



Formation à la collecte d'échantillons et à la reconnaissance des organismes nuisibles
13-23 Novembre 2006 - Madagascar

Bonnes pratiques du diagnostic phytosanitaire "du champ au laboratoire"

Bruno HOSTACHY (DAF-SPV Réunion)





Objectifs de la formation

Donner une démarche permettant de porter un diagnostic phytosanitaire sur une culture :

- Les observations de terrains,
- La reconnaissance des maladies et ravageurs au champ,
- Formuler une demande d'analyse,
- Echantillonnage, conditionnement et expédition des échantillons,

SOMMAIRE

1. Connaissance et reconnaissance des organismes nuisibles sur le terrain	p 1
Pour quelles applications	
1.1 La surveillance du territoire	
1.1.1 Plan de surveillance	
1.1.2 Plan de contrôle	
1.2 La production de matériel de base sain	
1.3 L'édition de bulletin d'avertissements agricole	
1.4 Le diagnostic conseil	
2. Du champ au laboratoire	p 3
2.1 La demande d'analyse	p 3
2.2 Echantillonnage, prélèvement, conditionnement et expédition	p 5
2.2.1 Echantillonnage et prélèvement: cas général	
2.2.2 Cas des échantillons sur plantes ligneuses	
2.3 Le conditionnement des échantillons	p 8
2.4 L'envoi des échantillons	

ANNEXES

A I: Plans de surveillance et plans de contrôle	p 11
A II: Protocole de prélèvement de tubercules de pomme de terre	p 12
A III: Conditionnement des échantillons en "BOS"	p 13
A IV: Technique d'Immuno-Empreinte (IE)	p 14
A V : Bonnes pratiques de diagnostic (complément)	p 15
A VI : Fiches de renseignements jointes aux échantillons	p 25
A VII : Les prélèvements pour analyse de sol	p 32
A VIII : Tableau statistique pour prélèvement d'échantillons	p 41



1. Connaissance et reconnaissance des organismes nuisibles sur le terrain

Pour quelles applications ?

1.1 La surveillance du territoire :

Organisée par des plans de surveillance et des plans de contrôle qui s'appuient sur les bases réglementaires de l'Organisation Nationale de Protection des Végétaux (ONPV) du pays ou de plusieurs états (Union Européenne). Ces plans sont diffusés au sein des divisions de l'ONPV par note de service détaillée (cf. présentation générale dans la note N2006-8041, fichier pdf). Ces plans définissent des recommandations spécifiques pour l'échantillonnage et les prélèvements :

- Les lieux à prospecter,
- Les végétaux à surveiller : liste des espèces sensibles, celles qui extériorisent les symptômes, les porteurs sains...
- Les périodes optimales : biologie de l'organisme nuisible (température, humidité), planning des flux commerciaux...
- Les symptômes à rechercher : avec les particularités selon les espèces
- La description de l'organisme nuisible: cas des insectes
- Les protocoles d'échantillonnage, de prélèvement, de conditionnement et d'expédition
- Les précautions à prendre
- Les laboratoires destinataires : avec les exigences des laboratoires (ex fiches de renseignements spécifiques, planning des envois...
- La gestion des résultats : la prise de décision (refoulement, destruction, traitement...)

1.1.1 Plan de surveillance :

Quels objectifs : détection des risques sanitaires et phytosanitaires.

Quels principes : Les plans de surveillance obéissent à 3 grands principes

- surveillance globale par rapport à un risque phytosanitaire : le plus souvent le plan est motivé par l'apparition d'organismes nuisibles émergents dans la zone géographique ou par l'existence de flux d'importations à partir d'origine à risque (ex : *Bactrocera invadens*, les Crinivirus de la tomate),
- échantillonnage aléatoire,
- préalable à la mise en place de plans de contrôle.

Quelques exemples de plan de surveillance actuellement en cours sur le territoire français (se référer aux fichiers pdf joints):

- Insecte : Plan de surveillance relatif aux capricornes asiatiques *Anoplophora spp* (Note de service DGAL/SDQP/N2005-8156 16/06/2005)
- Champignon :, Plan de surveillance relatif à *Phytophthora ramorum* (Note de service DGAL/SDQP/N2005-8161)



1.1.2 Plan de contrôle :

Quels objectifs : Le contrôle des conditions de production des végétaux

Quels principes :

- détection d'un ON au sein de la filière de production du matériel végétal,
- mise en évidence d'anomalies, de non conformités, voire de fraudes pouvant entraîner des sanctions pénales,
- échantillonnage ciblé : origine, type d'établissement, espèce, organe...

Quelques exemples de plan de contrôle actuellement en cours sur le territoire français et à La Réunion (voir références en annexe):

- Virus : Plan de contrôle des végétaux de tomate y compris semences vis à vis du virus de la mosaïque du pepino (PepMV): voir les détails sur la taille des échantillons (semences et plants) et sur les mesures de précautions lors des prélèvements (virus transmissible par contact)
- Plants de pomme de terre : Plan de contrôle phytosanitaire 2006-2007 de la pomme de terre destinée à la plantation : conditions de délivrance du Passeport Phytosanitaire Européen (PPE) : voir le protocole de prélèvement de tubercules de semence (cas de prélèvements nécessitant un numéro de scellé) et le protocole de prélèvement d'échantillons pour nématodes à kyste, ce plan précise les méthodes officielles d'analyses pour les ON recherchés (*Clavibacter michiganensis* sp *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*, *Globodera pallida* et *rostochiensis*, *Meloidogyne chitwoodi* et *fallax*,
- Réunion : les virus du bananier (CMV, BBTV, BSV, BBrMV) en application du cahier des charges relatif aux conditions de ré-acclimatation de vitro-plants de bananiers,
- Réunion et national : Plan de contrôle fraisier import : détails sur le protocole de prélèvement et d'échantillonnage pour la recherche de *Colletotrichum acutatum* avec des adaptations aux différents types de matériel végétal (plants frigo, vitro-plants, plants en motte) avec référence à une méthode officielle d'analyse.

1.2 La production de matériel de base sain : la certification du matériel végétal : schéma de production de plants assurant la qualité sanitaire avec des contrôles dans la filiation du matériel végétal : la production de plants certifiés : vanille, fraisier, agrume...,

1.3 L'édition de bulletin d'avertissements agricoles : l'objectif est d'avertir les producteurs du moment opportun pour intervenir : basé sur la surveillance de la culture, du repérage précoce des premiers symptômes ou de l'ON (exemple : le mildiou et l'oïdium de la vigne)

1.3 le diagnostic-conseil:

- l'objectif recherché est d'identifier avant de décider d'une intervention (traitement phytosanitaire, technique culturale, choix du matériel végétal...);
- le diagnostic est indispensable à la mise en œuvre des systèmes de Protection Biologique Intégrée : repérage des ravageurs, suivi des auxiliaires apportés, arrivée d'ON dont la présence est incompatible avec la poursuite de la lutte biologique contre les autres ON présents (choix des interventions chimiques),



2. Du champ au laboratoire

L'identification au champ n'est pas toujours possible et il est aussi important de pouvoir confirmer un diagnostic posé au champ.

Chaque laboratoire a des exigences et des recommandations spécifiques à la réglementation en vigueur dans le pays, sa discipline, son organisation. Cette organisation est maintenant le plus souvent régie par un système qualité qui précise les conditions générales des prestations d'analyses.

2.1 La demande d'analyse :

Tout produit à soumettre à analyse adressé au laboratoire doit être accompagné d'une demande d'analyse écrite explicite, datée et si possible signée par le demandeur ou son représentant, comportant au moins les renseignements suivants (pour plus de détail se référer à « La fiche de demande pour analyse officielle » en annexe VI 6.1 :

- **Demandeur de l'analyse :**

nom et adresse complète du demandeur, à qui le rapport d'analyse sera expédié,

- **Numéro de l'échantillon :**

Ce numéro est destiné à assurer la traçabilité de l'échantillon entre le demandeur et le laboratoire. Il doit être unique et explicite, dûment reporté à l'identique sur l'emballage de l'échantillon et ne pas prêter à confusion entre deux échantillons : Plusieurs systèmes sont envisageables en fonction de l'organisation et du mode fonctionnement de l'ONPV Il est recommandé que le numéro comporte l'année, puis un numéro chronologique : des lettres peuvent être insérées pour identifier la région, des numéros peuvent être attribués aux agents en charge des actions.

Exemple :

Année	Régions (Tuléar, Antanarivo, Anjouan, Grande Comore)	Numéro d'ordre
2006	TUL	1 à 1000
2006	ANT	1 à 999 (agent X)
2006	ANT	1000 à 1999 (agent Y)
2006	ANJ	1 à 1000
2006	GCO	1 à 999 (agent Z)
2006	GCO	W)

- **Identification du producteur ou du bénéficiaire**

Nom et adresse de l'interlocuteur où l'échantillon a été prélevé : producteur, exportateur, importateur, revendeur, collectivité; à qui les analyses peuvent éventuellement donner lieu à facturation.

- **Laboratoire destinataire :** s'assurer que le laboratoire a la compétence pour répondre à la demande

- **Identification de l'échantillon :**

- Type de lot : selon la nature de l'activité (importation, exportation, surveillance, contrôle en pépinière, gestion de foyer...);

- Consignation : Indiquer si la marchandise est bloquée dans l'attente des résultats d'analyse ;

- L'urgence des analyses : par exemple la consignation de la marchandise induit un caractère urgent pour les analyses avec la connaissance d'un délai pour gérer la marchandise bloquée (nécessité de réfrigération) ;



- Localisation du prélèvement : si besoin, détails sur la localisation de la parcelle
- Un numéro de scellé : cas où les échantillons sont prélevés en plusieurs lots identiques en vue d'analyses contradictoires ;
- Le numéro du lot : numéro de lot, de série, ...au sein d'une cargaison... ;
- Pays d'origine :

- **Description de l'échantillon :**

- Nom botanique de la plante : le nom de la plante est extrêmement important pour le laboratoire, indiquer le genre et l'espèce, à défaut indiquer la famille du végétal, le cas échéant l'appellation locale ou régionale ; l'indication de la variété (notamment pour les espèces légumières) peut s'avérer fort utile en orientant les tests de détection (cas de variétés résistantes ou tolérantes à tel ou tel ON).

- Description : décrire physiquement l'échantillon : par exemple sachet contenant de la terre, le nombre d'insectes dans de l'alcool à 70°C, 150 plants numérotés de 1 à 150 ou 150 plants sans numéro pris au hasard dans la parcelle, poids de 1000 graines (semences)...

- Informations complémentaires : ajouter toute information aidant à situer la plante dans le contexte de la production (ex : pied mère, tête de clone, échantillon traité en cas de semence...)

- **Demande :**

- Quelle analyse : Analyse demandée ou désignation de l'organisme nuisible à rechercher ; mentionner explicitement la demande de confirmation d'un résultat positif. Il faut toujours se référer à l'offre de prestation du laboratoire et en cas de doute ne pas hésiter à contacter le laboratoire.

L'absence de demande d'analyse peut conduire à un mauvais diagnostic, voire un refus d'analyse de la part du laboratoire. La demande d'analyse fait office de bon de commande.

- Quelques exemples de demandes :

- Demande de diagnostic: de quoi cette plante est elle malade? est ce une maladie d'origine virale? Suspicion d'une phytotoxicité à la suite d'un traitement phytosanitaire...
 - Demande de détection : demande de recherche ciblée pouvant faire référence à un plan de surveillance ou de contrôle: présence ou absence d'un ON en utilisant des méthodes dont le résultat est présence ou absence
 - Demande d'identification : demande d'identification d'un organisme : il est important de préciser quel est le niveau de détermination souhaité : genre, espèce, sous espèce, race..., en fonction de la demande les spécimens pourront être adressés à des spécialistes.

- **Quels formulaires utiliser ?** : Des formulaires de demande d'analyse sont disponibles auprès des laboratoires.

En fonction du contexte, plusieurs types de formulaires sont utilisables :

- des formulaires officiels de l'Organisation National de Protection des Végétaux (ONPV) du pays : formulaire général pour les contrôles (import, surveillance du territoire) (cf annexe VI). Dans le but d'harmoniser la saisie des données au sein des services de protection des végétaux il convient d'utiliser un formulaire unique commun aux services de contrôle et aux laboratoires.
- ou des formulaires spécifiques à des plans de surveillance et des plans de contrôle axé sur une recherche ciblée : annexe VI.
- des formulaires pour les demandes de professionnels : le diagnostic nécessite souvent de recueillir des renseignements sur l'historique de la culture : ex. fiche SPV Réunion (annexe VI) , LNPV unité de mycologie agricole et forestière (fichier pdf), nématologie (annexe VII).



- des formulaires plus adaptés pour les prospections, les inventaires : fiche d'observation terrain du PRPV (annexe VI).

- **Renseignements complémentaires notamment en cas de diagnostic :**

- Historique de la culture : précédent cultural, mention des analyses et résultats déjà obtenus sur les échantillons ;
- Conditions de culture : pleine terre, sous abri, hors sol, hydroponique, altitude ;
- Dernière intervention culturale : toute intervention susceptible d'interaction avec les symptômes observés (arrosage, taille, apport d'engrais,...) ;
- Dernier traitement phytosanitaire : avoir les éléments pour repérer une éventuelle phytotoxicité ;
- Observations : éléments de l'environnement, évènements climatiques (embruns en bord de mer, coup de vent, gel...)

