

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**DEVELOPPEMENT D'OUTILS POUR L'ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ
DES NOUVELLES MÉTHODES DE TRAITEMENTS**

G. ORGEUR ⁽¹⁾ ; I. SERANDAT ⁽¹⁾ ; S. PERROT ⁽¹⁾ ; G. FORSBERG ⁽²⁾ ; J. GOMBERT ⁽³⁾ et V. GRIMAUT ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire de Pathologie GEVES-SNES, rue Georges Morel, BP 9024, 49071 BEAUCOUZE, France.
geoffrey.orgeur@geves.fr; isabelle.serandat@geves.fr ; perrot.sophie@geves.fr; valerie.grimault@geves.fr

⁽²⁾ Incotec Field Crops, Europe, Fågelbacksvägen 3, 756 51 UPPSALA, Suède

⁽³⁾ FNAMS, Impasse du Verger. 49800 BRAIN SUR L'AUTHION.

RÉSUMÉ

La réduction du recours aux produits phytosanitaires étant un des objectifs du plan Ecophyto, de nombreux acteurs de la filière développent des solutions alternatives de traitements afin de respecter les objectifs fixés. C'est à ce titre que le GEVES souhaite apporter son expertise professionnelle sur l'évaluation de l'efficacité de ces nouvelles méthodes. Dans ce sens, la capacité de transmission du pathogène de la semence à la plantule (maîtrise du pathosystème) est évaluée et l'efficacité de ces méthodes alternatives est jugée. La viabilité et la nuisibilité des pathogènes peut être mesurée à travers des méthodes de détection existantes (Grow out, culture sur milieux gélosés ...) mais demande également le développement de nouvelles méthodes complémentaires (coloration vitale, bio test...). Tous ces outils ont été développés au laboratoire de pathologie du GEVES afin de répondre aux attentes des apporteurs de solutions et d'évaluer l'efficacité de ces nouveaux produits de lutte contre les bio-agresseurs. Plus que jamais, les agents pathogènes présents sur les semences doivent être détectés mais leur potentiel de nuisibilité doit également être considéré.

Mots-clés : traitements alternatifs-efficacité-pathosystème-viabilité-nuisibilité.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF TOOLS FOR EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF NEWS METHODS OF TREATMENT

To achieve one of the objectives of the Ecophyto plan, which is to reduce the use of phytosanitary products, many professionals in the sector are currently developing alternative methods of treatment. GEVES would like to offer its professional expertise in the evaluation of the effectiveness of these alternative treatment methods. To reach this goal, the capacity of transmission of the pathogen from seed to plant (pathosystem) is being evaluated and the effectiveness of these alternative treatment methods is being assessed. Viability and damage potential of the pathogens can be evaluated using the existing detection methods (grow out, culture on media...) but there is also a need to develop new complementary methods (vital staining, bio test ...). All these tools have been developed in the pathology laboratory of GEVES in order to meet the needs of the solution's providers and to evaluate the effectiveness of these new products against pests. More than ever before, the presence of pathogens on seeds needs to be detected and their damage potential needs to be assessed.

Keywords: alternative treatments-effectiveness-pathosystem-viability-damage potential.

INTRODUCTION

Un des enjeux majeurs de la filière semences est la protection des semences par traitement ou désinfection contre les bio-agresseurs. L'application de ces traitements permet de réduire les pertes en protégeant la semence et en proposant des semences saines.

La protection des semences risque de se retrouver face à un manque sérieux de molécules, avec notamment le risque de retraits de produits commerciaux d'ici à trois ans. Lors du Grenelle de l'environnement, un plan Ecophyto a été mis en place visant à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires. Il existe un réel besoin de développer des solutions alternatives de traitements. Les solutions de bio contrôle (biocide, antagoniste, stimulateur de défense naturelle...), les traitements physiques (Thermothérapie, balayage électronique, brossage...), les traitements chimiques alternatifs (désinfection superficielle...) pour les productions végétales commencent à se développer.

Ces nouvelles méthodes alternatives de traitements tuent mais n'éliminent pas les bio-agresseurs, autrement dit le pathogène demeure présent sur la semence mais n'est plus nuisible pour la culture. Certaines méthodes de détection n'utilisent pas la capacité de développement des agents pathogènes (méthodes sérologiques et observation directe) et ne permettent donc pas de connaître la viabilité des bio-agresseurs (R. Champion, 1997).

Pour répondre à cette problématique, l'évaluation de la viabilité a été étudiée. De nombreux pathosystèmes ont été maîtrisés sur le principe du grow out afin d'évaluer l'efficacité des solutions alternatives de traitements dans le cadre d'un programme de recherche national nommé Aseeds.

D'autres méthodes ont également été développées pour *Tilletia caries*, responsable de la carie commune du blé (Vanova *et al.*, 2006) et *Ditylenchus dipsaci*, nématode de la tige chez la luzerne (Volvas *et al.*, 2011).

Concernant *Tilletia caries*, une méthode de coloration vitale (Orgeur *et al.* 2012) a été mise au point dans le cadre d'un projet de recherche Européen (7th Framework programme) nommé TESTA. Cette méthode a été comparée à une méthode de germination des spores sur milieu gélosé (Boyd and Carris, 1997). Les modalités spores vivantes et spores mortes ont été testées au champ afin d'évaluer la transmission du pathogène de la semence à la plantule par l'observation de l'expression des symptômes sur épis. En parallèle, une méthode de détection précoce par PCR a été développé sur plantules.

Dans le cas de *Ditylenchus dipsaci*, des essais méthodologiques ont été réalisés afin de différencier les nématodes vivants (potentiellement nuisibles) des morts. Des essais ont été réalisés sur des lots contaminés et traités par thermothérapie (Serandat *et al.*, 2013). L'efficacité de cette méthode va ainsi être évaluée. La réalisation de bio test sur plantules de luzerne a été développée dans le but d'évaluer la nuisibilité des nématodes sur plantules de luzerne.

MATERIEL ET MÉTHODE

Afin d'évaluer l'efficacité de produit de traitement, il est impératif de maîtriser le pathosystème (couple hôte-pathogène) autrement dit la transmission du pathogène de la semence à la plantule.

