



Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA080 - Consultation

Identification des souches tropicales de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc TR4) par la détermination du groupe de compatibilité végétative (VCG)

Laboratoire de la santé des végétaux

Laboratoire national de référence « Autres champignons sur toutes matrices sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023 »

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.

ANSES/FGE/0139 [version e]
plan de classement PR3/ANSES/7

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
v1			Version initiale

* La version 1 a fait l'objet d'une consultation du XX au XX sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.

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 sauf exceptions mentionnées dans l'arrêté du 30 mars 2023 »

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

Contact : 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 décrite par PUHALLA (1985) et CORRELL et al. (1987).

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction.....	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	Erreurs ! Signet non défini.
3. Termes, sigles et définitions.....	8
4. Principe de la méthode.....	9
5. Réactifs.....	11
5.1 Eau.....	11
5.2 Milieux de culture.....	11
5.3 Autres consommables à usage unique	12
5.4 Contrôles et témoins.....	12
6. Appareillage et matériels.....	13
7. Échantillons	13
8. Mode opératoire.....	13
8.1 Obtention de souches de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> monosporées.....	13
8.2 Obtention des souches nitrate sensibles (<i>Nit</i>)	15
8.3 Détermination du phénotype de la souche mutante.	17
8.4 Détermination du VCG par confrontation avec les testeurs de référence	19
9. Résultats	20
9.1 Contrôle de la validité des résultats	20
9.2 Interprétation et expression des résultats.....	20
Annexe 1 : Composition des différents milieux de culture pour isolement des <i>Fusarium</i>....	21
Annexe 2 : Composition des différents milieux de culture pour l'obtention des mutants <i>Nit</i> et la détermination du VCG	23
Bibliographie.....	26

Supprimé: 8

Table des figures

FIGURE N°1 : CHAINE D'ASSIMILATION DES NITRATES	9
FIGURE N°2 : HETEROCARYON	9
FIGURE N°3 : PRINCIPE DE LA METHODE	10
FIGURE N°4 : ASPECT SUR PDA DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	14
FIGURE N°5 : MICROCONIDIES EN FAUSSES TETES DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	14
FIGURE N°6 : CHLAMYDOSPORES DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	14
FIGURE N°7 : SOUCHE CHLORATE SENSIBLE SUR MILIEU CHLORATE	16
FIGURE N°8 : SOUCHE CHLORATE RESISTANTE SUR MILIEU CHLORATE	16
FIGURE N°9 : SOUCHE NITRATE TOLERANTE SUR MILIEU NITRATE (SOUCHE SAUVAGE)	17
FIGURE N°10 : SOUCHE NITRATE SENSIBLE SUR MILIEU NITRATE (SOUCHE <i>NIT</i>)	17
FIGURE N°11 : PHENOTYPE DES SOUCHES MUTANTES	18
FIGURE N°12 : COMPLEMENTATION ET FORMATION D'HETEROCARYON ENTRE MUTANTS <i>NIT</i>	18

Table des tableaux

TABLEAU N°1 : PHENOTYPE DES SOUCHES MUTANTES	18
TABLEAU N°2 : VCG DES RACES DE <i>F. OXYSPORUM</i> F. SP. <i>CUBENSE</i>	<u>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI</u>

Supprimé: 19

Introduction

Le champignon pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) cause une maladie létale du bananier appelée 'maladie de Panama' ou 'Jaunisse Fusarienne'. Le champignon comprend plusieurs races, pouvant infecter différents cultivars de bananier, mais ce sont les souches de la race tropicale 4 (Foc TR4) qui constituent la principale menace à la production de bananes dans le monde (AGUAYO et al. 2017; DITA et al. 2010; ORDONEZ et al. 2015). Les souches de Foc TR4 sont pathogènes sur plusieurs variétés de bananier dans des conditions climatiques subtropicales et tropicales. Foc TR4 est notamment pathogène sur des cultivars de la variété Cavendish, variété la plus cultivée dans le monde. Les souches de Foc TR4 appartiennent à un groupe de compatibilité végétative (VCG), le VCG 01213/16, mais il a été aussi observé que des souches du VCG 0121, associé à Foc Str4 (Foc subtropical race 4), peuvent aussi être pathogènes sur la variété Cavendish en conditions tropicales (AGUAYO et al. 2017; CARVALHAIS et al. 2019; FRASER-SMITH et al. 2014).

