

# Flore fongique sur graines de résineux et risque associé: approche microbiologique

**Sophie Schmitz, Florence Paquet, Antoine Ghesquière, Anne Chandelier**  
CRA-W - Unité Santé des Plantes et Forêts

## **Projet ALERTSEED**

Financement SPF Santé publique et Sécurité de la Chaîne alimentaire  
juillet 2021-décembre 2023

# Contexte

Le commerce de graines:  
un risque phytosanitaire sous-estimé



Matériel peu réglementé et contrôlé  
d'un point de vue phytosanitaire



**Règlement EU 2019/2072**

mesures de contrôle spécifique  
uniquement pour *Fusarium circinatum*  
sur graines de résineux (*P. menziesii* et *Pinus* spp.)

# Projet ALERTSEED

**Objectif: évaluation du risque d'introduction de maladies émergentes via le commerce de graines de résineux**

Méthodologie: Analyse par séquençage à haut débit de lots de graines de différentes espèces de résineux et de diverses origines (Belgique, Europe et pays tiers)

**Analyse microbiologique de certains lots**  
Méthode de contrôle pour HTS (validation)

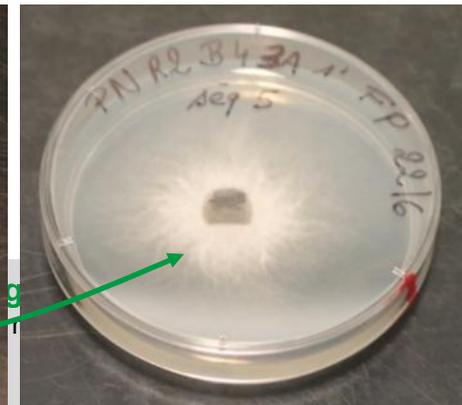
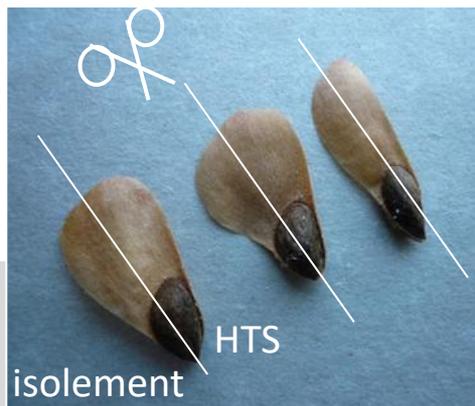


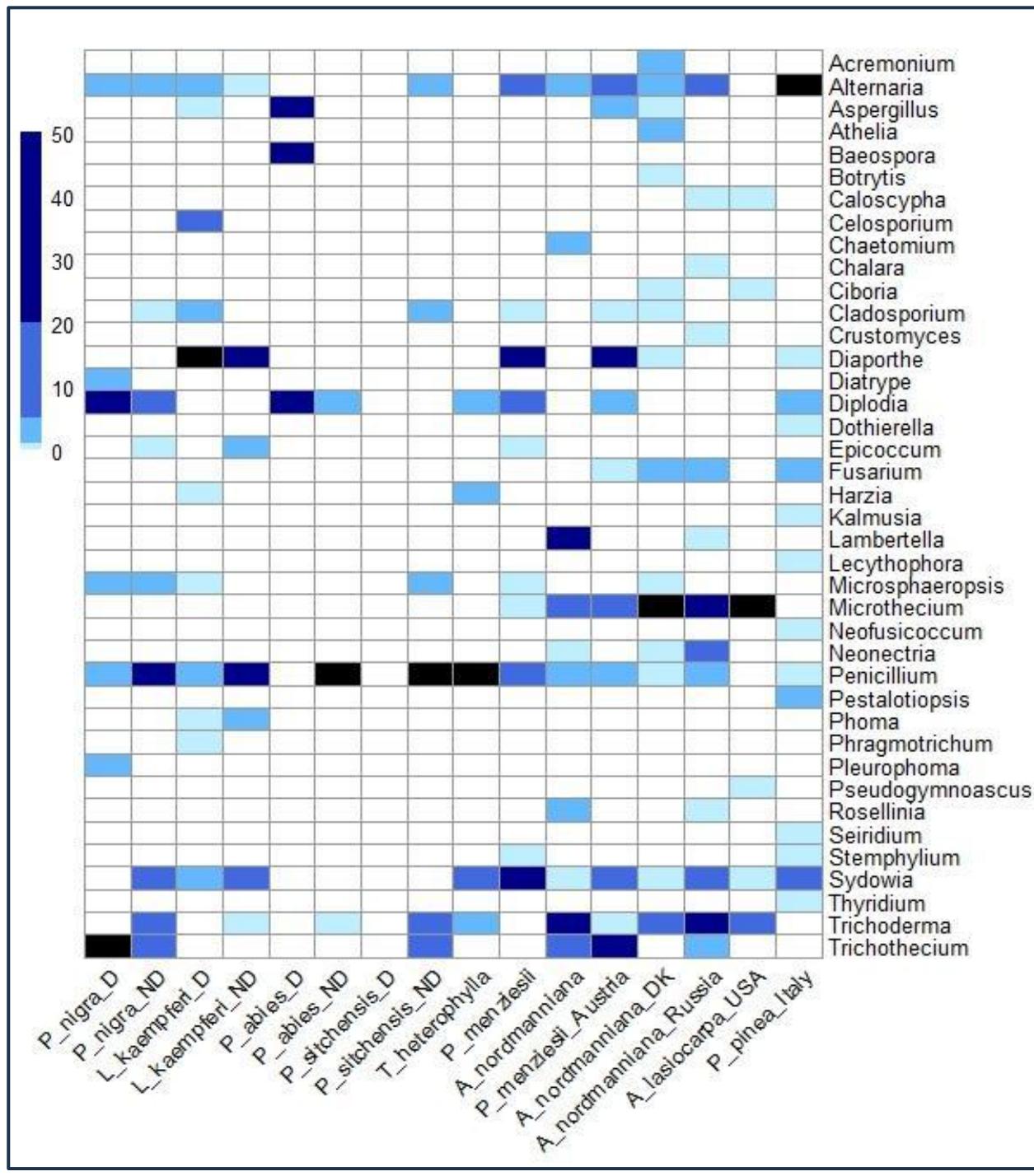
- Résultats obtenus par microbiologie
- Risque de transmission verticale
  - . Tests de pathogénicité *in vitro* (3 espèces fongiques)
  - . Observations de terrain (pépinières forestières, verger à graines)