- **Description et importance des symptômes**

Il s'agit d'indiquer ce qui semble important pour guider le laboratoire afin de faciliter l'analyse ou le diagnostic. Ce champ doit permettre à l'inspecteur d'apporter des informations seulement visibles sur le terrain :

- Répartition et importance des symptômes : sur le végétal et dans la culture
 - Apparence des symptômes : permet d'apporter des précisions sur la teinte, aspect, des symptômes (par exemple des taches peuvent avoir un aspect grasseux au champ et sec à l'arrivée au labo).
 - Remarques : incidence des symptômes en matière de qualité et de rendement;
- Cette rubrique peut également servir de lien avec le laboratoire: par exemple pour mettre en garde contre un éventuel danger (suspicion de parasites de quarantaine, traitements phytosanitaires récents ...).

2.2 Echantillonnage, prélèvement, conditionnement et expédition

Le résultat des analyses est pour partie tributaire des conditions d'échantillonnage, de prélèvement et d'expédition des échantillons. Le respect de ces conditions incombe entièrement au demandeur des analyses. Toutes les consignes énoncées sont autant de conditions pour que le laboratoire puisse accepter les échantillons mais aussi mieux répondre à la demande.

2.2.1 Echantillonnage et prélèvement:

Des règles statistiques tenant compte de la taille des lots à contrôler, du taux d'infestation potentiel, peuvent s'appliquer pour définir la taille de l'échantillon soumis à analyse ou au mode d'échantillonnage (voir en annexe tableau fixant la taille des échantillons).

De façon général, les prélèvements envoyés en frais doivent être réalisés juste avant l'expédition. Si les échantillons ne sont pas envoyés le jour même, ils doivent être conservés au froid avant envoi (aux environs de 4°C).

Pour un diagnostic :

- Si possible prélever la plante entière de façon à préserver la fraîcheur des échantillons et à couvrir la diversité des symptômes sur une plante; des problèmes racinaires peuvent entraîner des jaunissements ou flétrissement des parties aériennes ; prélever minimum 5 exemplaires « malades » (adapter le nombre selon le stade de développement des plantes) présentant des symptômes à différents stades d'évolution. Le prélèvement doit contenir au moins une plante saine,
- Lors de l'arrachage des plantes, utiliser un outil permettant de conserver un maximum de racines intactes ; conserver la terre autour des racines ;
- S'il n'est pas possible de prélever la plante entière, l'organe ou la portion d'organe doit être suffisamment important pour encadrer largement les symptômes.
- Isoler les racines dans un sac plastique noué autour du collet ; le cas échéant entourer les racines d'un papier absorbant humidifié en roulant fermement le tout dans un papier journal et placer le tout dans un sac plastique



Pour une détection :

- l'échantillonnage varie selon le type de matériel végétal. Il est souvent défini par les textes réglementaires des plans de surveillance ou de contrôle (voir référence en annexe I)
- l'échantillonnage des lots de semences est défini selon les recommandations de l'ISTA (International Seed Testing Association, www.seedtest.org), un lot étant défini par une variété et un numéro. Selon la taille des emballages, les échantillons élémentaires (petite partie de semences prélevée en un point du lot) y sont prélevés en des endroits et à des profondeurs différentes. L'échantillon envoyé au laboratoire pour analyse est constitué du mélange des échantillons élémentaires prélevés.

Quelques situations de prélèvements et d'échantillonnage proposées par des plans de surveillance actuellement en vigueur en France :

- Plan de contrôle des végétaux de tomate y compris semences vis à vis du virus de la mosaïque du pepino (PepMV) :
 - modalités pour le contrôle des semences :

Poids du lot	Poids de l'échantillon
supérieur à 10 kg et inférieur à 10000 kg	15 g de semences (environ 5000 graines)
inférieur à 10 kg et supérieur à 600 g	Au moins 7,5 g (environ 2500 graines)
Inférieur à 600 g	1% du lot avec un échantillon minimum de 1000 graines (soit environ 3,3 g)

NB : Ne pas prélever des lots de semences traitées, pelliculées ou enrobées car la méthode d'analyse (ELISA) n'a pas été validée pour ce type de matériel (faux positifs).

○ modalités pour le contrôle des plants en pépinière :

- Précautions à prendre : le virus de la mosaïque du pepino étant transmissible par contact, endosser blouse à usage unique, sur-bottes et gants jetables avant de pénétrer dans chaque unité de production et en changer entre les unités ;
 - L'échantillon est formé de 300 folioles prélevées sur 300 plants par unité de lieu de production (1 serre), pris au hasard (en privilégiant cependant les végétaux les plus âgés): prélever dans la zone apicale d'un plant, la foliole terminale de la dernière feuille étalée. Recommencer l'opération sur 14 autres plants choisis dans une même zone ou dans le même lot de plants. Cet ensemble de 15 folioles constitue un sous-échantillon. Prélever 19 autres sous-échantillons choisis dans d'autres zones de la pépinière ou dans d'autres lots de plants (un lot est formé des plants de même variété – même date de semis – même site de production). L'ensemble des 20 sous-échantillons constitue l'échantillon de 300 folioles.
 - Attention ! superposer et aligner les folioles par leur pointe, de manière à former un « sandwich » de 15 folioles. Placer le « sandwich » dans un petit sac plastique. Refermer le sac (ne pas faire de nœud trop serré), et inscrire un code attribué au sous-échantillon de façon à pouvoir retrouver rapidement la localisation de la contamination en cas d'analyse positive. Rassembler les 20 sachets des sous-échantillons dans un grand sac, le refermer et inscrire dessus un code attribué à l'échantillon.
 - Chacun de ces sous-échantillons fait l'objet d'un test ELISA.
- Plan de surveillance relatif aux capricornes asiatiques *Anoplophora* spp
 - Plan de surveillance relatif à *Phytophthora ramorum*



- Enquête suivi de filière de fraisiers importés de divers pays / *Colletotrichum acutatum* : les modalités de prélèvements sont définies en fonction de la nature du matériel végétal
 - Plants frais : prélever 2 pétioles complets avec stipules par plant sur 300 plants répartis sur l'ensemble de l'envoi,
 - Plants frigo : prélever 300 plants par botte (1 botte = 25 plants soit 12 bottes) en répartissant dans plusieurs caisses
 - Mottes (« Tray plants ») : prélever 300 mottes au hasard répartis sur l'ensemble de l'envoi

2.2.2 Cas des échantillons sur plantes ligneuses : il n'est souvent pas possible de prélever un plant entier mais seulement les parties qui présentent des symptômes. Pour ces cas, respecter les modalités suivantes

- sur feuilles : pour des symptômes de type chlorose, taches, feutrage, cloques

- prélever les feuilles ou les aiguilles attachées sur leurs pousses ou rameaux
- prélever plusieurs rameaux feuillés (20 feuilles environ). Tous les stades des symptômes doivent être représentés,
- en cas d'humidité (prélèvement par temps pluvieux), égoutter les échantillons dans du papier buvard
- vérifier si le symptôme n'est pas lié à un problème sur rameau, tronc, ou racine (cas des cochenilles sur racines, des pourridiés)
- prélever jusqu'à un dizaine de rameaux (longueur 20 à 40 cm)
- rechercher des zones en limite des symptômes (zones de changement de couleur, chancres avec des tissus sains autour... : prélever les rameaux porteurs de zones saines et de zones infectées. Eviter d'enlever l'écorce des tous les rameaux (celle-ci constitue une barrière qui protège les parasites présents de saprophytes superficiels).

- sur tronc : type nécrose, suintement, méplat, coloration ou pourriture du bois : En général le prélèvement est difficile. Deux cas peuvent se produire :

- Arbre abattu : si le diamètre du tronc est inférieur ou égal à 20 cm, prélever un billon (pièce de bois) au moins égal à celle du symptôme. Si le diamètre est supérieur, prélever une tranche de ce billon dans le sens de la longueur renfermant la partie atteinte et les zones limites de celle-ci
- Arbre sur pied :
 - Symptôme sous cortical : prélever en limite de nécrose un morceau de bois, au ciseau à bois ou à la tronçonneuse, d'au moins 15 cm de long.
 - Pourriture et coloration du bois du cœur : Prélever à la tarière quelques (5 à 10) carottes dans la zone atteinte, désinfecter la tarière à l'alcool entre chaque prélèvement, conditionner chaque carotte dans du papier type buvard ou journal sec ; dans le cas de pourriture du bois, envoyer les fructifications pouvant être présentes sur le tronc (bien préciser la zone de prélèvement et de la fructification par rapport à la pourriture du bois)

- sur collet et racines :

Type nécrose, pourriture, pourridié (mycélium sous cortical) :

- Cas de pourridiés : il importe de bien prélever des morceaux de racines ou de collet avec les palmettes mycéliennes encore adhérentes entre le bois et l'écorce (lier les 2 parties entre elle es si nécessaire), dans le cas de petites racines, prélever des morceaux complets de racines

Autres nécroses : prélever le maximum de racines de toutes tailles, trouver les zones limites tissus sains/nécrosés

- Fructifications de basidiomycètes lignivores :

Dégager la fructification (champignon à lamelles, à pores...) avec un couteau. Prélever la fructification au complet, car certains champignons possèdent une partie souterraine.



Cueillir les sujets adultes (ni trop jeunes, ni trop vieux) et les envoyer le plus rapidement possible après récolte.

L'identification des échantillons : chaque échantillon doit porter un numéro d'identification sur son emballage de conditionnement en respectant les règles suivantes : écriture lisible, écriture indélébile, numéro unique permettant d'assurer la traçabilité de l'échantillon, numéro reporté sur la fiche de renseignement (ou de demande d'analyse) jointe à l'échantillon.

Avant tout prélèvement, il est important de vérifier les points suivants :

- vérifier que l'on dispose du matériel nécessaire aux prélèvements (outils, sacs, marqueur, emballage ...

Cas des sols pour analyse de la flore pathogène : la plupart des champignons du sol se répartissent de façon hétérogène, sous forme de foyers épars dans la parcelle.

- avant tout prélèvement, il est important de repérer des zones homogènes (voir annexe VII) caractérisées par un même aspect végétatif de la culture, une localisation des symptômes, un même précédent cultural, un même historique cultural, toute autre caractéristique identique ; repérer les zones particulières et les exclure du prélèvement, il s'agit de zones telles que : points hauts, points bas, zones où des produits ont été entreposés (fumier, amendements...), anciens chemins, affleurements rocheux, bordures (haies), zones ayant subi des engorgements suite à des accidents d'irrigation ou de drainage.
- chaque grande zone homogène doit être échantillonnée séparément : en réalisant 10 à 15 prélèvements (ou prises) ; chaque prise est faite sur une profondeur de 15 à 20 cm après avoir dégagé les premiers centimètres superficiels du sol et en les regroupent dans un sac plastique pour constituer 1 échantillon de 3 litres environ.

Cas des substrats :

Un échantillon est constitué de 10 prélèvements mélangés dont le volume total est de 3 litres minimum.

- Dans le cas d'un lot supposé sain : il est conseillé d'effectuer les prélèvements à raison de :
Substrat conditionné en sac : 1 prélèvement par sac et 1 sac tous les 10 ou 12 sacs
Substrat conditionné en vrac : 1 prélèvement par m³ de substrat
- Dans le cas d'un lot supposé infesté :
Substrat conditionné en sac : 1 prélèvement par sac et 1 sac tous les 2 ou 3 sacs
Substrat conditionné en vrac : 1 prélèvement par 200 litres de substrat

2.3 Le conditionnement des échantillons

Pour le matériel végétal : protéger les échantillons des échauffements et du gel en les enveloppant dans du papier journal ou du papier absorbant en évitant de compacter l'échantillon puis dans une poche plastique sur laquelle est reporté le numéro d'identification de l'échantillon, bien caler le tout dans un carton solide.

Pour les échantillons de type liquide ou semi liquide, terre ou boues... destinés à des analyses bactériologiques, ils devront être conditionnés dans un flacon plastique, fermé hermétiquement, le tout placé dans un emballage suffisamment solide pour éviter sa détérioration. L'échantillon est dans ce cas constitué d'un litre ou équivalent d'un litre pour les échantillons semis liquides ou solides. La quantité d'eau peut être inférieure si elle a déjà été soumise à filtration sur le lieu de prélèvement.

Cas des plantes en pot : placer le pot dans un sac plastique et ceinturer au collet afin que la plante soit exempte de terre,



2.4 L'envoi des échantillons

Préalablement à l'envoi d'échantillons (indispensable pour les envois en nombre), il est conseillé de prévenir le laboratoire de l'envoi du colis par téléphone, télécopie ou mél. Il faut notamment s'assurer que la demande corresponde bien au domaine de compétence du laboratoire (ex : cas de dépérissement avec suspicion d'un problème d'origine tellurique : laboratoire de nématologie, laboratoire de la flore pathogène des sols, laboratoire de pédologie...). Pour les envois en nombre ou répétitif le demandeur proposera si possible un programme de prélèvement ou du moins s'assurera que le laboratoire peut prendre en charge les analyses. Le demandeur est aussi tenu d'informer le laboratoire des risques que pourraient occasionner la manipulation des échantillons. A réception, en cas de suspicion, le laboratoire se réserve le droit de refuser les échantillons (par exemple : réaliser des tests de pathogénicité sur des souches de cercosporiose du bananier nécessite de travailler dans une enceinte de confinement ayant les caractéristiques de type NS3). Pour des envois hors du pays, il faut prévoir l'envoi bien à l'avance de façon à respecter les dispositions imposées par le réglementation du pays de réception: cas des échantillons acheminés à en France (Réunion, Métropole) avec une LOA (Lettre officielle d'autorisation, voir Annexe VI 6.4).