Deux cas de figure sont possible : soit disposer de semences naturellement contaminées (ce qui est assez rare) soit réaliser une contamination artificielle de semences. Pour ce faire, l'étape initiale passe par la production d'inoculum. Le pathogène étudié est donc multiplié dans le but de contaminer artificiellement un lot de semence. Une fois les semences infectées par le pathogène cible, sur le principe de la méthode dite « grow out », un semi est réalisé en conditions contrôlés favorables à la transmission du pathogène de la semence à la plantules. L'objectif étant d'observer les symptômes sur plantules.

La mise au point de pathosystème permet ainsi d'évaluer la résistance des variétés mais surtout d'évaluer l'efficacité d'un produit de traitement qu'il soit chimique ou alternatif (la thermothérapie, les solutions biocides ou encore les solution de stimulation des défenses naturelles des plantes).

1- LA CARIE COMMUNE : TRANSMISSION DE PATHOGENE DE LA SEMENCE A LA PLANTULE

a. Contrôle de la viabilité des spores

La capacité du pathogène à infecter les plantules a été évaluée au cours de trois années de tests en comparant l'expression des symptômes sur épis entre les conditions spores viables et spores mortes. La viabilité des spores a été évaluée par l'intermédiaire d'un test de coloration vitale et d'un test de germination (Figure 1-a et 1-b) (Orgeur *et al.* 2012). Les observations ont été menées sur 400 spores par répétition et par méthode à raison de trois répétitions par modalité.

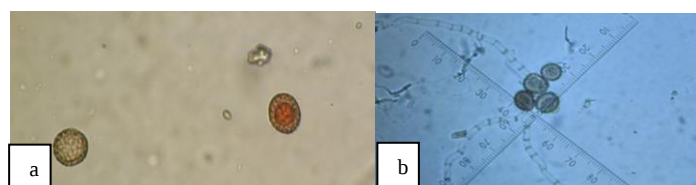


Figure 1 : Evaluation de la viabilité des spores de *Tilletia caries*

Evaluation of the viability of spores of *Tilletia caries*

a) Coloration vitale (spores vivantes colorés en rouge) / b) Germination (spores vivantes forment un tube de germination)
a) Vital staining (spores alive stained in red) / b) Germination (spores alive with a germination tube)

b. Expression des symptômes aux champs et détection précoce par PCR

Un biotest favorisant la transmission du pathogène de la semence à la plantule en conditions contrôlées a été mis au point. Différent taux de contamination (Tableau I) ont été appliqués sur semence de blé entre 2012 et 2014 afin de démontrer l'impact des spores viables comparé aux spores mortes (2012, 2013 et 2014) sur l'expression de la maladie.

Tableau I : Contaminations artificielles des semences sur les 3 dernières années.

Artificial infection of seeds during the three last years.

		Taux de Contamination théorique en spores/semences		
Pathogène	Spores Viables	2012	2013	2014
<i>Tilletia caries</i>	Oui			1
	Oui			5
	Oui	Naturellement infecté	100	10
	Oui	1000	1000	25
	Oui	10 000	10 000	1000
	Non	10 000	10 000	1000
Témoin Sain		0	0	0

Les semences artificiellement contaminées ont été placées en conditions contrôlées jusqu'au stade deux feuilles. Une partie des effectifs a été transféré au champ et en serre jusqu'à l'expression des symptômes sur épis. Une seconde partie a été utilisée afin de mettre au point une méthode de détection précoce par PCR sur plantule.

L'établissement de taux de contamination fort permettant de servir de témoin positif (10 000 et 1 000 spores viables) et l'établissement de taux de contamination faibles (1, 5, 10 et 25 spores viables par semence) permettant de juger de la capacité du pathogène *Tilletia caries* à contaminer une parcelle à l'année N+1. Afin de confirmer les résultats des précédentes années, la modalité spores mortes a également été testée.

Les notations ont été faites sur la totalité de chaque parcelle au stade grain laitieux. La fréquence d'épis présentant des symptômes de carie a été déterminée sur la totalité des 100 plantes par modalité et confronté au résultats de détection par PCR.

2- DITYLENCHUS DIPSACI : EVALUATION DE LA VIABILITE DES NEMAOTDE ET DOMMAGE SUR PLANTULES

a. Traitement par thermothérapie de lots de luzerne contaminés

Trois lots de semences de luzerne contaminés a different taux sont sélectionnés.

- Faiblement contaminé: Prospera
- Moyennement contaminé: Fravert
- Fortement contaminé: Robot

Les trois lots sont échantillonnés en 5 sous échantillons de 500g, soit 2,5Kg par lot, dans le but d'obtenir un témoin non traité et 4 répétitions traitées par thermothérapie.

Après désinfection par thermothérapie, chaque échantillon est sous échantillonné en 5 x 100 g pour réaliser une analyse de détection de nématodes afin de dénombrer le nombre de nématodes vivants et morts presents.

La méthode de detection utilisée pour l'identification des *Ditylenchus dipsaci* est la méthode officielle ANSES MOA 013 (Annexe1). Cette méthode est basée sur le trempage des semences de luzerne dans de l'eau afin de favoriser la migration des nématodes. Une étape de filtration est ensuite réalisée afin de capturer tous les nématodes présents dans l'échantillon.

L'identification des *D. Dipsaci* est réalisée par observation des caractères morphologiques (Tableau II). Un nématode est considéré vivant lorsqu'il nage et mort lorsqu'il est totalement immobile.

Tableau II : Caractère morphologique pour l'identification de *Ditylenchus dipsaci*
Morphological characters for the *Ditylenchus dipsaci* identification

Caractéristiques	En accord avec le bulletin OEPP bulletin 38, 2008		En accord avec Volvas <i>et al</i> , 2011	
	<i>Ditylenchus dipsaci</i> femelle	<i>Ditylenchus dipsaci</i> mâle	<i>Ditylenchus gigas</i> femelle	<i>Ditylenchus gigas</i> mâle
Taille du corps (µm)	1000-1300µm	1000-1300µm	1780µm (1561-1932)	1557µm (1373-1716)
Taille du stylet (µm)	10-12µm	10-12µm	12µm (11.5-13)	11.6µm (11-12.5)
Largeur du corps	36-40µm	37-41µm	48.9µm (43.0-56.4)	56.7µm (34.3-63.0)
Nombre de lignes latérales	4	4	4	4
Position de la Vulve (%)	82% (79-82)	/	81.5% (80-83)	/
distance Vulve-anus (µm)	1 3/4–2 1/4 de la longueur	/	228 (208-266)	/

b. Bio test : potentiel de nuisibilité des *Ditylenchus dipsaci* vivants et morts

Le biotest a été mis au point à partir d'une méthode basée sur l'évaluation de la résistance des variétés (Figure 2-a). Après une étape de prégermination, les plantules (variété sensible) ont été placées sur 2 buvards qui sont roulés en rouleaux à raison de 20 plantules par rouleau et 5 rouleaux par modalité (répétitions).