# Analyses microbiologiques

Sur 12 lots de graines de résineux (6 genres/ 9 espèces différentes)

Lot - Espèce végétale		Origine	Désinfecté		Non désinfecté	
			Réplicat A	Réplicat B	Réplicat A	Réplicat B
1	<i>Larix kaempferi</i>	Belgique	100	100	100	100
2	<i>Picea abies</i>	Belgique	100	100	100	100
3	<i>Picea sitchensis</i>	Belgique	100	100	100	100
4	<i>Pinus nigra</i>	Belgique	100	100	100	100
5	<i>Abies nordmanniana</i>	Belgique	100	100	-	-
6	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Belgique	100	100	-	-
7	<i>Tsuga heterophylla</i>	Belgique	100	100	-	-
8	<i>Abies nordmanniana</i>	Danemark	100	100	-	-
9	<i>Abies nordmanniana</i>	Russie	100	100	-	-
10	<i>Abies lasiocarpa</i>	USA	100	100	-	-
11	<i>Pinus pinea</i>	Italie	100	100	-	-
12	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Autriche	100	100	-	-





## Abondance relative (%) des genres fongiques au sein des 12 lots

un total de 2670 colonies  
appartenant à 40 genres

# Espèces pathogènes

espèces pathogènes	<i>Pinus nigra</i>	<i>Larix kaempferi</i>	<i>Picea abies</i>	<i>Picea sitchensis</i>	<i>Tsuga heterophylla</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	<i>Abies nordmanniana</i>	<i>Abies lasiocarpa</i>	<i>Pinus pinea</i>
	1 lot	1 lot	1 lot	1 lot	1 lot	2 lots	3 lots	1 lot	1 lot
	Belgique	Belgique	Belgique	Belgique	Belgique	Belgique, Autriche	Belgique, Danemark, Russie	USA	Italie
1 <i>Athelia bombacina</i>							x (DK)		
2 <i>Botrytis cinerea</i>							x (DK)		
3 <b><i>Caloscypha fulgens</i></b>							x (R)	x	
4 <b><i>Crustomyces subabruptus</i></b>							x (R)		
5 <i>Diaporthe eres</i>		x				x (B, A)			
6 <i>Diaporthe rudis</i>							x (DK)		
7 <b><i>Diplodia sapinea</i></b>	x		x			x (B, A)			x
8 <i>Diplodia seriata</i>					x				
9 <i>Fusarium culmorum</i>							x (DK)		
10 <i>Fusarium poae</i>						x (A)			
11 <i>Neofusicoccum parvum</i>									x
12 <b><i>Neonectria neomacrospora</i></b>							x (B, DK, R)		
13 <i>Phragmotrichum chailletii</i>		x							
14 <b><i>Rosellinia corticium</i></b>							x (B, R)		
15 <b><i>Seiridium cardinale</i></b>									x
16 <i>Stemphylium vesicarium</i>						x (B)			x
17 <b><i>Sydowia polyspora</i></b>	x	x			x	x (B, A)	x (B, DK, R)	x	x
n	2	3	1	0	2	5	9	2	5

