



**HAL**  
open science

# Fusariose du Cyclamen : Détection préventive du risque et contrôle biologique

Charline Lecomte

► **To cite this version:**

Charline Lecomte. Fusariose du Cyclamen : Détection préventive du risque et contrôle biologique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Bourgogne Franche-Comté (COMUE), 2016. Français. NNT: . tel-02801333

**HAL Id: tel-02801333**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02801333>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Unité Mixte de Recherche 1347 Agroécologie

## THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline: Sciences Vie

Présentée par

**Charline LECOMTE**

le 19 mai 2016

# Fusariose du cyclamen : détection préventive du risque et contrôle biologique

### Membres du jury

Karine Laval	Professeur, ESITPA, Mont-Saint-Aignan,	Rapporteuse
Diana Fernandez	Directrice de recherche, IRD, Montpellier,	Rapporteuse
Renaud Ioos	Chargé de recherche ANSES, Malzeville,	Examineur
Sylvain Jeandroz	Professeur, Agrosup, Dijon,	Président
Fabien Robert	Directeur scientifique et technique, Astredhor, Paris,	Responsable projet
Véronique Edel-Hermann	Ingénieure de recherche, INRA, Dijon,	Co-directrice
Christian Steinberg	Directeur de recherche, INRA, Dijon,	Directeur



## Remerciements

Cette aventure n'aurait pas été possible et n'aurait pas été aussi agréable et enrichissante sans un bon nombre de personnes. Je remercie tous ceux qui l'ont rendue possible et qui y ont contribué de près comme de loin.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de lire et évaluer mon travail et pour avoir contribué à l'enrichir par leur réflexion. Merci à Diana Fernandez (rapporteuse), Karine Laval (rapporteuse), Renaud Ios (examinateur) et Sylvain Jeandroz (examinateur et président du jury) d'être venus faire une halte bourguignonne pour échanger autour de ce travail.

Je remercie Philippe Lemanceau, directeur de l'UMR Agroécologie et Daniel Wipf, responsable du pôle « Interactions Plantes-Microorganismes », pour m'avoir accueillie dans l'unité.

Je remercie Astredhor, et tout particulièrement son directeur de l'unité nationale, Thierry Gokelaere et son directeur scientifique et technique Fabien Robert pour m'avoir fait confiance pour mener ce projet et avoir contribué à son bon déroulement.

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres du comité de pilotage de ma thèse, Marc Bardin et Marie-Agnès Jacques, de s'être rendus disponibles pour participer aux discussions qui ont jalonné le projet et pour leur contribution à la progression de ce travail.

J'adresse toute ma gratitude à mon directeur de thèse Christian Steinberg, le plus « Fusaphile » de tous. Je vous remercie pour l'accueil chaleureux qui m'a été réservé dans votre équipe et pour m'avoir accordée votre confiance pour mener ce projet. Merci pour votre curiosité scientifique insatiable et votre passion scientifique communicative. Je vous remercie de votre bienveillance et de m'avoir accompagnée au fur et à mesure des échanges scientifiques et culturels dijonnais, savoyard, alsacien ou suédois au long de ces années de thèse. Enfin, merci pour votre soutien et pour le temps que vous m'avez accordé notamment pendant la phase de rédaction. Cette expérience à vos côtés a été plus qu'enrichissante et m'a assurément permis de grandir professionnellement. J'espère continuer à travailler avec vous au cours de mes expériences professionnelles futures.

Un immense merci à ma co-encadrante Véronique Edel-Hermann. Je te remercie pour ta rigueur scientifique exemplaire, tes conseils et remarques toujours pertinentes. Merci également pour ta disponibilité lorsque j'avais des doutes, des questions ou que j'étais en période de rédaction, même si parfois « je comprends vite mais il faut m'expliquer longtemps ». Merci de m'avoir initiée au maniement des séquences et à la passionnante étude de la diversité génétique des Fufu et autres champignons microorganismes. Travailler avec toi m'a appris énormément.

Un immense merci du fond du coeur à Nadine Gautheron. Maman du labo, amie de trois ans et de toujours maintenant. Merci pour ta rigueur, ta disponibilité, ta franchise, ton caractère et pour m'avoir fait découvrir le monde des Fufu. Merci de ta générosité pour tous ces moments partagés au labo et en dehors. Tu as rythmé ces années de la batouc à l'auditorium. « Plouk Plouk Bim Boum...qu'est-ce qu'on est bien sur le canapé ! ». Merci de m'avoir appris à apprécier la musique classique. Des soirées 12/30, trivial poursuit aux instants berlinois, merci d'avoir partagé ces moments et d'avoir été présente dans les bons comme dans les mauvais moments. Je suis fière d'avoir travaillé à tes côtés et de pouvoir dire que je te compte parmi mes amis. Ta présence quotidienne me manquera.

Un grand merci à Astredhor pour être à l'origine de ce projet et pour le très bon accueil qui m'a été réservé au sein de l'institut. Merci Marc-Antoine Cannesan pour ton implication dans le projet et pour m'avoir aidé pour la mise en place et le suivi des essais. Je te souhaite une bonne continuation pour la suite que ce soit professionnellement ou personnellement. Merci également à Agnès Langlois pour être à l'origine de ce beau projet. Merci à toute l'équipe de Paris : Anne-Laure Laroche, Catherine Le Van Van, Cécilia Derrien, Guillaume Morel-Chevillet, Joséphine Piasentin, Laurent Jacob, Magali Ruffion, Maryse Goubet, Muriel Beros, Romain Manceau et Thierry Gokelaere. Un merci tout particulier à Fabien Robert pour avoir suivi mon travail avec bienveillance, pour votre disponibilité malgré la distance et votre humour toujours au rendez-vous. Merci d'avoir contribué au bon déroulement de ce projet et à la bonne entente entre les différents partenaires de ce projet.

Je remercie également Agrene et notamment Claude Alabouvette, Christelle Cordier et Nicolas Jeannin pour avoir suivi ce projet de A à Z ; pour avoir apporté leur aide et expertise en lutte biologique. Merci beaucoup à Nicolas et Christelle pour avoir mis en place et suivi l'essai d'Epoisses. Merci Claude pour votre franchise, gentillesse, disponibilité et pour avoir partagé un peu de vos connaissances avec moi. J'ai énormément apprécié les échanges scientifiques ou non que nous avons pu avoir et espère qu'ils seront encore nombreux.

Merci à Elodie Gautheron pour les bons moments au travail et en dehors. Du fond du cœur, je te souhaite une santé de fer et beaucoup d'épanouissements professionnel et personnel pour la suite. Pour m'avoir réconfortée pendant les moments difficiles de rédaction, pour m'avoir changée les idées pendant ces semaines scotchées au bureau, pour toutes les batailles de sucrettes et parce que « le gras c'est la vie », merci Seb, le geek au grand cœur. Je tiens également à adresser mes remerciements à Sébastien Aimé et Laure Avoscan.

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de différentes personnes. Un grand merci aux différentes stagiaires présentes sur le site de Dijon comme sur celui de Mont Saint Aignan. Merci à Gwennaëlle Chen pour ta bonne humeur et ta motivation. Merci également à Hamida Bouksil et Coralie Dupré. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir. Je remercie également le personnel de la PPHD de Dijon pour avoir veillé sur mes bébés durant l'essai de Dijon. Merci à Philippe Aubert pour sa disponibilité pour le réglage de la chambre climatique. Merci au personnel du service d'appui à la recherche. Un clin d'œil à Bernard Le Bihan, merci d'avoir répondu présent dès que j'avais un problème informatique (et tout le monde sait qu'en période de rédaction, il y a forcément des problèmes informatiques !). A toutes les personnes que j'ai croisées au cours de ces trois ans de thèse qui ont contribué à rendre ce travail plus agréable...merci !

Merci aux producteurs et/ou obtenteurs de cyclamen sans qui ce travail n'aurait pas eu de sens. Un merci tout particulier à la famille Eyraud pour m'avoir ouvert la porte de leur entreprise et pour leur disponibilité. Je ne peux que vous souhaiter des serres pleines de fleurs saines et beaucoup de consommateurs amateurs de cette belle plante qu'est le cyclamen. Je tiens également à remercier les fournisseurs de produits de lutte biologique pour avoir accepté que nous testions leurs produits.

Parce que voir sa thèse sous un autre angle aide énormément et donne une vraie bouffée d'oxygène et qu'il n'y a rien de tel que le regard ébahi d'un enfant pour se remotiver, merci beaucoup à l'expérimentarium.

Je tiens à adresser ma gratitude à toutes les personnes que j'ai croisées au cours de mes études et qui m'ont donné goût à la biologie. Merci à Alain Sarniguet, Muriel Marchi, Anne-Yvonne Guillerm, Lionel Lebreton, Stéphanie Daval, Morgane Boutin et Kevin Gazengel de l'INRA du Rheu, à Mohamed Kerkoud, Muriel Bahut, Amandine Léger et Nathalie Ramirez de la maison de la technopole d'Angers, à David Archer, Malcolm Stratford et Michaela Novodvorska de l'Université de Nottingham.

Merci à pouloucoutac et tous les pouloucoutaciens pour les moments rythmés et joyeux partagés ensemble. Merci au chef des pouloucoutac, Lucien, pour son énergie et sa bonne humeur. Un merci tout particulier à Tigrrrrrrrrrou, ami de batouc, de karaoké...une belle rencontre.

Merci à tous mes amis rencontrés à Dijon. Super Popo, copine de piscine, de jogging et de soiréeS. A Emilie, copine de jogging, batouc, d'auditorium et de soiréeS. Merci au breton à la touffe sans pareil, j'ai nommé Tahiti Bob alias Señor Pescado alias el ojito derecho ! Merci à Leninou et Maudinette pour les soirées Dominion et/ou Carcassonne et pour tous les agréables moments partagés ensemble. Sakina aka Miss Komada. M Gibs pour les jeux de mots et autres calembours en tout genre. Merci Véro pour ta bonne humeur toujours au rdv et ton entrain communicatif. Merci à Virginie pour ta gentillesse. Après la Suède et Dijon, je suis convaincue que le monde n'est pas assez grand pour que nos chemins ne se croisent pas à nouveau ! Obrigado Mayumi, garde ta bonne humeur et ton énergie impressionnante et j'espère te revoir bientôt en France ou au Brésil. Pour Lisou, merci meuf ! Merci à Yuko pour ton grain de folie ! Merci également à Delphine, Luiz, Benoit, Vincent, Julie, Alice et Morgane. Une pensée également pour Aneth...merci pour tout et dans l'attente de futures (proches) parties endiablées de 12/30.

Je remercie aussi mes amis d'ailleurs Marion, Popo et Tomtom, ma Kat, Rémi, Anne, Aurélia et Florian et leur belle famille. Un merci tout particulier à Roxane pour le soutien d'outre-manche.

Tack så mycket Ida!

Parce que je ne verrai jamais plus les boîtes de poivre sans penser Fufu et pour les excellents moments passés à tes côtés en France comme en Suède. Merci Ida.

¡ Muchas gracias Miguel !

Fue un verdadero placer conocerlo y trabajar con Usted. Gracias por tu humor y amabilidad. Nunca había pensado conocer la Pantera Rosa en persona durante mi doctorado. Como Usted ha dicho que es sólo una despedida, no adios. Espero tener la oportunidad de trabajar de nuevo a tu lado muy pronto. ¡ Cuidate !

Merci également à Yohann pour ta gentillesse, ta générosité, ta curiosité et ta bonne humeur. Tu as été un vrai compagnon des visites bourguignonnes et un épicurien du sucré (mais pas que !). A très vite !

Merci à Marion, la dernière arrivée du bureau 306 (ou devrais-je dire 41) et pas des moindres. Pour ta franchise, ta gentillesse, ta sensibilité, ta gaieté et tes atouts de pâtissière...un sincère merci ! Je te souhaite de t'éclater durant tes trois années de thèse et le meilleur pour la suite. Je suis certaine que nos chemins se croiseront à nouveau à Dijon, à Blois ou ailleurs.

« Au rendez-vous des bons copains, y'avait pas souvent de lapins...les copains d'abord. »

Cette thèse a également vu la surprenante rencontre de 3 poules au pays du charolais au près du radiateur d'un rital. Côt côté côté...bref merci aux deux poules pour les moments barrés, les discussions qui font du bien, les attentions qui réchauffent le cœur et les multiples coups de main. Marine, les champignons n'ont jamais été aussi tranquilles depuis ton départ auprès de ta moitié. Un immense merci pour les échanges philatéliques, culinaires, vestimentaires ou chantants... « tout tout tout est chez Grenouille et Chachou ! ». Dans la famille des Gallinacées, je demande la grande poule (et pas que de taille). Merci beaucoup Céline! Les mots me manquent...à toi l'as du trèfle, des plats viet et des karaokés endiablés un immense MERCI ainsi qu'à ton Nico, ton petit Léo pour les moments passés ensemble et ceux à venir !

Merci aux Mauriciens dijonnais !!

Au Nanou au cœur tendre, ami fidèle de ces trois ans, toujours partant pour les soirées et présent dans les bons comme les mauvais moments. To mank moi. A bientôt sous le soleil mauricien j'espère !

Un immense merci à mon pti frère mauricien, Flo. Quelle rencontre ! Je crois pouvoir dire que nous nous sommes entendus comme larrons en foire pour les soirées, les bouffes franco-mauriciennes, les joggings (même par froid de canard !), les discussions, j'en passe et des meilleurs...J'ai découvert en toi une personne qui a la main sur le cœur et toujours prête à venir à ma rescousse. Et même si mes remerciements ne « cassent pas la patte à un canard », je suis heureuse de t'avoir rencontrée et je te dis à très bientôt où que tu sois !

Grazie mille Leo !

Parmi les belles rencontres dijonnaises celle-là est certainement l'une des plus belles. Je suis contente d'avoir fait partie de ton séjour au pays de barbares et d'avoir partagé tous ces moments avec toi. A ramasser à la Couillère...c'est pas faux...tu vas me manquer. A toi l'italien épicurien au grand cœur un tantinet râleur merci pour tout !

Loin des yeux mais certainement pas loin du cœur

Un immense merci à toute ma famille qui a su me soutenir au cours de ces années d'étude. A Fabienne, Jean, mes oncles et tantes...merci beaucoup ! A ma mamie adorée au caractère sans pareil, merci de m'avoir toujours soutenue et d'être toi. Pensée non sans émotion pour mamie Solange partie trop tôt, je pense fort à toi.

A mes parents qui m'ont toujours soutenue dans mes choix, merci d'être présents pour moi. Les mots sont bien insuffisants.

A mon papa, le meilleur du monde sans aucun doute possible, merci pour tout !

A ma maman, nos chemins se sont séparés puis retrouvés, j'espère que nous nous donnerons les moyens que ce soit pour longtemps. Merci de ton soutien sans faille !

Je vous aime.

Un immense merci à Ma Lolo, ma puce que j'aime de tout mon cœur.

## Résumé

La fusariose vasculaire du cyclamen est une maladie causée par le champignon tellurique *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*. Elle est considérée comme l'une des maladies les plus graves du cyclamen et se traduit par des pertes atteignant jusqu'à 50 % de la production. Actuellement, les moyens de lutte ne permettent pas de contrôler la maladie. Dans ce contexte, une collaboration s'est engagée entre l'institut technique de l'horticulture, Astredhor, représentant les producteurs, l'INRA de Dijon pour son expertise sur *F. oxysporum* et la société Agrene pour son expertise en lutte biologique. Les objectifs de cette collaboration étaient doubles : i) identifier un marqueur spécifique de la forme spéciale *cyclaminis* et développer un outil de détection de l'agent pathogène permettant de mettre en place des méthodes de lutte appropriées ; ii) identifier un agent de lutte biologique efficace contre le pathogène. Le travail s'est donc structuré autour de ces deux objectifs.

Une collection de souches représentatives de la diversité des populations de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* a été constituée. Elle regroupe des souches provenant de collections internationales et des isolats obtenus de cyclamens symptomatiques ou non. L'analyse moléculaire de cette collection a permis de caractériser son importante diversité génétique et a mis en exergue la difficulté d'identifier un marqueur moléculaire spécifique. Néanmoins, un fragment d'ADN spécifique de l'agent pathogène a pu être mis en évidence par amplification aléatoire d'ADN polymorphe. A partir de ce fragment, un couple d'amorces spécifiques a été dessiné et un outil moléculaire a été développé. Ce dernier permet une détection du champignon *in planta* en PCR conventionnelle et en PCR en temps réel.

Parallèlement, une étude bibliographique approfondie relative aux méthodes de lutte biologique contre les fusarioses induites par *F. oxysporum* sur les plantes ornementales a été effectuée. Cette revue a souligné la possibilité d'utiliser des ressources d'origine microbienne et d'origine végétale pour contrôler *F. oxysporum*, mais cette stratégie impliquant une étape de sélection nous est apparue lourde et laborieuse. Nous avons opté pour une autre démarche visant à identifier, parmi des produits déjà sur le marché, ceux susceptibles de réduire significativement la gravité de la maladie. Des bioessais ont été conduits en serre, dans des conditions proches de celles de la production pour tester sept produits reposant sur la formulation de bactéries, de champignons ou de combinaisons de ces microorganismes. Les produits les moins performants ont été éliminés à l'issue d'un premier essai. Des bioessais ont été conduits à nouveau avec trois produits. Un seul de ces produits donne satisfaction mais son efficacité devra être validée en conditions de production réelles.

En conclusion, l'outil de détection spécifique permettra aux producteurs de s'assurer de la qualité sanitaire de la culture et des supports de culture. L'agent de lutte biologique retenu à l'issue de nos essais permettra dans un premier temps aux producteurs de prévenir le risque d'activité infectieuse de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*. Cependant, un travail de recherche d'un agent de lutte plus performant s'avère nécessaire. Des pistes sont proposées.

Mot-clés : *Cyclamen persicum*, diversité génétique, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, lutte biologique, marqueur moléculaire, moyen de lutte, outil moléculaire de détection, pathogénicité, RAPD-SCAR.



## Abstract

Fusarium wilt of cyclamen is one of the most damaging diseases of cyclamen. The causal agent, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, is a soil-borne fungus. Losses can reach more than 50 % of the production. Several methods of control are available, but none of them offer an efficient and environmentally friendly solution. In this context, a project was developed in collaboration with the French institute of horticulture, Astredhor, which represents the producers, the INRA of Dijon, for its expertise on *F. oxysporum* and the company Agrene for its expertise in biological control. The project has two goals: i) design a molecular marker specific of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* allowing a better management of the disease, ii) identify one or several efficient biological control agents.

A collection of strains representative of the diversity of *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* populations was made up with strains from international collections and isolates collected from symptomatic and asymptomatic cyclamens. A molecular study of the collection demonstrated the high genetic diversity of the *forma specialis*, which makes the identification of a specific molecular marker more complicated. However, a specific DNA fragment was identified by random amplified polymorphic DNA. A primer pairs was designed and a specific tool of detection was developed. Thanks to this tool, it is now possible to detect the fungus *in planta* by conventional and real-time PCR.

Simultaneously, a broad literature analysis on the biocontrol of ornamental plant diseases caused by *F. oxysporum* was performed. The review emphasized that biocontrol of *F. oxysporum* encompassed both microbial biocontrol agents and botanicals. To avoid the laborious and time-consuming screening step, we decided to assess the antagonistic activity of seven commercial products containing bacteria, fungi or a combination of both microorganisms. Greenhouse trials were performed under conditions similar to those of the production. First trial led to the exclusion of the less efficient products. Other trials were conducted with the three remaining products. Disease reduction was obtained with one of these products although it must be validated in production.

Finally, the molecular tool of detection will allow producers to insure the health status of the culture. In addition, the efficient biocontrol agent identified will prevent the disease progress for a while but more investigations are needed to obtain reliable, efficient and sustainable biocontrol agents. Proposals to improve Fusarium wilt control are discussed.

Keywords: biological control, *Cyclamen persicum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, genetic diversity, method of control, molecular marker, molecular tool of detection, pathogenicity, RAPD-SCAR.



## Table des matières

Résumé .....	1
Abstract.....	3
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des annexes.....	13
Liste des abréviations .....	15
Introduction générale .....	21
I. Le cyclamen .....	23
II. La fusariose vasculaire du cyclamen.....	29
III. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	31
III.1 Généralités .....	31
III.2 Les <i>Fusarium oxysporum</i> phytopathogènes .....	32
III.3 Diversité génétique de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	33
III.4 Détection des formes spéciales de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	36
IV. Moyens de lutte contre <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i> .....	38
V. Le projet de thèse .....	40
Chapitre I : Contrôle biologique des maladies des plantes ornementales causées par <i>Fusarium oxysporum</i> : une revue .....	41
I. Introduction .....	44
II. <i>Fusarium oxysporum</i> diseases on ornamentals .....	44
III. Control methods.....	48
III.1 Available control methods.....	48
III.2 Microorganisms to control <i>Fusarium oxysporum</i> .....	49
III.3 Botanicals to control <i>Fusarium oxysporum</i> .....	49

IV.	Biocontrol of <i>Fusarium oxysporum</i> on ornamentals.....	51
V.	Screening for candidates.....	53
VI.	Modes of action.....	54
VII.	Elaboration of the products.....	60
VIII.	Registration processes.....	61
IX.	Promising development and success stories.....	62
X.	Integrated disease management.....	63
XI.	Conclusion.....	64
 <b>Chapitre II : Matériels et méthodes.....</b>		<b>67</b>
I.	<b>Matériels.....</b>	<b>69</b>
I.1	Les souches microbiennes.....	69
I.1.1	Constitution d'une collection de souches de <i>Fusarium</i> isolées de cyclamen.....	69
I.1.2	Constitution d'une collection de souches microbiennes diverses.....	69
I.2	Les cultivars de cyclamens.....	78
I.3	Les agents de lutte biologique.....	78
II.	<b>Méthodes.....</b>	<b>78</b>
II.1	Analyses microbiologiques.....	78
II.1.1	Purification des souches et obtention de monospores.....	78
II.1.2	Conservation des souches.....	79
II.1.3	Production d'inoculum de <i>Fusarium</i> sp.....	79
II.1.4	Isolement de souches fongiques à partir de matériel végétal.....	80
II.1.5	Dénombrements microbiens.....	80
II.2	Caractérisation moléculaire.....	81
II.2.1	Extractions d'ADN.....	81
II.2.1.1	Extraction d'ADN fongique et végétal.....	81
II.2.1.2	Extraction d'ADN bactérien.....	81
II.2.1.3	Extraction d'ADN de tourbe.....	81
II.2.2	Dosage et conservation des ADN.....	83
II.2.3	Les amplifications par PCR.....	83
II.2.3.1	Généralités.....	83
II.2.3.2	L'espaceur transcrit interne (ITS).....	83
II.2.3.3	Le facteur d'élongation 1- $\alpha$ ( <i>EF-1<math>\alpha</math></i> ).....	85

II.2.3.4	L'espaceur intergénique (IGS) .....	85
II.2.3.5	La petite sous-unité ribosomique bactérienne (16S) .....	85
II.2.3.6	Les fragments clonés.....	85
II.2.3.7	La petite sous-unité ribosomique des plantes (28S) .....	87
II.2.4	Séquençage et analyses bioinformatiques .....	87
II.3	RAPD-SCAR .....	88
II.3.1	RAPD .....	88
II.3.2	Clonage .....	88
II.3.3	Recherche d'un SCAR .....	89
II.3.3.1	Recherche d'amorces spécifiques de Focv.....	89
II.3.3.2	Mise au point des conditions de PCR .....	89
II.3.3.3	Vérification de la spécificité des amorces .....	91
II.3.3.4	Mise au point des conditions de PCR en temps réel .....	91
II.3.4	Tests de sensibilité de l'outil moléculaire spécifique de Focv .....	91
II.3.4.1	Sur ADN de champignons et de tourbe.....	91
II.3.4.1	Sur tubercules contaminés en chambre climatique.....	93
II.4	Caractérisation de la pathogénicité de souches de <i>Fusarium</i> .....	93
II.4.1	Essai en serre .....	93
II.4.2	Essai en chambre climatique.....	95
II.5	Essais de lutte biologique.....	97
II.5.1	Essai de 2014.....	97
II.5.2	Essais de 2015.....	99
II.6	Traitement des données .....	100

**Chapitre III : *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*: une diversité génétique sous-estimée.....101**

**Chapitre IV : Développement d'un outil moléculaire de détection de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*.....115**

**Introduction .....**119

**Materials and Methods .....**125

Microbial isolates .....	125
Bioassay to evaluate the detection of Focv <i>in planta</i> .....	126
DNA extractions from microorganisms and plant tissues.....	126
RAPD analyses and amplification conditions .....	126
DNA cloning and sequencing.....	127

Design of SCAR primers and setting up of conditions for conventional PCR .....	127
Setting up of conditions for real-time PCR .....	129
<b>Results.....</b>	<b>131</b>
Development of a RAPD-SCAR based detection assay .....	131
Detection of Focy <i>via</i> real-time PCR.....	131
<b>Discussion.....</b>	<b>132</b>
<b>Chapitre V : Identification d'agents de lutte biologique efficaces contre <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i> .....</b>	<b>135</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>139</b>
<b>II. Matériels et méthodes.....</b>	<b>141</b>
<b>III. Résultats.....</b>	<b>143</b>
III.1 Vérification de l'identité et des concentrations des ALB.....	143
III.2 Premier essai : sélection d'agents de lutte biologique efficaces pour lutter contre Focy .....	143
III.3 Deuxième essai : confirmation des résultats de lutte biologique obtenus lors du premier essai.....	145
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>147</b>
<b>Chapitre VI : Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>151</b>
<b>I. Discussion générale.....</b>	<b>153</b>
<b>II. Perspectives.....</b>	<b>159</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>163</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>193</b>

## Liste des figures

### Introduction générale

<b>Figure 1</b> : Aires de répartition géographique des 22 espèces de <i>Cyclamen</i> .	22
<b>Figure 2</b> : Gravure du cyclamen provenant du cours complet d'agriculture de François Rozier.	22
<b>Figure 3</b> : Diversité de formes, motifs et couleurs de feuilles et fleurs des différentes espèces de <i>Cyclamen</i> .	24
<b>Figure 4</b> : Cycle de production du cyclamen en France.	24
<b>Figure 5</b> : Symptômes caractéristiques de fusariose vasculaire sur parties aériennes et sur tubercules de cyclamen.	28
<b>Figure 6</b> : Chronologie de l'apparition de la fusariose vasculaire du cyclamen dans le monde.	30
<b>Figure 7</b> : Structures de conservation et de dissémination <i>Fusarium oxysporum</i> .	30

### Matériels et méthodes

<b>Figure 8</b> : Carte de la région de l'espaceur intergénique ou intergenic spacer de l'ADN ribosomique.	86
<b>Figure 9</b> : Protocole et calendrier de la cinétique de détection de la fusariose du cyclamen.	92
<b>Figure 10</b> : Protocole et calendrier de l'essai de pathogénicité conduit en 2014 en serre dans une serre d'expérimentation d'Astredhor Seine-Manche à Mont-Saint-Aignan (76).	94
<b>Figure 11</b> : Protocole et calendrier du test de pathogénicité conduit en 2014 et 2015, dans une chambre climatique de l'INRA de Dijon.	94
<b>Figure 12</b> : Protocole et calendrier de l'essai de sélection d'agents de lutte biologique efficaces contre la fusariose du cyclamen.	98
<b>Figure 13</b> : Protocole et calendrier des essais de lutte biologique conduits simultanément en 2015 sur deux sites différents : à Bretenière et à Mont-Saint-Aignan.	98

### Chapitre V

<b>Figure 14</b> : Pourcentage de plantes levées selon les produits testés.	142
<b>Figure 15</b> : Pourcentage de plantes mortes selon les agents de lutte biologique et les rapports Focy/ALB testés lors du premier essai.	142

**Figure 16** : Sévérité de la maladie avec la souche Focy 43T3 et avec la souche Focy 14 pour chacun des trois produits et pour les différents rapports Focy/ALB testés dans le deuxième essai. 144

**Figure 17** : Evolution du pourcentage de plantes saines, c'est-à dire commercialisables, au cours du temps en présence de la souche Focy 43T3 et du produit 2. 146

## Annexe 5

**Figure 18** : Photographies des cyclamens inoculés avec différentes souches de *F. oxysporum* (pathogène ou non) ou inoculés à l'eau, à la fin de l'essai. 205

**Figure 19** : Comparaison des tubercules de cyclamen de trois modalités à la fin de l'essai en chambre climatique. 205

## Chapitre I

**Figure 1**: Symptoms caused by *Fusarium oxysporum* on ornamental plants: *Cyclamen* sp., *Mandevilla* sp., *Tulipa* sp., *Eustoma* sp., *Dianthus* sp., *Gladiolus* sp. 46

**Figure 2**: Dynamics of publishing on biocontrol of *Fusarium oxysporum* on ornamentals using microorganisms or botanicals over the years. 50

**Figure 3**: Most studied plant families to control *Fusarium oxysporum* on ornamentals. 50

**Figure 4**: Ranges of efficiency of biocontrol microorganisms evaluated *in vivo*. 52

## Chapitre III

**Figure 1**: Typical symptoms of *Fusarium* wilt on tuber and foliage of cyclamen. 105

**Figure 2**: Neighbour-joining tree of *Fusarium oxysporum* strains isolated from cyclamen, inferred from concatenated intergenic spacer (IGS) and translation elongation factor 1- $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) sequences. 111

## Chapitre IV

**Figure 1**: Sensitivity of the specific primers Focy F3/Focy R3 with concentrations ranging from 10 ng to 10 pg of DNA of three different strains of Focy. 130

## Liste des tableaux

### Matériels et méthodes

<b>Tableau 1</b> : Souches de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i> et isolats de <i>Fusarium</i> collectés à partir de cyclamens symptomatiques ou asymptomatiques.	70
<b>Tableau 2</b> : Souches de <i>Fusarium</i> , de champignons telluriques, de microorganismes pathogènes du cyclamen et isolats fongiques isolés de graines de <i>Cyclamen persicum</i> .	74
<b>Tableau 3</b> : Produits de protection des plantes ou de matière fertilisante utilisés dans cette étude.	77
<b>Tableau 4</b> : Amorces oligonucléotidiques utilisées dans cette étude.	82

### Chapitre V

<b>Tableau 5</b> : Composition et concentrations des produits de protection des plantes ou de matière fertilisante utilisés dans cette étude.	140
<b>Tableau 6</b> : Concentrations apportées en Focy et en produit, et rapports de concentration correspondant.	140

### Chapitre I

<b>Table 1</b> : List of ornamental plants affected by <i>Fusarium oxysporum</i> .	45
<b>Table 2</b> : Biocontrol microorganisms commercialized to control <i>Fusarium oxysporum</i> on ornamentals in the world.	56

### Chapitre III

<b>Table 1</b> : <i>Fusarium oxysporum</i> isolates analyzed in this study.	107
---	-----

### Chapitre IV

<b>Table 1</b> : Microbial strains used in this study.	120
--	-----



## Liste des annexes

<b>Annexe 1</b> : Liste des formes spéciales et races de <i>Fusarium oxysporum</i> .	192
<b>Annexe 2</b> : Composition des milieux utilisés dans cette étude.	198
<b>Annexe 3</b> : Protocole d'extraction d'ADN de <i>Fusarium</i> : minipréparation.	199
<b>Annexe 4</b> : Protocole d'extraction d'ADN de sol.	200
<b>Annexe 5</b> : Protocole de clonage.	201
<b>Annexe 6</b> : Evaluation de la pathogénicité de souches de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i> en chambre climatique.	202
<b>Annexe 7</b> : Article de vulgarisation intitulé «Fusariose du cyclamen : connaître, détecter et prévenir» et paru dans le journal Le lien horticole.	203
<b>Annexe 8</b> : Article de vulgarisation intitulé «Fusariose du cyclamen : vers un outil de détection précoce» et paru dans le journal Phytoma.	204
<b>Annexe 9</b> : Article de vulgarisation intitulé «Fusariose du cyclamen : travaux sur la lutte biologique» et paru dans le journal Phytoma.	205
<b>Annexe 10</b> : Chapitre d'ouvrage sur les souches de <i>F. oxysporum</i> non pathogènes.	206



## Liste des abréviations

Agrene : agriculture environnement études

ALB : agent de lutte biologique

AMM : autorisation de mise sur le marché

ASTREDHOR : association nationale des structures d'expérimentation et de démonstration en horticulture

AUDPC : aire sous la courbe de progression de la maladie (area under the disease progress curve)

BET : bromure d'éthidium

BSA : albumine sérique bovine (bovine serum albumin)

CLA : feuille d'œillet agar (carnation leaf agar)

CMA : milieu à la farine de maïs (corn meal agar)

*EF-1 $\alpha$*  : facteur d'élongation de la traduction 1- $\alpha$  (translation elongation factor 1- $\alpha$ )

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

ENA : european nucleotide archive

EO : huile essentielle (essential oil)

Focy : *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

Fosc : complexe d'espèces *Fusarium oxysporum*

Fucy : Fusariose du cyclamen

f. sp. : forme spéciale (*forma specialis*)

IGS : espaceur intergénique de l'ADN ribosomique (nuclear ribosomal intergenic spacer)

INRA : institut national de la recherche agronomique

IPTG : isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

ITL : institut technique du lin

ITS : espaceur interne transcrit de l'ADN ribosomique (internal transcribed spacer)

LB : Luria Bertani

LPGA : levure peptone glucose agar

MBA : microorganisme de lutte biologique (microbial biocontrol agent)

MIAE : micro-organismes d'intérêt agroenvironnemental

MLST : multilocus DNA sequence typing

NCBI : national center for biotechnology information

PDA : gélose dextrose à la pomme de terre (potato dextrose agar)

PDB : potato dextrose broth

PE : extrait végétal (plant extract)

PPP : produit de protection des plantes

PVPP : polyvinylpolypyrrolidone

RAPD : amplification aléatoire d'ADN polymorphe (random amplified polymorphic DNA)

Rpm : rotation par minute

SCAR : région amplifiée de séquence connue (sequenced characterized amplified region)

SDS : sodium dodecyl sulphate

SIX : protéine sécrétée dans le xylème (secreted in xylem)

ST : groupe de séquences (sequence type)

TAE : tris acétate EDTA

UFC : unité formant colonie (colony forming unit)

UMR : unité mixte de recherche

VCG : groupe de compatibilité végétative (vegetative compatibility group)





## Contexte du projet

Le projet «Fusariose du Cyclamen (FuCy) : détection précoce du risque et contrôle biologique», dont les résultats sont présentés dans ce manuscrit porte sur la recherche de solutions de contrôle de la fusariose du cyclamen en production. Les partenaires impliqués dans ce projet sont les suivants :

- Astredhor (association nationale des structures d'expérimentation et de démonstration en horticulture) : cette association est un institut technique qui fédère les stations d'expérimentation en horticulture ornementale depuis 1994. Il est organisé en 6 unités de bassins et 10 stations d'expérimentation. L'institut mène de façon coordonnée des essais régionaux et des programmes nationaux pour répondre aux attentes des adhérents. Ces derniers sont des producteurs, des entreprises du paysage, des distributeurs, des fournisseurs et des établissements d'enseignement. Les thématiques abordées par l'institut portent sur les techniques culturales, la diversification de la gamme de produits ainsi que leur qualité et la protection des cultures.

Le projet FuCy a été piloté scientifiquement par Fabien Robert de l'unité nationale d'Astredhor située à Paris. Une partie des travaux de ce projet a été réalisée à la station de Mont-Saint-Aignan de l'unité de bassin Astredhor Seine-Manche sous la direction d'Agnès Langlois et de Marc-Antoine Cannesan.

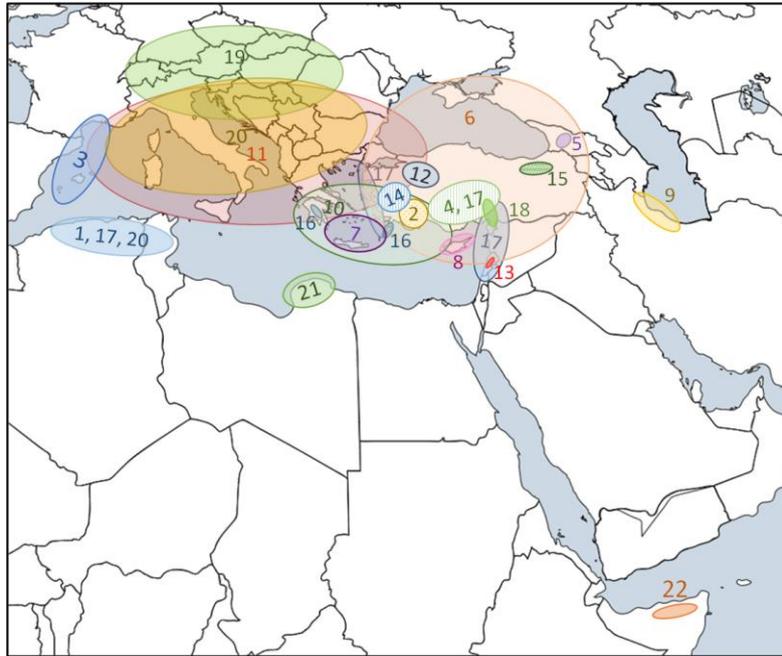
- INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) : l'institut développe des thématiques de recherche dans les domaines de l'alimentation, de l'agriculture et de l'environnement. Le projet a été mené au sein de l'équipe «écologie des champignons phytopathogènes d'origine tellurique» appartenant au pôle «interactions plantes microorganismes» (IPM), appartenant lui-même à l'unité mixte de recherche (UMR) Agroécologie 1347 de l'INRA de Dijon. L'équipe, animée par Christian Steinberg, axe ses recherches sur l'écologie des champignons d'origine tellurique et la recherche de solutions de lutte contre plusieurs champignons telluriques pathogènes. Elle s'appuie sur des études de diversité génétique et fonctionnelle de l'agent pathogène étudié et des communautés microbiennes de la rhizosphère des pathosystèmes associés. Les recherches engagées dans le projet FuCy ont été réalisées dans cette équipe sous la direction de Christian Steinberg avec le co-encadrement de Véronique Edel-Hermann.
- Agrene (agriculture environnement études) : la société, installée à proximité de Dijon, a pour but de mener des études, recherches et développement dans les domaines de l'agriculture et de l'environnement. Elle propose des prestations de service pour la protection des plantes, la qualité des sols et des récoltes et l'utilisation de microorganismes pour la dégradation de matériaux. Agrene apporte également son expertise pour la constitution de dossiers de réglementation et la rédaction de protocoles expérimentaux. Pendant la durée du projet, Claude Alabouvette a apporté son expertise scientifique et Christelle Cordier a mené un des essais du projet.

