

Méthode d'analyse

En santé des végétaux

Référence : M-GEVES/SV/MO/007

Version : 1.0

Novembre 2024

Détection et identification de *Bruchus pisorum* sur semences de pois (*Pisum sativum*), de *Bruchus rufimanus* sur semences de fève (*Vicia faba*) et d'*Acanthoscelides obtectus* sur semences de haricot (*Phaseolus vulgaris* et *Phaseolus coccineus*)

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

Laboratoire National de Référence : Insectes, acariens phytopathogènes et auxiliaires : « Bruches réglementées non de quarantaine des semences vraies »

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 : GEVES, Méthode d'analyse en santé des végétaux, Détection et identification de bruches sur semences de *Pisum sativum*, *Vicia Faba*, *Phaseolus Vulgaris* et *Phaseolus coccineus*; M-GEVES/SV/MO/007, 1.0 ; © 2024.

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 1 - Récapitulatif des différentes versions de la méthode.

Version	Date	Type de modification	Principales modifications
1.0	Novembre 2024	NA	Création

Sommaire

1	Introduction	4
1.1	Validation de la méthode	4
1.2	Caractéristiques de performance de la méthode	4
2	Avertissements et précautions de sécurité	4
3	Objet et domaine d'application	5
4	Termes, sigles et définitions	5
5	Principe de la méthode	5
6	Matériel	6
7	Echantillons	7
7.1	Taille, conditionnement	7
7.2	Conservation avant analyse	7
7.3	Critères d'acceptation	7
8	Mode opératoire	7
8.1	Inspection visuelle	7
8.2	Etape optionnelle d'inspection de la morphologie interne des semences	8
8.2.1	Détection par Radiographie 2D	8
8.2.2	Détection par dissection	9
8.2.2	Identification et résultats pour l'inspection de la morphologie interne des semences	9
8.3	Identification des espèces cibles	9
9	Report des résultats	11
10	Devenir des reliquats d'échantillon après analyse	11
11	Annexes	11
11.1	Bibliographie	11
11.2	Crédits (photos)	12

1 Introduction

L'état sanitaire des semences se réfère à la présence ou à l'absence des organismes provoquant des maladies, tels que les champignons, bactéries et virus, ainsi que des parasites animaux, y compris des nématodes et des insectes.

L'interrelation "insectes nuisibles et semences" est un problème réel et croissant. Les dommages causés par les insectes nuisibles sur les semences, tant pour le semis que pour la consommation, peuvent entraîner des pertes importantes avec des conséquences sur l'économie et la sécurité alimentaire. Ceci est particulièrement vrai dans les systèmes de stockage des semences où une récolte entière peut être détruite en quelques mois. De plus, les semences peuvent être un vecteur important de propagation d'insectes impactant ainsi la biosécurité. Les restrictions imposées par les pays sur l'importation de lots de semences sont donc de plus en plus strictes afin d'empêcher l'importation de lots de semences de mauvaise qualité et d'espèces d'insectes non endémiques et/ou invasives.

Cette méthode permet la détection et l'identification de *Bruchus pisorum*, *Bruchus rufimanus* et *Acanthoscelides obtectus*, insectes cibles selon le règlement d'exécution 2019/2072 de la commission européenne, respectivement dans les semences de pois, féverole et haricot, dont la circulation sur le territoire de l'Union Européenne exige un passeport phytosanitaire. Ce règlement stipule qu'une inspection visuelle doit être réalisée sur un échantillon représentatif de semences au moment le plus opportun pour détecter l'organisme nuisible, ceci afin de prévenir la présence d'insecte(s) cible(s) sur les semences.

La méthode consiste en une inspection visuelle d'un échantillon de semences pour détecter l'organisme nuisible.

Une étape optionnelle d'inspection de la morphologie interne des semences par radiographie ou dissection permet de détecter la présence éventuelle d'organisme nuisible caché à l'intérieur des semences. En effet, les bruches peuvent se retrouver sous forme adulte à l'extérieur des semences ou sous forme adulte ou larvaire à l'intérieur des semences.

Les bruches sont relativement spécifiques d'une espèce végétale, néanmoins elles peuvent également être présentes sur d'autres espèces de plantes. Par exemple, les bruches détectées dans une analyse de *Pisum sativum* ne sont donc pas obligatoirement de l'espèce *Bruchus pisorum*.

En l'absence de données concernant la taille de l'échantillon pour la représentativité sur le lot de semences, les résultats seront uniquement garantis sur l'échantillon fourni.