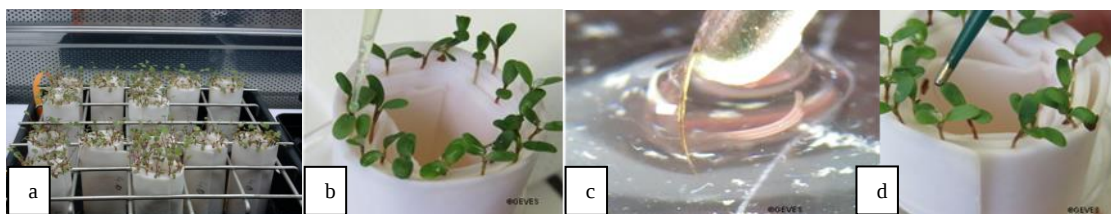


Figure 2 : Bio test sur plantules de luzernes

Bio test on alfalfa plantlets

- a) Plantules de luzernes disposées en rouleau / b) dépôt de la goutte de carboxy-méthyl-cellulose entre les cotylédons /
c) récupération des *Ditylenchus dipsaci* / d) Inoculation des plantules
- a) Alfalfa plantlets arranged in roll / b) deposit of carboxymethylcellulose between the cotyledons /
c) *Ditylenchus dipsaci* fished / d) Inoculation of the plantlets

Une goutte de carboxy-methyl-cellulose a été déposée entre deux cotylédons pour favoriser la pénétration des nématodes dans la plantule (Figure 2-b).

Les larves de *Ditylenchus dipsaci* ont été dénombrées et pêchées (Figure 2-c). Deux jours après la préparation des rouleaux, chaque plantule a été inoculée par dépôt de *Ditylenchus dipsaci* dans la goutte de carboxy-methyl-cellulose entre les cotylédons (Figure 2-d). Le test a été mené en module climatique.

Différentes modalités ont été testées au cours de deux essais. Entre 1, 5 et 10 *Ditylenchus dipsaci* vivants ou morts ainsi que des saprophages ont été déposés sur chaque plantules (Tableau III).

Tableau III : Biotest - Contaminations des plantules de luzerne lors des deux essais.
Biotest - Contamination of the alfalfa plantlets during both tests

Pathogène	Viables	Taux de Contamination en nb de nématode / plantule	
		Essai 1	Essai 2
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Oui	1	1
	Oui	5	
	Oui	10	
	Non	1	
	Non	5	
	Non	10	
Saprophages	Oui		1 à 5
Témoin Sain		0	0

A la fin de l'essai, les plantules atteintes ont été observées et notées sous forme de pourcentage de plantules gonflées (Figure 3).

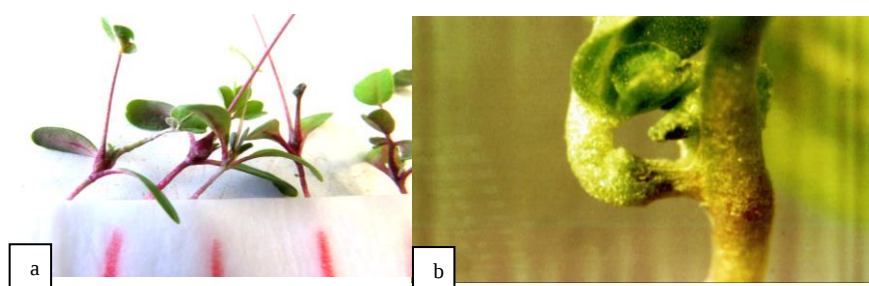


Figure 3 : Aspect des plantules de luzerne après inoculation par *D. dipsaci* vivant

Aspect of the alfalfa plantlets after inoculation by *D. dipsaci* alive

- a) plantules de luzerne gonflées à la fin du bio test/ b) plantule de luzerne gonflée
a) Alfalfa plantlets swollen at the end of the bio test/ b) swollen Alfalfa plantlet

RESULTATS

1- LA CARIE COMMUNE : TRANSMISSION DE PATHOGENE DE LA SEMENCE A LA PLANTULE ET ETUDE DU SEUIL DE NUISIBILITE

a. Contrôle de la viabilité des spores

L'évaluation de la viabilité des spores par coloration et germination est présentée dans la figure 4. Le pourcentage de germination représente les observations après 15 jours d'incubation et le pourcentage de coloration correspond aux observations après 48h d'incubation. Pour une même année, la comparaison entre ces deux méthodes indique que les pourcentages de coloration et de germination sont toujours très proches.

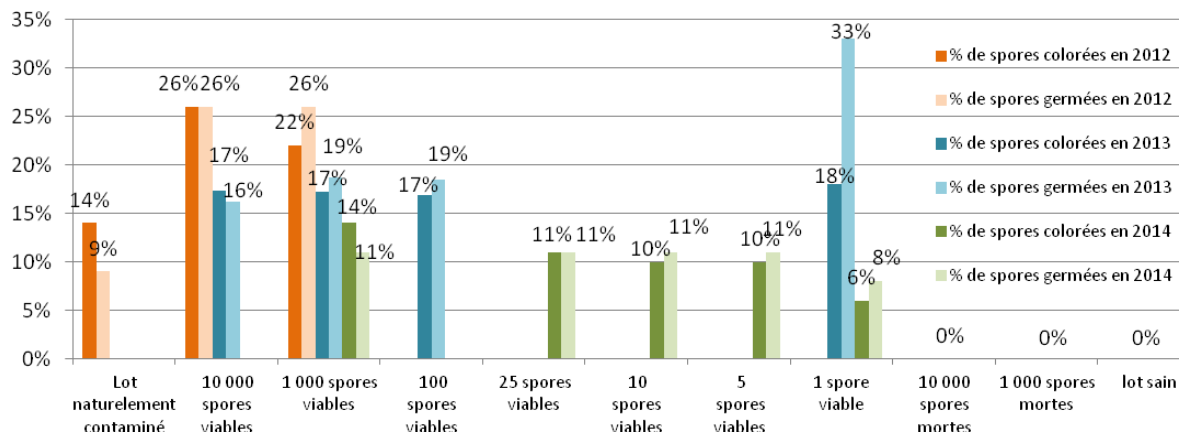


Figure 4: Evaluation de la viabilité des spores des différentes modalités entre 2012, 2013 et 2014
Evaluation of the viability of the spores to the different conditions between 2012, 2013 and 2014