Le colis : Les fiches de renseignements (ou de demande d'analyses) doivent être placées dans le colis, bien à part des sachets d'échantillons de façon à ce que les documents ne soient pas souillés (enveloppe papier sous plastique). Les références indiquées sur les sachets correspondant à celles figurant sur les demandes d'analyses ; ces références doivent être lisibles sans qu'il soit nécessaire d'ouvrir les sachets. Le demandeur doit faire en sorte qu'aucune contamination croisée entre les échantillons ou contamination de l'environnement ne soit possible et que les colis arrivent en bon état au laboratoire. Les laboratoires qui reçoivent des échantillons susceptibles de contenir des organismes nuisibles de quarantaine demandent à ce que les fiches accompagnant les échantillons soient placées dans une enveloppe à l'extérieur du colis. Ainsi à l'arrivée du colis et sans avoir à l'ouvrir, le personnel du laboratoire peut orienter les échantillons vers des salles aux conditions de confinement requises. Il est aussi possible de prévoir une signalétique « quarantaine » sur l'emballage.

L'envoi du colis :

Les échantillons peuvent être adressés au laboratoire de diverses manières :

- dépôt directement au laboratoire : une fiche de renseignement doit être remplie à l'accueil, les échantillons conditionnés dans un emballage hermétique,
- envoi conditionné selon les recommandations. les échantillons susceptibles de se dégrader rapidement et pour lesquels une analyse est urgente, devront être envoyés par transport rapide (inférieur ou égal à 2 jours). Les échantillons d'eau et d'effluents liquides doivent notamment être acheminés dans un délai maximum de 24 heures si la filtration est impossible sur le lieu de prélèvement. Pour les envois hors du pays, il est recommandé de se renseigner auprès des services de messagerie sur les délais, le planning des vols, les exigences du pays destination.

Réception des échantillons :

En cas de doute sur la bonne réception, un appel téléphonique auprès du laboratoire permet de s'assurer de la réception des échantillons par celui-ci.

Les échantillons devront être expédiés de façon à ce qu'ils puissent être réceptionnés de préférence en début de semaine (au plus tard le jeudi), pour pouvoir être traités dans les meilleurs délais. En cas de dépassement du délai recommandé, les résultats pourront être assortis de réserve.

3. Quelques situations de diagnostic :

Se référer aux présentations « powerpoint » faites durant la formation :

- Présentation BH Introduction.ppt
- Présentation BH champ labo.ppt
- Présentation champ labo partie 3.ppt
- Présentation ON émergents.ppt



ANNEXES

- **Annexe I** : Exemples de quelques plans de surveillance et de contrôle actuellement en cours sur le territoire français, plans intégrant des recommandations spécifiques pour l'échantillonnage et les prélèvements.
- **Annexe II** : Protocole de prélèvement de tubercules semences de pomme de terre
- **Annexe III**: Conditionnement des échantillons pour une conservation sous déshydratation par la méthode dite en « BOS ».
- **Annexe IV** : La technique d'immuno-empreinte pour la détection de certains virus
L'exemple du virus de la tristeza (CTV), application à l'épidémiologie, les contrôles en pépinière
- **Annexe V** : bonnes pratiques pour le diagnostic des affections phytosanitaires
- **Annexe VI** : les fiches de renseignements jointes aux envois d'échantillons
 - 6.1 Formulaire général ONPV
 - 6.2 Formulaire simplifié pour le diagnostic (DAF-SPV Réunion)
 - 6.3 Fiche PRPV dans le cadre des prospections pour inventaire
 - 6.4 Recommandations et formulaires de Lettre Officielle d'Autorisation (LOA) pour l'envoi d'échantillons vers La Réunion
- **Annexe VII** : Les prélèvements pour analyses de sol
 - 7.1 Principes généraux
 - 7.2 Prélèvement pour analyse de sol
 - 7.3 Conditionnement des échantillons de sol
 - 7.4 Echantillons pour analyses nématologiques
 - 7.4.1 Recommandations générales
 - 7.4.2 Protocole général de prélèvement pour nématodes à kystes
- **ANNEXE VIII** : Tableau statistique pour fixer la taille des échantillons



ANNEXE I

Exemples de quelques plans de surveillance et de plan de contrôle actuellement en cours sur le territoire français, plans intégrant des recommandations spécifiques pour l'échantillonnage et les prélèvements

Les Notes de services relatives à ces plans sont en fichier pdf sur le CD.

- Présentation générale : Plan de surveillance et de contrôle (Note de service DGAL N2006-8041)
- Virus : Plan de contrôle des végétaux de tomate y compris semences vis à vis du virus de la mosaïque du pepino (Note de service DGAL/SDQPV/N2005-8149),
- Insecte :, Plan de surveillance relatif aux capricornes asiatiques *Anoplophora* spp (Note de service DGAL/SDQPV/N2005-8156).
- Champignon : Plan de surveillance relatif à *Phytophthora ramorum* (Note de service DGAL/SDQPV/N2005-8161)
- Fraisier : Plan fraisier import, (Note de service DGAL N2006-8162) et méthode officielle *Colletotrichum acutatum*
- Pomme de terre : Plan de contrôle phytosanitaire 2006-2007 de la pomme de terre à plantation. Conditions de délivrance du Passeport Phytosanitaire Européen (PPE) (Note de service DGAL N2006-8252)

ANNEXE II

Protocole de prélèvement de tubercules semences de pomme de terre (d'après l'annexe II de la note de service DGAL/SDQPV/N2006-8250)

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT DE TUBERCULES DE SEMENCE

1- Matériel

- sacs poubelle + filets (25 kg), - scellé SPV, fiche de suivi d'échantillon + stylo, couteau ou ciseau

2- Définition du lot

Un lot de semence de pommes de terre correspond à :

- une parcelle, un numéro de producteur,
- une variété, une classe, une origine.

3- Taille de l'échantillon à prélever et identification de l'échantillon

Pour un lot identifié, le prélèvement sera de 200 tubercules, prélevés au hasard

- conditionnement en vrac : prélèvement réalisé de façon aléatoire sur tout le lot.
- conditionnement en pallox : prélèvement réalisé sur 5 sacs ou caisses.

Chaque échantillon de **200 tubercules**, accompagné du numéro d'identification (code région sur 2 lettres + numéro séquentiel), sera conditionné dans un unique sac, sac qui devra être scellé (voir point 5).

Les tubercules présentant des symptômes suspects seront placés dans un sac plastique et mis avec l'ensemble des autres 200 tubercules prélevés.

L'identification du lot est un point important : présence de notation (étiquette, N° cellule de stockage).

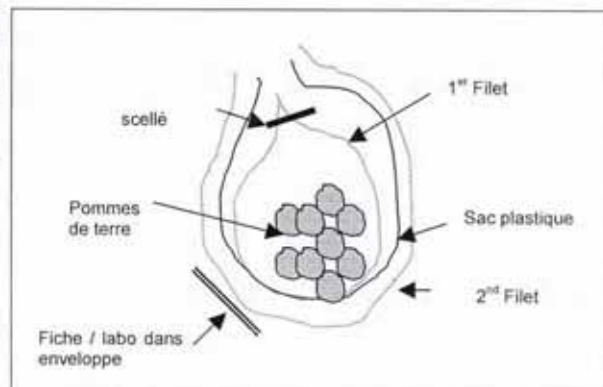
Prélever 200 tubercules en plusieurs prises élémentaires sur l'ensemble de la marchandise.

4- Conditionnement de l'échantillon

Concernant l'échantillon même : le filet contenant les tubercules sera mis dans un sac poubelle, à lier également et enfin remis dans un second filet. Le tout sera fermé avec un scellé **SPV numéroté**, N° reporté sur la fiche de suivi d'échantillon.

La fiche de suivi d'échantillon doit être renseignée et porter le numéro d'identification. Elle accompagne le prélèvement : elle devra être dans une enveloppe (ou toute autre protection), glissée entre l'emballage poubelle et le second filet, de telle façon à être visible.

L'échantillon doit être étanche.



7- Envoi des échantillons

Les sacs devront être **envoyés au laboratoire dans les meilleurs délais**, par un moyen de transport rapide.

Ils pourront être stockés avant envoi dans à l'abri du gel, mais pas au froid.

Attention à toutes manipulations excessives qui pourraient déchirer les sacs.

Pour une bonne organisation, prévenir le laboratoire concerné de l'envoi d'échantillons.



Annexe III

Conditionnement des échantillons pour une conservation sous déshydratation par la méthode dite en « BOS ».

Objectif de la méthode : conditionnement et conservation des échantillons de feuilles en vue de réaliser des analyses virologiques ultérieurement et de collectionner des échantillons infectés.

Descriptif de la méthode : Cette méthode a été mise au point par le virologue hollandais BOS. C'est une technique très simple de déshydratation et de conservation des organes végétaux en vue de réaliser des analyses virologiques ultérieurement. Principalement utilisée pour les feuilles, la technique peut aussi s'appliquer à des organes non lignifiés : épiderme de fruit, écorce de jeunes pousses d'arbres fruitiers.

Les étapes :

- Au terrain :
 - pour du diagnostic, prélever des feuilles présentant des symptômes
 - pour de la surveillance sans symptôme visible, prélever selon le protocole de prélèvement défini dans le plan de surveillance ou de contrôle.
 - les feuilles prélevées (2 ou 3 trois folioles ou fragments de feuilles) sont enroulées , sans les tasser, dans du papier absorbant (à la manière d'un « bonbon »), lui même inséré dans une petite boîte contenant du chlorure de calcium anhydre (CaCl₂, réf SIGMA C1016) au tiers du volume et fermant hermétiquement (par exemple boîte de pellicule photo, tube à hémolyse, tube Falcon...). Cette boîte est ensuite conservée à température ambiante ou de préférence à environ 4 °C. Au bout de 5 à 7 jours l'échantillon est déshydraté et peut être expédié en envoi simple vers un laboratoire en prenant soin .
- Au laboratoire : si les échantillons sont préparés au laboratoire, il est préférable de peser les échantillons à mettre en « BOS » de manière à avoir le poids requis pour la méthode d'analyse (ex 1gr pour un test ELISA, 0.1 gr pour une RT-PCR...).

Applications :

Les études réalisées ont montré que la plupart des familles de virus pouvaient se conserver par cette méthode et qu'au bout de 20 ans il était toujours possible de détecter le virus (L.BOS, 1977). Cette technique est particulièrement adaptée pour conditionner, conserver et adresser des échantillons dans le cadre d'inventaire.

Sur des échantillons ainsi conservés, la plupart des techniques pour le diagnostic et la détection des virus peuvent être mises en œuvre : Indexage biologique sur une gamme de plantes hôtes, sérologie (ELISA), biologie moléculaire (PCR),

Référence bibliographique :

- BOS, L, 1979. Persistence of infectivity of three viruses in plant material dried over CaCl₂ and stored under different conditions. European Journal of Plant Pathology, 217-220.

Annexe IV

La technique d'immuno-empreinte pour la détection de certains virus L'exemple du virus de la tristeza (CTV), application à l'épidémiologie, les contrôles en pépinière

LA TECHNIQUE D'IMMUNO-EMPREINTE (I.E.)

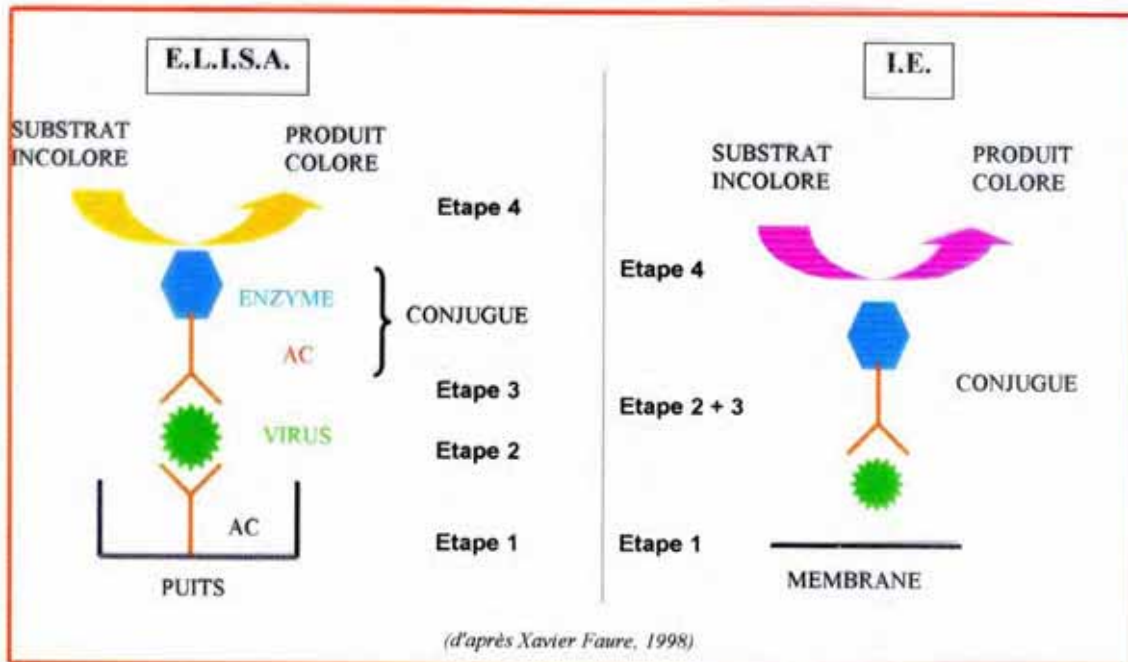
1 - PRINCIPE de l'I.E. et de l'ELISA

ELISA :

- Etape 1 :* préparation de la plaque, dépôt des anticorps (une nuit à 4 °C) pour permettre la fixation ultérieure des virus des échantillons contaminés.
- Etape 2 :* dépôt des échantillons (2 heures à 37 °C).
- Etape 3 :* dépôt du conjugué (2 heures à 37 °C): fixation sur le virus.
- Etape 4 :* dépôt du substrat (2 heures à 37 °C): coloration des échantillons contaminés et lecture au spectrophotomètre.