1.1 Validation de la méthode

Cette méthode a été développée par l'unité technique détection de bioagresseurs du Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences (GEVES).

Les données de validation de cette méthode, présentée dans le chapitre 1.2, sont issues du rapport de validation du GEVES (ANA/APHY/VAL/E/009).

1.2 Caractéristiques de performance de la méthode

Sensibilité analytique : 1 bruche libre
Spécificité analytique : 100%
Sensibilité diagnostique : 100%
Accordance (répétabilité) : 100%
Concordance (reproductibilité) : 100%
Sélectivité : 100%
Spécificité diagnostique : 100%
Exactitude : 100%.

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.

L'utilisation des rayons X est soumise à la réglementation en vigueur et doit être faite dans le respect des prescriptions du fabricant.

Il est attiré l'attention sur le risque de dissémination dans l'environnement des organismes nuisibles. L'utilisateur veillera donc à prendre toutes les dispositions nécessaires pour garantir la non-dissémination d'organismes nuisibles (notamment et sans que cette liste soit exhaustive : ouvrir les échantillons uniquement dans l'enceinte du laboratoire, confiner les échantillons stockés...).

3 Objet et domaine d'application

Cette méthode qualitative permet de détecter dans un échantillon, prélevé sur le lot, la présence éventuelle d'insecte cible vivant (insecte montrant une mobilité) :

- En inspectant visuellement un échantillon de semences pour détecter l'insecte cible vivant.
- En inspectant visuellement la morphologie interne des semences par radiographie ou dissection afin de détecter la présence de l'insecte cible vivant à l'intérieur des semences (optionnel).

Cette méthode s'applique aux pathosystèmes suivants :

- *Acanthoscelides obtectus* (Say) / *Phaseolus coccineus* (L.)
- *Acanthoscelides obtectus* (Say) / *Phaseolus vulgaris* (L.)
- *Bruchus pisorum* (L.) / *Pisum sativum* (L.) (partim)
- *Bruchus rufimanus* (L.) / *Vicia faba* (L.)

Cette méthode est applicable aux semences non traitées ou traitées.

Cette méthode n'est pas applicable aux semences enrobées.

Cette méthode permet l'identification des insectes cibles au stade adulte uniquement.

4 Termes, sigles et définitions

GEVES : Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences

LNR : Laboratoire National de Référence

ISTA : International Seed Testing Association

5 Principe de la méthode

Le principe de la méthode consiste en un examen visuel d'un échantillon soumis de 2 500 semences (maximum +10%) ou d'au minimum le poids décrit dans la colonne 4 du tableau 2C des Règles ISTA (poids échantillon de travail pureté, maximum +10%). L'échantillon doit être envoyé dans un contenant fermé pour éviter la perte/dissémination des semences et insectes.

Si aucun insecte cible vivant n'est détecté, une étape optionnelle d'analyse par radiographie 2D ou par dissection sur un sous-échantillon de 400 semences peut être réalisée pour détecter l'éventuelle présence d'insecte cible à l'intérieur des semences.

Si un insecte adulte vivant est détecté, une étape d'identification permet d'aboutir à deux résultats possibles au regard des 3 espèces cibles de cette méthode : présence d'insecte(s) cible(s) vivant(s) (genre et/ou espèce spécifique) ou présence d'insecte(s) non-cible(s) vivant(s).

La méthode peut être décrite de la façon suivante :

