



Identification Morphologique de *Diabrotica virgifera* au stade adulte

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE



Droits de reproduction et Copyright

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis gratuitement à la disposition des usagers du ministère chargé de l'agriculture en tant que méthode.

Le présent document est la propriété de l'ANSES, toute reproduction qu'elle soit totale ou partielle ne peut être effectuée qu'à la condition expresse que la source soit citée.

Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 18 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la méthode.

n° méthode Numéro de la version	Consultation publique		Validité	
	Début	Fin	Début	Fin
MOA 023 version 1a	Avril 2011	août 2011	Octobre 2011	Juin 2013 + 3 mois
MOA 023 version 1b	x	x	Juin 2013	

SOMMAIRE

PREAMBULE	4
Objet des méthodes officielles	4
Glossaire, abréviations et documents connexes	4
Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus	4
Échantillonnage et échantillon	4
Modification des méthodes officielles.....	4
Considérations d'ordre métrologique	5
Obligations réglementaires et limites de responsabilité	5
Revue des méthodes officielles, amendement et modification.....	6
ORIGINE DE LA METHODE	7
PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE	8
Modifications	8
Améliorations	8
DESCRIPTION DE LA METHODE	10
1. Objet.	10
2. Domaine d'application.....	10
3. Présentation schématique de l'identification	12
4. Matériel et consommables	12
5. Contrôles et témoins.....	12
6. Prise d'analyse	13
7. Mode opératoire.....	13
8. Résultats.....	16
9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants	16
10. Conservation des reliquats d'échantillons utilisés	16
REMERCIEMENTS	17
LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE	17
BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE	18

PREAMBULE

OBJET DES METHODES OFFICIELLES

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation...). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.

Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

GLOSSAIRE, ABREVIATIONS ET DOCUMENTS CONNEXES

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

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

Certains documents (composition de milieux et tampons...) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

LIMITES IMPOSEES AUX LABORATOIRES AGREES OU RECONNUS

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

ÉCHANTILLONNAGE ET ECHANTILLON

L'échantillonnage, est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.

L'échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception, par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.

Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

MODIFICATION DES METHODES OFFICIELLES

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle...).

Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.

Un réactif-clé (ou critique) est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés ou dont la qualité peut affecter directement le résultat.

Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Toute autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

CONSIDERATIONS D'ORDRE METROLOGIQUE

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

Volume	Volume < à 10 mL : EMT = ± 10% Volume ≥ à 10 mL : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	incubateur : EMT = ± 3°C réfrigérateur : 5°C et EMT = ± 4°C congélateur : ≤ -18°C congélateur froid intense : ≤ -65°C
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

OBLIGATIONS REGLEMENTAIRES ET LIMITES DE RESPONSABILITE

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique ...).

Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.

Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès

des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'agriculture, de l'alimentation et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

REVUE DES METHODES OFFICIELLES, AMENDEMENT ET MODIFICATION

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site de l'ANSES pendant une période usuelle de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».

Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

La présente méthode est une transcription du protocole de diagnostic pour les organismes réglementés de l'OEPP PM7/36(1) : *Diabrotica virgifera* publié en 2004 dans le Bulletin OEPP/EPPO 34 : 289-293. Il a été approuvé par le conseil de l'OEPP¹ en septembre 2003 suivant les procédures de validation propres à l'OEPP. La méthode originale est consultable dans la revue où elle a été publiée ainsi que sur le site internet de l'OEPP à l'adresse suivante [http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-36\(1\).pdf](http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-36(1).pdf) (consultation du 05-III-2011).

Par rapport au protocole OEPP, l'unité d'entomologie et plantes invasives de Montpellier du Laboratoire de la santé des végétaux a réalisé des modifications qui sont listées dans le paragraphe « principales modifications ».

Le travail de relecture et de révision a été effectué par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du laboratoire.

¹ OEPP/EPPO : Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes : www.eppo.org.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: la version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

Les modifications et améliorations listées ci-dessous s'entendent. par rapport au protocole OEPP PM7/36 sus-cité.

MODIFICATIONS

- Taille minimum des échantillons à prélever pour la recherche de *Diabrotica virgifera* : Si l'identification est en général possible à partir d'un seul spécimen, lorsque c'est possible, il est préférable d'observer plusieurs spécimens pour apprécier la variabilité intraspécifique.
- Taille des antennes : Chez *Diabrotica virgifera* les antennes dépassent largement la moitié du corps mais sont souvent plus courtes que sa longueur. Chez beaucoup d'autres Chrysomelidae elles sont effectivement plus courtes que la moitié du corps. Ce caractère n'est pas utilisable pour caractériser la famille des chrysomèles.
- Critères d'identification (p291 du protocole) : les critères évoqués se rapportent à *Diabrotica virgifera* et non à toutes les espèces du genre : *D. barberi* et *D. speciosa* notamment, n'ont pas la tête noire ni les fémurs marginés de noir.

AMELIORATIONS

- Traduction du texte en Français,
- Suppression de la description du sac interne de l'édéage qui n'apporte pas de caractère utile à l'identification.
- Suppression d'*Acalymma vittatum* de la liste des espèces Européennes ressemblantes dans la mesure où cette espèce est Nord-Américaine.
- Addition de quelques espèces « ressemblantes » supplémentaires, au vu des captures courantes dans les pièges en France.
- Ajout des genres Nord-Américains *Trirhabda* et *Disonycha* dans le paragraphe des confusions possibles avec *Diabrotica virgifera*.
- Remplacement de supports iconographiques par des photographies.