La méthode de détection des souches tropicales de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc TR4) par PCR en temps réel (ANSES/LSV/MA055) est utilisée dans un objectif de criblage des échantillons, et ne permet pas d'affirmer avec certitude la présence de Foc TR4 car elle détecte sans discrimination les VCG 01213/16 et VCG0121.

Il est impératif de confirmer l'identification de Foc TR4 en caractérisant la souche préalablement isolée en culture pure par la détermination de son Groupe de Compatibilité Végétative (VCG).

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 doit être en accord avec la réglementation en vigueur dans la région où se situe le laboratoire d'analyse.

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 déterminer le Groupe de Compatibilité Végétative (VCG) d'une souche en culture pure de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtenue par isolement à partir des faisceaux vasculaires préalablement séchés.

2. 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, etc.).

3. Principe de la méthode

La méthode repose sur la capacité des hyphes de deux souches distinctes d'un même groupe de compatibilité végétative à former des anastomoses et à développer des hétérocaryons.

Pour mettre en évidence la compatibilité végétative, il est nécessaire de produire et d'utiliser des souches mutantes *Nit* de la souche à identifier, qui sont incapables d'utiliser le nitrate comme source d'azote.

Les souches résistantes au chlorate (ClO_3) présentent, le plus souvent, une mutation au niveau de la chaîne d'assimilation des nitrates (Figure n°1). Trois phénotypes *Nit* (*Nit M*, *Nit 1* et *Nit 3*) peuvent être obtenus sur un milieu mutagène contenant du chlorate. Ces phénotypes présentent des mutations à trois niveaux différents de la chaîne d'assimilation des nitrates.

Figure n°1 : chaîne d'assimilation des nitrates

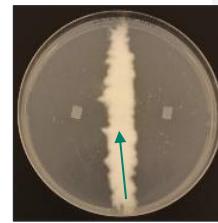
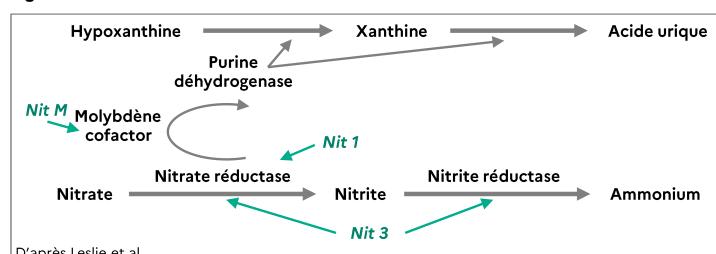