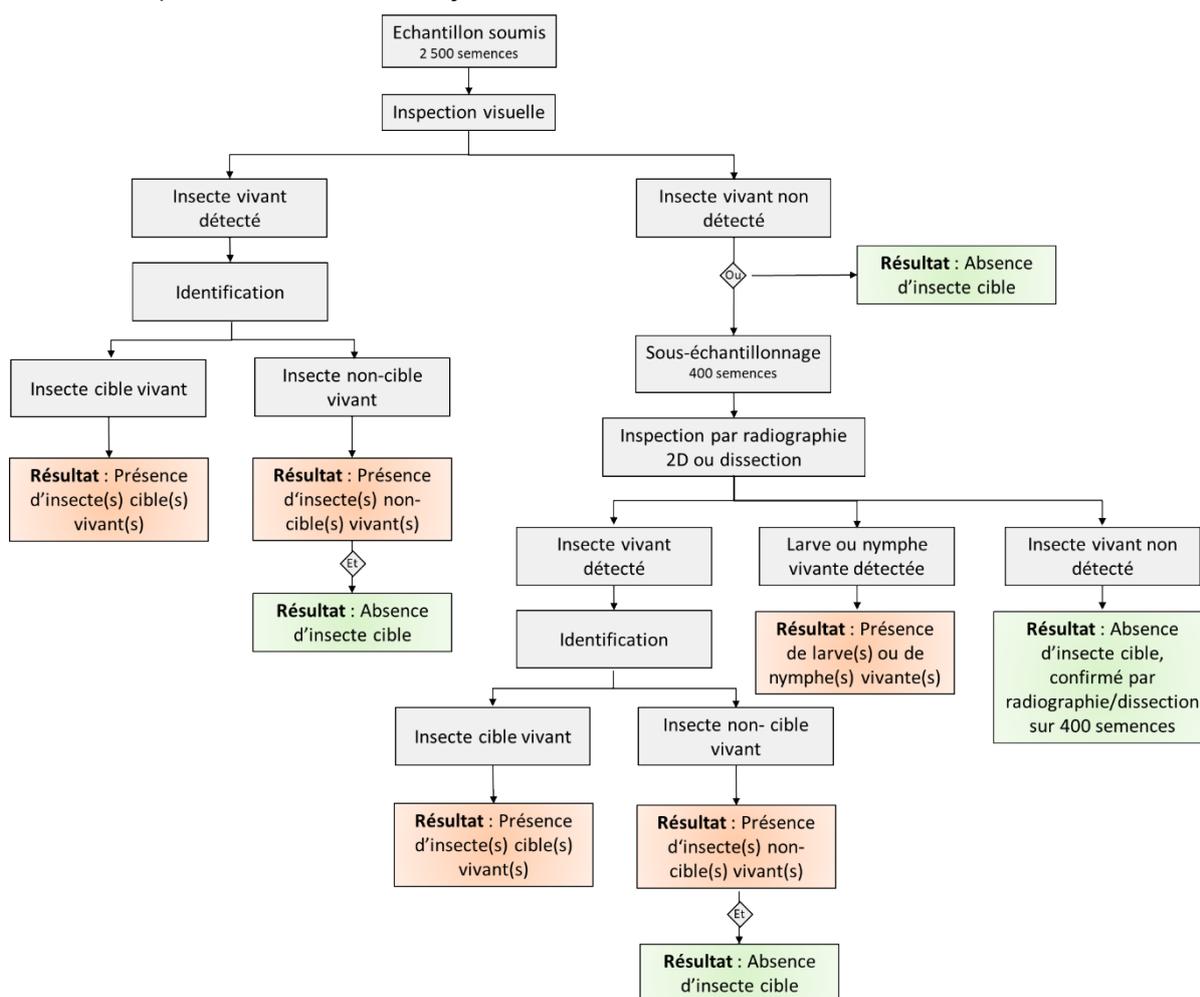


Figure 1 - Principe de la méthode de détection et d'identification de bruches sur semences de pois, féveroles et haricots

6 Matériel

- Coupelles et contenants refermables
- Outils de manipulation des semences : pinces, scalpel, spatules...
- Loupes d'un grossissement adapté à l'espèce analysée dont loupe binoculaire
- Microscope stéréoscopique
- Système de radiographie 2D, support pour semences, ordinateur
- Réfrigérateur (5°C ± 4 °C)
- Collection de bruches de référence ou fiche technique de reconnaissance (optionnel)

7 Echantillons

7.1 Taille, conditionnement

L'échantillon soumis doit être d'au minimum 2 500 semences (maximum +10%) ou d'au minimum le poids décrit dans la colonne 4 du tableau 2C des Règles ISTA (poids échantillon de travail pureté, maximum +10%). Dans le cas de petits lots de semences (règles ISTA chapitre 2.2.14), l'analyse sera effectuée sur la totalité de l'échantillon soumis et cela sera indiqué lors du report des résultats. L'échantillon doit être envoyé dans un contenant fermé pour éviter la perte et/ou la dissémination des semences et insectes.

7.2 Conservation avant analyse

Avant analyse, les échantillons sont stockés à 4°C (+/- 2°C) entre 16h et 48h afin d'immobiliser temporairement les insectes éventuellement présents.

7.3 Critères d'acceptation

Le sachet contenant l'échantillon doit être en parfait état de conservation, fermé et sans humidité. L'identité de l'espèce végétale à analyser doit correspondre à celle déclarée par le préleveur.