Améliorations apportées par la version 1b par rapport à la version 1a :

-point 1. Objet : Précision sur la notion de sous-espèce : La présente méthode décrit les modalités d'identification de *Diabrotica virgifera* sous espèce *virgifera* (dénommée *Diabrotica virgifera* dans la suite de ce protocole)

-point 7.1.4. Séparation des espèces à répartition nord-américaine des espèces à répartition sud-américaine : En Amérique du Nord en plus de *D. virgifera*, 6 espèces ou sous-espèces de *Diabrotica* sont reconnues comme ravageurs du maïs : *D. adelpha* Harold, *D. balteata* LeConte, *D. barberi* Smith & Lawrence (Fig. 8a), *D. undecimpunctata undecimpunctata* Mannerheimer, *D. undecimpunctata howardi* Barber, *D. virgifera zea* Krysan & Smith, (figure 8a). Trois existent également en Amérique du sud : *D. speciosa speciosa* Germar (Fig. 8a), *D. speciosa vigena* Erichson et *D. viridula* (Fabricius).

DESCRIPTION DE LA METHODE

Le genre *Diabrotica* comprend approximativement 338 espèces dans le monde (Wilcox, 1972), parmi lesquelles 10 espèces ou sous-espèces sont reconnues comme ravageurs (Krysan & Miller, 1986). *Diabrotica virgifera*, *D. barberi* et *D. undecimpunctata howardi*, sont de sérieux ravageurs du maïs en Amérique du Nord. Aux USA, la perte financière due aux chrysomèles du maïs est évaluée à 1 000 millions de dollars annuellement (Krysan & Miller, 1986). Les pertes de rendement provoquées par les chrysomèles du maïs peuvent être de 10-13% (Apple *et al.*, 1977 ; Petty *et al.*, 1968). Les adultes sont connus pour voler des maïs matures vers d'autres cultures en floraison. Les cucurbitacées sont particulièrement attractives pour ces chrysomèles, mais ce ravageur a également été trouvé sur luzerne, trèfle, colza, soja et tournesol.

En Europe (EPPO/CABI, 1997), *Diabrotica virgifera* a été signalé pour la première fois en 1992 près de Belgrade (Serbie) (Baca *et al.*, 1995). De Serbie il s'est répandu tout d'abord à l'Ouest, Nord-Ouest, Nord-Est et Est. En 2010 il est présent en Europe centrale, depuis l'Ukraine et la Roumanie à l'est jusqu'à l'Italie à l'ouest, et de la Grèce au sud à la Pologne au Nord. Il est encore très localisé et en cours d'éradication en Allemagne. En France les premiers foyers ont été découverts en Ile de France en 2002. Ils ont été éradiqués. A partir de 2009, les foyers se sont multipliés à l'est essentiellement en Alsace et en Rhône-Alpes. Les populations demeurent très réduites. Il y a deux sous espèces chez *D. virgifera*, *virgifera* (western corn rootworm) et *zea* Krysan & Smith (Mexican corn rootworm) (Krysan *et al.*, 1980). *D. v. virgifera* est distribué aux USA du Midwest vers l'est et le sud-est et au nord jusqu'en Ontario (Canada). Cette sous-espèce est adaptée aux climats tempérés (diapause), alors que *D. v. zea* est distribuée principalement du Texas et de l'Oklahoma au Panama, et il est adapté aux climats chauds (sans diapause). Seule la sous-espèce *virgifera* a été trouvée dans la zone OEPP.

Les filières d'introduction et de propagation de *D. virgifera* sont les sols infestés contenant des œufs, des larves, des pupes, ou les parties aériennes du maïs (fourrage, engrais vert, épis,...) avec des adultes. Dans ce dernier cas, cependant, la probabilité de propagation avec des plants de maïs est faible parce que, avant la récolte, en général les adultes migrent vers des plantes attractives dans d'autres champs ou meurent rapidement. Il est probable que son introduction en Europe ait eu lieu par voie aérienne, assertion basée sur le lieu de sa découverte en Europe, près de l'aéroport de Belgrade (Edwards *et al.*, 1999). Les adultes peuvent être transportés comme contaminants par d'autres moyens de transport (bateaux, trains, camions, automobiles). Les adultes peuvent voler jusqu'à 100 km d'une zone infestée.

Diabrotica virgifera est un organisme nuisible de quarantaine et, par voie de conséquence, soumis à la réglementation européenne (directive 2000/29 CE).

1. Objet.

La présente méthode décrit les modalités d'identification de *Diabrotica virgifera* sous espèce *virgifera* (dénommée *Diabrotica virgifera* dans la suite de ce protocole) au stade adulte et uniquement à ce stade. Elle repose sur une observation morphologique à la loupe binoculaire. Elle ne comprend pas la phase de détection qui est de la responsabilité du client.

2. Domaine d'application

Objets susceptibles d'être soumis à analyse

La méthode est applicable aux insectes isolés ou aux pièges.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

La taille minimum des échantillons à prélever pour la recherche de *Diabrotica virgifera* est : un insecte adulte. Toutefois lorsque c'est possible il est préférable d'observer plusieurs spécimens pour apprécier la variabilité intraspécifique.

Grandeur de l'objet soumis à analyse

Utiliser la totalité de l'échantillon reçu : ensemble des insectes présents dans l'échantillon qu'ils soient dans un liquide conservateur ou collés sur piège englué.

Précaution(s) particulière(s) à prendre

Diabrotica virgifera est un insecte de quarantaine, l'analyse doit se faire sur des insectes **MORTS**.

