

## Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA052 - Version 1

Mars 2018

# Détection de *Fusarium circinatum* sur tissu végétatif par isolement mycologique et caractérisation morphologique

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence « Champignons sur toute matrice »



## Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
MOA003 partie C		Mars 2010	Version initiale
V1 *	Majeures	Mars 2018	<ul style="list-style-type: none"><li>• Changement de format de présentation de la méthode.</li><li>• Mise à jour de la dénomination scientifique de l'organisme cible (<i>Fusarium circinatum</i>) selon les nouvelles règles nomenclaturales en mycologie.</li><li>• Prise en compte de nouvelles espèces de <i>Fusarium</i> produisant des hyphes circinés.</li><li>• En cas de suspicion de détection de <i>Fusarium circinatum</i>, envoi des souches en culture pure à un laboratoire réalisant une identification par analyse de séquence de marqueurs phylogénétiques.</li><li>• Suppression de la confirmation par PCR en temps réel ou conventionnelle.</li><li>• Ajout d'un tableau présentant les caractéristiques morphologiques des espèces de <i>Fusarium</i> potentiellement présentes sur pin</li><li>• Ajout d'éléments concernant la caractérisation des performances de la méthode.</li></ul>

\* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du 29 décembre 2017 au 9 février 2018 sur le site internet de l'agence.



## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

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

Laboratoire National de Référence « Champignons phytopathogènes sur toute matrice »

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

Contact : [nancy.lsv@anses.fr](mailto:nancy.lsv@anses.fr)

La présente version de la méthode a été rédigée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux en adaptant une méthode d'isolement des *Fusarium spp.* utilisée sur les céréales (méthode officielle MH.03.16) et en se basant sur le retour d'expérience du panel mycologie de l'OEPP. L'identification morphologique de cette espèce est basée sur la littérature scientifique.

La méthode a été révisée par l'unité de mycologie du Laboratoire de la Santé des Végétaux.

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



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Réactifs</b> .....	<b>11</b>
5.1 Eau.....	11
5.2 Milieu de culture .....	11
5.3 Hypochlorite de Sodium.....	11
5.4 Autres consommables à usage unique .....	11
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>12</b>
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>13</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse.....	13
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>14</b>
8.1 Prise d'essai .....	14
8.2 Isolement sur milieu semi-sélectif .....	14
8.3 Lecture des boîtes d'isolement et repiquage des <i>Fusarium spp.</i> .....	15
8.4 Identification de <i>Fusarium circinatum</i> .....	15
<b>9. Résultats</b> .....	<b>19</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	19
9.2 Calculs et expression des résultats .....	19
<b>10. Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>20</b>
10.1 Isolement mycologique .....	20
10.2 Caractérisation morphologique .....	20
<b>Annexe 1 : Composition des différents milieux de culture</b> .....	<b>21</b>
<b>Annexe 2 : Glossaire mycologique</b> .....	<b>22</b>



<b>Annexe 3 : Principales caractéristiques morphologiques en cultures sur SNA des espèces de <i>Fusarium</i> rencontrés sur pin. ....</b>	<b>24</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>25</b>



## Introduction

*Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell (ex *Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell ; Syn *F. subglutinans* [Wollenweb and Reinking] Nelson, Toussoun and Marasas f. sp. *pini*) est un important agent pathogène des *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* qui cause des chancres résineux sur arbres adultes et pourritures racinaires ou mortalité chez les jeunes semis. Les graines et les jeunes plants infectés de *Pinus* spp. et de *Pseudotsuga menziesii* peuvent véhiculer le champignon pathogène de régions infectées vers des régions saines. Des insectes de type « scolyte » peuvent par ailleurs faire office de vecteur en transportant des conidies sur leur exosquelette ou dans leur système digestif, d'arbres infectés vers des arbres sains.



## **Avertissements et précautions de sécurité**

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

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

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

### **Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants :**

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



## 1. Objet et domaine d'application

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de *F. circinatum* dans un échantillon de tissu végétatif par isolement et caractérisation morphologique en culture pure.

Le champignon n'est pas décrit comme parasite vasculaire, chaque chancre ou lésion est donc la conséquence d'une infection distincte. Les insectes foreurs sont les principaux vecteurs du parasite, et vont initier les sites d'infections sur un arbre.

Sur des plants infectés, l'infection se manifeste généralement par un symptôme de type fonte de semis. Il est toutefois possible que le champignon infecte un plant sans symptôme apparent pendant plusieurs mois avant d'exprimer la maladie (infection latente).

Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de *F. circinatum* ou contaminés à un niveau trop faible ou contaminé par une forme non cultivable (quiescente, morte) pour être mis en évidence par la technique utilisée.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse : La méthode s'applique sur tissus végétatifs de *Pinus spp.* et *Pseudotsuga menziesii*. Néanmoins, selon l'évolution des connaissances scientifiques concernant ce parasite, cette méthode reste utilisable sur d'autres plantes si la gamme d'hôtes potentiels ou avérés venait à s'élargir.

- Tissus sous corticaux de branches ou tronc, racines présentant des symptômes.
- Plants présentant des symptômes.
- Plants ne présentant pas de symptôme apparent, en cas de suspicion d'infection latente.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse : aucune

Grandeur de l'objet soumis à analyse :

- Rameaux, partie de tronc ou racines d'une taille inférieure à 40 cm.
- Plants entiers.

## 2. Documents de référence

- [1] EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2009. *Gibberella circinata* OEPP/EPPO Bulletin 39, 298-309.
- [2] IPPC (2017) International Standard for Phytosanitary Measures n° 27. Diagnostic Protocols n°22 : *Fusarium circinatum*.



### 3. Termes, sigles et définitions

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

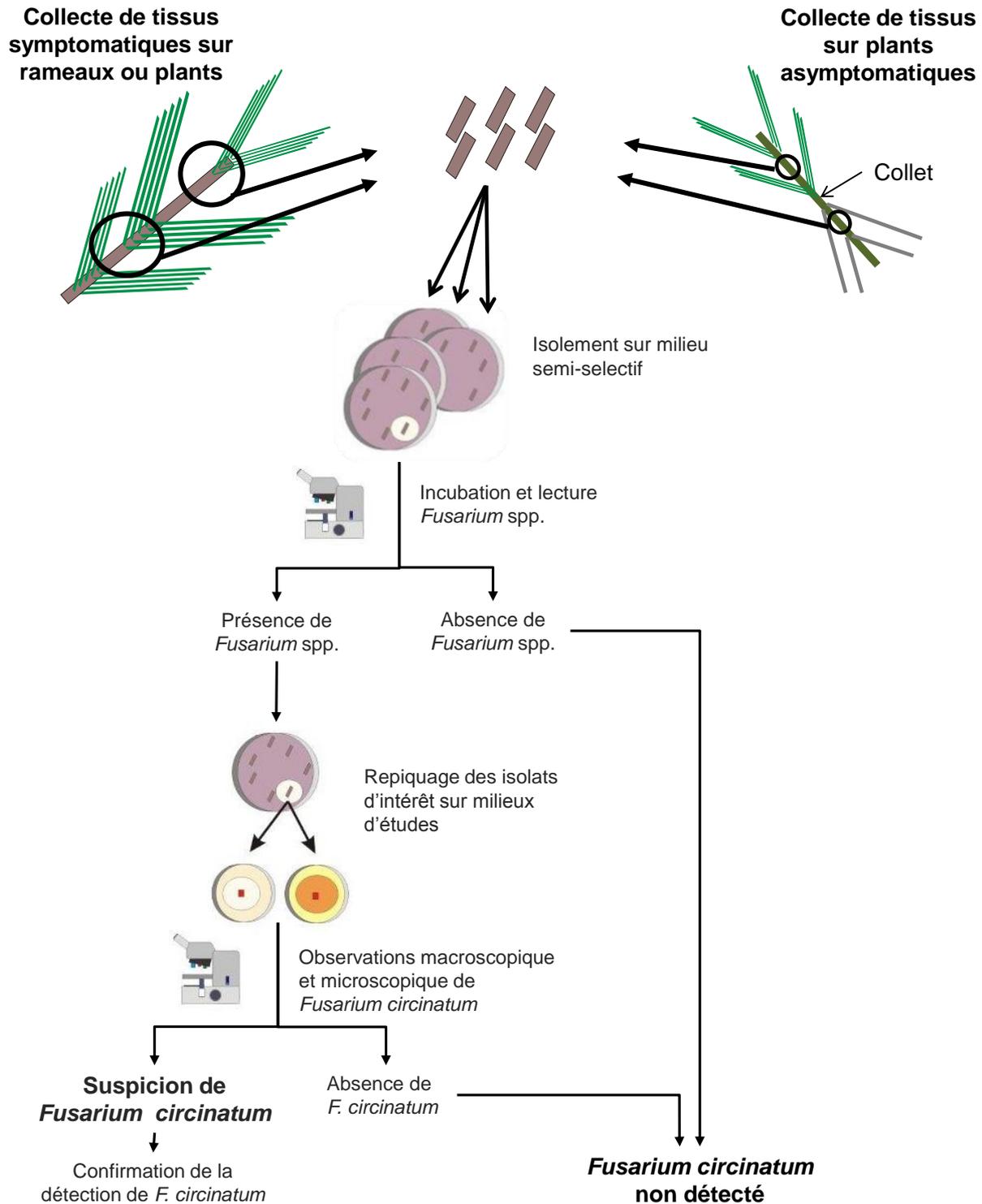
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.