8 Mode opératoire

8.1 Inspection visuelle

Récupérer l'échantillon soumis placé pendant 16h minimum à 4°C (+/- 2°C) afin d'immobiliser les insectes éventuellement présents. Attention les bruches retrouvent leur mobilité après quelques minutes à température ambiante.

❖ Réalisation de l'examen

L'échantillon est examiné, si besoin à l'aide d'une loupe (un grossissement x3 est suffisant), pour détecter l'éventuelle présence d'insecte. Si un insecte est détecté, il est alors placé dans un contenant refermable transparent ou dans un tube transparent contenant de l'alcool. Tout mouvement de l'insecte permettra de conclure à sa viabilité.

Si l'étape optionnelle d'analyse par radiographie 2D ou par dissection est prévue, mettre de côté les semences douteuses (forage non vide, forage fermé, ...) dans un sachet à part.

❖ Identification

Si au moins un insecte vivant a été détecté au cours de l'inspection visuelle, une identification doit être réalisée pour déterminer si l'insecte détecté correspond ou non à l'espèce cible. Pour l'identification, se référer au chapitre 8.3.

❖ Résultats

- Si au cours de l'analyse par inspection visuelle, **au moins un insecte cible vivant a été identifié**, l'analyse est terminée. Passer au chapitre 10 « Report des résultats ».
- Si au cours de l'analyse par inspection visuelle, **aucun insecte vivant n'a été détecté** soit :
 - L'analyse est terminée. Passer au chapitre 10 « Report des résultats ».
 - L'étape optionnelle d'analyse par radiographie 2D ou par dissection est réalisée. En effet, en l'absence d'insecte vivant détecté et/ou en présence de nombreux symptômes (forages) observés au cours de l'inspection visuelle, une analyse de la morphologie interne des semences peut être menée sur le même échantillon pour lever le doute.

8.2 Etape optionnelle d'inspection de la morphologie interne des semences

Cette étape peut être réalisée par radiographie 2D (8.2.1) ou par dissection (8.2.2).

8.2.1 Détection par radiographie 2D

Récupérer l'échantillon soumis placé à 4°C (+/- 2°C), entre 16h et 48h avant cette étape afin d'immobiliser les insectes éventuellement présents. Attention les bruches retrouvent leur mobilité après quelques minutes à température ambiante.

Répartir les semences douteuses mises de côté durant l'analyse visuelle, puis d'autres semences prélevées au hasard, parmi les 2 500 semences, jusqu'à atteindre 400 semences, sur un(des) support(s) pour semences adapté(s).

Réaliser la radiographie 2D. Des essais préalables sur les paramètres d'acquisition peuvent être nécessaires. A titre d'exemple :

- Voltage = 20 kV
- Durée d'acquisition = 12 secondes
- 50 semences / cliché.

Pour chaque image réalisée, évaluer visuellement la présence de semences infectées par des insectes. La radiographie 2D permet d'observer la structure interne des semences et donc la présence éventuelle d'insectes. Le symptôme caractéristique causé par les bruches est un « forage » (figure 2) à l'intérieur des semences pouvant abriter un insecte à différents stades de développement (figure 3).

En cas de présence de semence infestée, isoler la semence dans un pot refermable à température ambiante. Dans un délai maximum de 4h, extraire l'insecte de la semence :

- Si l'insecte est adulte, il est placé dans un contenant refermable transparent ou dans un tube transparent contenant de l'alcool. Tout mouvement de l'insecte permettra de conclure à sa viabilité.
- Si l'insecte est au stade de larve ou de nymphe, il est possible d'évaluer sa viabilité en observant des mouvements. En cas de doute, il est possible de découper la larve, si elle est vivante un écoulement d'hémolymphe est observé. Si la larve est morte, la découpe sera sèche.

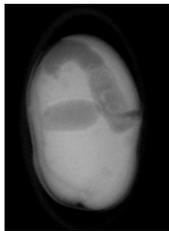


Figure 2 : Photo de radiographie 2D de semence de haricot présentant 2 forages vides

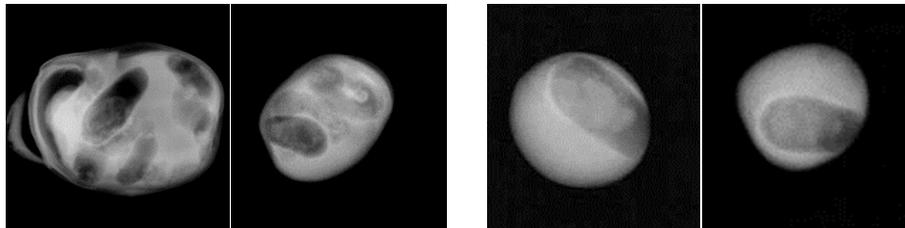


Figure 3 : Photos de radiographie 2D de semences de féverole et de pois infestées de bruche

8.2.2 Détection par dissection

Récupérer l'échantillon soumis placé à 4°C (+/- 2°C), entre 16h et 48h avant cette étape afin d'immobiliser les insectes éventuellement présents. Attention les bruches retrouvent leur mobilité après quelques minutes à température ambiante.