Au cours de ces trois années de tests, la comparaison des deux méthodes a démontré une corrélation entre le pourcentage de germination et le pourcentage de coloration des spores de *Tilletia caries*. La viabilité observée est similaire pour toutes les concentrations, excepté 1 spore viable en 2013 (histogramme bleu). Dans ce cas 33% des spores observées ont germées pour seulement 18 % de spores colorées. Cet écart s'explique est due aux conditions d'échantillonnage : 3 spores ont germé sur un total de 9 spores (33 %) quand seulement 2 spores ont colorées sur un total de 11 spores (18%). Dans le cas d'une faible concentration, le pourcentage de viabilité peut évoluer du simple au double à une spore près.

Ces résultats montrent une légère diminution de la viabilité des spores au cours du temps (entre 2012 et 2014) qui peut s'expliquer par le fait que les spores ont été récupérées sur des épis non matures afin éviter la contamination des parcelles. Aucune spore issue des modalités spores mortes (10 000 et 1000 spores) n'a été en capacité de germer ou d'être colorée.

b. Expression des symptômes aux champs et détection précoce par PCR

La figure 5 représente la compilation des résultats de ces trois dernières années. Au cours de ces essais, le pourcentage d'épis cariés est similaire d'une station à l'autre au cours d'une même saison. En 2012, environ 60 % d'épis cariés sont observés entre les stations de Brain sur l'Authion (49) et Bourges (18) pour la modalité 10 000 spores vivantes par semences et 16 à 17 % d'épis sont atteints pour la modalité 1000 spores vivantes par semences. Notons qu'en 2013, pour la modalité 10 000 spores vivantes par semence, les symptômes sur épis dénombrés sont similaires (environ 60%) à l'année 2012.

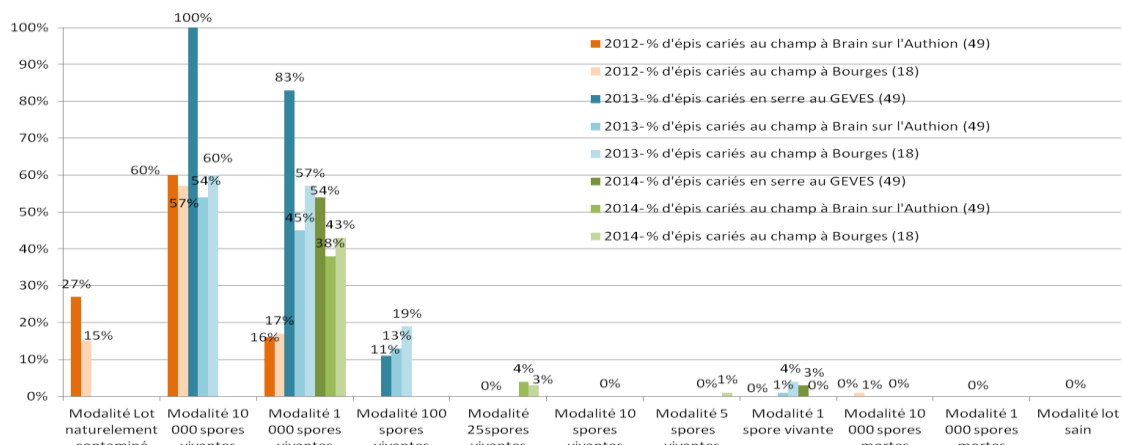


Figure 5 : Compilation des essais aux champs et en serre au cours de 2012, 2013 et 2014
Compilation of tests in field and in greenhouse during 2012, 2013 and 2014

Les pourcentages d'épis cariés observé en serre ont été supérieurs à ceux observés au champ (100% de plantes atteintes en serre contre 60 % au champ pour la modalité 10 000 spores vivantes par semence) s'expliquant par un effectif réduit (30 plantes en serre contre 100 au champ). Cependant la tendance est la même qu'au champ, plus la concentration en spores par semences diminue et plus le pourcentage d'épis cariés est réduit. Concernant la modalité 100 spores testée uniquement en 2013, le pourcentage d'épis cariés varie entre 11 et 19%. Notons qu'entre 1 et 4% d'épis cariés ont été observés au champ en 2013 pour la modalité 1 spore viable par semence. De plus faibles concentrations (25, 10, 5, et 1 spores) ont été testées en 2014. Parmi ces faibles concentrations, seule la modalité 25 spores viables par semences est à l'origine de l'expression de symptômes au champ avec 3 à 4 % d'épis atteints. Aucun symptôme n'a été observé pour les modalités 10, 5 et 1 spores aux champs. Cependant en 2014, une plante atteinte a été observée dans la parcelle de Bourges (1 sur 100 soit 1%) pour la modalité 5 spores vivantes par semence et une plante atteinte a été référencée à la serre GEVES (1 sur 30 soit 4%) pour la modalité 1 spore vivante par semence.

