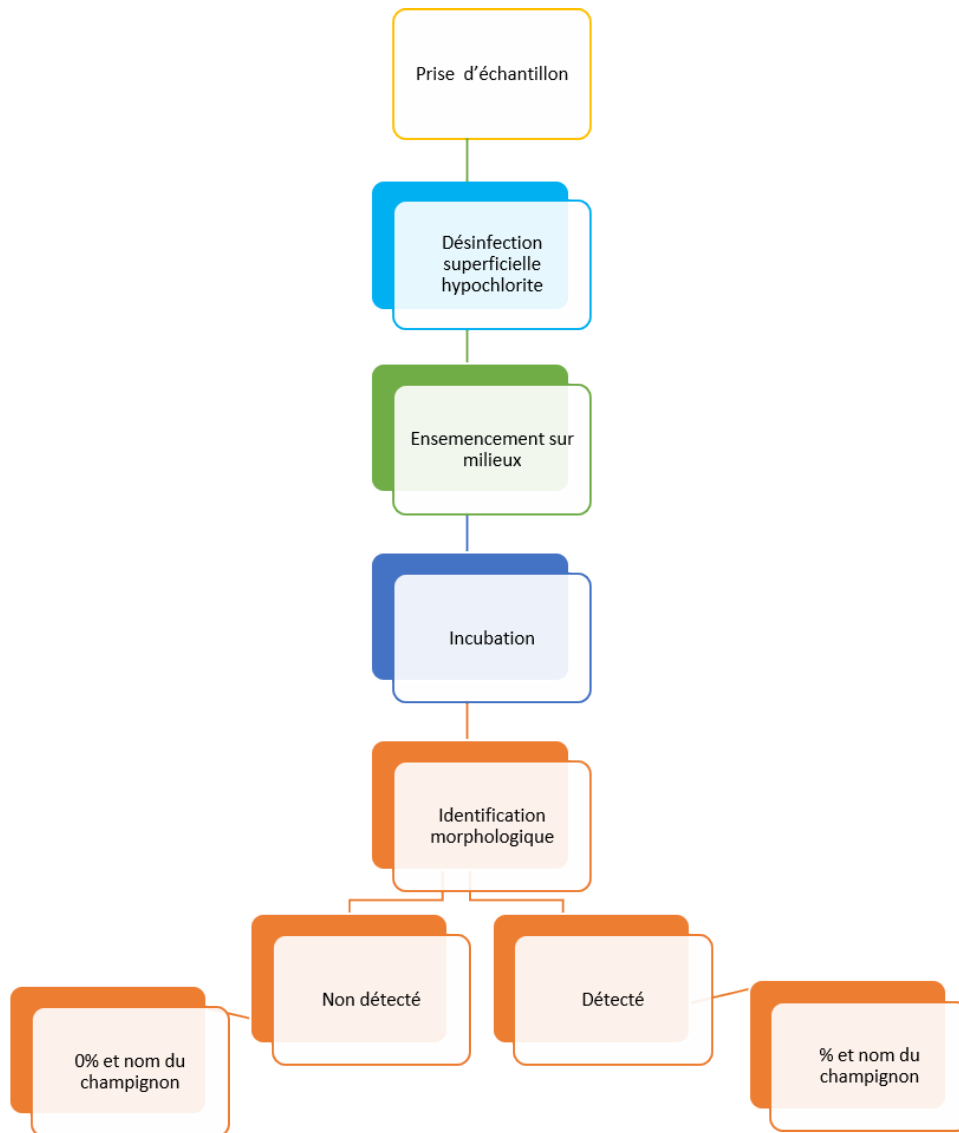
Phomopsis longicolla Hobbs, 1985 = *Diaporthe longicolla* (Hobbs) J. M. Santos, Vrandečić & A. J. L. Phillips, 2011

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 :



6 Réactifs

- Isolat de référence de *Phomopsis* spp isolé de soja ou semences connues pour être infectées
- Milieu PDA Acidifié (Potato dextrose agar acidifié)
- Hypochlorite de sodium 1%

7 Matériel

- Boîtes de Petri 90mm
- Etuve capable d'opérer à 25°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

Critère 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 un contenant adapté à la taille des semences.
 - 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 au hasard.
 - Prendre des portions suffisantes de semences pour constituer un sous échantillon de taille exigée.
 - Les verser dans un contenant plus petit pour la désinfection
- Pré traitement des semences (désinfection superficielle) : les semences sont rincées 30 sec dans une solution de NaOCl (chlore disponible 1%), puis 30 sec dans de l'eau stérile. Elles sont ensuite séchées sur buvard stérile.
- Ensemencement :
 - Disposer 10 semences espacées par boîte de Petri sur Milieu PDA Acidifié
- Incubation : incuber les boîtes pendant 7 jours à 25°C +/- 2°C à l'obscurité
- Témoins positifs d'analyse :
 - Repiquer une souche, issue de la collection de référence, de *Phomopsis* spp
 - Déposer un implant du pathogène au milieu de la boîte gélosée.
 - Incuber dans les conditions des échantillons
 - Ou ensemencer une boîte avec des semences connues pour être infectées. Ces semences ayant été également désinfectées en surface selon les mêmes modalités que les semences analysées.
- Lecture : Elle est réalisée à 3 et 7 jours d'incubation. L'observation est réalisée à l'œil nu
 - 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.
 - Les colonies mycéliennes de *Phomopsis* spp sont blanches à jaune, cotonneuses. Un exsudat marron clair s'écoule très souvent des semences contaminées (Fig.1).



