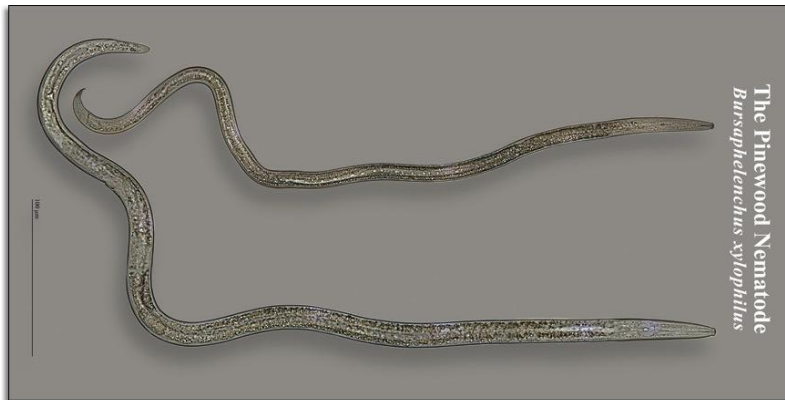




Anticiper le risque lié au nématode du pin

**Intégration de la tolérance au nématode du pin
dans le programme d'amélioration du Pin maritime:
1ers résultats et perspectives**

M. Kleinhentz, A. Raffin



Pine Wilt Disease : contexte

Le nématode du pin
(*Bursaphelenchus xylophilus*)

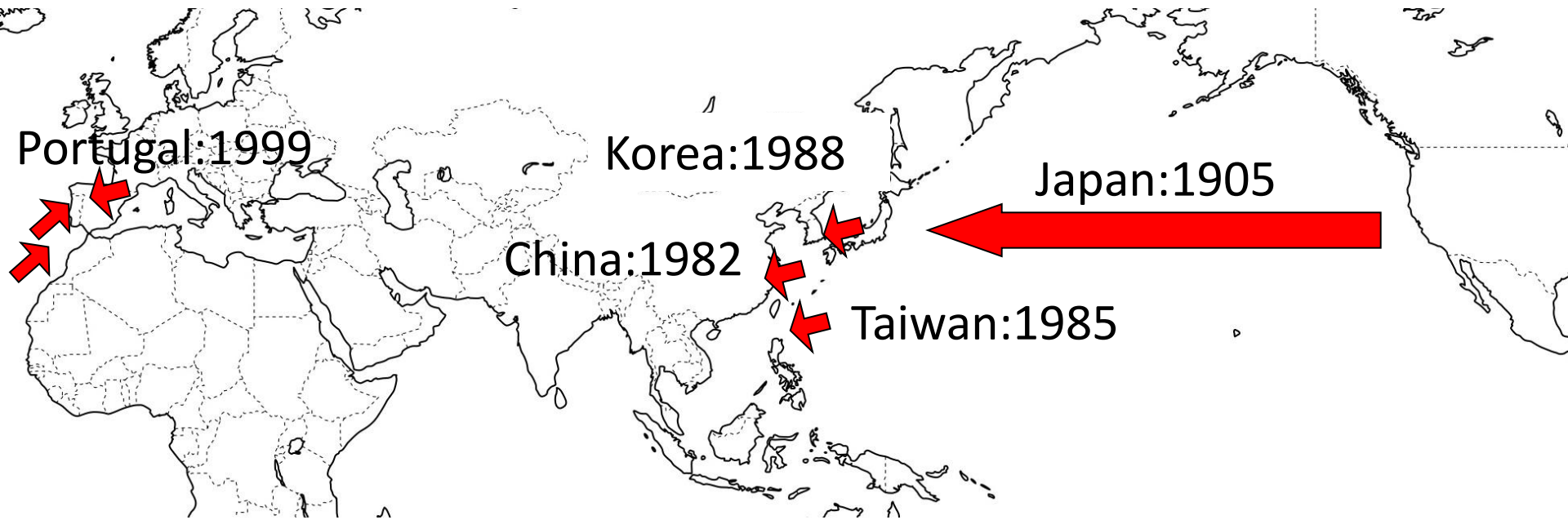


et son insecte vecteur
(*Monochamus galloprovincialis*)



Un ravageur invasif

Un vecteur indigène (déjà présent)



Espagne : 2008, 2010, 2012, 2013, 2016
Ile de Madère : 2009

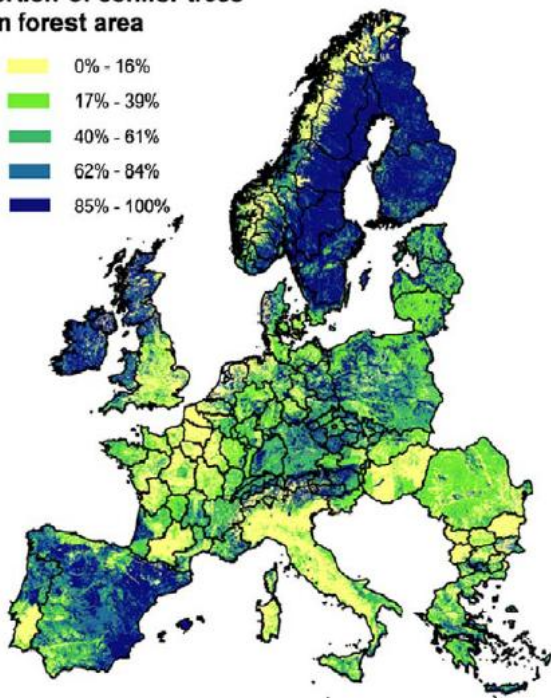
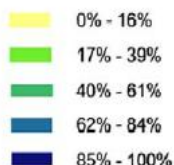
Un risque fort en Aquitaine

(Risque = Probabilité x Vulnérabilité x Impact)

