

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA058 - Version 1

Septembre 2018

Détection de *Stenocarpella maydis* et *S. macrospora* sur semences de maïs par caractérisation morphologique.

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence « Champignons sur toute matrice »



Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
1	/	Septembre 2018	Version initiale



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la Santé des Végétaux, Unité de Mycologie

Laboratoire National de Référence « Champignons phytopathogènes sur toute matrice »

Adresse : Domaine de Pixérécourt, Bâtiment E, CS40009, 54220 Malzéville

Contact : nancy.lsv@anses.fr

La présente version de la méthode a été rédigée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux en adaptant une méthode de détection de *Diplodia maydis* (ancien nom de *Stenocarpella maydis*) sur semences de maïs (méthode officielle MGs./96/02a). L'identification morphologique des deux espèces cibles est basée sur la littérature scientifique.

Le travail de relecture a été effectué par l'Unité de Coordination de la Référence du Laboratoire de la Santé des Végétaux.



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1. Objet et domaine d'application	7
2. Documents de référence	7
3. Termes, sigles et définitions	7
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	9
5.1 Eau.....	9
5.2 Milieu de culture	9
5.3 Solution de désinfection.....	9
5.4 Autres consommables à usage unique	9
6. Appareillage et matériels	10
7. Échantillons	11
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	11
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	11
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	11
8. Mode opératoire	12
8.1 Prise d'essai.....	12
8.2 Incubation sur milieu nutritif.	12
8.3 Lecture des boîtes d'isolement.	12
8.4 Identification de <i>Stenocarpella maydis</i> et <i>Stenocarpella macrospora</i>	12
9. Résultats	16
9.1 Validation des résultats.....	16
9.2 Interprétation et expression des résultats	16
10. Caractéristiques de performance de la méthode	17
Annexe 1 : Composition du milieu de culture Malt-CH.	18
Annexe 2 : Glossaire mycologique	19
Bibliographie	20



Introduction

Stenocarpella maydis (Berk.) B. Sutton et *Stenocarpella macrospora* (Earle) B. Sutton sont deux espèces de champignons phytopathogènes du maïs. Ces deux espèces causent des symptômes similaires sur maïs mais sont distinctes morphologiquement et génétiquement, et ont des distributions géographiques légèrement différentes au niveau mondial. Elles provoquent toutes deux des fontes de semis, des pourritures de tiges et des épis qui se couvrent d'une moisissure blanche.

Les semences de maïs peuvent véhiculer les agents pathogènes de régions infectées vers des régions saines. Le protocole présenté ici vise à détecter la présence de chacune de ces deux espèces sur des échantillons de semences de maïs.

La fréquence d'infection des semences par *Stenocarpella maydis* ou *Stenocarpella macrospora* peut être relativement faible et les semences infectées ne présentent pas de symptôme.



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

L'exigence de confinement pour la manipulation de formes viables de cet agent pathogène à dissémination aérienne doit être de type NS3.

Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.



1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *Stenocarpella maydis* ou *Stenocarpella macrospora* dans un échantillon de semences de maïs par incubation sur milieu nutritif et caractérisation morphologique des structures reproductives fongiques.

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue concernant *Stenocarpella maydis* ou concernant *Stenocarpella macrospora* sont considérés comme indemnes de l'espèce concernée ou contaminés à un niveau trop faible ou contaminé par une forme non cultivable (quiescente, morte) et ne pouvant être mis en évidence par la technique utilisée.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse : La méthode s'applique sur semences de maïs.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : Cette méthode a été mise au point et validée sur des semences de maïs sans enrobage phytosanitaire. L'effet d'un éventuel enrobage sanitaire sur la qualité de l'analyse utilisant cette méthode est inconnu.

Grandeur de l'objet soumis à analyse : La taille de l'échantillon de semences reçu au laboratoire pour recherche de *S. maydis* et *S. macrospora* doit permettre le prélèvement d'un échantillon pour analyse d'environ 400 grains.

2. Documents de référence

OEPP. Fiche informative sur les organismes de quarantaine. *Stenocarpella macrospora* et *Stenocarpella maydis*. EPPO Global Database. www.eppo.int.