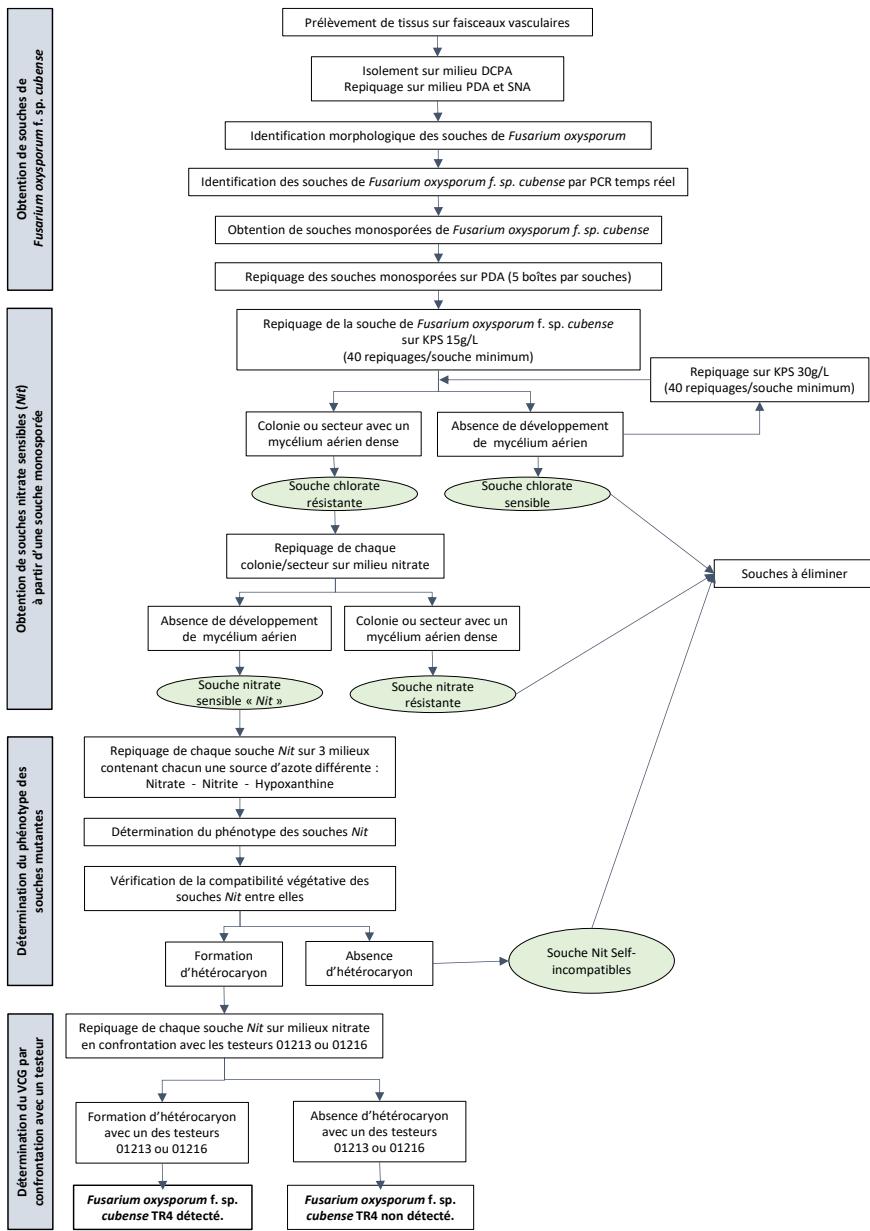
Figure n°2 :
Hétérocaryon se
présentant sous la forme
d'un mycélium aérien

(Photos : ANSES- LSV- Unité
de Mycologie)

La méthode de détermination du groupe de compatibilité végétative consiste à confronter sur milieu de culture les souches mutantes obtenues à des testeurs de référence (*NitM*, *Nit1* ou *Nit3*) spécifiques à *Fusarium oxyporum* f. sp. *cubense* TR4, c'est-à-dire du VCG 01213/16. Si les souches mutantes et les testeurs appartiennent au même groupe de VCG, il y aura une complémentation physiologique, l'assimilation du nitrate, et le développement d'hétérocaryons (Figure n°2).

La durée du test varie entre 20 et 35 jours selon la rapidité d'obtention des souches *Nit*.

Figure n°3 : Principe de la méthode



10 / 26

Supprimé: 268

4. 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.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination biologique, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant influer sur le résultat.

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.

5.2 Milieux 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

Water Agar à 1% (WA): cf annexe 1

Mis en forme : Anglais (États-Unis)

Milieu K.P.S. : cf annexe 2

Milieu nitrate : cf annexe 2

Milieu nitrite : cf annexe 2

Milieu hypoxanthine : cf annexe 2

5.3 Autres consommables à usage unique

Préparation des milieux de culture

- Microcônes / Cônes de micropipette stériles de volume adapté.
- Boîtes de Petri stériles.

Isolement

- Ethanol 70%

Identification morphologique

- Solution bleu coton ou fuchsine acide. Ces colorants dilués dans de l'acide lactique sont utilisés pour l'observation microscopique des structures fongiques.
- Manches et lames de scalpels.
- Lame porte objet pour microscopie.
- Lamelles couvre objets pour microscopie.
- Rouleau de bande adhésive transparente.

5.4 Contrôles et témoins

Validation des milieux de culture

Des souches de références sont utilisées pour valider les différents milieux de culture KPS, Nitrate, Nitrite et Hypoxanthine.

- souches naturelles (sauvages) de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* TR4.
- souches mutantes *Nit* 1, *Nit* 3 et *Nit* M de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* R1, R2, StR4 ou TR4.