Les termes spécifiques à l'identification morphologique des *Fusarium* spp. sont définis en annexe 2.



## 4. Principe de la méthode

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





## 5. Réactifs

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

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

### 5.1 Eau

La fabrication des différents milieux de culture requiert l'utilisation d'eau osmosée ou d'eau distillée.

### 5.2 Milieu de culture

Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar adapté (DCPA) : cf annexe 1

Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) : cf annexe 1

Spezieller Nährstoffärmer Agar (SNA) : cf annexe 1

### 5.3 Hypochlorite de Sodium

La solution d'utilisation est une dilution de la solution mère à une concentration finale d'environ 1,5 % de chlore actif dans de l'eau du robinet. Une solution du commerce (eau de javel) diluée est acceptable.

### 5.4 Autres consommables à usage unique

**Préparation des milieux de culture :**

- Solution bleu coton ou acide fuchsine. Ces colorants dilués dans de l'acide lactique sont utilisés pour l'observation microscopique des structures fongiques.
- Microcônes stériles de volume adapté.
- Boîtes de Petri stériles.

**Identification morphologique :**

- Manches et lames de scalpels.



- lame porte objet pour microscopie.
- lamelles couvre objets pour microscopie.
- rouleau de bande adhésive transparente.

## 6. Appareillage et matériels

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

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

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

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

- Poste de Sécurité Microbiologique de classe II équipé d'un système pour la stérilisation des instruments (ex : bec bunsen...).
- Enceinte climatique thermostatée ou pièce à température contrôlée à  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- Microscope optique (grossissement 100x à 400x) équipé au minimum des objectifs x10, x20, et x40
- Sécateur ou outil équivalent.



## 7. Échantillons

### 7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Pour que les échantillons soient acceptés sans réserve, les éléments suivants doivent être respectés :

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

- Tissus sous corticaux de branches ou tronc, racines présentant des symptômes (cf OEPP 2009, IPPC 2017) : les échantillons sont constitués d'au moins un rameau, un tronçon de rameau, un fragment de tronc ou un tronçon de racine.
- Plants présentant des symptômes : au moins un plant.
- Plants ne présentant pas de symptôme apparent : au moins un plant.

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

#### Confection du colis :

Secouer les racines des plants pour faire tomber la terre; ne pas les laver. Envelopper le prélèvement dans du papier journal ou dans du papier absorbant. Chaque échantillon est conditionné individuellement dans un emballage hermétique et parfaitement identifié (référence figurant sur la fiche de demande d'analyse). Toutes les mesures doivent être prises pour conserver l'intégrité de l'échantillon et éviter les contaminations par d'autres échantillons. Une signalétique «quarantaine» doit figurer sur le colis.

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

### 7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le délai entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse doit être inférieur à 10 jours. L'échantillon devra pendant ce temps être conservé à 5°C.

### 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

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



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

## 8. Mode opératoire

### 8.1 Prise d'essai

Les prélèvements de tissu s'effectuent dans une atmosphère stérile, en utilisant des outils coupants stérilisés. Pour un échantillon donné, réaliser une prise d'essai en ciblant les régions les plus pertinentes et prélever autant de fragments que nécessaire afin de maximiser les chances de détecter le parasite.

- Tissus sous corticaux de branches ou tronc, racines présentant des symptômes :

La prise d'essai s'effectuera uniquement sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *F. circinatum* ou des symptômes douteux. Prélever des fragments d'environ 2 cm préférentiellement dans la zone du chancre ou en limite de la zone nécrosée. Le prélèvement de fragments de taille inférieure est envisageable si l'échantillon pour analyse est de petit diamètre.

- Plants présentant des symptômes :

La prise d'essai s'effectuera sur des tissus présentant des symptômes typiques d'une infection par *F. circinatum* ou des symptômes douteux. Prélever des tronçons d'un à deux cm préférentiellement en limite de la zone nécrosée.

- Plants ne présentant pas de symptôme apparent :

Rincer les jeunes plants à l'eau courante pendant quelques secondes afin d'éliminer tout résidu de support de culture de l'appareil racinaire, avant de procéder au prélèvement de tissu. La prise d'essai s'effectuera au-dessus du niveau du collet, sous la forme d'un tronçon d'1 cm environ de la tige principale **et** au-dessous du collet, sous la forme d'un tronçon d'1cm environ de la racine principale (cf schéma §4).

