

LNPV

Laboratoire
National de la
Protection des
Végétaux

Végétal : *Triticum aestivum*,
Triticum durum, *Hordeum vulgare*,
Avena sativa, *Secale cereale*, x
tritico-secale spp., *Panicum*
miliaceum, *Sorghum vulgare*, *Zea*
mays)

Détection et identification des
espèces de *Fusarium* spp. et
Microdochium nivale sur grains de
céréales par isolement mycologique
semi sélectif et étude
microbiologique.

Réf. : MH/03/16 version a

Laboratoire de référence :

LNPV Unité de Mycologie Agricole et
Forestière
Domaine de Pixérécourt – BP 90059
54220 MALZEVILLE

VÉGÉTAL (*TRITICUM AESTIVUM*, *TRITICUM DURUM*, *HORDEUM VULGARE*, *AVENA SATIVA*, *SECALE CEREALE*, X *TRITICOSECALE SPP.*, *PANICUM MILIACEUM*, *SORGHUM VULGARE*, *ZEА MAYS*)

DETECTION ET IDENTIFICATION DES ESPECES DE *FUSARIUM SPP.* ET *MICRODOCHIUM NIVALE* SUR GRAINS DE CEREALES PAR ISOLEMENT MYCOLOGIQUE SEMI SELECTIF ET ETUDE MICROBIOLOGIQUE

SOMMAIRE

0. Introduction	4
1. Objet	4
2. Domaine d'application	5
3. Principe	5
4. Appareillage	5
5. Réactifs et produits	5
6. Consommables	6
7. Echantillonnage et échantillons	6
7.1. Définitions :	6
7.2. Echantillonnage :	6
7.3. Conservation et acheminement des échantillons :	6
7.4. Prise d'essai	6
7.4.1. Cas de l'analyse de grains de blé, d'orge, de seigle, d'avoine, de triticale, de sorgho	7
7.4.2. Cas de l'analyse de grains de maïs	7
8. Mode opératoire	7
8.1. Stérilisation de la surface des grains	7
8.2. Incubation des grains	7
8.2.1. Incubation des grains pour la recherche des <i>Fusarium spp.</i>	7
8.2.2. Incubation des grains pour la recherche de <i>Microdochium nivale</i>	8
8.3. Lecture des boîtes d'isolement (milieux DCPA et PDA)	8
8.3.1. Lecture des boîtes DCPA – recherche des <i>Fusarium spp.</i>	8
8.3.2. Lecture des boîtes de PDA- recherche de <i>Microdochium nivale</i>	9
8.4. Détermination de l'espèce des isolats repiqués sur milieux d'étude (SNA et PDA)	10
8.4.1. Mode opératoire des observations sur le milieu SNA	10
8.4.1.1. Observations du prélèvement de mycélium aérien	11
8.4.1.2. Observations des macroconidies produites en sporodochium	11
8.4.3. Exploitation des observations	12
8.5. Expression des résultats	12
8.5.1. Pourcentage de grains infectés par <i>Microdochium nivale</i>	12
8.5.2. Pourcentage de grains infectés par chacune des espèces de <i>Fusarium sp.</i>	12
9. Désinfection et destruction des déchets d'analyse	12
10. Références bibliographiques	13

<i>Figure 1 : récapitulatif du protocole d'analyse de grains de céréales pour la détection de Fusarium spp. et Microdochium nivale</i>	15
<i>Figure 2 : protocole de prélèvements à réaliser pour l'observation de critères microscopiques de Fusarium sp. cultivé sur milieu SNA</i>	16
<i>Annexe 1 : Composition des différents milieux d'isolement et de culture</i>	17
<i>Annexe 2 : Glossaire :</i>	18
<i>Tableau 1 : prises de vues d'éléments caractéristiques de quelques espèces de Fusarium et Microdochium nivale isolés de grains de céréales.</i>	22
<i>Tableau 2 : descriptif des espèces de Fusarium spp. décrites sur céréales</i>	25

VEGETAL (*TRITICUM AESTIVUM*, *TRITICUM DURUM*, *HORDEUM VULGARE*, *AVENA SATIVA*, *SECALE CEREALE*, X *TRITICOSECALE SPP.*, *PANICUM MILIACEUM*, *SORGHUM VULGARE*, *ZEA MAYS*)

DETECTION ET IDENTIFICATION DES ESPECES DE *FUSARIUM SPP.* ET *MICRODOCHIUM NIVALE* SUR GRAINS DE CEREALES PAR ISOLEMENT MYCOLOGIQUE SEMI SELECTIF ET ETUDE MICROBIOLOGIQUE

0. Introduction

Les champignons du genre *Fusarium sp.* et *Microdochium nivale* (Samuel et Halett) sont des *Deuteromycetes* de la famille des *Tuberculariaceae*.

La gamme d'hôtes de ces champignons couvre l'ensemble des graminées sauvages et cultivées.

Cinq espèces de *Fusarium sp.* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. poae*, *F. avenaceum*) et deux variétés de *Microdochium nivale* (*Microdochium nivale* var *majus* et *Microdochium nivale* var *nivale*) sont décrits dans la littérature comme agent de fusariose des épis (Parry *et al.*, 1995) des céréales à petits grains.

Quatre espèces de *Fusarium sp.* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* et *F. graminearum*) sont décrites dans la littérature comme agents de fusariose de l'épi du maïs.

D'autres espèces peuvent être présentes sur grain de blé ou maïs mais ne sont pas décrites comme agents de fusariose de l'épi. Ils peuvent être des parasites secondaires, voire de simples saprophytes.

Enfin, chacune des espèces de *Fusarium sp.* possède un spectre mycotoxinogène qui lui est propre et qui ne dépend pas de la pathogénicité vis à vis des céréales.

1. Objet

L'objet de cette méthode est de détecter la présence et de déterminer la fréquence d'infection des *Fusarium spp.* et des deux variétés de *Microdochium nivale* dans un échantillon de grains de céréales. Dans le cas du maïs, seuls les *Fusarium spp.* seront recherchés, le *Microdochium nivale* n'étant pas décrit sur maïs dans la littérature.

Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter les différentes espèces *Fusarium spp.* et des deux variétés de *Microdochium nivale* dans la limite du seuil de détection de la technique employée. Elle peut être semi quantitative dans la mesure où elle permet de déterminer un pourcentage de grains infectés par chacune des espèces de *Fusarium sp.* ou des variétés de *Microdochium nivale*.

Les échantillons pour lesquels aucun *Fusarium sp.* ou *Microdochium nivale* n'est détecté sont considérés comme indemnes de *Fusarium sp.* ou *Microdochium nivale* ou sont soit infectés à une fréquence trop faible pour être mise en évidence par la technique utilisée ou encore infectés par des propagules de champignons recherchés non viables.

Les échantillons pour lesquels un ou plusieurs *Fusarium spp.* ou *Microdochium nivale* sont détectés sont considérés comme infectés à raison de x pourcent(s) de grains infectés par chacune des espèces ou variétés mises en évidence.

La méthode présentée est à employer pour les analyses officielles, notamment dans le cadre des expérimentations nationales et les mises au point de méthodes de lutte.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique sur des grains récoltés manuellement ou par battage mécanique de blé dur, blé tendre, orge, triticale, avoine, seigle, millet, sorgho et maïs.

3. Principe

Pour un échantillon de grains à analyser, un sous échantillon représentatif de grains est soumis à analyse pour la détection des *Fusarium sp.* et un autre sous échantillon représentatif de grains est soumis à analyse pour la détection des variétés de *Microdochium nivale*.

La méthode repose sur l'emploi de la technique de l'isolement mycologique sur milieu semi sélectif pour la détection des *Fusarium spp.* et sur isolement sur milieu gélosé et incubation au froid pour la détection du *Microdochium nivale*. Les isolats de *Fusarium sp.* sont ensuite transférés du milieu d'isolement vers deux milieux d'étude spécifiques. Après incubation, leurs caractéristiques macro- et micro-scopiques sont étudiées et permettent dans la majorité des cas d'aboutir à l'identification de l'espèce.

Les pourcentages de grains infectés par chacune des espèces de *Fusarium sp* et par chacune des variétés de *Microdochium nivale* peuvent être ainsi estimés.