Ce projet a été développé pour répondre aux attentes de la profession horticole, démunie face à la fusariose du cyclamen. Pour apporter des solutions, les objectifs du projet sont les suivants :

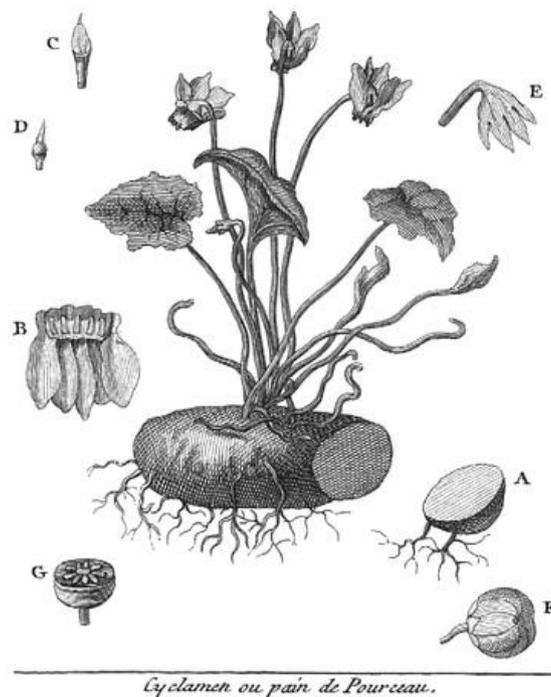
- Identifier un marqueur moléculaire spécifique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, responsable de la fusariose du cyclamen, pour permettre sa détection précoce en production
- Identifier un ou plusieurs agents de lutte biologique efficaces contre le pathogène

Le projet a débuté en février 2013. Les travaux menés et résultats obtenus sont présentés dans le présent manuscrit, après une brève introduction générale qui présente le cyclamen et la fusariose vasculaire du cyclamen, les *F. oxysporum* et leur diversité génétique, les outils de détection envisageables, ainsi que les moyens de lutte contre *F. oxysporum*.

# Introduction générale



**Figure 1 :** Aires de répartition géographique des 22 espèces de *Cyclamen* : *C. africanum* (1), *C. alpinum* (2), *C. balearicum* (3), *C. cilicium* (4), *C. colchicum* (5), *C. coum* (6), *C. creticum* (7), *C. cyprium* (8), *C. elegans* (9), *C. graecum* (10), *C. hederifolium* (11), *C. intaminatum* (12), *C. libanoticum* (13), *C. mirabile* (14), *C. parviflorum* (15), *C. peloponnesiacum* (16), *C. persicum* (17), *C. pseudibericum* (18), *C. purpurascens* (19), *C. repandum* (20), *C. rohlfsianum* (21), *C. somalense* (22). La figure a été réalisée d'après Grey-Wilson, 1997.



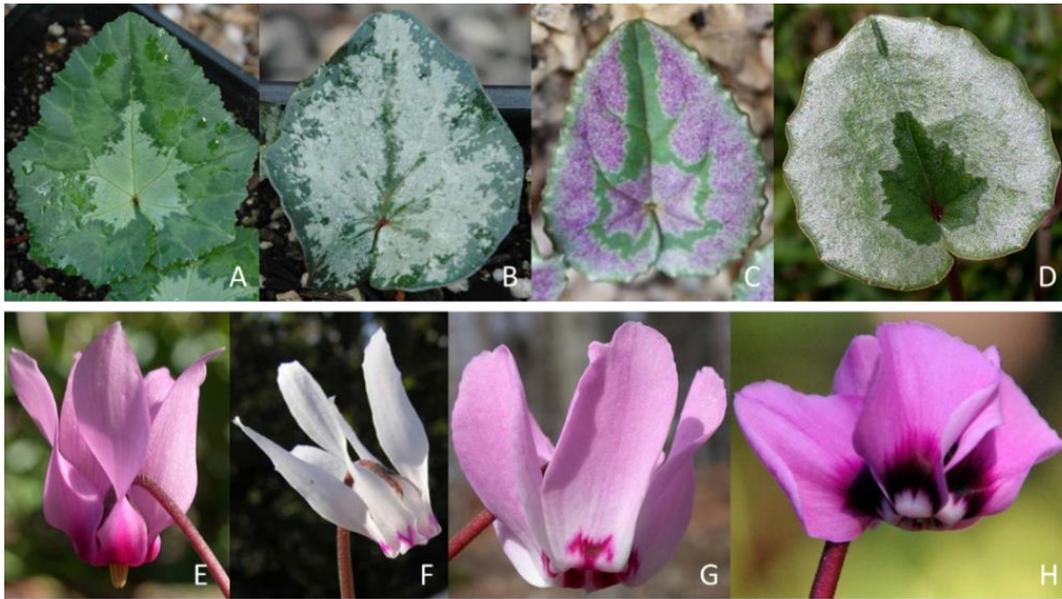
**Figure 2 :** Gravure du cyclamen provenant du cours complet d'agriculture de François Rozier (1784, p. 615-617). La figure présente : tubercule en coupe transversale (A), partie supérieure de la fleur vue intérieurement avec les 5 étamines (B), réunion des étamines autour du pistil (C), pistil posé sur l'embryon (D), fond du calice duquel sort le pistil (E), baie sphérique à une seule loge membraneuse s'ouvrant en 5 parties, renfermant des semences ovales, anguleuses et brunes (F), coupe latérale du fruit (G).

## I. Le cyclamen

Le genre *Cyclamen* appartient à la famille des Primulacées regroupant des plantes dicotylédones telles que les mourons, les primevères ou les soldanelles (Pax, 1889). Il comprend une vingtaine d'espèces de plantes vivaces majoritairement originaires du bassin méditerranéen (Figure 1) (Grey-Wilson, 1988). Ainsi, l'espèce la plus septentrionale est présente jusqu'en République Tchèque (*i.e.* *C. purpurascens*) et l'espèce la plus méridionale est présente en Somalie (*i.e.* *C. somalense*) (Grey-Wilson, 1986; Thulin et Warfa, 1989). Certaines espèces, comme *C. repandum*, ont une aire de répartition géographique large tandis que d'autres espèces, comme *C. colchicum*, présente uniquement dans une zone du Caucase, ou *C. balearicum*, présente uniquement dans les Baléares, sont endémiques (Grey-Wilson et Wilford, 1998; Debussche et Thompson, 2003). Certaines de ces espèces sont subdivisées en sous-espèces, en variétés voire en formes d'après leurs caractéristiques morphologiques (Grey-Wilson, 1997).

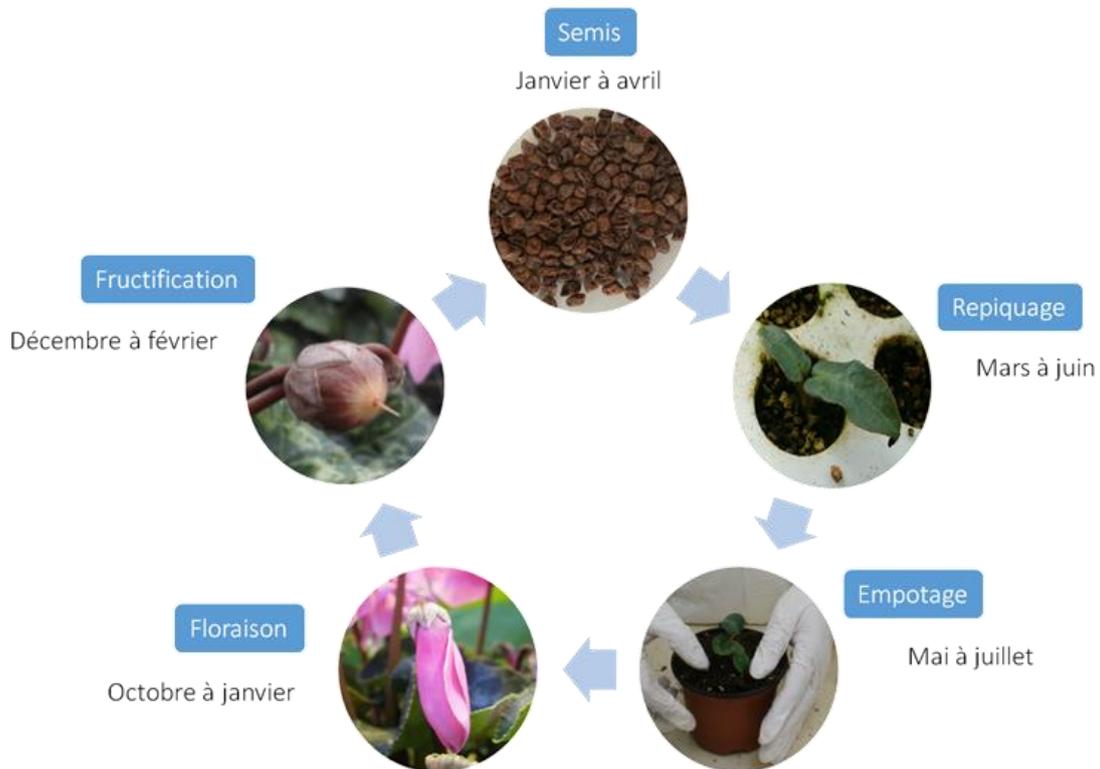
D'un point de vue botanique, le cyclamen (Figure 2) se distingue par un organe de réserve semi-souterrain appelé tubercule (Lamarck et Candolle, 1805). Il permet à la plante de rentrer en dormance pendant la période estivale (Wildmer et Lyons, 1985). Ses feuilles en forme de cœur présentent un motif en leur centre allant du vert au blanc en passant par l'argenté. Ses fleurs sont également remarquables puisqu'elles présentent une corolle ascendante sur le calice, donnant aux fleurs leur allure si caractéristique (Lamarck et Candolle, 1805). Les formes, couleurs et motifs des fleurs et feuilles de cyclamens sont très variés (Figure 3). De nombreuses études cytologiques ont été menées sur les différentes espèces de cyclamen (Bennett et Grimshaw, 1991; Ishizaka, 1994, 2003). Bien que la majorité des cyclamens soient diploïdes, certains cultivars sont polyploïdes. Le nombre de chromosomes décrits chez le cyclamen varie entre 20 et 96 selon les cultivars et/ou espèces (Grey-Wilson, 1997).

En considérant l'ensemble des espèces de cyclamen, il est possible de trouver un cyclamen en fleur à presque toutes les périodes de l'année. Ainsi, certaines espèces fleurissent en automne (*C. africanum*), beaucoup fleurissent l'hiver (*C. persicum*), certaines fleurissent au printemps (*C. balearicum*) et quelques-unes fleurissent l'été (*C. intaminatum*). Selon l'espèce considérée, la floraison peut intervenir 2 à 5 ans après le semis dans leur environnement naturel (Grey-Wilson, 1997). Le cyclamen est décrit comme allogame bien que l'autogamie ne soit pas totalement exclue (Affre *et al.*, 1995; Affre, 1996). Une fois la fleur fécondée, la corolle tombe et le fruit (capsule déhiscente) mûrit pendant que le pédoncule floral s'enroule progressivement sur lui-même. Lorsque la capsule atteint le sol, sa maturation est presque à terme. Le fruit finit par s'ouvrir et libère ainsi les graines (Germain, 1870). Les fourmis se chargent alors de les disséminer par attrait pour le mucilage sucré qui les recouvre (Hildebrand, 1898).



**Figure 3 :** Diversité de formes, motifs et couleurs de feuilles et fleurs des différentes espèces de cyclamen.

Les photographies présentent les feuilles et fleurs des espèces de cyclamen suivantes : *C. africanum* (A), *C. balearicum* (B), *C. hederifolium* (C), *C. cilicium* (D), *C. rohlfsianum* (E), *C. cyprum* (F), *C. libanoticum* (G), *C. coum* (H). Photographies d'Arnold Trachtenberg (F), de John T Lonsdale (C, D, E, G) et de Mary Sue Ittner (A, B, H).



**Figure 4 :** Cycle de production du cyclamen en France.

Le mot cyclamen dériverait du mot grec «κυκλάμινος» signifiant cercle ou couronne, se rapportant probablement à la forme circulaire de son tubercule (Miller, 1785). Le mot cyclamen peut également être employé comme adjectif pour qualifier une couleur. Dans la littérature, il est également possible de trouver le mot cyclame pour désigner un cyclamen (Cuvier, 1818). L'autre nom vernaculaire du cyclamen est «pain de pourceau» par référence à l'attrait des porcs pour cette plante (Jonghe, 1844). L'aspect peu commun des cyclamens a inspiré et inspire encore de nombreux auteurs et peintres.

*Cyclamen persicum* est la principale espèce de cyclamen commercialisée. Ce cyclamen dit «des fleuristes» a longtemps été surnommé à tort «cyclamen de Perse» alors qu'il provient des côtes méditerranéennes du Liban, de Syrie et de la Turquie et non pas de Perse (Iran). La culture du cyclamen débute pendant la première moitié du 17<sup>ème</sup> siècle. L'espèce est alors cultivée dans quelques jardins européens où elle fleurit après 3 à 4 ans de culture (Blasdale, 1954; Grey-Wilson, 1997). Ce n'est qu'au 19<sup>ème</sup> siècle que la culture se développe vraiment, les nouveaux cultivars permettent alors d'obtenir une floraison seulement 15 à 18 mois après le semis. A partir de cette période, la sélection variétale a permis de diversifier la gamme de coloris, de taille et de forme de fleurs et feuilles et de réduire la durée du cycle de production. Aujourd'hui, en conditions optimales, la floraison intervient 7 à 9 mois après semis. L'espèce se décline en de nombreux cultivars, séries et hybrides F1 (Grey-Wilson, 1997). Les autres espèces de cyclamen constituent d'attractives sources génétiques pour la sélection variétale. Dans la majorité des cas, les hybrides obtenus sont non viables ou stériles (Ishizaka et Uematsu, 1995; Ishizaka, 2008). L'hybridation interspécifique n'a d'ailleurs jamais été observée dans la nature. Les seuls cas où les hybrides obtenus se sont montrés viables correspondent aux croisements effectués entre des espèces ayant le même nombre de chromosomes (Grey-Wilson, 1997). Cependant, l'utilisation de la technique de culture *in vitro* de sauvetage d'embryon a permis d'outrepasser cette incompatibilité (Ishizaka, 2008).

En production, les cyclamens sont généralement semés de janvier à mars, voire avril, pour atteindre la floraison d'octobre à janvier selon les cultivars (Figure 4). Le semis est réalisé dans de la tourbe et les cyclamens doivent être placés en chambre de germination à 17-18 °C avec une humidité de 90 % pendant une vingtaine de jours à l'obscurité. Les jeunes plants sont ensuite placés en serre à une température de 18 à 20 °C. Après l'apparition de la première feuille, les plantules sont repiquées dans de plus grandes alvéoles pour permettre au tubercule et au système racinaire de bien se développer. Il est courant que cette première étape de culture soit réalisée chez des producteurs spécialisés parfois également obtenteurs. Les jeunes plants peuvent donc être vendus aux horticulteurs qui conduisent le reste de la culture jusqu'à la floraison (CNIH, 1986; Grey-Wilson, 1997). Environ 6 à 8 semaines après l'étape de repiquage, les jeunes plants sont repotés dans leurs pots finaux. Cette dernière étape de production est généralement menée à une température variant entre 15 °C et 18 °C.

Le cyclamen est une plante sensible aux variations de température. De trop fortes ou trop faibles températures sont responsables de l'entrée en dormance de la plante. Le substrat est lui aussi important, il doit être drainant, aéré et d'un pH neutre de préférence. Les tourbes sont généralement conseillées pour la culture de cyclamens (Grey-Wilson, 1997). La photopériode



n'a aucune influence sur la culture. Cependant, une forte quantité de lumière en intensité et en durée favorise la floraison. En conditions inverses, les plantes présentent une surface plus importante des limbes foliaires et une diminution du nombre de fleurs (Grey-Wilson, 1997; Cheon *et al.*, 2006).

Le cyclamen est majoritairement vendu comme plante fleurie en pot d'intérieur ou d'extérieur. Cependant, il est également possible, bien que plus rare, de l'acheter en fleurs coupées. Il est en vente dans les jardinerie et chez les fleuristes principalement durant le dernier trimestre de l'année. En France, au moment de la Toussaint, le cyclamen est la troisième plante la plus achetée après le chrysanthème et la bruyère (FranceAgriMer, 2015a). De manière générale, le cyclamen est la troisième plante fleurie en pot la plus achetée en France (8 % en 2014) après l'orchidée (20 %) et la jacinthe (13 %) (FranceAgriMer, 2015b). Historiquement, la production de cyclamen est principalement européenne, les principaux pays producteurs étant l'Allemagne, l'Italie et les Pays-Bas. Cependant, le cyclamen est également cultivé aux Etats-Unis, au Japon ou en Argentine (AIPH et Union Fleurs, 2011, Lori *et al.*, 2012). Très peu de données rendant compte de la production internationale ou européenne sont disponibles. A titre d'exemples, environ 22 millions de pots de cyclamen ont été produits en Allemagne en 2012 et au Japon en 2008 tandis que 35 millions de pots de cyclamen ont été produits en Italie en 2007 (FranceAgriMer, 2015b).

Plusieurs ravageurs et agents pathogènes peuvent endommager les cyclamens au cours de la production et les rendre impropres à la commercialisation. Le charançon de la vigne (*Otiorhyncus sulcatus*) est l'un des arthropodes les plus dangereux pour la culture. En effet, les adultes se nourrissent des feuilles et fleurs tandis que les larves consomment les racines et la base du tubercule (Smith, 1932; CNIH, 1986). Les autres arthropodes redoutés sont les larves des mouches des terreaux (*Bradysia* sp. et *Sciara* sp.), certains thrips (*Frankliniella occidentalis* et *Thrips tabaci*), l'acarier du cyclamen (*Phytonemus pallidus*) et les chenilles du papillon *Duponchelia fovealis* (CNIH, 1986; Grey-Wilson, 1997; Jagdale *et al.*, 2004; Pozzebon *et al.*, 2015).

Plusieurs microorganismes peuvent être responsables de maladies sur cyclamen. La pourriture du tubercule est due à la bactérie *Pectobacterium carotovorum*. Ce symptôme typique est accompagné du jaunissement du feuillage et de son flétrissement. Il s'agit de la seule maladie bactérienne fréquente chez le cyclamen (Chandrashekar et Diriwaechter, 1983; Grey-Wilson, 1997). Plus rarement, *Phytophthora tropicalis* est responsable d'un dessèchement de la partie aérienne de la plante. Cet oomycète détruit le système racinaire du cyclamen (Gerlach et Schubert, 2001). Des champignons comme *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola* ou *Colletotrichum* sp. peuvent également se développer au cours de la culture (Grey-Wilson, 1997; Someya *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2006). Cependant, les deux champignons les plus dangereux sur cyclamen sont *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* et *Botrytis cinerea* (Reimherr, 1985). Très polyphage, ce dernier provoque des taches sur feuilles, pétioles et fleurs et se développe en présence d'une forte humidité (CNIH, 1986; Kessel *et al.*, 1999).



Figure 5 : Symptômes caractéristiques de fusariose vasculaire sur parties aériennes et sur tubercules de cyclamen.

## II. La fusariose vasculaire du cyclamen

La fusariose du cyclamen et son agent causal *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Focv) furent décrits pour la première fois par Wolfgang Gerlach en 1930 (Gerlach, 1954). La maladie peut se déclarer soudainement à tout moment du cycle de culture bien qu'elle soit plus fréquente en fin de cycle de production (Tompkins et Snyder, 1972). Elle se caractérise par un jaunissement foliaire qui s'étend progressivement à l'ensemble du limbe. Le pétiole de la feuille atteinte flétrit puis la feuille tombe sur le bord du pot (Figure 5). Les premières feuilles symptomatiques sont les plus âgées. La maladie se déclare souvent d'un seul côté de la plante avant de se généraliser à la plante entière. Cependant, le flétrissement des parties aériennes ne constitue que les symptômes secondaires, les symptômes primaires se déclarant au niveau du tubercule. Une coupe transversale de cet organe de réserve révèle des ponctuations brunes plus ou moins abondantes au niveau des vaisseaux conducteurs qui sont caractéristiques de la fusariose du cyclamen (Rouxel et Grouet, 1974). Lorsque la maladie est bien avancée, du mycélium blanc peut parfois être observé à la surface du tubercule. Les symptômes de cette maladie peuvent parfois être confondus avec ceux dus à *P. carotovorum*. Cependant, une coupe du tubercule permet généralement d'affiner le diagnostic (Grouet, 1985).

Le champignon est présent dans le sol sous forme de propagules. A proximité de la racine, la propagule germe et l'hyphe adhère à la surface de la racine. Le champignon pénètre majoritairement au niveau des jonctions des cellules épidermiques (Lagopodi *et al.*, 2002). Il progresse ensuite entre les cellules végétales jusqu'à atteindre les vaisseaux du xylème qu'il colonise progressivement (Bishop et Cooper, 1983; Rodriguez-Galvez et Mendgen, 1995; Olivain et Alabouvette, 1999). A terme, le développement du champignon dans ces vaisseaux finit par les obstruer. La diminution du flux de xylème qui en résulte est responsable des symptômes de flétrissement typiques de la maladie. En conséquence, la maladie se déclare fréquemment lorsque de fortes chaleurs et une faible hygrométrie engendrent un important flux de xylème (Rattink, 1980). Par ailleurs, la température optimale de croissance de Focv se situe entre 27,5 °C et 30 °C (Pitta et Teranishi, 1979; Grouet, 1985; Rattink, 1986).

Les sources de contamination pendant le cycle de culture sont assez méconnues. La possible contamination des graines de cyclamen fait débat. Des tests ont montré que le champignon est absent des fleurs et des fruits de cyclamen. La contamination interne des graines est donc peu probable (Grouet, 1985). En revanche, l'ouverture de la capsule au niveau du sol laisse envisager qu'une contamination externe des graines est possible bien que cette hypothèse soit discutée (Gerlach, 1954; Tompkins et Snyder, 1972; Rattink, 1982). Après 3 à 4 mois de culture, il a été montré que 2 à 5 % des jeunes plants sont contaminés bien qu'asymptomatiques (Grouet, 1985). De plus, la période d'incubation de la maladie est parfois longue (Gerlach, 1954; Rouxel et Grouet, 1974). Par conséquent, le matériel végétal, bien qu'asymptomatique, peut héberger le champignon et être source de contamination pour les plantes adjacentes (Rattink, 1980). Dans ces circonstances, l'irrigation en circuit fermé ou par subirrigation est déconseillée (Grouet, 1985; Stelder, 1991; Minuto et Garibaldi, 1998).

## Introduction générale

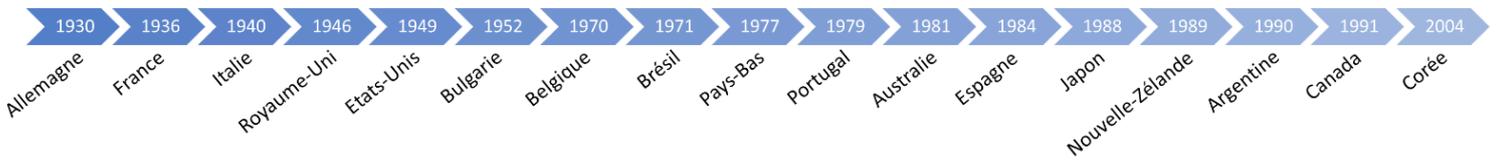


Figure 6 : Chronologie de l'apparition de la fusariose vasculaire du cyclamen dans le monde.

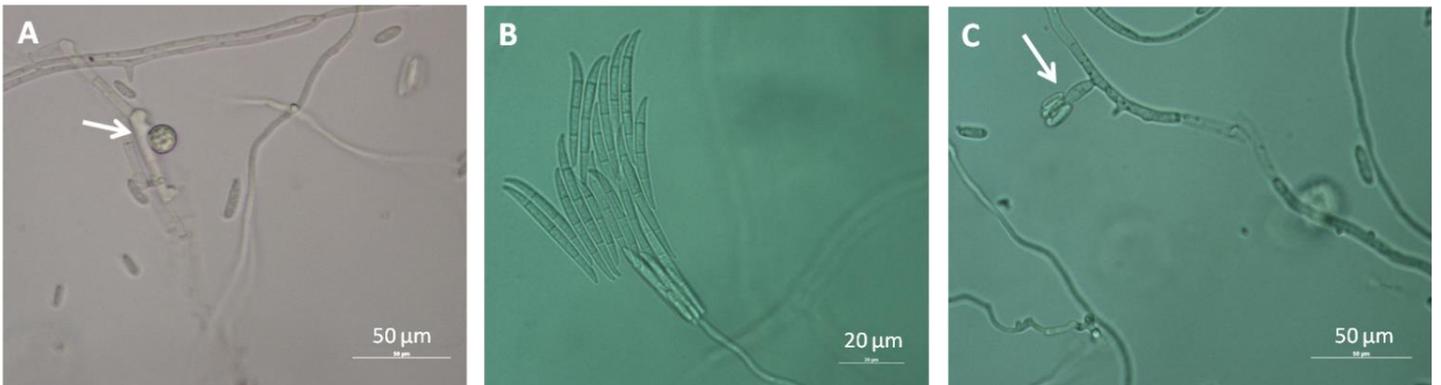


Figure 7 : Structures de conservation et de dissémination *Fusarium oxysporum*.

Les chlamydospores (A) de *F. oxysporum* permettent la survie du champignon dans le sol pendant plusieurs années. Ses macroconidies (B), en forme de fuseau, donnent son nom au genre fongique et ses microconidies (C), de forme ovoïde sont regroupées en «fausse-tête» sur un phialide.

Aucune étude ne s'est intéressée à la dissémination du champignon par les insectes. Cependant, pour d'autres *F. oxysporum* pathogènes de plante, il est communément accepté que les insectes sont vecteurs (Rekah *et al.*, 2001). Le matériel de culture (pot, tablard, serre) et le substrat sont aussi des sources potentielles de contamination (Rattink, 1980; Grouet, 1985).

En 1930, la maladie est observée et décrite pour la première fois dans la région berlinoise (Gerlach, 1954). En 1935, l'agent causal est alors nommé *F. oxysporum* f. sp. *aurantiacum* (Wollenweber et Reinking, 1935). En 1954, une autre souche du champignon responsable de fusariose est isolée, identifiée et nommée *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Gerlach, 1954). Ce n'est qu'en 1965 que les deux dénominations sont considérées comme synonymes et que le nom *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* est conservé (Gordon, 1965). Depuis son apparition, la maladie a été décrite dans de nombreux pays dans le monde (Figure 6).

L'impact de la maladie est tel que certaines exploitations sont contraintes d'arrêter la culture (Grouet, 1985). En 1972, Tompkins et Snyder rapportent la perte de la totalité de la production (50000-60000 plantes) dans des sites de production américains. Lorsque l'incidence de la maladie est considérée comme faible, 10 % de pertes peuvent être atteints tandis que dans les cas extrêmes les pertes atteignent jusqu'à 90 % (Orlicz-Luthardt, 1998). Cependant, dans la majorité des cas, les pertes atteignent entre 40 et 50 % (Elmer, 2002).

### III. *Fusarium oxysporum*

#### III.1 Généralités

*Fusarium oxysporum* est un champignon Ascomycète dont le téléomorphe n'a jamais été observé (Leslie et Summerell, 2006). L'espèce a été isolée de sols du monde entier (cultivés ou non) et sous tous les climats (arctique, tropical, désertique) (Joffe et Palti, 1977; Burgess, 1981; Kommedhal *et al.*, 1988; Mandeel *et al.*, 1995). Bien que l'espèce soit classiquement retrouvée dans les sols, elle est également isolée d'endroits plus insolites : circuit d'eau d'hôpitaux, eau de mer, eau de rivière, eau du robinet, lave-vaisselle (eau, produits détergents), lentilles de contact ou nourriture (Hageskal *et al.*, 2006; Imamura *et al.*, 2008; Palmero *et al.*, 2009; Sautour *et al.*, 2012; Bevilacqua *et al.*, 2013; Babič *et al.*, 2015). *F. oxysporum* est capable de croître en saprophyte dans le sol et d'y survivre pendant plusieurs années sous forme de structures de conservation : les chlamydospores (Figure 7) (Park, 1959). Lorsque le champignon se développe, il produit deux types de conidies qui assurent sa dissémination. Les microconidies, de petite taille (8-10 µm), ovoïdes et non septées, sont en général nombreuses et regroupées en «fausse-tête» sur des phialides portées par le mycélium. Les macroconidies sont plus grosses (jusqu'à 45 µm), en forme de fuseau et multiseptées, en bouquets sur des phialides terminales portées par des conidiophores (Burgess, 1981). Ces caractéristiques permettent l'identification de *F. oxysporum* au microscope (Leslie et Summerell, 2006).

L'espèce regroupe une grande diversité de souches qui peuvent être de simples saprophytes, des pathogènes opportunistes de l'homme ou des animaux et des souches

pathogènes de plantes (Park, 1959; Armstrong et Armstrong, 1981; Ortoneda *et al.*, 2004). Les souches qualifiées de «non pathogènes» sont des souches pour lesquelles aucune plante hôte n'a été identifiée. Ces souches ont la particularité d'être de très bonnes compétitrices (Couteaudier, 1990). Certaines sont d'ailleurs connues pour être antagonistes d'autres souches de *F. oxysporum* pathogènes de plantes et d'autres microorganismes phytopathogènes comme *Pythium ultimum*, *Phytophthora erythroseptica* et *Sclerotinia sclerotiorum* ou d'autres ravageurs de plante (Park, 1963; Paulitz *et al.*, 1987; Benhamou *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006; Dababat et Alexander, 2007). La souche de *F. oxysporum* Fo47, isolée d'un sol résistant aux fusarioses en 1978, est particulièrement bien connue (Alabouvette *et al.*, 1987). Cette souche s'est révélée un excellent agent de lutte biologique contre les fusarioses du lin, du melon, et de la tomate (Alabouvette *et al.*, 1993). Certaines souches de *F. oxysporum* non pathogènes sont également endophytes (Demers *et al.*, 2015). La grande plasticité écologique et la grande diversité de souches de l'espèce suscitent la curiosité des chercheurs depuis de nombreuses années.

### III.2 Les *Fusarium oxysporum* phytopathogènes

Les *F. oxysporum* phytopathogènes sont responsables de deux types de symptômes distincts : les flétrissements vasculaires et les pourritures des racines et/ou du collet (Gordon, 1965). Une grande diversité de plantes peut être atteinte de fusarioses causées par *F. oxysporum*. L'espèce a d'ailleurs été classée parmi le «top 10» des champignons phytopathogènes, sur la base de son importance économique et de son intérêt scientifique (Dean *et al.*, 2012). Cependant, si le champignon est polyphage à l'échelle de l'espèce, il n'en est rien à l'échelle de la souche. En effet, chaque souche de *F. oxysporum* phytopathogène montre une grande spécificité d'hôte. Les souches sont classées en formes spéciales selon l'espèce végétale infectée. Les formes spéciales sont parfois subdivisées en races, dénommées par rapport aux gènes de résistance qu'elles sont capables de contourner (Armstrong et Armstrong, 1981; Gordon et Martyn, 1997). Le nombre de races par forme spéciale varie de deux, comme pour la forme spéciale *conglutinans*, à six comme c'est le cas dans la forme spéciale *vasinfectum* (Correll, 1991; Holmes *et al.*, 2009). Cependant, pour certaines formes spéciales, et notamment *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, aucune race n'a été identifiée bien que des différences d'agressivité entre souches aient été constatées (Rattink, 1986; Elmer et Daughtrey, 2012).

Actuellement, plus de 150 formes spéciales et races sont décrites au sein de l'espèce *F. oxysporum* (Annexe 1). Cependant, certaines souches pathogènes sont décrites dans la littérature sans qu'un nom de forme spéciale leur soit systématiquement associé (Bullock *et al.*, 1998; Elmer *et al.*, 2007; Bertetti *et al.*, 2012, 2013; Elmer et Marra, 2015). Le nombre de formes spéciales et races de *F. oxysporum* est donc certainement bien plus important. Dans certains cas, la notion de spécificité d'hôte qui définit une forme spéciale est ambiguë. En effet, chez les Cucurbitacées et chez certaines plantes ornementales, des cas de pathogénicité croisée ont été observés (Martyn et Vakalounakis, 2012; Gullino *et al.*, 2015). Par exemple, la

forme spéciale *chrysanthemi*, responsable de la fusariose du chrysanthème, peut également être pathogène d'autres espèces de la famille des Asteracées telles que *Argyranthemum frutescens*, *Gerbera jamesonii* et *Osteospermum* sp. (Minuto *et al.*, 2007). Dans ces cas particuliers, la forme spéciale ne serait pas inféodée à une espèce mais plutôt à une famille végétale.

L'impact économique de *F. oxysporum* est important de par la diversité de ses plante-hôtes. En effet, des cultures aussi importantes que la tomate, le coton, la vanille, le lin ou le concombre peuvent être attaquées. L'un des exemples les plus notables est certainement la fusariose du bananier (Panama disease) causée par *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Pendant la première moitié du 20ème siècle, la maladie a décimé les bananeraies de Centre Afrique et des Caraïbes et est considérée comme étant la plus importante sur la banane. Le marché mondial de la banane n'a été sauvé que par l'introduction du cultivar Cavendish, résistant au pathogène (Stover, 1962). De même, le développement de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* dans les plantations de vanille est le principal facteur limitant la production mondiale (Tombe et Liew, 2010).

Si un œil entraîné peut différencier *F. oxysporum* d'autres espèces de *Fusarium* au microscope, il n'est pas possible d'en faire autant avec deux souches de *F. oxysporum*. Ainsi, des souches partageant les mêmes caractéristiques morphologiques peuvent être pathogènes de la tomate, agent de lutte biologique ou pathogène opportuniste de l'homme. La différenciation des souches de *F. oxysporum* et l'identification des formes spéciales sont très importantes pour pouvoir comprendre l'écologie des populations pathogènes et l'épidémiologie des maladies. De cette identification va également dépendre la mise en place de mesures de lutte adaptées. Pour l'instant, seuls les tests de pathogénicité sur plantes et la vérification des postulats de Koch permettent d'identifier la forme spéciale d'appartenance d'une souche (Leslie et Summerell, 2006). Cependant, les tests de pathogénicité sont très chronophages. Par exemple, un tel test prend entre 4 et 6 mois sur dattier des Canaries (*F. oxysporum* f. sp. *canariensis*) et entre 8 à 12 mois sur palmier à huile (*F. oxysporum* f. sp. *elaeidis*) (Priest et Letham, 1996; Abadie *et al.*, 1998).

Bien que les outils moléculaires puissent permettre d'identifier des marqueurs génétiques spécifiques de certains taxons, rares sont les formes spéciales de *F. oxysporum* pour lesquelles un tel marqueur de détection est disponible. Leur mise en évidence offrirait un moyen plus rapide, plus sensible, plus reproductible et moins cher pour détecter spécifiquement une forme spéciale, mais nécessite au préalable, la connaissance de la diversité génétique de la forme spéciale considérée.

### III.3 Diversité génétique de *Fusarium oxysporum*

Historiquement, la diversité génétique de *F. oxysporum* a été étudiée *via* la détermination de groupes de compatibilité végétative ou vegetative compatibility groups (VCG) (Katan, 1999). Cette technique, d'abord utilisée chez *Aspergillus nidulans*, a été mise en place pour *F. oxysporum* par Puhalla en 1985. Elle se base sur la confrontation en boîtes de Petri de souches mutées dans des gènes du métabolisme du nitrate sur un milieu carencé en nitrate. Deux

souches mutées capables de compléter et de former un hétérocaryon (*i.e.* formé par l'anastomose puis la fusion de deux hyphes) sont regroupées dans le même VCG (Puhalla, 1985). L'hétérocaryon est une cellule multinucléée au sein de laquelle des échanges d'ADN peuvent intervenir. Lorsqu'aucun hétérocaryon n'est obtenu avec une souche donnée, celle-ci ne peut être associée à un VCG et est dite auto-incompatible (Heterokaryon Self-Incompatibility, HSI) (Leslie, 1993). Les tests de compatibilité végétative ont été utilisés pour caractériser de nombreuses formes spéciales (Baayen *et al.*, 1998; Lori *et al.*, 2004; Abo *et al.*, 2005) et une nomenclature des VCG a été définie (Katan, 1999). Le nombre de VCG par forme spéciale peut varier de 1, comme dans le cas de la forme spéciale *albedinis*, à 24 pour la forme spéciale *cubense* (Katan, 1999). Il est compliqué d'établir une relation entre forme spéciale, race et VCG. En effet, si dans certains cas une race correspond à un VCG, comme pour *F. oxysporum* f. sp. *raphani*, d'autres exemples montrent qu'une race peut grouper plusieurs VCG, comme c'est le cas pour la race 1 de la forme spéciale *niveum* (Jacobson et Gordon, 1988; Correll, 1991). Les VCG sont très utiles pour décrire la proximité génétique entre souches puisqu'ils permettent d'atteindre un niveau clonal. Cependant, ils ne permettent pas de révéler les relations génétiques entre VCG (Kistler, 1997). De plus, cette technique est laborieuse et très chronophage. Bien que la détermination des VCG ait longtemps été la méthode de référence pour la caractérisation des populations pathogènes de *F. oxysporum*, elle est actuellement moins utilisée.