Couper les semences en 2, au niveau des cotylédons si possible, en commençant par les semences douteuses mises de côté durant l'analyse visuelle. Pour chaque semence disséquée, évaluer visuellement la présence de semences infectées par des insectes.

La dissection permet d'observer la structure interne des semences et donc la présence éventuelle d'insectes. Le symptôme caractéristique causé par les bruches est un « forage » à l'intérieur des semences pouvant abriter un insecte à différents stades de développement.

En cas de présence de semence infestée, isoler la semence dans un pot refermable à température ambiante. Si un insecte vivant adulte est détecté à l'intérieur d'une semence isolée, il est alors à confiner dans un pot refermable à température ambiante pour identification.

En cas de présence de larve, l'identification est impossible. La présence de larve sera signalée dans le résultat.

8.2.3 Identification et résultats pour l'inspection de la morphologie interne des semences

❖ Identification

Si au moins un insecte adulte vivant a été détecté au cours de l'inspection de la morphologie interne des semences, l'identification doit être réalisée pour déterminer si l'insecte détecté correspond ou non à l'espèce cible. Pour l'identification, se référer au chapitre 8.3.

L'identification de larve ou de nymphe est impossible. La présence de larve ou de nymphe vivante sera signalée dans le résultat.

❖ Résultats

- Si au cours l'analyse par radiographie ou dissection, **au moins un insecte cible vivant a été identifié**, l'analyse est terminée. Passer au chapitre 10 « Report des résultats ».
- Si au cours l'analyse par radiographie ou dissection, **aucun insecte cible vivant n'a été identifié**, l'analyse est terminée. Passer au chapitre 10 « Report des résultats ».
- Si au cours de l'analyse par radiographie, **la présence de larve ou nymphe vivante a été détectée**, l'analyse est terminée. Passer au chapitre 10 « Report des résultats ».

8.3 Identification des espèces cibles

Les insectes détectés doivent être observés afin de déterminer si leur identification correspond à l'espèce cible. Voir le support de la morphologie d'une bruche (figure 4), les descriptions des 3 espèces cibles ci-dessous (figure 5) et éventuellement se référer à la collection d'insectes de référence. L'identification doit être réalisée le plus précisément possible.

L'analyse est terminée dès qu'un insecte cible vivant est identifié.

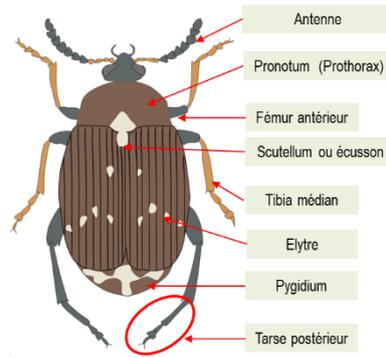


Figure 4 : Morphologie générale d'une bruche



Photo 1 : *Bruchus pisorum*

a) *Bruchus pisorum* (photo 1)

Petit coléoptère dont l'adulte mesure 4 à 4,5 mm avec des élytres bruns parsemés de taches blanchâtres et roussâtres. La partie basale des antennes est jaune à rougeâtre (les quatre premiers articles), la partie apicale noire. Le pronotum présente une dent sur les bords latéraux. Le pygidium est blanchâtre avec 2 grandes taches noires. Les fémurs antérieurs sont noirs. Les tibias antérieurs sont jaunes à rougeâtres, les tibias médians et antérieurs sont simples (non courbés) et rougeâtres.

Chez le mâle, le tibia médian présente une seule épine tranchante à l'apex.



b) *Bruchus rufimanus* (photo 2)

Petit coléoptère dont l'adulte mesure 3,5 à 5 mm avec des élytres noirs parsemés de taches grisâtres. La partie basale des antennes est rouge (les quatre premiers articles), la partie apicale noire. Le pronotum présente une dent sur les bords latéraux. Le pygidium est de couleur gris pâle. Le scutellum est blanchâtre. Les pattes antérieures jaunes à rougeâtres. Les pattes médianes et postérieures sont noires. Les tibias postérieurs sont munis d'une longue pointe à l'angle interne.