### 8.2 Isolement sur milieu semi-sélectif

Les fragments ou tronçons de tissus récupérés sont stérilisés en surface par trempage de 1 à 2 minutes dans une solution titrant environ 1,5 % de chlore actif puis rincés dans 2 bains d'eau stérile successifs d'environ 2 mn chacun. Les fragments sont ensuite placés sur du papier filtre et séchés par le flux stérile.



Les fragments ou tronçons de tissus sont ensuite découpés en plus petits fragments qui seront déposés individuellement sur un milieu de culture DCPA, à raison de 5-6 implants par boîte de Petri (maximum 30 implants).

Les boîtes de Petri sont ensuite incubées pendant 5 à 10 jours à  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Attention : les boîtes de Petri ne doivent pas être scellées par un film adhésif ou du parafilm®.

### 8.3 Lecture des boîtes d'isolement et repiquage des *Fusarium* spp.

Après 5 à 10 jours d'incubation, les *Fusarium* spp. infectant les tissus incubés se sont bien développés sur le milieu semi-sélectif DCPA. Les cultures qui s'y développent apparaissent généralement blanches à saumon-rose très pâle, car ce milieu inhibe significativement la production de pigments par les champignons qui parviennent à s'y développer.

Le milieu étant semi-sélectif, les champignons du genre *Fusarium* vont se développer de manière conséquente sur le milieu (vitesse de croissance radiale  $>2\text{mm}$  / jour et mycélium aérien abondant). Les colonies de *F. circinatum* présentent typiquement un aspect « poudreux » sur DCPA. Les autres genres de champignons peuvent croître mais vont présenter une vitesse de croissance radiale relativement faible ( $<2\text{ mm}$  / jour) et/ou un mycélium aérien très peu abondant voire inexistant.

Les colonies sont ensuite observées à un grossissement de x 50 à x 200 en plaçant les boîtes de Petri fermées sur le plateau du microscope. Toutes les colonies présentant des microconidies disposées en fausse-tête sur des conidiophores érigés, assez courts et plus ou moins ramifiés (cf figure 3) seront identifiées et transférées individuellement sur un milieu SNA et un milieu PDA sous un PSM.

Les colonies transférées sur PDA et SNA sont ensuite incubées pendant 5 à 10 jours à  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Attention : les boîtes de Petri ne doivent pas être scellées par un film adhésif ou du parafilm®.

### 8.4 Identification de *Fusarium circinatum*

L'identification de *Fusarium circinatum* repose sur l'observation de l'ensemble des caractéristiques décrites par la littérature scientifique (Britz et al. 2002; Nirenberg and O'Donnell 1998; Pérez-Sierra et al. 2007).

#### Caractéristiques morphologiques de *Fusarium circinatum* sur milieu PDA

Les caractères macroscopiques (morphologie et pigmentation) des colonies sont observés sur les souches développées sur milieu PDA.

Sur milieu PDA, les souches de *Fusarium circinatum* présentent les caractéristiques morphologiques suivantes :

- Colonie à marge entière,
- Mycélium aérien blanc et de type cotonneux (figure 1),



- Coloration de l'agar sous la culture : saumon virant au violet, voire au noir, vers le centre de la culture (figure 2) ou parfois zones violettes à noires de taille et forme variables. Dans de rares cas, la souche peut présenter une coloration rouge.

#### Caractéristiques morphologiques de *Fusarium circinatum* sur milieu SNA

Les caractères microscopiques (microconidies, conidiophores, hyphes circlés ...) des colonies sont observés sur les souches développées sur milieu SNA.

Les isolats SNA sont observés à un grossissement de x50 à x200 en plaçant les boîtes de Petri fermées sur le plateau du microscope. Les boîtes sont observées à l'endroit et à l'envers.

Un prélèvement de mycélium peut être réalisé sous PSM pour observer les isolats à un grossissement plus élevé (x400 à x1000). Une bande adhésive transparente est déposée sur la surface du mycélium, la face supérieure sera lissée à l'aide de la tête d'un coton tige, afin de bien mettre en contact la face collante avec les structures mycéliennes et la surface gélosée. La bande adhésive est ensuite retirée et la face collante est déposée sur une goutte de colorant pour observation directe au microscope. De cette façon, il est souvent plus facile d'observer les microconidies encore fixées à leur cellule conidiogène et gardant un éventuel agencement particulier (fausse tête, chaînette). Lorsque l'isolat étudié en produit, les polyphialides sont plus facilement observables dans les parties jeunes de la culture (marge).