Le développement des techniques moléculaires a permis de progresser dans la caractérisation de la diversité génétique de *F. oxysporum*. De nombreux marqueurs moléculaires, correspondant à des régions codantes ou non codantes du génome, existent et permettent d'atteindre différents niveaux de discrimination. Actuellement ils sont principalement utilisés en comparant les séquences de produits d'amplification obtenus par PCR (polymerase chain reaction). Ainsi, l'espaceur interne transcrit (internal transcribed spacer, ITS) de l'ADN ribosomique (ADNr), classiquement considéré comme le code-barres des champignons permet généralement de différencier les espèces fongiques (O'Donnell et Cigelnik, 1997; Schoch *et al.*, 2012). Chez *Fusarium*, la région ITS n'est cependant pas suffisante ni pour différencier certaines espèces proches ni pour mener des études de phylogénie (O'Donnell et Cigelnik, 1997). En revanche, de récentes études ont montré que certains gènes sont plus informatifs. Ainsi les gènes de la plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase II (RNA polymerase II largest subunit, *RPB1*) et celui de la deuxième plus grande sous-unité de l'enzyme (RNA polymerase II second largest subunit, *RPB2*) sont plus informatifs pour comprendre l'évolution des champignons en général et de *Fusarium* en particulier (Schoch *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2013). L'utilisation de certains de ces marqueurs moléculaires a d'ailleurs montré que l'espèce morphologique *F. oxysporum* peut être qualifiée de complexe d'espèces (O'Donnell *et al.*, 2009). D'autres marqueurs moléculaires permettent d'atteindre un niveau de polymorphisme plus fin et de révéler la diversité intraspécifique de *F. oxysporum* (Alves-Santos *et al.*, 1999; Mbofung *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2015). Ces marqueurs peuvent être des gènes codant des protéines connues pour leur implication dans le pouvoir pathogène (xylanase, polygalacturonase), des gènes dits de «ménage» (facteur d'élongation de la traduction 1- $\alpha$  (*EF-*

1 $\alpha$ ),  $\beta$ -tubuline), des régions d'ADN non codant comme l'espaceur intergénique (IGS, intergenic spacer) de l'ADNr (Jiménez-Gasco *et al.*, 2002; Hirano et Arie, 2009; Holmes *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2009; Demers *et al.*, 2014). L'utilisation de la région *EF-1 $\alpha$*  a permis de décrire 46 groupes génétiquement différents au sein d'une collection de 205 souches de *F. oxysporum* isolées de 26 sols non cultivés en Australie (Laurence *et al.*, 2012). La combinaison de différents marqueurs moléculaires (multilocus DNA sequence typing) permet d'atteindre un niveau de discrimination génétique encore plus important et de rassembler les souches en génotypes ou sequence type (ST) (Demers *et al.*, 2014). Ainsi chez *F. oxysporum*, de nombreuses études ont combiné l'utilisation des marqueurs *EF-1 $\alpha$*  et IGS (Poli *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). O'Donnell *et al.* (2009) ont ainsi identifié 256 ST parmi 850 isolats de *F. oxysporum*. Des techniques d'amplification aléatoires comme les techniques de RAPD (random amplified polymorphic DNA) ou d'AFLP (amplified fragment length polymorphism) ont également été appliquées à l'étude de la diversité de nombreuses formes spéciales de *F. oxysporum* (Sivaramakrishnan *et al.*, 2002). L'étude combinée de marqueurs moléculaires et de la technique de VCG a d'ailleurs confirmé que cette dernière permet d'atteindre un niveau de discrimination clonal (Steinberg *et al.*, 1997; Baayen *et al.*, 1998). L'ensemble de ces outils a permis d'analyser la diversité des populations pathogènes et saprophytes de *F. oxysporum*.

De nombreuses études portant sur les souches de *F. oxysporum* pathogènes ont montré que certaines formes spéciales seraient monophylétiques (*i.e.* ayant une seule origine évolutive) tandis que d'autres seraient polyphylétiques (*i.e.* ayant plusieurs origines évolutives) (O'Donnell *et al.*, 1998; Baayen *et al.*, 2000). Dans le cas des formes spéciales polyphylétiques, le pouvoir pathogène aurait été acquis plusieurs fois au cours de l'évolution et de façon indépendante au sein des populations de *F. oxysporum* non pathogènes ou *via* le transfert horizontal de gènes (O'Donnell *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2010). Pour citer quelques exemples, les formes spéciales *cubense*, *gladioli* et *vasinfectum* sont polyphylétiques tandis que les formes spéciales *spinaciae*, *radicis-cucumerinum* et *tulipae* sont monophylétiques (O'Donnell *et al.*, 1998; Vakalounakis et Fragkiadakis, 1999; Baayen *et al.*, 2000; Skovgaard *et al.*, 2001). Dans le cas de *Foc*, seules deux études ont été menées ; la première il y a 20 ans portait sur une collection de 53 souches provenant de 7 pays ; la seconde plus récente comportait 64 souches uniquement argentines. La première étude suggère que la forme spéciale *cyclaminis* serait polyphylétique (Woudt *et al.*, 1995; Lori *et al.*, 2012).

Les analyses qui ne se limitent pas à une forme spéciale donnée mais plus généralement aux *F. oxysporum* d'un environnement complexe révèlent une diversité intraspécifique particulièrement importante (Edel *et al.*, 2001; Lori *et al.*, 2004; Edel-Hermann *et al.*, 2015). Une étude portant sur 151 souches de *F. oxysporum* associées à l'œillet a révélé que les 129 souches non pathogènes de l'œillet se distribuent parmi 97 VCG et les 22 souches de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* se regroupent en un seul VCG (Lori *et al.*, 2004). Un récent travail a porté sur la diversité génétique des populations de *F. oxysporum* associées à un champ de tomate (Demers *et al.*, 2015). L'utilisation du gène *EF-1 $\alpha$*  a révélé la grande diversité génétique présente dans les différents sols ainsi que dans les plants de tomate. Ainsi, la diversité des *F. oxysporum* endophytes par plante était de 4,2 génotypes en moyenne.

Certaines souches de *F. oxysporum* pathogènes sont génétiquement plus proches de souches de *F. oxysporum* non pathogènes ou appartenant à une autre forme spéciale que de souches de la même forme spéciale (Kistler, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998). Il faut en effet rappeler que les isolats d'une forme spéciale donnée n'ont pas systématiquement de lien clonal puisque l'affectation d'une souche à une forme spéciale se fait uniquement sur la base de sa capacité à être pathogène d'une plante hôte donnée. La diversité génétique des formes spéciales polyphylétiques complique donc leur possible discrimination par des outils moléculaires. Dans ces circonstances, l'étude de la diversité génétique de la forme spéciale est un prérequis indispensable à la recherche d'un marqueur moléculaire spécifique, fiable et pérenne.

### III.4 Détection des formes spéciales de *Fusarium oxysporum*

Peu d'informations sont disponibles concernant le déterminisme génétique du pouvoir pathogène des formes spéciales de *F. oxysporum*. En 2005, une protéine sécrétée dans le xylème (secreted in xylem, SIX) de la tomate par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a été mise en évidence. La même étude a montré qu'elle est impliquée dans le pouvoir pathogène de la forme spéciale (Rep, 2005). D'autres gènes codants des enzymes (chitine synthase,  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase, endopolygalacturonase), des facteurs de transcription ou des protéines impliquées dans la transduction de signaux (protéine G, kinase) sont des déterminants du pouvoir pathogène de *F. oxysporum* (Di Pietro et Roncero, 1998; Di Pietro *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2002; Caracuel *et al.*, 2005; Martín-Urdíroz *et al.*, 2008; Michielse *et al.*, 2009). L'étude des génomes de différentes souches de *F. oxysporum* doit permettre de mieux comprendre les déterminants de la pathogénicité de l'espèce. En 2010, une étude comparative a été menée sur les génomes d'une souche de *F. verticillioides*, une souche de *F. graminearum* et une souche de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. L'étude a montré que le génome de *F. oxysporum* comprend 60 Mb réparties en 15 chromosomes. Mais l'information la plus surprenante et la plus intrigante est certainement la présence d'un «core genome», commun aux trois espèces, et d'un «accessory genome» présent uniquement chez *F. oxysporum* et représentant 40 % de son génome. Il comprend des chromosomes riches en éléments transposables ainsi que des gènes impliqués dans la pathogénicité (des effecteurs) (Ma *et al.*, 2010). Ces chromosomes surnuméraires ont été acquis par transfert horizontal et détermineraient la spécificité d'hôte des souches de *F. oxysporum* pathogènes. Ils auraient joué un rôle important dans le caractère polyphylétique des spécificités d'hôte de *F. oxysporum* et dans l'émergence de nouvelles souches pathogènes (Ma *et al.*, 2013; Ma, 2014). Par la suite, une étude similaire a été mise en place pour comparer les génomes de différentes souches de *F. oxysporum* et comprendre la plasticité génétique du complexe d'espèces aboutissant ou non à la virulence d'une souche (Ma *et al.*, 2013). Depuis, le Broad Institute a séquencé le génome de 10 autres souches de *F. oxysporum* appartenant aux formes spéciales *conglutinans*, *cubense*, *lycopersici*, *melonis*, *pisi*, *radicis-lycopersici*, *raphani* et *vasinfectum*, ainsi qu'une souche antagoniste et une souche pathogène de l'homme. Ce projet est toujours en cours et permettra de comprendre ce qui

différencie une souche pathogène d'une souche non pathogène pour pouvoir développer des outils de détection.

Dans certains cas, des outils de détection ont été définis à partir des gènes identifiés comme impliqués dans la pathogénicité. C'est par exemple le cas pour le gène SIX1 à partir duquel un couple d'amorces a été dessiné et permet de détecter spécifiquement les races 1, 2 et 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Rep *et al.*, 2004). De même, les séquences des gènes codant une endopolygalacturonase et une exopolygalacturonase ont permis de définir deux couples d'amorces spécifiques des races 2 et 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et de la forme spéciale *radicis-lycopersici* respectivement (Hirano et Arie, 2006). Une autre stratégie se base sur l'amplification par PCR de séquences d'éléments transposables. Ainsi, des amorces de détection des formes spéciales *albedinis* et *chysanthemi* ont été développées en utilisant les régions flanquantes du transposon *Fot1* (Fernandez *et al.*, 1998; Pasquali *et al.*, 2004). Cependant, les principales méthodes utilisées pour définir un outil de détection spécifique se basent sur la mise en évidence aléatoire de différences génétiques entre souches (Kelly *et al.*, 1998; Garcia-Pedrajas *et al.*, 1999; Chiocchetti *et al.*, 2001). Par exemple, la technique de RAPD consiste à amplifier de l'ADN par PCR avec de courtes amorces afin de générer un profil d'amplification multi-bandes permettant de révéler un polymorphisme entre souches. Le manque de reproductibilité de cette technique est souvent pallié par la définition d'amorces à partir du fragment d'ADN identifié (sequenced characterized amplified region, SCAR). La combinaison des techniques de RAPD et de SCAR permet d'aboutir à une détection plus simple et plus fiable de la cible (Lievens *et al.*, 2008). Ces techniques ont permis de mettre au point des outils de détection pour plusieurs formes spéciales ou races telles que les formes spéciales *cucumerinum* et *radicis-cucumerinum* (Lievens *et al.*, 2007). Pour cela, 115 oligonucléotides ont été utilisés et les profils d'amplification ont été analysés. Les fragments d'ADN d'intérêt (*i.e.* présents uniquement pour le pathogène souhaité) ont été séquencés et un couple d'amorces a été défini pour chacune des deux formes spéciales. Les marqueurs moléculaires obtenus peuvent permettre une détection sur différentes matrices telles que l'eau ou la plante (Kelly *et al.*, 1998; Lievens *et al.*, 2007).

En 1995, une étude a été menée sur la diversité génétique de Focv. Les 53 souches de l'étude ont été réparties dans 3 VCG (Woudt *et al.*, 1995). Une étude plus récente décrit 5 VCG parmi les 64 souches de Focv isolées d'Argentine mais sans intégrer dans l'étude des représentants des 3 VCG de la précédente étude (Lori *et al.*, 2012). Cependant, aucun marqueur moléculaire spécifique de Focv n'a été identifié pour l'instant. C'est la raison pour laquelle, la recherche d'un tel marqueur pour identifier spécifiquement Focv constitue l'un des objectifs de ce projet.

#### IV. Moyens de lutte contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

Le développement d'un outil moléculaire de détection de Focv permettrait de mieux connaître la propagation du pathogène en production. De plus, le développement d'un outil de détection en production permettrait d'adapter la lutte contre le pathogène à chaque situation. Cependant, peu de méthodes permettent une lutte efficace contre la maladie.

La mise en place de toute mesure permettant de prévenir l'introduction et la dissémination du champignon dans les exploitations est fortement recommandée. Ces mesures passent par l'utilisation de matériel végétal sain, ce qui nécessite de pouvoir détecter le champignon où qu'il soit de façon spécifique. Or, pour l'instant, seuls les tests sur cyclamen permettent d'identifier les souches de Focv. Les plantes symptomatiques doivent être rapidement évacuées et détruites et le matériel contaminé doit être nettoyé. L'entretien d'un bon état sanitaire des sites de production et du matériel utilisé (semoir, pot, système d'irrigation) est primordial (Elmer et Daughtrey, 2012). Par ailleurs, le substrat utilisé joue également un rôle sur l'expression de la maladie. En effet, il a été montré que l'incidence de la maladie est plus élevée dans de la tourbe ou dans un mélange désinfecté de différents substrats (tourbe, sol, fumier et feuilles de hêtre) que dans un substrat à base de compost (Garibaldi, 1987). Enfin, le pH semble également être un facteur favorable au pathogène puisque la maladie est plus importante lorsque le pH du substrat est acide, tandis que le nombre de plantes malades est diminué lorsque le pH du substrat est neutre (Gerlach *et al.*, 1997; Elmer et Daughtrey, 2012).

La sélection variétale serait probablement l'un des meilleurs moyens de lutte contre ce pathogène. Des tests ont été menés sur différentes espèces (*C. coum*, *C. graecum*, *C. hederifolium*, *C. persicum*, *C. purpurascens*) et sur des hybrides interspécifiques de cyclamen (*C. persicum* x *C. purpurascens*) afin de déterminer si des sources de résistance existent. Ils ont mis en évidence des différences de sensibilité à la maladie. Les espèces *C. graecum* et *C. purpurascens* ainsi que certains hybrides sont effectivement moins sensibles à la maladie. Cependant, si des sources de résistance ont été identifiées chez d'autres plantes hôtes de *F. oxysporum* comme chez la tomate, aucune résistance totale n'a été identifiée chez le cyclamen (Huang et Lindhout, 1997; Orlicz-Luthardt, 1998). Pour l'instant, la lutte variétale ne permet pas d'apporter une solution contre la fusariose vasculaire du cyclamen.

Des molécules chimiques comme l'azoxystrobine ou le bromure de méthyle, sont ou ont été utilisées comme fongicide ou pour désinfecter le substrat respectivement (Gullino *et al.*, 2002; Elmer et Daughtrey, 2012). L'apport d'azoxystrobine au rempotage a permis de limiter le pourcentage de plantes mortes à 36 % contre 89 % sans aucun traitement (Gullino *et al.*, 2002). En 1986, Rattink a testé le chlorothalonil, le thiophanate-méthyl, le tolylfluanide et le bénomyl pour lutter contre Focv. Le bénomyl a permis de limiter les pertes à 54 % de plantes contre 80 à 90 % sans traitement. Cependant, les résultats obtenus avec les molécules chimiques ne sont pas suffisants et ne permettent pas une action curative (Elmer et McGovern, 2004). Les applications sont donc souvent préventives en cours de culture et avant la commercialisation. La suppression de molécules chimiques du marché limite d'autant plus l'utilisation de la lutte chimique. En France, les substances actives fréquemment utilisées sont le thiophanate-méthyl,

l'azoxystrobine et le fludioxonil (Eyraud production, Morel). De plus, plusieurs études ont montré que la lutte chimique peut être plus efficace si elle est combinée avec la lutte biologique (Minuto *et al.*, 1995; Daughtrey et Tobiasz, 2004; Elmer et McGovern, 2004).

La lutte biologique se définit comme l'utilisation d'agents ou de produits naturels qui nuisent à des ravageurs de plantes ou à des microorganismes pathogènes de plantes. Cette définition inclut les macroorganismes (insectes, acariens, nématodes), les microorganismes (*i.e.* champignons, bactéries, virus), les médiateurs chimiques (phéromone, kairomone) et les substances naturelles (extraits de plantes, huiles essentielles) (Directive européenne 2009/128/CE). L'utilisation de microorganismes pour lutter contre d'autres microorganismes phytopathogènes n'est pas récente. En effet, dès 1892, il est constaté que l'incidence de la fusariose vasculaire varie selon les sols (Atkinson, 1892). Un sol dans lequel l'incidence d'une maladie est faible malgré la présence du pathogène est dit «résistant». Dès lors, de nombreuses études ont cherché à connaître la raison de cette résistance. Dans les années 1960, des études ont porté sur le rôle de facteurs abiotiques (*i.e.* la composition minéralogique du sol) sur ce phénomène (Stover, 1962; Stotzky et Martin, 1963). Quelques années plus tard, des études se sont intéressées au rôle de facteurs biotiques dans la résistance des sols (Smith, 1971; Toussoun, 1975). Lorsque des souches de microorganismes antagonistes ont été identifiées comme impliquées dans cette résistance, l'apport de ces souches dans des sols sensibles a été envisagé comme moyen de lutte (Louvet *et al.*, 1976; Rouxel *et al.*, 1977). Ainsi, en 1979, une diminution de la maladie a été observée en ajoutant des souches fongiques, isolées d'un sol résistant, dans le même sol mais désinfecté (Rouxel *et al.*, 1979). L'étude a montré que des souches de *F. oxysorum* et *F. solani* jouaient un rôle prépondérant dans le mécanisme de résistance. De manière similaire, la sensibilité ou résistance de différents substrats de culture a été étudiée dans l'objectif de lutter contre la fusariose vasculaire de la tomate (Couteaudier et Alabouvette, 1981). De même, l'incidence de la fusariose du cyclamen a été diminuée en apportant des souches antagonistes de *Fusarium* sp. seules ou en combinaison. Cette étude a également montré l'importance du ratio agent de lutte biologique/agent pathogène et du choix du cultivar utilisé pour la mise au point de tests de lutte biologique (Minuto *et al.*, 1995). La souche de *F. oxysporum* non pathogène Fo47 a permis de réduire la fusariose du cyclamen de manière drastique (Alabouvette *et al.*, 1993). En outre, l'antagonisme de la bactérie *Serratia marcescens* a également été testé contre Focv. Cependant, les résultats n'ont pas été à la hauteur des attentes puisque la réduction de la maladie est d'un peu moins de 40 % avec la bactérie mais de 90 % avec le traitement chimique (Someya *et al.*, 2000). Afin d'obtenir une meilleure efficacité de protection du cyclamen, Elmer et McGovern (2004) évaluèrent l'utilisation combinée de produits de lutte biologique commercialisés et de produits chimiques. Le meilleur résultat a été obtenu en utilisant le fludioxonil et une souche de *Streptomyces griseoviridis* (*i.e.* produit MycoStop). En effet, en combinant les deux produits, l'aire sous la courbe de progression de la maladie (area under the disease progress curve, AUDPC) était de seulement 8,6 contre 81,7 sans moyen de lutte. De manière générale, les microorganismes évalués par ces études permettent de diminuer l'incidence de la maladie et/ou de retarder son apparition. Ces travaux n'ont cependant pas permis d'identifier un agent de lutte biologique

durablement efficace contre la fusariose du cyclamen. La lutte contre cette maladie s'avère donc difficile et les producteurs, démunis face à cet agent pathogène, sont dans l'attente de solutions de contrôle.

## V. Le projet de thèse

Cette introduction bibliographique montre la diversité du complexe d'espèces *F. oxysporum*. Cette diversité, bien que fascinante pour les chercheurs, rend l'identification des souches phytopathogènes d'autant plus difficile. Cette introduction présente également les problèmes de contrôle des maladies des plantes rencontrés en production face à cette espèce en général et face à Focv en particulier. Ainsi, ce projet a été développé pour répondre aux attentes directes de la profession horticole, démunie face à la fusariose du cyclamen. Pour apporter des solutions, les objectifs du projet sont les suivants :

- Identifier un marqueur moléculaire spécifique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, responsable de la fusariose du cyclamen pour permettre sa détection précoce en production
- Identifier un ou plusieurs agents de lutte biologique efficaces contre le pathogène

Les travaux menés et les résultats obtenus sont présentés dans le présent manuscrit. Celui-ci s'articule en 6 chapitres. Le premier introduira le contexte scientifique de l'étude ainsi qu'une synthèse bibliographique portant sur la lutte biologique contre les fusarioses, dues à *Fusarium oxysporum*, sur cultures ornementales. Le second présentera les matériels et méthodes utilisés au cours de l'étude. Le chapitre 3 portera sur l'étude de la diversité génétique de l'agent pathogène, permettant d'aborder la recherche d'un outil de détection spécifique de l'agent pathogène dans le chapitre 4. Le chapitre 5 portera sur l'identification de un à plusieurs agents de lutte biologique. Enfin, dans le dernier chapitre, les résultats de cette étude seront discutés ainsi que les perspectives qu'elle ouvre.

## Chapitre I :

Contrôle biologique des maladies des  
plantes ornementales causées par  
*Fusarium oxysporum* : une revue



## **Biocontrol of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review**

Charline Lecomte<sup>1</sup>, Claude Alabouvette<sup>2</sup>, Véronique Edel-Hermann<sup>3</sup>, Fabien Robert<sup>1</sup>, Christian Steinberg<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Astredhor, 44, rue d'Alésia, 75682 Paris, France

<sup>2</sup> Agrene, 47 rue C. Pierrot, 21000 Dijon, France

<sup>3</sup> INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, 21065 Dijon, France

\* Corresponding author

e-mail address: [christian.steinberg@dijon.inra.fr](mailto:christian.steinberg@dijon.inra.fr)

tel: +33 380 693 050

Fax: +33 380 693 224

### **Abstract**

Ornamentals gather all decorative plants suitable for indoor or outdoor uses. A large variety of plants is produced and sold on a worldwide market. One of the most worrying pathogenic microorganisms for ornamental production is the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* Schltdl. (1824) (Hypocreales, Nectriaceae). Many *F. oxysporum* Schltdl. (1824) (Hypocreales, Nectriaceae) pathogenic strains can infect numerous ornamental plants during production and/or storage. Once the disease has broken out, plants are no longer suitable for commercialization. No curative control method is currently available. The best management of the diseases can only be achieved through an integrative approach in which biocontrol can play a major role. Biocontrol methods on ornamentals are limited to the use of microbial biocontrol agents and botanicals, *i.e.* essential oils or plant extracts. An overview of the studies about botanical and microorganism use against *F. oxysporum* Schltdl. (1824) (Hypocreales, Nectriaceae) on ornamentals highlighted that the use of these methods is recent and that they arouse increasing interest. Microorganism and botanical sources are countless; consequently, the choice of a screening method to select good candidates is critical. Both microorganisms and botanicals display various modes of action that are not all fully understood, especially for botanicals. As soon as a promising microorganism or botanical candidate is identified, different parameters linked to the development of the product (mode of application, dose, formulation, production) need to be defined and standardized to optimize the quality of the final product. These steps also determine the success or failure of a product on the market. Once the product

has been elaborated, the registration process can start. Depending on the country, requirements are different and the whole process is more or less tedious. However, 26 biocontrol products are currently available for *F. oxysporum* Schltdl. (1824) (Hypocreales, Nectriaceae) control on ornamentals, and the biocontrol market is growing. Moreover, biocontrol methods can be combined with one another or with other control methods. Biocontrol keeps emerging as a sustainable way to control pathogens within the framework of an integrated approach for disease management.

### **Key-words**

*Fusarium oxysporum* diseases, integrated disease management, floriculture, botanicals, microbial biocontrol agents

## I. Introduction

Ornamentals include all plants grown for decorative purposes for indoor or outdoor uses. They are produced in potting mixture, in soilless culture medium, or directly in the field. Crops are divided into several categories: cut flower or cut foliage crops, bulb and corm crops, potted plants, and woody ornamentals. The world production of flowers and potted plants is dominated by the European Union, with 34 % of the production. The second producer is China (16 %), and the third one the USA (14 %). In Europe, The Netherlands produce 32 % of ornamentals, followed by Italy (12 %), and Germany (13 %) (European Commission, 2015). Global annual sales of flowers range between US\$ 40 and 60 billion. Consumers constantly seek for new products, and the demand is rising. Globally, the floriculture sector is growing, especially in developing countries and to a lower extent in Western Europe, North America and Japan. Nevertheless, Europe, America and Asia productions provide for more than 90 % of current needs (Intracen, 2016).

*Fusarium oxysporum* Schltdl. (1824) (Hypocreales, Nectriaceae) is a well-described soil-borne fungus (Gordon and Martyn 1997). The species includes a wide diversity of strains responsible for wilts or rots on many plant species (Kistler 1997; Ortoneda *et al.* 2004; Dean *et al.* 2012). Among its broad range of host plants, many are ornamental crops. *F. oxysporum*-induced diseases cause serious damage during both production and storage (Gullino *et al.* 2015). Pathogen control and disease management can only be achieved through an integrative approach in which biocontrol can play a major role. The aim of this review is to present an overview of biocontrol methods against *F. oxysporum* in ornamentals, their strengths and weaknesses, and their integration into a global disease management approach.

## II. *Fusarium oxysporum* diseases on ornamentals

Several fungi can cause diseases on ornamentals, but the most worrying one for worldwide production is the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. This morphological species is now

Table 1: List of ornamental plants affected by *Fusarium oxysporum*.

Host plants	<i>Formae speciales</i>	References
<i>Actinotus helianthi</i>	Undefined f. sp.	Bullock <i>et al.</i> , 1998
<i>Anoectochilus</i> sp.	f. sp. <i>anoectochili</i>	Huang <i>et al.</i> , 2014
<i>Argyranthemum frutescens</i>	f. sp. <i>chrysanthemi</i>	Garibaldi <i>et al.</i> , 1998
<i>Callistephus chinensis</i>	f. sp. <i>callistephi</i>	Baker 1953
<i>Cattleya</i> sp.	f. sp. <i>cattleyae</i>	Sepúlveda Chavera and Cortés 1999
<i>Cereus marginatus</i> var. <i>cristata</i>	Undefined f. sp.	Garibaldi <i>et al.</i> , 2014
<i>Cereus peruvianus</i>	Undefined f. sp.	Bertetti <i>et al.</i> , 2012
<i>Chrysanthemum</i> sp.	f. sp. <i>chrysanthemi</i> , f. sp. <i>tracheiphilum</i>	Engelhard and Woltz 1971
<i>Coreopsis verticillata</i>	Undefined f. sp.	Elmer <i>et al.</i> 2007
<i>Crassula ovata</i>	f. sp. <i>crassulae</i>	Garibaldi <i>et al.</i> , 2011a; Ortu <i>et al.</i> , 2013
<i>Crocus sativus</i>	f. sp. <i>gladioli</i> , f. sp. <i>croci</i> and undefined f. sp.	Boerema and Hamers 1989; Gupta and Vakhlu 2015; Yamamoto <i>et al.</i> , 1954
<i>Cyclamen persicum</i>	f. sp. <i>cyclaminis</i>	Gerlach 1954
<i>Delphinium</i> sp.	f. sp. <i>delphinii</i>	Laskaris 1949
<i>Dianthus</i> sp.	Undefined f. sp., f. sp. <i>dianthi</i>	Garibaldi 1977; Garibaldi <i>et al.</i> 2011b
<i>Echeveria agavoides</i>	f. sp. <i>echeveriae</i>	Bertetti <i>et al.</i> , 2013
<i>Echeveria tolimanensis</i>	f. sp. <i>echeveriae</i>	Bertetti <i>et al.</i> , 2015
<i>Euphorbia mamillaris</i> var. <i>variegata</i>	Undefined f. sp.	Garibaldi <i>et al.</i> , 2016a
<i>Eustoma</i> sp.	f. sp. <i>eustomae</i>	Hahm 1998
<i>Exacum</i> sp.	Undefined f. sp.	Elmer and O'Dowd 2001
<i>Freesia</i> sp.	Undefined f. sp., f. sp. <i>gladioli</i>	Farr <i>et al.</i> , 1989; McClellan 1945
<i>Gerbera</i> sp.	f. sp. <i>chrysanthemi</i> , f. sp. <i>tracheiphilum</i>	van Arx 1952
<i>Gladiolus</i> sp.	f. sp. <i>gladioli</i>	Massey 1926
<i>Gypsophila</i> sp.	Undefined f. sp.	Werner and Irzykowska 2007
<i>Hibiscus</i> sp.	f. sp. <i>rosellae</i>	Ooi and Salleh 1999
<i>Hosta</i> sp.	Undefined f. sp.	Wang and Jeffers 2000
<i>Hyacinthus</i> sp.	f. sp. <i>hyacinthi</i>	Boerema and Hamers 1988
<i>Iris</i> sp.	f. sp. <i>gladioli</i>	McClellan 1945

Chapitre I : Contrôle biologique des maladies des plantes ornementales causées par *Fusarium oxysporum* : une revue

<i>Ixia</i> sp.	Undefined f. sp., f. sp. <i>gladioli</i>	Fantino <i>et al.</i> , 1985; McClellan 1945
<i>Lewisia rediviva</i>	Undefined f. sp.	Gullino <i>et al.</i> , 2015
<i>Lewisia cotyledon</i>	Undefined f. sp.	Garibaldi <i>et al.</i> , 2005
<i>Lilium</i> sp.	f. sp. <i>lilii</i>	Imle 1942
<i>Mammillaria zeilmanniana</i>	f. sp. <i>opuntiarum</i>	Garibaldi <i>et al.</i> , 2016b
<i>Mandevilla</i> sp.	Undefined f. sp.	Sella <i>et al.</i> , 2010
<i>Mimosa</i> sp.	f. sp. <i>perniciosum</i>	Hepting 1939
<i>Narcissus</i> sp.	f. sp. <i>narcissi</i>	Gregory 1932
<i>Osteospermum</i> sp.	f. sp. <i>chrysanthemi</i>	Minuto <i>et al.</i> 2007
<i>Papaver nudicaule</i>	f. sp. <i>papaveris</i>	Garibaldi <i>et al.</i> , 2012; Ortu <i>et al.</i> , 2015b
<i>Philodendron oxycardium</i>	Undefined f. sp.	Wang <i>et al.</i> , 2015a
<i>Protea</i> sp.	Undefined f. sp.	Swart <i>et al.</i> , 1999
<i>Ranunculus asiaticus</i>	f. sp. <i>ranunculi</i>	Martini <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhus</i> sp.	f. sp. <i>callistephi</i>	Armstrong and Armstrong 1971
<i>Sanguinaria canadensis</i>	Undefined f. sp.	Elmer and Marra 2015
<i>Tulipa</i> sp.	f. sp. <i>tulipae</i>	Bergman 1965



Fig. 1: Symptoms caused by *Fusarium oxysporum* on ornamental plants: *Cyclamen* sp. (a), *Mandevilla* sp. (b), *Tulipa* sp. (c), *Eustoma* sp. (d), *Dianthus* sp. (e), *Gladiolus* sp. (f).

recognized as a species complex because of its high level of phylogenetic diversity (O'Donnell *et al.* 2009). The species complex includes a wide diversity of saprophytic and phytopathogenic strains. The pathogenic strains are characterized by narrow host specificity; they are named *formae speciales* according to their species specificity. When resistance genes are identified in the plant, *formae speciales* are further subdivided into races according to their cultivar specificity (Gordon and Martyn 1997). More than 150 *formae speciales* and races are currently described. *F. oxysporum* host plants include some of the most valuable ornamental plants, such as *Chrysanthemum* spp., *Dianthus* spp., *Gerbera* spp., *Gladiolus* spp. and *Lilium* spp. (Massey 1926; Imle 1942; van Arx 1952; Nelson 1964; Engelhard and Woltz 1971). On the whole, more than 30 ornamental plant genera are known targets of *F. oxysporum* (Table 1). Surprisingly, only 21 *formae speciales* are described on ornamental crops. A strain from a given *forma specialis* may infect different ornamentals, and a same ornamental species can be infected by strains of *F. oxysporum* belonging to several *formae speciales*. For example, the *forma specialis chrysanthemi* can cause disease on Barberton daisy, chrysanthemum, daisybush, and Paris daisy, which are all plants from the *Asteraceae* family, while the *forma specialis tracheiphilum* is pathogenic on Barberton daisy and chrysanthemum (Engelhard and Woltz 1971; Minuto *et al.* 2007; Troisi *et al.* 2010). Likewise, *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* affects several plants from the *Iridaceae* family (corn lily, crocus, freesia, gladiolus, iris) (McClellan 1945). Consequently, in ornamentals, the "narrow specificity of *formae specialis*" concept might not apply, or it applies at the botanical family level rather than at the species level (Gullino 2012).

On ornamentals, diseases caused by *F. oxysporum* occur during cultivation and/or during storage of bulbs and corms. Two kinds of symptoms are associated with the fungus: vascular wilt, and crown and root rot (Engelhard and Woltz 1971; Linderman 1981; Brayford 1996). Wilting is usually described on whole plants and on some storage organs, as on gladiolus corm or tulip bulb (Fig. 1) (Bald *et al.* 1971). *F. oxysporum* penetrates the host roots until it reaches the xylem vessels, which it colonizes upwards (Olivain and Alabouvette 1999). The first visible symptoms of Fusarium wilt are aerial. They begin with a progressive yellowing of the foliage, often on one side only. Then, leaves gradually wilt, until the whole plant collapses (Fig. 1). Symptoms associated with crown and root rot are described only on some storage organs such as those of lily, crocus, narcissus, or tulip (Bald *et al.* 1971; Gullino 2012). The fungus degrades the cortex layers, and causes the formation of severe brown to black necrotic spots that lead to basal plate rot (Fig. 1) (Bald *et al.* 1971; Baayen and Rijkenberg 1999). Storage organs, such as the corm or bulb, are characterized by a shortened stem. In this context, we may wonder if the symptoms considered as rotting may in fact be advanced wilting symptoms on these peculiar organs.

Losses can have a high economic impact, e.g. on carnation and chrysanthemum production. On gladiolus, *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* colonizes corms during storage. This can result in 60 % to 80 % losses (Barrera-Necha *et al.* 2008). Since its first outbreaks in 1930 in Germany, Fusarium wilt of cyclamen had spread to all production areas worldwide and led some growers to stop cyclamen production and/or diversify their production (Gerlach 1954; Rouxel and Grouet 1974). Furthermore, in the last decade *F. oxysporum* diseases have been

newly described on ornamental crops such as *Anoectochilus* spp., *Crassula* sp., *Lewisia* spp., or *Ranunculus* sp. (Table 1) (Ortu *et al.* 2015a).

### III. Control methods

#### III.1 Available control methods

Pathogenic *F. oxysporum* strains represent a serious threat to production, and no curative control method is currently available. The best control is achieved by integrating several management tools throughout the production cycle. Prophylactic measures and cultural practices are the first methods to be used to prevent the introduction and further dispersal of pathogens. In practice, they consist in: (i) keeping the greenhouse and equipment (machinery) in good sanitary conditions, (ii) using *F. oxysporum*-free plant materials, (iii) disinfecting soils and substrates, (iv) managing water in an appropriate manner, (v) paying special attention to crop monitoring, and (vi) rotating crops (Katan 2000; Elmer 2001; Riaz *et al.* 2009; Mehta *et al.* 2014; Raudales *et al.* 2014). In an attempt to control the disease, several chemicals have been used over the years. For instance, Benomyl has long been used to reduce disease severity (Minuto *et al.* 1995; Someya *et al.* 2000). However, its carcinogenic effect on mammals led to its removal in several countries at the beginning of the 21<sup>st</sup> century (McCarroll 2002). Methyl bromide has also been extensively used as a soil fumigant, but it is now banned because of its ozone-depleting effect (Gullino *et al.* 2005). Today, the use of chemicals is restricted since more and more molecules are phased out for environmental and health purposes. Crop breeding to select resistant cultivars is a useful and efficient method to manage the disease; however, it takes time to obtain resistant cultivars with suitable ornamental characteristics. Dutch studies reveal that partial *F. oxysporum* resistance exists in most bulbous plants, such as tulip and lily (Straathof *et al.* 1996). On carnation, the progression of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* in the xylem of a resistant cultivar is limited by vessel occlusion as compared to a susceptible cultivar (Ouellette *et al.* 1999). Nevertheless, virtually no resistant cultivar is available yet among ornamentals. The first objective of breeding in ornamentals is to improve yield and valuable quality traits, generally at the expense of resistance to pathogens. Moreover, the main drawback of plant breeding is undoubtedly its unpredictable durability due to possible overcome by pathogens.

Biocontrol can provide effective solutions for managing *F. oxysporum* diseases. It is currently defined by the International Biocontrol Manufacturers Association (IBMA) as the use of agents or products that naturally affect crop pests and pathogens by limiting their propagation. This definition fits with the European directive 2009/128/CE, which promotes the reduction of pesticide use by developing non-chemical methods for disease and pest management in agriculture, including physical, mechanical and biological practices, and biocontrol (EU 2009a). The agents or products that naturally affect crop pests and pathogens include macroorganisms, microorganisms, chemical mediators, and natural substances. A large variety of substances can be considered as “natural”, like those originating from animals,

microorganisms or plants. In this review, we consider the IBMA definition and focus on microorganisms and natural substances originating from plants (*i.e.* botanicals), the only products supposed to be able to control *F. oxysporum* on ornamentals.