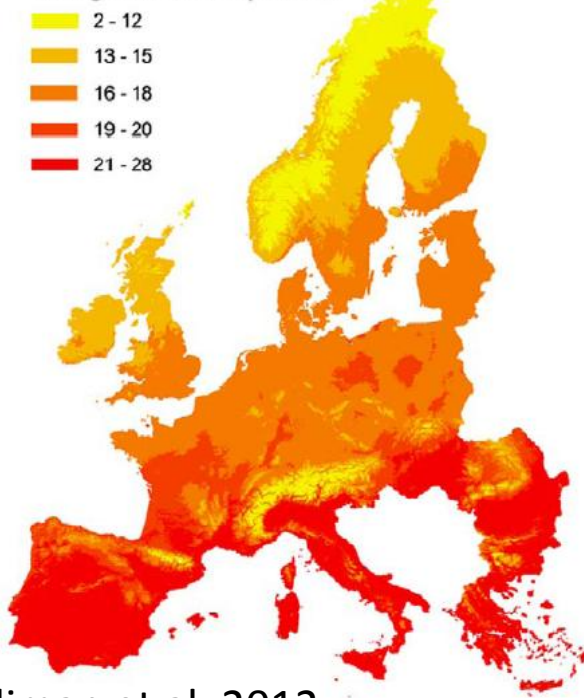
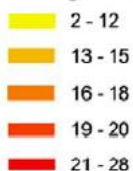
Forte probabilité d'occurrence

- Un vecteur déjà présent
- Une température moyenne des mois d'été supérieure à 20°C
- Des voies d'entrée possibles par le transport et le stockage de bois (ports, autoroutes ...)
- Probabilité = 1 en 2025 ...

Proportion of conifer trees in forest area



Average summer temperature



Soliman et al, 2012

Vulnérabilité

- Une espèce hôte sensible
- Mortalité rapide (10% par an ?)
- 3 M ha pin maritime du Portugal à l'Aquitaine
- Une méthode d'éradication très contraignante, pas de méthode de lutte efficace jusqu'à présent

Impact

- Economique, écologique
- La valeur du bois sur pied perdue serait de 22 milliards d'euros entre 2008 et 2030 pour l'Europe (Soliman et al., 2012)

Les dégâts causés par le nématode du pin

- Se nourrit des cellules des vaisseaux conducteurs de sève
- Provoque la cavitation de ces vaisseaux et le flétrissement du houppier
- Mort de l'arbre en quelques mois, voir semaines



Le risque sanitaire le plus grave pour les pinèdes d'Europe du Sud

*Pin maritime
au Portugal*



Figura 21 – Povoamento de Pinheiro bravo com sintomas de NMP

Le cycle épidémiologique

Emergence d'un
Monochamus adulte
chargé de nématodes

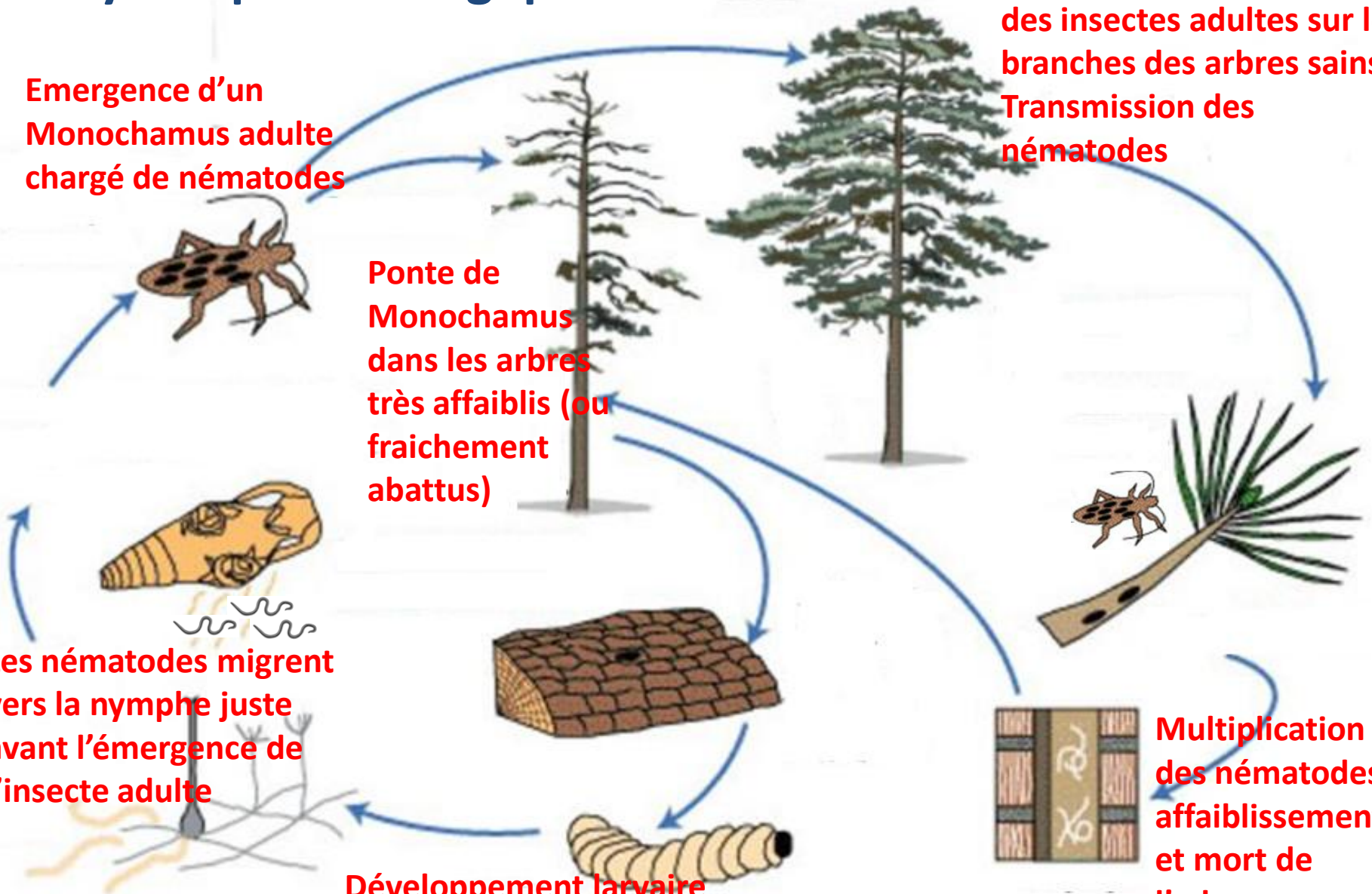
Ponte de
Monochamus
dans les arbres
très affaiblis (ou
fraichement
abattus)