Témoin positif

Une souche de référence de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* de VCG 01213 ou 01216 est testée en parallèle de chaque série de confrontation avec les testeurs de référence.

Témoin négatif

Une souche de référence de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* de VCG 0120, 0121, 0126, 0129 ou 01215 est testée en parallèle de chaque série de confrontation avec les testeurs de référence.

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.

Les considérations d'ordre métrologique à appliquer sont celles de la MOA 022 ou de la norme ISO 8655 (versions en vigueur).

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 (PSM) 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°C ±3°C.
- Microscope optique équipé au minimum des objectifs x10, x20, et x40

7. Échantillons

Les conditions de prélèvement, de préparation, d'envoi et de conservation des échantillons sont décrites dans la méthode ANSES/LSV/MA055.

8. Mode opératoire

8.1 Obtention de souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* monosporées

8.1.1 Obtention de souches de *Fusarium oxysporum*

Isolement sur milieu semi-sélectif

L'isolation est réalisée à partir des reliquats de faisceaux vasculaires conservés à température ambiante.

Les faisceaux sont désinfectés à l'éthanol à 70% et séchés sous le PSM jusqu'à élimination de toute trace d'humidité.

Les faisceaux sont découpés en 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°C ±3°C.

Supprimé: 267

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

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 >2mm / jour et mycélium aérien abondant). Les autres genres de champignons peuvent croître mais vont présenter une vitesse de croissance radiale relativement faible (<2 mm / jour) et/ou un mycélium aérien très peu abondant voire inexistant.

Les colonies sont transférées sur PDA et SNA et incubées pendant 5 à 10 jours à 22°C ±3°C.

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

Identification des souches de *Fusarium oxysporum*

L'identification de *Fusarium oxysporum* repose sur l'observation de l'ensemble des caractéristiques décrites par la littérature scientifique (Nelson et al. 1983 ; Leslie and Summerell. 2006). L'identification morphologique ne permet pas d'identifier les formes spéciales.

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

- Mycélium floconneux, blanc à violet pâle (Figure n°4)
- Production de pigment violet foncé ou magenta foncé dans l'agar (Figure n°4)

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

- Microconidies agrégées uniquement en fausse tête (Figure n°5),
- Conidiophores très courts, parfois invisibles, monophialides (Figure n°5)
- Microconidies ovales ou réniformes, non septées. Abondantes dans le mycélium aérien.
- Chlamydospores présents, solitaires ou par paires. (Figure n°6)

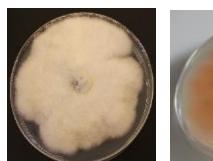


Figure n°4 : Aspect sur PDA de *Fusarium oxysporum*

(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)

Figure n°5 :
Microconidies en
fausses têtes de
Fusarium oxysporum



Figure n°6 :
Chlamydospores de
Fusarium
oxysporum

14 / 26 Supprimé : 268

8.1.2 Détection des souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

La caractérisation morphologique ne permet pas d'identifier les formes spéciales et les races de *Fusarium*. La détection de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* parmi les isolats purifiés est réalisée selon la méthode ANSES/LSV/MA055 « Détection des souches tropicales de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc TR4) par PCR en temps réel ».

8.1.3 Obtention de souches monosporées.

L'obtention de souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* monosporées est réalisée à partir d'une culture sur SNA :

- Déposer un explant de la culture dans un tube contenant 10 ml d'eau osmosée stérile.
- Agiter
- Vérifier la concentration en macroconidies au microscope. En l'absence de macroconidies il est possible d'utiliser les microconidies.
- Réaliser une gamme de dilution pour obtenir une concentration de 1 à 5 spores (macro ou microconidies) par goutte observée au microscope
- Déposer 1 mL sur WA et étaler jusqu'à disparition du liquide.
- Incuber 24h à 22°C ±3°C
- Après observation à la loupe binoculaire, prélever individuellement les conidies germées et les repiquer sur PDA (une boîte par conidie, qui représentera une souche monosporée)

Supprimé: SNA

8.2 Obtention des souches nitrate sensibles (*Nit*)

- Repiquer les souches monosporées sur PDA : (environ 5 boîtes par souche).
- Incubation de 3 à 5 jours à 22°C ±3°C

➤ Les étapes suivantes sont à réaliser pour chaque souche monosporée.