### III.2 Microorganisms to control *Fusarium oxysporum*

The sources of potential microorganisms able to control soil-borne pathogens are diverse. However, historically, in the 1960s, studies on suppressive soils, *i.e.* soils with a low disease incidence despite the presence of the pathogen, emphasized the existence of antagonistic microorganisms in the soil (Stover 1962; Stotzky and Martin 1963). The first symposium dedicated to the ecology of soil-borne plant pathogens was held in 1965. Different biocontrol methods using resident microorganisms were considered. Biocontrol *via* the introduction of organisms was later proposed by Baker and Cook (1974) in their book “Biological control of plant pathogens”. Several strategies have been developed to identify potential Microbial Biocontrol Agents (MBA) through *in vitro* or *in vivo* tests. These MBA are mostly fungi and bacteria. They are able to control soil-borne diseases by directly antagonizing the pathogens or indirectly competing for common trophic and/or spatial resources, or stimulating plant defense reactions, or both (Alabouvette *et al.* 2009). The different methods used to screen MBA, their modes of action, and their production and registration processes are addressed in part 5.

### III.3 Botanicals to control *Fusarium oxysporum*

Botanicals include plant extracts (PE) and essential oils (EO). They are mixtures composed of 20 to 60 volatile or/and aromatic components, including acetones, acids, alcohols, aldehydes, alkaloids, esters, terpenes, and phenols (Bakkali *et al.* 2008; Negi 2012; Azmir *et al.* 2013). They accumulate in glandular trichomes or in secretory cavities of plant cell walls and represent between 1 % and 2 % of plant biomass. Since these peculiar cells can be found in most part of the plant, botanicals can be extracted from any part of the plant (Koul *et al.* 2008; Bakkali *et al.* 2008). Two to three major components of a mixture are present in higher concentrations, whereas the others are minor components present at trace levels. According to the International Organization for Standardization (ISO), an EO is a “product obtained from a natural raw material of plant origin either, by steam distillation, by mechanical processes or by dry distillation, after separation of the aqueous phase, if any, by physical processes”, while a PE is “a product obtained by treating raw material with one or several solvents” (ISO 2013). The methods for screening botanicals, their modes of action, and the production and registration processes are addressed in part V.

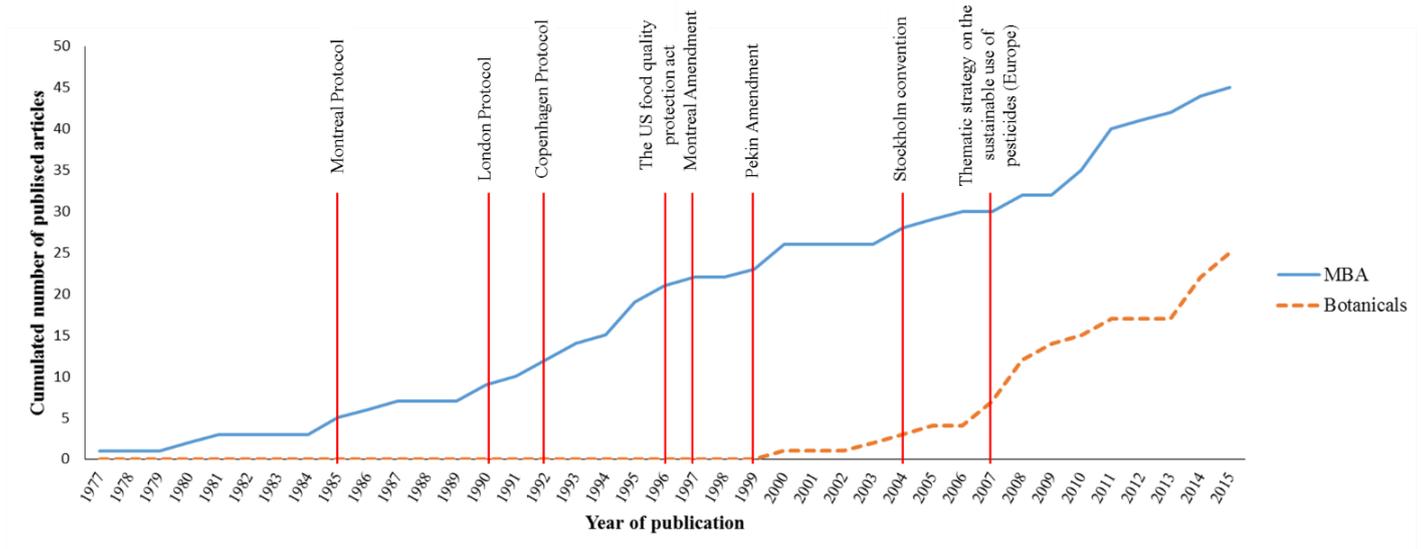


Fig. 2: Dynamics of publishing on biocontrol of *Fusarium oxysporum* on ornamentals using microorganisms (full line) or botanicals (dotted line) over the years.

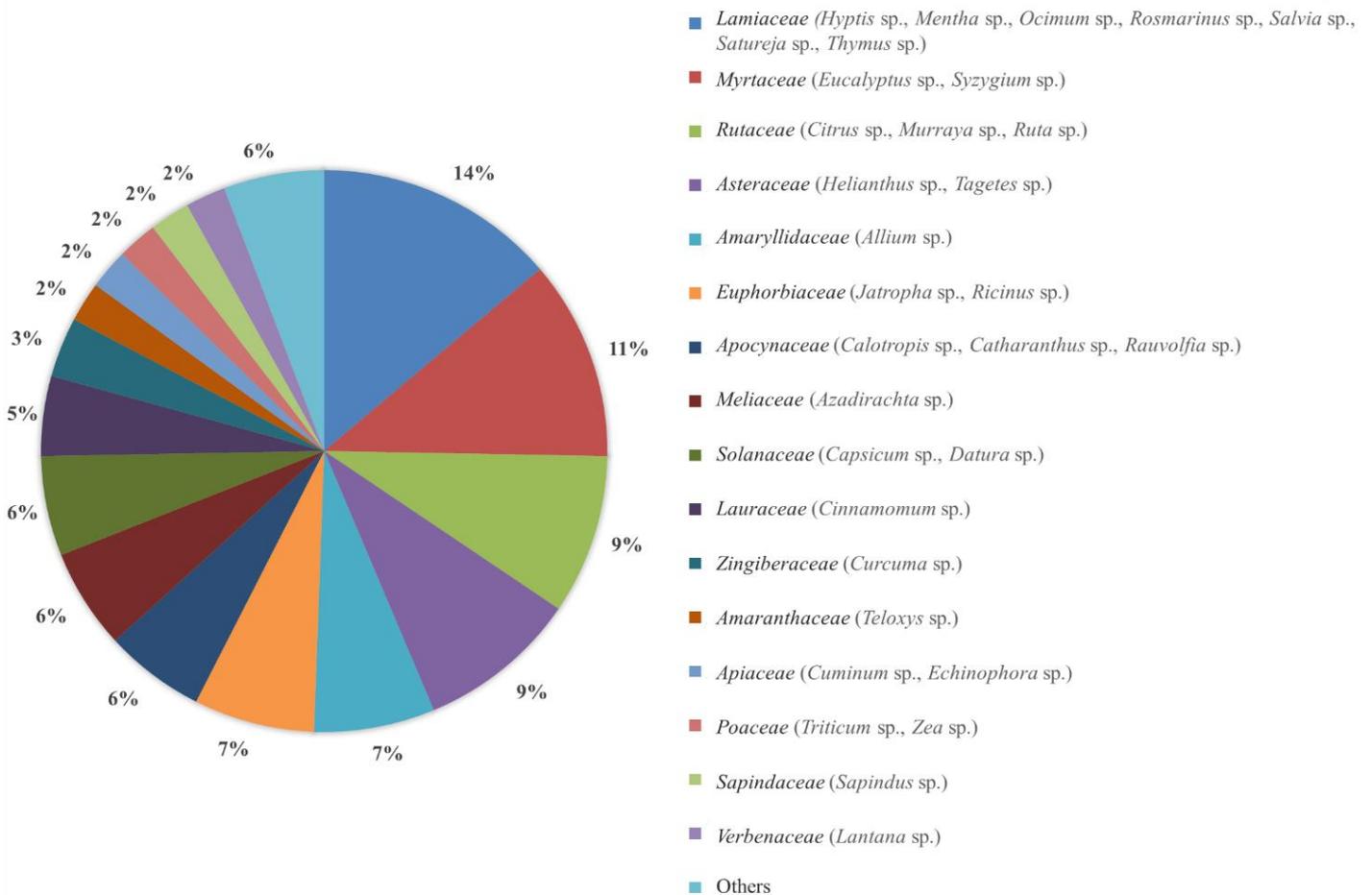


Fig. 3: Most studied plant families to control *Fusarium oxysporum* on ornamentals.

#### IV. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* on ornamentals

We compiled peer-reviewed articles about MBA and botanicals as control agents of *F. oxysporum* diseases on ornamentals published between 1977 and 2015. Health and environmental concerns led to the phasing out of several chemicals, reinforcing the interest for alternative control methods. This growing interest is illustrated by the increasing number of works on the biocontrol of *F. oxysporum* on ornamentals published in the last 10 years (40 since 2004) as compared to the small amount (30) published between 1977 and 2004 (Fig. 2). The first publication dealing with the use of MBA dates back to 1977, while the first one focusing on botanicals was published in 2000 (Langerak 1977; Bowers and Locke 2000). MBA have been known for a long time, and numerous studies deal with their use as fungicides. However, the bibliometric data show that among the 45 publications on the subject, only 19 were published during the last 15 years. Similarly, botanicals have been known and used for decades in various sectors (agri-food, medicine, perfumery,...) and for various uses (antimicrobial activity, flavor, fragrance, preservative,...), but their use to control *F. oxysporum* diseases of ornamentals is recent (Philogène *et al.* 2005; Baser and Buchbauer 2009). Since 2000, 25 publications about botanicals have been reported. This growing interest for biocontrol is probably supported by socio-ecological concerns and stimulated by the different safety protocols implemented since 1985 (Isman 2000; Koul *et al.* 2008; Mohan *et al.* 2011; Gurjar *et al.* 2012).

Among microorganisms, fungi have been assessed more often than bacteria to control *F. oxysporum* (68 % versus 32 %). More attention has been paid to the genus *Trichoderma* (53 % of the fungi), which gathers species well-known for their biocontrol activity (Vinale *et al.* 2008; Gajera *et al.* 2013). Other microorganisms well represented in the literature are non-pathogenic *Fusarium* (23 %) and *Penicillium* (10 %). Bacteria tested as MBA mainly belong to the genus *Pseudomonas* (44 %), followed by *Bacillus* (13 %) and *Streptomyces* (9 %). All these bacteria belong to the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) known to promote plant growth and induce protection against abiotic stresses (Antoun and Prévost 2006). Bibliometric data also reveal that 57 plant species distributed across 20 plant families have been investigated with the aim to control *F. oxysporum* on ornamentals using botanicals (Fig. 3). The most studied families are *Lamiaceae* (14 %), followed by *Myrtaceae* (11 %), *Rutaceae* (9 %), and *Asteraceae* (9 %). They include plants such as citrus, clove, eucalyptus, marigold, and mint, which are well-known for the antimicrobial activity of their oils or extracts (Salie *et al.* 1996; Bozin and Mimica-Dukic 2006; Chaieb *et al.* 2007; Viuda-Martos *et al.* 2008; Ben Marzoug *et al.* 2010).

Regarding MBA as well as botanicals, the most targeted *formae speciales* are *dianthi* and *gladioli*, probably because of the economic importance of the crops they attack. The other *formae speciales* (*chrysanthemi*, *cyclaminis*, *lilii*, *narcissi*, and *tulipae*) have been less studied. Microorganisms and botanicals can both display a wide range of efficiency levels. Among potential microbial candidates for biocontrol of *F. oxysporum* diseases on ornamentals, 16 % provided 80 % to 100 % efficiency, while 19 % provided between 60 % and 80 % and 19 % provided 40 % to 60 % efficiency (Fig. 4). The most efficient microorganisms belong to the

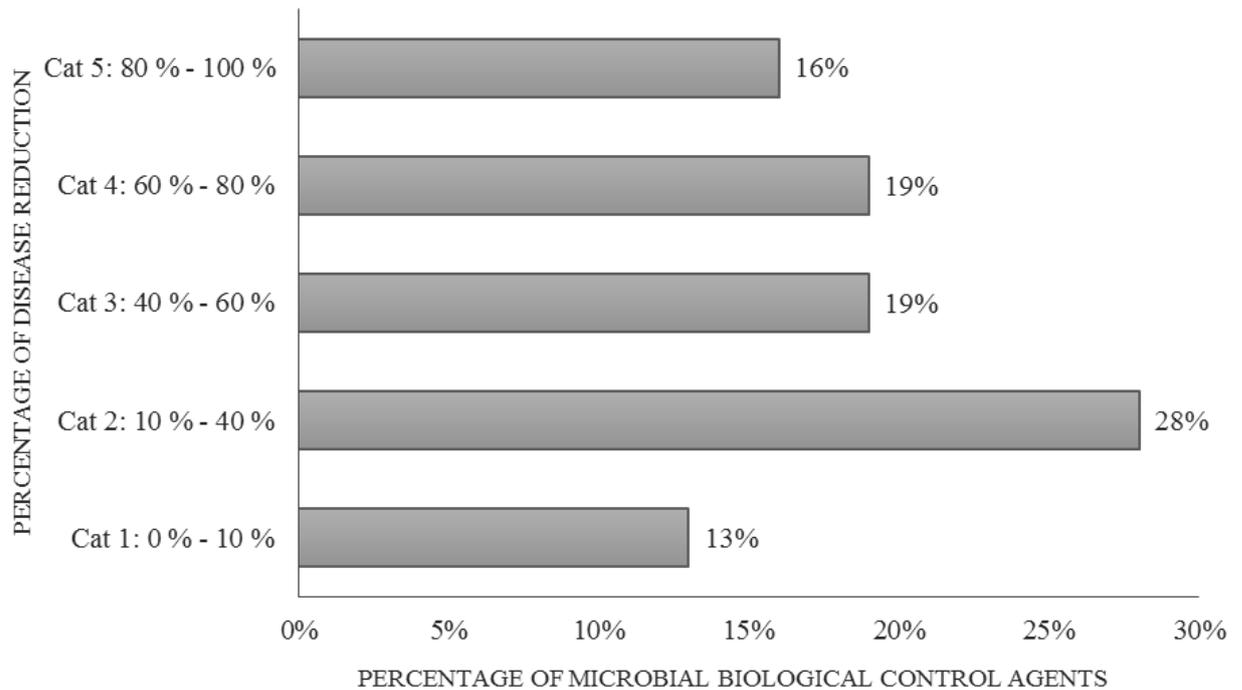


Fig. 4: Ranges of efficiency of biocontrol microorganisms evaluated *in vivo*.

We organized the efficiency rates of disease reduction (incidence or severity) by biocontrol microorganisms in *in vivo* tests into 5 categories. For 5 % of the MBA, the data did not allow us to calculate an efficiency rate.

*Bacillus*, *Fusarium*, *Glomus*, or *Trichoderma* genera (Postma and Luttikholt 1996; Singh and Vijay 2011; Maya and Matsubara 2013a; Hassan *et al.* 2014). Yet, almost one third (28 %) of the microorganisms tested so far reduced the disease by only 10 % to 40 %. As for botanicals, most of the studies performed so far were only *in vitro* tests, so a similar kind of categorization is not possible yet. These categories raise the question of the level of efficiency required to consider the commercialization of a biocontrol product. Actually, 40 % reduction of the disease is already of real interest for producers.

## V. Screening for candidates

Sources of biocontrol candidates, whether microorganisms or botanicals, are highly diverse. The most part of the current microorganisms of interest comes from different types of soils (e.g. bulk soil, rhizosphere soil) or from suppressive soil (Beale and Pitt 1995; Gupta and Vakhlu 2015). The antagonistic abilities of microorganisms isolated from the rhizoplane, the phylloplane, or from the endophytic compartment (mainly roots) of healthy plants have also been tested (Carver *et al.* 1996; Someya *et al.* 2000; Ajit *et al.* 2006). MBA can also be found in microorganism collections or from currently commercialized products registered towards other pathogens (Elmer and McGovern 2004; Shanmugam *et al.* 2011). More unusually, potential MBA have been isolated from mangrove, raised bog, or vinegar waste compost (Samuel and Muthukkaruppan 2011; Szentes *et al.* 2013; Lin *et al.* 2014). Moreover, knowing the ecological competence and adaptability of the microorganism is essential to understand suitable conditions of growth of the microorganism in the environment and ensure the best control. Such information is anyway required for the registration process. Similarly, there is a wide diversity of sources among botanicals. They can be extracted from a whole plant or from a plant part (aerial part, branch, bulb, flower, fruit, leaf, peel, root, seed), and from fresh or dry plant material (Okwu *et al.* 2007; Chohan *et al.* 2011; Cordova-Albores *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015b). The composition of botanicals fluctuates in quantity and quality depending on the plant (species, variety, subspecies, and chemotype), the organ, the age or the life stage of the plant, the soil composition, the season, and the climate (Pitarokili *et al.* 2003; Baser and Buchbauer 2009; Raeisi *et al.* 2015; Licata *et al.* 2015; Moghaddam and Mehdizadeh 2015). Plant candidates for the search for potential sources of botanical compounds are selected among plants already well known for their interest in medicinal or food uses. They represent a wide diversity of plant species, among which garlic, lemon, cinnamon, mint, Madagascar periwinkle, or eucalyptus (Chandel *et al.* 2004; Okwu *et al.* 2007; Barrera-Necha *et al.* 2008). Another research strategy focuses on plants involved in biocidal functions for other organisms through the production of specific metabolites, e.g. allelopathic plants (Riaz *et al.* 2010). A practical and timely perspective also consists in using and exploiting by-products from plant production to get botanical candidates, as in the case of *Citrus* juice production (Crupi and Rispoli 2002).

The first step of the screening for microorganisms or botanicals of interest is performed *in vitro* in 53 % and 96 % of the studies, respectively. The antifungal activity of a microorganism or a botanical is mainly evaluated by measuring its impact on pathogen growth in liquid or agar

culture media. Conidial germination percentages and agar well diffusion are commonly used to assess MBA and botanical efficiency (Duijff *et al.* 1993; Shobha and Kumudini 2012). Other methods are used to test microorganisms or botanicals specifically. The classical dual culture method on Petri dishes was set up in 1960 by Johnson *et al.* to test the antagonistic abilities of potential MBA. Microorganisms can also be selected according to their ability to produce enzymes such as chitinase (Someya *et al.* 2000). The commonly used poisoned food technique defines the minimum inhibitory concentration of botanicals needed to inhibit fungal growth, while the less frequent vapor phase test is used to evaluate the effect of botanical volatiles on fungi (Zentmeyer 1955; Nakahara *et al.* 2003). Based on the poisoned food technique, citronella oil failed to inhibit nine different fungal species, while it inhibited the growth of all of them in the vapor phase test (Nakahara *et al.* 2003). Beale and Pitt (1990) isolated 135 microorganisms from plant materials and soils. They screened all isolates for their antagonistic activity against *F. oxysporum* f. sp. *narcissi* and for their tolerance to a fungicide. Among this collection, 30 microorganisms were found to be antagonists. In another example, the strain *Trichoderma* sp. 075 gave the best result to inhibit *F. oxysporum* f. sp. *narcissi* growth on Petri dishes, while the same strain evaluated in the greenhouse resulted in a higher disease severity compared to the pathogen alone (Beale and Pitt 1990). These examples emphasize the well-known irrelevance of *in vitro* experiments to assess the potential of a microorganism or botanical to control *F. oxysporum*, since *in vitro* results can be diametrically opposite to *in vivo* results.

The second screening step is performed *in vivo* in 78 % of the studies on MBA, but only in 20 % of the studies on botanicals. The tests are performed on storage organs in containers or on whole plants in the greenhouse or in the field. Biocontrol efficiency is mostly evaluated from the incidence and/or severity of the disease according to a defined disease index. Even so, it can also be assessed by recording data on plant growth parameters such as plant height, the dry or fresh weight of certain plant parts, or the flowering date (Beale and Pitt 1990; Nosir *et al.* 2010; Shanmugam *et al.* 2011). For example, among the 30 antagonistic microorganisms selected *in vitro* against *F. oxysporum* f. sp. *narcissi* by Beale and Pitt (1990), 17 were further tested in greenhouse trials, and 5 were tested in field experiments. The fungus *Minimedusa polyspora* gave the best disease reduction (only 33 % of diseased bulbs), and significantly increased bulb weight and flower yield.

The screening can be based on the physiological status of the plant through measurements of the water status (e.g. transpiration, stomatal conductance), of changes in antioxidant activity (e.g. enzymatic activity levels), or the production of plant defense molecules (e.g. phytoalexins) (van Peer *et al.* 1991; Sant *et al.* 2010; Maya and Matsubara 2013b). More rarely, the production of molecules such as fusaric acid by the pathogen is monitored (Nosir *et al.* 2011). However, the results of *in vivo* assays really depend on external parameters such as the plant cultivar, the plant growth stage, cultivation conditions, the growth substrate, the way microorganisms are applied, and the pathogen/MBA ratio (Sneh *et al.* 1985; Garibaldi *et al.* 1987; Minuto *et al.* 1995; Postma and Luttikholt 1996).

## VI. Modes of action

A large amount of studies has been performed on the modes of action of microbial antagonists and reviewed elsewhere (Compant *et al.* 2005; Harman 2006; Alabouvette *et al.* 2009; Lioussanne 2010). Antagonistic microorganisms act directly or indirectly against *F. oxysporum* and thus reduce its development. These actions include mycoparasitism, antibiosis, competition for nutrients or for an ecological niche, and induction of plant defense reactions (Baker 1968).

Mycoparasitism is defined as the parasitism of a fungus by another fungus. It is mediated by the development of peculiar organs (haustoria) and by the synthesis of enzymes or secondary metabolites to finally allow nutrient uptake from the pathogenic fungus (Manocha 1991; Daguerre *et al.* 2014). Some strains of *Trichoderma* are known for their mycoparasitic ability on *F. oxysporum* hyphae (John *et al.* 2010). Secondary metabolites, antibiotics or enzymes are also involved in antibiosis. For example, a strain of *Bacillus thermoglucosidasius* produces antibiotics, resulting in growth inhibition and control of *F. oxysporum* f. sp. *lilii* (Chung *et al.* 2011). Competition for resources is another kind of interaction between microorganisms. Some microorganisms have developed beneficial strategies to be ahead of others when they compete for a same ecological niche or for a same source of nutrients. The secretion of peptides that have high affinity for iron, called siderophores, is a good example of competition for nutrients. This strategy is used by some strains of *Pseudomonas* to control *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Elad and Baker 1985; Lemanceau *et al.* 1992, 1993; Duijff *et al.* 1993). Other molecules produced by microorganisms trigger plant defense reactions. St-Arnaud *et al.* (1997) hypothesized that *Glomus intraradices* induces *Dianthus caryophyllus* disease resistance mechanisms against *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* to explain reduced disease severity. Similarly, the non-pathogenic strain *F. oxysporum* Fo47 primes the defense responses of tomato plants to control *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Aimé *et al.* 2013).

In comparison to MBA, the mechanisms whereby botanicals act against microorganisms are even less known. These mechanisms rely on the composition of botanicals, which is multi-factor dependent. A few studies reveal that the major components are mainly responsible for the biological activity of botanicals, but others conclude that several components act in synergy (Pitarokili *et al.* 2003; Bakkali *et al.* 2008). Furthermore, as botanicals contain a mixture of diverse components, their antifungal activity is probably not attributable to a single mechanism. The main mechanisms reported so far are membrane disruption, metal chelation, interaction with DNA, and induction of plant defense reactions (Cowan 1999; Arzoo *et al.* 2012). Several studies report that EO or some of their components are able to disrupt cell wall and membrane integrity and to easily penetrate into the cells (Li *et al.* 2015; Pontin *et al.* 2015). This disruption causes mitochondrial membrane damage, which induces changes in the electron transport chain. Consequently, free radicals are produced, and they oxidize and damage lipids, proteins, and DNA. In contact with reactive oxygen species (ROS), EO phenolic compounds are oxidized and release reactive phenoxy radicals (Bakkali *et al.* 2008; Alam *et al.* 2014). The induction of plant defenses by EO has also been investigated. Thyme oil application on tomato roots efficiently triggered peroxidase accumulation in roots, which are well-known to be part of the plant defense mechanisms (Kawano 2003; Ben-Jabeur *et al.* 2015). Similarly,

Table 2: Biocontrol microorganisms commercialized to control *Fusarium oxysporum* on ornamentals in the world.

Antagonistic microorganism	Strain	Product *	Targeted crop	Use	Company
<i>Bacillus pumilus</i>	GB34	Yield Shield	Ornamentals and others	Seed treatment	Bayer Crop Science
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Glomus intraradices</i>	NM	Pro-mix BX Biofungicide +Mycorrhizae	Ornamentals (indoor gardening, perennials, potted flowering plants, annuals, foliage plants) and others including greenhouse vegetables, vegetable transplants and young plant propagation	Potted crop	Premier Tech Horticulture
<i>Bacillus subtilis</i>	GB03	Companion	Ornamentals (greenhouse plug production) and others including vegetables, herbs, hydroponics, small fruits, berries and nut trees	Foliar spraying, seed treatment, soil drenching	Growth products
	GB03	Kodiak	Ornamentals and others including barley, bean, corn, cotton, pea, soybean and wheat	Seed treatment	Bayer Crop Science
	QST 713	Rhapsody	Ornamentals (annual and perennial bedding plants, potted flowers) and others including conifer, deciduous trees, landscape plants, shrubs and trees	Foliar spraying, tank mixing, soil drenching	Bayer Crop Science
	MBI 600	Subtilex	greenhouse and nursery ornamentals and others including fruits, herbs and vegetables	Soil drenching or mixing	BASF
	FZB24	Taegro	Ornamentals and others including cucurbits, fruit and leafy vegetables	Cutting or root dipping, seed treatment, soil drenching	Novozymes and Syngenta

Chapitre I : Contrôle biologique des maladies des plantes ornementales causées par *Fusarium oxysporum* : une revue

<i>Gliocladium catenulatum</i>	J1446	Prestop*	Ornamentals and others including fruits and vegetables	Dipping, spraying, drenching or mixing	foliar soil	Lallemand
<i>Pseudomonas cepacia</i>	NM	Intercept	Ornamentals and others including bulb, field crops, fruit, greenhouse crops, herbs, spices, vegetable and vine crops	Root dipping, drenching	soil	Soil technologies
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	63-28	AtEze	Greenhouse ornamentals and others including nursery crops and vegetable transplants	Drenching		EcoSoil Systems
<i>Pythium oligandrum</i>	M1	Polyversum*	Ornamentals and others including cereals, forest nursery, grape, hop, strawberry, turf and vegetables	Root treatment, application, suspension	dipping, seed spray watering	Biopreparaty
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	K61	Mycostop*	Ornamentals and others including herbs, seedling production and vegetables	Bulbs or cuttings dipping, seed coating, soil drenching or mixing, watering		Verdera oy
<i>Streptomyces lydicus</i>	WYEC 108	Actinovate SP	Ornamentals and others including all greenhouse and nursery crops and landscape plants	Bulb or crop cutting dipping, treatment, drenching, application, watering	dusting, or root seed soil spray	Novozymes
<i>Trichoderma asperellum</i>	T34	T34 biocontrol	Carnation	Root spraying, watering	dipping,	Biocontrol technologies

Chapitre I : Contrôle biologique des maladies des plantes ornementales causées par *Fusarium oxysporum* : une revue

<i>Trichoderma harzianum</i>	DSM 14944	Agroguard	Ornamentals and others including fruits and vegetables	Soil watering	drenching,	Live systems technology
	T-22	Trianum*	Greenhouse ornamentals and others including, carrot, cucumber, lettuce, tomato and turf	Soil mixing, watering	drenching, or spraying,	Koppert
	OBTh55	Tricho-D WP	Ornamentals and others including fruit, greenhouse crops and vegetables, nurseries, perennial crops, seeds and tubers, short-cycle crops and vegetables	Soil spraying	drenching,	Orius biotecnologia
	T-22	Plantshield	Ornamentals and others including hydroponic crops, shadehouse and outdoor nursery crops, cucurbit vegetables, fruiting vegetables, herbs, leafy vegetables, mints, pome fruits, spices, stone fruit and tree nuts	Cutting dipping, drenching,	or root soil spraying	BioWorks
	T-22	RootShield granule	Ornamentals and others including asparagus, berries, bulb vegetables, cereal grains, citrus fruits, cucurbit vegetables, fruiting vegetables, herbs, leafy vegetables, legume vegetables, mints, oilseed crops, small fruits and spices	In-furrow, soil mixing		BioWorks
	KRL-AG2	Rootshield WP	Ornamentals and others including berries, bulb crops, citrus fruits, cucurbit vegetables, fruiting vegetables, herbs, hydroponic crops, leafy vegetables, mints, pome fruit, shadehouse and outdoor nursery crops, small fruits, spices, stone fruit, tree nuts and tuber crops	Cutting dipping, furrow, drenching or spraying	or root soil	BioWorks
<i>Trichoderma harzianum</i> and <i>Trichoderma polysporum</i>	NM	Binab TF WP*	Ornamentals (cut flowers, flower bulbs, ornamental trees) and others including, berries, fruit, grass fields, nurseries, pot plants and vegetables	Soil mixing or watering	or praying,	Bio-innovation AB

<i>Trichoderma harzianum</i> and <i>Trichoderma virens</i>	T-22 and G41	RootShield plus WP	Ornamentals and others including asparagus, berries, bulb vegetables, cereal grains, citrus fruits, conifer tree and seedlings cucurbit vegetables, fruiting vegetables, herbs, hydroponic crops, leafy vegetables, legume vegetables, mints, oilseed crops, peanuts, pome fruits, shadehouse and outdoor nursery crops, small fruits, spices, stone fruits, root and tuber vegetables, and tree nuts	Bulb, cutting or root dipping, in-furrow, soil drenching, dusting, spray	BioWorks
<i>Trichoderma virens</i>	GL-21	SoilGard	Ornamentals and others including field crops and transplants	Drip irrigation, soil drenching or spraying, sprinkler	Certis USA

NM: Not mentioned

\*An asterisk denotes that the product is commercialized in Europe

Arzoo *et al.* (2012) found evidence of the induction of plant defense responses against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* using different plant extracts. Although the antimicrobial mechanisms of action of botanicals have been carefully studied for their pharmaceutical or food preservative uses, less information is available concerning their use to control plant pathogenic microorganisms (Burt 2004; Buchbauer 2009; Negi 2012).

## VII. Elaboration of the products

The parameters of the processes for mass production and formulation of MBA and botanicals have to be carefully defined to optimize the quality and yield of the final product. In fact, these steps affect the efficiency, shelf-life, ease of handling and of application of the final product (Montesinos 2003; Fravel 2005). Microorganisms are produced in high-volume fermenters to perform liquid or solid fermentation. Mass production of a given microorganism has to be optimized by selecting optimal growth conditions (aeration, pH, substrate, temperature). The product concentration should also be optimized. For MBA, it is commonly accepted that efficient control can only be achieved when the MBA is present in higher concentrations than the pathogen (Fravel *et al.* 2003). Then, the choice of a formulant (e.g. alginate, coal, talc) is of prime importance (Fravel *et al.* 1998). In a commercialized MBA product, the amount of formulant makes up the most part of the product. Companion<sup>®</sup> (Table 2) for example, contains only 0.03 % of a strain of *Bacillus subtilis*, and 99.97 % of formulant. Garibaldi *et al.* (1987) described that using poplar bark to formulate an inoculum of non-pathogenic strains of *Fusarium* spp. decreased its biocontrol efficiency as compared to wheat kernels or wheat bran. The mixture of microorganisms sold by Premier Tech Horticulture as Pro-mix BX biofungicide + mycorrhizae<sup>®</sup> is composed of a combination of lime, peat, perlite, vermiculite, and a wetting agent. The choice of the formulant is so determining that it is kept secret for most of the marketed products.

Conversely, little information is available about the formulation and mass production processes of botanicals for plant disease management. However, more studies have examined these processes for pharmaceutical or food uses. The main processes used to obtain EO are hydrodistillation, steam or dry distillation, and mechanical extraction (e.g. expression) in large-volume distillation containers (Schmidt 2015). The extraction parameters, such as temperature, pressure, and total time also influence on the quantity and quality of the final product (Baser and Buchbauer 2009). As an example, a lower yield but a higher quality of EO from *Curcuma longa* leaves was obtained with water distillation (Babu *et al.* 2007). Thus, the extraction technique needs to be carefully chosen. Similarly, the nature of the solvents determines the chemical composition of PE. For example, anthocyanins can be obtained with methanol or water extraction, while alkaloids can be recovered using ether or ethanol as solvents (Azmir *et al.* 2013). As for MBA, the amount of product to be used has to be defined to achieve best efficiency and to avoid undesirable effects (Bowers and Locke 2000). Special attention has to be devoted to the standardization of these parameters to obtain a consistent and uniform final product. Asparagus extract eluted with ethanol proved to be phytotoxic for asparagus seeds, while it was not phytotoxic when other solvents were used to extract the PE (Rosado-Álvarez *et al.* 2014). Anyway, application of botanicals presents limitations as a high amount of product is required to reach

a good efficiency. Kadoglidou *et al.* (2011) calculated that 1 ha of oregano is needed to obtain the 5 t of carvacrol required to treat 1 ha of field at an efficient concentration. Thus, the feasibility of a large-scale use of botanicals is questionable.

The mode of application of the product can at least partially solve the scarcity issue. Applications have to fit with the cultural practices of the diseased crop. The tuning of the mode of application with cultural practices influences the success or failure of a biocontrol product. The method of application also impacts the efficiency of the formulated product. MBA and botanical products can be prepared under liquid or solid forms (Jones and Burges 1998; Soliman 2013). Essential oils or plant extracts can also be prepared in a semi-liquid form (e.g. gel, liposomes) (Soliman 2013). Therefore MBA or botanicals can be incorporated into horticultural potting mixes or in-furrow when they are under a solid form (e.g. granular, powder), while a wettable powder formulation is more adapted for spraying or dipping applications (Cook *et al.* 1996; Spadaro and Gullino 2005). These methods of application are probably more suitable for use in the greenhouse. For open cultures, application by seed coating or by micro-encapsulation is probably a better option (Minuto *et al.* 2007; Mohan *et al.* 2011; Soliman 2013; El-Mougy *et al.* 2015).

All these steps of product development are essential to obtain a cost-effective products for biocontrol. One of the main factors is the economic feasibility of the product, which highly influences the grower's choice. Thus it will contribute to its good competitiveness on the market of plant disease management.

## VIII. Registration processes

To commercialize a biological product, companies have to go through registration processes. Registration requirements depend on countries. In Europe, both biological (MBA and botanical) and chemical plant protection products are submitted to regulation No. 1107/2009 (EU 2009b). The active substance is first evaluated by a reporter member state which assesses if its application is acceptable and prepares a report. This report is then evaluated by the European Food Safety Authority (EFSA). Finally, the Commission's Directorate General for Health and Food Safety decides for its final approval or not. Once the active substance is authorized at the European level, the preparation, *i.e.* the formulated product, is evaluated by national authorities (Hauschild *et al.* 2011). Botanicals are considered as low-risk active substances or basic substances according to regulation No. 1107/2009, hence an easier registration process (EU 2009b; Tamm *et al.* 2011).

In Europe, biological products are evaluated in the same way as chemicals although they do not behave as such (Alabouvette *et al.* 2012). The registration process can take up to 5 years and cost more than 2 million euros (Ehlers 2011). The prohibitive impact of such a procedure on companies is then easily understandable. Estimations show that only 0.1 % of the tested microorganisms reach the market, which explains why the registration process is often considered as a real bottleneck for commercialization (Pertot 2014). In the USA, regulatory approval conditions for MBA and botanicals are less complicated as they are not evaluated in the same way as chemicals. They are divided into microbial pesticides and biochemical pesticides. Products are submitted to the registration eligibility

decision of the US Environmental Protection Agency (EPA), which only examines hazard and risk assessments, not efficiency. Some of the biocontrol products can also be considered as minimal risk pesticides; in this case, they can be used without any registration (Hauschild *et al.* 2011). Consequently, the commercialization of these products is especially well developed in the USA (Regnault-Roger *et al.* 2012).

Anyhow, these registration processes aim at listing the risks that need to be assessed prior to registration in order to safely commercialize a product. In 1996, Stine Microbial Product Company registered a bio-fungicide based on a strain of *Burkholderia cepacia*, but growing concerns regarding the threat it represents for immunocompromised patients led to its removal several years later (Holmes *et al.* 1998; Wozniak 2007). In Europe, according to regulation No. 1107/2009, requirements include a precise identification and characterization of the microorganism at the strain level; a description of its biological properties and ecology; all available details on the product composition and production; information on the methods used to characterize the microorganism and the possible contaminants of the product; a full study of the potential effects of the microorganism on human health; a check on the residues likely to be present in the product or on the treated plant; specifications about the fate and behavior of the microorganism in the environment and its potential effects on non-target organisms (EU 2009b; Alabouvette and Cordier 2011). For botanicals, if the product is registered as an active substance, the same requirements as those presented above are needed (Hauschild *et al.* 2011). However, if the product is considered as a low-risk active substance or as a basic substance, the conditions to be fulfilled are described in annex II.5 and in article 23 of regulation No. 1107/2009, respectively (EU 2009b). These requirements are only related to the active substance of the product. Details about the formulated products, such as the mode of application, the composition, the targeted pathogen or the conditions of use, can be requested at the national level (Ehlers 2011).