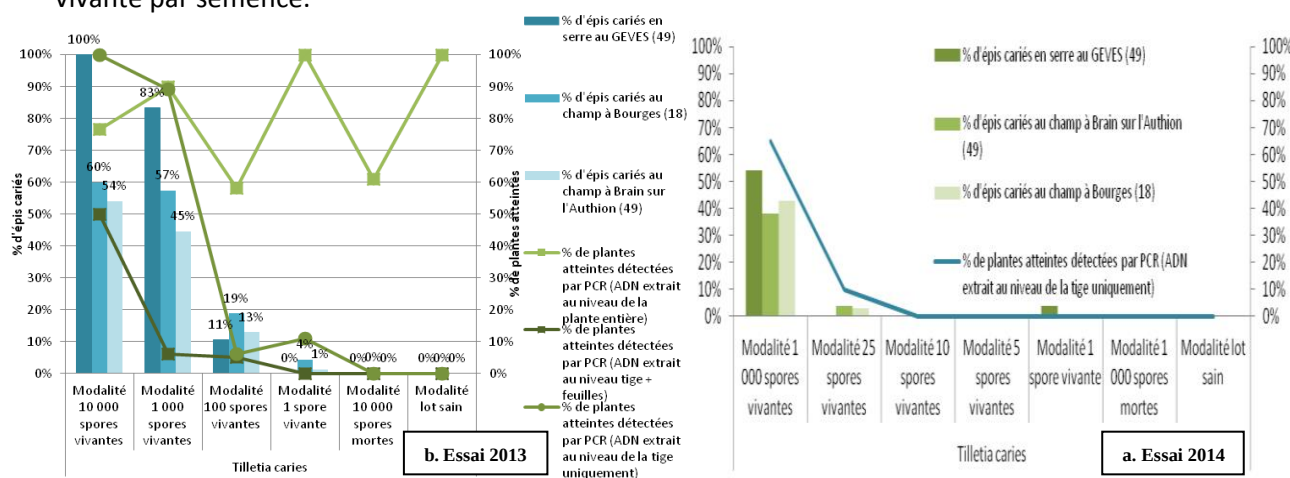


Figure 6 : Comparaison de l'expression des symptômes sur épis avec la détection par PCR sur plantules infectées par *Tilletia caries* à différent taux

Comparison of symptoms expression on ears and PCR detection on plantlets infected at different level by *Tilletia caries*

a) Essais réalisés en 2013 / b) Essais réalisés en 2014

a) Tests realized in 2013 / b) Tests realized in 2014

Une méthode de détection précoce par PCR a été mise au point lors des essais 2013 et 2014. Basé sur l'extraction d'ADN sur plantules, le pourcentage de plantules détectées positives par PCR a été comparé au pourcentage d'épis cariés observé au champ (Figure 6-a et 6-b). Lors de l'extraction d'ADN sur plante entière, des échantillons positifs ont été détecté pour les modalités spores mortes et témoins soin. Ceci s'expliquant par la présence de spores au niveau des résidus de téguments présent à proximité des racines (Figure 6-a, courbe verte anis). Les essais d'extraction d'ADN sur la partie aérienne de la plante (tige et feuille) ont permis de détecter très peu de plantes positives pour les modalités fortement contaminées (10 000 spores et 1000 spores par semence) (Figure 6-a, courbe verte foncée). En revanche l'extraction de l'ADN réalisé au niveau de la tige de la plantules a montré une très bonne corrélation des résultats avec l'expression des symptômes sur épis (Figure 6-a, courbe verte et Figure 6-b, courbe bleu).

De manière globale, les résultats démontrent qu'aucun symptôme n'a été observé sur les modalités spores mortes. En revanche la présence de spores viable, même en faible concentration, sont à l'origine de l'expression de la maladie. Ces résultats permettent de confirmer l'intérêt de mesurer la viabilité des spores, la mise au point d'un biotest favorisant la transmission du pathogène en conditions contrôlées ainsi que la mise à disposition d'un protocole PCR permettant une détection précoce de la carie dans les plantules.

2- DITYLENCHUS DIPSACI : EVALUATION DE LA VIABILITE DES NEMATODES ET DOMMAGES SUR PLANTULES

a. Traitement par thermothérapie de lots de luzerne contaminés

Les lots du luzerne traités et non traités sont analysés et les *Ditylenchus dipsaci* vivants et morts présents dans chaque lot sont dénombrés (Tableau IV).

Les résultats indiquent la présence de *Ditylenchus dipsaci* vivants pour les trois lots de luzerne non traités avec respectivement 69 *D. dipsaci* dénombrés pour le lot Prospera, 256 pour le lot Fravert et 1128 pour le Robot. En revanche, les memes lots analysés après traitement par thermothérapie indiquent uniquement la présence de *Ditylenchus dipsaci* mort. Les 4 répétitions de chaque lot de semence expriment des résultats identiques avec aucun *D. dipsaci* vivant observé.

Tableau IV : Dénombrement de *Ditylenchus dipsaci* dans les lots de luzerne avant et après traitement
Numbering of *Ditylenchus dipsaci* in the alfalfa seed lots before and after treatment

Lots	Conditions	Répétitions	<i>D.dipsaci</i> vivant	<i>D.dipsaci</i> mort
Prospera	Non Traité	1	69	6
	Traité	1	0	1
		2	0	10
		3	0	1
		4	0	4
Fravert	Non Traité	1	256	0
	Traité	1	0	>100
		2	0	>100
		3	0	>100
		4	0	>100
Robot	Non Traité	1	1128	0
	Traité	1	0	>100
		2	0	>100
		3	0	>100
		4	0	>100

 *Ditylenchus dipsaci* observés et comptés

L'application du traitement par thermothérapie a donc permis de tuer les populations de *Ditylenchus dipsaci* présentes dans les lots de luzerne Prospera, Fravert et Robot. Cependant, la méthode de détection, basée sur la morphologie, ne permet pas de distinguer les nématodes morts et les nématodes vivants, et nous avons ici décrits comme morts, les nématodes totalement immobiles.

b. Bio test : potentiel de nuisibilité des *Ditylenchus dipsaci* vivants et morts

Les résultats des deux essais sont présentés dans la figure 6. Au cours de l'essai 1, les symptômes sur plantules (plantules gonflées) ont pu être observés seulement sur les modalités *D. dipsaci* vivant (= mobiles) : 39% de plantules gonflées pour la modalité 1 *Ditylenchus dipsaci* vivant, 75% pour la modalité 5 *Ditylenchus dipsaci* vivants et 81% pour la modalité 10 *Ditylenchus dipsaci* vivants. En revanche les modalités *Ditylenchus dipsaci* mort (= immobiles) (1, 5 et 10) ne présentent aucun symptôme tout comme le témoin non inoculé (0 *Ditylenchus dipsaci*).

Lors de l'essai 2, toutes les modalités n'ont pas été répétées. Seule la modalité 1 *Ditylenchus dipsaci* vivant (témoin positif), 0 *Ditylenchus dipsaci* (témoin non inoculé) et 1 à 5 saprophages ont été testées. Les résultats montrent que la modalité 1 *D. dipsaci* vivant est à l'origine de 41% de plantules gonflées soit un résultat similaire à l'essai 1. Le témoin non inoculé est conforme avec 0% de plantules atteintes tandis que les plantules inoculées avec des saprophages ne présentent aucun symptôme type plantules gonflées.