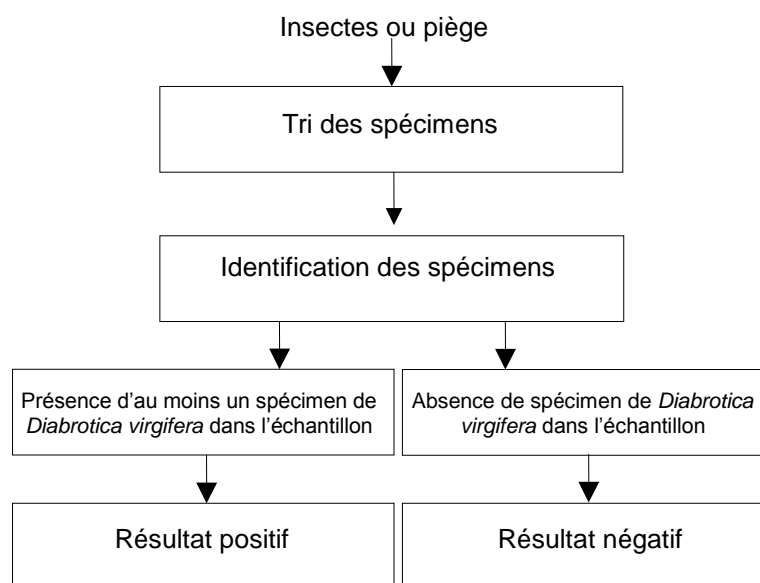
Les insectes à identifier doivent être envoyés morts, soit dans un liquide conservateur (alcool, 70% ou autre) soit à sec mais dans ce cas on les tuera préalablement (congélation, acétate d'éthyle etc.) et on les conditionnera de manière à garantir leur conservation.

La méthode s'applique également à des pièges. Dans le cas de pièges englués, les insectes piégés sont collés sur le piège. Les pièges doivent être conditionnés de manière à ne pas se coller entre eux ou à l'emballage. L'expéditeur veillera également à ce que les insectes collés soient morts de manière à ce qu'ils ne puissent pas passer d'une plaque à l'autre ou s'échapper. S'il reste des insectes vivants sur le piège, ils seront tués avant envoi au laboratoire.

Si le laboratoire reçoit des insectes vivants, il doit les tuer, en utilisant une méthode appropriée, avant ouverture des récipients et avant de procéder à l'analyse.

La manipulation de spécimens vivants de *Diabrotica virgifera*, en France, ne peut se faire que dans une enceinte confinée agréée à cet effet (voir directive européenne 2008/61).

3. Présentation schématique de l'identification



4. Matériel et consommables

4.1. Consommables

Aucun consommable n'est requis pour réaliser l'analyse.

Il est conseillé de se renseigner sur le type de piège auprès du client et de porter des gants pour manipuler les pièges englués.

Il est parfois nécessaire de décoller les insectes englués grâce à un solvant.

Le petit matériel de laboratoire, pinces, tubes, alcool est utile.

4.2. Matériel

Loupe binoculaire : grossissement minimum 40x.

5. Contrôles et témoins

En cas de doute l'identification pourra être confirmée par comparaison à un spécimen de référence. Dans le cas présent le spécimen de référence est un adulte de *Diabrotica virgifera virgifera* correctement identifié et conservé de manière adéquate.

6. Prise d'analyse

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures,...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et de contamination d'un échantillon par un autre.

L'ensemble des insectes de l'échantillon doit être observé.

Dans le cas de pièges englués l'ensemble de la superficie du piège est observée visuellement, et lorsque c'est nécessaire sous la loupe binoculaire (notamment lorsque la densité d'insectes est élevée). L'observation commence dans ce cas avec un grossissement faible puis plus fort si besoin. Tous les insectes « douteux » (ou suspects) sont décollés et désenglués pour être observés plus attentivement. Un solvant adapté au type de glue est souvent nécessaire.

7. Mode opératoire

7.1. Identification

7.1.1. Identité

Les figures citées ci-après sont données en annexe de la présente méthode.

Nom : *Diabrotica virgifera* LeConte.

Position taxonomique : Insecta : Coleoptera : *Chrysomelidae* : *Galerucinae* : *Luperini* : *Diabroticina*.

Statut réglementaire : OEP list A2 n° 199, UE annexe 1A/1.

Les coléoptères adultes (figure 1) présentent :

- des ailes antérieures épaisses formant des élytres, corps en général très sclérifié (figure 2),
- des antennes habituellement avec 11 segments (figure 3).

Les Chrysomelidae adultes présentent (Delvare & Aberlenc, 1989) :

- la base des antennes non entourée par les yeux et non insérée sur une projection de la tête (figure 4),
- des tarses cryptopentamères (le 4^{ème} article très petit entouré et caché par le 3^{ème} bilobé) (figure 5).

Les Galerucinae adultes présentent :

- des antennes insérées sur la partie médiane de la tête, très rapprochées (figures 3 et 4),
- un corps non cylindrique (figure 2),
- une tête projetée vers l'avant (figures 1, 2 et 4).

Les adultes de *Diabrotica virgifera* présentent :

- des élytres avec une carène longitudinale (figure 2),
- des antennes moniliformes, plus longues que la moitié du corps parfois aussi longues (figure 3),
- des fémurs jaunes avec une bande noire sur la marge externe (figure 5),
- une tête brun-noir (figure 4),
- un pronotum jaune pâle, parfois avec des marques orangées (figure 4),
- une taille comprise entre 4,2 et 6,8 mm (figure 1).

La taxonomie de ce genre très large est confuse et mériterait une révision. Les taxa sont difficilement distinguables par des caractères morphologiques externes. Les révisions disponibles datent du 19^e siècle et ne couvrent que certaines aires géographiques.