8.2.1 Obtention de souches chlorate résistantes.

Les souches de phénotype *Nit*, résistante au chlorate, sont obtenues sur un milieu mutagène contenant du chlorate

- Repiquer chaque souche de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sur milieu Chlorate (KPS).
- 40 repiquages minimum par souche (à partir des 5 boîtes produites au § 8.2)
- Incubation de 5 à 15 jours à 25°C ±3°C

Cas 1 : Absence de développement de mycélium aérien sur milieu chlorate (Figure n°7)

Aucune mutation n'a été obtenue.

La souche est « chlorate sensible ».

Recommencer l'étape de production de souches chlorate résistantes en augmentant la concentration en KClO_3 (30g.L^{-1}) dans le milieu de culture.

Cas 2 : Développement de mycélium aérien dense. Croissance en colonie ou en secteur (Figure n°8)

Le développement de mycélium aérien indique qu'une mutation a eu lieu.

Ces nouvelles souches sont « chlorate résistantes ».

Chaque colonie, chaque secteur est repiqué sur un milieu nitrate.



Figure n°7 : Souche chlorate sensible sur milieu chlorate

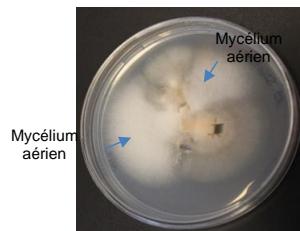


Figure n°8 : Souche chlorate résistante sur milieu chlorate
(Souches identifiées par une flèche bleue)

(Photos : ANSES - LSV- Unité de Mycologie)

8.2.2 Sélection des souches *Nit*.

- Repiquer les souches « chlorate résistantes » sur le milieu nitrate
- Incubation 3 à 7 jours à $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$

Cas 1 : Développement de mycélium aérien (Figure n°9)

La culture présente un mycélium aérien développé, la souche obtenue est de type « sauvage ».

Elle ne présente pas de mutation au niveau de la chaîne d'assimilation des nitrates.

Cas 2 : Absence de mycélium aérien (Figure n°10)

La culture présente une croissance rasante, la souche obtenue est une souche mutante *Nit*.

Elle présente une mutation au niveau de la chaîne d'assimilation des nitrates.

Il est nécessaire d'obtenir plusieurs mutants de ce type car les mutations ne sont pas toujours stables et certains mutants ont une croissance aérienne peu développée.

Remarques :

Il est possible de perdre une mutation stable en cas de repiquage régulier. Il est conseillé de conserver les souches mutantes au congélateur sous formes d'explants de gélose contenus dans du glycérol à 15%.

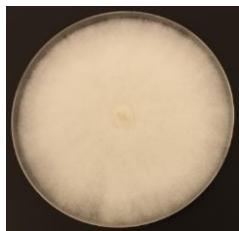


Figure n°9 : Souche nitrate tolérante sur milieu nitrate (Souche sauvage)

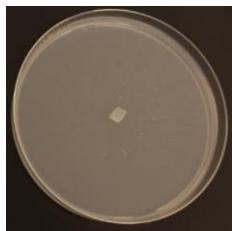


Figure n°10 : Souche nitrate sensible sur milieu nitrate (Souche Nit)

(Photos : ANSES - LSV - Unité de Mycologie)

8.3 Détermination du phénotype de la souche mutante.

➤ Les étapes suivantes sont à réaliser pour chaque souche *Nit* obtenue

8.3.1 Identification des phénotypes

Les souches *Nit* sont repiquées sur 3 milieux contenant chacun une source d'azote différente.

- Repiquer les souches mutantes *Nit* sur les milieux Nitrate, Nitrite et Hypoxanthine.
- Incubation 3 à 7 jours à 25°C ±3°C

Sur chacun des milieux, la croissance des souches *Nit* peut être rasante (notée -) ou aérienne (notée +). Le phénotype de chaque souche mutante est défini selon le tableau ci-après.