Anonyme (1996) Semences de maïs, détection du champignon *Diplodia maydis* (agent de la pourriture sèche des épis) par la méthode du papier buvard ou « blotter test ». Méthode de détection MGs./96/02 a

3. Termes, sigles et définitions

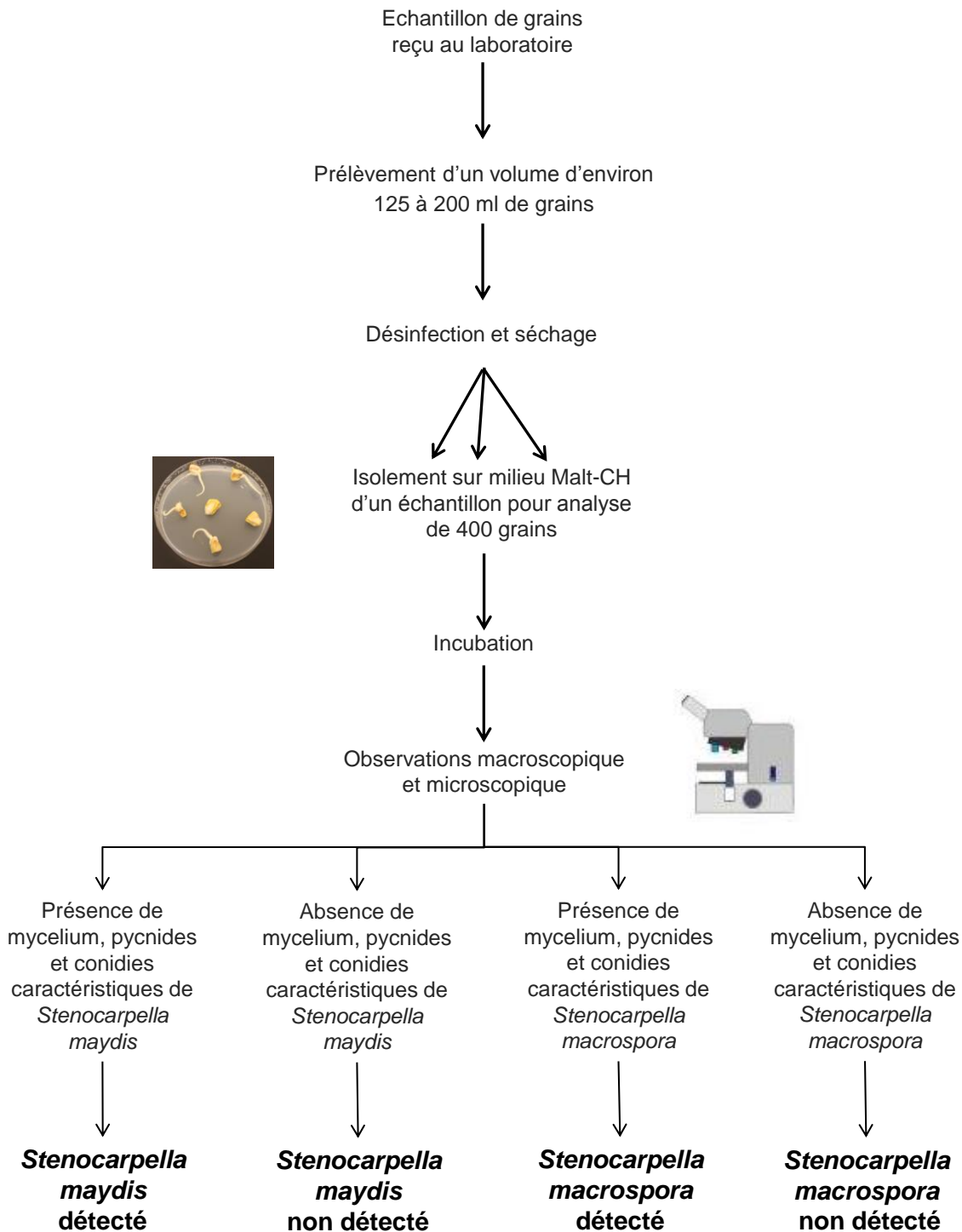
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.



4. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-dessous :





5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Les recommandations des fournisseurs concernant les conditions de stockage avant utilisation seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

5.1 Eau

La fabrication du milieu de culture requiert l'utilisation d'eau osmosée ou d'eau distillée.

La désinfection des semences requiert l'utilisation d'eau osmosée stérile ou d'eau distillée stérile.

5.2 Milieu de culture

Malt-Chloramphenicol (Malt-CH) : cf. annexe 1

5.3 Solution de désinfection

Hypochlorite de sodium : la solution de désinfection est à une concentration finale d'environ 2% de chlore actif dans de l'eau du robinet. Une solution du commerce (eau de javel) diluée est acceptable.

Tween 20 : 2 gouttes par litre de solution de désinfection d'hypochlorite de sodium.

5.4 Autres consommables à usage unique

Préparation des milieux de culture :

- Microcônes stériles de volume adapté.
- Boîtes de Petri stériles.

Désinfection :

- Papiers filtres stériles.

Identification morphologique :

- Solution bleu coton ou acide fuchsine. Ces colorants dilués dans de l'acide lactique sont utilisés pour l'observation microscopique des structures fongiques.
- Manches et lames de scalpels.
- Lames porte-objet pour microscopie.
- Lamelles couvre-objet pour microscopie.



6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Grandeur	EMT
Volume	volume < à 10ml : EMT = $\pm 10\%$
Masse	EMT = 10%
Température	incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (ou plus strict en fonction des recommandations fournisseur)

En plus de l'appareillage courant d'un laboratoire de microbiologie, le matériel suivant est jugé nécessaire pour certaines phases de l'analyse :

- Poste de Sécurité Microbiologique de classe II équipé d'un système pour la stérilisation des instruments (ex : bec bunsen...).
- Enceinte climatique thermostatée ou pièce à température contrôlée à $22\pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Stéréomicroscope (loupe binoculaire) à platine et éclairage par faisceaux de lumière froide permettant l'observation de boîtes de Petri (grossissement 10x à 40x).
- Microscope optique (grossissement 100x à 400x) équipé au minimum des objectifs x10, x20, et x40 ainsi que d'un micromètre ou tout autre système permettant la mesure des éléments observés.



7. Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les conditions suivantes doivent être respectées :

Nature et état de l'échantillon compatibles avec l'analyse :

Le temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire doit être le plus réduit possible. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant l'envoi.

Confection du colis :

Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique de type « quarantaine » doit figurer sur le colis.

Fiche de demande d'analyse :

Formulation claire de la demande, marchandise consignée ou non, identification du végétal, de l'expéditeur, référence des échantillons. Cette fiche est fixée à l'extérieur du colis.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 30 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5°C.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, au minimum jusqu'au dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Dans le cadre des missions qui lui sont confiées, le laboratoire national de référence peut demander que tout ou une partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus.



8. Mode opératoire

8.1 Prise d'essai

La préparation des échantillons pour analyse s'effectue sous un poste de sécurité microbiologique.

A partir de l'échantillon reçu au laboratoire, un prélèvement d'une quantité minimale de 400 grains, correspondant à un volume d'environ 125 à 200 ml (selon la variété) est effectué de façon aléatoire.

Ce prélèvement correspondra à l'échantillon pour analyse.

8.2 Incubation sur milieu nutritif.

- Les grains sont placés dans un panier tamis, stérilisés en surface par trempage pendant 3 min dans une solution d'hypochlorite de sodium titrant environ 2% de chlore actif additionnée de tween puis rincés dans 2 bains d'eau stérile successifs pendant environ 2 min chacun.
- Durant la phase de stérilisation, le panier est agité afin de remettre en suspension les grains et d'assurer ainsi une désinfection plus efficace.
- Après rinçage, les grains sont étalés en une couche sur du papier filtre et séchés par le flux stérile pendant au minimum 1 heure.
- Parmi les grains parfaitement séchés, 400 grains sont prélevés de façon aléatoire sur le papier filtre et placés directement sur le milieu de culture Malt-CH dans 67 boîtes de Petri à raison 6 grains par boîte, sauf la dernière (4 grains).
- Les boîtes de Petri sont ensuite incubées 8 jours à $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ en respectant une alternance jour-nuit naturelle ou artificielle.