Nutrition de maturation
des insectes adultes sur les
branches des arbres sains :
Transmission des
nématodes

Les nématodes migrent
vers la nymphe juste
avant l'émergence de
l'insecte adulte

Développement larvaire
de l'insecte dans le bois
mort (durant l'hiver)

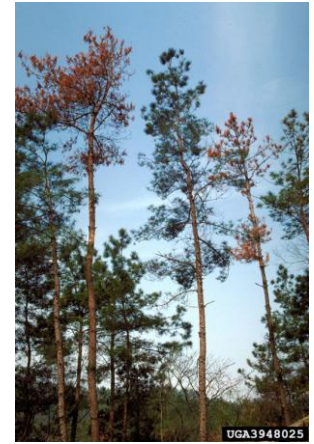
Multiplication
des nématodes :
affaiblissement
et mort de
l'arbre



Des recherches en cours

Sur les modèles d'invasion du nématode et d'expansion de la maladie

Inra Orléans (URZF)



Sur l'insecte vecteur : Comportement de dispersion, capacités de vol

Inra Bordeaux (Biogeco)



Sur le nématode : test moléculaire de détection, diversité génétique, routes de colonisation

Inra Sophia (ISA)



Sur l'interaction hôte x nématode, Sur les méthodes de lutte
Asie (Japon, Chine, Corée), Espagne, Portugal

France : interaction pin et 3 bio-agresseurs: le champignon *Sphaeropsis sapinea* , les nématodes *B. spp.* et leurs coléoptères vecteurs (**Inra Bordeaux, Biogeco**)

Des méthodes de lutte ?

➤ **Importance de la détection précoce** : plan de surveillance (DSF-DRAAF Aquitaine) ; étude / télésurveillance (Caisse PF et Télespazio)

➤ **Lutte intégrée** visant à maintenir l'inoculum à un faible niveau et à réduire les dommages : pistes à étudier

- Coupes sanitaires en hiver (individus symptomatiques uniquement) et surveillance d'une large zone tampon (40 à 70 km, plutôt que 20km)

- Protection des piles de bois (attractives comme sites de ponte lorsqu'elles sont fraîches)

- Piégeage de masse de l'insecte vecteur (améliorer l'efficacité des pièges ?) ou confusion sexuelle (à étudier)



Des méthodes de lutte ?

➤ Lutte intégrée (suite)

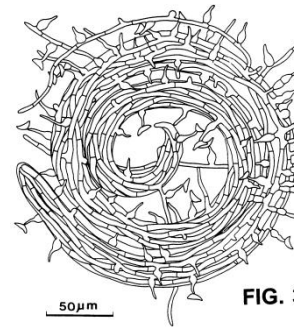
■ Lutte biologique contre l'insecte vecteur

- parasitoïdes Hyménoptères : *Schleroderma guani* et *Ontsira palliatus* (Chine), *Dastarcus longulus* (Japon), *Cyanopterus flavator* (Portugal, détection uniquement): à étudier
- champignon entomopathogène : *Beauveria bassiana*



■ Lutte biologique contre le nématode

- champignon : *Esteya vermicola*
- bactéries ?



Des méthodes de lutte ?

➔ Sélection de matériel de reboisement tolérant

- Au Japon sur *P. densiflora* et *P. thunbergii*
- En Chine sur *P. massonina*
- Au Portugal et en Galice, sur les provenances locales de *P. pinaster*



Verger à graines, *Pinus densiflora*, Japon



Test d'inoculation en pépinière, Japon

Intégration de la tolérance au nématode du pin dans le programme d'amélioration du Pin maritime: 1ers résultats et perspectives

M. Kleinhentz, A. Raffin



Des questions de recherche : comprendre les interactions pin - nématode (entre autres)

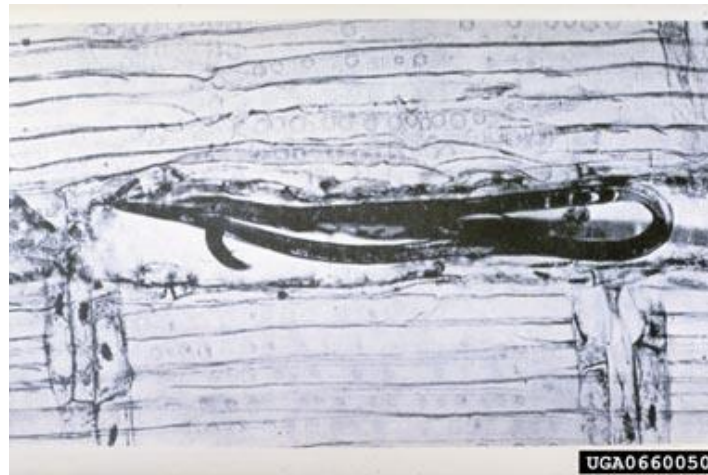
L'interaction pin - nématode

- Virulence et variabilité génétique du nématode (*B. xylophilus*, *B. mucronatus*)
- Mécanismes du processus infectieux chez le pin, signaux chimiques
- Mécanismes de résistance et gènes impliqués chez le pin
- Durabilité de la résistance génétique chez le pin