Sur milieu SNA, les souches de *Fusarium circinatum* présentent les caractéristiques morphologiques suivantes :

- Microconidies agrégées uniquement en fausse tête (figure 3),
- Conidiophores ramifiés présentant des mono- et des polyphialides (figure 4)
- Microconidies obovoïdes, majoritairement non septées ou avec occasionnellement un septum (figure 4)
- Chlamydospores absentes
- Présence d'hyphes stériles, enroulés ou non enroulés de façon distincte (figures 5 à 8).

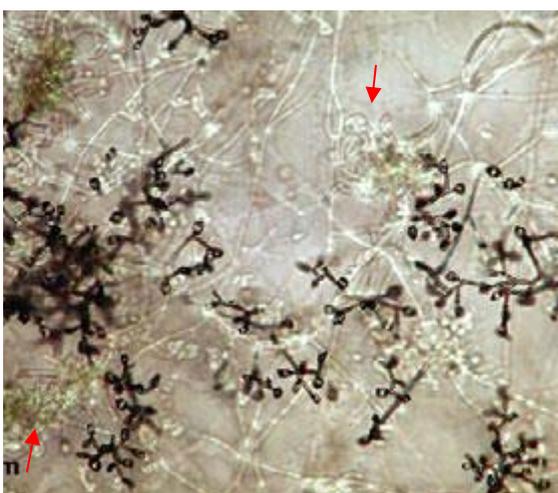
Attention : certaines souches peuvent développer des hyphes stériles plus tardivement. En cas de doute, il est possible de prolonger la durée d'incubation des cultures sur SNA d'environ 5 jours.



**Figure 1 :** Aspect cultural aérien de *F. circinatum* sur PDA (Difco®)  
(crédit photo R. loos, ANSES-LSV, Malzéville, France)



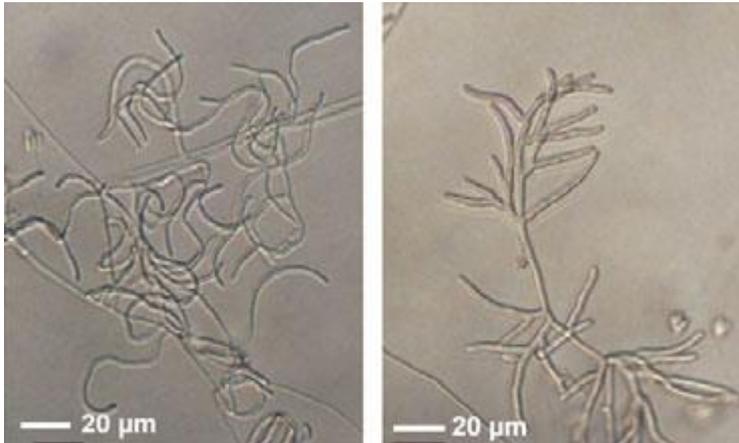
**Figure 2 :** Aspect cultural de *F. circinatum* sur PDA (Difco®), pigmentation particulière visible sous la culture  
(crédit photo R. loos, ANSES-LSV, Malzéville, France)



**Figure 3 :** Vue au microscope (x100) d'une culture sur milieu SNA de *Fusarium circinatum* présentant des conidiophores érigés portant des microconidies arrangées en fausse-tête. Sur la gélose sont visibles des hyphes stériles enroulés typiques de *F. circinatum* (flèches rouges). (crédit photo R. loos, ANSES-LSV, Malzéville, France)



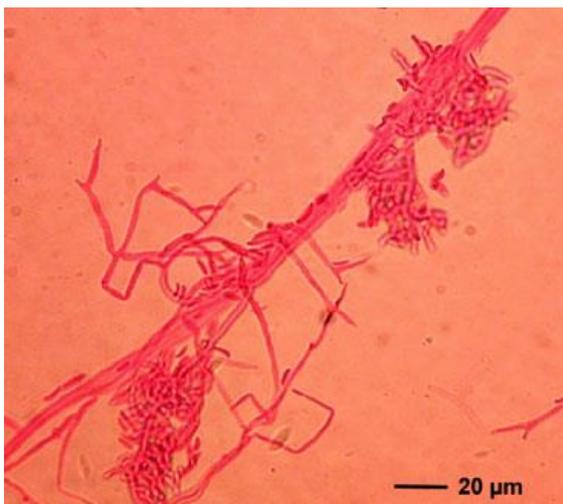
**Figure 4 :** conidiophores mono- et polyphialidiques et microconidies observés sur milieu SNA (crédit photo : J. Armengol, Instituto Agroforestal Mediterraneo, Valencia, Espagne)