4. Appareillage

Matériel :

- 4.1. Autoclave à pression de vapeur
- 4.2. Réfrigérateur ou chambre froide de température constante de 7°C (+-2°C)
- 4.3. Balance de précision (+- 10 mg) de portée adaptée (0.10 g à 100 g)
- 4.4. Micropipettes (gamme de 1000µl à 5000 µl)
- 4.5. Poste de Sécurité Microbiologique ou hotte à flux laminaire, de préférence horizontal
- 4.6. Enceinte climatique illuminée réfrigérée ou pièce à température contrôlée de 22°C (+- 3°C)
- 4.7. Source de lumière produisant des rayons ultraviolet proches (longueur d'onde autour de 370 nm)
- 4.8. Loupe binoculaire équipée d'une source de lumière froide (source de lumière par diascope fortement recommandée)
- 4.9. Microscope optique équipé au minimum des objectifs x20, x40 et x100 à immersion.

Verrerie

- 4.10. Flacons autoclavables en verre borosilicaté de 1000 ml.
- 4.11. Bêchers de 400 ml

5. Réactifs et produits

Les réactifs décrits ci dessous doivent être conservés et utilisés en suivant strictement les recommandations du fournisseur.

5.1. Eau osmosée :

Cette qualité d'eau est requise pour la fabrication des différents milieux de culture. Elle doit présenter une résistivité de 1 MOhm.cm à 25°C.

ou

5.2. Eau distillée

Cette qualité d'eau est requise pour la fabrication des différents milieux de culture.

5.3. Eau stérile

Cette eau ne doit pas avoir de qualité chimique particulière, l'eau du robinet peut tout à fait convenir. Elle doit impérativement être stérilisée par autoclavage.

5.4. Consommables entrant dans la composition des milieux de culture :

- Milieu Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar adapté (DCPA) : cf. annexe 1
- Milieu Synthetisher Nährstoffärmer Agar (SNA) : cf. annexe 1
- Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) : cf. annexe 1

5.5. Hypochlorite de Sodium [Au contact d'un acide dégage un gaz toxique. Provoque des brûlures. Après contact avec la peau se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau. En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). Ne pas mélanger avec des acides]

La solution mère doit titrer au maximum au 36°C.

La solution d'utilisation est une dilution de la solution mère à 1.5°C dans de l'eau du robinet et additionnée de Tween 20 (0.05% V/V). La solution diluée doit être préparée fraîchement avant chaque analyse, elle ne se conserve pas.

5.6. Alcool rectifié (type alcool à brûler) [Produit inflammable, à tenir éloigné des sources de chaleur et des flammes nues]

L'alcool est utilisé pour flamber les pinces, scalpels et pointes de prélèvements utilisés durant les différentes phases du protocole, afin de les stériliser.

5.7. Solution bleu coton ou acide fuchsine

Ces solutions sont utilisées pour l'observation microscopique des structures fongiques

6. Consommables

Consommables plastiques

6.1. Microcônes stériles 1000-5000 µl

6.2. Boîtes de pétri stériles

Autres consommables

6.3. Lames de scalpel stériles

6.4. Manches de scalpels

6.5. Lame porte objet pour microscopie

6.6. Lamelles couvre objets pour microscopie

6.7. Pointes de prélèvements

7. Echantillonnage et échantillons

7.1. Définitions :

L'unité d'analyse est le grain de céréale.

Un échantillon correspond à lot de grains de céréales reçu au laboratoire pour analyse.

7.2. Echantillonnage :

Le prélèvement de grains de céréales pour analyse devra s'effectuer de façon à être représentatif du lot global dont il est issu (parcelle, parcelle élémentaire, silo, etc.).

7.3. Conservation et acheminement des échantillons :

Afin de garantir une analyse traduisant au mieux l'état sanitaire des grains à la récolte, il est recommandé de suivre les recommandations suivantes :

- Après prélèvement sur le terrain, les échantillons seront conditionnés dans des sachets en papier. L'emploi du sac plastique est à proscrire. Ils doivent être conservés à 4°C (+-2°C) avant envoi au laboratoire. Ce dernier devra s'effectuer par un envoi postal garantissant la livraison du colis sous 48 h.
- Avant analyse, les échantillons reçus au laboratoire peuvent être conservés dans leur sachet papier jusqu'à 2 mois à une température de 4°C (+-2°C).

7.4. Prise d'essai

L'analyse d'un échantillon de grains reçu au laboratoire s'effectuera sur un sous échantillonnage représentatif correspondant à un volume approximatif de 50 ml (céréales autres que maïs) ou de 100 ml (maïs). Ces grains analysés seront prélevés aléatoirement dans l'échantillon reçu à l'aide d'une spatule creuse désinfectée à l'hypochlorite (1.5 °Cl) et en le mélangeant vigoureusement.

7.4.1. Cas de l'analyse de grains de blé, d'orge, de seigle, d'avoine, de triticale, de sorgho

Après leur désinfection de surface :

- Au minimum, 100 grains seront analysés pour la détection et l'identification des différentes espèces de *Fusarium* spp..
- Au minimum, 100 grains seront analysés pour la détection et l'identification des différentes variétés de *Microdochium nivale*.

Ces deux fois 100 grains minimum constitueront la prise d'essai.

7.4.2. Cas de l'analyse de grains de maïs

Après leur désinfection de surface :

- Au minimum, 100 grains seront analysés pour la détection et l'identification des différentes espèces de *Fusarium* spp..

Ce minimum de 100 grains constituera la prise d'essai.

8. Mode opératoire

Les manipulations décrites en §8.1. et §8.2. sont à réaliser exclusivement en atmosphère stérile (hotte à flux laminaire, Poste de Sécurité Microbiologique, etc.). Le protocole général d'analyse est synthétisé dans la figure 1.

8.1. Stérilisation de la surface des grains

L'objectif de la stérilisation de surface des grains est d'éliminer toutes les pollutions externes d'origines fongique ou bactérienne.

Pour l'analyse de céréales à petits grains : 50 ml de grains sont stérilisés en surface. Pour l'analyse de grains de maïs, 100 ml de grains sont stérilisés en surface.

Les grains sont placés dans un panier tamis à maille de 05-1 mm (type "moustiquaire") et suivent le cycle de désinfection suivant :

- 10 min dans un bécher contenant 300 ml d'une solution d'hypochlorite de Sodium à 1.5%Cl additionnée de Tween 20 (0.01% V/V)
- 1 min dans un bécher contenant 300 ml d'eau stérile
- 1 min dans un bécher contenant 300 ml d'eau stérile

note : durant chacune des trois phases, le panier est agité vigoureusement afin de remettre en suspension les grains et d'assurer ainsi une désinfection et un rinçage plus efficace.

Le panier contenant les grains est ensuite égoutté et les grains sont placés à sécher sur du papier filtre stérile (compter 15 min minimum sous la hotte à flux laminaire).

8.2. Incubation des grains

8.2.1. Incubation des grains pour la recherche des *Fusarium* spp.

Parmi les grains parfaitement séchés, au minimum 100 grains sont prélevés de façon aléatoire sur le papier filtre et placés directement sur le milieu de culture DCPA à raison de 3 grains par boîte de pétri. Les boîtes ne sont pas parafilmées.

Les boîtes de pétri DCPA sont incubées 10-12 jours dans une enceinte climatique illuminée réfrigérée à 22°C ±3°C en alternance éclairage- obscurité 12h/12h.

Note : l'incubation des boîtes de DCPA peut aussi être effectuées sans enceinte climatique en les plaçant dans des boîtes de plexiglas transparentes dont le couvercle reste légèrement ouvert. Ces boîtes d'incubations peuvent être placées sur les paillasses ou sur des étagères du laboratoire pourvu que celui ci soit climatisé (22°C±3°C) et permette une alternance éclairage obscurité (garantissant au moins 6 heures d'obscurité). L'alternance de la lumière naturelle du jour est parfaitement suffisante.

8.2.2. Incubation des grains pour la recherche de *Microdochium nivale*

Parmi les grains parfaitement séchés, au minimum 100 grains sont prélevés de façon aléatoire sur le papier filtre et placés directement sur le milieu de culture PDA à raison de 3 grains par boîte de pétri. Les boîtes ne sont pas parafilmées.

Les boîtes de pétri PDA sont tout d'abord incubées 6 jours à l'obscurité dans une chambre froide ou un réfrigérateur à 6°C±2°C. Les boîtes de pétri PDA sont ensuite incubées 6 jours dans les mêmes conditions que les boîtes DCPA.

Il est déconseillé de placer plus de 3 grains par boîte car après la période d'incubation, il devient difficile de bien délimiter l'origine des différents isolats qui se développent et recouvrent l'ensemble du milieu de culture.