Autres interactions biotiques

Recherche et étude du rôle des micro-organismes facilitateurs ou antagonistes des nématodes dans le processus infectieux :

- Nématode et son microbiote (bactéries associées au nématode)
- Tissus du pin et microbiote associé (bactéries et champignons)



Un objectif finalisé : Sélection de matériel végétal tolérant au nématode

Evaluer la tolérance aux nématodes de pins maritimes d'origines génétiques différentes :

- Estimer le taux de dégât maximal attendu en forêt naturelle et sur les variétés améliorées de pin maritime, en cas d'introduction du pathogène en Nouvelle Aquitaine
- Isoler des origines ou des individus tolérants de façon à débiter un programme de création variétale pour ce caractère
- Mettre à disposition un matériel végétal identifié tolérant / sensible pour les études des mécanismes et des gènes impliqués dans la résistance au pathogène.



Expérimentations

Collaboration avec l'INRA Sophia Antipolis - UMR IBSV (Interactions Biotiques et Santé Végétale)
P. Castagnone



Objectifs:

- Mise au point méthodologique:
 - Inoculation nématodes
 - Extraction nématodes
 - Estimation des dégâts
- Identification de l'existence d'une variabilité de réponse vis-à-vis du nématode chez le pin maritime

Mise au point méthodologique

1. L'inoculation

→ Amélioration de la méthodologie d'inoculation contrôlée mise au point au Japon.



1^{ère} étape: Les aiguilles sont enlevées au niveau du point d'inoculation. Une incision au scalpel est réalisée au niveau de l'écorce afin de séparer cette dernière du bois sans affecter le cambium.



2^{ème} étape: Un petit morceau de coton stérile est inséré dans l'incision et bien plaqué contre le bois.

Mise au point méthodologique

1. L'inoculation



3^{ème} étape: l'inoculum est transféré sur le coton (100ul d'eau distillée contenant 500 nématodes d'une souche portugaise prélevée en 2014 au Portugal multipliés en boîte de Petri sur milieu de culture)



4^{ème} étape: fermeture hermétique par du parafilm évitant tout risque de dessèchement de l'inoculum.

Mise au point méthodologique

1. L'inoculation

2. Extraction des nématodes par la technique de Baermann

—→ Sur 3 sections de la plante : partie au niveau de l'inoculation, partie supérieure et partie inférieure au point d'inoculation.



chaque partie a été coupée en morceaux de 5 à 10mm de long.



48h d'immersion dans de l'eau : les nématodes migrent et tombent par gravité au fond de l'entonnoir



récupération d'un culot de 10ml d'eau pour le comptage des nématodes sous binoculaire.

Mise au point méthodologique

1. L'inoculation

2. Extraction des nématodes par la technique de Baermann

3. Estimation du taux de dessèchement des pins

Notes des niveaux de dessèchement des plants de pins inoculés par *B. xylophilus* en fonction du pourcentage d'aiguilles chlorosées.

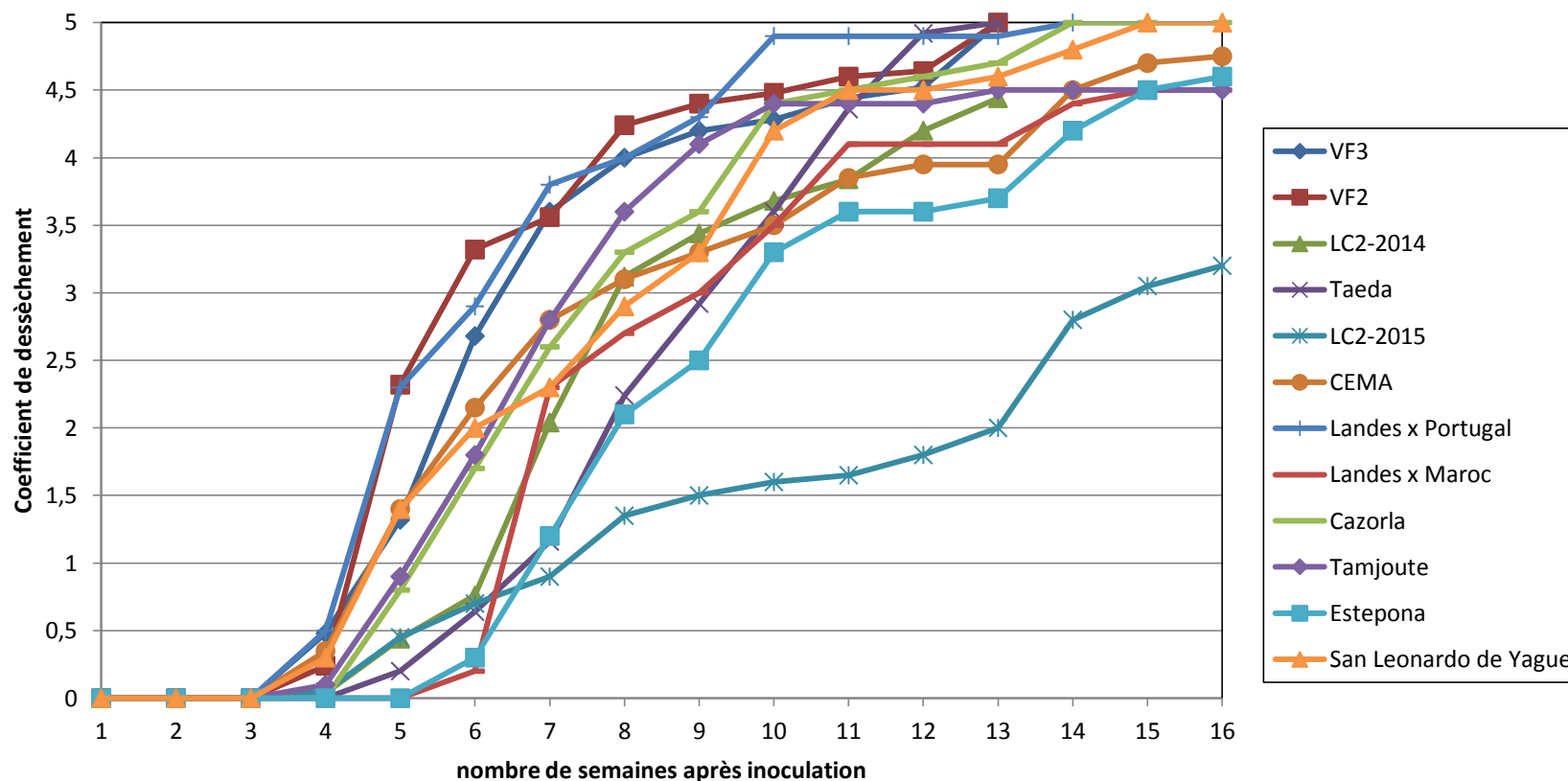
note	% d'aiguilles chlorosées	Etat physiologique
0	0	sain
1	1-25	Expression symptômes nématodes
2	26-50	
3	51-75	
4	76-99	
5	100	mort