Attention : les boîtes de Petri ne doivent pas être scellées.

8.3 Lecture des boîtes d'isolement.

Après 3 à 5 jours d'incubation, rechercher les colonies mycéliennes caractéristiques de *Stenocarpella* spp. et la présence de pycnides sur la surface des grains.

Les colonies de *Stenocarpella* spp présentent une vitesse de croissance radiale élevée (10 à 15 mm/jour)

Sur le milieu Malt-CH les pycnides se développent tout d'abord à la face inférieure des grains au contact de la gélose.

Les pycnides sont prélevées sous PSM, montées entre lames et lamelles et observées au microscope (grossissement 100x à 400x).

En l'absence de pycnides matures, maintenir les boîtes en incubation pendant 3 à 5 jours supplémentaires, puis observer à nouveau les boîtes.

8.4 Identification de *Stenocarpella maydis* et *Stenocarpella macrospora*

L'identification de *Stenocarpella maydis* et de *Stenocarpella macrospora* repose sur l'observation des caractéristiques microscopiques des conidiomata (ici des pycnides) et des conidies (ici des pycniospores) qu'ils contiennent à maturité, tels que décrites par la littérature scientifique (Sutton 1980).



Une synthèse des caractéristiques est présentée dans le tableau 1.

Les figures 1 à 8 présentent les caractéristiques macro- et microscopiques des deux espèces.

Tableau 1. Caractéristiques morphologiques de *Stenocarpella maydis* et de *Stenocarpella macrospora*

Critères morphologiques	<i>Stenocarpella maydis</i>	<i>Stenocarpella macrospora</i>
Aspect des pycnides	Couleur marron foncé à noire, Immergées dans la gélose ou dans la cuticule du grain, Forme sphérique ou subglobuleuse	Couleur marron foncé à noire, Immergées dans la gélose ou dans la cuticule du grain, Forme sphérique ou subglobuleuse
Aspect cultural sur Malt-CH:		
Culture jeune :	Blanc, aspect cotonneux	Blanc, aspect cotonneux
Culture agée :	Grisâtre à brun foncé	Blanc
Couleur des conidies	Brun pâle	Brun pâle
Taille des conidies	15-34 x 5-8 µm	44-82 x 7,5-11,5 µm
Nombre de septa	0 à 2	0 à 3

D'après B.C. Sutton (1980), CMI (1966 a) et CMI (1966 b).



Figure 1: Culture de *Stenocarpella maydis* se développant à partir de grains de maïs.
Incubation : 7 jours sur Malt-CH.
(Crédit photo V. Wilson, ANSES-LSV, Malzéville, France)