8.3. Lecture des boîtes d'isolement (milieux DCPA et PDA)

8.3.1. Lecture des boîtes DCPA – recherche des *Fusarium* spp.

Après 10-12 d'incubation, les *Fusarium* spp. infectant les grains se sont bien développés sur le milieu semi sélectif DCPA. Ce dernier ne permet pratiquement aucune pigmentation du thalle des champignons qui s'y développent. Les cultures apparaissent donc généralement blanche à rose très pâle.

Le milieu étant semi sélectif, seuls les champignons du genre *Fusarium* vont se développer de manière conséquente sur le milieu (vitesse de croissance radiale >2 mm / 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 un mycélium aérien très peu abondant voire inexistant. De plus, il a été montré que ce milieu était significativement plus efficace que le milieu PDA pour la détection des *Fusarium* spp. (Ioos, 2001a).

Il est toutefois à noter que pour certaines espèces (*F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme* et *F. subglutinans*), l'extrême abondance de leur sporulation (*sporodochia*¹ évoluant en pionnotes²) déprime le mycélium aérien jusqu'à rendre l'aspect de la culture ras et gras. Néanmoins, la vitesse de croissance radiale de ces espèces sur le milieu DCPA dépasse très largement 2 mm/jour.

Pour un échantillon de grains analysés, l'ensemble des boîtes de DCPA est examiné. Les boîtes dans lesquelles des cultures de *Fusarium* spp. se sont développées sont placées sur le plateau d'une loupe binoculaire et éclairées par dessous (diascopie) à forte puissance.

Chaque grain est observé.

- Les *sporodochia* éventuellement présentes sont repérées à la binoculaire et sont prélevées à l'aide d'une pointe très fine préalablement flambée et refroidie. Les *sporodochia* sont très souvent formées à proximité du grain incubé, il est donc indispensable d'écartier le grain incubé à l'aide de la pointe de prélèvement et d'observer scrupuleusement la zone ainsi découverte. (cf. point "i")
- Si aucun *sporodochium* n'est visible, un prélèvement est effectué en récoltant du mycélium aérien (cf. points "ii" et "iii").

Le prélèvement est ensuite transféré dans une goutte de colorant (bleu coton ou acide fuchsine) puis monté entre lame et lamelle pour observation au microscope.

Trois cas de figures sont alors possibles :

- i. Lorsque qu'il a été possible de repérer et de prélever des *sporodochia*, les spores observées (=macroconidies³) sont de forme et de taille relativement homogènes.

¹ cf. Glossaire

² cf. Glossaire

³ cf. Glossaire

Il est possible de déterminer directement 3 espèces de *Fusarium sp.* : *F. culmorum* ou *F. graminearum* – *F. crookwellense*⁴ (cf. tableaux 1 et 2). Si les macroconidies observées ne correspondent à aucune de ces trois espèces, la culture est repiquée sur milieu SNA et sur milieu PDA pour une étude spécifique et une détermination de l'espèce en identifiant clairement les repiquages. Les repiquages sont ensuite incubés 10 jours dans les mêmes conditions que pour les incubations sur DCPA.

- ii. Lorsque les spores présentes dans le mycélium aérien (= microconidies) sont très abondantes et ont une forme strictement homogène de goutte d'eau à papille (napiforme⁵), il est possible de déterminer directement l'espèce : *F. poae*⁶ (cf. tableau 1).
- iii. Lorsque aucune spore n'est visible ou lorsque des spores de forme et de taille non homogènes sont observées et lorsqu' aucun *sporodochium* n'est visible, la culture est repiquée sur milieu SNA et sur milieu PDA pour une étude spécifique et une détermination de l'espèce en identifiant clairement les repiquages. Les repiquages sont ensuite incubés 10 jours dans les mêmes conditions que pour les incubations sur DCPA.

8.3.2. Lecture des boîtes de PDA- recherche de *Microdochium nivale*

Après 6 jours d'incubation à 6°C +2°C, le *Microdochium nivale* a pu se développer sur le milieu PDA. Les champignons des autres genres, dont *Fusarium* infectant éventuellement les grains ne se sont que très peu développés à cette température. Ainsi, s'il y a co-infection d'un grain par des *Fusarium spp.* et *Microdochium nivale*, ce dernier aura un avantage compétitif dans ces conditions de culture et supplantera les *Fusarium spp.* (Petitt et al. 1996).

Après 6 jours supplémentaires d'incubation à 22°C+2°C, le *Microdochium nivale*, s'il est présent a recouvert l'intégralité du milieu de culture et a amorcé sa sporulation.

Après ces deux phases d'incubation, le *Microdochium nivale* présente les caractéristiques suivantes :

- Croissance généralement rase, parfois légèrement aérienne,
- Mycélium aérien d'aspect dense et feutré, de couleur blanche à rose saumon,
- Coloration rose saumon sous la culture,
- Présence de nappes de sporodochia de couleur orange vif très souvent à la limite de la paroi verticale de la boîte de culture et de la culture, mais aussi parfois dispersés sur la culture,
- Chez certaines souches, présence de petites concrétions dans la gélose disposées de façon concentrique et visibles par transparence.

L'identification de *Microdochium nivale* n'est toutefois certaine que si les critères énumérés plus haut sont vérifiées et que des conidies typiques de *Microdochium nivale* et produites en *sporodochia* sont observées au microscope.

Lorsque tous les critères correspondent mais que si après plus de 12 jours d'incubation aucun *sporodochium* n'est visible à la binoculaire, les cultures sont soumises à l'éclairage UV proches pendant 48 heures. Cette exposition stimule la production de *sporodochia* chez *Microdochium nivale*. Si après cette phase aucune *sporodochia* n'est visible, le champignon isolé ne sera pas considéré comme *Microdochium nivale*.

⁴ Les macroconidies produites en *sporodochia* de ces trois espèces sont identiques sur le milieu DCPA et sur SNA. La détermination de l'espèce est donc directement possible sur le milieu d'isolement (Hocking and Andrews, 1987)

⁵ cf. Glossaire

⁶ Les microconidies de *F. poae* sont identiques sur le milieu DCPA et sur SNA. La détermination de l'espèce est donc directement possible sur le milieu d'isolement (Hocking and Andrews, 1987)

Pour un échantillon de grains analysés, l'ensemble des boîtes de PDA est examiné. Chaque grain est observé pour constater la présence ou l'absence de *Microdochium nivale*.

Le pourcentage de grains infectés par *Microdochium nivale* est ainsi directement déterminé pour l'échantillon analysé.

8.4. Détermination de l'espèce des isolats repiqués sur milieux d'étude (SNA et PDA)

La détermination morphologique de l'espèce d'un isolat de *Fusarium sp.* repose sur l'observation de nombreuses caractéristiques anamorphiques sur des milieux de culture bien définis. Lorsque toutes les informations présentées ci dessous sont recueillies, l'identification pourra être réalisée en utilisant les clés de références de Nelson *et al.* (1983) et Nirenberg *et al.* (1982). Ces clés permettent d'identifier la très grande majorité des espèces de *Fusarium spp.* que l'on peut isoler des céréales européennes. Toutefois, il n'est pas à exclure que pour certains isolats, l'identification soit impossible par les moyens classiques (dégénérescence de la souche, nouvelle espèce, variant inconnu d'une espèce donnée, etc.)

La culture de l'isolat sur PDA est étudiée pour l'appréciation de critères macroscopiques :

- Vitesse de croissance,
- Aspect du mycélium aérien,
- Couleur de l'envers de la colonie,
- Odeur,
- Couleur des *sporodochia*.

La culture de l'isolat sur SNA est étudiée pour l'appréciation de critères microscopiques :

i. Macroconidies produites en *sporodochia*

- Répartition, aspect et abondance des *sporodochia*,
- Forme générale des macroconidies,
- Section la plus large de la macroconidie,
- Dimensions relatives des macroconidies,
- Cloisonnement des macroconidies,
- Forme de la cellule basale des macroconidies,
- Forme et taille de la cellule apicale des macroconidies.

ii. Microconidies dans le mycélium aérien

- Abondance relative des microconidies dans le mycélium aérien,
- Présence de microconidies en chaînettes ou en fausses têtes,
- Forme des microconidies,
- Type des phialides des conidiophores du mycélium aérien.

iii. Présence et type et agencement des chlamydospores

8.4.1. Mode opératoire des observations sur le milieu SNA

Pour l'observation des critères microscopiques de la culture de *Fusarium sp.* sur le milieu SNA, deux prélèvements sont effectués systématiquement (cf. figure 2).

Les boîtes de cultures de *Fusarium spp* sur SNA sont placées sur le plateau d'une loupe binoculaire et éclairée par dessous (diascopie) à forte puissance.