## IX. Promising development and success stories

Despite the difficulties encountered to reach commercialization, 23 MBA products and 3 botanical products are currently available round the world to manage *F. oxysporum* diseases on ornamentals (Table 2). Among these products, only 5 MBA are authorized in Europe, while no botanical is yet available. In 2010, Sant *et al.* published interesting results on the control of Fusarium wilt of carnation using strain T34 of *Trichoderma asperellum*. The strain proved able to colonize the substrate and to reduce disease incidence and severity by 33 % and 48 %, respectively. In 2011, the product was registered by the EPA, in charge of recording all pesticides allowed for sale in the United States (EPA, 2011). In 2012, the European Food Safety Authority gave its first conclusion about the potential risk of T34. The product is about to be commercialized in Europe (EFSA, 2012). In 2013, Canada's Pest Management Regulatory Agency decided to register the product for sale to control *F. oxysporum* on greenhouse ornamentals (PMRA, 2013). The majority of the MBA products commercialized to control *F. oxysporum* on ornamentals are composed of *Trichoderma* strains. More globally, the main microbial species efficient against *F. oxysporum* on ornamentals are already represented on the market (Table 2). However, only a few formulations based on *Fusarium* spp., *Streptomyces* spp. or *Pseudomonas* spp.

are sold, while many strains of these genera have been largely assessed in the literature. The low number of studies published in this domain and assessed in the present review does not permit to draw hypotheses about this observation. Nevertheless, when considering the entire market, it is obvious that mainly microorganisms studied for a long time are commercialized, which highlights the lack of diversity on the market (Pertot, 2014).

Regarding botanicals, even fewer products are marketed. However, they should provide a sustainable control method: they display various modes of action, so the risk of pathogens bypassing them is reduced (Chiasson *et al.* 2008). They are biodegradable, so they are naturally catabolized and non-persistent in soil and water. This makes them an eco-friendly solution (Isman, 2000; Regnault-Roger *et al.* 2012). Even if a high amount of biomass is needed, it is possible to use only part of the plant or plant by-products from production (Batish *et al.* 2008). Furthermore, botanicals can be applied in microcapsules or seed coating to facilitate their use and avoid any excessive input (El-Mougy *et al.* 2015; Soliman, 2013). In addition, in some cases they promote plant yield and quality (Granja *et al.* 2014). Three products are currently registered round the world to control *F. oxysporum* on ornamentals. The first one, Armorex<sup>®</sup>, is commercialized by SoilTech (Iowa, USA). It is composed of EO from garlic, pepper, sesame, rosemary, and clove. The second one, Fungastop<sup>®</sup>, is also marketed by SoilTech. It is composed of citric acid, mint oil, citrus pulp, fish oil, glycerol, and vitamin C. These two products are sold in the USA. The last one, named Regalis<sup>®</sup>, is produced by Marrone bio innovations. It consists of an extract from giant knotweed, *Reynoutria sachalinensis*. This product is approved for use nearly in the whole American continent.

As a whole, the market of biocontrol is making progress, although an improvement of the European regulation process is certainly required to facilitate marketing. In 2004, the global biocontrol market was \$588 million, among which 40 % for microorganisms. The main sales were localized in North America (43 %), followed by Europe and Asia with 21 % and 12 % of the market, respectively. The European market doubled between 1985 and 2004, and is expected to keep rising in the years to come (Bolckmans, 2008). These facts are confirmed by a study focusing on biocontrol perspectives in Europe, which highlights an increasing interest for these products. In 2012, the European market for biocontrol microorganisms was estimated around 52 million euros (Nicot *et al.* 2012). Similar figures are not available for botanicals, but the increasing number of scientific publications in this area highlights the promising future of these products. Globally, the potential of MBA and botanical resources is not fully exploited yet, and there is ample space for improvement.

## X. Integrated disease management

The two control methods presented here have proved efficient alone, but they would be more effective once combined and integrated with other control methods. Combination can be done simultaneously or successively. As an example, Minuto *et al.* (2008) tested the effect of biocontrol and physical methods by modifying the pH and the disinfection protocol of the nutrient solution (using UV radiation, slow sand filtration, or slow rockwool filtration), and application of MBA (*Fusaria* mix, *Streptomyces griseoviridis*, or *Trichoderma* mix) to reduce the incidence of *F. oxysporum* on chrysanthemum. The best result was achieved by combining a neutral pH of the nutrient solution, slow

sand or rockwool filtration of the nutrient solution, and *S. griseoviridis* or *Trichoderma* mix application. The use of each method alone revealed less efficient. On gladiolus corms, the combined use of treatments inhibiting both the growth and the proliferation of the fungus (using EO, UV-C, and hot water) was more effective in reducing the fungus population during storage than each treatment used alone (Sharma and Tripathi, 2008). Biocontrol products can be combined with cultural practices (soil or nutrient solution disinfection, management of the pH of the substrate) or chemicals at different times during a production cycle (Duijff *et al.* 1995; Elmer and McGovern, 2004; Mishra *et al.* 2000). The use of these different practices often allows for better and longer disease management.

## XI. Conclusion

In the last years, new or updated control methods have emerged to offer plant growers alternatives to chemicals to manage plant diseases. Among them, MBA and botanicals have sparked interest. The main ideas of this work are listed below.

- 1) Although pathogenic *F. oxysporum* are highly dangerous pathogens for ornamental production, only few publications dealing with biocontrol of these fungi have been recorded in comparison to other host plants of *F. oxysporum*. But the restriction of chemical use for environmental and human health concerns has stimulated the study of these alternatives.
- 2) Among the microorganisms evaluated so far, a majority has proved efficient in reducing the disease. However, only a few of them are commercialized. Thus, these microorganisms represent good candidates that should be exploited.
- 3) Botanicals for the control of pathogenic fungi have been poorly studied, although their antimicrobial properties for other uses have been well known for decades. Nevertheless, studies show a good potential of these mixtures. In addition, they display interesting features such as their low risk for the environment and for human health, and their biodegradability. Botanicals will soon be part of integrated disease management strategies.
- 4) Numerous techniques and parameters are available to evaluate the biocontrol competences of microorganisms and botanicals. However, *in vivo* tests under controlled conditions are undoubtedly the best technique. Although *in vitro* tests are more convenient, *in vivo* tests should first be performed to obtain reliable screening results.
- 5) In this context, research and development should play a key role in the development of these products to define and optimize the parameters of production and use. They should be the link between research and the market.
- 6) This development will only succeed if the training of agricultural stakeholders about the use of biological control products, their advantages and drawbacks is encouraged in parallel.
- 7) Producers are expecting solutions to face the threat of diseases on crops, and they should be a driving force for the development and the understanding of alternative control methods such as biocontrol. The increasing number of studies on MBA and botanicals highlights that research is already on-going. However, the low number of products available in Europe shows that

Chapitre I : Contrôle biologique des maladies des plantes ornementales causées par *Fusarium oxysporum* :  
une revue

legislation clearly slows down the commercialization of these products. This is even more obvious when comparing the number of products available in the USA, where procedures are different.



## Chapitre II : Matériels et méthodes



## I. Matériels

### I.1 Les souches microbiennes

#### I.1.1 Constitution d'une collection de souches de *Fusarium* isolées de cyclamen

Deux collectes d'isolats ont été menées par Astredhor Seine-Manche en 2009 et 2010 auprès d'horticulteurs de Normandie. Au total, 34 isolats de *Fusarium* (notés Fo 28 à Fo 61) associés à la fusariose du cyclamen sont isolés de tubercules de cyclamen symptomatiques ou asymptomatiques (Tableau 1). Les jeunes plants ont été prélevés chez 10 producteurs de Normandie s'approvisionnant chez 6 fournisseurs européens différents. Les prélèvements ont été effectués dès la réception des jeunes plants chez les producteurs. Les isolements ont été réalisés selon le protocole présenté dans la partie II.1.4.

Cette collection est complétée avec 40 souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Focy) originaires de différentes collections internationales de microorganismes ou fournies par des collègues ayant travaillé sur la fusariose du cyclamen (Tableau 1). Par la suite, cette collection sera nommée «collection Focy».

#### I.1.2 Constitution d'une collection de souches microbiennes diverses

Une seconde collection de souches microbiennes autres que Focy a été constituée (Tableau 2). Elle se compose de 69 souches fongiques et bactériennes provenant de la collection MIAE (Microorganismes d'Intérêt AgroEnvironnemental, INRA, Dijon) et d'autres collections de microorganismes. Cette collection est constituée de :

- 16 souches de *F. oxysporum* telluriques supposées «non pathogènes»
- 26 souches de *F. oxysporum* pathogènes d'autres plantes que le cyclamen
- 18 souches de *Fusarium* appartenant à d'autres espèces que *F. oxysporum*
- 3 souches de champignons telluriques n'appartenant pas au genre *Fusarium*
- 6 souches d'autres microorganismes pathogènes du cyclamen dont 1 bactérie et 5 champignons

Pour compléter cette collection, des isolements de champignons ont été effectués à partir de graines de cyclamen (cf. partie II.1.6.). Les isolats sont groupés en morphotypes d'après leurs caractéristiques morphologiques. Au total, 31 morphotypes différents ont été décrits et 8 d'entre eux ont été intégrés à la collection (Tableau 2). Ces 8 isolats ont été sélectionnés suite à leur identification taxonomique, car ils représentent différents genres fongiques communément retrouvés dans les sols. Par la suite, cette collection sera nommée «collection d'autres microorganismes».

Chapitre II : Matériels et méthodes

Tableau 1 : Souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* et isolats de *Fusarium* collectés à partir de cyclamens symptomatiques ou asymptomatiques.

Isolats et souches	Code de travail <sup>a</sup>	Numéro MIAE	Autres numéros d'accension <sup>b</sup>	Origine géographique	Date d'isolement	Cultivar d'isolement <sup>c</sup>	Fourni par ou référence	Identification moléculaire <sup>d</sup>
Isolats de <i>Fusarium</i> issus de campagnes de prélèvement chez des producteurs	Fo 28 (T1 à T6)	MIAE01800 (T1)		Pays-Bas	2009	Umbrella	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex
	Fo 29 (T1 à T6)	MIAE01698 (T1)		Pays-Bas	2009	Umbrella	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 30 (T1 à T6)	MIAE01651 (T1)		France	2009	Swan rose 1758	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex
	Fo 31 (T1 à T6)	MIAE01694 (T1)		France	2009	Swan rose 1758	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 32 (T1 à T6)	MIAE01688 (T1)		France	2009	Swann mélange	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 33 (T1 à T6)			France	2009	Swan mélange	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 34 (T1 à T6)	MIAE01689 (T1)		France	2009	Swan mélange	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 35 (T1 à T6)	MIAE01813 (T1)		Italie	2009	Halios Frangé mélange	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex
	Fo 36 (T1 à T6)	MIAE01814 (T1)		Italie	2009	Halios Frangé mélange	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex
	Fo 37 (T1 à T6)	MIAE01690 (T3)		France	2009	Swan 363 rose flammé	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 38 (T1 à T6)	MIAE01691 (T4)		France	2009	Swan 363 rose flammé	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 39 (T1 à T6)	MIAE01692 (T1)		France	2009	Swan 363 rose flammé	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 40 (T1 à T6)	MIAE01815 (T1)		France	2009	Super Serie winter rouge écarlate	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex
	Fo 41 (T1 à T6)	MIAE01816 (T1)		France	2009	Super serie winter blanc	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex
	Fo 42 (T1 à T6)	MIAE01695 (T1)		France	2009	Super serie winter blanc	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 43 (T1 à T6)	MIAE01507 (T3)		Pays-Bas	2010	Une variété de mini cyclamen*	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 44 (T1 à T6)	MIAE01693 (T1)		Pays-Bas	2010	Une variété de mini cyclamen*	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 45 (T1 à T6)	MIAE01817 (T1)		Italie	2010	Metis mélange	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex
	Fo 46 (T1 à T6)	MIAE01701 (T1)		Pays-Bas	2010	Halios Lollipop frangé mélange 257	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 47 (T1 à T6)			Pays-Bas	2010	Umbrella	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
Fo 48 (T1 à T6)			Pays-Bas	2010	Umbrella	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>	
Fo 49 (T1 à T6)	MIAE01699 (T1)		Pays-Bas	2010	Umbrella	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>	
Fo 50 (T1 à T6)	MIAE01818		Pays-Bas	2010	Umbrella	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex	
Fo 51 (T1 à T6)	MIAE01819 (T1)		Pays-Bas	2010	Umbrella	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex	
Fo 52 (T1 à T6)	MIAE01700 (T1)		Pays-Bas	2010	Umbrella	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>	
Fo 53 (T1 à T6)			Pays-Bas	2010	Umbrella	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>	
Fo 54 (T1 à T6)			Pays-Bas	2010	Umbrella	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>	

Chapitre II : Matériels et méthodes

	Fo 55 (T1 à T6)			Pays-Bas	2010	Metis magenta decora (4220)	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 56 (T1 à T6)	MIAE01702 (T1)		Allemagne	2010	Metis Mélangé flammé	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 57 (T1 à T6)			Pays-Bas	2010	Metis saumon écarlate	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 58 (T5 à T6)	MIAE01820 (T5)		Pays-Bas	2010	Metis victoria	A. Langlois	<i>F. fujikuroi</i> species complex
	Fo 59 (T1 à T6)	MIAE01696 (T1)		Italie	2010	Rainier	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 60 (T1 à T6)	MIAE01697 (T1)		Italie	2010	Super Serie Mini Winter Mélange	A. Langlois	<i>F. oxysporum</i>
	Fo 61 (T1 à T6)	MIAE01821 (T1)		Italie	2010	XXL Mammouth*	A. Langlois	<i>F. venenatum</i>
Souches de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i> provenant de collections internationales ou fournies par des collègues	Focy 1			France	1994	Inconnu		<i>F. oxysporum</i>
	Focy 2	MIAE01687		France	1994	Inconnu		<i>F. oxysporum</i>
	Focy 3	MIAE01658	BBA 62316	Allemagne	1955	Inconnu		<i>F. oxysporum</i>
	Focy 4	MIAE00190	ATCC 16061, CBS 159.57, FRC O-1825, FRC O-1831, BBA 7022, DSM 62316, IMB 7521, NRRL 36266, NRRL 22542	Allemagne	avant 1995	Inconnu		<i>F. oxysporum</i>
	Focy 5		NRRL 36266	Allemagne (Berlin)	Inconnue	Inconnu	J. Swezey	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 6		NRRL 22542	Allemagne	Inconnue	Inconnu	J. Swezey	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 7	MIAE01654	FRC O-6501, NRRL 26673	Etats-Unis (Texas)	avant 1997	Inconnu	J. Swezey	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 8	MIAE01655	FRC O-6503, NRRL 26674	Etats-Unis (Texas)	avant 1997	Inconnu	J. Swezey	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 9	MIAE01656	FRC O-6507, NRRL 26675	Etats-Unis (Texas)	avant 1997	Inconnu	J. Swezey	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 10	MIAE01657	FRC O-6547, NRRL 26676	Etats-Unis (Texas)	avant 1997	Inconnu	J. Swezey	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 11	MIAE01660	BBA 62315	Allemagne	1947	Inconnu	W. Maier	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 12		BBA 64417	Allemagne	1984	Inconnu	W. Maier	<i>F. equiseti-incarnatum</i> species complex
	Focy 13	MIAE01684		Italie (Albenga)	2008	Alios	A. Minuto	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 14	MIAE01685		Italie (Albenga)	2008	Latinia	A. Minuto	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 15	MIAE01686		Italie (Albenga)	2008	Alios	A. Minuto	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 16	MIAE01658	FRC O-1099, NRRL 38294	Australie	Inconnue	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 17	MIAE01667	FRC O-1797	Pays-Bas	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 18	MIAE01664	FRC O-1799	Royaume-Uni	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
	Focy 19	MIAE01663	FRC O-1800	Royaume-Uni	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>

## Chapitre II : Matériels et méthodes

Focy 20	MIAE01670	FRC O-1802	Japon	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
Focy 21	MIAE01665	FRC O-1804	Royaume-Uni	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
Focy 22	MIAE01666	FRC O-1809	Pays-Bas	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
Focy 24	MIAE01668	FRC O-1834	Pays-Bas	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
Focy 25	MIAE01669	FRC O-1842	Pays-Bas	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
Focy 26	MIAE01662	FRC O-1239	Etats-Unis	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
Focy 27	MIAE01661	FRC O-1205	Australie	avant 1995	Inconnu	Wouldt <i>et al.</i> , 1995	<i>F. oxysporum</i>
Focy 62	MIAE01673		Argentine (Buenos Aires)	≤ 2004	Sierra	Lori <i>et al.</i> , 2012	<i>F. oxysporum</i>
Focy 69	MIAE01674		Argentine (Buenos Aires)	≤ 2004	Inconnu	Lori <i>et al.</i> , 2012	<i>F. oxysporum</i>
Focy 79	MIAE01672		Argentine (Buenos Aires)	≤ 2004	Sierra	Lori <i>et al.</i> , 2012	<i>F. oxysporum</i>
Focy 83	MIAE01675		Argentine (Buenos Aires)	≤ 2004	Inconnu	Lori <i>et al.</i> , 2012	<i>F. oxysporum</i>
Focy 84	MIAE01676		Argentine (Buenos Aires)	≤ 2004	Inconnu	Lori <i>et al.</i> , 2012	<i>F. oxysporum</i>
Focy 85	MIAE01677		Argentine (Buenos Aires)	≤ 2004	Inconnu	Lori <i>et al.</i> , 2012	<i>F. oxysporum</i>
Focy 86	MIAE01678		Argentine (Córdoba)	≤ 2004	Inconnu	Lori <i>et al.</i> , 2012	<i>F. oxysporum</i>
Focy 87	MIAE01679		Inconnue	< 2002	Inconnu	W. H. Elmer	<i>F. oxysporum</i>
Focy 88	MIAE01680		Etats-Unis (Connecticut)	< 2013	Inconnu	W. H. Elmer	<i>F. oxysporum</i>
Focy 89	MIAE01681		Etats-Unis (Connecticut)	< 2013	Inconnu	W. H. Elmer	<i>F. oxysporum</i>
Focy 90	MIAE01682		Etats-Unis (Connecticut)	< 2013	Inconnu	W. H. Elmer	<i>F. oxysporum</i>
Focy 91	MIAE01683		Etats-Unis (Connecticut)	< 2013	Inconnu	W. H. Elmer	<i>F. oxysporum</i>
Focy 92			Inconnue	< 2013	Inconnu	W. H. Elmer	<i>F. oxysporum</i>

## Chapitre II : Matériels et méthodes

Focy 93

MIAE01671

MAFF 712101

Japon

1990

Inconnu

Someya et al., *F. oxysporum*  
2000

---

<sup>a</sup> Pour les isolats issus des campagnes de prélèvements, 6 monospores ont été conservées après purification (notées T1 à T6) sauf pour l'isolat Fo 58 (2 monospores notées T5 et T6). Les souches provenant de collections internationales ou fournies par des collègues ont été notées Focy dès leur réception au laboratoire. Leur appartenance à la forme spéciale cyclaminis a été testée par la suite. <sup>b</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginie ; BBA, Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Berlin, Allemagne ; CBS, Centraal-bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Pays-Bas ; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne ; FRC, Fusarium Research Center, State College, Pennsylvanie ; IMI, Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), Oxford, Royaume-Uni ; MAFF, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japon ; MIAE, Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment, INRA, Dijon, France ; NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service (ARS), Peoria, Illinois. <sup>c</sup> Les astérisques indiquent des plantes asymptomatiques. <sup>d</sup> Les souches ont été identifiées en utilisant les séquences de l'espaceur transcrit interne (ITS) de l'ADN ribosomique et du facteur d'élongation 1- $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ).

Chapitre II : Matériels et méthodes

Tableau 2 : Souches de *Fusarium*, de champignons telluriques, de microorganismes pathogènes du cyclamen et isolats fongiques isolés de graines de *Cyclamen persicum*.

Souches et isolats	Identification taxonomique	Code de travail	Numéro MIAE	Autres numéros d'accession <sup>a</sup>	Lieu d'isolement	Date d'isolement	Identification moléculaire <sup>b</sup>
<i>F. oxysporum</i> telluriques "non pathogènes"	<i>F. oxysporum</i>	91069	MIAE01780		France (Dijon)	1991	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	91104	MIAE01781		France (Dijon)	1991	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	B2	MIAE01782		France (Blaudes)	2011	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	B4	MIAE01783		France (Blaudes)	2011	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Ca2	MIAE01784		France (Carquefou)	1997	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Ca31	MIAE01785		France (Carquefou)	1997	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Chat40	MIAE01786		France (Châteaurenard)	1997	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Chat49	MIAE01792		France (Châteaurenard)	1997	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Chat255	MIAE01787		France (Châteaurenard)	1997	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Chat266	MIAE01788		France (Châteaurenard)	1997	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	E001	MIAE01650		France (Epoisses)	2009	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	E005	MIAE01790		France (Epoisses)	2009	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	E010	MIAE01791		France (Epoisses)	2009	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Fo20	MIAE00676		France (Châteaurenard)	1978	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Fo34	MIAE00677		France (Châteaurenard)	1978	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i>	Fo47	MIAE00047	ATCC MYA-1198	France (Châteaurenard)	1978	<i>F. oxysporum</i>
<i>F. oxysporum</i> pathogènes	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	Foa1	MIAE00453	ATCC MYA-1202	Maroc (Zagora)	1966	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	Foas1	MIAE01766		Inconnu	Inconnue	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>basilici</i>	Fob2	MIAE01767		Inconnu	1994	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>basilici</i>	Fob3	MIAE01768		Inconnu	>1999	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Focub1	MIAE01125		Taiwan	Inconnue	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Focub2	MIAE01126		Taiwan	Inconnue	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Focuc1	MIAE01473		Inconnu	Inconnue	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	Fod5	MIAE01769		Inconnu	>2000	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	Fod6	MIAE01770		Inconnu	>2000	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	Fod7	MIAE01771		Inconnu	>2000	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>elaeidis</i>	Foe1	MIAE01772		Inconnu	Inconnue	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i>	Foln3	MIAE00347	ATCC MYA-1201	France (Rennes)	1981	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol8	MIAE00046	ATCC MYA-1199	France (Villefranche sur Saône)	1971	<i>F. oxysporum</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol26	MIAE00461		France (Nantes)	1977	<i>F. oxysporum</i>	

Chapitre II : Matériels et méthodes

	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fol101	MIAE00525		Inconnu	Inconnue	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom15	MIAE00680	ATCC MYA-1200	France (Paris)	1965	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom24	MIAE00681		France (Nantes)	1968	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Fom35	MIAE01644		France (Angers)	1985	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	Fopis1	MIAE01463	ATCC 24381, CBS 127.73, IMI 159029, NRRL 36228	Royaume-Uni	1973	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Forl5	MIAE00471		France (Brest)	1993	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Forl12	MIAE00045		Maroc	1995	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Forl45	MIAE00476		France (Brest)	1998	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	For1	MIAE01775		Inconnu	Inconnue	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>	For2	MIAE01776		Inconnu	Inconnue	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Fov1	MIAE01773	CBS 116611	Côte d'Ivoire (Bouabé)	1994	<i>F. oxysporum</i>
	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Fov4	MIAE01774	CBS 116614	Côte d'Ivoire (Tiéningboué)	1994	<i>F. oxysporum</i>
Autres espèces de <i>Fusarium</i>	<i>F. acuminatum</i>	FAC1	MIAE00244	BBA 65224	Inconnu	Inconnue	<i>F. acuminatum</i>
	<i>F. avenaceum</i>	FAV5	MIAE00286	ATCC 24362, CBS 121.73, IMI 145562	Angleterre	Inconnue	Complexe d'espèces <i>F. tricinctum</i>
	<i>F. chlamydosporum</i>	FCHL2	MIAE00287	ATCC 24372, BBA 62168, CBS 124.73, IMI 128101, NRRL 25535	Pakistan	Inconnue	Complexe d'espèces <i>F. chlamydosporum</i>
	<i>F. commune</i>	NH1	MIAE00101		Algérie (Oran)	2006	<i>F. commune</i>
	<i>F. culmorum</i>	FCUL4	MIAE00688		France	1993	<i>F. culmorum</i>
	<i>F. equiseti</i>	FEQ1	MIAE01649		France	1989	<i>F. equiseti</i>
	<i>F. graminearum</i>	PH1	MIAE01623	CBS 123657, FGSC #9075, NRRL 31084	Etats-Unis (Michigan)	Inconnue	Complexe d'espèces <i>F. sambucinum</i>
	<i>F. langsethiae</i>	FLANG6	MIAE00289		France	2007	<i>F. langsethiae</i>
	<i>F. lateritium</i>	FLAT5	MIAE00291	ATCC 11857, CBS 268.51	Pays-Bas	Inconnue	<i>F. lateritium</i>
	<i>F. moniliforme</i>	FMO3	MIAE00061		Inconnu	Inconnue	Complexe d'espèces <i>F. fujikuroi</i>
	<i>F. poae</i>	FPO1	MIAE00299	CBS 597.96	Pologne	1991	<i>F. poae</i>
	<i>F. redolens</i>	E003	MIAE01652		France	2009	<i>F. redolens</i>
	<i>F. sambucinum</i>	FSA2	MIAE00301	CBS 533.96	Pologne	1991	Complexe d'espèces <i>F. sambucinum</i>
	<i>F. solani</i>	E006	MIAE01653		France	2009	<i>F. solani</i>
	<i>F. sporotrichioides</i>	FSPO1	MIAE00304	CBS 534.96	Pologne	1989	<i>F. sporotrichioides</i>

Chapitre II : Matériels et méthodes

	<i>F. subglutinans</i>	FSUB2	MIAE00068		Inconnu	Inconnue	Complexe d'espèces <i>F. fujikuroi</i>
	<i>F. tricinctum</i>	FTR1	MIAE00305	CBS 144.78	Inconnu	Inconnue	Complexe d'espèces <i>F. tricinctum</i>
	<i>F. verticillioides</i>	FVER3	MIAE00306		Italie (Turin)	Inconnue	Complexe d'espèces <i>F. fujikuroi</i>
Autres champignons telluriques	<i>Aspergillus sp.</i>	SYS419	MIAE01778		France	2010	<i>Aspergillus sp.</i>
	<i>Trichoderma sp.</i>	MIAE 29	MIAE00029		Inconnu	Inconnue	<i>Trichoderma gamsii</i>
	<i>Verticillium dahliae</i>	MIAE 48	MIAE00048		Inconnu	Inconnue	<i>Verticillium dahliae</i>
Autres microorganismes pathogènes du cyclamen	<i>Botrytis cinerea</i>	BOT2 bis	MIAE01777		France (Eyragues)	1991	<i>Botrytis cinerea</i>
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>C. acutatum</i>	MIAE01743	C27-1-3, NRRL 62813	Etats-Unis (Michigan)	Inconnue	<i>Colletotrichum sp.</i>
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>			ATCC 15713, CCM 1008, DSM 30168, LMG 2404, MPL-EC-WT-1, NCPPB 312, NRRL B-4072	Etats-Unis (Illinois)	Inconnue	<i>P. carotovorum</i>
	<i>Phytophthora tropicalis</i>	PO199	MIAE01718		Inconnu	Inconnue	<i>P. tropicalis</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>	C1	MIAE01476		France (Châteaurenard)	2013	<i>R. solani</i>
	<i>Thielaviopsis basicola</i>	<i>T. basicola</i>	MIAE01744	A-13644, NRRL 66261	Philippines (île du Muzon)	Inconnue	<i>Ceratocystis paradoxa</i>
Isolats provenant de graines de cyclamen	Inconnue	morph 1	MIAE01795		France (Dijon)	2013	<i>Penicillium sp.</i>
	Inconnue	morph 2	MIAE01796		France (Dijon)	2013	<i>Penicillium polonicum</i>
	Inconnue	morph 9			France (Dijon)	2013	Genre non identifié (Heliotales)
	Inconnue	morph 10	MIAE01797		France (Dijon)	2013	<i>Alternaria concatenata</i>
	Inconnue	morph 14			France (Dijon)	2013	<i>Geomyces sp.</i>
	Inconnue	morph 22			France (Dijon)	2013	<i>Penicillium sp.</i>
	Inconnue	morph 24	MIAE01798		France (Dijon)	2013	<i>Geomyces pannorum</i>
	Inconnue	morph 26	MIAE01799		France (Dijon)	2013	<i>Paraphoma fimeti</i>

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginie ; BBA, Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Berlin, Allemagne ; CBS, Centraal-bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Pays-Bas ; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Brno, République Tchèque ; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne ; FGSC, Fungal Genetics Stock Center, Manhattan, New York ; IMI, Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), Oxford, Royaume-Uni ; LMG, Belgian co-ordinated collections of micro-organisms (BCCM/LMG) ; MIAE, Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment, INRA, Dijon, France ; NCPPG, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, Royaume-Uni ; NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service (ARS), Peoria, Illinois. <sup>b</sup> Les souches ont été identifiées en utilisant les séquences de l'espaceur transcrit interne (ITS) de l'ADN ribosomique et du facteur d'élongation 1- $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ).

Tableau 3 : Produits de protection des plantes ou de matière fertilisante utilisés dans cette étude.

Code des produits	Composition	Concentration annoncée (en UFC/g de produit) <sup>a</sup>	Utilisation
1	<i>Gliocladium</i> sp.	2.10 <sup>8</sup>	Produit de protection des plantes
2	<i>Bacillus</i> sp.	2.10 <sup>9</sup>	Matière fertilisante
3	<i>Glomus</i> sp.	4.10 <sup>3</sup>	Matière fertilisante
4	<i>Pseudomonas</i> sp. et <i>Trichoderma</i> sp.	10 <sup>9</sup> (bactérie) et 4.10 <sup>6</sup> (champignon)	Matière fertilisante
5	<i>Trichoderma</i> sp.	10 <sup>9</sup>	Confidentiel
6	<i>Fusarium</i> sp.	10 <sup>7</sup>	Aucune
7	<i>Trichoderma</i> sp.	10 <sup>7</sup>	Confidentiel

<sup>a</sup> UFC : unité formant colonie

## I.2 Les cultivars de cyclamens

Au cours de ces travaux, 2 cultivars de *Cyclamen persicum* provenant de 2 obtenteurs différents ont été utilisés. Le cultivar Swan rose flammé (Eyraud production, Saint-Laurent-la-Conche, France) a été décrit comme particulièrement sensible à la fusariose du cyclamen lors des campagnes de prélèvement réalisées par Astredhor Seine-Manche. Ce cultivar a donc été choisi pour effectuer l'ensemble des essais du projet à l'exception des tests en chambre climatique. Pour ces derniers, le cultivar Melody red (Varinova, Berkel en Rodenrijs, Pays-Bas) a été utilisé car il présente le meilleur taux de germination des cultivars disponibles au laboratoire.

## I.3 Les agents de lutte biologique

Six produits à base de microorganismes vendus soit en matières fertilisantes, soit en produits de protection des plantes ont été sélectionnés (Tableau 3). Ces produits sont déjà commercialisés mais ne disposent d'aucune homologation relative à leur utilisation pour lutter contre Focy. Un septième produit (n°6) a été sélectionné. Il est formulé mais pas encore disponible à la vente. Les produits sélectionnés sont composés de microorganismes largement décrits dans la littérature pour leur activité antagoniste contre divers agents pathogènes.

# II. Méthodes

## II.1 Analyses microbiologiques

### II.1.1 Purification des souches et obtention de monospores

Les souches sont purifiées pour assurer leur unicité génétique et pour éliminer les éventuelles bactéries présentes dans la culture d'origine.

Pour les 34 isolats provenant de la campagne de prélèvement de 2009 et 2010, 6 monospores indépendantes par isolat (identifiées de T1 à T6) ont été obtenues par l'Institut Technique du Lin (ITL) avant le début du projet. Pratiquement, les isolats ont été mis en culture sur milieu gélosé. Après incubation, des spores ont été décrochées du mycélium avec une spatule stérile et introduites dans 9 mL d'eau stérile. A partir de cette suspension-mère, des dilutions au dixième ont été faites en série jusqu'à la suspension à 10<sup>-10</sup>. Pour chaque dilution, 1 mL a été déposé et étalé sur malt agar streptomycine (Annexe 2) et 6 boîtes/isolat ont été préparées. Les boîtes ont ensuite été incubées à 25 °C pendant 5 à 7 jours. Les colonies bien isolées ont été repiquées.

Toutes les autres souches de la collection Focy et les isolats provenant de graines de cyclamen sont placés sur boîtes de Petri de Potato Dextrose Agar (PDA, Annexe 2) à température ambiante pendant une semaine. Cinq mL d'eau stérile y sont déposés et les spores

sont mises en suspension à l'aide de pointes cônes. L'inoculum est filtré sur de la toile à bluter de 48 µm, et la suspension-mère obtenue est diluée au dixième plusieurs fois. Les suspensions sont agitées au vortex et 100 µL de chacune sont déposés sur boîtes de Petri de malt agar triton (Annexe 2) et étalés à l'aide de billes de verre stériles. Les boîtes sont placées à l'étuve à 25 °C pendant 2 à 7 jours selon les souches. Pour chaque souche, une colonie isolée est prélevée et déposée sur boîte de Petri de PDA.

L'ensemble des souches de la collection Focy et celles isolées de graines de cyclamen sont ensuite repiquées trois fois successivement sur malt agar antibiotique (Annexe 2).

### II.1.2 Conservation des souches

Les souches sont mises en culture en tube, sur pente de PDA pendant 10 jours. Un volume de 750 µL de Potato Dextrose Broth (PDB, Annexe 2) est déposé par tube de PDA. Chaque tube est agité au vortex pendant plusieurs secondes pour mettre les spores en suspension. Un volume de suspension est déposé dans un cryotube, dans lequel un volume de glycérol ¼ (Annexe 2) est ajouté. Les tubes sont agités au vortex et congelés aussitôt à – 80 °C.

La souche d'Oomycète est mise en culture sur boîte de Petri de Corn Meal Agar (CMA, 17 g/L CMA, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) pendant une semaine. Des explants de culture sont prélevés et déposés dans des tubes de graines de chanvre (15 mL d'eau stérile /tube, 6 graines de chanvre stériles/tube). Les tubes sont conservés à température ambiante.

### II.1.3 Production d'inoculum de *Fusarium* sp.

Des inoculums sont préparés régulièrement pour répondre aux besoins correspondant aux différentes expérimentations dont les tests en chambres climatiques et les essais en serres. Différents protocoles ont été utilisés pour produire ces inoculums.

Le protocole qui suit a été utilisé uniquement pour le premier essai de pathogénicité conduit en 2013. Les souches sont cultivées sur boîtes de Petri de malt agar (Annexe 2) pendant plusieurs jours. Lorsque le mycélium est bien développé, les spores sont mises en suspension avec une pipette Pasteur et 1,5 mL d'eau stérile. Elles sont ensuite comptées sur cellule de Malassez et les inoculums sont préparées à la concentration souhaitée.

Le protocole qui suit a été utilisé pour l'ensemble des autres tests et essais. Un à plusieurs tubes de PDA incliné sont inoculés avec la souche de *Fusarium* souhaitée. Ils sont incubés à température ambiante pendant 10 jours. Deux mL de malt liquide (Annexe 2) sont introduits dans chaque tube. Les tubes sont ensuite agités au vortex pour décrocher les spores du mycélium. La suspension obtenue est déposée dans le volume de malt liquide à inoculer. Les inoculums sont incubés 7 jours à 25 °C et 125 rpm. Une souche de *F. oxysporum* produit en moyenne 10<sup>7</sup> UFC/mL de milieu dans ces conditions. Les inoculums sont filtrés sur toile à bluter de 48 µm stérile et centrifugés à 4800 g et 15 °C pendant 20 min dans des flacons de 500 mL. Les surnageants sont jetés et les culots sont re-suspendus dans de l'eau du robinet. Les

inoculums sont centrifugés à deux reprises à 7000 g et 15 °C pendant 15 min dans des tubes de 15 mL. Entre ces deux centrifugations, les surnageants sont jetés et les culots sont re-suspendus dans de l'eau du robinet. Les suspension-mères obtenues sont diluées plusieurs fois au dixième. Les dilutions sont dosées au spectrophotomètre (UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japon) à 660 nm avec un programme dédié au dosage des suspensions de spores de *F. oxysporum*. Les inoculums sont ajustés à la concentration souhaitée avec de l'eau du robinet.

### II.1.4 Isolement de souches fongiques à partir de matériel végétal

Des isollements fongiques ont été effectués à partir des tubercules prélevés chez les producteurs lors des collectes de 2009 et 2010 d'après le protocole suivant. Les tubercules sont nettoyés à l'eau du robinet puis désinfectés en les plongeant dans deux bains successifs : 2 min dans l'alcool à 70 ° puis 10 min dans le NaOCl 5 %. Ils sont ensuite lavés 3 fois pendant 5 min à l'eau stérile. Des morceaux de tubercule sont prélevés et déposés sur malt agar. Les boîtes de Petri sont incubées à 28 °C pendant 10 jours.

Au cours des différents essais menés en serres, les ré-isollements de souches fongiques ont été réalisés d'après le protocole suivant. Différents tissus de plantes mortes, symptomatiques ou asymptomatiques sont prélevés. Le matériel est stérilisé en surface en le plongeant successivement dans un bain d'alcool à 70 ° et deux bains d'eau stérile de 20 s chacun. Les temps des bains sont ajustés selon le matériel à stériliser. Un à plusieurs fragments de tissu sont déposés sur malt agar antibiotique. Les boîtes de Petri sont incubées à température ambiante au moins une semaine. Si l'identification morphologique n'est pas possible sur malt agar antibiotique, les isolats sont repiqués sur gélose à l'eau contenant une feuille d'œillet (Carnation Leaf Agar (CLA), Annexe 2). Ce milieu stimule la sporulation des isolats et peut permettre l'identification microscopique.