I.-E. :

- Etape 1 :* impression des échantillons et éventuellement fixation des virus directement sur la membrane
- Etape 2 :* bain BSA (1 heure à température ambiante et sous agitation)
- Etape 3 :* bain conjugué (2 heures à température ambiante et sous agitation)
- Etape 4 :* bain substrat (20 min) et lecture sous binoculaire.





ANNEXE V

BONNES PRATIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DES AFFECTIONS PHYTOSANITAIRES ORIENTEES SUR LES ARBRES

(d'après G. Chauvel, Bases de la protection phytosanitaire, Edition SRPV Midi Pyrénées, mars 1995 et adaptations B. Hostachy).

Le diagnostic est l'acte de reconnaître une affection phytosanitaire à partir de symptômes, de signes, d'indices... Il s'agit de trouver les causes de l'affection afin d'y remédier de la façon la plus efficace possible. Sans diagnostic de qualité, les interventions seront décidées avec une grande part de hasard et leur résultat sera tout aussi hasardeux.

5.1 QUALITES ET COMPORTEMENT DU DIAGNOSTIQUEUR

C'est l'ensemble des éléments fournis par l'examen de la plante, de son environnement et de son histoire qui permettra de poser le diagnostic. Aussi est-il indispensable de réaliser une enquête minutieuse fondée sur des questions et des observations méthodiques et sans *a priori*.

L'observateur doit examiner toutes les pistes possibles, en gardant à l'esprit qu'un problème phytosanitaire peut être causé non seulement par des facteurs biotiques (maladies, insectes, plantes parasites...), mais aussi par des facteurs abiotiques (accidents climatiques, pollution, stress édaphique, dégâts de construction...) ou par les deux types de facteurs agissant simultanément.

Ainsi, le diagnostiqueur doit être capable :

- de reconnaître et de distinguer les symptômes causés par divers agents parasites
- d'apprécier l'importance des relations présentes et passées entre l'arbre et son environnement.

Par ailleurs, pour examiner une plante malade, il est nécessaire d'avoir des éléments sur la plante et la culture dans son état normal. C'est-à-dire connaître :

- ses caractéristiques morphologiques : forme, taille, couleur des feuilles, des branches, du tronc, des racines...
- ses caractéristiques écologiques : besoin en eau, sensibilité au froid, préférence pour les sols calcaires ou acides...
- son cycle "saisonnier" habituel (phénologie) : époques de débourrement, floraison, fructification, tubérisation...



5.2 DIVERSITE DES AGENTS PATHOGENES

Les symptômes peuvent être causés par de nombreux facteurs agissant isolément ou non. par exemple, un flétrissement du feuillage peut résulter :

- d'un déficit hydrique dans le sol ;
- de problèmes racinaires (maladies ou asphyxie racinaire...) ;
- de l'obstruction de vaisseaux dans le tronc ou les branches (fusarioses, verticillioses...).

5.2.1 Agents abiotiques (non vivants)

Les facteurs abiotiques jouent souvent un rôle plus important sur la santé des plantes cultivées dans un environnement urbain ou péri-urbain. Les problèmes de pollution, de compaction, d'hétérogénéité des sols du fait du remodelage ne doivent pas être sous-estimés. Par ailleurs, le diagnostic de ces affections s'avère souvent délicat.

Accidents climatiques:

- Fortes températures,
- Changements brutaux de température,
- Froid, gel,
- Vent, grêle
- Foudre,
- Sécheresse,
- Submersion

Stress édaphiques :

- Carence (N, P, K, S, Mg, Ca, Mn, Fe, B, Cu, Zn, Mo).
- Pollutions (herbicides et autres pesticides, gaz de ville, sels de déneigement).
- Compétitions racinaires, étranglements...
- Compaction, aération.
- Dégâts liés à la construction (décapage, remblai, asphalte, béton, dallage).

Pollutions atmosphériques :

CO₂, SO₂, fluorures, ozone, métaux lourds, pluies acides, ammoniacque, particules et poussières

Dégâts mécaniques :

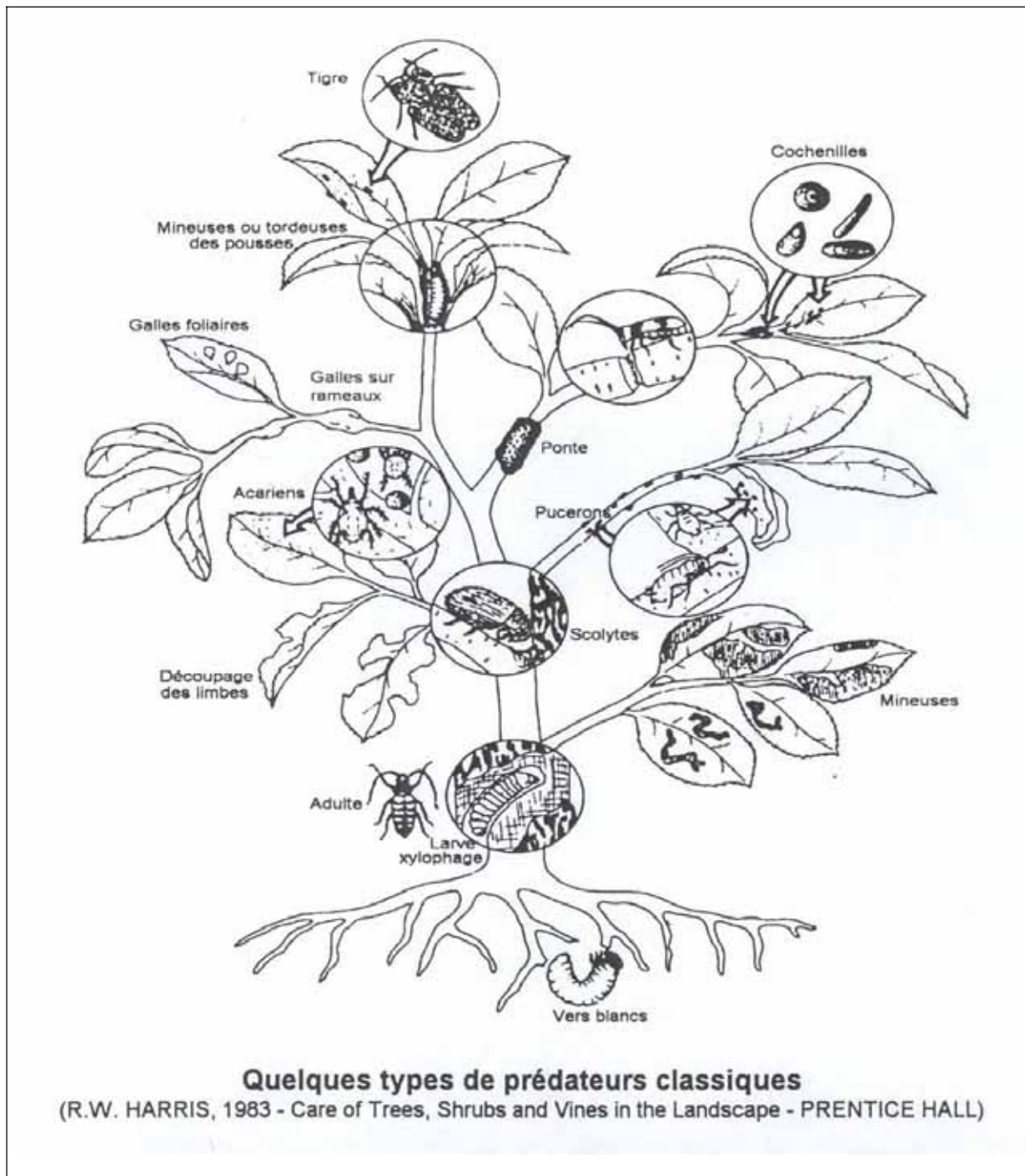
Taille, élagage,

Autres problèmes :

- espèce inadaptée au contexte édapho-climatique,
- Dégâts liés à l'éclairage artificiel

5.2.2 Agents biotiques (vivants) :

- Champignons,
- Bactéries,
- Mycoplasmes,
- Spiroplasma,
- Rickettsies,
- Virus
- Insectes
- Acariens
- Nématodes,
- Vertébrés,
- Plantes parasites.



Cependant, il faut souligner que les symptômes dus à l'activité de certains insectes peuvent s'apparenter à certains symptômes de maladies : flétrissement, jaunissement dus aux insectes xylophages, pousse du pin tordues par la "tordeuse du pin" ou par la "rouille courbeuse des rameaux"...

- **Ne pas confondre les lieux d'apparition des symptômes et la localisation de l'agent pathogène.**

Pour la plupart des insectes et pour certaines maladies (oïdium, rouilles;;), les symptômes apparaissent à proximité du site infesté. Le diagnostic s'en trouve alors grandement facilité.

Cependant, de nombreuses maladies (et certains insectes) sont signalés par des symptômes parfois très éloignés de l'endroit où est localisé l'agent pathogène. C'est notamment le cas des problèmes



phytosanitaires touchant les racines ou les vaisseaux à l'intérieur du tronc et des branches : insectes xylophages, pourridiés, phytophthora, verticilliose...

Le diagnostiqueur ne doit pas focaliser son regard sur le lieu des symptômes les plus marquants. Il s'agit d'inspecter avec précision toutes les parties de la plante, de la culture et de son environnement proche..

5.3 L'EXAMEN DE LA CULTURE DANS SON MILIEU

Le diagnostiqueur doit pouvoir analyser les conditions présentes et passées de l'environnement de la culture et évaluer leurs incidences sur les plantes malades.

5.3.1 Principes généraux : Outre les conditions physico-chimiques du sol et les accidents variés de pollutions chimiques qui expliquent un nombre non négligeable d'affections, des causes moins perceptibles comme les travaux agricoles source de compaction du sol peuvent être à l'origine de dépérissement. Par exemple une semelle de labour va perturber le développement des racines et avoir des répercussions sur la croissance : le diagnostic de ce genre de problème nécessite une étude du profil cultural en creusant une tranchée sur la profondeur explorée par les racines. Pour les arbres, des symptômes, peu discriminants, se manifestent progressivement sur plusieurs années après les modifications de l'environnement. Il peut apparaître un changement de coloration des feuilles, une diminution de taille, un éclaircissement de la couronne de haut en bas, un dépérissement de bourgeons et de branches, une prolifération anarchique des pousses

Il est donc nécessaire de connaître :

- les éléments qui ont pu perturber la plante, pour les arbres remonter sur les 5 à 10 dernières années,
- les dates d'apparition des premiers symptômes et l'évolution du problème au cours du temps.

5.3.2 Les conditions climatiques

Le climat récent (2 à 4 semaines précédentes) est directement lié à l'apparition de nombreuses maladies.

Si par exemple, des taches nécrotiques sur feuilles apparaissent une dizaine de jours après un temps fortement pluvieux, on peut souvent en déduire qu'un organisme parasite est responsable, en raison des conditions favorables à la contamination et à la dissémination.

Si des roussissements d'aiguilles, des nécroses et recroquevillements de feuilles apparaissent dans les jours qui suivent un temps extrêmement chaud, sec et venté, les symptômes peuvent être attribués à une évapotranspiration excessive. De même, de faibles températures printanières peuvent altérer les jeunes feuilles.

De plus, le climat des mois ou des années passées peut également jouer un rôle notable dans la santé des arbres et arbustes. En particulier, l'impact de sécheresse répétée ne doit pas être sous-estimé.

Les maladies à virus sont particulièrement sensibles aux effets de la température. Ainsi, des températures trop froides sous serres peuvent provoquer des symptômes nécrotiques chez des tomates infectées par le virus Y de la pomme de terre (PVY) alors que la plupart des souches françaises ne provoquent pas de symptômes sur tomate dans les conditions normales (LOT et LECOQ, 1986, Le diagnostic en virologie végétale : Un art des méthodes, PHM Revue Horticole, 11-23). De même, c'est la différence d'intensité lumineuse qui explique l'expression de deux virus de la laitue :

- le virus de la jaunisse occidentale de la betterave (BWYV) est fréquent dans les cultures de plein champ en fortes conditions d'éclaircissement,
- le virus de la pseudo jaunisse de la betterave (BPsYV) qui sévit essentiellement en culture sous abri l'hiver.

Les symptômes de jaunisses causés par ces virus sont identiques et ont longtemps été attribués à des carences magnésiennes.

5.4 LES OUTILS DU DIAGNOSTIC

La réponse aux questions du diagnostic nécessite l'utilisation d'outils adéquats qui sont pour la plupart, des outils relativement courants.