Le premier prélèvement consiste à récolter du mycélium aérien en plusieurs endroits de la culture à l'aide d'une fine pointe stérile. Le mycélium récolté est transféré dans une goutte de colorant (bleu coton ou acide fuchsine) puis monté entre lame et lamelle pour observation au microscope. Ces prélèvements permettent d'observer les microconidies produites dans le mycélium aérien.

Le second prélèvement consiste à recueillir des *sporodochia* repérées à la loupe binoculaire à l'aide d'une fine pointe stérile. Dans la majorité des cas, les *sporodochia* se situent à proximité du cube de gélose qui a servi au transfert de la culture. Toutefois, chez certaines espèces, il convient d'examiner l'intégralité de la surface de la culture afin de les repérer car elles peuvent être dispersées sur la culture. En règle générale, les *sporodochia* apparaissent comme de petits amas gélatineux et colorés posés directement sur le milieu gélosé (cf. Glossaire).

Parfois, à l'issue des 10 jours d'incubation, aucun *sporodochium* n'est visible, il convient alors de parafilmer la boîte et de la placer pendant 48 h sous exposition aux UV proches. Si après cette exposition aucun *sporodochium* n'est visible il ne sera pas possible d'identifier l'espèce du *Fusarium sp.* étudiée.

Les *sporodochia* récoltées seront transférées dans une goutte de colorant (bleu coton ou acide fuchsine) puis monté entre lame et lamelle pour observation au microscope. Ce prélèvement permet d'observer les macroconidies produites en *sporodochium*.

8.4.1.1. Observations du prélèvement de mycélium aérien

Deux cas de figures peuvent se présenter :

i. les microconidies sont produites de façon très abondante.

Il est alors nécessaire d'observer directement au microscope le mycélium aérien de la culture (grossissement x 50 ou x 100) afin de définir le mode de production des microconidies :

- en chaînette et ou en fausse tête, ou de façon solitaire (cf. glossaire),
- sur conidiophore long ou court, renflé ou flexueux (cf. glossaire),
- à partir de monophialide et ou de polyphialide (cf. glossaire).

On identifiera aussi la ou les formes des microconidies :

- globuleuse,
- citriforme,
- fusiforme
- ovale,
- allantoïde,
- hétérogène.

ii. les microconidies ne sont pas produites de façon abondante

Dans ce cas, seule la forme des microconidies sera identifiée et le type de phialides sur lesquelles elles sont produites sera déterminé (monophialide et ou polyphialide).

Enfin, la présence et l'aspect des chlamydospores seront étudiés (cf. glossaire):

- Formation rapide ou lente,
- Production abondante, rare ou absente,
- Produites de façon solitaire, en couple, en chaîne, en amas,
- Aspect de la surface : lisse, verruqueux.

note : ce critère peut aussi éventuellement être étudié à partir de prélèvement sur le mycélium aérien de la culture sur PDA dans le cas où le critère "chlamydospore" est critique pour l'identification d'une espèce.

8.4.1.2. Observations des macroconidies produites en *sporodochium*

Les macroconidies produites en *sporodochium* sont de taille et de forme relativement homogènes. Etant produites sur SNA, leur caractéristiques peuvent être comparées aux photographies publiées dans les publications de référence citées plus haut. Seules les macroconidies produites sur SNA seront observées.

Les critères suivants seront observés :

- Forme générale des macroconidies,
- Section la plus large de la macroconidie,
- Dimensions relatives des macroconidies,
- Cloisonnement des macroconidies,
- Forme de la cellule basale des macroconidies,
- Forme et taille de la cellule apicale des macroconidies.

8.4.3. Exploitation des observations

Lorsque toutes les informations présentées ci dessus sont recueillies, l'identification pourra être réalisée en utilisant les clés de références de Nelson *et al.* (1983) et Nirenberg *et al.* (1982).

L'opérateur peut en outre s'aider du tableau de synthèse présenté en annexe : descriptif des espèces, mais il est indispensable d'utiliser en priorité les publications citées plus haut.

Il est important de rappeler que l'identification de l'espèce d'un isolat étudié n'aboutira pas systématiquement. Il est préférable de laisser la mention "*Fusarium sp.*" lorsque que certains critères manquent ou semblent contradictoires.

8.5. Expression des résultats

8.5.1. Pourcentage de grains infectés par *Microdochium nivale*

Lorsque l'ensemble des boîtes d'isolement PDA ont été observées (après une éventuelle exposition aux UV proches), il est possible d'estimer directement la proportion de grains infectés par *Microdochium nivale* dans l'échantillon analysé.

Le résultat sera exprimé de la façon suivante : "l'analyse de l'échantillon par isolement mycologique à basse température a révélé la présence de x % de grains infectés par *Microdochium nivale*"

8.5.2. Pourcentage de grains infectés par chacune des espèces de *Fusarium sp.*

Lorsque l'ensemble des boîtes d'isolement DCPA ont été observées, et que l'ensemble des isolats non identifiables sur DCPA aient été observés après culture sur SNA et PDA, éventuellement après exposition aux UV proches, il est possible d'estimer directement la proportion de grains infectés par chacune des espèces de *Fusarium sp.* identifiée dans l'échantillon analysé.

Le résultat sera exprimé de la façon suivante: "l'analyse de l'échantillon par isolement mycologique sur milieu semi-sélectif a révélé la présence de x % de grains infectées par *Fusarium sp1*, y % de grains infectées par *Fusarium sp2*, etc., dans l'échantillon infecté."

Le pourcentage de grains infecté par des espèces non identifiées sera précisé de la même manière : z % de grains infectés par "*Fusarium spp.*"

Il est important de préciser dans l'expression des résultats que :

"L'analyse visant à déterminer les pourcentages d'infection par *Microdochium nivale* et par les *Fusarium sp.* ayant été effectuées sur des sous échantillons différents du même échantillon, les pourcentages d'infection des grains par les deux genres de champignons ne peuvent pas être additionnés".

Il est en effet démontré que les grains peuvent être infectés simultanément par les deux genres, voire par plusieurs espèces du même genre (Ioos, 2001a,b)

9. Désinfection et destruction des déchets d'analyse

Les solutions d'hypochlorite de sodium ayant été utilisées à la désinfection de surface des grains et les solutions d'au stérile ayant été utilisées pour rincer les grains désinfectés peuvent

être éliminées sans précautions particulière en veillant toutefois à ne pas entrer directement en contact avec ces solutions.

L'intégralité des cultures de champignons obtenues, sur les milieux d'isolement et sur les milieux d'études seront autoclavées avant leur élimination avec les déchets ménagers.

10. Références bibliographiques

ANDREWS S., PITT J., 1986. Selection medium for *Fusarium* species and dematiaceous Hyphomycetes from cereals. *Appl. Environ. Microb.* 51 (6). 1235-1238.

BOOTH C., 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 237 pp.

BURGESS L. W., LIDDELL C. M. and SUMMERELL B.A., 1988. Laboratory manual for *Fusarium* research, 2nd ed. University of Sydney, Sydney. 156 pp

GERLACH W. and NIRENBERG H., 1982. The genus *Fusarium* - a pictorial atlas. *Mitt. Biol. Bund. Land-Forst.* 209. 406 pp.

HOCKING A., ANDREWS S., 1987. Dichloran chloramphenicol peptone agar as an identification medium for *Fusarium* species and some dematiaceous hyphomycètes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89 (2). 239-244.

IOOS R., 2001a. Les *Fusarium* et *Microdochium* sur grains de céréales en France. *Phytoma* 539: 52-55.

IOOS R., 2001b. Comparaison de deux techniques de détection des *Fusarium* spp. sur grains de céréales et premières descriptions d'infections multiples par *Fusarium* spp. et *Microdochium* sp. au niveau du grain. *Annales du 5e congrès de la S.F.P.*, Angers, mars 2001

KIEFFER E. and MORELET M., 1997. Les Deuteromycètes – Classification et clés d'identifications générique. INRA ed., 306 pp

NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., MARASAS W.F.O., 1983 - *Fusarium* species - An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA, 193 pp.

NIRENBERG H. I., 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Can. J. Bot.* 59. 1599-1609.