Chez le mâle, le tibia médian est galbé et présente une seule épine tranchante à l'apex.

Photo 2 : *Bruchus rufimanus*



c) *Acanthoscelides obtectus* (photo 3)

Petit coléoptère dont l'adulte mesure 3 à 4 mm avec des élytres tronqués de couleur brun roussâtre ou gris verdâtre, des taches longitudinales, et présentant une bordure postérieure rouge. Les 5 premiers articles des antennes et le dernier roux, les autres sont noirs. Le pronotum ne présente pas de dent sur les bords latéraux. Le fémur postérieur est muni d'une forte dent crénelée suivie de 2 petites dents. Les pattes sont jaunes rouges.

Photo 3 : *Acanthoscelides obtectus*

Figure 5 : photos et descriptions de *Bruchus pisorum* (a), *Bruchus rufimanus* (b) et *Acanthoscelides obtectus* (c)

9 Report des résultats

Le nombre de semences ou le poids de l'échantillon analysé doit être reporté dans les résultats. Cette méthode de détection étant qualitative, le résultat est exprimé en termes de présence ou d'absence de l'espèce d'insecte cible :

- a) Si au moins un insecte cible vivant a été identifié lors de l'inspection visuelle, ou éventuellement lors de l'inspection interne, il est indiqué : Présence de « *nom de genre et d'espèce* » (espèce cible).
- b) Si au moins un insecte non-cible vivant est détecté, il est indiqué « Absence de « *nom de genre et d'espèce* » (espèce cible) et « Présence d'insecte(s) vivant(s) non-cible(s) ».
- c) Si aucun insecte cible n'a été détecté durant l'inspection visuelle, il est indiqué : Absence de « *nom de genre et d'espèce* » (espèce cible).
- d) Si aucun insecte cible n'a été détecté durant l'inspection visuelle ni lors de l'inspection interne, il est indiqué : Absence de « *nom de genre et d'espèce* » (espèce cible) confirmée par radiographie ou dissection sur 400 semences.
- e) Si au moins une larve ou nymphe d'insecte vivante est détectée, il est indiqué « Présence de larve(s) ou de nymphe(s) vivante(s) d'insecte(s) ».

10 Devenir des reliquats d'échantillon après analyse

Après analyse, les échantillons doivent être conservés pendant 1 an dans les conditions de stockage permettant de conserver la composition de l'échantillon et d'éviter tout risque de dissémination (utilisation d'un sac hermétique ou traitement pour tuer les éventuels insectes vivants sans altérer les critères permettant de les identifier).

11 Annexes

11.1 Bibliographie

- HOFFMANN A. (1945) – Coléoptères Bruchides et Anthribides. Faune de France 44. Fédération des sociétés de Sciences naturelles.
- BALACHOWSKY A. (1962) – Entomologie appliquée à l'agriculture. Masson et Cie.
- ZAMPETTI MF and RICCI M.S. (2012) – Guida ai Coleotteri Bruchidi della Fauna Italiana. Darwin Edizioni.
- DU CHATENAT G. (2014) – Anthribidae, Bruchidae, Curculionidae Entiminae. Coléoptères phytophages d'Europe III. NAP Editions.
- TRONQUET M. (2014) – Catalogue des coléoptères de France. Association Roussillonnaise d'Entomologie.
- Règlement d'exécution (UE) 2019/2072 de la commission du 28 novembre 2019 (journal officiel de l'Union Européenne), version du 15 août 2024.
- Règlement (UE) 2016/2031 du parlement européen et du conseil du 26 octobre 2016 (journal officiel de l'Union Européenne), version du 14 décembre 2019.
- Règles ISTA 2024

11.2 Crédits (photos)

Figure 2 : Photo de radiographie de semence de haricot présentant 2 forages vides / © GEVES 2022
Tous droits réservés

Figure 3 : Photos de radiographie de semences de féverole et de pois infestées de bruche / © GEVES
2019 Tous droits réservés.

Figure 4 : Morphologie générale d'une bruche / © GEVES 2022 – Tous droits réservés

Photo 1 : *Bruchus pisorum* / © GEVES 2022 – Tous droits réservés

Photo 2 : *Bruchus rufimanus* / © U.Schmidt 2020

Photo 3 : *Acanthoscelides obtectus* / © U.Schmidt 2011