### II.1.5 Dénombrements microbiens

Des dénombrements microbiens ont été faits à partir d'un gramme de matière (tourbe, produit de lutte biologique). L'échantillon est déposé dans un flacon de 45 mL d'eau stérile. Trois flacons sont préparés par modalité. Les flacons sont placés dans un agitateur bidimensionnel (Flask Shaker SF1, Stuart, Staffordshire, Royaume-Uni) à 700 oscillations/min pendant 20 min. Cinq mL de la suspension-mère sont prélevés dans le flacon après homogénéisation et déposés dans un nouveau flacon de 45 mL d'eau stérile. Le nombre de dilutions à préparer est dépendant de l'échantillon considéré.

Pour dénombrer les champignons, 1 mL de la dilution souhaitée est déposé dans une boîte de Petri vide. Au moins 3 dilutions successives sont déposées à raison de 5 boîtes par dilution. Du milieu malt agar antibiotique en surfusion est ajouté sur la goutte de dilution et le mélange est homogénéisé en agitant doucement la boîte.

Pour dénombrer les bactéries, 100 µL de la dilution souhaitée sont déposés à la surface d'une boîte de Petri de Levure Peptone Glucose Agar (LPGA) avec cycloheximide (Annexe 2). L'inoculum est étalé à l'aide de billes de verre stériles.

Les boîtes sont incubées à température ambiante pendant 7 jours, date du dénombrement final.

## II.2 Caractérisation moléculaire

### II.2.1 Extractions d'ADN

#### II.2.1.1 Extraction d'ADN fongique et végétal

Le protocole suivant a été utilisé pour extraire l'ADN de souches fongiques et de matériel végétal. Les souches sont mises en culture sur boîtes de Petri de PDA pendant une semaine à température ambiante. Cinq mL de PDB sont déposés à la surface, le mycélium est prélevé à l'aide d'une anse stérile pour inoculer une fiole de Roux contenant 100 mL de PDB. La culture est placée à l'horizontal pendant 48 h à température ambiante et sans agitation, puis elle est filtrée sur toile à bluter de 48 µm stérile dans une fiole à vide reliée à une pompe. Le mycélium obtenu sur la toile est placé dans un pilulier stérile. Le matériel végétal est stérilisé en surface selon le protocole détaillé dans la partie II.1.4. Le matériel végétal ou le mycélium fongique est placé à -80 °C pendant au moins une nuit, puis il est lyophilisé (Beta 1-8 LD, Christ, Osterode am Harz, Allemagne) et broyé à l'azote liquide. Les ADN sont extraits avec le kit DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Venlo, Pays-Bas). Pour certaines applications, les ADN fongiques sont extraits en utilisant un protocole rapide de minipréparation présenté en Annexe 3.

#### II.2.1.2 Extraction d'ADN bactérien

Une boîte de Petri de milieu Luria Bertani (LB, Annexe 2) estensemencée avec la souche bactérienne à extraire et incubée à température ambiante pendant une semaine. A l'aide d'un cure-dent stérile, des cellules bactériennes sont prélevées et mises en suspension dans 100 µL de tampon de lyse (0,05 M NaOH ; 0,25 % SDS). Le mélange est incubé 15 min à 100 °C puis centrifugé à 15000 g à température ambiante pendant 1 min. Le surnageant contenant l'ADN est prélevé (Robin, 2006).

#### II.2.1.3 Extraction d'ADN de tourbe

L'ADN de la tourbe n°11 (Pindstrup, Ryomgaard, Danemark) est extrait suivant le protocole détaillé en Annexe 4. Trois extractions sont faites à partir d'1 g de tourbe (3 répétitions indépendantes). La densité de la tourbe étant très faible, chaque répétition est subdivisée en 4 tubes de 250 mg de tourbe et les ADN sont regroupés en fin d'extraction.

Tableau 4 : Amorces oligonucléotidiques utilisées dans cette étude.

Régions d'ADN amplifiées	Amorces <sup>a</sup>	Séquences (5'-3')	Référence ou fournisseur
ITS	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes et Bruns, 1993
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998
	EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	
IGS	CNS1	GAGACAAGCATATGACTAC	O'Donnell <i>et al.</i> , 2009
	NL11	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	
	CNS2	AACTTCAATCGCCTCTCACG	
	CNSa	TTCATRTACCCTCCGAGACC	
	iNL11	AGGCTTCGCTTAGCGTCTTAG	
	NLA	TCTAGGGTAGGCKRGTGGTTC	
ADNr 16S	1492r	CGGTTACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991
	27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	
Clones	SP6	GATTTAGGTGACACTATA	Amorces universelles, Eurofins MWG
	T7	AATACGACTCACTATAG	
ADNr 28S de plante	28KJ	GGCGGTAAATTCCGTCC	Cullings, 1992
	28C	GCTATCCTGAGGGAAACTTC	
RAPD	Kit OPA à OPD	Kits Operon's RAPD	Eurofins MWG

<sup>a</sup> ITS, Espaceur transcrit interne de l'ADN ribosomique ; EF-1 $\alpha$ , facteur d'élongation de la traduction 1- $\alpha$  ; IGS, espaceur intergénique de l'ADN ribosomique ; ADNr 16S, l'ADN de la petite sous-unité ribosomique bactérienne 16S ; ADNr 28S, ADN de la petite sous-unité ribosomique des plantes 28S ; RAPD, amplification aléatoire d'ADN polymorphe

## II.2.2 Dosage et conservation des ADN

Les ADN sont quantifiés au spectrophotomètre (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) à 260 nm et dilués à 10 ng/ $\mu$ L en utilisant du tampon TE (10 mM pH 8 Tris HCl ; 1 mM EDTA). Lorsque les expérimentations ont nécessité une quantification plus précise de la concentration en ADN, *i.e.* pour le clonage et la caractérisation de l'outil de détection, les ADN sont dosés au fluoromètre (Quantus, Promega, Madison, Etats-Unis) à l'aide du kit QuantiFluor dsDNA Dye System (Promega, Madison, Etats-Unis), ou au spectrophotomètre (Biophotomètre, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) à 260 nm. Les ADN microbiens et végétaux sont conservés à 4 °C tandis que les ADN extraits de tourbe sont conservés à – 20 °C.

## II.2.3 Les amplifications par PCR

### II.2.3.1 Généralités

Les réactions de Polymerase Chain Reaction (PCR) sont toutes réalisées dans le même thermocycleur (Master cycler gradient, Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 4. Différents marqueurs moléculaires sont amplifiés par PCR. L'espaceur transcrit interne de l'ADN ribosomique (ADNr) ou internal transcribed spacer (ITS) est utilisé pour l'identification taxonomique des souches fongiques. Le gène codant le facteur d'élongation de la traduction  $1\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) permet d'affiner l'identification des espèces de *Fusarium* et d'étudier leur diversité intraspécifique. La région pleine longueur de l'espaceur intergénique de l'ADNr (intergenic spacer, IGS) est utilisée pour étudier la diversité intraspécifique de *F. oxysporum*. L'ADN de la petite sous-unité ribosomique bactérienne (16S) est utilisé pour identifier les espèces bactériennes. Une partie de l'ADN de la petite sous-unité ribosomique des plantes (28S) est utilisée pour vérifier que l'ADN de plante peut être amplifié.

Pour chacune des réactions de PCR, un témoin négatif d'amplification est préparé avec de l'eau ultrapure stérile. Un témoin positif d'amplification est également préparé. La présence de produits d'amplification est confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose (1 % agarose, 80 mL Tris Acétate EDTA 1x (5 Prime, Hilden, Allemagne)) à 100 V pendant 45 min. Les gels sont colorés dans un bain de bromure d'éthidium (BET) à 10 mg/L pendant 15 min puis rincés dans un bain d'eau pendant 15 min. La migration des ADN est visualisée en utilisant un imageur (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France) et le logiciel d'acquisition d'image Infinity-capt (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France). La taille des bandes est vérifiée par rapport à un marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec, Seraing, Belgique).

### II.2.3.2 L'espaceur transcrit interne (ITS)

La région ITS est amplifiée par PCR en utilisant le couple d'amorces ITS1F et ITS4 (White *et al.*, 1990; Gardes et Bruns, 1993) dans un volume final de 25  $\mu$ L contenant 10 ng d'ADN, 150



$\mu\text{M}$  de dNTP,  $0,5 \mu\text{M}$  de chaque amorce, 3 U de *Taq* polymérase (MP Bio, Carlsbad, Etats-Unis) et le tampon de la *Taq* polymérase. Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation initiale de 3 min à  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , 35 cycles de 1 min à  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min à  $50^\circ\text{C}$  et 1 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , puis une élongation finale de 10 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### II.2.3.3 Le facteur d'élongation 1- $\alpha$ (*EF-1 $\alpha$* )

Une partie du gène codant l'*EF-1 $\alpha$*  des champignons est amplifiée par PCR en utilisant le couple d'amorces EF1 et EF2 (O'Donnell *et al.*, 1998) dans un volume final de  $25 \mu\text{L}$  contenant 10 ng d'ADN,  $150 \mu\text{M}$  de dNTP,  $0,1 \mu\text{M}$  de chaque amorce, 3 U de *Taq* polymérase et le tampon de la *Taq* polymérase. Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation initiale de 7 min à  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 38 cycles de 1 min à  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min 15 s à  $57 \text{ }^\circ\text{C}$  et 1 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , puis une élongation finale de 10 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### II.2.3.4 L'espaceur intergénique (IGS)

La région IGS est amplifiée par PCR en utilisant le couple d'amorces CNS1 et NL11 (O'Donnell *et al.*, 2009) dans un volume final de  $50 \mu\text{L}$  contenant 10 ng d'ADN,  $100 \mu\text{M}$  de dNTP,  $0,2 \mu\text{M}$  de chaque amorce, 6 U de *Taq* polymérase et le tampon de la *Taq* polymérase. Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation initiale de 5 min à  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , 35 cycles de 1 min à  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min à  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  et 1 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , puis une élongation finale de 5 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### II.2.3.5 La petite sous-unité ribosomique bactérienne (16S)

La région de l'ADNr 16S est amplifiée par PCR en utilisant le couple d'amorces 27f et 1492r (Lane, 1991) dans un volume final de  $50 \mu\text{L}$  contenant  $2 \mu\text{L}$  d'ADN,  $150 \mu\text{M}$  de dNTP,  $0,2 \mu\text{M}$  de chaque amorce, 6 U de *Taq* polymérase et le tampon de la *Taq* polymérase. Le programme PCR est le suivant : une dénaturation initiale de 5 min à  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , 35 cycles de 1 min à  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min à  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  et 2 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , puis une élongation finale de 15 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  (Martin-Laurent *et al.*, 2001).

#### II.2.3.6 Les fragments clonés

Pour les expérimentations nécessitant une étape de clonage (cf. partie II.3.2.), les fragments intégrés dans un plasmide sont amplifiés par PCR en utilisant le couple d'amorces SP6 et T7 dans un volume final de  $25 \mu\text{L}$  contenant des cellules de clones positifs prélevées au cure-dent,  $150 \mu\text{M}$  de dNTP,  $0,25 \mu\text{M}$  de chaque amorce, 3 U de *Taq* polymérase et le tampon de la *Taq* polymérase. Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation initiale de 5 min à  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 35 cycles de 45 s à  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 45 s à  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  et 1 min 30 s à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , puis une élongation finale de 10 min à  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ .

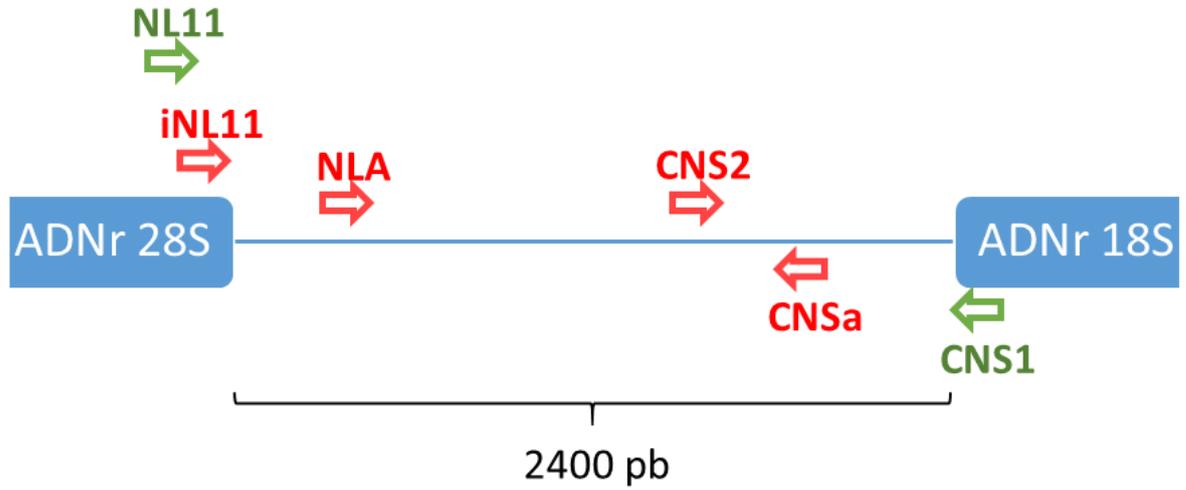


Figure 8 : Carte de la région de l'espaceur intergénique ou intergenic spacer (IGS) de l'ADN ribosomique d'après O'Donnell *et al.*, 2009.

Les amorces symbolisées en vert correspondent à celles utilisées pour amplifier l'IGS, celles en rouge ont été utilisées pour séquencer la région d'ADN. La figure présentée ici n'est pas à l'échelle.

### II.2.3.7 La petite sous-unité ribosomique des plantes (28S)

La région de l'ADNr 28S est amplifiée par PCR en utilisant le couple d'amorces 28KJ et 28C, spécifiques des plantes (Cullings, 1992) dans un volume final de 25 µL contenant 5 ng d'ADN de plante, 400 µM de dNTP, 0,4 µM de chaque amorce, 4 U de *Taq* polymérase et le tampon de la *Taq* polymérase. Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation initiale de 3 min à 94 °C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 55 °C et 1 min à 72 °C, puis une élongation finale de 5 min à 72 °C.

### II.2.4 Séquençage et analyses bioinformatiques

Pour cette étude, tous les produits de PCR obtenus avec les réactions détaillées précédemment ont été séquencés excepté le produit d'amplification obtenu avec les amorces 28KJ/28C. Les réactions de séquençages ont été effectuées par Beckman Coulter Genomics (Brea, Etats-Unis).

Chaque produit d'amplification est séquencé deux fois pour obtenir une double lecture de chaque séquence. Pour l'IGS, la séquence amplifiée avec les amorces NL11 et CNS1 étant trop longue pour être séquencée avec le même couple d'amorces, les amorces iNL11, NLA, CNS2 et CNSa sont utilisées pour le séquençage (Tableau 4) (Figure 8) (O'Donnell *et al.*, 2009). Afin d'obtenir une double lecture de la séquence, la région IGS est amplifiée deux fois. Chaque produit d'amplification est séquencé avec les 4 amorces. Pour chaque produit de PCR séquencé, les séquences sont assemblées, vérifiées et nettoyées aux extrémités en utilisant le logiciel SeqMan 6.0 (DNASTAR Lasergene, GATC Biotech, Kronstanz, Allemagne).

Les séquences sont alignées sur la base de données GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Etats-Unis) en utilisant le programme informatique Basic Local Alignment Search Tool nucleotide (BLASTn, NCBI, Etats-Unis). Les résultats ayant le meilleur pourcentage de similarité avec la séquence à identifier sont considérés, mais seules les séquences associées à une souche identifiée et une référence bibliographique sont retenues.

Pour les souches de *F. oxysporum* associées à la fusariose du cyclamen, les séquences de l'*EF-1α* et l'IGS sont utilisées pour caractériser la diversité génétique de la forme spéciale cyclaminis. Les séquences *EF-1α* d'une part et IGS d'autre part, sont alignées avec le logiciel MEGA 6 version 6.0.5 (Research Center for Genomics and Bioinformatics, Tokyo, Japon) (Tamura *et al.*, 2013). Les alignements sont comparés individuellement en utilisant la méthode de neighbour-joining et le modèle Kimura's two parameter distance avec MEGA 6. Les deux alignements sont concaténés et les souches sont comparées dans un arbre combinant les séquences des deux marqueurs moléculaires. La topologie de l'arbre est testée après 1000 ré-échantillonnages par bootstrap.

## II.3 RAPD-SCAR

La technique de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) est une amplification aléatoire d'ADN par PCR. Dans cette étude, elle est utilisée pour générer des profils multibandes et rechercher un fragment d'ADN spécifique de Focy. Lorsque ce fragment est identifié, il est cloné et séquencé afin de définir des amorces spécifiques de Focy de type SCAR (sequence characterized amplified region).

### II.3.1 RAPD

La technique de RAPD permet de révéler du polymorphisme entre plusieurs ADN en utilisant de courtes amorces aspécifiques. Les amorces testées proviennent de kits Operon (Eurofins, Luxembourg, Luxembourg).

Les conditions des réactions de PCR ont été mises au point en faisant varier les paramètres du programme de PCR afin de générer des profils d'amplification multi-bandes reproductibles. Les paramètres testés sont la température d'hybridation des amorces et la concentration des amorces.

Les réactions de PCR sont faites dans un volume final de 20 µL contenant 4 ng d'ADN, 200 µM de dNTP, 0,5 µM de l'amorce à tester, 1 U de *Taq* polymérase et le tampon de la *Taq* polymérase (MP Bio). Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation initiale de 3 min à 94 °C, 40 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 40 °C et 1 min 30 s à 72 °C, puis une élongation finale de 5 min à 72 °C. Les produits d'amplification obtenus sont révélés par électrophorèse sur gels d'agarose, comme mentionné précédemment et comparé au marqueur de taille Low molecular weight DNA ladder (Biolabs, Ipswich, Massachusetts) (cf. partie II.2.2.1.).

Pour simplifier la recherche d'un fragment spécifique, les amorces sont d'abord testées sur un nombre limité de souches incluant 6 souches de Focy (Focy 13, Focy 14, Focy 16, Focy 19, Focy 24 et Focy 89) Focy et 1 souche de la collection d'autres microorganismes (Fo47). Lorsqu'un fragment spécifique est identifié, les ADN des autres souches sont testés avec l'amorce considérée.

### II.3.2 Clonage

Lorsqu'un fragment spécifique est identifié, les produits de plusieurs réactions de PCR de ce fragment sont groupés et déposés sur gel d'agarose. Après migration, la bande spécifique est découpée sous UV. Le fragment d'ADN est extrait de l'agarose suivant le protocole du kit MinElute gel extraction (QIAGEN, Venlo, Pays-Bas). La taille du fragment est déterminée par rapport à un marqueur de taille (Smart Ladder) sur gel d'agarose et sa concentration est estimée au fluoromètre (cf. partie II.2.1.4). Le fragment est inséré dans le plasmide pGEM-T easy (Promega, Madison, Etats-Unis), qui est ensuite intégré dans des cellules compétentes d'*Escherichia coli* (JM109, Promega, Madison, Etats-Unis) suivant le protocole présenté en

Annexe 5. La ligation et le clonage sont vérifiés par PCR avec les amorces SP6 et T7 (cf. partie II.2.2.6.).

Les produits d'amplification sont séquencés avec le couple d'amorces SP6 et T7. Les séquences sont nettoyées avec le logiciel SeqMan (cf. partie II.2.3.). La séquence du plasmide restante est recherchée et supprimée à l'aide du programme informatique VecScreen (NCBI, Etats-Unis).

### II.3.3 Recherche d'un SCAR

#### II.3.3.1 Recherche d'amorces spécifiques de Focy

Les séquences obtenues précédemment sont alignées sur les bases de données GenBank et ENA (European Nucleotide Archive, Cambridge, Royaume-Uni). Les séquences proches de celles de clones sont téléchargées et alignées avec les séquences des clones en utilisant SeaView (Gouy *et al.*, 2010). A partir de ces alignements, les zones d'ADN spécifiques de Focy sont recherchées et utilisées pour définir des amorces de PCR. La spécificité des couples d'amorces est testée *in silico* dans les bases de données de GenBank et de l'ENA.

#### II.3.3.2 Mise au point des conditions de PCR

La composition du mélange réactionnel et les caractéristiques du programme PCR sont définies en faisant varier un à un différents paramètres : la concentration en  $MgCl_2$  qui joue sur la spécificité et le rendement de la réaction, l'origine de l'enzyme (*Taq* high fidelity (Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne), Go *Taq* G2 polymérase (Promega, Madison, Etats-Unis)), l'addition de protéine gp 32 du bactériophage T4 (Mpbio, Carlsbad, Etats-Unis) ou de l'albumine sérique bovine (BSA, Promega, Madison, Etats-Unis), connus pour améliorer l'efficacité et la stabilité de l'enzyme. Concernant le programme de PCR, la mise au point s'est principalement concentrée sur la durée de l'étape d'élongation et la température d'hybridation des amorces en utilisant des gradients de température et la fonction Touchdown du thermocycleur. Pour ce travail de mise au point, un faible nombre de souches est utilisé, à savoir 2 souches de la collection Focy (Focy 5 et Focy 14) et 2 souches de la collection d'autres microorganismes (Fo47 et Fol26).

La réaction de PCR mise au point est faite dans un volume final de 20  $\mu$ L contenant 10 ng d'ADN, 200  $\mu$ M de dNTP, 0,2  $\mu$ M d'amorces, 3 U de *Taq* polymérase et le tampon de la *Taq* polymérase. Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation initiale de 2 min à 94 °C, 40 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 68 °C et 30 s à 72 °C, puis une élongation finale de 5 min à 72 °C. Les produits d'amplification obtenus sont révélés par électrophorèse sur gels d'agarose (cf. partie II.2.2.1.).



### II.3.3.3 Vérification de la spécificité des amorces

La spécificité des amorces est testée avec l'ensemble des souches comprises dans les deux collections de microorganismes. Les amorces sont également testées sur de l'ADN de cyclamen. Une PCR avec le couple d'amorces 28KJ/28C est réalisée sur l'ADN de cyclamen pour vérifier qu'il peut être amplifié (cf. partie II.2.2.7.).

### II.3.3.4 Mise au point des conditions de PCR en temps réel

Les amorces sont ensuite utilisées en PCR quantitative (StepOne Plus system, Applied Biosystems, Foster city, Etats-Unis). Pour cela, les réactifs du kit ABsolute qPCR SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) et la concentration d'amorces utilisée en PCR sont utilisés. La réaction est réalisée dans un volume final de 15  $\mu$ L contenant 7,5  $\mu$ L de mastermix SYBR green, 0,5  $\mu$ M de chaque amorce et 5  $\mu$ L d'ADN. Le programme est le suivant : une dénaturation initiale de 15 min à 95 °C, 40 cycles de 15 s à 95 °C, 30 s à 68 °C et 30 s à 72 °C. A la fin de ce programme, une étape supplémentaire permettant d'obtenir une courbe de fusion a été rajoutée. Cette étape suit le programme suivant : une augmentation de la température à 95 °C pendant 15 s, puis une diminution de la température à 60 °C pendant 1 min et une augmentation progressive de la température à 95 °C.

Le nombre de copies du fragment cible est déterminé par comparaison à une gamme de nombres de copies connus. Pour préparer cette gamme, le plasmide contenant le fragment cloné est extrait et purifié selon le protocole du kit QIAfilter plasmid midi (QIAGEN, Venlo, Pays-Bas) à partir d'une culture de 10 mL de cellules recombinantes obtenues précédemment (cf. partie II.3.2.). Le plasmide est linéarisé avec l'enzyme de restriction *Pst*I (Promega, Madison, Etats-Unis) en suivant les instructions du fournisseur. Le produit digéré est déposé sur gel pour vérifier la digestion, puis il est dosé au spectrophotomètre. Une solution à  $10^8$  copies/ $\mu$ L est préparée et conservée à  $-20$  °C. Avant chaque expérience d'amplification en PCR en temps réel, une gamme de concentration de  $10^2$  à  $10^8$  copies/ $\mu$ L est préparée et déposée deux fois. Le seuil de fluorescence automatiquement calculé par le logiciel est conservé. Ce seuil est utilisé pour calculer l'efficacité des réactions et déterminer le nombre de copies cibles dans les échantillons. Chaque réaction est répétée deux fois indépendamment.

## II.3.4 Tests de sensibilité de l'outil moléculaire spécifique de FocY

### II.3.4.1 Sur ADN de champignons et de tourbe

La sensibilité de l'outil en PCR conventionnelle et en PCR en temps réel est testée avec l'ADN de 3 souches de FocY. Les quantités d'ADN apportées au mélange réactionnel sont les suivantes : 10 ng, 5 ng, 1 ng, 500 pg, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 5 pg ou 1 pg. Afin de tester une éventuelle inhibition de la réaction d'amplification lors de la détection de FocY dans une matrice environnementale (tourbe ou tubercule de cyclamen), la PCR est réalisée sur un

**Cinétique de détection de la maladie en chambre climatique**

Dijon, 2015

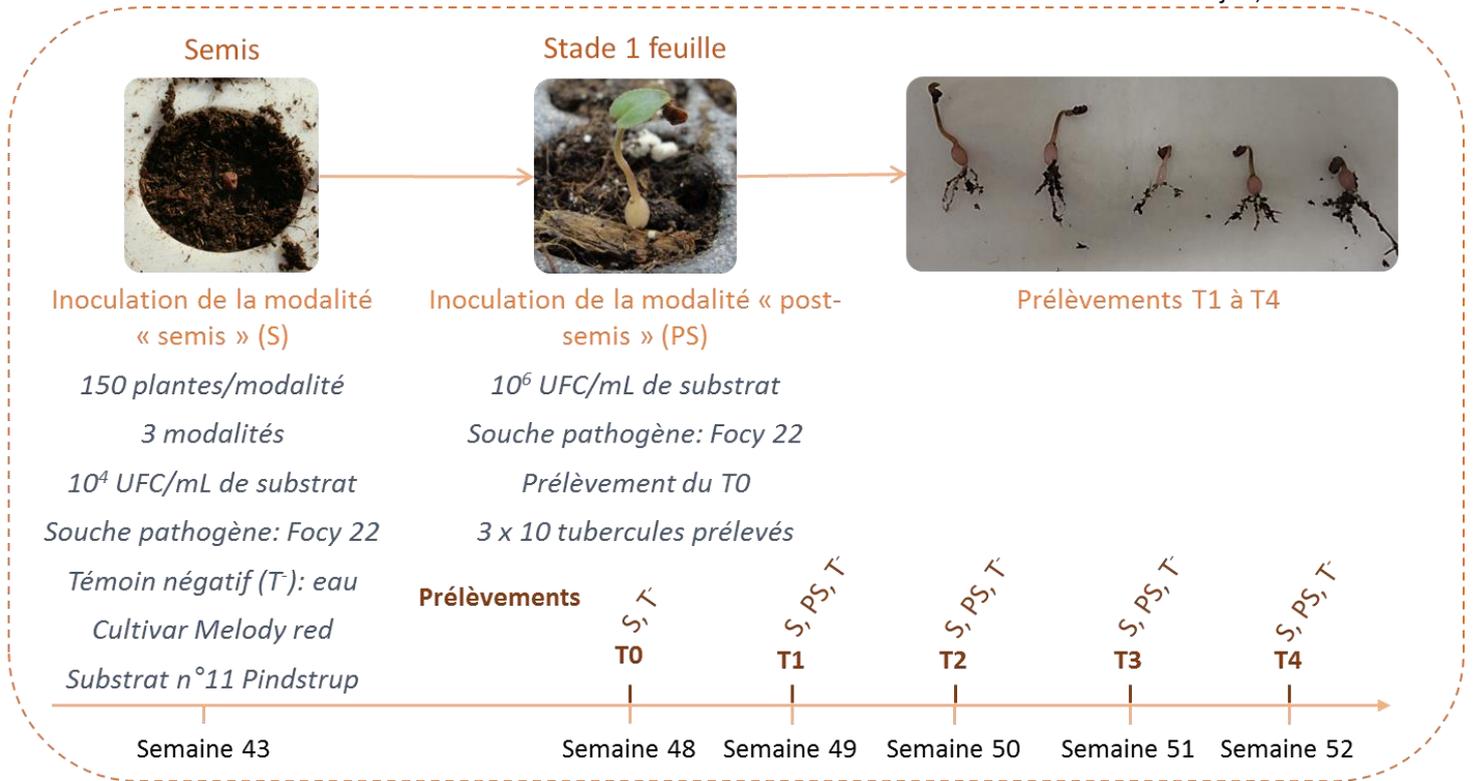


Figure 9 : Protocole et calendrier de la cinétique de détection de la fusariose du cyclamen.

mélange d'ADN comprenant une quantité fixe d'ADN de tourbe ou de tubercule et une quantité variable d'ADN de Focy.

#### II.3.4.1 Sur tubercules contaminés en chambre climatique

Pour déterminer la sensibilité de l'outil de détection pendant le développement de la maladie, un test est mis en place en 2015 en chambre climatique à l'INRA de Dijon. Le calendrier et les conditions de cet essai sont présentés dans la Figure 9. Pour ce test, la souche Focy 22 est apportée au semis (S) ou en post-semis (PS).

Des graines de cyclamen Melody red sont semées manuellement dans de la tourbe n°11 (Pindstrup, Ryomgaard, Danemark). Trois plaques de 150 alvéoles sont préparées et placées dans une étuve réfrigérée à 18 °C et à l'obscurité. Une humidité importante est maintenue en filmant les plaques et en les humidifiant par aspersion deux fois par jour. Lorsque la première feuille apparaît (4 semaines après semis), les plaques sont transférées en chambre climatique dans les conditions suivantes : 18 °C jour, 16 °C nuit et 10 h de jour.

Au semis (S) et après la levée (post-semis, PS), les inoculums sont préparés (cf. partie II.1.3.) et apportés à une concentration de  $10^4$  UFC/mL de substrat et  $10^6$  UFC/mL de substrat respectivement dans un volume de 5 mL d'eau du robinet. Les suspensions sont distribuées à la pipette à la base des tubercules. Une plaque de 150 alvéoles est inoculée au semis (modalité «semis») et une autre à la levée (modalité «post-semis»). Une plaque inoculée à l'eau du robinet (T<sup>-</sup>) est préparée. La semaine suivant chaque inoculation, les arrosages sont superficiels pour éviter le lessivage des spores fongiques, puis les plantes sont arrosées au moins 3 fois par semaine. Les températures sont augmentées à 25 °C jour et 20 °C nuit au moment de l'inoculation post-semis.

Trois prélèvements de 10 tubercules par modalité sont effectués. Le premier prélèvement (T<sub>0</sub>) est effectué au moment de l'inoculation après la levée pour les conditions T<sup>-</sup> et S. Puis des prélèvements sont faits toutes les semaines pendant 4 semaines dans les 3 traitements (T<sup>-</sup>, S et PS). Les tubercules sont stérilisés (cf. partie II.1.4.), puis congelés à - 80 °C et lyophilisés pour en extraire l'ADN (cf. partie II.2.1.1.). Chaque lot de 10 tubercules est également pesé avant lyophilisation. La réaction de PCR en temps réel est décrite dans la partie II.3.3.4.

## II.4 Caractérisation de la pathogénicité de souches de Fusarium

### II.4.1 Essai en serre

L'essai de pathogénicité (2014) a été mené à la serre d'expérimentation d'Astredhor Seine-Manche à Mont-Saint-Aignan (Seine-Maritime). La serre fait 70 m<sup>2</sup> et contient 5 tablars de 10 m<sup>2</sup>. La serre dispose d'un système d'ouvrants et de rideaux d'ombrage. Pour cet essai, 81 souches et isolats ont été testées pour leur pouvoir pathogène sur cyclamen. Les 40 souches issues de collections internationales ou associées à d'autres travaux présents dans la littérature

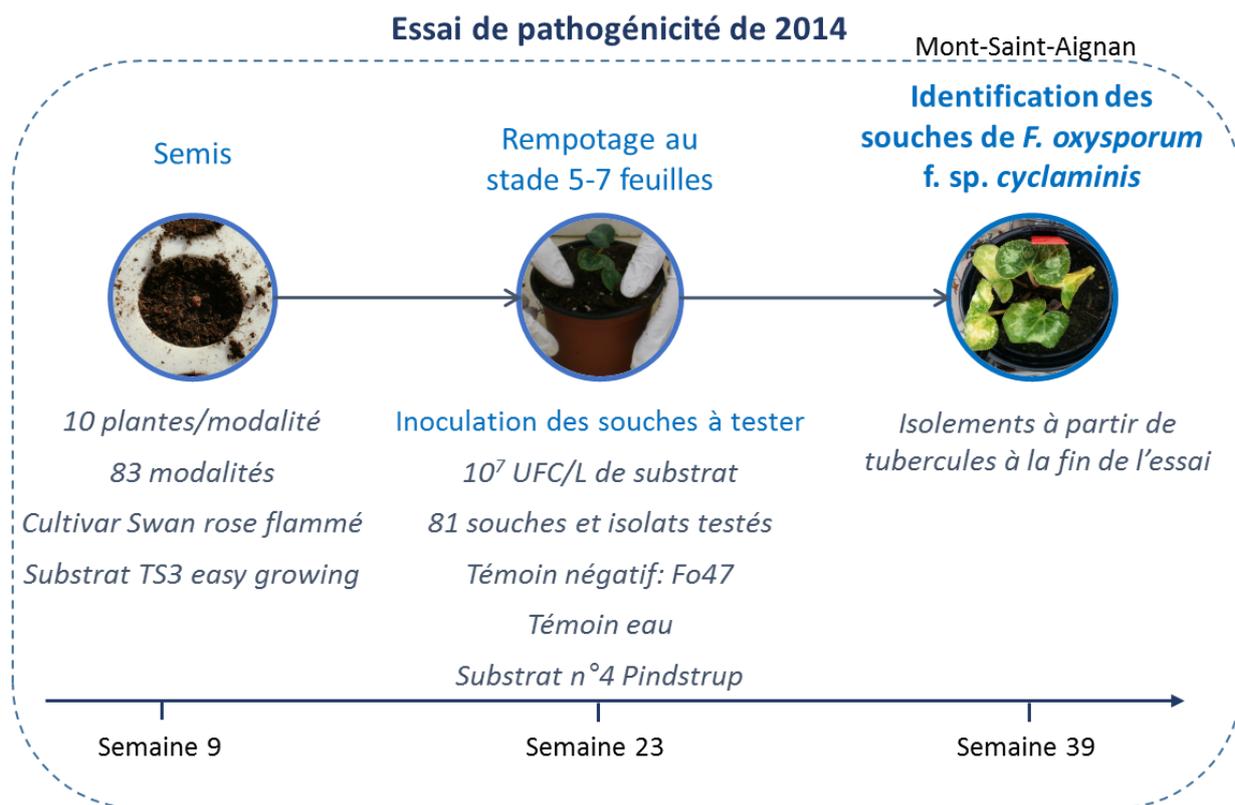


Figure 10 : Protocole et calendrier de l'essai de pathogénicité conduit en 2014 en serre dans une serre d'expérimentation d'Astredhor Seine-Manche à Mont-Saint-Aignan (76).

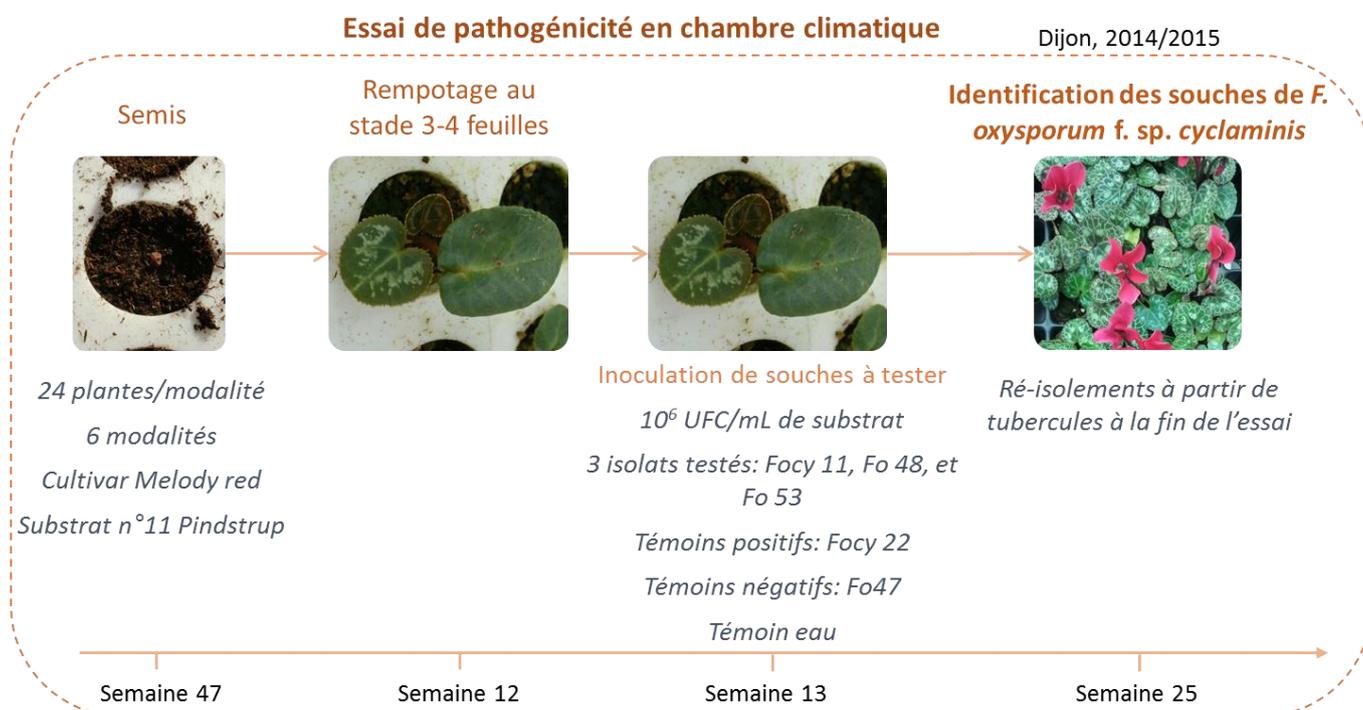


Figure 11 : Protocole et calendrier du test de pathogénicité conduit en 2014 et 2015, dans une chambre climatique de l'INRA de Dijon.

ainsi que la première monospore (T1) de chaque isolat collecté en Normandie ont été évaluées. De plus, 7 autres monospores des isolats collectés en Normandie ayant montré lors de précédents tests (non présentés) : Fo 37T3, Fo 37T4, Fo 38T3, Fo 38T4, Fo 39T3, Fo 43T3 et Fo 44T2. La souche de *F. oxysporum* non pathogène Fo47 a été utilisée comme témoin négatif.