PETTIT T.R., PARRY D.W. and POLLEY R.W., 1996. Effect of temperature on the incidence of nodal foot rot in winter wheat crops in England and Wales caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale*. *Agr. For. Meteorol.* 79. 233-242

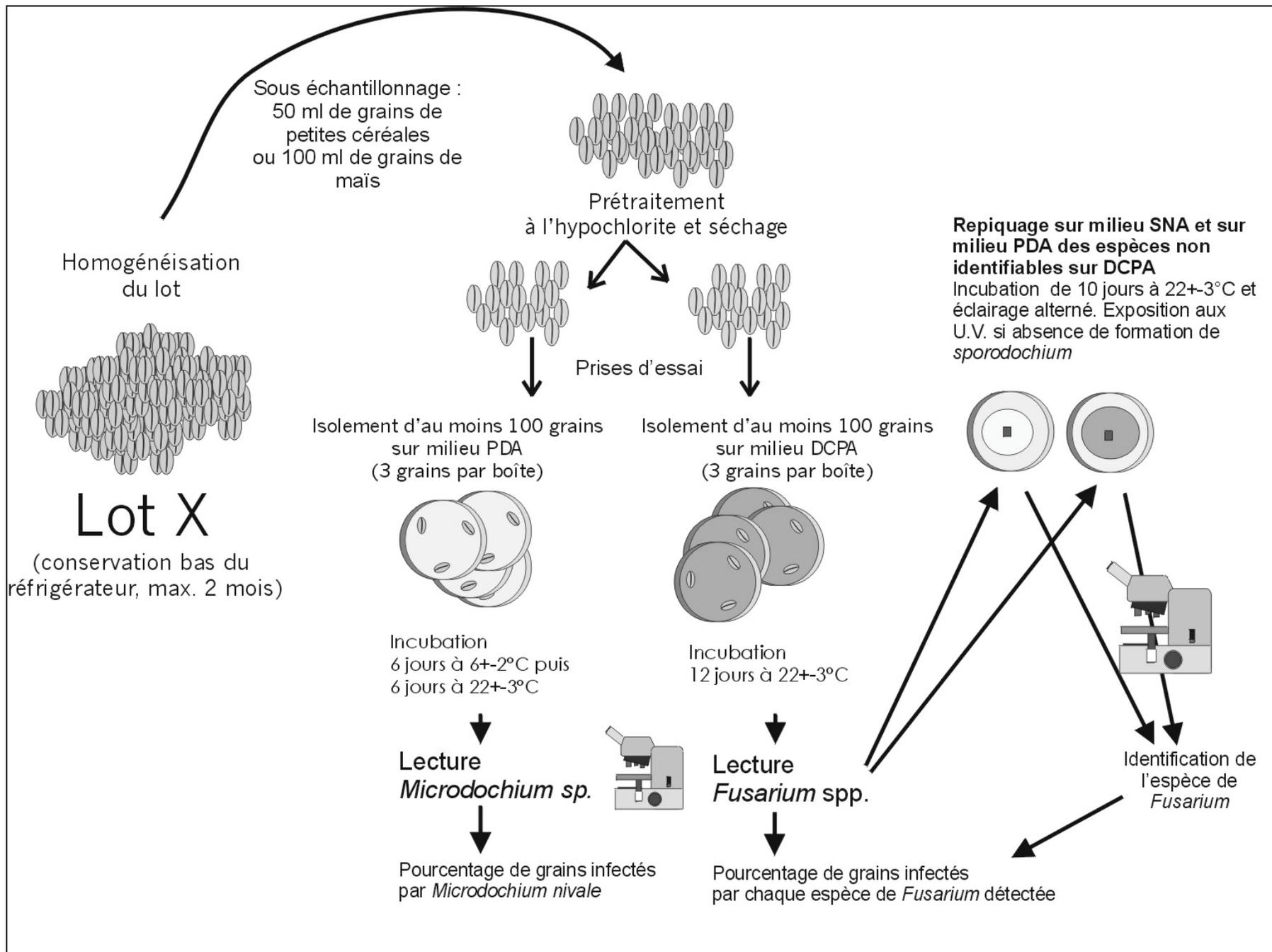


Figure 1 : récapitulatif du protocole d'analyse de grains de céréales pour la détection de *Fusarium spp.* et *Microdochium nivale*

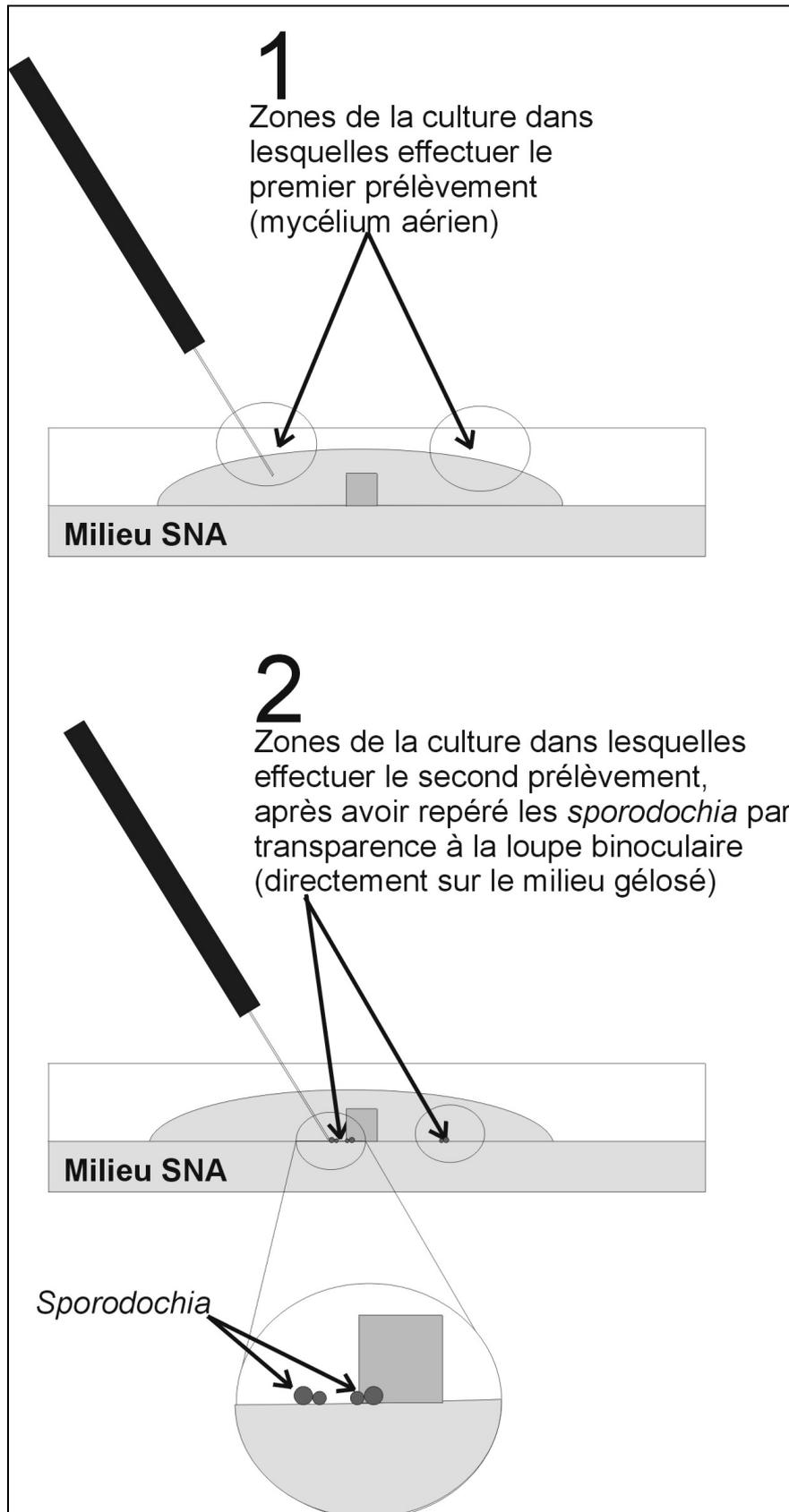


Figure 2 : protocole de prélèvements à réaliser pour l'observation de critères microscopiques de *Fusarium* sp. cultivé sur milieu SNA

Annexe 1 : Composition des différents milieux d'isolement et de culture

DCPA (Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar)

Composition tirée de ANDREWS S., PITT J. (1986) et adaptée par B. Cahagnier, INRA Nantes, comm. pers.)