Tableau n°1 : Phénotype des souches mutantes

Phénotype du mutant	Croissance aérienne sur différentes sources d'azote		
	Nitrate	Nitrite	Hypoxanthine
<i>Nit 1</i>	-	+	+
<i>Nit 3</i>	-	-	+
<i>Nit M</i>	-	+	-

(Correl et al, 1987)

Les mutants *Nit 1* sont les plus faciles à obtenir et les mutants *Nit M* les plus difficiles à obtenir.


 Souche de gauche : *Nit 3* Souche de droite : *Nit 1*

Figure n°11 : Phénotype des souches mutantes

(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)

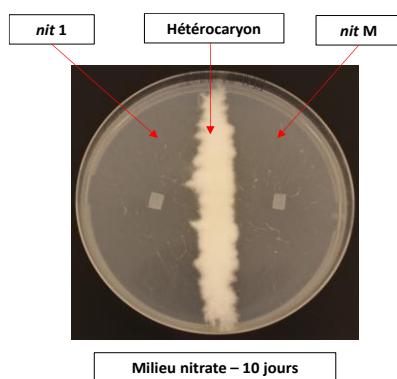
8.3.2 Confrontation des mutants entre eux.

La dernière étape de l'obtention des souches mutantes consiste à vérifier qu'elles ne sont pas « self-incompatibles ». Pour cela on confronte entre eux les mutants *Nit* obtenus à partir d'une même souche initiale de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Confrontation sur milieu nitrate des mutants *Nit 1* avec les mutants *Nit M* ou *Nit 3*

- Repiquer les souches mutantes *Nit* sur le milieu Nitrate.
- Incubation 3 à 7 jours à 25°C ±3°C

Les mutants *Nit* ont une croissance rase. S'ils se complémentent, ils forment un hétérocaryon à croissance aérienne dans la zone de confrontation.


 Figure n°12 : Complémentation et formation d'hétérocaryon entre mutants *Nit*

(Photos : ANSES- LSV- Unité de Mycologie)

8.4 Détermination du VCG par confrontation avec les testeurs de référence

A chaque race de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* correspondent des groupes de compatibilité végétative spécifiques.

Tableau n°2 : VCG des races de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

Races	VCG
TR4	01213/16
STR4	0120, 0121, 0122, 0129, 01211
R1 et R2	Tous sauf 01213/16

Chaque souche *Nit 1* ou *Nit 3* ayant formé un hétérocaryon est confronté avec un testeur *Nit M* de référence pour le VCG 01213/16.

Chaque souche *Nit M* ayant formé un hétérocaryon est confronté avec un testeur *Nit 1* ou *Nit 3* de référence pour le VCG 01213/16.

- Repiquer les souches *Nit* à tester et les souches de référence sur le milieu Nitrate. Les souches à tester *Nit 1* et *Nit 3* doivent être confrontées à une souche de référence *Nit M* du VCG 01213 et une souche de référence *Nit M* du VCG 01216. Les souches à tester *Nit M* doivent être confrontées à une souche de référence *Nit 1* du VCG 01213 ou *Nit 3* du VCG 01213 et une souche de référence *Nit 1* du VCG 01216 ou *Nit 3* du VCG 01216. La souche de référence est déposée au centre de la boîte de Petri et les souches à tester réparties autour (1 à 4 souches à tester par boîte de Petri)
- Incubation 3 à 7 jours à 25°C ±3°C

Deux témoins positifs (*Nit 1* et *Nit M*) et deux témoins négatifs (*Nit 1* et *Nit M*) sont testés pour chaque série de test.

Observation pour chacune des souches *Nit* testées de la présence ou de l'absence de croissance aérienne dans la zone de confrontation.

Remarque

Afin de diminuer la durée du test, les étapes de « Confrontation des mutants entre eux » (§ 8.3.2) et de « Détermination du VCG par confrontation avec les testeurs de référence » (§ 8.4) peuvent être réalisées simultanément.

9. Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

L'analyse est considérée comme validée si :

- Un hétérocaryon se développe dans la zone de confrontation entre les témoins positifs et le testeur
- Aucun hétérocaryon ne se développe dans la zone de confrontation entre les témoins négatifs et le testeur.

9.2 Interprétation et expression des résultats

Si la souche *Nit 1* à tester complémentaire avec la souche *Nit M* du VCG 01213 ou avec la souche *Nit M* du VCG 01216 de référence et forme un hétérocaryon à croissance aérienne plus ou moins dense dans la zone de confrontation, la souche à tester *Nit 1* et la souche de référence *Nit M* appartiennent au même VCG 01213/16.