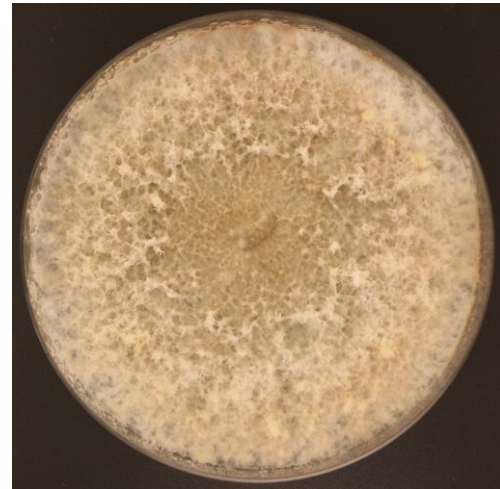


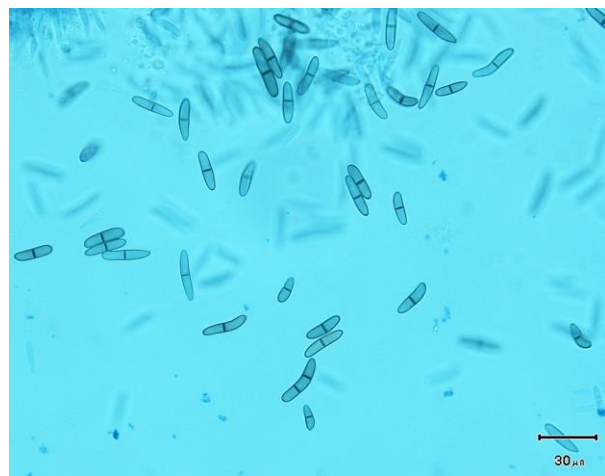
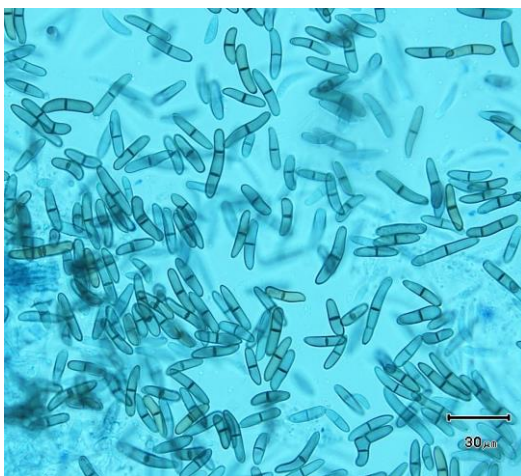
Figure 2 : Culture pure de *Stenocarpella maydis*
Incubation : 11 jours sur Malt-CH.
(Crédit photo V. Wilson, ANSES-LSV, Malzéville, France)



Figure 3 : Pycnides de *Stenocarpella maydis* se développant à partir de grains de maïs
(Crédit photo I. Cerf, ANSES-LSV, Malzéville, France)



Figure 4 : Pycnides de *Stenocarpella maydis* se développant à partir de grains de maïs
(Crédit photo I. Cerf, ANSES-LSV, Malzéville, France)



Figures 5 et 6 : Conidies de *Stenocarpella maydis*. (obj x40)
(Crédit photo V. Wilson, ANSES-LSV, Malzéville, France)

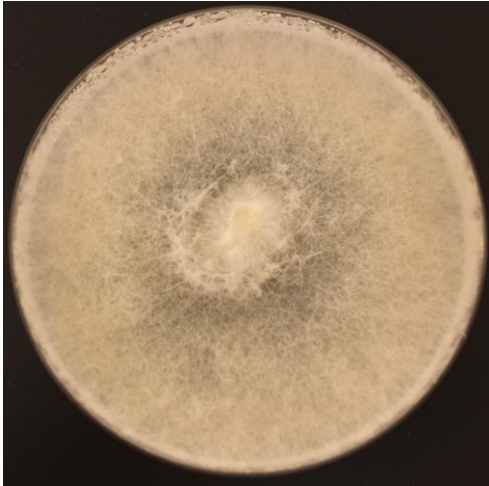


Figure 7 : Culture pure de *Stenocarpella macrospora*.
Incubation : 11 jours sur Malt-CH.
(Crédit photo V. Wilson, ANSES-LSV, Malzéville, France)

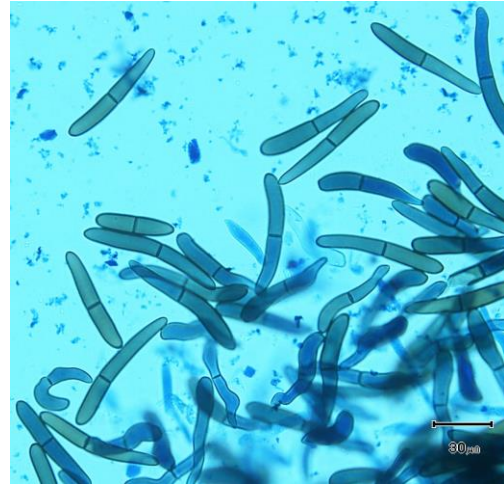


Figure 8 : Conidies de *Stenocarpella macrospora*. (obj x40)
(Crédit photo V. Wilson, ANSES-LSV, Malzéville, France)



9. Résultats

9.1 Validation des résultats

Les conidies observées à partir de pycnides produites à la surface des grains de maïs seront identifiées comme *Stenocarpella maydis* si tous les critères spécifiques correspondant à cette espèce listés dans le tableau 1 sont observés.

Les conidies observées à partir de pycnides produites à la surface des grains de maïs seront identifiées comme *Stenocarpella macrospora* si tous les critères spécifiques correspondant à cette espèce listés dans le tableau 1 sont observés.