Un coefficient de dessèchement (CD) a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$CD = \frac{\sum_{i=0}^{n=5} CD_i}{nb \text{ plants totaux}} \times nb \text{ plants par } CD_i$$

Avec CD_i= notes de niveaux de dessèchement (0-5)

Evolution du coefficient de dessèchement des différentes origines de pins maritimes inoculés par *B. xylophilus*

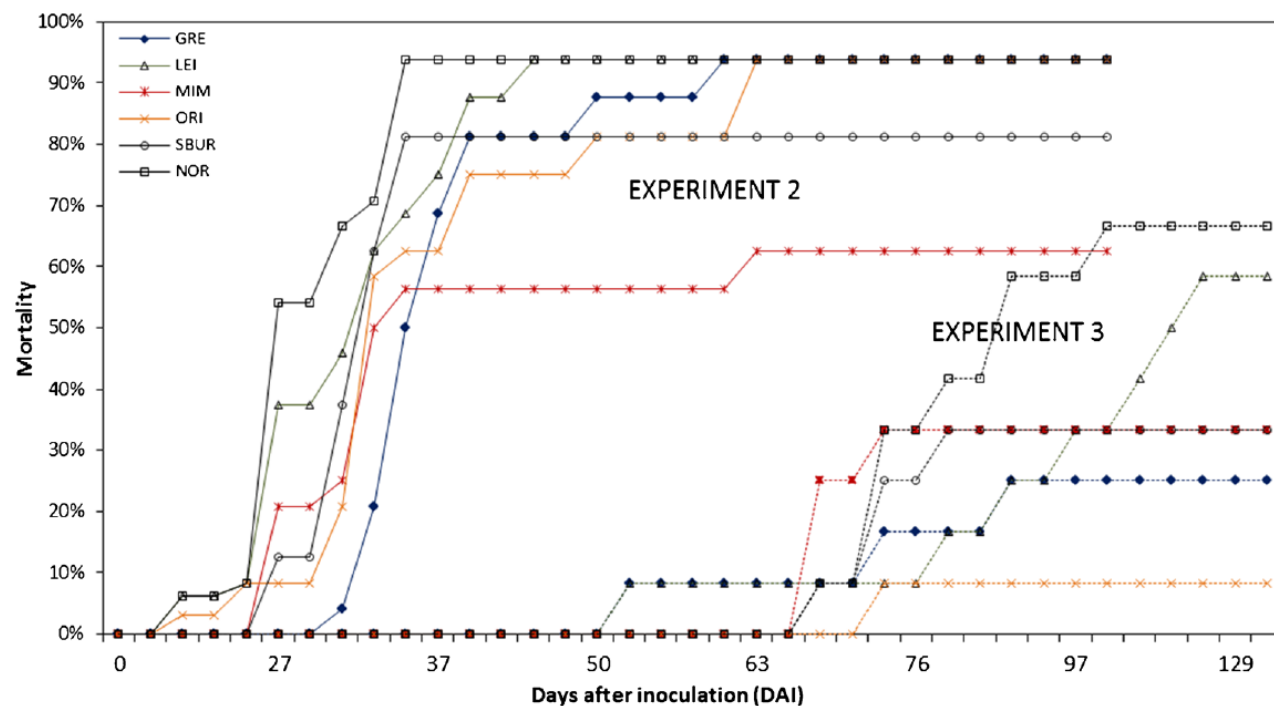


Mise en évidence d'une variabilité de réponse vis-à-vis du nématode chez le pin maritime selon l'origine génétique des plants :

- **Variabilité du taux de survie :** 3 origines génétiques sur les 11 testées présentent des arbres indemnes de symptômes en fin d'expérimentation
- **Variabilité dans les délais d'apparition des 1^{ers} symptômes**