Les outils du diagnostic		
Secteur d'investigation	Outillage	Usages
Racines	Bêche, pelle, transplantoir Couteau, serpette Cisaille, sécateur	Dégagement des racines superficielles Observation de la zone sous-corticale (coloration des tissus, présence de mycélium). Prélèvement d'échantillons et observation de la zone vasculaire (décoloration)
Sol	pH mètre Tarière agronomique	Mesure du pH Exploration du sol et du sous-sol et prélèvement d'échantillons.
Feuilles et rameaux	Paire de jumelles Loupe de poche (x 10) Couteau, serpette Sécateur, cisaille Echenilloir Scies Sacs plastiques Tubes ou boîtes fermées	Observation des parties inaccessibles de l'arbre Très utile pour la détection des acariens et de certains organes de fructification des champignons. Observation de la zone sous-corticale (recherche de galeries d'insectes, limite entre les tissus sains et les tissus nécrosés...) Sectionnement pour déceler les affections vasculaires. Prélèvement d'échantillons de rameaux en hauteur. Sectionnement de branches de fort diamètre Pour le conditionnement des échantillons verts prélevés. Pour le transport des insectes prélevés.
Tronc	Tarière sonde Ciseaux à bois Shigomètre	Prélèvement de carottes destinées à déceler la présence de maladies vasculaires, de pourritures du cœur. Etude également des cernes de croissance. Peuvent être utilisés pour effectuer des prélèvements en surface. Instrument de mesure électronique qui permet de déceler des pourritures internes sans avoir à effectuer des sondages (mesure de la conductivité électrique).
Autres	Mètre ruban Bouteille d'alcool Bloc notes Appareil photo numérique	Mesure de plages nécrosées, de trous de sortie d'insectes. Désinfection des outils après prélèvement d'échantillons suspects. Observations, plans, dessins... Très utile, afin de fixer un symptôme, demander un avis



5.5 LES PRINCIPALES QUESTIONS POUR LE DIAGNOSTIC

5.5.1 QUESTIONS GENERALES : LA PLANTE ET SON ENVIRONNEMENT

1. Espèce ? Age ? Dimensions ?
2. Situation de l'arbre (bord de route, isolé sur pelouse, dans un parc, à proximité d'un point d'eau...) et situation par rapport aux sources polluantes (complexe industriel, grande voie de communication) ?
3. Si l'arbre a été nouvellement transplanté, dans quelles conditions l'opération a-t-elle été réalisée ?
4. De quand datent les symptômes et comment sont-ils survenus (arrivée soudaine ou progressive) ?
5. Les symptômes sont-ils généralisés ou localisés à certaines parties de l'arbre (branches hautes, basses, sur un seul côté...) ?
6. Des arbres de la même espèce situés aux alentours présentent-ils les mêmes symptômes ? Des arbres d'espèces différentes sont-ils également atteints ?
7. Quel est le type de symptôme général observé ?
 - Flétrissement
 - Dépérissement
 - Décolorations
 - Baisse de vigueur
 - Défoliation
 - Chutes prématurées de feuilles
 - Déformations...
8. Quelle a été l'importance de la pousse au cours de ces dernières années ?
9. Des travaux de construction ou de terrassement ont-ils été effectués récemment à proximité (routes, parking, creusement de fossés, tranchées...) ?
10. L'arbre est-il exposé à des dégâts mécaniques répétés (pare-choc d'automobiles, tondeuses, fils de débroussaillage...) ou, a-t-il été sévèrement ou régulièrement rabattu ?
11. Le niveau du sol a-t-il été modifié autour de l'arbre ?
12. Quelles interventions ont été réalisées sur l'arbre ?
 - traitement ? Quand ? Quel produit ? Dosage ?
 - la taille a-t-il été accompagnée d'une désinfection des outils ?
13. Y a-t-il eu utilisation ou épandage de produits à proximité (désherbage total...) ?
14. Y a-t-il des canalisations enterrées (eau, gaz...) ?
15. Y a-t-il eu des accidents climatiques pouvant être reliés à l'apparition des symptômes (inondations, grêle, foudre...) ?

5.5.2 QUESTIONS SUR LE SOL

Les réponses à ces questions sont extrêmement importantes surtout si l'arbre présente un dépérissement progressif depuis plusieurs années.

1. Quel est le type de sol (argileux, sablonneux, humifère...) et son état de compaction ?
2. Ce sol est-il recouvert (asphalte, ciment, gazon, mulchs divers...) ? Si c'est le cas, quelle est l'importance de la surface laissée découverte à la périphérie de l'arbre ?
3. Est-ce que l'eau stagne après une forte pluie ? Y a-t-il une hydromorphie temporaire ?
4. Y a-t-il des aérateurs ou des drains ?
5. Quelle est la profondeur du sol (roche mère, dalle, débris de construction) ?
6. Quel est le pH du sol ? Sa teneur en macro et oligo-éléments ?



5.5.3 QUESTIONS SUR LE SYSTEME RACINAIRE

1. Les racines ont-elles un volume de sol apparemment suffisant pour se développer ? Examiner la densité de plantation, la proximité des arbres par rapport aux fondations, aux murs. Y a-t-il des étranglements racinaires ?
2. Les racines ont-elles une coloration normale (écorce et bois) ?
3. Y a-t-il des altérations sur le système racinaire : tumeurs, galles, pourritures ?
4. Les racines dégagent-elles une odeur particulière ?

5.5.4 QUESTIONS SUR TRONC, COLLET ET BRANCHES

1. Y a-t-il des fissures ou des fentes ? Comment sont-elles orientées sur le tronc et les branches ?
2. Y a-t-il des cavités visibles dans le tronc ? Quelle est leur taille ?
3. Observe-t-on des écoulements sur l'écorce ?
4. Quelle est la coloration des tissus sous l'écorce et l'état de transition entre la partie saine et atteinte ? Peut-on déceler un feutrage mycélien ?
5. Y a-t-il des trous de sortie d'insectes ou des traces de leur présence (sciure au sol...) ?
6. Le collet est-il sain (présence de tumeurs, traces de blessures...) ?
7. Y a-t-il des encroûtements, sectionnements de pousses ,
8. Peut-on déceler des raccourcissements des entrenœuds, des arrêts de l'élongation, des accidents de croissance ?

5.5.5 QUESTIONS SUR LES FEUILLES

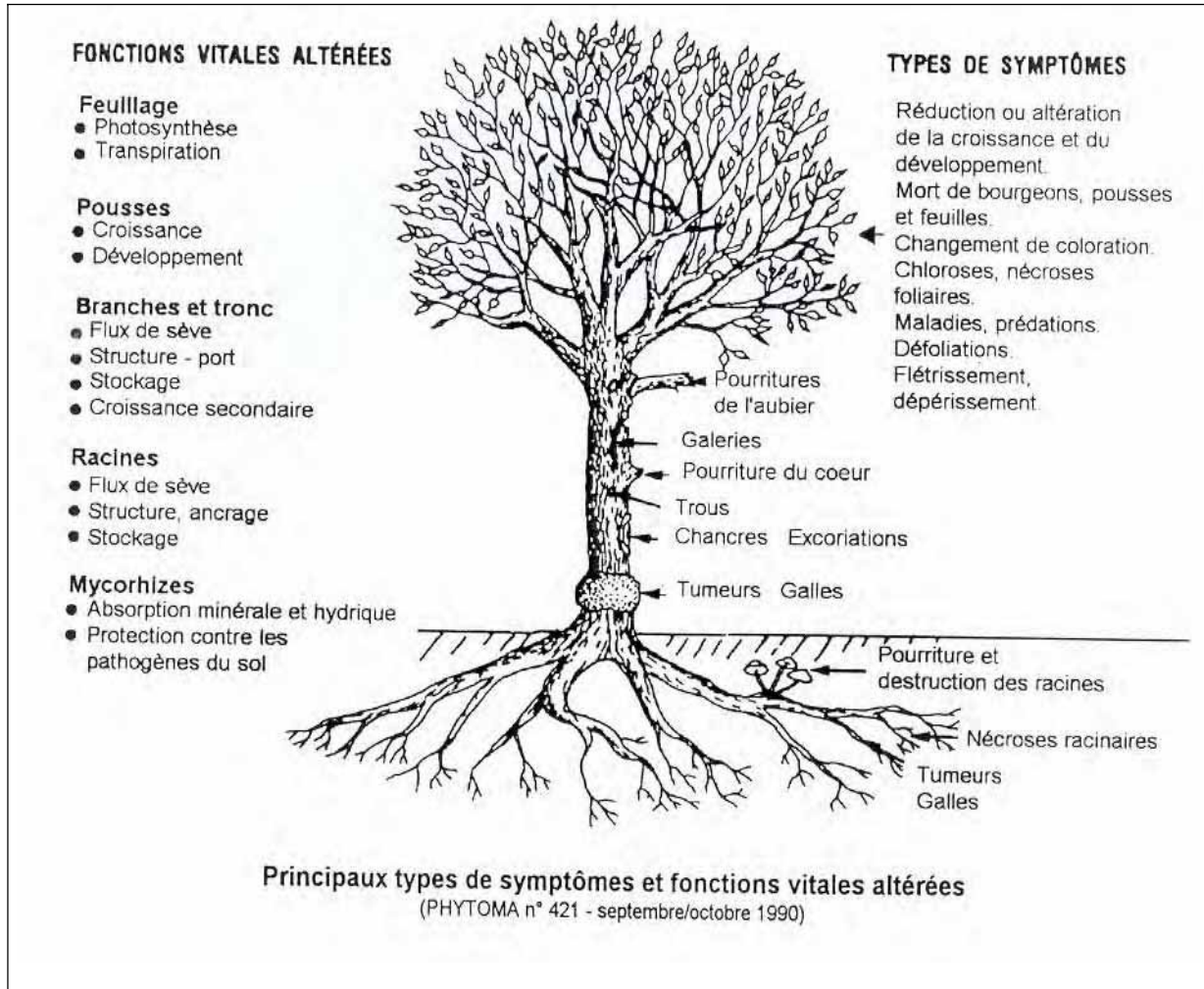
1. Y a-t-il des insectes ou des exuvies ?
2. Quel est le type de dégâts occasionnés ou de traces observées ?
 - décapage, découpage marginal, perforation ou destruction des limbes ;
 - mines,
 - présence de miellats, fumagine, bourses soyeuses,
 - déformation, crispation ;
 - décoloration, chlorose ;
 - présence d'un feutrage mycélien, pustules, organes de fructification.. ;
 - nécroses, taches foliaires (description), répartition et formes ;
 - malformations, tumeurs, galles érinoses.

5.6 LES SYMPTOMES

Les symptômes sont les manifestations visibles qui traduisent l'état maladif de l'arbre. Ils sont liés soit au dysfonctionnement du végétal (jaunissements, flétrissements...), soit à l'apparition de lésions ou de malformations (nécroses, tumeurs...).

Principaux symptômes et indices de présence

Le schéma suivant présente les principaux types de symptômes ainsi que les fonctions vitales pouvant être altérées.



En général, les attaques d'insectes ou d'acariens sont assez faciles à identifier par :

La présence directe des animaux ;

La présence d'indices (cocons, toiles, dépouilles nymphales, miellat) ;

Les dégâts subis par l'arbre (ex. : feuilles minées avec des morphologies caractéristiques des mines selon l'espèce de mineuses ; la défoliation totale par les chenilles processionnaires ; grandes perforations des limbes par la cheimatobie ; décapage des feuilles par les galéruques ; limbes entièrement détruits sauf les nervures par le bombyx cul brun ; crispations et déformations des feuilles par les psylles ; décolorations des feuilles par les tigres acariens ; galles érinoses par les acariens galligènes ; miellat et fumagines par les pucerons)...

Un arbre avec 39 maladies? Si toutes ces maladies ne peuvent pas infecter en même temps une plante, il est important de pouvoir les identifier pour mettre en œuvre les méthodes de lutte appropriées. Attention aux noms communs attribués à des maladies, à des traductions parfois erronées, qui peuvent prêter à des confusions et être à l'origine de mauvais diagnostic et de mauvais choix de méthodes de lutte.

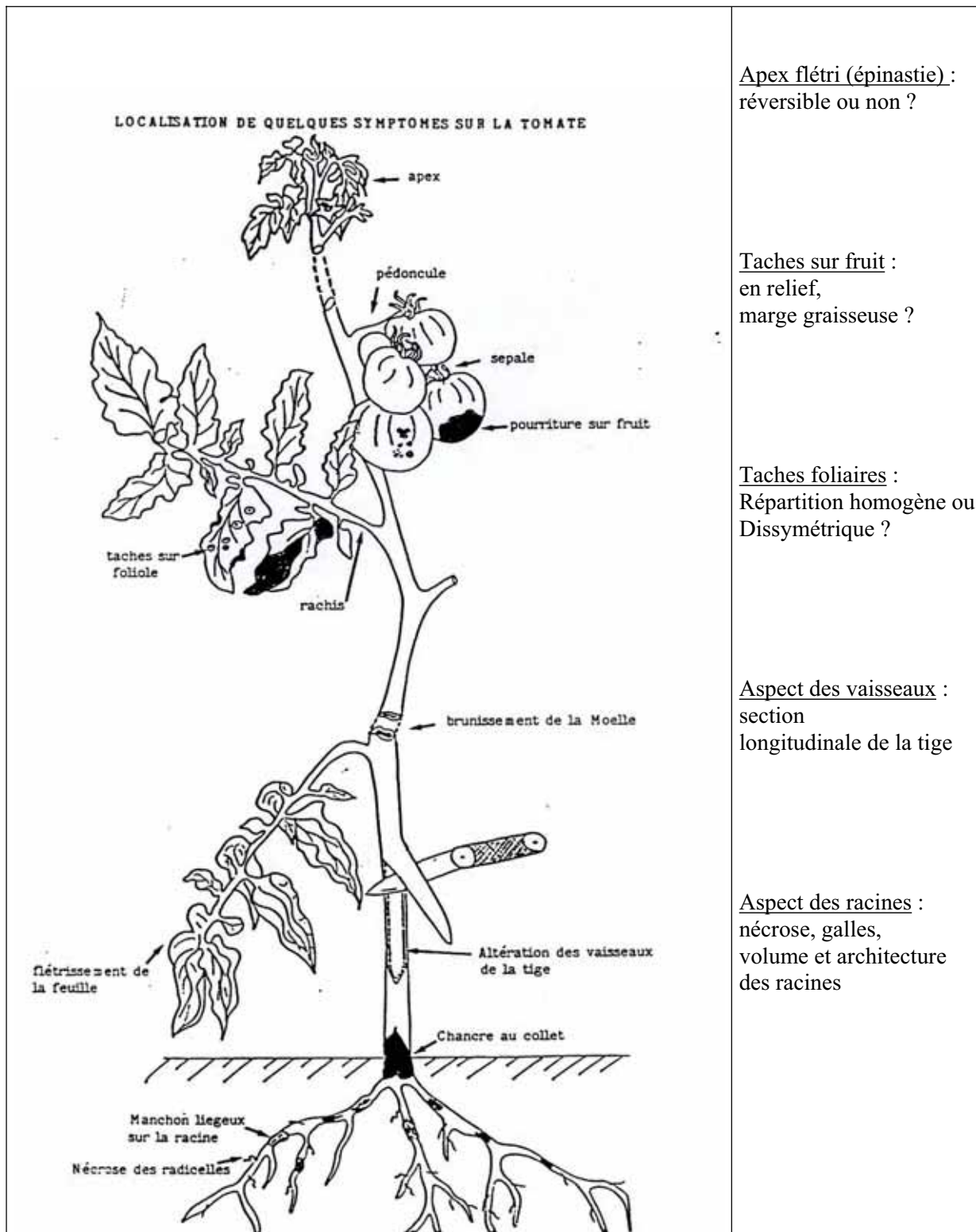


Anglais

- 5. Root rot
- 14. Mosaic
- 15. Downy mildew
- 18. Powdery Mildew
- 23. 2,4-D herbicide injury
- 24. Witches' broom
- 27. Wilt
- 33. Anthracnose
- 34. Ring spot

Français

- Pourriture des racines
- Mosaïque
- Mildiou
- Blanc ou Oïdium
- Dégâts de 2,4-D
- Balaie de sorcière
- Flétrissement
- Anthracnose
- Taches en anneaux



Approche du diagnostic sur un plant de tomate : les bonnes observations.