Le groupe *D. virgifera* a été défini sur la base de certains caractères externes (Seeno & Wilcox, 1982) :

- taille petite à modérée,
- habitus plus long que convexe,
- pronotum subquadrangulaire, bifovéolé, brillant, à ponctuation très superficielle et éparse ; glabre excepté de longues soies aux angles antérieurs et postérieurs ; 1 ou 2 soies courtes sur la marge latérale, adjacentes à la longue soie antérieure et plusieurs soies dirigées vers l'arrière le long de la marge postérieure ; les soies des angles sont extrêmement fragiles et souvent manquantes ; marge latérale distinctement défléchie (en forme d'arc) (figure 4),
- élytre avec un pli huméral distinct, parallèle ou presque, s'étendant sur au moins les 2/3 de l'élytre (figure 2) ; habituellement 2 ou plus sillons sinueux sur le disque de l'élytre, parfois obsolètes chez certains individus ; soies élytrales courtes, érigées à semi-érigées, clairsemées sur la marge apicale, très éparses sur le disque,
- tête à l'aspect brillant, espace génal (distance entre le bord inférieur de l'œil et la suture gulaire) faisant moins du quart du plus grand diamètre de l'œil (figure 4),
- antennes avec des soies droites, semi-érigées, clairsemées et modérément longues (figure 3). Pubescence composée de soies courtes et légèrement courbées, éparse voire nulle sur le segment antennaire 1, éparse sur les segments 2 et 3, dense sur les segments 4 à 11; segments 1,2 et 3 lisses, brillants, les suivants à l'aspect rugueux ; segments 4 à 11 d'un diamètre à peu près égal ; chez le mâle segments 2 et 3 de même longueur ; chez la femelle le troisième segment va d'à peu près égal, à deux fois plus long que le second ; longueur des segments 2 et 3 réunis au moins égale à la moitié de la longueur du segment 4.
- génitalia du mâle comme illustrés (figure 6).

7.1.2. Description du genre *Diabrotica*

La tête tout au plus insérée dans le pronotum jusqu'à la marge postérieure des yeux, front avec un fin sillon longitudinal (de taille et profondeur variables suivant l'espèce), vertex fovéolé, une carène longitudinale entre les antennes. Yeux nettement ovales, entiers, labre tronqué ou faiblement marginé. Antennes avec 11 segments, minces, filiformes, au moins aussi longues que la moitié du corps, quelque fois plus longues que le corps. Deuxième et troisième segments antennaires souvent très petits. Palpe maxillaire tri-segmenté, le dernier étant conique, plus court et étroit que le précédent. Thorax légèrement plus large que long, parfois presque carré, aux côtés à peu près parallèles, quelquefois sinueux, disque généralement bifovéolé. Thorax légèrement ovale postérieurement. Elytre marginé latéralement, parfois sinué, épipleure distinctement différencié jusqu'à l'apex ; coxas antérieurs contigus, prosternum avec un processus prosternal unique et linéaire, les cavités ouvertes postérieurement ; épisternes métasternaux, longs, se rétrécissant en arrière. Pattes modérément longues et minces, tibias étroits, méso et méta tibias avec une épine terminale, face externe carénée sur toute sa longueur, excepté chez quelques espèces ; premier segment des métatarses aussi long que les deux suivants, parfois que les trois suivants. Cavités procoxales ouvertes. Tibia peu ou pas excavé en gouttière, griffes bifides parfois simples (Monoxia) (Christensen, 1943).

7.1.3. Description de l'espèce *Diabrotica virgifera* (adultes)

Les adultes doivent être observés à la loupe binoculaire avec un grossissement minimum de 40X. Les femelles adultes mesurent de 4,2 à 6,8 mm de long, les mâles de 4,4 à 6,6 mm. Le corps (élytres et pronotum) est jaune-pâle. Les fémurs sont noirs ou pâles avec la marge externe toujours noire, les tarsi sont brun-noirs. Les élytres présentent des carènes longitudinales sur le disque. Elytres avec une bande noire partant des angles antérieurs et une le long de la suture et couvrant souvent la totalité de l'élytre. Les mâles sont en général plus sombres que les femelles. Il est plus sûr de déterminer le sexe par l'observation de l'extrémité de l'abdomen. Les mâles présentent un sclérite additionnel à l'extrémité de l'abdomen, celui-ci étant plutôt émoussé, alors que chez la femelle l'abdomen est pointu. Les antennes chez le mâle sont plus longues que chez la femelle.

7.1.4. Confusion possible avec d'autres espèces.

Concernant le stade adulte il y a peu de confusion possible avec des espèces Européennes (Mohr, 1966). Seules les chrysomèles *Coptocephala unifasciata* (Scopoli), *Cryptocephalus decemmaculatus* (Linnaeus), *Cryptocephalus moraei* (Linnaeus), *Cryptocephalus vittatus* Fabricius, *Phyllobrotica quadrimaculata* (Linnaeus) et *Xanthogaleruca luteola* (Muller) montrent quelques ressemblances quant à la taille, forme et couleur d'ensemble, mais la couleur des pronotum et des élytres est discriminante. En général ces espèces voisines ne sont pas trouvées dans les champs de maïs. Elles peuvent être trouvées sur les plantes sauvages voisines de ces champs tout comme *D. virgifera*, trois sont présentées sur la figure 7a.

L'espèce Européenne la plus souvent confondue sur le terrain est *Xanthogaleruca luteola* (Muller). Dans les pièges lorsque les insectes sont englués *D. virgifera* est parfois confondue avec un petit carabique jaune et noir : *Demetrias atricapillus* (L.). Les espèces du genre *Rhagonycha* (Coleoptera, Cantharidae) sont également souvent capturées sur les pièges englués (figure 7b). Le genre *Diabrotica* n'est pas présent en Europe à l'exception de *D. virgifera* introduit.

En Amérique du Nord en plus de *D. virgifera*, 6 espèces ou sous-espèces de *Diabrotica* sont reconnues comme ravageurs du maïs : *D. adelpha* Harold, *D. balteata* LeConte, *D. barberi* Smith & Lawrence (Fig. 8a), *D. undecimpunctata undecimpunctata* Mannerheimer, *D. undecimpunctata howardi* Barber, *D. virgifera zea* Krysan & Smith, (figure 8a). Trois existent également en Amérique du sud : *D. speciosa speciosa* Germar (Fig. 8a), *D. speciosa vigena* Erichson et *D. viridula* (Fabricius).