Le calendrier et les conditions de cet essai sont présentés dans la Figure 10. Pour l'essai, des graines de cyclamen Swan rose flammé sont semées. Le semis est réalisé au sein de l'entreprise Leclerc à Saint-Etienne du Rouvray (Seine-Maritime) dans des plaques de 240 alvéoles. Elles sont semées au semoir dans du substrat TS3 easy growing (Klasmann Deilmann, Bremen, Allemagne), puis recouvertes de morceaux de liège (Neho, Les ponts de Cé, France) pour garder l'humidité. Les plaques sont placées 15 jours en chambre de germination à 19 °C et 90 % d'humidité. Au stade 5-7 feuilles, les cyclamens sont repotés dans des pots de 500 mL. Au moment des inoculations, les suspensions sont distribuées à la pipette à la base des tubercules. Des plantes témoins sont inoculées à l'eau du robinet. Dix plantes sont inoculées par modalité. Les plantules sont repotées avec de la tourbe n°4 (Pindstrup). Les inoculums des souches à tester sont apportés en suspension dans un volume final de 20 mL et à une concentration de  $10^7$  UFC/L de substrat (cf. partie II.1.3.). Deux lots de 5 plantes par condition sont placés aléatoirement dans la serre. Les pots sont espacés les uns des autres d'environ 5 cm. La semaine suivant l'inoculation, les arrosages sont superficiels pour éviter le lessivage des spores. Ensuite, les plantes sont arrosées au pistolet d'arrosage une à plusieurs fois par semaine selon les besoins hydriques des plantes. La solution nutritive est équilibrée (ratio 1-1-1) et est apportée à chaque arrosage. Le nombre de plantes mortes par condition est noté au cours de l'essai. Les plantes mortes sont envoyées à l'INRA de Dijon pendant toute la durée de l'essai et des ré-isolements sont effectués. A la fin du test, des ré-isolements sont faits à partir de plantes traitées à l'eau et de plantes asymptomatiques.

### II.4.2 Essai en chambre climatique

Pour les souches dont le pouvoir pathogène évalué en serre n'a pas pu être déterminé avec certitude, un test de pathogénicité a été conduit en chambre climatique. Cet essai inclut la souche de *F. oxysporum* non pathogène Fo47 comme témoin négatif et la souche pathogène Focy 22 comme témoin positif. Les souches testées dans cet essai sont : Focy 11, Fo 48 et Fo 53.

L'essai est conduit en chambre climatique à l'INRA de Dijon en 2014 et 2015. Le calendrier et les conditions de cet essai sont présentés dans la Figure 11. Des graines de cyclamen Melody red sont semées à la main dans la tourbe n°11 (Pindstrup) dans des plaques de 150 alvéoles. Les plaques sont placées en étuve suivant les conditions détaillées dans la partie II.3.4.2. Au stade 3-4 feuilles, les plantules sont repotées dans des plaques de 96 alvéoles avec de la tourbe n°11. Dans chaque plaque, deux modalités de 24 plantes chacune sont disposées aux extrémités de la plaque. Elles sont placées en chambre climatique dans les conditions suivantes : 25 °C jour, 18 °C nuit et 10 h jour.



Les inoculums sont préparés et apportés à  $10^6$  UFC/mL de substrat dans un volume de 10 mL (cf. partie II.1.3.). Les suspensions sont distribuées à la pipette à la base des tubercules. La semaine suivant l'inoculation, les arrosages sont superficiels pour éviter le lessivage des spores, puis les plantes sont arrosées au moins 3 fois par semaine. L'évolution de la maladie est suivie deux fois par semaine à partir de l'apparition des symptômes. Le nombre de plantes mortes par modalité est noté. Des ré-isolements sont faits à partir des tubercules et parties aériennes des plantes mortes, de plantes traitées à l'eau, de plantes asymptomatiques et de plantes traitées avec Fo47 à la fin de l'essai (cf. parties II.1.4.). Les résultats de cet essai sont présentés en Annexe 6.

### II.5 Essais de lutte biologique

Avant la mise en place des essais de lutte biologique, les concentrations des produits de lutte biologiques, à l'exception du produit n°3 contenant du *Glomus*, sont vérifiées en suivant le protocole présenté dans la partie II.1.5.

Pour ces essais, des graines de cyclamen Swan rose flammé sont semées. Le semis est réalisé au sein de l'entreprise Leclerc à Saint-Etienne du Rouvray (Seine-Maritime) dans des plaques de 240 alvéoles. Les différents agents de lutte biologique (ALB) sont pesés et apportés en suspension liquide aux concentrations souhaitées dans le substrat TS3 easy growing. Le mélange est utilisé pour remplir les alvéoles et les graines sont semées à la main, puis recouvertes de morceaux de liège pour garder l'humidité. Des plaques sans ALB sont également préparées. Les plaques sont placées 15 jours en chambre de germination à 19 °C et 90 % d'humidité.

Pour chaque test, les inoculums des souches pathogènes sont apportés à la pipette à la base des tubercules. Des plantes témoins sont inoculées à l'eau du robinet. Des conditions comprenant uniquement les ALB et uniquement les souches pathogènes sont également préparées, pour chaque concentration testée. Les semaines suivant les inoculations, les arrosages sont superficiels pour éviter le lessivage des spores. Les symptômes sont observés au minimum deux fois par semaine à partir de leur apparition et le nombre de plantes mortes par modalité est noté. Des ré-isolements sont effectués à partir des plantes mortes pendant toute la durée de l'essai. A la fin du test, des ré-isolements sont également faits à partir de plantes traitées à l'eau et de plantes asymptomatiques (cf. parties II.1.4.).

#### II.5.1 Essai de 2014

Sept produits de protection des plantes ou de matières fertilisantes présentés dans le Tableau 3 ont été évalués pour leurs propriétés antagonistes seuls ou en combinaison (1+2, 2+3 et 2+4) contre la souche Fo 43T3. Cette souche a été sélectionnée car elle a montré une forte agressivité lors du test de pathogénicité mené en 2013.

Les identités des produits de lutte biologique à l'exception du produit n°3 sont vérifiées avant la mise en place de l'essai. L'identité du produit n°3 contenant une souche de *Glomus* n'a

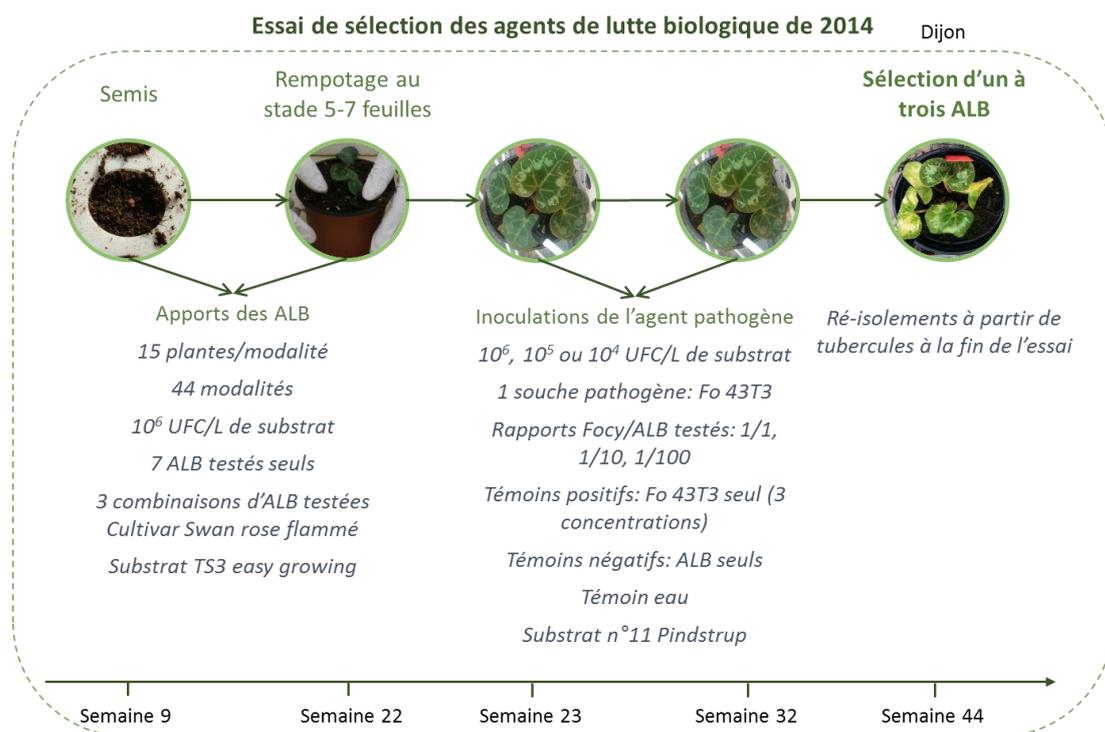


Figure 12 : Protocole et calendrier de l'essai de sélection d'agents de lutte biologique efficaces contre la fusariose du cyclamen.

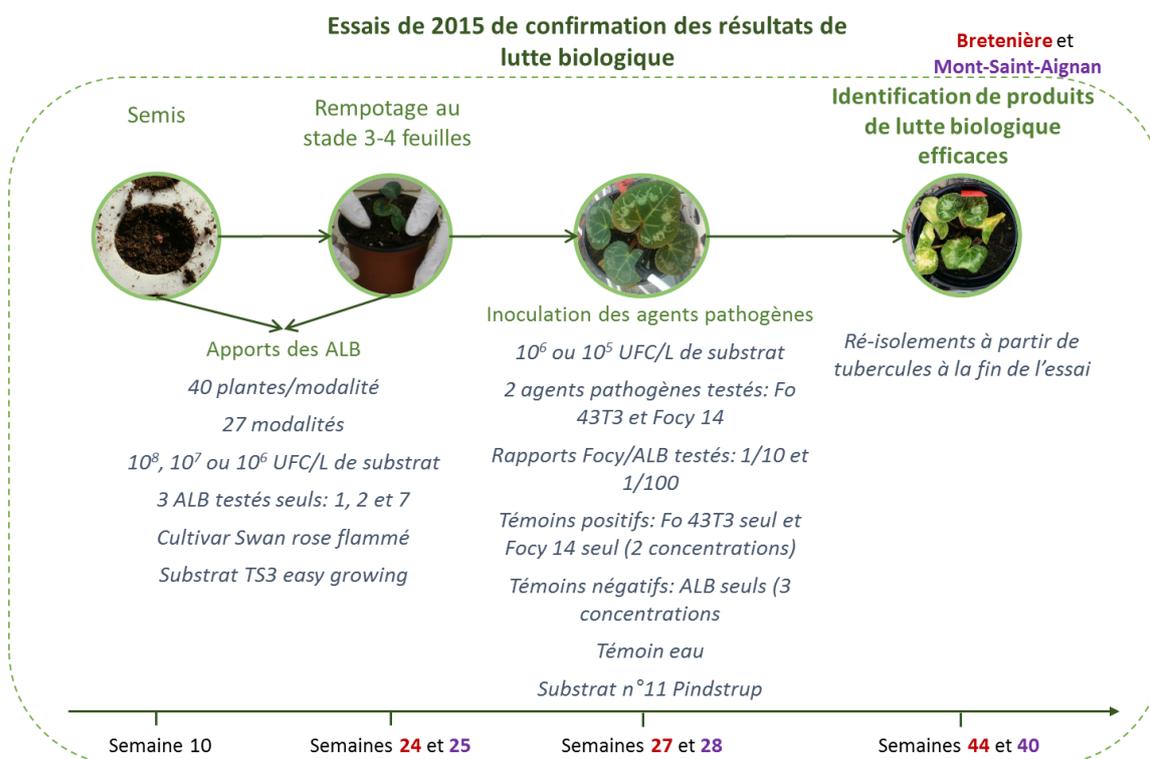


Figure 13 : Protocole et calendrier des essais de lutte biologique conduits simultanément en 2015 sur deux sites différents : à Bretenièrre et à Mont-Saint-Aignan.

Pour les deux essais, le protocole suivi est le même. Les différences de calendrier entre les deux essais sont indiquées en rouge (Bretenièrre) et en violet (Mont-Saint-Aignan).

pas pu être vérifiée. L'identité des produits à base de champignon et de bactérie est vérifiée par séquençage de la région ITS et 16S, respectivement (cf. parties II.2.2.2. et II.2.2.5.).

Le test est conduit dans les serres de l'INRA de Dijon. La serre fait 37 m<sup>2</sup> et comprend 7 tablars de 1,8 m<sup>2</sup> chacun. La serre dispose d'un système d'ouvrants, de rideaux d'ombrage, d'un brumisateur et d'un système de refroidissement. Les conditions climatiques de la serre sont réglées pour que la température puisse atteindre maximum 30 °C et pour quelle ne puisse pas descendre sous 15 °C.

Le calendrier de cet essai est présenté dans la Figure 12. Les différents ALB sont apportés au semis à 10<sup>6</sup> UFC/L de substrat. Les plaques sont transportées à Dijon et placées dans la serre. Pour chaque ALB, 40 L de mélange tourbe/ALB sont préparés à la bétonnière pour obtenir une concentration de 10<sup>6</sup> UFC/L de substrat. Lorsque les plantules atteignent le stade 5-7 feuilles, elles sont repotées dans des pots de 500 mL avec le mélange tourbe/ALB. L'inoculum de la souche pathogène Fo 43T3 est préparé une semaine après le repotage (cf. partie II.1.3.). La souche est apportée aux concentrations 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> ou 10<sup>4</sup> UFC/L de substrat de telle sorte que les rapports Focy/ALB soient les suivants : 1/1, 1/10 et 1/100. Les suspensions sont distribuées dans un volume de 20 mL d'eau du robinet. Dix semaines après le repotage, un second inoculum de Fo 43T3 est apporté aux mêmes concentrations et dans les mêmes conditions. Quinze plantes sont inoculées par modalité. Les plantes sont placées aléatoirement dans la serre et espacées les unes des autres d'au moins 5 cm. Les plantes sont arrosées au goutte-à-goutte plusieurs fois par semaine selon les besoins hydriques des plantes. La solution nutritive équilibrée (ratio 1-1-1) est apportée à chaque arrosage.

### II.5.2 Essais de 2015

Trois produits de protection des plantes ou de matières fertilisantes sélectionnés suite à l'essai conduit en 2014 ont été évalués à nouveau pour leurs propriétés antagonistes contre les souches Fo 43T3 et Focy 14. Ces souches pathogènes ont été sélectionnées, car elles ont montré de fortes agressivités lors des tests de pathogénicité.

Le calendrier de ces essais est présenté dans la Figure 13. Les différents ALB sont apportés au semis aux concentrations suivantes : 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup> ou 10<sup>6</sup> UFC/L de substrat. Lorsque les plantules atteignent le stade 3-4 feuilles, elles sont repotées dans des pots de 500 mL avec la tourbe n°11. Les ALB sont apportés en suspension liquide aux mêmes concentrations qu'au semis. Les inoculum des souches pathogènes sont préparés et apportés aux concentrations 10<sup>6</sup> ou 10<sup>5</sup> UFC/L de substrat de telle sorte que les rapports Focy/ALB soient: 1/10 et 1/100. Quarante plantes sont inoculées par modalité.

Le test a été mené simultanément sur deux sites différents :

- A Bretenière (21)

La serre utilisée fait 100 m<sup>2</sup> et contient 26 tablars de 1,75 m<sup>2</sup> chacun. La serre dispose d'un système d'ouvrants et de rideaux d'ombrage. L'arrosage se fait au goutte-à-goutte. Les plantes sont placées aléatoirement dans les serres comme suit : 5 blocs de 8 plantes. Une solution

nutritive (14-7-22) a été apportée une fois par semaine à partir de la semaine 37 afin de stimuler la floraison.

- A Mont-Saint-Aignan (76)

Le site est présenté dans la partie II.4. L'arrosage est fait au pistolet d'arrosage. Les plantes sont placées aléatoirement dans les serres comme suit : 4 blocs de 10 plantes. Une solution nutritive (1-1-1) a été apportée une fois par semaine à partir de la semaine 30 puis une solution 19-6-10 à partir de la semaine 33 afin de stimuler la floraison.

## II.6 Traitement des données

Afin d'évaluer l'impact de la maladie, la surface sous le courbe d'évolution de la maladie a été calculée pour les différentes conditions. Ce calcul prend en compte le nombre de plantes mortes dans un temps donné. Les résultats de l'essai mené à Bretenière en 2015 ont été traités par analyse de variance (ANOVA).

## Chapitre III :

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*:  
une diversité génétique sous-estimée



## Avant-propos

Parmi les différentes maladies du cyclamen, la fusariose causée par *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Focy), est l'une des plus nuisibles. Les moyens de lutte contre ce pathogène sont limités et insuffisants pour garantir le bon état sanitaire de la culture. Le développement d'un outil permettant la détection précoce de Focy et la mise en place de méthodes de lutte efficaces ne seront possibles que si la diversité génétique de la forme spéciale est décrite. Nous avons collecté 27 souches de Focy de collections internationales et isolé 24 souches de *F. oxysporum* de cyclamens symptomatiques ou non. Les séquences de l'espaceur interne transcrit de l'ADN ribosomique (ADNr) et du gène codant le facteur d'élongation de la traduction 1- $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) ont permis de vérifier l'identité taxonomique des souches. Un test de pathogénicité a révélé d'une part la virulence de 15 des 24 souches isolées, et d'autre part la forte variabilité d'agressivité entre les souches. Les 9 souches restantes n'ont montré aucune virulence sur cyclamen et peuvent donc être considérées comme des souches de *F. oxysporum* endophytes. La diversité génétique des souches pathogènes et non pathogènes a été caractérisée en comparant les séquences partielles du gène de l'*EF-1 $\alpha$*  et les séquences pleines longueurs de l'espaceur intergénique de l'ADNr. La forme spéciale *cyclaminis* se caractérise par une grande diversité génétique puisque les 42 souches de Focy se répartissent en 6 génotypes. Aucun lien n'a été établi entre les génotypes, l'origine géographique et l'agressivité des souches. La diversité génétique était encore plus importante parmi les 9 souches non pathogènes qui correspondent à 9 génotypes, tous distincts de ceux associés à Focy. Les résultats de ces travaux sont présentés et discutés dans ce chapitre. Ils ont également fait l'objet d'une publication dans le journal de vulgarisation scientifique Le lien horticole (Annexe 7).



## *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*: underestimated genetic diversity

Charline Lecomte · Véronique Edel-Hermann ·  
Marc-Antoine Cannesan · Nadine Gautheron · Agnès Langlois ·  
Claude Alabouvette · Fabien Robert · Christian Steinberg

Accepted: 10 January 2016

© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2016

**Abstract** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Focy) is the most damaging pathogen of cyclamen (*Cyclamen persicum*). Control measures are limited and not efficient enough to ensure a healthy production. The development of a tool allowing the early detection of Focy and an effective control method relies on the knowledge of Focy diversity. We obtained 27 Focy strains from international collections, and recovered 24 additional *F. oxysporum* isolates from cyclamen. A pathogenicity test revealed 15 pathogenic isolates out of the 24 isolates from cyclamen, with substantial differences in aggressiveness among isolates. The other nine were non-pathogenic endophytic strains of cyclamen. We described the genetic diversity of pathogenic

and non-pathogenic strains by sequencing part of the translation elongation factor 1- $\alpha$  gene and the full-length nuclear ribosomal intergenic spacer region. We found high genetic diversity within the *forma specialis*, with 42 Focy strains distributed into six two-locus sequence types (ST). No relationship was found between genotypic grouping, geographic origin and aggressiveness within the collection of strains. Genetic diversity was much higher among non-pathogenic strains: the nine strains were distributed into nine ST, all of them distinct from pathogenic ST. As both pathogenic strains and endophytic strains can be present in cyclamen, an efficient tool to detect Focy is badly needed.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10658-016-0856-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Lecomte · F. Robert  
Astredhor, 44, rue d'Alésia, 75682 Paris, France

V. Edel-Hermann (✉) · N. Gautheron · C. Steinberg  
INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, 21065 Dijon,  
France  
e-mail: veronique.edel@dijon.inra.fr

M.-A. Cannesan · A. Langlois  
Arehor Seine Manche, 22 rue de Normandie,  
76640 Fauville-en-Caux, France

C. Alabouvette  
Agréne, 47 rue C. Pierrot, 21000 Dijon, France

**Keywords** *Cyclamen persicum* · Fusarium wilt · Horticulture · Molecular marker · Pathogenicity

### Abbreviations

<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	translation elongation factor 1- $\alpha$
Focy	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>
IGS	intergenic spacer
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique (French National Institute for Agricultural Research)
MIAE	Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment
PDB	potato dextrose broth
ST	sequence type
VCG	vegetative compatibility group

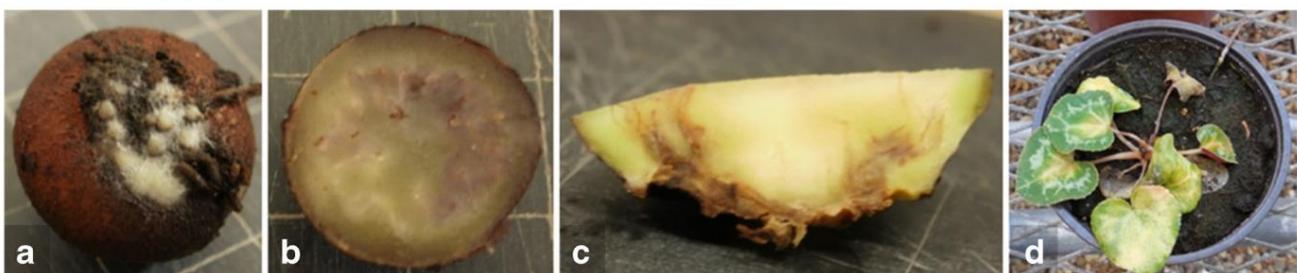
## Introduction

As part of the Primulaceae family, *Cyclamen* is a genus of about 20 species all originating from mountainous areas of the Mediterranean basin. The florist's cyclamen, *Cyclamen persicum*, is the only commercial ornamental species. It is a valuable and appreciated plant cultivated as flowering potted plants and cut flowers. Its production represents a substantial market worldwide. *Cyclamen* displays diverse shapes and colour patterns on leaves, and an infinite variety of flower colours. For gardeners and horticulturists, its key attractive feature is undoubtedly its flowering time as flowers primarily bloom in winter (Grey-Wilson 1997). *Cyclamen* has to face pathogens such as *Erwinia carotovora*, *Botrytis cinerea* or *Cylindrocarpon radicum* (Reimherr 1985). However, its most damaging pathogen is the soilborne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (hereafter referred to as Focyc), which causes Fusarium wilt.

The disease was first reported in 1930 near Berlin, and then quickly spread across Germany in the following years. It was then observed in Italy (1940), England (1946), the USA (1949), Bulgaria (1952), Belgium (1970), Brazil (1971), France (1973), The Netherlands (1978), and Spain (1984) (Grouet 1985; Tello et al. 1985; Tompkins and Snyder 1972). Symptoms of Fusarium wilt of cyclamen have been fully described (Fig. 1). The fungus penetrates root tips and makes progress through the cortex until it reaches the xylem vessels where it grows. Once the pathogen is fully established, vascular tissues clog up, progressively reducing the flow of sap to finally interrupt it. No symptoms are detected on the surface of tubers, but inside the tuber, dark-brown spots are located on vessels (Elmer and Daughtrey 2012). Areas of discoloration quickly

spread on leaves and on the points of attachment of petioles. Symptoms, first located on one side of the plant, spread to the whole plant that finally dies (Grouet 1985). Although seedlings can be contaminated, they hardly ever display symptoms. Actually, Fusarium wilt is a tracheomycosis and disease symptoms are often noticed in the summer or at the end of the production cycle, and occur suddenly (Grouet 1985; Tompkins and Snyder 1972). The time lapse between fungus penetration, xylem colonization and sap disruption varies from several weeks to several months. It mainly depends on temperature and on the plant's water needs (Rattink 1986). This delay in symptom outbreak makes the control of the disease very difficult. All preventive measures have to be taken to maintain and promote healthy culture conditions during the entire production cycle. The use of healthy seedlings and of clean pots/substrates/greenhouses is essential to prevent the risk of disease (Grouet 1985; Tompkins and Snyder 1972). It is also recommended to avoid any temperature increase and closed irrigation systems (Rattink 1986). Any symptomatic plant should be removed and quickly destroyed as soon as it is detected (Grouet 1985).

Several methods of control are available, but none of them offer an efficient and environmentally friendly solution. Chemical products do not provide a curative action against the pathogen (Elmer and Daughtrey 2012). There is no resistant cultivar of cyclamen available on the market as no dominant resistance gene has been identified yet (Orlicz-Luthardt 1998). In such a context, biological control appears as the only alternative method that could quickly provide a solution to producers to control the pathogen. However, the effectiveness of biocontrol agents proved to be variable a few years ago (Minuto et al. 1995).



**Fig. 1** Typical symptoms of Fusarium wilt on tuber and foliage of cyclamen. The tuber seems healthy outside until the mycelium develops on its top at the end of the disease cycle (a). Inside the tuber, the fungus progresses in xylem vessels (brown spots) (b, c).

Symptoms are often unilateral (b, d). Older leaves start yellowing and petioles gradually lose their turgidity. Symptoms quickly spread to the entire foliage (d)

The development of tools allowing early detection of the pathogen and effective disease control relies on the knowledge of the diversity of the pathogen. The *F. oxysporum* species complex is very diverse based on several criteria. This species complex includes both pathogenic and non-pathogenic strains that can survive as saprophytes in the soil. Pathogenic strains exhibit a high level of host specificity. They are subdivided into *formae speciales* based on the plant species they infect, and into races based on the cultivar they infect. Until now, more than 100 *F. oxysporum formae speciales* and races have been described (Lievens et al. 2012). As genetic determinants of pathogenicity are poorly understood for *F. oxysporum*, most *formae speciales* can only be identified from pathogenicity tests. The characterization of vegetative compatibility groups (VCG) has been used for many years to study the genetic diversity of *F. oxysporum* (Correll et al. 1987). The number of VCG within a *forma specialis* is variable. For example, the *forma specialis cubense* includes at least 24 VCG while only one VCG is described within the *forma specialis albedinis* (Katan 1999). However, if it is assumed that VCG reflects the genetic similarities between strains, it may not reflect the genetic differences between them (Kistler 1997). Moreover, this method is time-consuming and not really suitable for assessing the genetic diversity of a large collection of strains. Later, with the development of molecular methods, different DNA regions have been targeted to characterize genetic diversity among and within *formae speciales*, for example *cepae*, *phaseoli* and *lactucae* (Alves-Santos et al. 1999; Mbofung et al. 2007; Sasaki et al. 2014). Their combined use in a multilocus DNA sequence typing approach ensures a better understanding of diversity and a higher level of genetic distinction (Demers et al. 2014; Mbofung et al. 2007). Among molecular markers, the translation elongation factor 1- $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) gene and the nuclear ribosomal intergenic spacer (IGS) region are particularly useful to determine genetic relationships within *F. oxysporum* (O'Donnell et al. 2009; Silva et al. 2014).

Many *formae speciales* display a high level of genetic diversity (Alves-Santos et al. 1999; Lori et al. 2004). However, very little is known about genetic diversity within Focv. Only two studies have addressed this issue. The first one dates back to twenty years ago. It dealt with strains originating from several countries (Woudt et al. 1995). The second, more recent one, dealt with strains originating from Argentina only (Lori et al.

2012). The objective of the present study is to characterize Focv genetic diversity using a worldwide collection of isolates.

## Materials and methods

### Fungal isolates

We carried out a comprehensive search in international collections and in the literature to gather all Focv strains available. Twenty-seven reference strains of Focv from Argentina, Australia, Japan, the USA and European countries were collected (Table 1). The collection was enriched with eight *F. oxysporum* isolates collected from diseased cyclamens between 1994 and 2013 (MIAE01680 to MIAE01687), and 16 isolates collected from cyclamen seedlings (3–4 leaves) in 2009 and 2010 (MIAE01507, and MIAE01688 to MIAE01702). Since contaminated seedlings rarely display symptoms, strains were isolated both from symptomatic and asymptomatic seedlings. Tubers were rinsed thoroughly with tap water and disinfected 2 min with 70 % ethanol, and then 10 min with 5 % NaOCl. Clean tubers were rinsed three times with sterile water for 5 min, and tuber plugs were sampled and cultured on malt agar medium (15 g l<sup>-1</sup> malt extract; 10 g l<sup>-1</sup> agar) at 28 °C. Isolates with morphological characteristics similar to those of *F. oxysporum* were kept (Nelson et al. 1983). Single spores were isolated from each isolate of the collection. Isolates were cultured on potato dextrose agar (39 g l<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) for 15 days. For each of them, spore suspensions were prepared by adding 750  $\mu$ l of potato dextrose broth (PDB) (24 g l<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and mixing. Around 500  $\mu$ l of the suspension were added to 600  $\mu$ l of 1/4-glycerol in a cryotube. Isolates were stored at -80 °C in the MIAE (Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment, INRA Dijon, France) collection.

### Pathogenicity test

The pathogenic abilities of the *F. oxysporum* isolates previously collected from diseased cyclamens and cyclamen seedlings were tested. Five reference strains of Focv originating from different countries were used as positive controls (Table 1). Fo47 (MIAE00047), a non-pathogenic strain of *F. oxysporum*, was used as a

**Table 1** *Fusarium oxysporum* isolates analyzed in this study

<i>Forma specialis</i> or host of origin	MIAE accession number <sup>a</sup>	Other accession numbers or/and references or suppliers <sup>b</sup>	VCG <sup>c</sup>	Isolate	Country of origin	<i>Cyclamen persicum</i> variety of origin <sup>d</sup>	Year of isolation	Percentage of dead plants <sup>e</sup>	GenBank accession numbers of <i>EF-1α</i> sequences	GenBank accession numbers of IGS sequences
<i>f. sp. cyclaminis</i>	MIAE01654	NRRL 26673, FRC O-6501	ND	Foc7	USA (Texas)	Unknown	< 1997	70 %	KU128907	KU128958
	MIAE01655	NRRL 26674, FRC O-6503	ND	Foc8	USA (Texas)	Unknown	< 1997	ND	KU128908	KU128959
	MIAE01656	NRRL 26675, FRC O-6507	ND	Foc9	USA (Texas)	Unknown	< 1997	ND	KU128909	KU128960
	MIAE01657	NRRL 26676, FRC O-6547	ND	Foc10	USA (Texas)	Unknown	< 1997	ND	KU128910	KU128961
	MIAE01658	NRRL 38294, FRC O-1099 (Woudt et al. 1995)	0151	Foc16	Australia	Unknown	< 1995	ND	KU128911	KU128962
	MIAE01659	BBA 62316	ND	Foc3	Germany	Unknown	1955	ND	KU128912	KU128963
	MIAE01660	BBA 62315	ND	Foc11	Germany	Unknown	1947	ND	KU128913	KU128964
	MIAE00190	BBA 7022, ATCC 16061, CBS 159.57, DSM 62316, FRC O-1831, FRC O-1825, NRRL 36266, NRRL 22542	0153I	Foc4	Germany	Unknown	< 1995	ND	KU128914	KU128965
	MIAE01661	FRC O-1205 (Woudt et al. 1995)	0152	Foc27	Australia	Unknown	< 1995	ND	KU128915	KU128966
	MIAE01662	FRC O-1239 (Woudt et al. 1995)	0152	Foc26	USA	Unknown	< 1995	ND	KU128916	KU128967
	MIAE01663	FRC O-1800 (Woudt et al. 1995)	0152	Foc19	United-Kingdom	Unknown	< 1995	80 %	KU128917	KU128968
	MIAE01664	FRC O-1799 (Woudt et al. 1995)	0151	Foc18	United-Kingdom	Unknown	< 1995	ND	KU128918	KU128969
	MIAE01665	FRC O-1804 (Woudt et al. 1995)	0151	Foc21	United-Kingdom	Unknown	< 1995	ND	KU128919	KU128970
	MIAE01666	FRC O-1809 (Woudt et al. 1995)	0151	Foc22	Netherlands	Unknown	< 1995	90 %	KU128920	KU128971
	MIAE01667	FRC O-1797 (Woudt et al. 1995)	0151	Foc17	Netherlands	Unknown	< 1995	ND	KU128921	KU128972
	MIAE01668	FRC O-1834 (Woudt et al. 1995)	0153I	Foc24	Netherlands	Unknown	< 1995	ND	KU128922	KU128973
	MIAE01669	FRC O-1842 (Woudt et al. 1995)	0152	Foc25	Netherlands	Unknown	< 1995	ND	KU128923	KU128974
	MIAE01670	FRC O-1802 (Woudt et al. 1995)	0151	Foc20	Japan	Unknown	< 1995	80 %	KU128924	KU128975
	MIAE01671	MAFF 712101	ND	Foc93	Japan	Unknown	1990	ND	KU128925	KU128976
MIAE01672	Lori et al. 2012	1	Foc79	Argentina	Sierra	≤ 2004	60 %	KU128926	KU128977	
MIAE01673	Lori et al. 2012	1	Foc62	Argentina	Sierra	≤ 2004	ND	KU128927	KU128978	
MIAE01674	Lori et al. 2012	1	Foc69	Argentina	Sierra	≤ 2004	ND	KU128928	KU128979	
MIAE01675	Lori et al. 2012	2	Foc83	Argentina	Sierra	≤ 2004	ND	KU128929	KU128980	
MIAE01676	Lori et al. 2012	2	Foc84	Argentina	Sierra	≤ 2004	ND	KU128930	KU128981	
MIAE01677	Lori et al. 2012	4	Foc85	Argentina	Sierra	≤ 2004	ND	KU128931	KU128982	
MIAE01678	Lori et al. 2012	3	Foc86	Argentina	Sierra	≤ 2004	ND	KU128932	KU128983	
MIAE01679	W. Elmer	ND	Foc87	Unknow	Unknown	< 2002	ND	KU128933	KU128984	
MIAE01680	W. Elmer	ND	Foc88	USA (Connecticut)	Unknown	< 2013	70 %	KU128934	KU128985	
MIAE01681	W. Elmer	ND	Foc89	USA (Connecticut)	Unknown	< 2013	50 %	KU128935	KU128986	
MIAE01682	W. Elmer	ND	Foc90	USA (Connecticut)	Unknown	< 2013	50 %	KU128936	KU128987	
MIAE01683	W. Elmer	ND	Foc91	USA (Connecticut)	Unknown	< 2013	60 %	KU128937	KU128988	
<i>Cyclamen persicum</i>										

**Table 1** (continued)

<i>Forma specialis</i> or host of origin	MIAE accession number <sup>a</sup>	Other accession numbers or/and references or suppliers <sup>b</sup>	VCG <sup>c</sup>	Isolate	Country of origin	<i>Cyclamen persicum</i> variety of origin <sup>d</sup>	Year of isolation	Percentage of dead plants <sup>e</sup>	GenBank accession numbers of <i>EF-1α</i> sequences	GenBank accession numbers of IGS sequences
	MIAE01684	A. Minito	ND	Focy 13	Italy	Alios	2008	60 %	KUI28938	KUI28989
	MIAE01685	A. Minito	ND	Focy 14	Italy	Latina	2008	90 %	KUI28939	KUI28990
	MIAE01686	A. Minito	ND	Focy 15	Italy	Alios	2008	40 %	KUI28940	KUI28991
	MIAE01687	This study	ND	Focy 2	France	Unknown	1994	80 %	KUI28941	KUI28992
	MIAE01688	This study	ND	Focy 32 T1	France	Swan mélange *	2009	10 %	KUI28942	KUI28993
	MIAE01689	This study	ND	Focy 34 T1	France	Swan mélange *	2009	30 %	KUI28943	KUI28994
	MIAE01690	This study	ND	Focy 37 T3	France	Swan 363 rose flamme *	2009	60 %	KUI28944	KUI28995
	MIAE01691	This study	ND	Focy 38 T4	France	Swan 363 rose flamme *	2009	20 %	KUI28945	KUI28996
	MIAE01692	This study	ND	Focy 39 T1	France	Swan 363 rose flamme *	2009	40 %	KUI28946	KUI28997
	MIAE01507	This study	ND	Focy 43 T3	Netherlands	Variety of mini cyclamen	2009	50 %	KUI28947	KUI28998
	MIAE01693	This study	ND	Focy 44 T1	Netherlands	Variety of mini cyclamen	2010	50 %	KUI28948	KUI28999
	MIAE01694	This study	ND	Fo 31 T1	France	Swan rose (1758) *	2009	0 %	KUI28949	KUI29000
	MIAE01695	This study	ND	Fo 42 T1	France	Super serie winter blanc *	2009	0 %	KUI28950	KUI29001
	MIAE01696	This study	ND	Fo 59 T1	Italy	Rainier *	2010	0 %	KUI28951	KUI29002
	MIAE01697	This study	ND	Fo 60 T1	Italy	Super série mini winter mélange *	2010	0 %	KUI28952	KUI29003
	MIAE01698	This study	ND	Fo 29 T1	Netherlands	Umbrella *	2009	0 %	KUI28953	KUI29004
	MIAE01699	This study	ND	Fo 49 T1	Netherlands	Umbrella *	2010	0 %	KUI28954	KUI29005
	MIAE01700	This study	ND	Fo 52 T1	Netherlands	Umbrella *	2010	0 %	KUI28955	KUI29006
	MIAE01701	This study	ND	Fo 46 T1	Netherlands	Halos Lollipop frangé mélange (257) *	2010	0 %	KUI28956	KUI29007
	MIAE01702	This study	ND	Fo 56 T1	Germany	Meitis mélange flamme *	2010	0 %	KUI28957	KUI29008

<sup>a</sup> Collection MIAE, Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment, INRA, Dijon, France

<sup>b</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia; BBA, Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Berlin, Germany; CBS, Centraal-bureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; FRC, Fusarium Research Center, State College, Pennsylvania; MAFF, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan; NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service (ARS), Peoria, Illinois

<sup>c</sup> Vegetative compatibility groups (VCG) were determined by Woudt et al. (1995) and Lori et al. (2012); ND, not determined

<sup>d</sup> An asterisk denotes that the isolate was collected from an asymptomatic plant

<sup>e</sup> ND, not determined

negative control. Isolates were cultured in liquid malt medium (20 g l<sup>-1</sup> malt extract) at 25 °C and 124 rpm for 10 days in a Multitron (Infors HT, Bottmingen, Switzerland). Inoculums were filtered on 48-µm cheesecloth, and concentrations were estimated by spectrophotometry. Fungal suspensions were diluted to 2.5 × 10<sup>5</sup> conidia ml<sup>-1</sup> with tap water.