Apex flétri (épinastie) :
réversible ou non ?

Taches sur fruit :
en relief,
marge grasseuse ?

Taches foliaires :
Répartition homogène ou
Dissymétrique ?



Aspect des vaisseaux :
section
longitudinale de la tige

Aspect des racines :
nécrose, galles,
volume et architecture
des racines

ANNEXE VI

Les fiches de renseignements jointes aux envois d'échantillons

6.1 Formulaire général ONPV

Fiche de demande pour analyse officielle			
 LIBERTÉ • ÉGALITÉ • FRATERNITÉ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE 	1 Demandeur de l'analyse 11 Nom de l'inspecteur (*) 12 Adresse (*) 13 Fax Téléphone 14 Email institutionnel Email inspecteur (*)		2 N° d'échantillon (*) Année Régio Numéro d'ordre e n 22 date de prélèvement (*) 23 signature 23 signature de inspecteur l'inspecté
	3 Identification du producteur ou du bénéficiaire 31 NOM (*) 32 ADRESSE 33 N° Phytopass2 34 N° Producteur		4 Laboratoire destinataire (*)
	5 Identification de l'échantillon 51 Type de lot (1) (*) Importation exportation surveillance PPE Foyer 52 Consignation 53 URGENCE		54 Localisation du prélèvement 55 N° de Scellé 56 N° de lot 57 Pays d'origine
6 Description de l'échantillon 64 Nom botanique (*) 65 Variété 61 Description		62 Classe de l'échantillon (*) 63 Quantité et unité 66 Organe affecté 67 Informations complémentaires	
71 Type de recherche (*) (1)	72 Parasite recherché	73 Références (note de service ou méthode d'analyse)	
711 Détection	(*)	(*)	
712 Infestation latente	(*)		
713 Identification			
714 Diagnostic			
715 OGM			
716 Remarques			
<u>En cas de diagnostic, renseignements complémentaires</u>			
8 Conditions culturelles 81 Précédent culturel 82 Conditions de culture (1) Pleine terre Terre sous abri Terre sous abri chauffé Hors sol Conteneurs Hydroponique Autre 83 Dernière intervention culturale 84 Dernier traitement 85 Observations 9 Importance des symptômes 91 Répartition et importance des symptômes: 92 Apparence des symptômes 93 Remarques			

(1) Cocher la case correspondante / (*) Information obligatoire



ANNEXE VI

Les fiches de renseignements jointes aux envois d'échantillons

6.2 Formulaire simplifié pour le diagnostic (DAF-SPV Réunion)


FICHE DE RENSEIGNEMENTS A JOINDRE AVEC L'ECHANTILLON

Date d'enregistrement :		Date de prélèvement :		
Références du laboratoire, N° LOLA :		Références de l'expéditeur, N° :		
	PRODUCTEUR		EXPEDITEUR	
Nom				
Adresse				
Téléphone				
Pays d'origine				
Facturation	<input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui		<input type="checkbox"/> au PRODUCTEUR <input type="checkbox"/> Surveillance	
<input type="checkbox"/> Importation, pays :			<input type="checkbox"/> Autre : _____ <input type="checkbox"/> Certification <input type="checkbox"/> Autre thème :	
<input type="checkbox"/> Exportation, pays :				
INFORMATIONS SUR LA CULTURE ou SUR LE LOT				
Plante (espèce, variété, porte-greffe)				
Type de matériel végétal (plante entière, bouture, in vitro...) et utilisation (production, multiplication...)				
Historique de la culture (date plantation, traitements particuliers, toutes informations utiles au diagnostic)				
Description des symptômes (Importance et répartition)				
Analyses demandées				
Autres analyses déjà effectuées (résultats)				

ANNEXE VI

Les fiches de renseignements jointes aux envois d'échantillons

6.3 Fiche PRPV dans le cadre des prospections pour inventaire



OBSERVATION TERRAIN

Référence observation terrain * :

Date d'observation (JJ/MM/AAAA) * : / / Nom observateur / récolteur * :

ATTENTION : Pour une observation, on prend en compte la plante hôte et l'organisme nuisible ou adventice observé. L'observation prend aussi en compte le cas de l'organisme auxiliaire

LOCALISATION :

Pays * :

Région * :

Commune/Localité * :

Type de milieu :

<input type="checkbox"/> Cultivé ouvert	<input type="checkbox"/> Cultivé sous abris
<input type="checkbox"/> Hors sol	<input type="checkbox"/> Forestier
<input type="checkbox"/> Friche	<input type="checkbox"/> Autre

GEOLOCALISATION :

- Coordonnées en degrés décimaux
- Ellipsoïde de référence : WGS84

Longitude : Est

Latitude : Sud

Altitude : mètres

PLANTE HOTE * : Langue * :

Stade de développement de la plante : Semence(s) Plantule(s) Plante(s) adulte(s)

Plante(s) au stade floraison et/ou de fructification Stade non déterminé

Intensité des dégâts sur les organes suivants et commentaires des dégâts sur l'organe :

Racines/tubercules/rhizomes/bulbes : <input type="checkbox"/> Non observé <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort Collet : <input type="checkbox"/> Non observé <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort Tige/tronc : <input type="checkbox"/> Non observé <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort Feuilles/bourgeons : <input type="checkbox"/> Non observé <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort Fleurs : <input type="checkbox"/> Non observé <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort Fruits/graines : <input type="checkbox"/> Non observé <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort	
--	--

Intensité des dégâts sur la plante hôte entière et commentaires des dégâts sur la plante :

Non observé Nul Faible Moyen Fort

Intensité des dégâts sur toute la culture et commentaires des dégâts sur la culture :

Non observé Nul Faible Moyen Fort

ORGANISMES OBSERVES : (pour un organisme auxiliaire, indiquer le nuisible cible)

Pré-détermination (nom supposé organisme ou Famille) *	Echantillonnage	Référence du prélèvement *	Rôle de l'organisme *	Type d'organisme (1)	Méthode de capture (2)	Abondance
	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		<input type="checkbox"/> Nuisible <input type="checkbox"/> Auxiliaire <input type="checkbox"/> Adventice	<input type="checkbox"/> AC <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AR <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> ?	<input type="checkbox"/> Aspi <input type="checkbox"/> Fauch <input type="checkbox"/> Elev <input type="checkbox"/> Rege <input type="checkbox"/> Frap <input type="checkbox"/> Autre	<input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Forte
	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		<input type="checkbox"/> Nuisible <input type="checkbox"/> Auxiliaire <input type="checkbox"/> Adventice	<input type="checkbox"/> AC <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> AR <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> ?	<input type="checkbox"/> Aspi <input type="checkbox"/> Fauch <input type="checkbox"/> Elev <input type="checkbox"/> Rege <input type="checkbox"/> Frap <input type="checkbox"/> Autre	<input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Forte

COMMENTAIRES : Préciser la demande d'analyse, schéma, croquis des symptômes, historique de la culture, ...

(1) : Type d'organismes : AC = Acariens, AB = Aragnées, B = Bactérie, C = Champignon, I = Insecte, N = Nématode, P = Plante, V = Virus, Viroïde, Viroid, ? = Non déterminé
 (2) : Méthode de capture : Aspi = Aspirateur, Elev = Elevage, Frap = Frappage, Fauch = Fauchage, Rege = Regage, Autre = Autres modalités
 * Texte en italique : champ obligatoire

Programme Régional de Protection des Végétaux dans l'Océan Indien



ANNEXE VI - Les fiches de renseignements jointes aux envois d'échantillons 6.3 Fiche PRPV dans le cadre des prospections pour inventaire (suite)



DETERMINATION DES ORGANISMES OBSERVES

Référence observation terrain:

Référence prélèvement *	Référence échantillon laboratoire *	Déterminateur *	Date détermination (JJ/MM/AAAA) *	Méthode de détermination (5)	Détermination de l'organisme * (6)	Stade de développement (7)	Commentaires sur l'organisme (8)
			... / ... / ...	<input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> IPI <input type="checkbox"/> IPIB <input type="checkbox"/> IS <input type="checkbox"/> IIB <input type="checkbox"/> OIB <input type="checkbox"/> A1	Famille * Nom scientifique *	<input type="checkbox"/> Oeuf(s) <input type="checkbox"/> Larve(s) <input type="checkbox"/> Nymphe(s) <input type="checkbox"/> Adulte(s) <input type="checkbox"/> Stade non déterminé	
			... / ... / ...	<input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> IPI <input type="checkbox"/> IPIB <input type="checkbox"/> IS <input type="checkbox"/> IIB <input type="checkbox"/> OIB <input type="checkbox"/> A1	Famille * Nom scientifique *	<input type="checkbox"/> Oeuf(s) <input type="checkbox"/> Larve(s) <input type="checkbox"/> Nymphe(s) <input type="checkbox"/> Adulte(s) <input type="checkbox"/> Stade non déterminé	

COMMENTAIRES SUR LES DETERMINATIONS :

(1) : Référence prélèvement ; Référence de prélèvement sur le terrain (démarré par le récolteur)
 (2) : Référence échantillon laboratoire ; Référence d'échantillon envoyé par laboratoire de détermination
 (3) : Déterminateur ; nom du déterminateur et éventuellement nom du laboratoire auquel il appartient
 (4) : Date de détermination ; date à laquelle l'échantillon est déterminé au format JJ/MM/AAAA
 (5) : Méthode de détermination ; IV = Identification visuelle par examen visuel ; IPIB = Identification par des méthodes morpho-biologiques ; IIB = Identification par message biologique ; IPI = Identification (après coloration) ; IS = Identification au microscope ; ISE = Identification au microscope ; IIB = Identification par message biologique ; IPI = Identification (après coloration) ; IS = Identification au microscope ; ISE = Identification au microscope
 * : Texte en italique = Champ obligatoire



Annexe VI

Les fiches de renseignements jointes aux envois d'échantillons

6.4 Envoi d'échantillons pour analyse en laboratoire à la Réunion (consulter le site www.prpv.org).

Le dispositif réglementaire français prévoit une demande obligatoire d'autorisation préalable pour importer des échantillons de végétaux ou d'organismes biologiques pour analyse en laboratoire. Dans le cadre du PRPV, une procédure simplifiée est mise en place par le Service de Protection des Végétaux (SPV) de la Réunion.

Cette procédure permettra de faciliter l'appui au diagnostic, la réalisation des inventaires « organismes nuisibles » des pays ainsi que l'analyse des échantillons de végétaux destinés à la recherche de résidus pesticides dans le cadre des campagnes de contrôles prévues par le PRPV. Pour ce faire, le demandeur se doit de respecter scrupuleusement les règles suivantes :

1. Chaque demandeur doit prévenir par email le responsable du laboratoire SPV ou par télécopie (02 62 33 36 08) de son intention, en précisant le pourquoi, la nature et l'origine de l'envoi ainsi que la quantité. Pour faciliter le travail du SPV, télécharger le formulaire de Lettre Officielle d'Autorisation (LOA) à partir de cette page (*voir encadré*), le remplir et le joindre à l'email de demande.

Il faut préciser que cette demande est réalisée uniquement dans le cadre du PRPV/COI.

2. Chaque demande sera analysée et une LOA sera délivrée au demandeur en français ou en anglais. Il s'agit d'un permis d'importation de matériel à caractère scientifique, donc pouvant être soumis à dérogation au sens réglementaire.
3. Chaque demandeur devra respecter les conditions exigées par l'importation et s'assurer que les autorités phytosanitaires officielles du pays demandeur contresignent (en bas à gauche) le formulaire préalablement envoyé par le SPV Réunion. Un certificat phytosanitaire peut aussi accompagner ce papier mais ce n'est pas une obligation stricte.
4. Dans tous les cas, le colis devra être hermétiquement fermé afin d'éviter toute dissémination potentielle.
5. Les fiches de renseignement accompagnant les échantillons seront accessibles sans avoir à ouvrir le colis (enveloppe scotchée sur l'emballage).
6. Enfin, avant toute démarche, s'assurer que le laboratoire de destination a donné son feu vert pour l'analyse.
7. Au moment de l'envoi des échantillons, il est indispensable de prévenir le laboratoire destinataire en précisant les références de l'envoi (date d'envoi, numéro de LTA (lettre de Transfert Aérien, société de transport choisie...))