La clé de Krysan & Miller (1986) peut être utilisée pour différencier les espèces de *Diabrotica* d'intérêt agronomique aux USA. Cette clé tient compte de leur distribution en Amérique du Nord.

Il existe en Amérique du Nord plusieurs genres de Chrysomèles dont l'habitus est assez similaire à *D. virgifera*. *Acalymma vittatum* (Fabricius), présente sur fleurs de Cucurbitacées peut être facilement confondue avec *D. virgifera* mais un examen attentif permet très facilement de différencier ces deux espèces. Les genres *Trirhabda* et *Disonycha* présentent également des espèces jaunes et noires qui peuvent superficiellement être confondues avec *D. virgifera* (figure 8b).

7.1.5. Clé d'identification des adultes pour 8 espèces de *Diabrotica* rencontrées en agriculture aux USA (11 en différenciant les sous-espèces).

- | | | |
|----|--|-------------------------------|
| 1. | Elytre en partie pâle, jaune ou vert..... | 2 |
| | Elytre entièrement noir ; 4-6 mm de long..... | <i>D. cristata</i> |
| 2. | Pronotum pâle, jaune ou vert..... | 3 |
| | Pronotum noir (Nouveau-Mexique, Texas, Arizona)..... | <i>D. lemniscata</i> |
| 3. | Elytre avec des carènes longitudinales sur le disque..... | 4 |
| | Elytre dépourvu de carène sur le disque..... | 8 |
| 4. | Fémur noir ou pâle avec la marge externe teintée de noir..... | 5 |
| | Fémur vert ou jaune, non marqué de noir..... | 6 |
| 5. | Elytres avec des bandes noires partant du calus huméral et sur les sutures ; souvent couvrant la majeure partie des élytres, coléoptères habituellement jaune et noir..... | <i>D. virgifera virgifera</i> |
| | Elytre complètement pâle ou avec une étroite bande noire longitudinale du calus huméral vers l'arrière ; coléoptère foncièrement vert..... | <i>D. virgifera zea</i> |
| 6. | Antenne (excepté le segment proximal), clypeus, tibia et tarse souvent noirs..... | 7 |
| | Antenne, clypeus, tibia et tarse, jaunes ou testacés, bande humérale, si présente, très peu colorée..... | <i>D. barberi</i> (en partie) |
| 7. | Scutellum habituellement noir (Nebraska, Texas, Colorado, Arizona)..... | <i>D. longicornis</i> |
| | Scutellum jaune ou testacé ; Pennsylvanie, du Québec au Vermont, Massachusetts ; populations en Géorgie et Caroline du Sud ont un scutellum noir..... | <i>D. barberi</i> (en partie) |
| 8. | Elytre avec des marques noires..... | 9 |

- | | | |
|-----|--|------------------------------|
| | Elytre sans marques noires ; vert avec des bandes transversales jaunes..... | <i>D. balteata</i> |
| 9. | Elytres avec 11 taches noires..... | 10 |
| | Elytre avec une aire basale noire entourant une tache claire et une bande noire en forme d'arc dans le tiers apical..... | <i>D. tibialis</i> |
| 10. | Pattes et abdomen entièrement noirs (Côte Pacifique)..... | <i>D. u. undecimpunctata</i> |
| | Abdomen pâle, pattes en partie claires..... | 11 |
| 11. | Taches noires plutôt larges ; forme robuste (Est des USA)..... | <i>D. u. howardi</i> |
| | Taches plus petites et brunâtres ; forme moins robustes..... | <i>D. u. tenella</i> |

8. Résultats

8.1. Interprétation des résultats

Pour qu'un diagnostic soit positif il est nécessaire :

- d'avoir suivi les procédures de diagnostic et d'identification décrites dans la méthode,
- un ou des spécimens adultes ont dû être étudiés,
- le(s) spécimen(s) doit(vent) présenter les caractéristiques décrites ci-dessus des *Chrysomelidae*, *Galerucinae*, du genre *Diabrotica* et de l'espèce *virgifera*.

8.2. Formulation du résultat d'analyse

L'échantillon est déclaré positif si au moins un spécimen adulte a pu être identifié comme *Diabrotica virgifera*.

9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures pour garantir la non dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement. **Les insectes doivent être tués avant analyse.**

10. Conservation des reliquats d'échantillons utilisés

Il n'y a pas d'exigences particulières concernant la conservation des reliquats de matériels utilisés sauf spécifications contraires de la Direction Générale de l'Alimentation au sein du ministère chargé de l'agriculture.

Dans le cas où une analyse de confirmation est nécessaire, les insectes (positifs ou négatifs) peuvent être conservés dans l'alcool 70% pendant plusieurs années et envoyés pour confirmation au laboratoire de référence.

REMERCIEMENTS

Des remerciements sont adressés à l'OEPP pour la mise à disposition du protocole et l'autorisation d'utiliser l'iconographie.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
PM7/36	Protocole de diagnostic pour les organismes réglementés : <i>Diabrotica virgifera</i> . 2004. Bulletin OEPP/EPPO 34 : 289-293.
Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000	Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté <i>Journal officiel n° L 169 du 10/07/2000 p. 0001 – 0022</i>
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

APPLE J.W., CHIANG H.C., ENGLISH L.M., RENCH L.K., KEASTER A.J., KRAUSE G.F., MAYO Z.B., MUNSON J.D., MUSICK G.J., OWEN J.C., RASMUSSEN E.E., SECHRIEST R.E., TOLLEFSON J.J., WEDBERG J.L. (1977). Impact of northern and western corn rootworm larvae on field corn. North Central Region Research Publication n°29. Research Division: University of Wisconsin, Madison (US).