9.2 Interprétation et expression des résultats

- Si aucun des 400 grains de la prise d'essai ne présente de pycnide, ou que les pycnides et conidies observées ne présentent pas toutes les caractéristiques de *Stenocarpella maydis* ou *Stenocarpella macrospora*, le résultat sera exprimé par une phrase du type « *Stenocarpella maydis* non détecté dans l'échantillon analysé», et / ou « *Stenocarpella macrospora* non détecté dans l'échantillon analysé».
- Si pour au moins un des 400 grains de la prise d'essai, une ou plusieurs pycnides contenant des conidies caractéristiques de *Stenocarpella maydis* ou de *Stenocarpella macrospora* sont observées, le résultat sera exprimé par une phrase du type « *Stenocarpella maydis* détecté dans l'échantillon analysé», et / ou « *Stenocarpella macrospora* détecté dans l'échantillon analysé».



10. Caractéristiques de performance de la méthode

L'identification morphologique est une expertise basée sur l'utilisation d'une documentation de référence. Les critères d'identification de *Stenocarpella maydis* et *Stenocarpella macrospora* sont issus de publications internationales relues par des pairs qui décrivent ces espèces ou proposent des clefs d'identification (Synthétisées par Sutton, 1980).

Une étude de la spécificité de cette méthode a été réalisée par le LNR. L'identification morphologique de 21 colonies de *Stenocarpella maydis* observées sur grains de maïs de différentes variétés et provenances géographiques a été confirmée par amplification et analyse de séquence de codes-barres génétique (ITS) et/ou par PCR selon la méthode décrite par Romero and Wise (2015).

L'identification morphologique de 59 colonies mycéliennes blanches différentes de *Stenocarpella* spp. observées sur grains de maïs de différentes variétés et provenances géographiques a été confirmée par amplification et analyse de séquence de codes-barres génétique (ITS) et/ou par PCR selon la méthode décrite par Romero and Wise (2015).

Critère de performance	Résultats obtenus
Spécificité	<p>100 % de 21 isolats de <i>Stenocarpella maydis</i> identifiés morphologiquement confirmés par analyse moléculaire.</p> <p>100 % des 59 isolats identifiés morphologiquement comme différents de <i>S. maydis</i> ou <i>S. macrospora</i> confirmés par analyse moléculaire.</p>



Annexe 1 : Composition du milieu de culture Malt-CH.

Milieu Malt-CH (extrait de malt - chloramphenicol)

Pour un litre de milieu :

- Agar : 15.0 ± 1.0 g
- Extrait de malt : 12.0 ± 0.5 g
- Chloramphénicol¹ : 2.0 ± 0.1 ml d'une solution éthanolique* [concentration finale 200 ppm]
- H₂O distillée ou osmosée : 1000 ml

* : 10.0 ± 0.1 g de chloramphenicol dans 100 ± 2 ml d'éthanol.

Le chloramphénicol étant un antibiotique thermostable, il est possible de l'ajouter à la préparation avant la stérilisation du milieu de culture par autoclavage.



Annexe 2 : Glossaire mycologique

Conidie : Spore asexuée produite à l'extérieur d'un conidiophore

Pycnide : Fructification globuleuse s'ouvrant par un ostiole produit lors de la phase de reproduction végétative (asexuée) chez certains champignons, notamment ceux des ordres des *Sphaeropsidales* et *Melanconiales*.

Pycniospore : Conidie produite à l'intérieur d'une pycnide.



Bibliographie

OEPP/EPPO (1991) Méthodes de quarantaine n° 35, *Cochliobolus carbonum*, *Stenocarpella macrospora* & *S. maydis*. Méthodes d'inspection et de test pour les semences de maïs. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 21, 261-262

Sutton Brian C (1980) *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.* Commonwealth Mycological Institute, Kew, U.K.

Commonwealth Mycological Institute (1966 a) Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N° 83 *Diplodia macrospora*. Kew, U.K.

Commonwealth Mycological Institute (1966 b) Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N° 84 *Diplodia maydis*. Kew, U.K.

Romero M.P. and Wise K.A. (2015) Developpement of molecular assays for detection of *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpelle macrospora* in corn. *Plant disease* june 2015, 761-769