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 : 0,2 g [**Peut causer le cancer. Peut causer des altérations génétiques héréditaires. Risques possibles pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant. Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et contact avec la peau. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/ du visage.**]
- dichloran (2-6-dichloro-4-nitroaniline) en solution alcoolique* : 1ml. [**nocif en cas d'ingestion**]
- crystal violet en solution aqueuse** : 1 ml [**Peut causer le cancer. Peut causer des altérations génétiques héréditaires. Toxique par ingestion et par inhalation. Irritant pour les yeux, le système respiratoire et la peau. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). Après contact avec les yeux se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/ du visage.**]
- agar : 15,0 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000 ml

* : 0.2 g de dichloran dans 100 ml d'éthanol

** : 50 mg de crystal violet dans 100 ml d'eau distillée

SNA (Synthetischer Nährstoffärmer Agar)

Composition tirée de 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 : 0,2 g
- Saccharose : 0,2 g
- Agar : 20,0 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000 ml

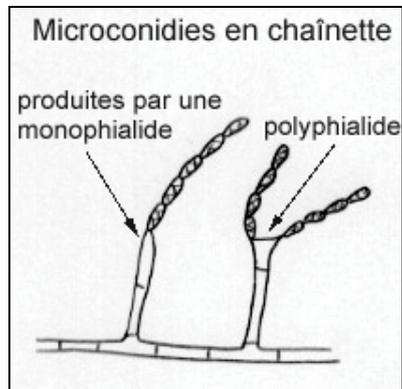
PDA (Potato Dextrose Agar)

Pour un litre de milieu :

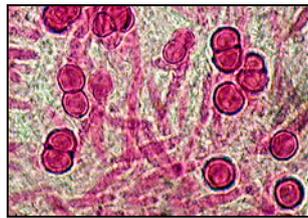
- PDA en poudre prêt à l'emploi : 39 g
- H_2O distillée ou osmosée : 1000 ml

Annexe 2 : Glossaire :

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.



Chlamydospore : 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.

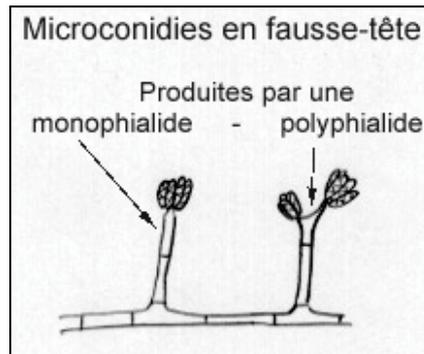


Chlamydospores à surface rugueuse
de *F. equiseti*

Conidiogénèse : mode de production des conidies ; concerne particulièrement les relations entre cellules mères et conidies au niveau de la paroi.

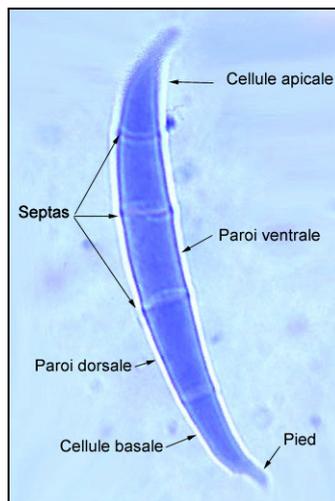
Conidiophore : structure, plus ou moins simple ou complexe, située entre l'hyphes végétative et les conidies, formée par la (les) cellule(s)-mère(s), l'hyphes fertile et ses ramifications éventuelles.

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.



Fusiforme : en fuseau, à extrémités pointues

Macroconidie : dans le cas où deux formes conidiennes coexistent chez un deutéromycète, les conidies les plus grosses (souvent cloisonnées) sont les macroconidies. On distinguera les macroconidies produites dans le mycélium aérien, de forme et de taille hétérogènes des macroconidies produites en sporodochium, de taille et de forme homogènes, et typique de l'espèce en question.



Macroconidie produite en *sporodochium*
de *F. graminearum*

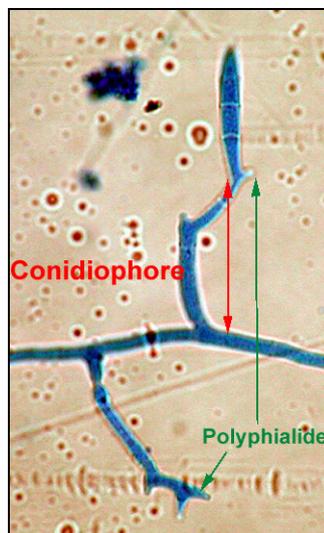
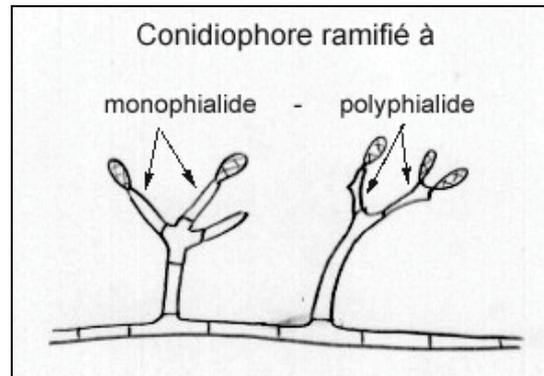
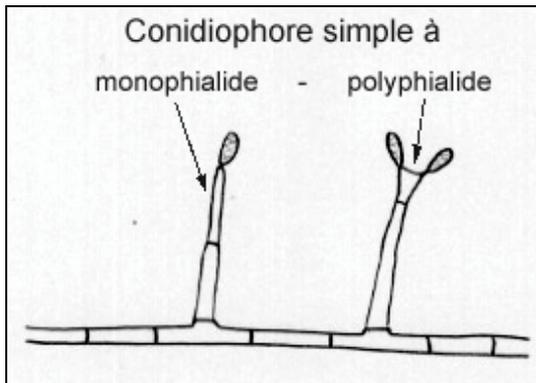
Microconidie : dans le cas où deux formes conidiennes coexistent chez un deutéromycète, les conidies les plus petites sont les microconidies. Certains auteurs, donnent le nom de microconidies aux conidies produites dans le mycélium aérien, quelle que soit leur taille et leur cloisonnement.

Napiforme : en forme de goutte d'eau, globuleux à papille

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 :

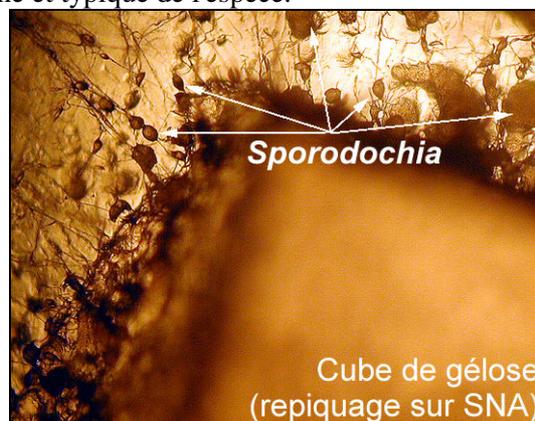
Monophialide : phialide ne présentant qu'un unique pore par lequel est produite la ou les conidies

Polyphialide : phialide présentant plusieurs pores par lesquels sont produites une ou plusieurs conidies. A ne pas confondre avec un conidiophore ramifié à monopialide.



Polyphialides sur conidiophore simple de *F. sporotrichioides*

Sporodochium (plur. *sporodochia*) : stroma fertile pustuliforme, superficiel ou largement érompant. Dans le cas des champignons du genre *Fusarium*, ces structures ressemblent à de petits amas gélatineux à la surface de la gélose, dans lesquels sont produites des macroconidies de taille et de forme relativement homogène et typique de l'espèce.

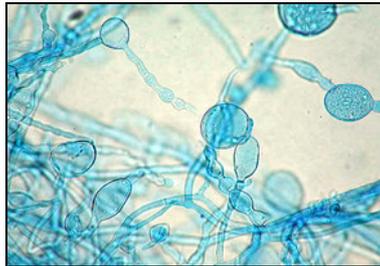


Sporodochia visibles par diascopie sur une culture de *Fusarium* sur SNA

Pionnotes : masse de spores ayant une apparence graisseuse. Dans le genre *Fusarium*, les pionnotes apparaissent lorsque les *sporodochia* sont produites en très grande quantité et coalescent ou lorsque l'isolat dégénère jusqu'à ne pratiquement plus produire de mycélium mais des conidies.

Réniforme : en forme de haricot

Swelling : renflement de certaines cellules d'un hyphe mycélien. A ne pas confondre avec les chlamydospores qui ont une paroi épaisse et sont parfois rugueuses.



Swellings hyphaux de *Fusarium sp.*

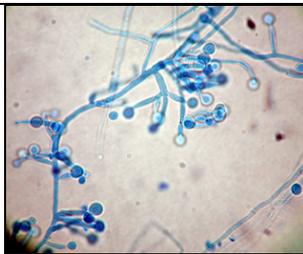
Crédit tous dessins et photographies : R. IOOS (LNPV-UMAF)

Tableau 1 : prises de vues d'éléments caractéristiques de quelques espèces de *Fusarium* et *Microdochium nivale* isolés de grains de céréales.