BACA F., CAMPRAG D., KERESI T., KRNJAJIC S., MANOJLOVIC B., SEKULIC R., SIVCEV I. (1995). [Western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*.]. In Društvo za Zastitu Bilja Srbije. Belgrade (en serbo-croate).

CHRISTENSEN J. (1943). [Studies on the genus *Diabrotica* Chev. In Argentina.]. Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria 10, 464-516.

DELVARE G. ABERLENC H.-P. (1989). Les insectes d'Afrique et d'Amérique tropicale - clés pour la reconnaissance des familles. CIRAD/GERDAT. Montpellier.

EDWARDS C.R. BARCIC J., BERBEROVIC H., BERGER H.K., FESTIC H., FURLAN L., IVANOVA I., KISS J., PRINCZINGER G., SIVCEV I., VONICA I. (1999). An update on the spread of western corn rootworm in Europe. In: 6th International IWGO workshop on *Diabrotica virgifera*, Paris.

EPPO/CABI (1997). *Diabrotica barberi* and *D. virgifera*. Quarantine pests for Europe (2nd Ed.), pp 233-237. CAB International, Wallingford.

KISS J., KHOSBAYAR B., KOMAROMI J., IGRC-BARCIC J., DOBRINCIC R., SIVCEV I., EDWARDS C.R., HATALA-ZSELLER I. (2001). Is the western corn rootworm adapting itself to the European crop rotation system? Results of a joint European trial. In: 8th International IWGO Workshop on *Diabrotica virgifera*, Venezia.

KRYSAN J.L., MILLER T.A. (1986). Methods for the study of pest *Diabrotica*. Springer Verlag, New-York.

KRYSAN J.L., RAY F.S., BRANSON T.F., GUSS P.L. (1980). A new subspecies of *Diabrotica virgifera*: description, distribution, and sexual compatibility. Annals of the Entomological Society of America. 73: 123-130.

LAWRENCE J.F. (1991). Order Coleoptera. In: Immature insects (Ed. Stehr F.W.) 2pp, 144-658. Kendall/Hunt, Dubuque.

MOHR K.H. (1966). Chrysomelidae. In: Die Käfer Mitteleuropa (Ed. Freude H., Harde K.W & Lohse G.A.) Vol 9, pp 95-280. Goecke & Evers, Krefeld.

PETTY H.B., KUHLMAN D.E. SECHRIEST R.E. (1968). Corn yield losses correlated with rootworm larval populations. Entomological Society of America North Central Branch Proceedings. 24: 141-142.

SEENO T., WILCOX J.A. (1982). Leaf beetles genera (Coleoptera: Chrysomelidae). Entomography. 1:1-221.

WILCOW J.A. (1972). A synopsis of the North American Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae). Bulletin New-York State Museum and Science service n°400/ Albany.