=> L'identification de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 est confirmée.

Si la souche *Nit 3* à tester complémentaire avec la souche *Nit M* du VCG 01213 ou avec la souche *Nit M* du VCG 01216 de référence et forme un hétérocaryon à croissance aérienne plus ou moins dense dans la zone de confrontation, la souche à tester *Nit 3* et la souche de référence *Nit M* appartiennent au même VCG 01213/16.

=> L'identification de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 est confirmée.

Si la souche *Nit M* à tester complémentaire avec la souche *Nit 1* du VCG 01213 ou avec la souche *Nit 1* du VCG 01216 ou avec la souche *Nit 3* du VCG 01213 ou avec la souche *Nit 3* du VCG 01216 de référence et forme un hétérocaryon à croissance aérienne plus ou moins dense dans la zone de confrontation, la souche à tester *Nit 3* et la souche de référence *Nit M* appartiennent au même VCG 01213/16.

=> L'identification de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 est confirmée.

Annexe 1 : Composition des différents milieux de culture pour isolement des *Fusarium*

Milieu DCPA (Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar) adapté

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

Pour un litre de milieu :

- Peptone bactériologique : 15.0 g
- K_2HPO_4 : 1.0 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.5 g
- Chloramphénicol: 2.0 mL d'une solution éthanolique*
- Dichloran (2-6-dichloro-4-nitroaniline) en solution éthanolique** : 1.0 mL
- Crystal violet en solution aqueuse*** : 1.0 mL
- Agar : 15.0 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000 mL

* : 10.0 g de chloramphenicol dans 100 mL d'éthanol pur.

** : 0.20 g de dichloran dans 100 mL d'éthanol.

*** : 0.05 g de crystal violet dans 100 mL d'eau distillée ou osmosée.

Stérilisation :

Autoclaver 20 min à 122°C

Milieu SNA (Spezieller Nährstoffärmer Agar)

(Gerlach and Nirenberg 1982)

Pour un litre de milieu :

- K_2HPO_4 : 1.0 g
- KNO_3 : 1.0 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.5 g
- KCl : 0.5 g
- Glucose : 0,20 g
- Saccharose : 0,20 g
- Agar : 20 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000 mL

Stérilisation : Autoclaver 20 min à 122°C

21 /26

Supprimé: 267

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pour un litre de milieu :

- PDA en poudre prêt à l'emploi : selon indication du fabricant
- H₂O distillée ou osmosée : 1000 mL

Stérilisation : Autoclaver 20 min à 122°C

Milieu Water Agar à 1%

Supprimé: 1

Pour un litre de milieu :

- Agar : 10 g
- H₂O distillée ou osmosée : 1000 mL

Stérilisation : Autoclaver 20 min à 122°C

Annexe 2 : Composition des différents milieux de culture pour l'obtention des mutants *Nit* et la détermination du VCG

Milieu de culture KPS (15g/L)

(Puhalla, J.E., 1985)

Pour 1 litre de milieu :

Eau distillée ou osmosée : 1000 mL

KClO₃ : 15 g

PDA : 39 g

Stérilisation : Autoclaver 15 min à 120°C

Milieu de culture KPS (30g/L)

(D'après Puhalla, J.E., 1985)

Pour 1 litre de milieu :

Eau distillée ou osmosée : 1000 mL

KClO₃ : 30 g

PDA : 39 g

Stérilisation : Autoclaver 15 min à 120°C

Milieu de culture Nitrate

(Puhalla, J.E., 1985)

Pour 1 litre de milieu :

Eau distillée ou osmosée : 1000 mL

NaNO₃ : 2 g

KH₂PO₄ : 1 g

MgSO₄. 7H₂O : 0,5 g

KCl : 0,5 g

Saccharose : 30 g

Agar bactériologique Oxoid (*) : 20 g

Solution d'oligo-éléments : 2 ml

(*) Utiliser de la gélose Oxoid qui ne contient pas de source d'azote (e.g. Oxoid LP0011)

Stérilisation : Autoclaver 45 min à 110°C

Attention : Le milieu de culture Nitrate se conserve 1 mois maximum à 5°±3°C

Supprimé: 267

Milieu de culture Nitrite

(Correll J.C. et al, 1987)

Pour 1 litre de milieu :

Eau distillée ou osmosée :	1000 mL
NaNO ₂ :	0,5 g
KH ₂ PO ₄ :	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O :	0,5 g
KCl :	0,5 g
Saccharose :	30 g
Agar bactériologique Oxoid (*) :	20 g
Solution d'oligo-éléments :	2 mL

(*) Utiliser de la gélose Oxoid qui ne contient pas de source d'azote (e.g. Oxoid LP0011).