**Figure 5** : hyphes stériles typiquement enroulés, ou non distinctivement enroulés, observés chez *F. circinatum* cultivé sur milieu SNA (crédit photo A.M. Perez-Sierra, Instituto Agroforestal Mediterraneo, Valencia, Espagne)



**Figure 6** : groupes d'hyphes stériles enroulés produits par *F. circinatum* sur milieu SNA (grossissement x 400) (crédit photo R. loos, ANSES-LSV, Malzéville, France)



**Figure 7** : hyphes stériles enroulés produits par *F. circinatum* sur milieu SNA (grossissement x 400) (crédit photo R. loos, ANSES-LSV, Malzéville, France)



**Figure 8** : hyphes stériles non distinctivement enroulés observés chez *F. circinatum* cultivé sur milieu SNA (grossissement x 200) (crédit photo R. loos, ANSES-LSV, Malzéville, France).



## 9. Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

Parmi les espèces de *Fusarium* présentes sur pin certaines présentent des caractéristiques morphologiques identiques à celles de *Fusarium circinatum* (Annexe 3) et il n'est pas possible de statuer définitivement sur l'identification. Il est nécessaire de confirmer la présence de l'espèce *F. circinatum* en analysant la séquence d'au moins un gène d'intérêt phylogénétique discriminant pour le genre *Fusarium* (Ex : *Translation Elongation Factor alpha* (EF1- $\alpha$ ), *RNA polymerase II* (RPB2)...)

### 9.2 Calculs et expression des résultats

Absence de souche susceptible d'appartenir à l'espèce *Fusarium circinatum*.

Si pour une prise d'essai aucun des isolats repiqués ne présente toutes les caractéristiques de *F. circinatum* en culture pure, l'échantillon analysé est dit négatif pour *Fusarium circinatum*.

Le résultat sera exprimé par une phrase du type « *F. circinatum* non détecté dans l'échantillon analysé ».

Présence de souche susceptible d'appartenir à l'espèce *Fusarium circinatum*.

Si pour une prise d'essai au moins un des isolats repiqués présente toutes les caractéristiques de *F. circinatum* en culture pure, le résultat sera exprimé par une phrase du type « Suspicion de présence de *F. circinatum* dans l'échantillon analysé ».

Les souches en culture pure présentant les caractéristiques morphologiques de *F. circinatum* seront adressées à un laboratoire réalisant des analyses d'identification par analyse de séquence de marqueurs phylogénétiques.

Dans la cadre d'analyses officielles, ce résultat est accompagné obligatoirement d'une mention précisant que « la présence définitive de l'espèce *F. circinatum* sera confirmée par analyse de séquence de marqueur(s) phylogénétique(s) ». L'envoi des souches au laboratoire chargé de leur identification est indiqué sur le rapport d'analyse.



## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

### 10.1 Isolement mycologique

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation établi par le LNR sous la référence MIAM 016. Les critères de performances ont été sélectionnés et évalués selon les recommandations de la norme EPPO PM 7/98(1) pour les méthodes ayant recours à l'isolement en mycologie (EPPO, 2010).

Critère de performance	Résultats obtenus
Sensibilité analytique	1 fragment (implant) de tissu de pin contaminé par une forme biologiquement active de <i>F. circinatum</i> parmi 30 fragments (implants) mis en culture
Répétabilité	100% L'analyse répétée de tiges de pin artificiellement contaminées par <i>F. circinatum</i> a généré 100% de résultats identiques (suspicion de présence de <i>F. circinatum</i> )
Reproductibilité	100% L'analyse reproduite de tiges de pin artificiellement contaminées par <i>F. circinatum</i> a généré 100% de résultats identiques (suspicion de présence de <i>F. circinatum</i> )

### 10.2 Caractérisation morphologique

L'identification morphologique est une expertise basée sur l'utilisation d'une documentation de référence. Les critères d'identification de *Fusarium circinatum* et des espèces proches morphologiquement sont décrits dans les publications internationales relues par des pairs qui décrivent de nouvelles espèces (Nirenberg et al. 1998, Herron et al. 2015) et les clés d'identification de *Fusarium* spp. (Nelson et al. 1983, Leslie et al. 2006).



## Annexe 1 : Composition des différents milieux de culture.

### Milieu DCPA (Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar)

(Andrews and Pitt 1986; loos et al. 2004).