Figure 1 : *Diabrotica virgifera* LeConte



Femelle adulte
Taille de 4,2 à 6,8 mm



Mâle adulte
Taille de 4,4 à 6,6 mm

Figure 2 : Ailes antérieures épaissies formant des élytres

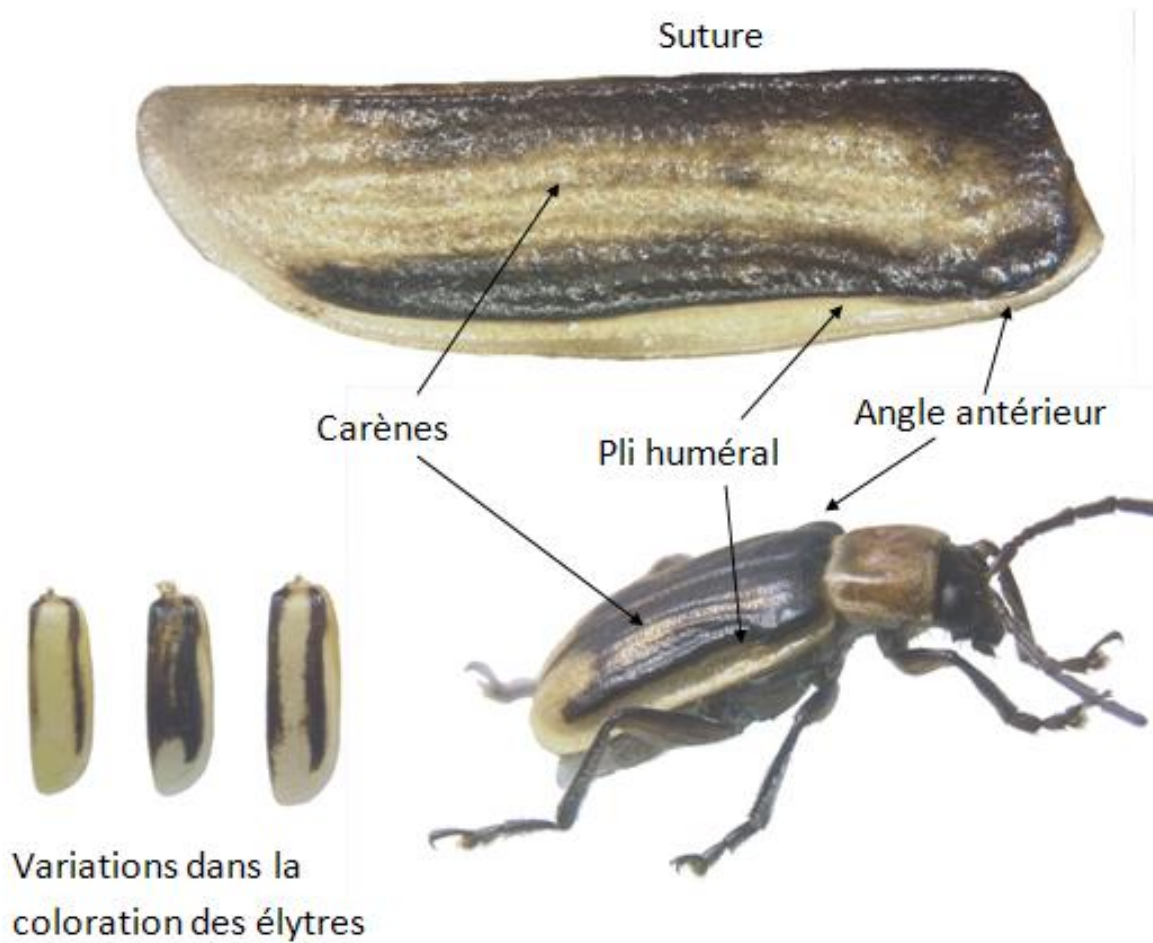


Figure 3: Antennes moniliformes composées de 11 articles



Segments antennaires 2 et 3 plus courts que les autres



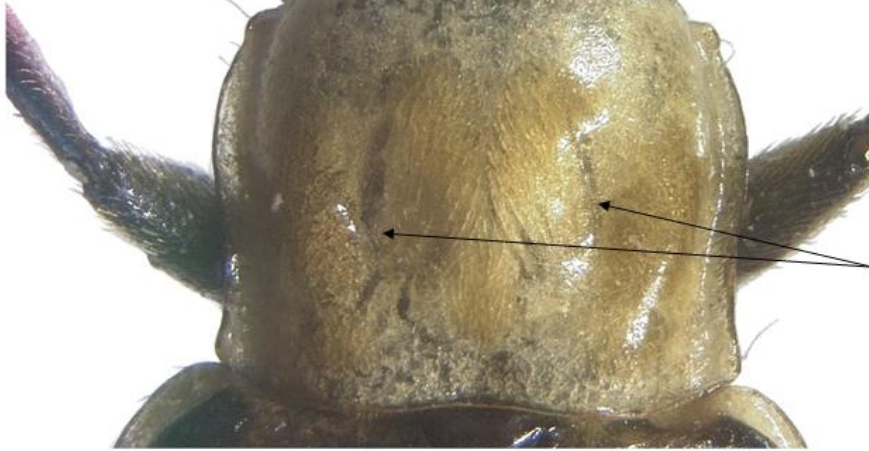
Figure 4

Bases des antennes en partie médiane de la tête, très rapprochées, non entourées par les yeux, non insérées sur une projection de la tête

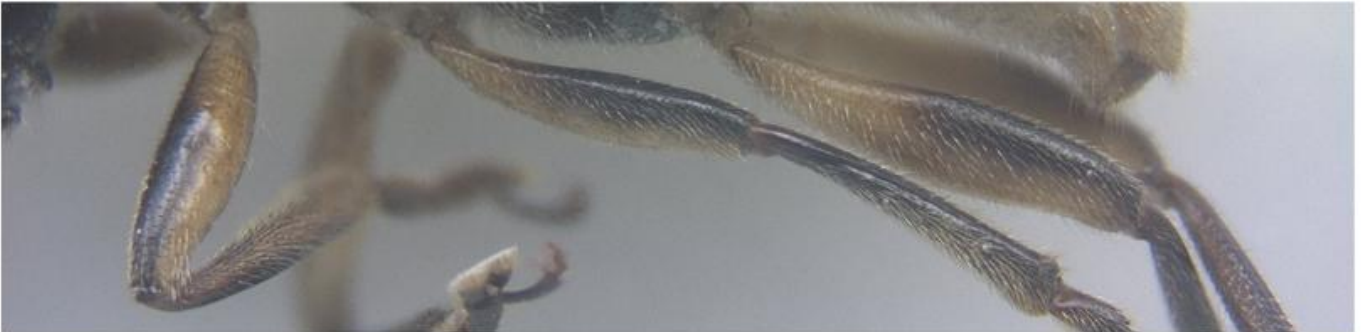
Tête brun foncé,
Vertex fovéolé



Pronotum jaune-pâle,
Subquadrangulaire,
Bifovéolé à ponctuation très superficielle



Fémurs jaunes avec une bande noire sur la marge externe



Tarse cryptopentamère

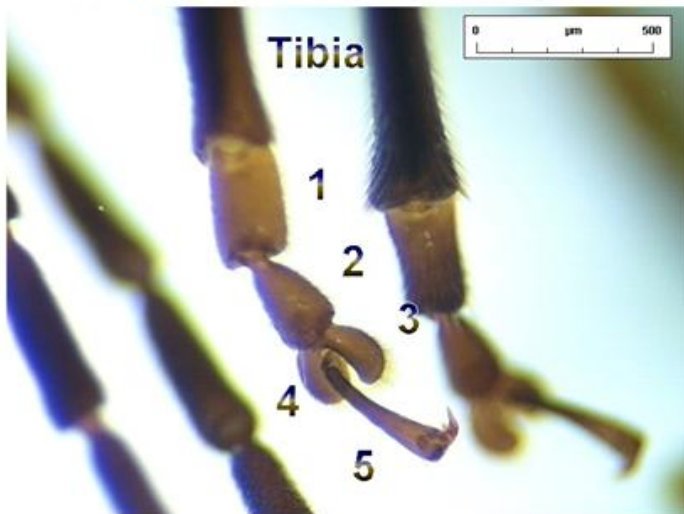


Figure 5





Figure 6: génitalia mâle (édéage)

Figure 7a: Chrysomèles européennes pouvant se trouver dans le voisinage des champs de maïs