Fig.1. Aspect des colonies de *Phomopsis* complex

- Des pycnides peuvent être présentes
 - Les pycnides (Fig.2) peu nombreuses sont formées sur les téguments de la graine ou à la surface de la gélose, elles sont de taille et forme variables. Deux types de spores sont formées dans les pycnides

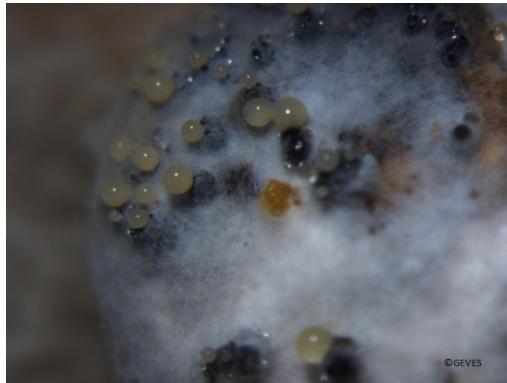


Fig. 2. Aspect de pycnides de *Phomopsis* spp

- Type Alpha : spores claires, unicellulaires, fusiformes, droites à elliptiques. Elles mesurent 4.9 – 9.8 x 1.7 – 3.2 μ (Fig.3)

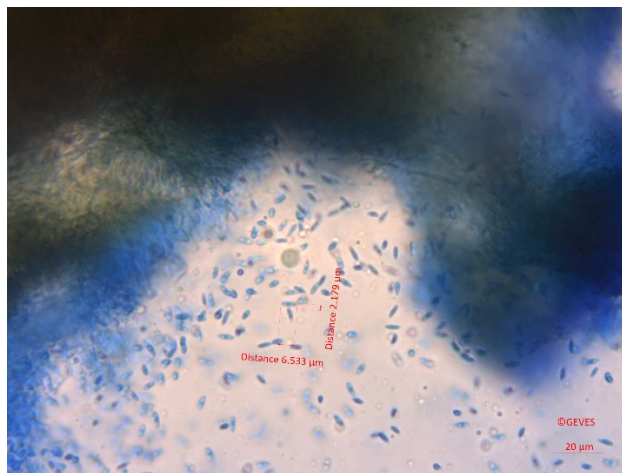


Fig.3. Aspect des α conidies *Phomopsis* spp

- Type Beta : spores claires, minces, filiformes, quelques fois recourbées. Elles mesurent 20-30x0.5-1 μ (cf. Fig.4)

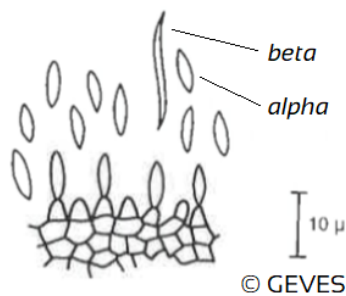


Fig.4. Aspect conidies α et β *Phomopsis* spp

- La majorité des pycnides produisent seulement des conidies alpha, peu produisent des conidies alpha avec quelques conidies beta, les conidies beta sont rarement produites seules.

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

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 Préparation du NaOCl à 1% de Chlore actif

A partir d'hypochlorite de sodium liquide

Produits	Quantité pour 1 L
Hypochlorite de sodium à 15 % de chlore actif (47° chlorométrique)	67 mL
Eau	933 ml
Hypochlorite de sodium à 17 % de chlore actif (54° chlorométrique)	59 mL
Eau	941 mL

Après test au laboratoire, cette solution d'hypochlorite de sodium se conserve 3 jours à température ambiante.

12.2 Préparation de Milieu PDA acidifié

PRODUITS	Quantité pour 1L
PDA	39.0g
Eau	Qsp 1L

Verser la quantité de PDA dans un récipient autoclavable

Compléter Qsp 1L avec de l'eau osmosée

Chauffer pour dissoudre le PDA dans l'eau

Autoclaver le mélange à 121°C/ 15 psi pendant 15 min

Laisser refroidir jusque 50°C

Ajuster le pH à 4,5 avec de l'acide lactique (préparation stérile)

Couler le milieu en boite de Petri à raison de 18 à 22 ml par boite de 90mm de diamètre.

Laisser solidifier pendant 24h avant emploi.

Les boites de PDA acidifié sont à conserver entre 4°C et 22°C pour une durée n'excédant pas 3 semaines.

12.3 Bibliographie

7-016: Détection de complexe de *Phomopsis* sur semences de *Glycine max* (soja), méthode ISTA, L'Association Internationale d'Essais de Semences (ISTA) Zürichstr. 50, 8303 Bassersdorf, Suisse

12.4 Crédits

Fig.1. Aspect des colonies de *Phomopsis* complex © GEVES – Mai 2021 Tous droits réservés.

Fig.2. Aspect de pycnides de *Phomopsis* spp © GEVES – Mai 2021 Tous droits réservés

Fig.3. Aspect des α conidies *Phomopsis* spp © GEVES – Mai 2021 Tous droits réservés

Fig.4. Aspect conidies α et β *Phomopsis* spp © INRA 1997, in « Identifier les champignons transmis par les semences », de Rémi Champion