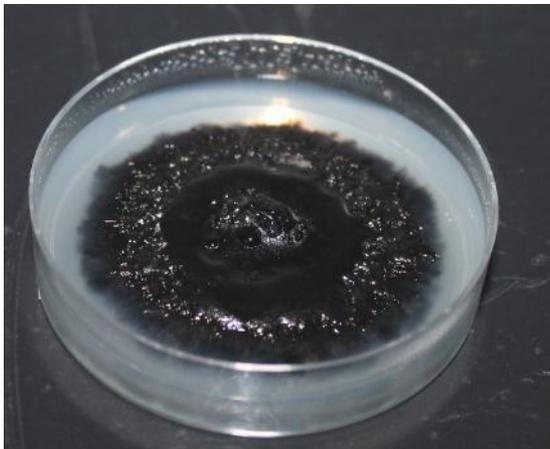
- Espèces les + fréquentes: *Sydowia polyspora* (n=10/12), *Diplodia sapinea* (n=5/12), *Diaporthe eres* (n=3/12) et *Neonectria neomacrospora* (n=3/12)
- Lot le plus riche = *A. nordmanniana* DK (6 champignons pathogènes)

# Transmission: tests de pathogénicité

Tests par inoculation de graines *in vitro* (inspirés de Gure et al. 2005)

## Choix de 3 souches fongiques

- *Sydowia polyspora*
  - *Diaporthe eres*
- } testées sur graines de *Picea abies*
- *Neonectria neomacrospora*: testée sur graines de *Abies nordmanniana* (après levée de dormance!)