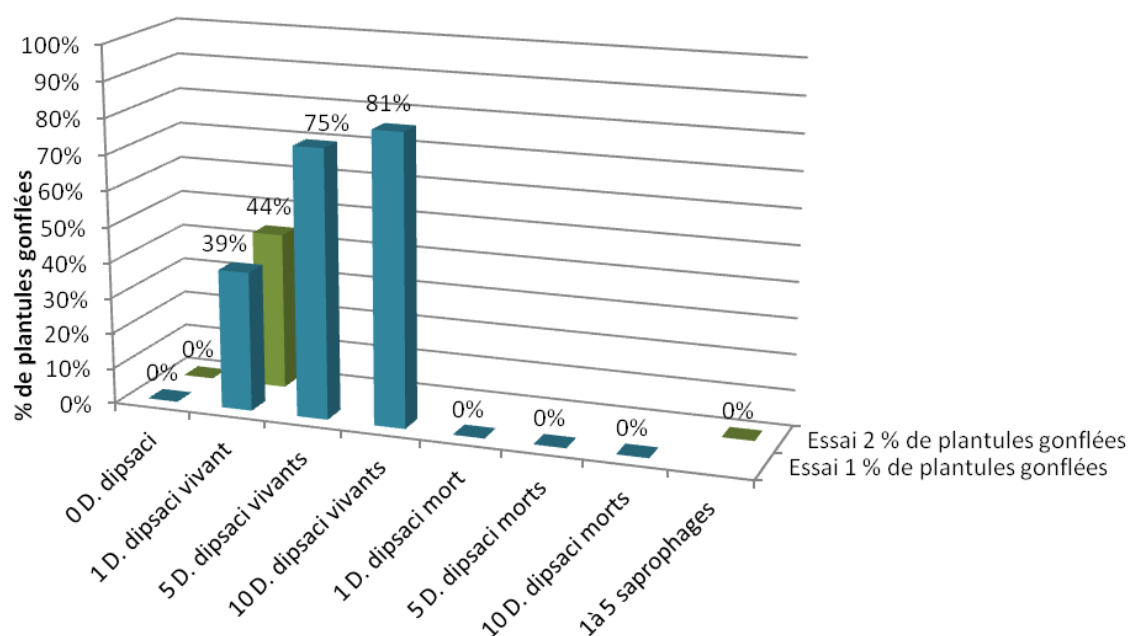


Figure 6 : Compilation des essais 1 et 2 réalisé sur *Ditylenchus dipsaci* vivant et mort.
Compilation of tests 1 and 2 realized on *Ditylenchus dipsaci* alive and dead.

De manière générale, sur l'ensemble des deux essais, le bio-test a permis de valider l'interprétation morphologique prouvant que les *Ditylenchus dipsaci* immobiles sont bien morts en obtenant des plantules gonflées au seuil de 1 *Ditylenchus dipsaci* vivant (=mobile) tandis qu'aucune plantule gonflée n'a été observée avec des nématodes immobiles ou même des saprophages. Notons que les variétés de luzerne correspondent à une population, toutes les plantules ne sont pas sensibles. Ce qui explique que le nombre de plantules gonflées ne peut pas être de 100%.

DISCUSSION

La réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires favorisant l'avènement des nouvelles méthodes de traitements, renforce l'intérêt d'évaluer la viabilité des bio-agresseurs mais également d'étudier leur potentiel de nuisibilité.

Les deux exemples cités ci-dessus ont permis de prouver l'impact de la viabilité des pathogènes par rapport à l'expression des symptômes sur plantes hôtes.

La mesure de la viabilité des spores de *Tilletia caries* a permis d'évaluer l'impact de la contamination des semences de blé par des spores viables sur l'expression de la maladie comparée aux spores mortes. L'expression des symptômes aux champs et en serre a été observée seulement dans le cas des modalités spores viables prouvant la maîtrise du pathosystème et confirmant l'intérêt de mesurer la viabilité des spores.

La viabilité des spores mesurée par méthode de germination reste cependant longue et difficile à mettre en place. Pas moins de 15 jours sont nécessaires pour déterminer le niveau de viabilité des spores. De plus son application sur des lots faiblement contaminés engendre des difficultés de lectures. L'utilisation de milieu non sélectif entraîne un développement important des

saprophytes qui est également un facteur limitant la lecture. L'intérêt de développer une méthode de coloration était de raccourcir les délais de réponse et de gagner en temps de manipulations. Au cours de ces dernières années, les résultats des essais au Tétrazolium ont montré une très bonne corrélation avec les tests de germination des spores, permettant d'apprécier rapidement leur viabilité. Cependant l'application de traitement chimique de référence de couleur rouge (type REDIGO) ne permet pas d'appliquer la méthode au tétrazolium obligeant ainsi de conserver la méthode de germination des spores. Cette méthode n'est donc pas utilisable pour évaluer l'efficacité de tous types de traitements de semences. Une alternative est possible pour les traitements non évaluables par coloration grâce au développement du bio test en conditions contrôlées, par méthode « grow out » favorisant la transmission du pathogène de la semence à la plantule suivi d'une détection précoce par PCR sur plantule.

Les essais de détection précoce sur plantule par méthode PCR développés au laboratoire permettant d'éviter d'aller jusqu'au stade épis et ainsi obtenir des résultats plus rapidement. La maîtrise du pathosystème carie permet de disposer d'une méthode pour juger les méthodes alternatives de traitements. Des essais sont actuellement en cours sur semences contaminées non traitées et traitées par une référence chimique : le REDIGO.