F. poae
(Peck) Wollenw.



Vue de la culture au microscope de conidiophores de *F. poae*

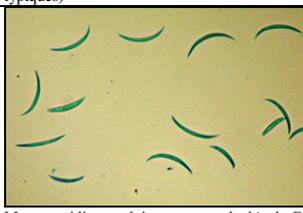


Conidiophore à base renflée de *F. poae* (monophialides portant les microconidies typiques)

F. tricinctum
(Corda) Sacc.



Microconidies citrine et en forme de virgule typiques de *F. tricinctum*

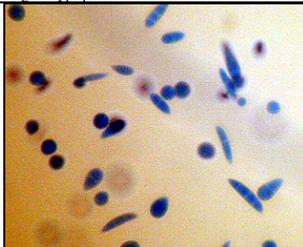


Macroconidies produites en sporodochia de *F. tricinctum*

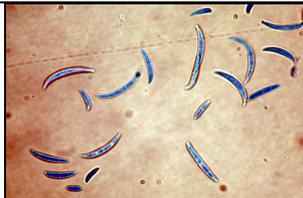


Conidiophores flexueux de *F. tricinctum* (monophialides portant les microconidies typiques)

F. sporotrichioides
Sherb.



Microconidies napiforme et fusiformes de *F. sporotrichioides*



Macroconidies produites en sporodochia de *F. sporotrichioides*

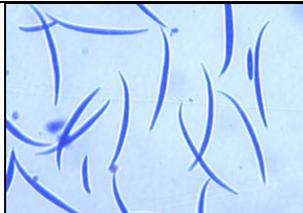


Vue de la culture au microscope de conidiophores de *F. sporotrichioides* (polyphialides)

F. avenaceum
(Fr.) Sacc.

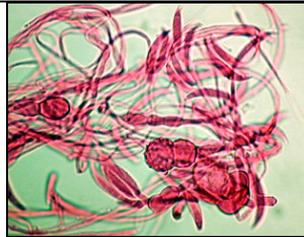


Macroconidie du mycélium aérien et microconidie fusiforme typique de *F. avenaceum*



Macroconidies produites en sporodochia de *F. avenaceum*

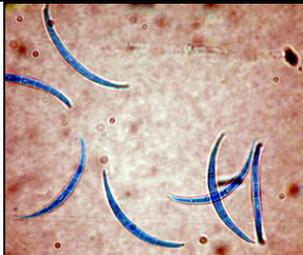
F. equiseti
(Corda) Sacc.



Chlamydospores à paroi rugueuse typiques de *F. equiseti*

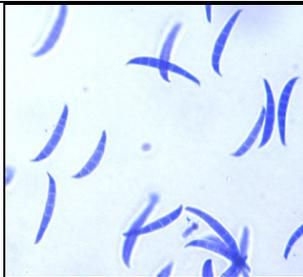
Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. equiseti*

F. acuminatum
Ell. & Ev.



Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. acuminatum*

F. sambucinum
Fuckel

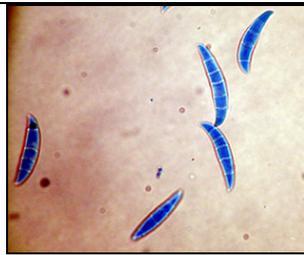


Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. sambucinum*

F. culmorum
(W. G. Smith) Sacc.

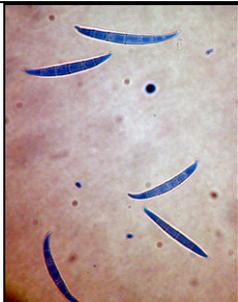


Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. culmorum*



Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. culmorum*

F. graminearum
Schwabe



Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. graminearum*



Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. graminearum*

F. crookwellense
Burgess, Nelson &
Toussoun



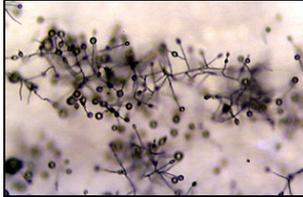
Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. crookwellense*

F. moniliforme Sheldon

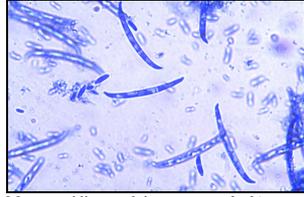


Vue de la culture sur SNA au microscope, microconidies en chaînettes de *F. moniliforme* (monophialides)

F. subglutinans
(Wollenw. & Reinking)
Nelson, Toussoun &
Marasas comb. nov



Vue de la culture sur SNA au microscope, microconidies en fausse-tête (mono- et polyphialides) de *F. subglutinans*

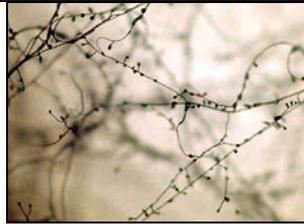


Macroconidies produites en *sporodochia* et microconidies de *F. subglutinans*

F. oxysporum
Schlecht. emmend. Syd.
& Hans.



Macroconidies produites en *sporodochia* et microconidies de *F. oxysporum*



Vue de la culture sur SNA au microscope, microconidies en fausse-tête sur conidiophore très court (monophialide) de *F. oxysporum*

F. solani
(Mart.) Appel &
Wollenw. emmend.
Syd. & Hans.

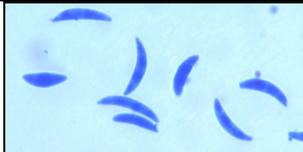


Macroconidies produites en *sporodochia* de *F. solani*



Conidiophore ramifié de *F. solani* (monophialides)

Microdochium nivale
Samuels et Hallett



Conidies produites en *sporodochia* sur PDA de *Microdochium nivale*

Crédit toutes photographies : R. IOOS (LNPV – UMAF)