Remarque : le SPV Réunion accepte les échantillons de végétaux et d'organismes biologiques provenant d'autres pays et hors cadre PRPV, la procédure à suivre est un peu plus longue et nécessite une demande de Lettre Officielle d'Autorisation (LOA) à imprimer et à envoyer au SPV Réunion.



ANNEXE VI

Les fiches de renseignements jointes aux envois d'échantillons 6.4 Formulaire de Lettre Officielle d'Autorisation (LOA)

Communautés Européennes

Lettre officielle d'autorisation (importation pays tiers)

1. Nom, adresse de l'expéditeur/organisation de protection des végétaux du pays d'origine	Lettre officielle d'autorisation pour l'importation des organismes nuisibles, des végétaux, des produits végétaux et autres objets pour des travaux à des fins d'essai ou à des fins scientifiques et pour des travaux sur les sélections végétales <i>(Délivrée conformément à la directive 95/44/CE)</i>	
2. Nom et adresse de la personne responsable des activités autorisées France		
4. Adresse et description du ou des sites spécifiques de maintien en quarantaine FRANCE	5. Lieu d'origine (<i>avec, jointe, la preuve documentaire pour le matériel introduit d'un pays tiers</i>)	6. Numéro du certificat phytosanitaire :
7. Point d'entrée déclaré pour le matériel introduit d'un pays tiers		
8. Nom(s) scientifique(s) du matériel, y compris les organismes nuisibles concernés	9. Quantité de matériel	
10. Type de matériel		
11. Déclaration supplémentaire Ce matériel est importé dans la Communauté conformément à la directive 95/44/CE		
12. Information supplémentaire		
13. Endossement par l'organisme officiel responsable de l'Etat membre d'origine du matériel Lieu d'endossement : Date Nom et signature du fonctionnaire autorisé	14. Cachet de l'organisme officiel responsable de délivrance Lieu de délivrance : Date : Nom et signature du fonctionnaire autorisé :	


Numéro : /49/LOA

ANNEXE VII LES PRELEVEMENTS POUR ANALYSE DE SOL

7.1 Principes généraux :

Selon la nature des analyses (analyses chimiques, nématologiques, flore pathogène ...) les protocoles sont différents mais certaines règles sont générales (source Canne progrès, Cahier technique la canne, août 2006, les analyses de sol).

Définir dans la parcelle une ou plusieurs zones homogènes

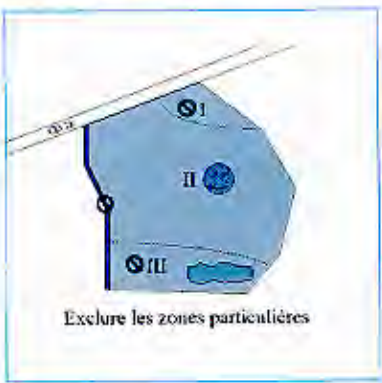


Détermination des zones homogènes

Définition d'une zone homogène :
C'est une zone qui a :

- > La même couleur de sol
- > Le même précédent cultural
- > Le même historique de fertilisation
- > Le même aspect végétatif de la culture
- > Toutes autres caractéristiques identiques

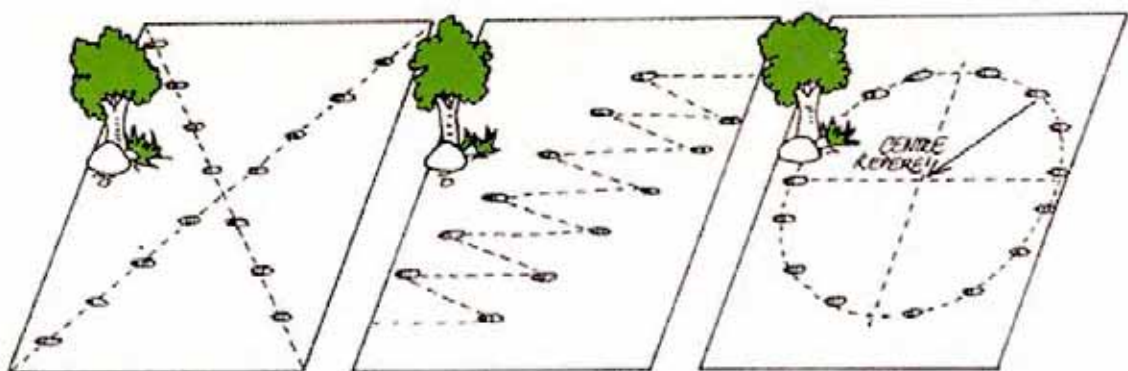
Exclure les zones particulières



Exclure les zones particulières

Définition des zones particulières :

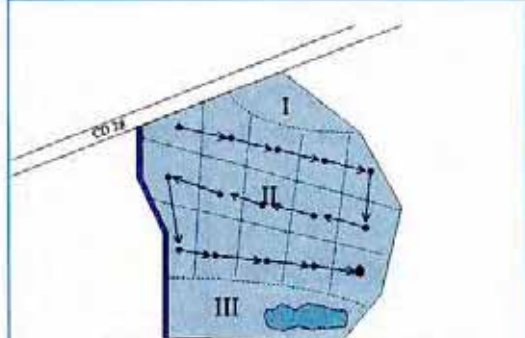
- > Les points hauts (buttes, andains...)
- > Les points bas (fossés...)
- > Les zones où des produits ont été entreposés (fumiers, amendements...)
- > Les anciens chemins
- > Les affleurements rocheux
- > Les bordures (haies...)
- > Les zones ayant subi des engorgements suite à des accidents d'irrigation ou de drainage (mouillères...)



EN DIAGONALE , EN ZIG ZAG , EN ROND ,

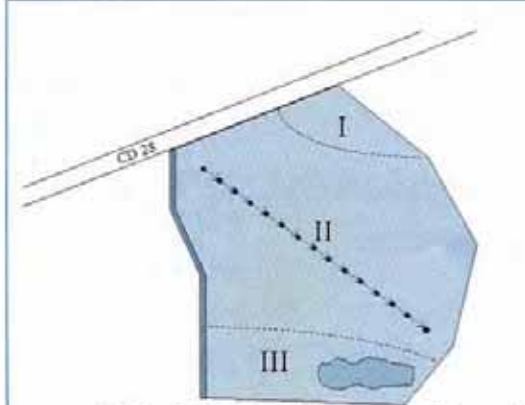
NOMBRE DE PRELEVEMENTS
Au minimum 15 pour 1 ha en sol très homogène.

ANNEXE VII : 7.1 Analyses de sol, principes généraux



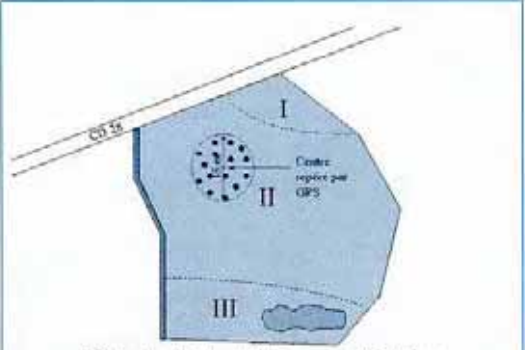
Méthode d'échantillonnage selon la norme
AFNOR X 31-100

> Selon la norme AFNOR X31-100 relative aux prélèvements de sol : la zone homogène est découpée en 15 lots de même surface. Un prélèvement de sol est effectué au hasard dans chaque lot.



Méthode d'échantillonnage en diagonale
(selon GEMAS / COMIFER)

1 > Le prélèvement sur une diagonale



Méthode d'échantillonnage à l'intérieur
d'un cercle (selon GEMAS / COMIFER)

2 > Le prélèvement à l'intérieur d'un cercle de 15 m de diamètre dont le centre est géo-référencé par GPS.

Cette méthode est plutôt réservée dans le cadre d'essais agronomiques nécessitant des suivis précis de fertilité (ex : pour l'épandage des boues).

ANNEXE VII

7.2 Prélèvement des échantillons pour analyse de sol

COMMENT REALISER UN PRELEVEMENT POUR LA CULTURE DE CANNE A SUCRE ?

1 > Avant le prélèvement, nettoyer la surface du sol des herbes, des résidus organiques ou autres résidus pour avoir le sol propre sur un carré de 40 cm de côté environ.

2 > On échantillonne la couche de sol supérieure, très organique (noire) qui est labourée et dans laquelle se développent 90% des racines de la canne à sucre assurant la nutrition de la canne. Elles exploitent en général les 25 premiers cm du sol.

3 > Utiliser de préférence une tarière (en zone peu caillouteuse), qui sera enfoncée jusqu'à 25 cm de profondeur (90% des racines de la canne à sucre exploitent les 25 premiers cm du sol). Si la terre change de couleur en profondeur, l'éliminer du prélèvement.

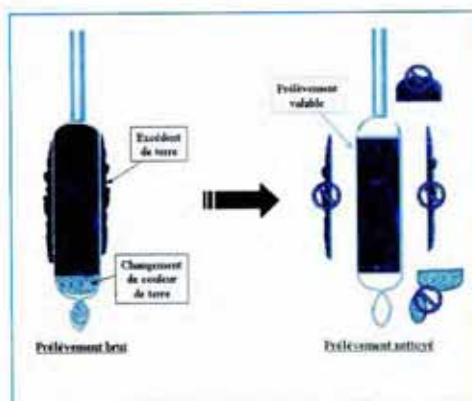
4 > Il faut généralement 2 coups de tarière pour atteindre cette profondeur. Si la terre change de couleur en profondeur, en bout de tarière, éliminer la partie différente du prélèvement.

5 > Pour chaque point de prélèvement, recueillir le contenu de la tarière dans un seau à l'aide d'un couteau ou d'un tournevis. Pour cela, l'excédent de terre qui déborde de la tarière ainsi que la partie supérieure de la carotte sont éliminés. On évide la terre de la tarière avec un couteau ou un tournevis. On enlève la partie supérieure de terre dans la partie creuse et on garde la partie centrale de la carotte de sol.



6 > Dans le cas de l'utilisation d'une bêche, il faut prélever jusqu'à 25 cm de profondeur (sauf si la terre change de couleur avant). Les volumes de terre de chaque prélèvement étant plus importants que lors de l'utilisation d'une tarière, il convient de mélanger chaque prélèvement dans un seau et d'en récupérer deux poignées

que l'on met dans un deuxième seau. Ce deuxième seau récupérera les 15 prélèvements, formant l'échantillon moyen de la parcelle.



ANNEXE VII

7.3 Conditionnement des échantillons pour analyse de sol

COMMENT CONSTITUER L'ÉCHANTILLON MOYEN DESTINÉ AU LABORATOIRE ?



> Les 15 prélèvements contenus dans le seau sont émiétés, les cailloux sont enlevés et le contenu du seau est soigneusement mélangé. Ensuite l'équivalent d'1 kg de terre sera récupéré en plusieurs poignées pour remplir un sac plastique destiné au laboratoire.



> Remplir la fiche d'identification CIRAD qui accompagnera le sac de l'échantillon. Mentionner obligatoirement les coordonnées géographiques de la parcelle en précisant le référentiel utilisé.

Il existe au laboratoire de cartes topographiques IGN au 1/25 000-ième permettant de retrouver les coordonnées X-Y Laborde du point de prélèvement.



> Conserver l'échantillon au frais jusqu'à son arrivée au laboratoire du CIRAD.

Au laboratoire, il convient de remplir également des formulaires de demande d'analyses lors de l'enregistrement de l'échantillon.

Les résultats seront obtenus sous 45 jours environ.

Source Canne-Progrès, Cahier technique la canne N°10 août 2006, Les analyses de sol



Annexe VII

7.4 Les échantillons pour analyse nématologique

7.4.1 Recommandations générales.

Prélèvement, conditionnement et expédition des échantillons : recommandations

Rappel : les résultats d'une analyse nématologique dépendent pour partie du prélèvement, du conditionnement et de l'expédition de l'échantillon. Ces opérations, de même que la formulation de la demande, sont sous la responsabilité du client. Le laboratoire se tient néanmoins à la disposition du client pour toute information complémentaire.

Autres documents à utiliser (remis sur simple demande par le laboratoire) :

- offre de prestations d'analyses (liste des analyses, conditions générale de fourniture des prestations) EN0103,
- fiche de demande d'analyse EN0801.

Ce document ne se substitue pas aux protocoles de prélèvement spécifiques prévus pour des analyses à caractère réglementaire.

Que doit représenter un échantillon ,

L'échantillon représente selon le cas :

- une parcelle homogène (même type de sol, même culture, même précédent, même travaux culturaux, même type de symptômes le cas échéant),
- un lot homogène d'un produit (plants, graines, tubercules, bulbes, bois, substrat...).

Pour une parcelle, la surface maximale indicative que peut représenter l'échantillon est la suivante :

- cultures intensives (horticulture ornementale et florale, maraîchage) 1000 m² ou une unité de serre,
- cultures légumières, arboriculture, viticulture : 5000 m²,
- grandes cultures : 20000 m².

Pour un lot d'un produit, l'échantillon doit être constitué à partir d'un nombre d'individus issus de prises élémentaires en rapport avec le volume du lot testé et avec la fiabilité de détection souhaitée. Ces prises doivent être réparties au hasard sur l'ensemble du lot pour assurer la représentativité du prélèvement.

Quoi prélever ?

Les nématodes phytoparasites peuvent être classés en deux catégories :

- les endoparasites qui pénètrent dans les tissus (racines, feuilles, tiges, graines) des végétaux cultivés ou sur des adventices hôtes et vivent dans le sol en dehors des périodes de culture.
- Les ectoparasites qui vivent dans le sol et se nourrissent en piquant les racines sans les coloniser.