*Sydowia polyspora*



*Diaporthe eres*



*Neonectria neomacrospora*

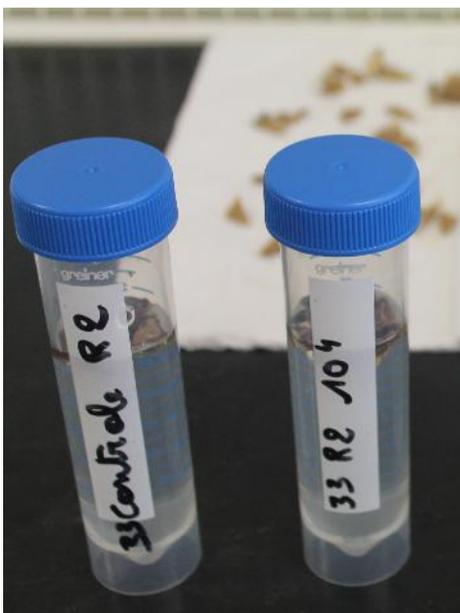
# Méthode d'inoculation et évaluation

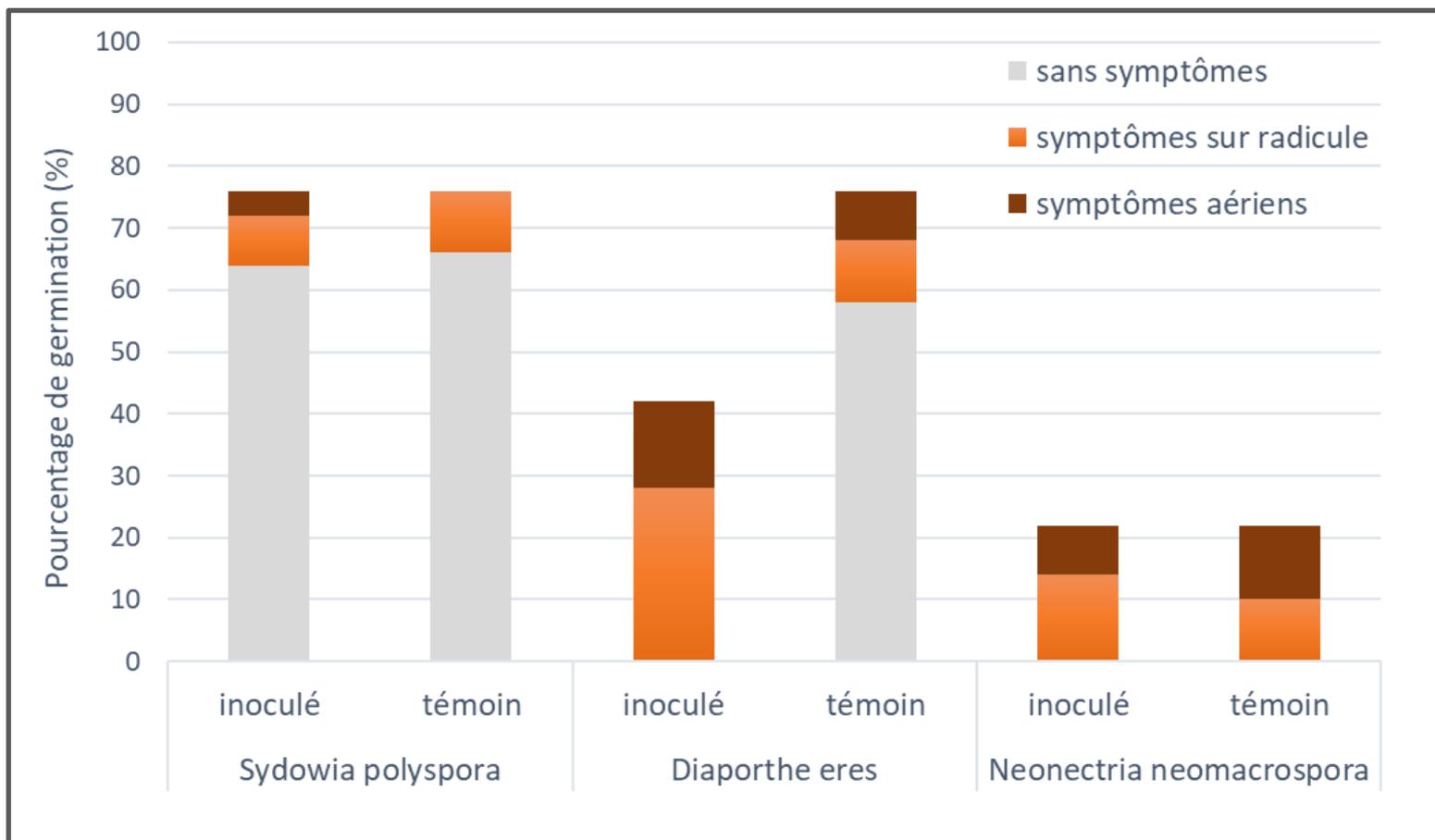
Pour chaque souche testée (n=3) :

- désinfection de graines (2% javel – 10 min)
- 5x10 graines dans suspension  $10^4$  spores/ml et 5x10 graines dans eau stérile (10 min)
- mise en culture sur PDA

Après 8 semaines:

- évaluation de (1) taux de germination et (2) présence de symptômes sur plantules
- essai de ré-isolement en cas de symptômes





- ***S. polyspora***: pas d'effet significatif sur taux de germination ou santé des plantules
- ***D. eres***: taux de germination réduit pour graines inoculées
- ***N. neomacrospora***: taux de germination réduits pour graines inoculées et non inoculées, champignon ré-isolé à partir de graines inoculées et témoins



I. Thomsen



CRA-W



CRA-W

# Transmission: observations de terrain



Vergers à graines  
nécroses?

*N. neomacrospora*/  
*A. nordmanniana*



Pépinières forestières  
fonte de semis?

# Verger à graines



- Visite en verger à graines (Baudrimont - août 2025)
- Symptômes discrets
- Prélèvement de 12 pousses nécrosées

- Analyse séparée de chaque pousse
- *N. neomacrospora* isolé à partir de 11/12 pousses

# Pépinières forestières



## Analyse d'un lot d'*A. nordmanniana* récent

VG Baudrimont - ref. CFW – Lots UAP

**Microbiologie** (graines prégermées désinfectées)

Pathogènes: *Diplodia sapinea*, *Diaporthe rudis*, *Fusarium avenaceum*

**PCR *N. neomacrospora*** (6 répétitions)

Résultats: 6 échantillons positifs /6 répétitions

## Visites dans 3 pépinières

**PCR *N. neomacrospora*** sur semis symptomatiques

Résultat: négatif pour les 3 pépinières

**Microbiologie** isolement sur semis symptomatiques

- Pépinière 1: - (nd)
- Pépinière 2: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium avenaceum* et *F. oxysporum*
- Pépinière 3: *Cylindrocarpon* sp.



# Conclusion

## Diversité de champignons sur graines

- Champignons pathogènes transportés par les graines de résineux
- Champignons viables (approche microbiologique)

## Transmission verticale

- Manque d'études sur le sujet – difficulté pour évaluation du risque (Simonin et al., 2022; Franic et al, 2023; Larsson et al., 2024)
- Difficultés expérimentales à surmonter
  - stérilité du matériel expérimental(graines, substrat...)
  - difficulté à interpréter de faibles taux de germination (physiologie ou fonte de préémergence?)
  - ...

# Merci pour votre attention