Tableau 2 : descriptif des espèces de *Fusarium* spp. décrites sur céréales

Espèce de <i>Fusarium</i>	Caractéristiques sur milieu PDA			Microconidies sur SNA					Sporodochia sur SNA		Macroconidies produites en <i>sporodochium</i> sur SNA					Chlamydo spores	Fréquence de l'espèce sur céréales
	Mycélium aérien	Couleur sous la culture	Vitesse de croissance	Abondance dans le mycélium aérien	Forme(s)	Disposition (observation directe de la culture)	Aspect du conidio-phore	Conidio-génèse	Disposition	Couleur (éventuellement sur PDA)	Taille relative	Forme générale	Section la plus large	Forme de la cellule basale	Forme et taille de la cellule apicale		
<i>F. poae</i> (Peck) Wollenw.	abondant et aérien blanc à rosé, ou ras et blanc d'aspect pulvérulent. Odeur abricot-pêche	blanc à orange ou rouge carmin	rapide (type aérien) ou moyen (type pulvérulent)	extrêmement abondantes	napiforme <i>Idem sur DCPA</i>	solitaires, conidiophores en grappe <i>Idem sur DCPA</i>	enfilé à la base, relativement court <i>Idem sur DCPA</i>	monophialide <i>Idem sur DCPA</i>	généralement au centre de la culture	transparente	petite à taille moyenne	légèrement courbée	parois parallèles	distinctement pédifforme ou à encoche		rarement présentes	fréquente sur maïs, très fréquente sur autres céréales
<i>F. tricinctum</i> (Corda) Sacc.	plutôt ras et duveteux, rose à marron	rouge carmin	moyenne	extrêmement abondantes	mélange de napiforme, citriforme et en forme de virgule	solitaires, conidiophores en grappe	taille moyenne, à parois parallèles, flexueux	monophialide	dispersées sur toute la culture	orange très clair	taille moyenne	distinctement en forme de faucille	parois parallèles	distinctement pédifforme ou à encoche		rarement présentes	très peu fréquente sur maïs, très fréquente sur autres céréales
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	abondant et aérien blanc à rosé Odeur abricot-pêche	blanc évoluant en rose pâle voire rouge carmin	rapide	extrêmement abondantes	mélange de napiforme et fusiforme septées	solitaires	ramifié et non ramifié	monophialide et polyphialide	dispersées sur toute la culture	orange très clair	taille moyenne	distinctement en forme de faucille		non distinctement pédifforme		présentes, plutôt à paroi lisse et formés solitairement, en chaîne ou en amas	peu fréquente sur autres céréales
<i>F. chlamydosporum</i> Wollenw. & Reinking	abondant et aérien, rosé à brun	rouge carmin à ocre ou marron	rapide	extrêmement abondantes	fusiforme uni ou bi cellulaire	solitaires	ramifié et non ramifié	monophialide et polyphialide			taille moyenne	distinctement en forme de faucille		pédiforme		présentes, souvent très abondantes, à paroi rugueuse	très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	abondant, aérien et très dense, généralement blanc	rouge carmin à ocre ou marron avec une marge blanche	rapide	rare	en forme de fuseau très caractéristique à paroi épaisse	solitaires	ramifié et non ramifié	monophialide	généralement au centre de la culture	orange vif	longue	généralement très effilée		pédiforme	parfois allongée	absentes	peu fréquente sur maïs, très fréquente sur autres céréales
<i>F. equiseti</i> (Corda) Sacc.	abondant, aérien et généralement blanc pouvant évoluer vers l'ocre.	typiquement ocre à marron (sauf la var. <i>compactum</i> qui est rouge)	rapide	rare	ovale à forme de virgule	solitaires		monophialide	dispersées sur toute la culture. Macroconidies regroupées en forme de plumeau	orange clair	longue	distinctement en forme de faucille		pédiforme	plus allongée et parfois en forme de fouet	présentes, souvent très abondantes, à paroi rugueuse	peu fréquente sur autres céréales
<i>F. scirpi</i> Lamotte & Fautr.	abondant, aérien et blanc évoluant vers l'ocre	typiquement ocre avec parfois des taches marron	rapide	assez abondantes	ellipsoïde à forme de club		typiquement court, tronqué et souvent en forme de croix	monophialide et polyphialide	dispersées sur toute la culture	orange clair	longue	courbure très prononcée, par fois en forme de "S"		pédiforme, souvent très allongée et courbe		présentes, en chaîne ou en amas	peu fréquente sur autres céréales
<i>F. acuminatum</i> Ell. & Ev.	abondant et aérien, parfois plus ras en vieillissant, blanc	rouge carmin	moyenne à rapide	rare	forme de virgule, pluriseptées	solitaires	ramifié et non ramifié	monophialide	concentrées au centre de la colonie	brun rouge à orange	taille moyenne	forme distincte de faucille		distinctement pédifforme ou à encoche	parfois allongée	rare, formées solitairement, en chaîne ou en amas	peu fréquente sur autres céréales
<i>F. heterosporum</i> Nees	abondant et dense, blanc à rosé	saumon à ocre	rapide	absentes					concentrées au centre de la colonie	orange	taille moyenne	forme de faucille	rétrécies aux extrémités			présentes, formés en chaîne	très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. sambucinum</i> Fuckel	abondant et dense, blanc à rosé voire ocre	rouge carmin, ocre ou marron	rapide	absentes					concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonie	orange	taille petite à moyenne	forme de faucille, à paroi épaisse		distinctement pédifforme ou à encoche parfois arrondie	parfois en forme de mamelon ou de bec	présentes et parfois abondants, formés solitairement, en chaîne ou en amas	peu fréquente sur autres céréales

à suivre

tableau 2(suite)

Espèce de <i>Fusarium</i>	Caractéristiques sur milieu PDA			Microconidies sur SNA					Sporodochia sur SNA		Macroconidies produites en <i>sporodochium</i> sur SNA					Chlamydo-spores	Fréquence de l'espèce sur céréales
	Mycélium aérien	Couleur sous la culture	Vitesse de croissance	Abondance dans le mycélium aérien	Forme(s)	Disposition (observation directe de la culture)	Aspect du conidio-phore	Conidio-génèse	Disposition	Couleur (éventuellement sur PDA)	Taille relative	Forme générale	Section la plus large	Forme de la cellule basale	Forme et taille de la cellule apicale		
<i>F. culmorum</i> (W. G. Smith) Sacc.	abondant, aérien, blanc à jaune, parfois rosé	rouge carmin	rapide	absentes					Dispersées sur toute la colonie <i>Idem sur DCPA</i>	orange à brun rouge <i>Idem sur DCPA</i>	taille moyenne à petite <i>Idem sur DCPA</i>	forme de faucille, à paroi épaisse <i>Idem sur DCPA</i>		souvent arrondie voire papillée <i>Idem sur DCPA</i>	parfois en forme de mamelon ou de bec <i>Idem sur DCPA</i>	présentes et parfois abondantes, formées solitairement, en chaîne ou en amas	très fréquente sur autres céréales
<i>F. graminearum</i> Schwabe	abondant, aérien, blanc à jaune, parfois rosé	rouge carmin	rapide	absentes					concentrées au centre de la colonie <i>Idem sur DCPA</i>	orange à brun rouge <i>Idem sur DCPA</i>	taille moyenne à grande <i>Idem sur DCPA</i>	forme de faucille <i>Idem sur DCPA</i>	parois quasi parallèle <i>Idem sur DCPA</i>	distinctement pédiforme <i>Idem sur DCPA</i>	en forme de bec <i>Idem sur DCPA</i>	très rares et très lentes à se former	très fréquente sur maïs et sur autres céréales
<i>F. crookwellense</i> Burgess, Nelson & Toussoun	abondant, aérien, blanc à jaune, parfois rosé	rouge carmin	rapide	absentes					concentrées au centre de la colonie <i>Idem sur DCPA</i>	orange à brun rouge <i>Idem sur DCPA</i>	taille moyenne à grande <i>Idem sur DCPA</i>	forme de faucille, face dorsale plus courbe que la ventrale <i>Idem sur DCPA</i>	plus large dans la moitié supérieure <i>Idem sur DCPA</i>	très distinctement pédiforme <i>Idem sur DCPA</i>	en forme de bec <i>Idem sur DCPA</i>	présentes, lentes à se former	peu fréquente sur autres céréales
<i>F. lateritium</i> Nees	peu abondant, généralement blanc à ocre	rouge carmin ou brun ou orange	lente	rare	ellipsoïde, fusiforme à forme de club	solitaires	de taille moyenne	monophialide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonie	orange vif	taille moyenne	relativement droite			formant distinctement un bec	rare mais quand présentes verruqueuses	très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. moniliforme</i> Sheldon	abondant et blanc se teintant de pourpre	saumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	unicellulaire, ovale à forme de club et à la base aplatie	en chaînette et en fausse tête	relativement long	monophialide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonie	ocre à orange	taille moyenne à grande	relativement droite, assez fine				absentes	très fréquente sur maïs, très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg	abondant et blanc se teintant de pourpre	saumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	unicellulaire, ovale à forme de club et à la base aplatie	en chaînette et en fausse tête	de taille moyenne, parfois ramifié	monophialide et polyphialide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonie	ocre à orange	taille moyenne à grande	relativement droite, assez fine				absentes	très fréquente sur maïs, très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. subglutinans</i> (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas comb. nov	abondant et blanc se teintant de pourpre	saumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	unicellulaire, ovale à forme de club et à la base aplatie	en fausse tête	court à taille moyenne, souvent ramifié	monophialide et polyphialide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonie	ocre à orange	taille moyenne à grande	relativement droite, assez fine				absentes	très fréquente sur maïs, très peu fréquente sur autres céréales
<i>F. anthophilum</i> (A. Braun) Wollenw.	abondant et blanc se teintant de pourpre	saumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	unicellulaire, ovale, napiforme, piriforme, ou forme de club	en fausse tête	court à taille moyenne, souvent ramifié	monophialide et polyphialide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonie	ocre à orange	taille moyenne à grande	relativement droite, assez fine				absentes	très peu fréquente sur maïs
<i>F. oxysporum</i> Schlecht. emmend. Snyder & Hans.	abondant et blanc se teintant de pourpre	saumon à pourpre	rapide	extrêmement abondantes	ovale à réniforme	en fausse tête	typiquement très court, parfois invisible	monophialide	concentrées au centre ou dispersées sur toute la colonie	incolore à pourpre	taille moyenne	forme de faucille		piéd légèrement émoussé		abondantes, typiquement solitaires et par paire	très peu fréquente sur maïs et sur autres céréales
<i>F. solani</i> (Mart.) Appel & Wollenw. emmend. Snyder & Hans.	abondant ou ras et blanc jaunâtre se teintant de pourpre	saumon à pourpre parfois très prononcé	rapide	rare à extrêmement abondantes	ovale à réniforme	en fausse tête, souvent dans une gouttelette	typiquement très long	monophialide	généralement concentrées au centre de la colonie ou en cercle concentriques	crème à pourpre	taille moyenne à grande	relativement droite		pédiforme à émoussé, voire arrondi	émoussée à arrondie	abondantes, typiquement solitaires et par paire	très peu fréquente autres sur céréales