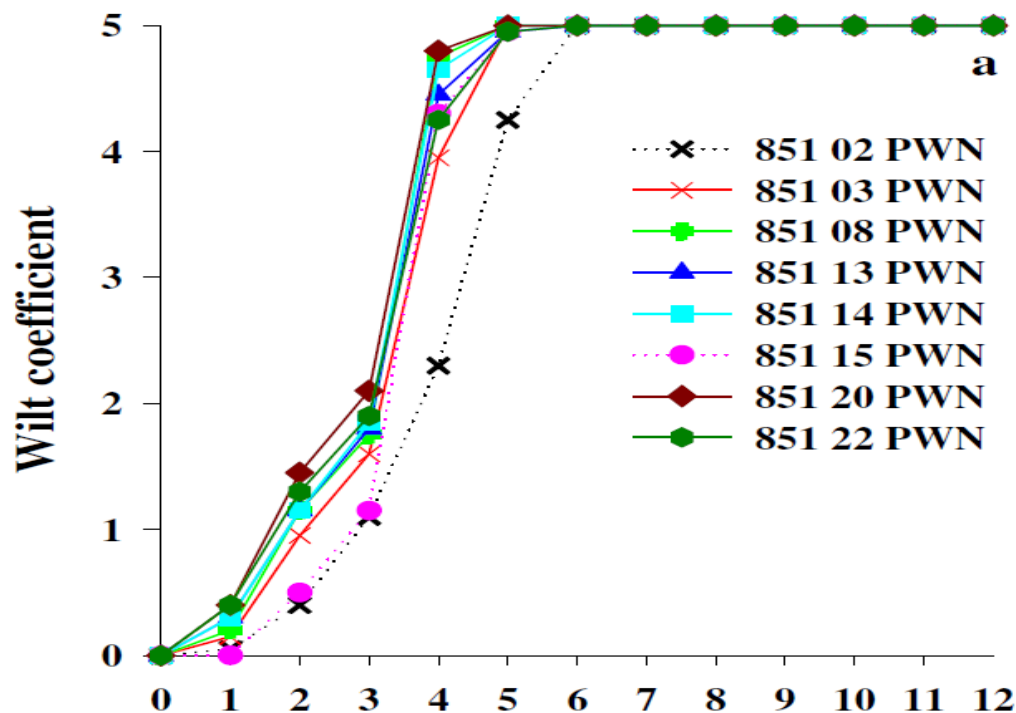
La variabilité entre origines géographiques est en concordance avec les résultats obtenus sur *Pinus pinaster* en Galice (taux de survie)

Fig. 1 Mortality rate for *P. pinaster* provenances in days after *Bursaphelenchus xylophilus* inoculation until the end of the experiment in experiments 2 and 3. Provenances: Sierra de Gredos (GRE), Leiria (LEI), Mimizan (MIM), Sierra de Oria (ORI), Montaña de Soria-Burgos (SBUR), and Noroeste-Litoral (NOR)



Variabilité pour la mortalité entre provenances de pin maritime (Menendez et al, 2017)

Par comparaison, aucune variabilité entre origines géographiques n'est mise en évidence sur *Pinus sylvestris* en Allemagne (coefficient de dessèchement)

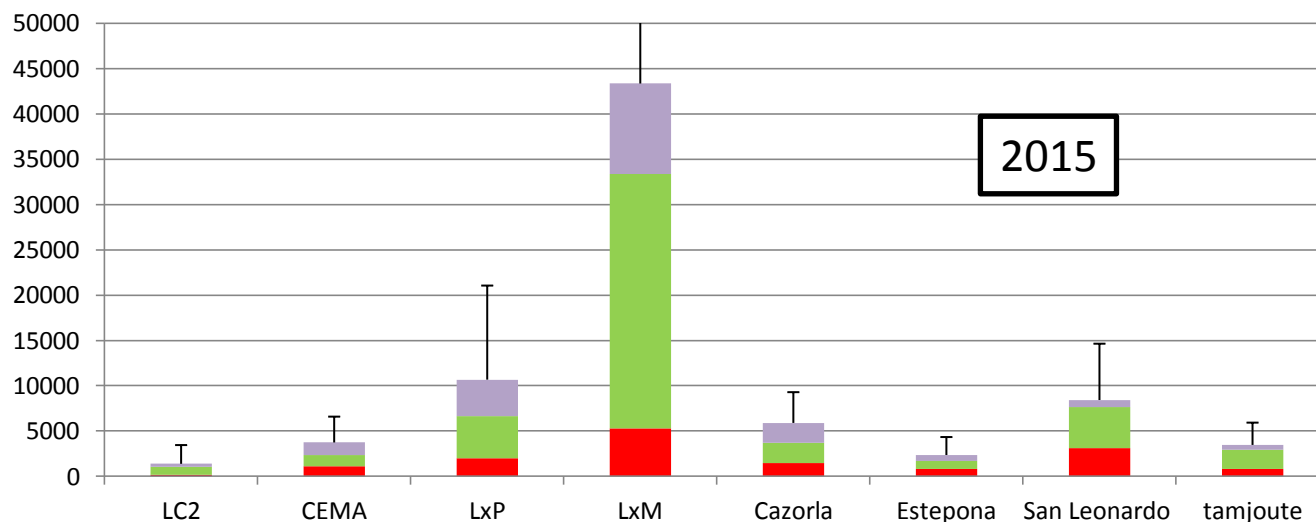
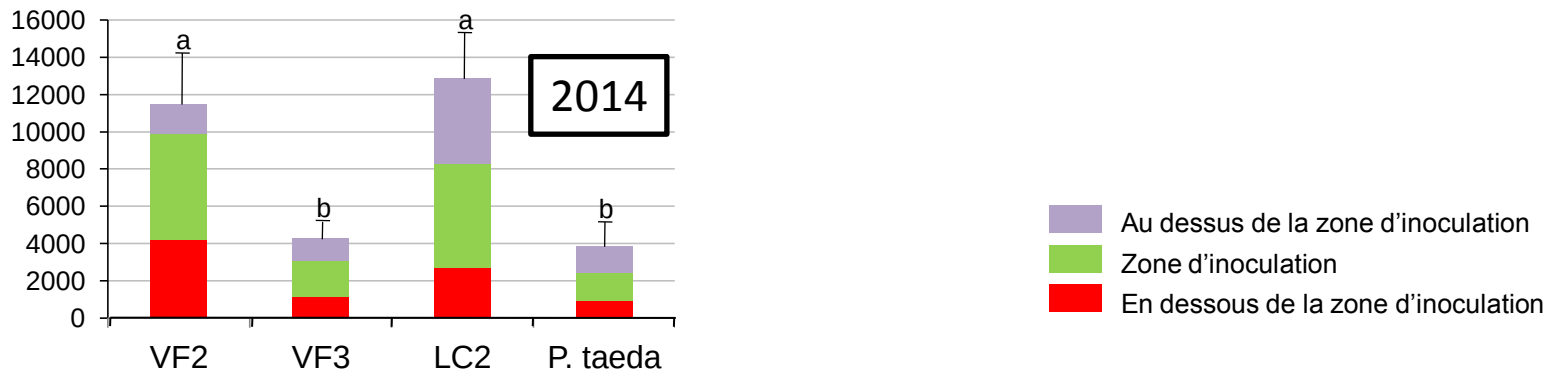