Pour un litre de milieu :

- peptone bactériologique : 15.0±1.0 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.0±0.1 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : 0.5±0.1 g
- Chloramphénicol<sup>1</sup> : 2.0±0.1 ml d'une solution éthanolique\*
- dichloran<sup>2</sup> (2-6-dichloro-4-nitroaniline) en solution éthanolique\*\* : 1.0±0.1 ml
- crystal violet en solution aqueuse\*\*\* : 1.0±0.1 ml
- Agar : 15.0±1.0 g
- H<sub>2</sub>O distillée ou osmosée : 1000 ml

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

\*\* : 0.20±0.01 g de dichloran dans 100±2 ml d'éthanol.

\*\*\* : 0.05±0.01 g de crystal violet dans 100±2 ml d'eau distillée ou osmosée.

### Milieu SNA (Spezieller Nährstoffärmer Agar)

(Gerlach and Nirenberg 1982)

Pour un litre de milieu :

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.0±0.1 g
- KNO<sub>3</sub> : 1.0±0.1 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : 0.5±0.1 g
- KCl : 0.5±0.1 g
- Glucose : 0,20±0.05g
- Saccharose : 0,20±0.05 g
- Agar : 20±1 g
- H<sub>2</sub>O distillée ou osmosée : 1000 ml

### Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

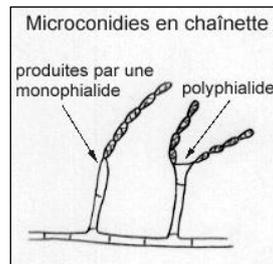
Pour un litre de milieu :

- PDA en poudre prêt à l'emploi : selon indication du fabricant
- H<sub>2</sub>O distillée ou osmosée : 1000 ml

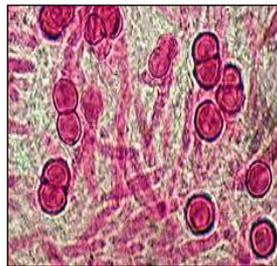


## Annexe 2 : Glossaire mycologique

**Chaînette** (microconidies en -) : se dit du regroupement en chaîne de microconidies (conidies les unes sous les autres) produites de façon basifuge par une phialide et provenant d'une même pore.

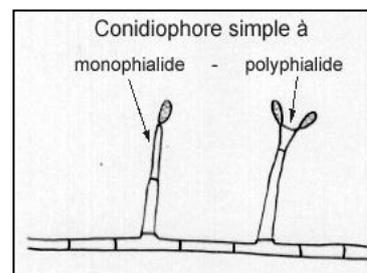
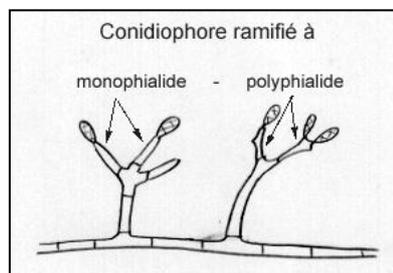


**Chlamydo-spore** : forme de repos, de résistance, très fréquente chez les champignons, constituée de portions d'hyphes où le cytoplasme s'est condensé et généralement entouré d'une paroi épaisse et mélanisée.



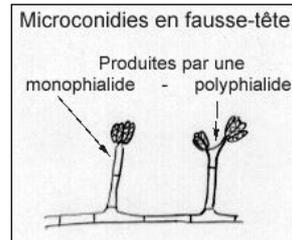
Chlamydo-spores à surface rugueuse de *F. equiseti*

**Conidiophore** : structure, simple ou ramifiée, située entre l'hyphes végétative et les conidies, formée par la (les) cellule(s)-mère(s) (phialides), l'hyphes fertile et ses ramifications éventuelles.





**Fausse tête** (microconidies en -) : se dit du regroupement en amas de microconidies produites par une phialide et provenant d'un même pore. Les microconidies en fausse tête peuvent ou non être incluses dans une gouttelette.

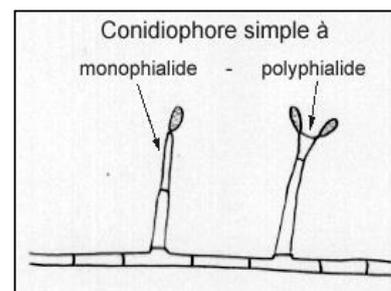
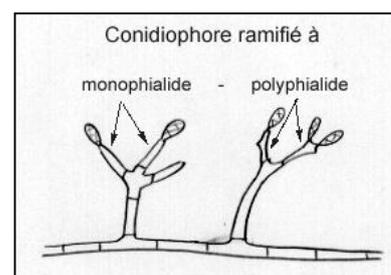
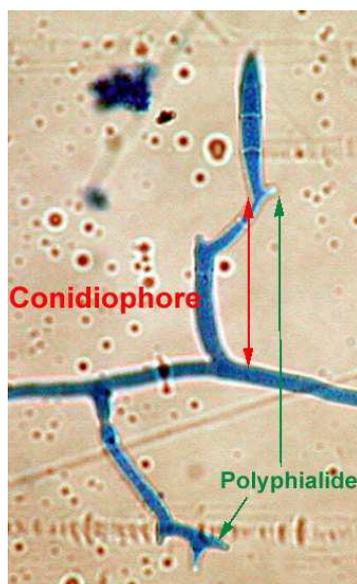