Les analyses pour recherche de cause de dépérissement sont orientées en priorité vers la détection des nématodes endoparasites, les prélèvements doivent donc d'abord porter sur le végétal. Le sol prélevé est constitué par de la terre adhérente aux racines ou située à leur proximité dans laquelle vivent préférentiellement les nématodes ectoparasites.

Comment prélever ?

Selon les problèmes posés, les modes de prélèvement recommandés sont les suivants :

1 – recherche de la cause d'un dépérissement sur une culture en place :

- Les dégâts au champ se présentent habituellement sous forme de taches aux contours irréguliers .
 - o Effectuer en bordure des taches 30 prises élémentaires de plantes ou parties de plantes (racines, tiges, feuilles...) à symptômes.
- Dans le cas de prélèvements racinaires, soulever les plantes sans les arracher pour préserver l'intégrité des racines et radicelles. Ne pas laver les racines.



- Pour réaliser le prélèvement de sol accompagnant le prélèvement ci-dessus, conserver le sol adhérent aux racines.
- Le poids maximal de l'échantillon à expédier au laboratoire est d'environ 1000 g (végétal + sol).
- Compléter l'envoi par l'ajout de quelques plantes (ou parties de plantes) et de sol provenant des zones aïnes. Séparer ce prélèvement dans l'envoi. Ne pas humidifier le prélèvement.

2 – Estimation du risque dû aux nématodes pour la culture suivante :

L'arrachage ou la récolte de la culture et les travaux du sol dispersent les nématodes et peuvent rendre ainsi au moins temporairement leur détection plus difficile.

Il est conseillé d'effectuer le prélèvement avant l'arrachage ou la récolte de la culture en place. En effet, son aspect peut orienter le prélèvement (zones de dépérissement).

2.1 – Prélèvement avant arrachage de la culture précédente :

Si le précédent présente des zones de dépérissement, procéder comme indiqué dans le paragraphe 1.

Si le précédent ne présente pas de zones de dépérissement : effectuer les 30 prises élémentaires sur l'ensemble de la parcelle. Envoyer l'ensemble (plantes + sol) au laboratoire.

2.2 – prélèvement après récolte ou arrachage de la culture précédente (parcelle retournée, sol nu)

Echantillonnage à éviter (sauf pour l'analyse des formes enkystées, ou avant remise en culture après jachère), surtout en hiver lorsque la plupart des nématodes sont sous la forme d'œufs ou de larves difficiles à détecter.

En cas de nécessité, effectuer 30 prises élémentaires de sol totalisant 1000 g environ, réparties sur l'ensemble de la parcelle et sur toute la profondeur de la couche labourée.

Cas particulier 1 – nématodes à kystes

La prévision du risque qu'ils font encourir à la culture suivante est faite de préférence sur sol nu et travaillé en procédant par 30 prises élémentaires de sol, réparties sur l'ensemble de la parcelle, à environ 10 cm de profondeur. Après homogénéisation le prélèvement transmis au laboratoire peut être réduit à 500 g environ. Pour la détection de *Globodera pallida* et *rostochiensis* (nématodes à kystes de la pomme de terre), le sol prélevé est séché et émiété. Après élimination des cailloux et des gros débris végétaux et homogénéisation, un prélèvement d'un volume maximal de 300 ml est envoyé au laboratoire.

Cas particulier 2 – nématodes vecteurs de viroses

La fragilité de ces nématodes, leur répartition et leur faible concentration dans le sol, conduisent à recommander le respect des règles ci-dessous lors du prélèvement :

- 1- Echantillonner sur la culture en place ou sur son précédent avant arrachage, en dehors des périodes de gelées ou de fortes sécheresses,
- 2- Prélever des mottes autour des racines et des radicelles, sur l'ensemble de la zone prospectée par celles-ci,
- 3- Effectuer 30 prises élémentaires réparties sur l'ensemble de la zone atteinte. Ne pas émietter les mottes, ne pas séparer les radicelles du sol.
- 4- Conditionner immédiatement, ainsi qu'il est indiqué ci-après 1500 à 2000 g de sol (sac plastique étanche correctement calé dans un colis rigide, envoi dans les meilleurs délais ou stockage momentané au frais).

3 – Contrôle sanitaire de végétaux, de produits végétaux ou de produits divers

A titre indicatif, la quantité de produit traitée lors d'une analyse est la suivante :

- Graines	1000 à 5000 unités (selon leur dimension)	- Bulbes et tubercules	1 à 200 unités
- Radicelles	3 à 30 g	- Racines charnues	1 à 50 unités
- Substrats	0,1 à 2 litres	- Collets et parties aériennes	1 à 200 unités

Remarques :

- Ces quantités ne préjugent pas de la représentativité statistique de l'échantillon
- Prélèvement de radicelles : ne pas arracher les plantes mais les soulever pour préserver l'intégrité du système racinaire.



4 – Expérimentations nématologiques

Il est conseillé de contacter le laboratoire lors de la conception de l'essai afin de définir avant implantation les modalités de prélèvement et le programme d'analyses (la distribution des nématodes dans une parcelle peut présenter une grande hétérogénéité et les populations de nématodes peuvent évoluer très rapidement sur le plan quantitatif et qualitatif).

Comment conditionner et expédier les échantillons ?

Conditionnement : disposer l'échantillon dans un sac plastique robuste et neuf (éviter les sacs de congélation et impérativement les sacs ayant contenu un produit chimique : engrais, pesticide). Identifier le sac de manière indélébile.

- Plantes herbacées : les jeunes plantes sont conditionnées entières, les racelles ou les parties aériennes étant prélevées au laboratoire. Pour les analyses de racines, lorsque les plantes ont une taille importante, réduire la partie aérienne en conservant les systèmes racinaires. Ne pas laver les racines.
- Plantes ligneuses : conditionner le sol et les racelles dans le même sac. Ne pas laver les racines.

La dessiccation des racines ou d'organes verts expédiés seuls peut être évitée en les enroulant dans du papier journal, avant leur conditionnement en sac plastique.

Conservation : l'échantillon en attente d'expédition ne doit en aucun cas être exposé à des températures supérieures à 35° C. Si le produit est périssable (végétaux verts) ou si l'expédition est différée, l'échantillon est conservé au frais.

Référence de l'échantillon : elle doit être simple (au plus 12 caractères) et lisible sans ouverture du sac de conditionnement.

Expédition : envoyer l'échantillon au laboratoire sans attendre et en utilisant un moyen d'acheminement rapide. Éviter l'expédition en fin de semaine ou les veilles de jours fériés pour les échantillons périssables.

Joindre la fiche de demande d'analyse renseignée. Ne pas placer la fiche au contact du prélèvement, protéger si nécessaire celle-ci en la disposant dans un sachet plastique.

Recommandations spécifiques :

Exemple : Nématode à kyste de la pomme de terre

ANNEXE VII

Les prélèvements pour analyse nématologique

7.4.2 Protocole de prélèvement pour nématodes à kystes

(d'après l'annexe III de la note de service DGAL/SDQP/N2006-8250)

Protocole de prélèvement d'échantillons pour nématodes à kystes

1. Cas des prélèvements de sol (surveillance des plants avant la plantation)

- Période de prélèvement : avant fin février.
- Unité de surface pour un échantillon : 5000 m², soit 2 échantillons par ha
- Constitution d'un échantillon : 300 ml de terre fine maximum, constitué de 25 prises élémentaires, réparties de façon homogène, ce qui correspond à une prise par 200 m² et une seule.
- Matériel : - une gouge de capacité de 20 g maximum par prise.
 - porte-sacs et sacs neufs en kraft ou polyéthylène adaptés
 - plan sommaire à réaliser avec numérotation des unités
 - piquets, équerre de visée....

• Préparation des échantillons pour envoi :

En cas de sol humide, le risque d'éventrage des sacs kraft est réel. Il faut alors procéder à un séchage naturel à température ambiante en un lieu ventilé, ou à température plus élevée (< 35°) dans un local disposant d'une circulation d'air correcte.

- Identification : Utiliser la fiche de suivi jointe en annexe I.

Porter la référence de l'échantillon sur le sac de prélèvement.

L'identification doit être lisible sur les sacs sans ouverture du sac.

- Expédition au laboratoire : immédiatement si possible, mais le stockage à température et humidité ambiantes ne pose aucun problème de conservation. Ne jamais ajouter d'eau, ni pendant le stockage, ni lors de l'envoi.

2. Cas de la prospection dans une parcelle positive et dans l'exploitation concernée

- Période de prélèvement : toute l'année

- Modalités : voir I.4

Cas particuliers :

- pour la délimitation de foyer(s) en parcelle contaminée et plantée : échantillonner le sol dans les buttes de culture en place ou juste après arrachage et, si possible, avant tout travail du sol. Plantes : voir ci-dessous : constitution d'un échantillon de plantes.

- en cas de présence de repousses de pommes de terre : prélèvement de racines et du sol adhérent aux racines de mars à juillet. Cette procédure est considérée comme complémentaire à la procédure « prélèvements de sol ».

- * Unité de surface pour un échantillon : 1000 m² dans la parcelle positive.

- Constitution d'un échantillon de sol : 300 ml de terre fine maximum, constitué de 25 prises élémentaires, réparties de façon homogène par unité de surface retenue, ce qui correspond à une prise par 40 m² et une seule.

- Constitution d'un échantillon de plantes : prélever les systèmes racinaires de 25 plantes par unité de surface retenue, réparties de façon homogène. Laisser le sol accompagnant les racines.

- Matériel : voir I.1

- Préparation des échantillons pour envoi :

- sol : voir I.1

- plantes : placer les racines en l'état avec le sol adhérent dans un sac plastique neuf et solide.

- Identification : voir I.1

- Expédition au laboratoire :

- sol : voir I.1

- plantes : expédition immédiate

- 3. Modalités de prélèvement de sol et résidus sous calibre, table de visite.

- Période de prélèvement : après récolte, lors du calibrage et (ou) du conditionnement (septembre à mars).

ANNEXE VII

7.4 Les prélèvements pour analyse nématologique

7.4.2 Protocole de prélèvement pour nématodes à kystes (suite)

5

- **Unité de prélèvement pour un échantillon** : exploitation, ou parcelle de l'exploitation, ou parcelle + une variété, ou parcelle + une variété + une classe, selon les cas.
- **Constitution d'un échantillon** : par lot : 300 ml de terre fine maximum et résidus environ, constitué par des prélèvements réalisés en continu dans des récipients collecteurs adaptés sous calibre.
- **Matériel** : - récipients collecteurs
- porte-sacs et sacs neufs en kraft ou polyéthylène, adaptés
- **Préparation des échantillons, Identification, Expédition au laboratoire** : voir I.1.

4. Modalités de prélèvement de sol dans le cadre de levées d'interdiction

- **Période de prélèvement** : le plus tôt possible, dès l'automne, afin de laisser le temps d'étudier la viabilité des kystes en cas de détection.
- **Modalités** :
- *en cas de présence de repousses de pommes de terre* : prélèvement de racines et du sol adhérent aux racines de mars à juillet. Cette procédure est considérée comme complémentaire de la procédure « prélèvements de sol ».
- **Unité de surface pour un échantillon** : 1000 m² dans la parcelle positive.
- **Constitution d'un échantillon de sol** : 300 ml de terre fine maximum, constitué de 25 prises élémentaires, réparties de façon homogène par unité de surface retenue, ce qui correspond à une prise par 40 m², et une seule.
- **Constitution d'un échantillon de plantes** : prélever les systèmes racinaires de 25 plantes par unité de surface retenue, réparties de façon homogène. Laisser le sol accompagnant les racines.
- **Matériel, Préparation des échantillons pour envoi, Identification, Expédition** : voir I.1.

Tableau récapitulatif :

NORMES D'ECHANTILLONNAGE EN SURVEILLANCE DES NEMATODES A KYSTES

	Surveillance du territoire en plants	Calibreur Table de visite	Gestion de foyer	
			Parcelle suspecte de l'exploitation	Levées d'interdiction
Unités d'échantillonnage	Parcelle 5000 m ²	Exploitation, Parcelle...	Parcelle 1000 m ²	Parcelle 1000 m ²
Nature de l'échantillon	300 ml de terre fine maximum	300 ml de terre fine maximum / lot	300 ml de terre fine maximum plantes	300 ml de terre fine maximum plantes
Nombre de prises	25	en continu	25	25
Répartition des prises élémentaires	homogène 1/200 m ²	homogène sur la totalité des résidus	homogène 1/40 m ²	homogène 1/40 m ²
Epoque	- avant plantation	septembre à mars	- avant plantation - en végétation	- avant plantation - en végétation
Matériel	gouges, sacs, piquets, équerre de visée	récipients, sacs...	gouges, sacs, piquets, équerre de visée	gouges, sacs, piquets, équerre de visée



ANNEXE VIII : Tableau statistique pour fixer la taille des échantillons

Echantillon devant être pris dans des lots de tailles variées afin de déceler un article infesté avec des probabilités de 95 % et de 99 % pour 5 niveaux d'infestation.

Nbre d'articles dans le lot	P = 95 % Niveau d'infestation en %					P = 99 % Niveau d'infestation en %				
	5	2	1	0.5	0.1	5	2	1	0.5	0.1
25	23	25	25	25	25	25	25	25	25	25
100	45	78	95	100	100	59	90	99	100	100
200	51	105	155	190	200	73	136	180	198	200
500	56	129	225	349	500	83	183	300	421	500
1000	57	138	258	450	950	86	204	368	601	990
2000	58	143	277	517	1553	88	216	410	737	1800
10000	59	148	294	581	2587	90	226	448	878	3689