Concernant les essais de traitement sur semence de luzerne, l'application de la thermothérapie a prouvé son efficacité en tuant les nématodes présents. Les essais menés sur les 3 lots de semences à raison de 4 répétitions par lot ont démontré l'efficacité de cette méthode. Cependant l'évaluation de la viabilité des nématodes est à ce jour au stade de développement. Basé sur la mobilité des *Ditylenchus dipsaci* pour dissocier les morts (immobiles) des vivants (mobiles), différentes méthodes ont été testées sans succès. De l'imagerie multispectrale (manque de résolution au micron) en passant par des essais de colorations vitale et létale (problème de pénétration des colorants dans les nématodes), aucune méthode rapide et fiable n'est à ce jour disponible. De plus en accord avec Chen *et al* en 2000, l'immobilité de certains nématodes est observée sur des nématodes dit « dormant ». Ce n'est donc pas un critère fiable pour dissocier les morts des vivants. Cependant le développement du biotest sur plantules de luzerne inoculées par des *D. dipsaci* vivants et morts a permis de prouver le potentiel de nuisibilité de ce pathogène : présence de symptômes sur plantules inoculées par les nématodes mobiles (=vivants) comparé à l'absence de symptômes sur plantules inoculées avec les nématodes immobiles (=morts).

Les résultats ont prouvé qu'après traitement par thermothérapie, les nématodes n'étaient plus en capacité d'infecter les plantules. Ces essais ont confirmé la maîtrise du pathosystème et ont permis de développer une méthode de référence pour le développement d'autres méthodes d'évaluation de la viabilité. Notons cependant que le biotest présente un certain nombre de limites, notamment en terme de coût, de délai de résultats et surtout de main d'œuvre.

CONCLUSION

L'évaluation de la viabilité des pathogènes (*Tilletia caries* et *Ditylenchus dipsaci*), corrélés à l'expression des symptômes sur plantes (respectivement blé et luzerne) ont permis d'évaluer la transmission du pathogène de la semence à la plantule et de maîtriser les pathosystèmes.

Ces deux cas sont des exemples concrets démontrant l'intérêt et l'importance de dissocier les agents pathogènes viables des non-viables. La maîtrise de ces pathosystèmes permettant d'observer l'expression de symptômes peuvent ainsi être adaptée dans le but d'évaluer l'efficacité des nouvelles méthodes de traitement.

REMERCIEMENTS

Le GEVES tient à remercier la Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences pour les essais caries réalisés en champs entre 2012 et 2014 ainsi que la société INCOTEC pour les essais de traitement par thermothérapie des semences de luzerne réalisés entre 2012 et 2013.

BIBLIOGRAPHIE

Boyd M. L. and Carris L. M., 1997, Enhancement of teliospore germination in wheat-and wild grass-infecting species of *Tilletia* on activated charcoal medium, *Phytopathology*, 88:260-264.

Champion R., 1997, Identifier les champignons transmis par les semences, Edition INRA, France, p353-356.

Chen S. Y. and Dickson D. W., 2000, A Technique for Determining Live Second-stage Juveniles of *Heterodera glycines* *Journal of Nematology* 32(1):117–121.

Eibel P., Wolf G. A. and Koch E., 2005, Detection of *Tilletia caries*, Causal Agent of Common Bunt of Wheat, by ELISA and PCR. *Journal of Phytopathology*, 297–306.

Orgeur G., Serandat I., Mériaux B., Allart C., Colombel F., Fougereux J. A., Fricot C., Lebourg D., et Grimault V., 2012, Qualité sanitaire des semences de blé : Evaluation de la viabilité des spores de *Tilletia* spp., AFPP – 10e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes.

Serandat I., Grimault V., Gombert J., Lesprit E., Sarniguet C., Straëbler M. and Forsberg G., 2013, Thermotherapy : a promising control method against *Ditylenchus dipsaci* on alfalfa seeds. 30th ISTA Congress, Antalya 12-18th June 2013.

Vanova M., Matusinsky P. and Benad J., 2006, Survey of incidence of bunts (*Tilletia caries* and *Tilletia controversa*) in the Czech Republic and susceptibility of winter wheat cultivars, *Plant Protection Science*, 42: 21-25.

Vovlas N., Troccoli A., Palomares-Rius J. E., De Luca F., Liébanas G., Landa B. B., Subbotind S. A. and Castillo P. (2011) *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: a new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny, *Plant Pathology* 60, Doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02430.x, 762–775.

ANNEXE 1: Method: MOA13 part A version 1a, 2013 (p12-14)

5.2. Extraction à partir des substrats et organes végétaux

5.2.1. Prise d'analyse

Les nématodes présents dans les substrats ou dans les organes végétaux sont placés en milieu aqueux pour leur permettre de migrer hors de ces supports selon la méthode Baermann modifiée décrite dans le chapitre 1.2.2.2 de la MOA 012.

Quelle que soit la matrice, laisser les nématodes migrer pendant au moins 24 heures.

Graines, substrats

L'extraction est faite sur la totalité de l'échantillon reçu avec un volume maximal de 400 millilitres.

Intercaler un tissu type essuie tout ou filtre à lait entre l'échantillon et le tamis pour les substrats et les graines sales. Dans le cas de graines qui absorbent beaucoup d'eau, rajouter de l'eau après quelques heures.

Bulbes, caïeux, cormus, rhizomes, tubercules

L'extraction est faite sur la totalité de l'échantillon reçu avec un maximum de 200 unités.

Prélever une tranche par organe (si possible le plateau dans le cas des bulbes).

Les bulbilles sont analysées en l'état.

Les tranches ainsi prélevées sont mises à migrer après un léger broyage.

Les bulbilles sont également broyées (entières) avant migration.

Feuilles et tiges

L'extraction est faite sur un prélèvement réalisé sur la totalité de l'échantillon reçu avec un maximum de 200 unités.

Choisir dans la mesure du possible les parties jeunes ou avec symptômes.

Cas particulier de l'ail

La quantité maximale à analyser est de 200 têtes d'ail.

Après un lavage au jet pour éliminer la terre adhérente, l'échantillon est placé dans un récipient de volume suffisant pour permettre une immersion de toutes les têtes dans l'eau.

5.2.2. Récupération des nématodes

Après migration sur tamis

Enlever le tamis et filtrer l'eau de la cuvette sur un tamis de récupération de maille 20 µm.

Transférer le produit retenu par le tamis dans un récipient pour extrait à l'aide d'un jet de pissette d'eau.

Si la suspension obtenue est sale : procéder à une centrifugation de l'extrait obtenu au sulfate de magnésium (d=1,18) + kaolin, 2 min à 900 g.

Récupérer les nématodes par filtration du surnageant sur un tamis de 20 µm. Transférer le produit retenu par le tamis dans un récipient pour extrait à l'aide d'un jet de pissette d'eau.