Evolution du coefficient de dessèchement de différentes origines de pins sylvestres inoculés par *B. xylophilus* (Hopf-Biziks et al., 2016)

Multiplication et répartition des nématodes dans les plants en fonction de l'origine génétique.

Résultats

No. nematodes



Existence d'une variabilité de réponse chez le Pin maritime:
en terme de multiplication du nématode
en terme de capacité pour le nématode à se déplacer dans l'arbre

Conclusions sur ces premiers résultats

- Existence d'une variabilité chez le Pin maritime en terme d'apparition de symptômes, de multiplication des nématodes et de survie des plants
- Limites de ces expérimentations:
 - Quantité de matériel testé liée à la taille de la structure mais également à l'éloignement du site de production du matériel végétal
 - Age du matériel testé



**Nécessité d'un équipement adapté pour envisager l'intégration
de la tolérance au nématode
dans le programme d'amélioration du Pin maritime**

Localisation de l'équipement: Inra La Grande Ferrade- Villenave d'Ornon



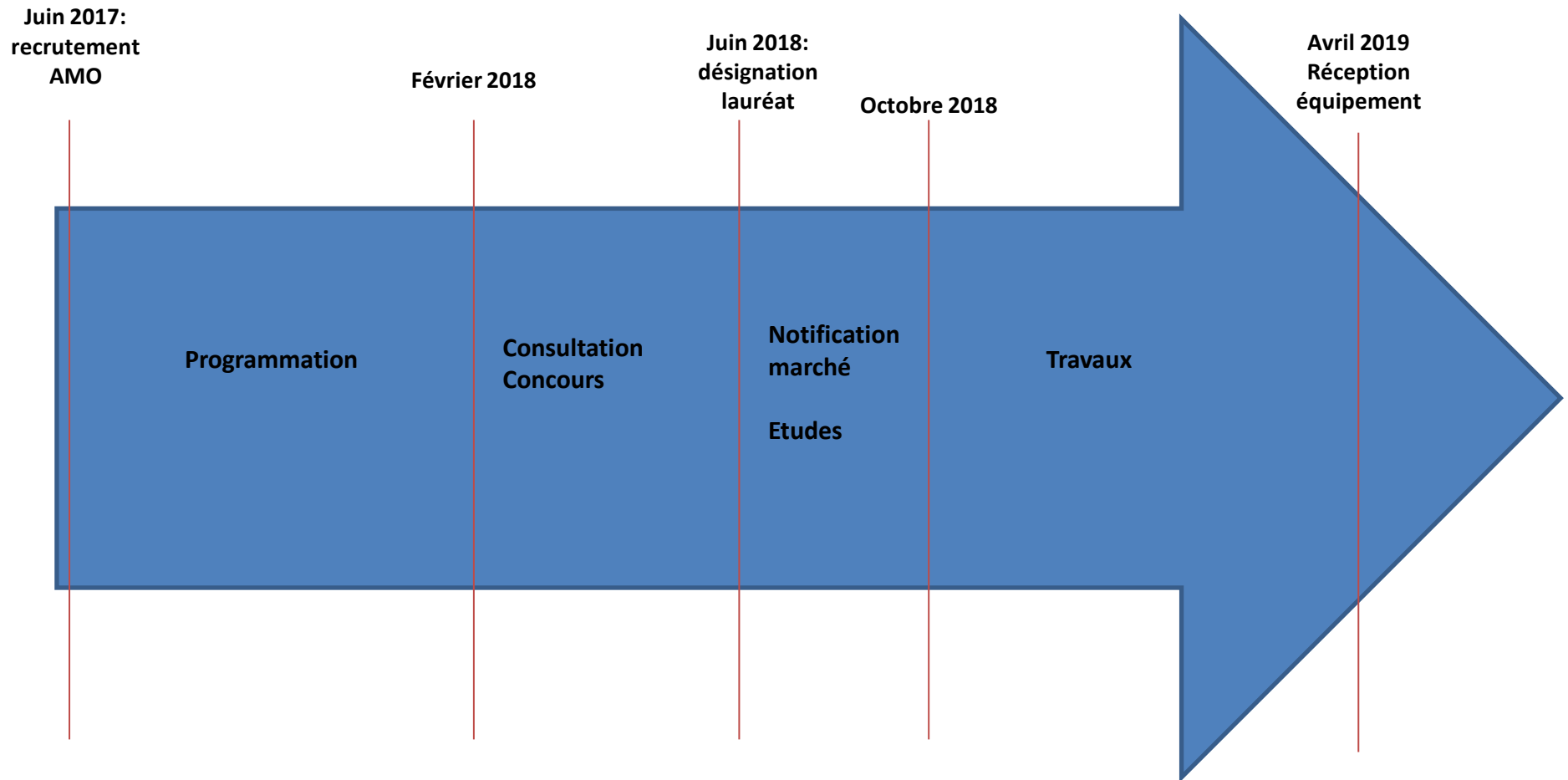
- Intégration dans un pool de serres confinées existantes
- Mutualisation de certains équipements
- Présence de personnels qualifiés sur le site
- Proximité avec le lieu de production du matériel issu du programme d'amélioration