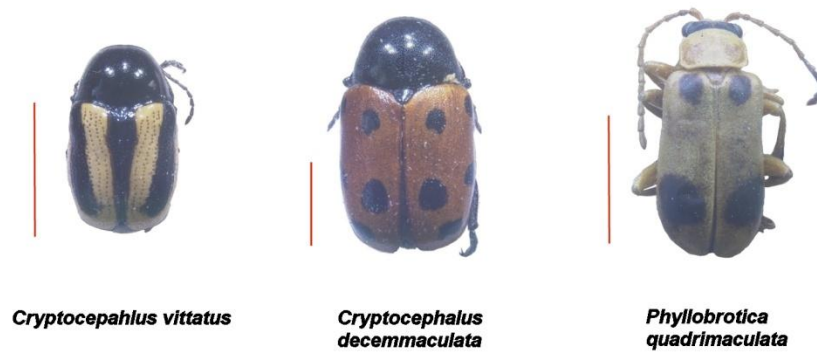


Figure 7b: Coléoptères régulièrement trouvés dans les pièges englués

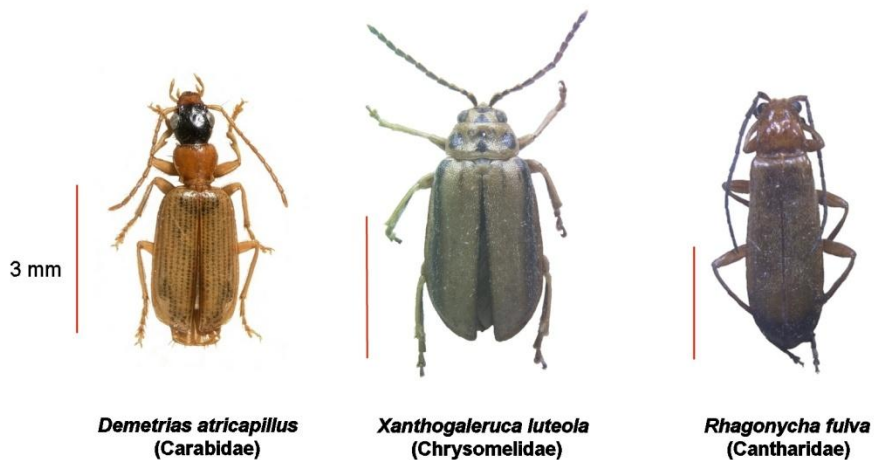


Figure 8a : Exemples de deux espèces américaines du genre *Diabrotica* :

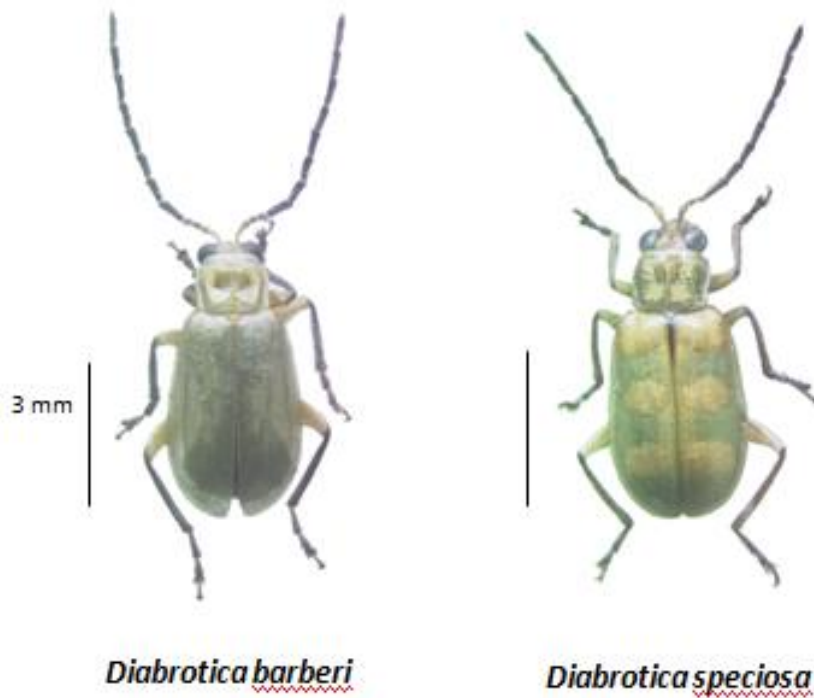
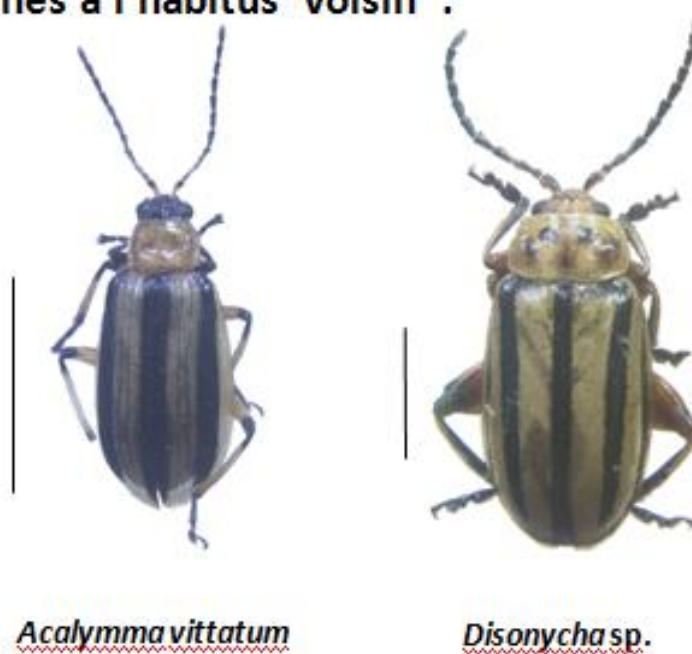


Figure 8b : Exemple de deux chrysomèles américaines à l'habitus 'voisin' :



Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

**Laboratoire de la santé des végétaux (ANSES),
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01**
lsv@anses.fr

Ce document est édité par :

**Ministère chargé de l'agriculture
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15**
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.