Après trempage (cas de l'ail)

Brasser le contenu du récipient et enlever les têtes d'ail.

Passer l'eau du récipient à travers 2 tamis superposés de mailles respectives 1 mm et 40 µm maximum.

Le produit récupéré sur le tamis de 40 µm est soit :

☐ centrifugé comme indiqué ci-dessus. Les nématodes sont alors récupérés par filtration du surnageant sur un tamis de 20 µm.

☐ mis en migration selon méthode Baermann modifiée décrite chapitre 1.2.2.2 de la MOA 012.

Après 24 heures, filtrer l'eau de la cuvette sur un tamis de maille 20 µm puis récupérer le produit obtenu dans un récipient pour extrait.

5.3. Lecture de l'extrait

Placer les extraits en coupelles d'observation pour examen à la loupe binoculaire sous lumière diascopique pour identification du genre.

Les personnes chargées de la lecture doivent savoir reconnaître les principaux genres de nématodes phytoparasites.

Les critères caractéristiques du genre *Ditylenchus* sont les suivants :

Critères généraux :

- ☐ Nématode long et fin, habitus droit ou légère courbure, locomotion ondulante
- ☐ Limite oesophageo-intestinale droite
- ☐ Stylet trapu et court, peu visible à la loupe, présence de boutons basaux
- ☐ Queue courte et pointue
- ☐ Tête aplatie, dans le prolongement du corps, faiblement sclérotisée

Critères liés au sexe :

- ☐ Chez la femelle : vulve postérieure, un seul ovaire
- ☐ Chez le mâle : spicules légèrement courbes, présence d'une bursa

6. Préparation, conditionnement des nématodes pour identification

Si l'observation de l'extrait a mis en évidence la présence de nématodes du genre *Ditylenchus* :

- ☐ soit le laboratoire réalise l'identification spécifique (voir MOA 013 partie B identification de *Ditylenchus*),
- ☐ soit le laboratoire envoie l'extrait à un laboratoire tiers (sauf disposition contraire, ce laboratoire est le laboratoire national de référence) pour identification de l'espèce.

Dans ce dernier cas, conditionner l'extrait dans un récipient étanche, résistant au transport.

Identifier le contenant de manière indélébile et l'expédier, sous emballage résistant, pour l'identification spécifique.

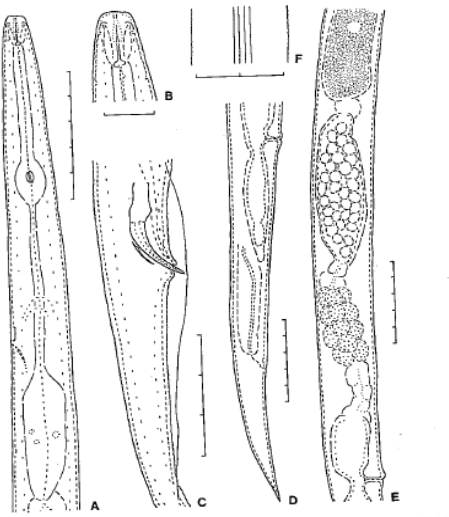
7. Formulation des résultats

Le résultat s'exprime sous forme qualitative :

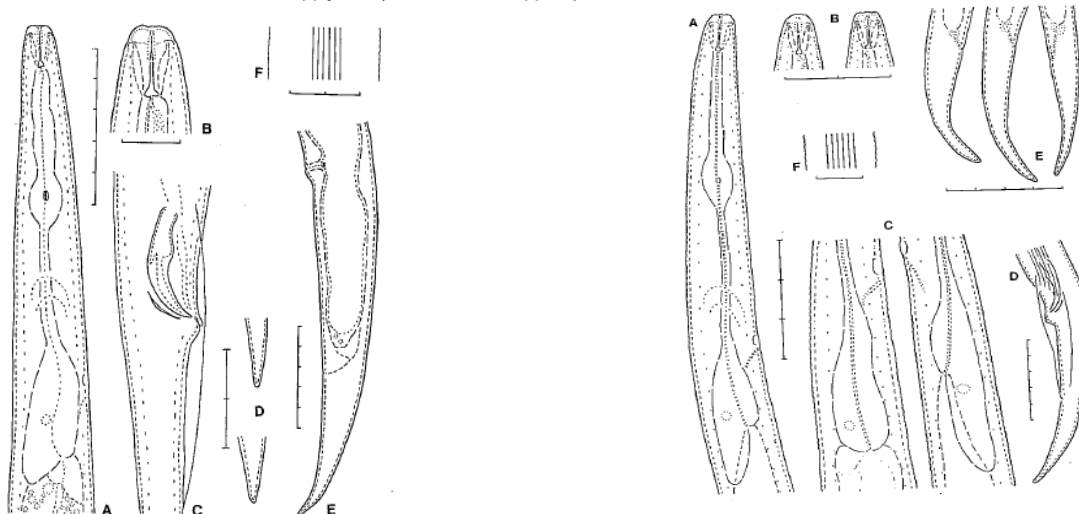
- ☐ dans le cas d'une analyse ne révélant pas la présence de nématodes du genre *Ditylenchus* par une phrase telle que : « ***Ditylenchus dipsaci* et/ou *destructor* non détecté** » selon la ou les espèces demandées.
- ☐ dans le cas d'une analyse révélant la présence de nématodes du genre *Ditylenchus* par une phrase telle que : « ***Ditylenchus* sp. détecté** »

MOA 013 part B identification de *Ditylenchus* :

Illustrations (d'après Sturhan D. et Brzeski M.W., 1991):



Ditylenchus dipsaci : (A) région oesophagienne, (B) tête, (C) Mâle : spicules, (D) partie postérieure de la femelle, (E) système reproducteur de la femelle, (F) champs latéraux



Ditylenchus destructor : (A) région oesophagienne, (B) tête, (C) Mâle : spicules, (D) extrémité de la queue, (E) partie postérieure de la femelle, (F) champs latéraux.
Echelles : 1 graduation = 10 µm

Ditylenchus myceliophagus : (A) région oesophagienne, (B) têtes, (C) partie postérieure de l'oesophage, (D) Mâle : spicules et queue, (E) extrémités de queue, (F) champs latéraux
Echelles : 1 graduation = 10 µm