**Microconidie** : dans le cas où deux formes conidiennes coexistent chez un deutéromycète, les conidies les plus petites sont les microconidies. Certains auteurs donnent le nom de microconidies aux conidies produites dans le mycélium aérien, quelles que soient leur taille et leur cloisonnement.

**Phialide** : cellule-mère produisant des conidies de façon entéroblastique (par bourgeonnement avec continuité entre la couche interne de la cellule-mère et la paroi conidienne) sans allongement lors des conidiogénèses successives. On distingue :

**Monophialide** : phialide ne présentant qu'un unique pore par lequel est produite la ou les conidies

**Polyphialide** : phialide présentant plusieurs pores par lesquels sont produites une ou plusieurs conidies. A ne pas confondre avec un conidiophore ramifié à monophialide. Polyphialides sur conidiophore simple



Crédits tous dessins et photographies : R. IOOS (Anses-LSV, Malzéville, France)



### Annexe 3 : Principales caractéristiques morphologiques en cultures sur SNA des espèces de *Fusarium* rencontrés sur pin.

Espèces de <i>Fusarium</i>	Disposition des microconidies	Conidiogénese	Hyphes circonés stériles	Chlamydozoospores	Sources
<i>F. circinatum</i>	Uniquement en fausse tête	Monophialides et polyphialides	Présents	Absents	(1)
<i>F. subglutinans</i>	Uniquement en fausse tête	Monophialides et polyphialides	Absents	Absents	(1)
<i>F. verticillioides</i>	Chaînette et fausse tête	Uniquement monophialides	Absents	Absents	(1)
<i>F. oxysporum</i>	Uniquement en fausse tête sur un conidiophore très court (parfois invisible)	Uniquement courtes monophialides	Absents	Présents	(1)
<i>F. solani</i>	Uniquement en fausse tête sur un long conidiophore	Uniquement monophialides, souvent assez longues	Absents	Présents	(1)
<i>F. pseudocircinatum</i>	Fausse tête et courte chaînette	Monophialides et occasionnellement polyphialides	Présents	Absents	(1)
<i>F. fracticaudum</i>	Uniquement en fausse tête	Monophialides et polyphialides	Absents	Absents	(2)
<i>F. marasasianum</i>	Uniquement en fausse tête	Monophialides et polyphialides	Présents	Absents	(2)
<i>F. parvisorum</i>	Uniquement en fausse tête	Monophialides et polyphialides	Présents	Absents	(2)
<i>F. pininemorale</i>	Uniquement en fausse tête	Monophialides et polyphialides	Absents	Absents	(2)
<i>F. sororula</i>	Uniquement en fausse tête	Monophialides et polyphialides	Absents	Absents	(2)

(1) D'après Leslie et Summerell (2006),

(2) D'après Herron et al (2015)



## Bibliographie

Andrews S, Pitt JI, 1986. Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *Applied And Environmental Microbiology* 51, 1235-1238.

Britz H, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO, 2002. Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Sydowia* 54, 9-22.

EPPO. 2009. PM 7/91(1): *Gibberella circinata* OEPP/EPPO Bulletin 39, 298-309.

EPPO, 2010. PM 7/98(1): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* 40, 5-22.

Geiser DM, 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 473-479.

Gerlach W, Nirenberg HI, 1982. The genus *Fusarium* -- a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 209, 406.

Herron, D.A., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D., Rodas, C.A., Marincowitz, S. & Steenkamp, E.T. 2015. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology*, 80: 131-150.

IPPC, 2017. International Standard for Phytosanitary Measures n° 27. Diagnostic Protocols n°22 : *Fusarium circinatum*.

Ioos R, Belhadj A, Menez M, 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* 158, 351-362.

Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames, IA, Blackwell, Publishing. xii + 388 pp.

Nelson P. E., Toussoun T. A., and Marasas W.F.O., 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press.



Nirenberg HI, O'Donnell K, 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 434-458.

Pérez-Sierra A, Landeras E, León M, Berbegal M, García-Jiménez J, Armengol J, 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research* 111, 832-839.