Financement du projet

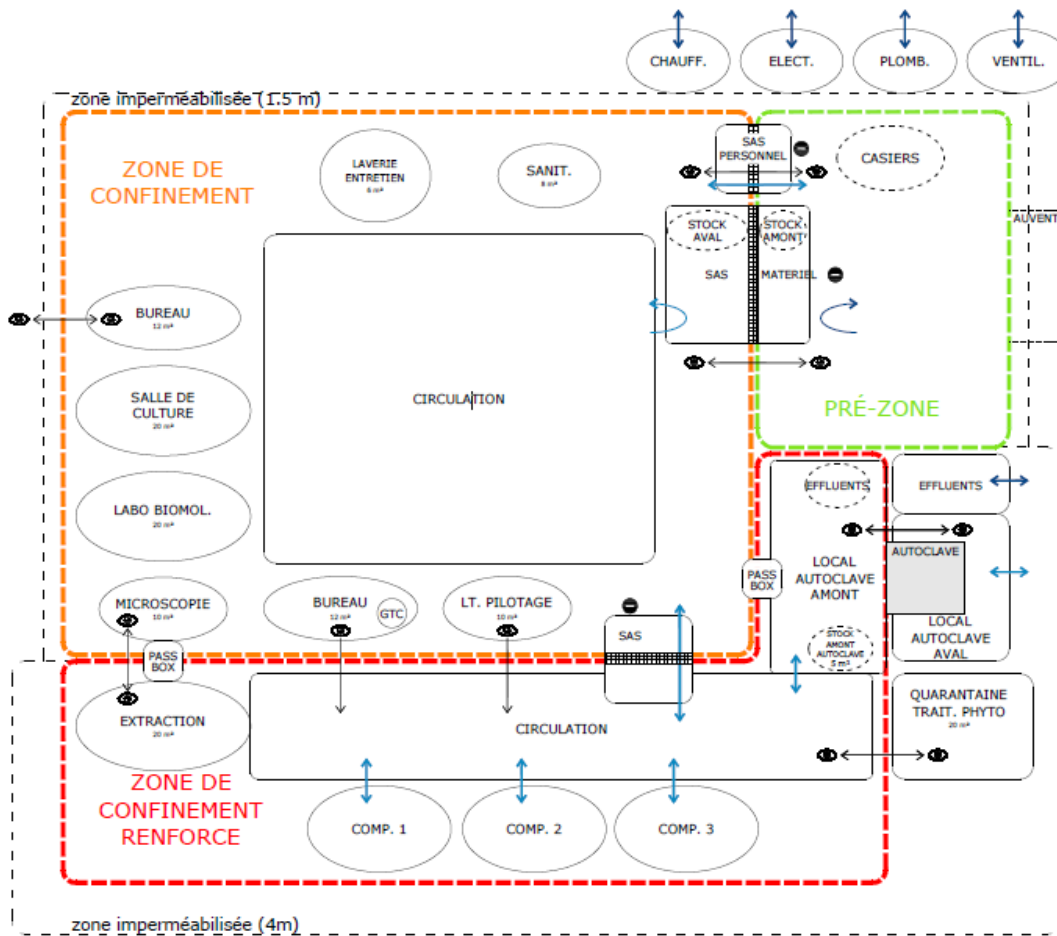
Le budget total affecté au projet est de 1,6 M€ HT (travaux bâtiment, équipements, et frais annexes), dont 1,2 M€ affecté aux travaux.

- Région Nouvelle Aquitaine : 1,3M€ d'euros dans le cadre du CPER 2015-2020**
- INRA: 100 000 euros**
- Filière Forêt : 200 000 euros (Fredon)**

Calendrier prévisionnel



Equipements envisagés



	nombre	surface unitaire en m²	surface totale en m²
Espace Serre confinée ZC+			256
Compartiments de culture	3	50	150
Circulation de desserte des compartiments comprenant des zones de travail dont:	1	5	50
• Surface de stockage/ rangement	1	5	
Local découpage / autoclave			
• Stock amont autoclavage			
• Zone traitement effluents	1		
Local extraction	1	20	20
Sas d'accès en zone	1	6	6
Espace Serre confinée ZC			124
Local microscopie	1	10	10
Salle de culture	1	20	20
Laboratoire biologie moléculaire	1	20	20
Local technique pilotage serre	1	10	10
Laverie / entretien	1	6	6
Bureaux	2	12	24
Sanitaires WC + douche	1	8	8
Sas personnel	1	6	6
Sas matériel y.c. stocks amont aval	1	20	20
Espaces non confinés			50 + LT
Pré-zone comprenant des espaces dédiés dont:			
• Casiers			
• Surface de stockage/ rangement			
• Autoclave et Stock aval autoclavage	1	30	30
Local autoclave aval / cuve effluents	1		
Local traitement phytosanitaire	1	20	20
Locaux techniques			
• Local électrique TGBT et équipements non confiné			
• Traitement d'eau et fog			
• Production EC			
• Production EC			
• Ventilation		À définir	
• Surface utile totale			400 + LT
autres besoins			
PM : Zone périphérique béton largeur 4m côté compartiments et 1,5 m côté bâtiment technique		suivant implantation	

Merci pour votre attention