Stérilisation : Autoclaver 45 min à 110°C

Attention : Le milieu de culture Nitrite se conserve 1 mois maximum à 5°±3°C

Milieu de culture Hypoxanthine

(Correll J.C. et al, 1987)

Pour 1 litre de milieu :

Eau distillée ou osmosée :	1000 mL
Hypoxanthine :	0,2 g
KH ₂ PO ₄ :	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O :	0,5 g
KCL :	0,5 g
Saccharose :	30 g
Agar bactériologique Oxoid (*) :	20 g
Solution d'oligo-éléments :	2 mL

(*) Utiliser de la gélose Oxoid qui ne contient pas de source d'azote (e.g. Oxoid LP0011).

Stérilisation : Autoclaver 45 mn à 110°C

Attention : Le milieu de culture Hypoxanthine se conserve 1 mois maximum à 5°±3°C

Solution d'oligo-éléments

Puhalla, J.E., 1985

Ne préparer que 100 mL de solution. Solution à préparer 1 à 2 jours maximum avant la préparation des milieux. Conservé à l'abri de la lumière.

100 mL de solution 1 litre de solution

Acide citrique :	0,5 g	5 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5 g	5 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,475 g	4,75 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ; 6 H ₂ O	0,1 g	1 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025 g	0,25 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,005 g	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,005 g	0,05 g
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O	0,005 g	0,05 g

Eau distillée ou osmosée : Qsp 100 mL Qsp 1000 mL

(*) L'acide citrique doit d'abord être ajouté à l'eau et dissous complètement pour empêcher la précipitation d'autres sels

Stérilisation : Par filtration 0,2 µm ou autoclaver 20 min à 120°C

Bibliographie

- AGUAYO, J.; D. MOSTERT; C. FOURRIER-JEANDEL; I. CERF-WENDLING; B. HOSTACHY; A. VILJOEN; R. IOOS, 2017: Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *PLoS one*, 12, e0171767
- ANDREWS S, PITT JI, 1986. Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *Applied And Environmental Microbiology* 51, 1235-1238.
- CARVALHAIS, L. C.; J. HENDERSON; V. A. RINCON-FLOREZ; C. O'DWYER; E. CZISLOWSKI; E. A. B. AITKEN; A. DRENTH, 2019: Molecular Diagnostics of Banana Fusarium Wilt Targeting Secreted-in-Xylem Genes. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- CORRELL J.C., KLITTICH C.J.R. & LESLIE J.F. (1987) Nitrate non utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77, 1640-1646.
- DITA, M. A.; C. WAALWIJK; I. W. BUDDENHAGEN; M. T. SOUZA JR; G. H. J. KEMA, 2010: A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology*, 59, 348-357.
- FRASER-SMITH, S.; E. CZISLOWSKI; R. A. MELDRUM; M. ZANDER; W. O'NEILL; G. R. BALALI; E. A. B. AITKEN, 2014: Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Pathology*, 63, 1044-1052.
- LESLIE J.F., SUMMERELL B.A. 2006 *The Fusarium laboratory manual*. 1st edition. Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- NELSON PE, TOUSSOUN TA, MARASAS WFO, editors. 1983 *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. University Park: Pennsylvania State University Press.
- ORDONEZ, N.; M. F. SEIDL; C. WAALWIJK; A. DRENTH; A. KILIAN; B. P. H. J. THOMMA; R. C. PLOETZ; G. H. J. KEMA, 2015: Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease—When Plant and Pathogen Clones Meet. *PLoS pathogens*, 11, e1005197.
- PUHALLA, J.E., 1985: Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Ca. J. Bot.* 63:179-183