Seeds of *Cyclamen persicum* Miller variety Swan rose flammé (Eyraud-Production, Saint Laurent la Conche, France) were sowed in TS3 substrate (Klasmann Deilmann, Bremen, Germany), covered with small pieces of cork (Neho, Les Ponts de Cé, France), and kept in the dark for 2 weeks at 19 °C with 90 % humidity. Seedlings were kept under greenhouse conditions until the 5–7-leaf stage was reached, and then repotted in 0.5-l pots with Pindstrup n°4 substrate (Pindstrup, Kongerslev, Denmark). The absence of *F. oxysporum* in the substrate was verified by plating substrate dilutions.

Twenty millilitres of inoculum were added to the top of each pot close to the tuber (5 × 10<sup>6</sup> conidia/pot). Ten pots were inoculated per isolate, 10 plants were inoculated with 20 ml of tap water as a control. For each treatment, the 10 pots were divided in two groups of five plants. Then, groups of five pots were randomly distributed in the greenhouse. Conditions were set to allow a temperature increase up to more than 30 °C. Plants were irrigated with a nutrient solution 1:1:1 every two days using a drip irrigation system. The onset of symptoms was regularly monitored, and the final percentage of dead plants was determined 4 months after inoculation. For each dead plant, the tuber was surface-sterilized 20 s with 70 % ethanol and rinsed 20 s with sterile water twice to re-isolate the pathogenic fungus. When damage to tissues was relatively low, isolations were also performed from leaves and petioles (42 isolations). Plugs from plants were cultured on malt-agar-antibiotics medium (250 mg l<sup>-1</sup> citric acid, 100 mg l<sup>-1</sup> streptomycin, 50 mg l<sup>-1</sup> chlortetracycline). To check their identity, isolates were transferred to carnation leaf agar (20 g l<sup>-1</sup> agar, sterilized carnation leaf on top of water agar) and morphologically identified at the species level.

#### Molecular characterization

The 51 *F. oxysporum* isolates were characterized by sequencing part of the translation elongation factor 1-α (*EF-1α*) gene and the full-length ribosomal intergenic spacer (IGS) region. Fungal isolates were cultured in

PDB for 2 days. The mycelium was harvested by filtration, freeze-dried and ground with liquid nitrogen. DNA was extracted using the DNeasy plant mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. DNA concentrations were estimated using a spectrophotometer.

Part of the *EF-1α* gene was amplified by PCR using primers EF1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') and EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (O'Donnell et al. 1998) in a final volume of 25 µl containing 10 ng of DNA, 150 µM dNTP, 0.1 µM of each primer, 3 U of *Taq* DNA polymerase (MP Bio, Carlsbad, USA) and 1× PCR buffer. PCR amplification was performed in a Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) as follows: an initial denaturation step of 7 min at 95 °C, followed by 38 cycles of 1 min at 95 °C, 75 s at 57 °C and 1 min at 72 °C, and a final elongation step of 10 min at 72 °C. The presence of PCR products was confirmed by gel electrophoresis. *EF-1α* amplicons were sequenced in the two directions, to get duplicates and ensure reliable sequences, by Beckman Coulters Genomics (Danvers, USA) using the previously mentioned primers. For each PCR product, sequences from the two strands were assembled, and their ends cleaned using SeqMan 6.0 (DNASTAR Lasergene, GATC Biotech, Kronstanz, Germany). The *EF-1α* sequences were aligned using MEGA 6 software program, version 6.0.5 (Research Center for Genomics and Bioinformatics, Tokyo, Japan) (Tamura et al. 2013).

The IGS region was amplified using primers CNS1 (5'-GAGACAAGCATATGACTA C-3') and NL11 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') (O'Donnell et al. 2009) in a final volume of 50 µl containing 10 ng of DNA, 100 µM dNTP, 0.2 µM of each primer, 6 U of *Taq* DNA polymerase (MP Bio), and 1× PCR buffer. PCR conditions were as follows: an initial denaturation step of 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C, and a final elongation step of 5 min at 72 °C. The presence of PCR products was confirmed by gel electrophoresis. For each isolate, the entire IGS region was amplified twice to produce two full-length IGS sequences, and both amplicons were sequenced using primers INL11 (5'-AGGCTTCGCTTAGCGTCTTAG-3'), NLA (5'-TCTAGGGTAGGCKRGTGTTGTC-3'), CNSA (5'-TCTCATRIACCCTCCGAGACC-3') and CNS2 (5'-AACTTCAATCGCCTCTCACG-3') (O'Donnell et al. 2009). The eight sequences were assembled and cleaned as above. All IGS sequences were aligned as above.

*EF-1 $\alpha$*  and IGS alignments were compared using the neighbour-joining method and Kimura's two-parameter distance model using MEGA 6 software program, version 6.0.5. The two alignments were also concatenated to compare the strains in a tree combining both molecular markers. The trees were rooted with sequences of *F. commune* (HM057283 and HM057338). The topology of the resulting tree was tested by bootstrapping with 1000 resamplings of the data. Sequences were deposited in GenBank.

## Results

### Pathogenicity test

Typical wilt symptoms developed, with progressive wilting of the foliage leading to plant death; sometimes mycelium even developed on the top of the tuber (Fig. 1). The first disease symptoms were detected 20 days after inoculation, and the first dead plants 27 days after inoculation. The strains that proved to be pathogenic exhibited differences in aggressiveness. No symptom was observed on plants inoculated with water or on plants inoculated with the non-pathogenic strain Fo47. The five Focv reference strains induced death in 60 % to 90 % of the plants (Table 1). The eight isolates collected from diseased cyclamens induced death in 40 % to 90 % of the plants. Similarly, the two isolates collected from symptomatic cyclamen seedlings induced death in 50 % of the plants. Among the 14 isolates recovered from asymptomatic cyclamen seedlings, five turned out to be pathogenic. They caused the death of 10 % to 60 % of the plants. The remaining nine isolates did not induce disease on cyclamen.

For each dead plant, fungal isolations from the tuber were carried out. The fungus was detected in xylem tissues in both longitudinal and cross sections. *F. oxysporum* was recovered from dead plants in 95 % of isolations. It was not recovered when tuber tissues were too damaged. In these cases, opportunistic fungi such as *Botrytis* sp. or *Penicillium* sp. developed in Petri dishes. The pathogen was also recovered from petioles (lower and upper parts) of diseased plants in 88 % of isolations.

During the test, maximal temperatures in the greenhouse per day fluctuated from 19.1 °C to 37.1 °C. A few days before symptoms appeared, maximum temperature per day was higher than 30 °C for 3 consecutive days. During that period, the difference between maximum

temperature and minimum temperature per day was more than 15 °C.

### Molecular characterization

The *EF-1 $\alpha$*  and IGS alignments contained about 630 and 2400 nucleotides, respectively. The tree inferred from IGS sequences and *EF-1 $\alpha$*  sequences revealed respectively 13 and 12 sequence types (ST) among the 51 strains of *F. oxysporum* (Fig. S1, Fig. S2). The combination of both markers yielded 15 two-locus ST (Fig. 2). The 42 Focv strains were distributed into 6 two-locus ST that did not include non-pathogenic strains. ST 1, 2, and 3 were grouped in one branch, ST 4 was differentiated in one branch, and ST 5 and 6 were grouped in a third one. Using only IGS sequences did not discriminate between closely related ST 1 and ST 2 on the one hand and closely related ST 5 and ST 6 on the other hand (Fig. S1). However within *EF-1 $\alpha$*  sequences, only five nucleotides differed between ST 1 and ST 2 and two nucleotides between ST 5 and ST 6.

The number of strains per ST ranged between one and 17. ST 1 included strains representing a widespread distribution; it grouped 13 strains originating from six different countries (Australia, France, Japan, The Netherlands, the United Kingdom, and the USA). ST 2 and ST 3 were exclusively associated with Italian strains, while ST 4 exclusively grouped North American strains. ST 5 included strains from Germany and The Netherlands. ST 6 was closely related to ST 5 and included as much geographic diversity as ST 1. It grouped 10 strains originating from the same six countries as ST 1, together with the seven strains from Argentina.

Non-pathogenic *F. oxysporum* strains displayed a higher level of genetic diversity than pathogenic strains. The nine strains were differentiated into nine different ST and several of them were highly divergent from one another (Fig. 2). The non-pathogenic strains MIAE01699 and MIAE01700 were discriminated from pathogenic strains by their IGS sequences but not by their *EF-1 $\alpha$*  sequences (Fig. S2). Finally, no two-locus ST was shared by both pathogenic and non-pathogenic strains.

## Discussion

This study focuses on Focv genetic diversity around the world for the first time in twenty years. We collected all Focv strains available in international collections and in



of several VCG within one IGS group (Mirtalebi et al. 2013; Sasaki et al. 2014). The use of molecular markers allows comparing VCG identified in different studies and at different time periods without any need of testers or complementation testing. Thus, the strains from four out of the five VCG described by Lori et al. (2012) grouped into ST 6 with strains from VCG 0151 described by Woudt et al. (1995). The strains of the other two VCG reported in 1995 were in ST 1 and ST 5. This finding indicates that Focv should include at least nine VCG, since ST 2, 3 and 4 may represent unassigned VCG.

Among the six genetic groups we identified, ST 1 and 6 included the largest part of the collection. ST 5 grouped strains from two countries. For these groups, there was no correlation between genetic groups and geographical origin. This finding has also been reported for *F. oxysporum* populations that are pathogenic on carnation (Migheli et al. 1998) and lettuce (Pasquali et al. 2007). Furthermore, Lori et al. (2012) reported the scattering of genetically distinct strains of Focv in Argentina. The fact that each of ST 2, 3, and 4 grouped strains from the same geographical origins might be explained by the small number of strains each ST included.

Among the isolates collected from cyclamen, we identified nine non-pathogenic *F. oxysporum* strains. These strains were highly diverse as they scattered into nine genetic groups, some of them highly divergent. As they were isolated from surface-sterilized tubers, these strains can be considered as endophytic strains. Many studies reported high genetic diversity among saprophytic strains inhabiting soils (Edel-Hermann et al. 2015; Lori et al. 2004). Far fewer studies focused on endophytic fungi. Recently, Demers et al. (2015) showed that a tomato plant carried 4.2 ST of endophytic strains on average. Although our study revealed high genetic diversity of endophytic strains in cyclamen, it did not enable us to tell how many ST could coexist inside one cyclamen.

Pathogenic test highlighted huge differences in aggressiveness among strains, ranging between 10 % and 90 % of dead plants. Our results confirm earlier reports on Focv (Rattink 1986; Woudt et al. 1995). Woudt et al. (1995) noticed that among 53 strains, some killed only one or two plants out of 10. In our study, the disease started a few days after a high temperature peak for several days on end, quite comparable to the sudden and lasting temperature increase that triggers Fusarium wilt of cyclamen (Rattink 1986). Disease progress is

multifactor-dependent. Fusarium wilt of cyclamen is reliant on temperature, inoculum density, pH, and irrigation type (Elmer and Daughtrey 2012). Variability in aggressiveness among strains should be taken into account by breeders to select Focv-resistant varieties, as already done for onion and banana (Costa et al. 2015; Taylor et al. 2013).

Isolations from asymptomatic seedlings also yielded five pathogenic strains besides the nine endophytic strains. This confirms the early presence of the pathogen, while the disease appears later in the production cycle (Tompkins and Snyder 1972). It is therefore of prime importance to set up prophylactic measures early. The existence of either pathogenic or endophytic strains in cyclamen highlights how subtle differences in traits are for strains belonging to the same species. Both pathogenic and endophytic strains can penetrate cyclamen roots and colonize plants asymptotically at first. Differences between strains rely on the inability of endophytic strains to induce disease, probably because of the nature, the quantity or the timing of expression of signal molecules by both the plant and the *F. oxysporum* strains (L'Haridon et al. 2011). Their life stage similarities could be of great interest to better understand the mechanisms of disease triggering. The isolation at random of non-pathogenic strains from cyclamen is relevant because these non-pathogenic strains can be used to validate the specificity of a molecular marker, if any, allowing for early detection of Focv.

Our results as a whole support the hypothesis of a polyphyletic origin of Focv. Globally, three clades can be distinguished in the tree. The first one includes ST 1, 2 and 3 that appear close from each other. The second one consists of ST 4 while the last one groups the closely related ST 5 and 6. This hypothesis of polyphyletic origin had already been suggested (Woudt et al. 1995). As observed for other *formae speciales*, pathogenicity can appear at different times and places independently through various mechanisms during the evolutionary path of pathogenic *F. oxysporum*, including horizontal gene transfer (Ma et al. 2010; Mbofung et al. 2007; O'Donnell et al. 1998). Our study demonstrated the high genetic and biological diversity of the pathogen, and the simultaneous presence of latent pathogenic strains and of endophytic *F. oxysporum* strains in young cyclamen. It clearly reveals the need for a specific molecular marker of Focv to detect its presence early and selectively in seeds, seedlings, substrates, irrigation

water, and on any equipment used in production that can be a potential vector of the pathogen. This molecular tool would be of great interest to improve prophylaxis at all stages of cyclamen production.

**Acknowledgments** The authors would like to thank Gladys Lori, Wade Elmer, Andrea Minuto, the Agricultural Research Service (ARS) collection, and the National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS) Genebank for providing strains. We thank cyclamen growers who kindly provided seeds and their premises and allowed us to sample from seedlings. We also thank Gwenaëlle Chen for her technical assistance.

Charline Lecomte was financially supported by a PhD funding from the National Association of Technical Research (ANRT) (CIFRE n°2012/2833). This work was also supported by the Compte d’Affectation Spéciale “Développement Agricole et Rural” (CASDAR) (FuCy project n°1284).

## References

- Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P., & Diaz-Minguez, J. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(8), 3335–3340.
- Correll, J. C. C., Klittich, C. J. R., & Leslie, J. F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, *77*, 1640–1646.
- Costa, S. N., Bragança, C. A. D., Ribeiro, L. R., Amorim, E. P., Oliveira, S. A. S., Dita, M. A., et al. (2015). Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in different regions from Brazil. *Plant Pathology*, *64*(1), 137–146.
- Demers, J. E., Garzón, C. D., Jiménez-Gasco, M., & M., d. (2014). Striking genetic similarity between races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* confirms a monophyletic origin and clonal evolution of the chickpea vascular wilt pathogen. *European Journal of Plant Pathology*, *139*(2), 309–324.
- Demers, J. E., Gugino, B. K., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2015). Highly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field-grown tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(1), 81–90.
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Mounier, A., & Steinberg, C. (2015). *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *Journal of Microbiological Methods*, *111*, 64–71.
- Elmer, W. H., & Daughtrey, M. (2012). Fusarium wilt of Cyclamen. In M. L. Gullino, J. Katan, & A. Garibaldi (Eds.), *Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops* (pp. 213–219). St Paul: American Phytopathological Society.
- Fujinaga, M., Ogiso, H., Shinohara, H., Tsushima, S., Nishimura, N., Togawa, M., et al. (2005). Phylogenetic relationships between the lettuce root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* races 1, 2, and 3 based on the sequence of the intergenic spacer region of its ribosomal DNA. *Journal of General Plant Pathology*, *71*(6), 402–407.
- Grey-Wilson, C. (1997). *Cyclamen: a guide for gardeners, horticulturists and botanists*. London: BT Batsford.
- Grouet, D. (1985). La fusariose vasculaire du cyclamen. *Phytoma*, *372*, 49–50.
- Katan, T. (1999). Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*, *27*(1), 51–64.
- Kistler, H. C. (1997). Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. In population genetics of soil-borne fungal plant pathogens (*Vol. 87*, pp. 474–479).
- L’Haridon, F., Aimé, S., Duplessis, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., & Olivain, C. (2011). Isolation of differentially expressed genes during interactions between tomato cells and a protective or a non-protective strain of *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *76*(1), 9–19.
- Lievens, B., Hanssen, I. M., & Rep, M. (2012). Recent developments in the detection and identification of *formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum*: from pathogenicity testing to molecular diagnostics. In M. L. Gullino, J. Katan, & A. Garibaldi (Eds.), *Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops* (pp. 47–55). St Paul: American Phytopathological Society.
- Lori, G., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., & Alabouvette, C. (2004). Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. *Phytopathology*, *94*(6), 661–668.
- Lori, G. A., Petiet, P. M., Malbrán, I., Mourellos, C. A., Wright, E. R., & Rivera, M. C. (2012). Fusarium wilt of cyclamen: pathogenicity and vegetative compatibility groups structure of the pathogen in Argentina. *Crop Protection*, *36*, 43–48.
- Ma, L.-J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., et al. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, *464*(7287), 367–373.
- Mbofung, G. Y., Hong, S. G., & Pryor, B. M. (2007). Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1-alpha, and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Phytopathology*, *97*(1), 87–98.
- Migheli, Q., Briatore, E., & Garibaldi, A. (1998). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4, and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, *104*(1), 49–57.
- Minuto, A., Migheli, Q., & Garibaldi, A. (1995). Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of Fusarium wilt of cyclamen. *Crop Protection*, *14*(3), 221–226.
- Mirtalebi, M., Banihashemi, Z., & Linde, C. C. (2013). Phylogenetic relationship of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, *136*(4), 749–762.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (Eds.) (1983). *Fusarium species, an illustrated manual for identification*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press.
- O’Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(5), 2044–2049.
- O’Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., et al. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium*

- oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46(12), 936–948.
- Orlicz-Luthardt, A. (1998). *Studies on the resistance of cyclamen to Fusarium wilt*. (Paper presented at the International Symposium, New aspect of resistance research on cultivated plants: epidemiology, resistance evaluation and resistance genetics of fungal pathogens, Ascherleben).
- Pasquali, M., Dematheis, F., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2007). Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. *Phytopathology*, 97(8), 987–996.
- Rattink, H. (1986). *Some aspects of the etiology and epidemiology of Fusarium wilt on cyclamen*. Ghent: Paper presented at the International Symposium over Fytofarmacie en Fytiatrie.
- Reimherr, P. (1985). Atlas of diseases and pests of cyclamen. *Gärtnerbörse und Gartenwelt*, 85, 1780–1790.
- Sasaki, K., Nakahara, K., Tanaka, S., Shigyo, M., & Ito, S.-I. (2014). Genetic and pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from onion and Welsh onion in Japan. *Phytopathology*, 105(4), 525–532.
- Silva, F. P. d., Vechiato, M. H., & Harakava, R. (2014). *EF-1 $\alpha$*  gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. *Tropical Plant Pathology*, 39(1), 64–73.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Taylor, A., Vagany, V., Barbara, D. J., Thomas, B., Pink, D. A. C., Jones, J. E., & Clarkson, J. P. (2013). Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay. *Plant Pathology*, 62(1), 103–111.
- Tello, F. J., Vares, L., Vares, F., & Mijares, A. (1985). *Fusarium wilt of cyclamen in Spain*. Noordwijkerhout: Paper presented at the IV International Symposium on Flower Bulbs.
- Tompkins, C. M., & Snyder, W. C. (1972). Cyclamen wilt in California and its control. *Plant Disease Reporter*, 56(6), 493–497.
- Woudt, L. P., Neuvel, A., Sikkema, A., van Grinsven, M. Q. J. M., De Milliano, W. A. J., Campbell, C. L., & Leslie, J. F. (1995). Genetic variation in *Fusarium oxysporum* from cyclamen. *Phytopathology*, 85(11), 1348–1355.

## Chapitre IV :

Développement d'un outil moléculaire  
de détection de *Fusarium oxysporum* f.  
*sp. cyclaminis*



## Avant-propos

Le développement d'un outil moléculaire de détection de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Focy) permettrait de lutter plus efficacement contre le pathogène et de mieux comprendre sa propagation. En se basant sur les résultats de diversité génétique décrits dans le chapitre précédent, un fragment d'ADN spécifique de Focy a été recherché par amplification aléatoire d'ADN polymorphe (random amplified polymorphic DNA, RAPD). Pour cela, nous avons utilisé une collection de 138 souches microbiennes incluant 42 souches de Focy. Un fragment d'ADN présent uniquement dans les profils RAPD de Focy a été identifié, séquencé et aligné avec des séquences similaires présentes dans une base de données. Un couple d'amorces a été défini et un test PCR spécifique de Focy a été mis au point. Le couple d'amorces a permis de détecter jusqu'à 50 pg d'ADN de Focy en PCR conventionnelle, et jusqu'à 5 pg en PCR en temps réel. L'optimisation des conditions réactionnelles de PCR en temps réel permettra d'améliorer encore la sensibilité de détection. Un essai en chambre climatique effectué sur des tubercules de cyclamens inoculés montrent que le pathogène peut être détecté *in planta* par PCR en temps réel avant l'apparition des symptômes de fusariose. Le couple d'amorces développé constitue le premier outil de détection spécifique de Focy. La protection de l'outil développé étant sujet à discussions, les séquences du couple d'amorces ne sont pas dévoilées dans le manuscrit. Les résultats de ces travaux sont présentés et discutés dans ce chapitre. Ils ont également fait l'objet d'une publication dans le journal de vulgarisation scientifique Phytoma (Annexe 8).

## A specific molecular assay for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

Charline Lecomte<sup>1</sup>, Christian Steinberg<sup>2</sup>, Francisco Miguel de Cara<sup>3</sup>, Nadine Gautheron<sup>2</sup>, Fabien Robert<sup>1</sup>, Véronique Edel-Hermann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Astredhor, 44, rue d'Alésia, 75682 Paris, France

<sup>2</sup>INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17, rue Sully, 21065 Dijon, France

<sup>3</sup>IFAPA Centro La Mojonera, Camino San Nicolás n°1, 04745 La Mojonera, Almería, Spain

### Abstract

*Fusarium oxysporum* is an ubiquitous fungus which groups a wide diversity of strains. Some are plant pathogenic strains, as for example the *forma specialis cyclaminis* (Focy), exclusively pathogenic on cyclamen. Strains of *F. oxysporum* cannot be discriminated based on morphological features. Pathogenic strains are mainly identified by testing their pathogenicity on plants. However, in some cases, specific molecular markers have been successfully identified to design specific primers to target plant pathogenic strains. On cyclamen, methods of control of Focy are limited and producers urgently need to improve the management of the disease. Based on the previously assessed genetic diversity within the *forma specialis*, a specific molecular marker for Focy was investigated using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) strategy and a collection of 138 microbial strains including 42 strains de Focy. A specific band was found for all the Focy strains. The band was sequenced and compared to *F. oxysporum* genomes available in a database. From this alignment, we designed a couple of primers and set up a PCR assay specific of Focy. The primers supported a reliable detection of Focy by conventional PCR and by real-time PCR. In conventional PCR, the primers achieved a detection of Focy DNA until 50 pg. This threshold was ten times lower in real-time PCR. However, the amplification efficiency in real-time PCR will be further improved. To evaluate if the primers enabled *in planta* detection of Focy, we carried out a bioassay by inoculating cyclamens with Focy, and we sampled plants at different times after inoculation. Preliminary results show that the primers allow *in planta* detection of the pathogen before outbreak of symptoms.

### Key-words

*Cyclamen persicum*, diagnosis, *Fusarium* wilt of cyclamen, molecular detection, real-time PCR, RAPD-SCAR

## Introduction

The ubiquitous fungus *Fusarium oxysporum* is a soil-borne Ascomycota. This well-known species includes both plant pathogenic and non-pathogenic strains for which no host plants have been identified. The pathogenic ones are responsible for vascular wilt or for crown and root rot on a broad range of crops. However, each strain shows a high level of host specificity for one plant species. The pathogenic strains are ordered by *formae speciales* and races according to their species and cultivar specificity, respectively (Armstrong and Armstrong, 1981). More than 150 *formae speciales* and races are described. Pathogenic and non-pathogenic strains cannot be discriminated from morphological features. Currently, the main way to identify *formae speciales* is to evaluate their pathogenicity on plants (Recorbet *et al.*, 2003). However, it is a laborious and time-consuming work.

The understanding of the disease epidemiology and the use of adapted methods to control the pathogenic *F. oxysporum* rely on a fast and accurate method of detection of *formae speciales* if any. Molecular tools allow the development of specific, sensitive, fast and financially affordable methods of detection. Moreover, such detection tools raise commercial interests to avoid agricultural losses as well as to guarantee pathogen-free plant materials (Lievens *et al.*, 2012). The development of a detection tool relies on the knowledge of the pathogen diversity. Historically, the vegetative compatibility groups (VCG) have been widely used to assess the diversity of *formae speciales* of *F. oxysporum* (Puhalla, 1985; Kistler *et al.*, 1998). This method relies on the complementary pairing of mutants unable to use nitrate (Puhalla, 1985). Most of the *formae speciales* include several VCG, which means that each new strain should be paired with members of the previously identified VCG. Molecular markers now allow describing the diversity between and/or within *formae speciales* depending on the DNA marker considered. The combination of different molecular markers in a multilocus sequence typing approach allows an even more precise description of the genetic diversity (Mbofung *et al.*, 2007; Demers *et al.*, 2014). However, studies on the genetic diversity of *F. oxysporum* showed that most *formae speciales* are polyphyletic, which makes their identification more complicated (O'Donnell *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2014).

Methods allowing identification of pathogenic *F. oxysporum* is ideally based on genes involved in pathogenicity. However, little information is available regarding the genes conferring the virulence of *formae speciales* (Recorbet *et al.*, 2003). Thus, only few molecular markers based on these genes have been developed so far (Rep *et al.*, 2004; Hirano and Arie, 2006). *F. oxysporum* genomes are enriched in transposable elements and their insertion sites provided specific detection tools (Fernandez *et al.*, 1998; Pasquali *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2010). As an example, Pasquali *et al.* (2004) identified specific primers to detect *F. oxysporum* strains pathogenic on Paris daisy through the identification of polymorphism in the flanking region of the transposable element *Fot1*. Moreover, detection tools for *formae speciales* or races can also be based on randomly selected specific markers through genotyping techniques such as random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003; Li *et al.*, 2010; Luongo *et al.*, 2012). However, the main drawback of RAPD is the lack of reproducibility.

**Table 1:** Microbial strains used in this study.

Microorganisms	<i>Forma specialis</i> or species	MIAE accession number <sup>a</sup>	Other accession numbers or/and references or suppliers <sup>b</sup>	Isolate	Country of origin	Year of isolation
<i>Fusarium oxysporum</i>	f. sp. <i>cyclaminis</i>	MIAE01654	NRRL 26673, FRC O-6501	Focy 7	USA (Texas)	< 1997
		MIAE01655	NRRL 26674, FRC O-6503	Focy 8	USA (Texas)	< 1997
		MIAE01656	NRRL 26675, FRC O-6507	Focy 9	USA (Texas)	< 1997
		MIAE01657	NRRL 26676, FRC O-6547	Focy 10	USA (Texas)	< 1997
		MIAE01658	NRRL 38294, FRC O-1099 (Woudt et al., 1995)	Focy 16	Australia	< 1995
		MIAE01659	BBA 62316	Focy 3	Germany	1955
		MIAE01660	BBA 62315	Focy 11	Germany	1947
		MIAE00190	BBA 7022, ATCC 16061, CBS 159.57, DSM 62316, FRC O-1831, FRC O-1825, NRRL 36266, NRRL 22542	Focy 4	Germany	< 1995
		MIAE01661	FRC O-1205 (Woudt et al., 1995)	Focy 27	Australia	< 1995
		MIAE01662	FRC O-1239 (Woudt et al., 1995)	Focy 26	USA	< 1995
		MIAE01663	FRC O-1800 (Woudt et al., 1995)	Focy 19	United-Kingdom	< 1995
		MIAE01664	FRC O-1799 (Woudt et al., 1995)	Focy 18	United-Kingdom	< 1995
		MIAE01665	FRC O-1804 (Woudt et al., 1995)	Focy 21	United-Kingdom	< 1995
		MIAE01666	FRC O-1809 (Woudt et al., 1995)	Focy 22	The Netherlands	< 1995
		MIAE01667	FRC O-1797 (Woudt et al., 1995)	Focy 17	The Netherlands	< 1995
		MIAE01668	FRC O-1834 (Woudt et al., 1995)	Focy 24	The Netherlands	< 1995
		MIAE01669	FRC O-1842 (Woudt et al., 1995)	Focy 25	The Netherlands	< 1995
		MIAE01670	FRC O-1802 (Woudt et al., 1995)	Focy 20	Japan	< 1995
		MIAE01671	MAFF 712101 (Someya et al., 1999)	Focy 93	Japan	1990
		MIAE01672	Lori <i>et al.</i> , 2012	Focy 79	Argentina	≤ 2004
		MIAE01673	Lori <i>et al.</i> , 2012	Focy 62	Argentina	≤ 2004
		MIAE01674	Lori <i>et al.</i> , 2012	Focy 69	Argentina	≤ 2004
		MIAE01675	Lori <i>et al.</i> , 2012	Focy 83	Argentina	≤ 2004
		MIAE01676	Lori <i>et al.</i> , 2012	Focy 84	Argentina	≤ 2004
		MIAE01677	Lori <i>et al.</i> , 2012	Focy 85	Argentina	≤ 2004
		MIAE01678	Lori <i>et al.</i> , 2012	Focy 86	Argentina	≤ 2004

Chapitre IV : Développement d'un outil moléculaire de détection de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

	MIAE01679	Elmer <i>et al.</i> , 2002	Focy 87	Unknown	< 2002
	MIAE01680	W. Elmer	Focy 88	USA (Connecticut)	< 2013
	MIAE01681	W. Elmer	Focy 89	USA (Connecticut)	< 2013
	MIAE01682	W. Elmer	Focy 90	USA (Connecticut)	< 2013
	MIAE01683	W. Elmer	Focy 91	USA (Connecticut)	< 2013
	MIAE01684	A. Minuto	Focy 13	Italy	2008
	MIAE01685	A. Minuto	Focy 14	Italy	2008
	MIAE01686	A. Minuto	Focy 15	Italy	2008
	MIAE01687	Lecomte <i>et al.</i> , 2016	Focy 2	France	1994
	MIAE01688	Lecomte <i>et al.</i> , 2016	Focy 32T1	France	2009
	MIAE01689	Lecomte <i>et al.</i> , 2016	Focy 34T1	France	2009
	MIAE01690	Lecomte <i>et al.</i> , 2016	Focy 37T3	France	2009
	MIAE01691	Lecomte <i>et al.</i> , 2016	Focy 38T4	France	2009
	MIAE01692	Lecomte <i>et al.</i> , 2016	Focy 39T1	France	2009
	MIAE01507	Lecomte <i>et al.</i> , 2016	Focy 43T3	The Netherlands	2009
	MIAE01693	Lecomte <i>et al.</i> , 2016	Focy 44T1	The Netherlands	2010
f. sp. <i>albedinis</i>	MIAE00453	ATCC MYA-1202	Foa1	Morocco	Unknown
f. sp. <i>asparagi</i>	MIAE01766		Foas1	Unknown	Unknown
f. sp. <i>basilici</i>	MIAE01767		Fob2	Unknown	Unknown
	MIAE01768		Fob3	Unknown	Unknown
f. sp. <i>cubense</i>	MIAE01125		Focub1	Taiwan	Unknown
	MIAE01126		Focub2	Taiwan	Unknown
f. sp. <i>cucumerinum</i>	MIAE01473		Focuc1	Unknown	Unknown
f. sp. <i>dianthi</i>	MIAE01769		Fod5	Unknown	Unknown
	MIAE01770		Fod6	Unknown	Unknown
	MIAE01771		Fod7	Unknown	Unknown
f. sp. <i>elaeidis</i>	MIAE01772		Foe1	Unknown	Unknown
f. sp. <i>lini</i>	MIAE00347	ATCC MYA-1201	Foln3	France	Unknown
f. sp. <i>lycopersici</i>	MIAE00046	ATCC MYA-1199	Fol8	France	Unknown
	MIAE00461		Fol26	France	Unknown
	MIAE00525		Fol101	Unknown	Unknown
f. sp. <i>melonis</i>	MIAE00680	ATCC MYA-1200	Fom15	France	Unknown

Chapitre IV : Développement d'un outil moléculaire de détection de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

		MIAE00681		Fom24	France	Unknown
		MIAE01644		Fom35	France	Unknown
f. sp. <i>pisii</i>		MIAE01463	ATCC 24381, CBS 127.73, IMI 159029, NRRL 36228	Fopisi1	United-Kingdom	Unknown
f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>		MIAE00045		Forl12	Morocco	Unknown
		MIAE00471		Forl5	France	Unknown
		MIAE00476		Forl45	France	Unknown
f. sp. <i>raphani</i>		MIAE01775		For1	Unknown	Unknown
		MIAE01776		For2	Unknown	Unknown
f. sp. <i>vasinfectum</i>		MIAE01773	CBS 116611	Fov1	Ivory Coast	Unknown
		MIAE01774	CBS 116614	Fov4	Ivory Coast	Unknown
soilborne <i>F. oxysporum</i>		MIAE00047		Fo47	France	1978
		MIAE00676		Fo20	France	1978
		MIAE00677		Fo34	France	1978
		MIAE01650		E001	France	2009
		MIAE01780		91069	France	1991
		MIAE01781		91104	France	1991
		MIAE01782		B2	France	2011
		MIAE01783		B4	France	2011
		MIAE01784		Ca2	France	1997
		MIAE01785		Ca31	France	1997
		MIAE01786		Chat40	France	1997
		MIAE01787		Chat255	France	1997
		MIAE01788		Chat266	France	1997
		MIAE01790		E005	France	2009
		MIAE01791		E010	France	2009
		MIAE01792		Chat49	France	1997
<i>Fusarium</i> spp. isolated from cyclamen (non pathogenic)	<i>F. oxysporum</i>	MIAE01694		Fo 31T1	France	2009
		MIAE01695		Fo 42T1	France	2009
		MIAE01696		Fo 59T1	Italy	2010
		MIAE01697		Fo 60T1	Italy	2010
		MIAE01698		Fo 29T1	The Netherlands	2009
		MIAE01699		Fo 49T1	The Netherlands	2010

Chapitre IV : Développement d'un outil moléculaire de détection de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

		MIAE01700		Fo 52T1	The Netherlands	2010
		MIAE01701		Fo 46T1	The Netherlands	2010
		MIAE01702		Fo 56T1	Germany	2010
	<i>F. fujikuroi</i> species complex	MIAE01800		Fo 28	The Netherlands	2009
		MIAE01651		Fo 30	France	2009
		MIAE01813		Fo 35	Italy	2009
		MIAE01814		Fo 36	Italy	2009
		MIAE01815		Fo 40	France	2009
		MIAE01816		Fo 41	France	2009
		MIAE01817		Fo 45	Italy	2010
		MIAE01818		Fo 50	The Netherlands	2010
		MIAE01819		Fo 51	The Netherlands	2010
		MIAE01820		Fo 58	The Netherlands	2010
	<i>F. venenatum</i>	MIAE01821		Fo 61	Italy	2010
Other <i>Fusarium</i> spp.	<i>F. acuminatum</i>	MIAE00244	BBA 65224	FAC1	Unknown	Unknown
	<i>F. chlamydosporum</i> species complex	MIAE00287	ATCC 24372, BBA 62168, CBS 124.73, IMI 128101, NRRL 25535	FCHL2	Pakistan	Unknown
	<i>F. commune</i>	MIAE00101		NH1	Algeria	2006
	<i>F. culmorum</i>	MIAE00688		FCUL4	France	1993
	<i>F. equiseti</i>	MIAE01649		FEQ1	France	1989
	<i>F. fujikuroi</i> species complex	MIAE00061		FMO3	Unknown	Unknown
		MIAE00068		FSUB2	Unknown	Unknown
		MIAE00306		FVER3	Italy	Unknown
	<i>F. langsethiae</i>	MIAE00289		FLANG6	France	2007
	<i>F. lateritium</i>	MIAE00291	ATCC 11857, CBS 268.51	FLAT5	The Netherlands	Unknown
	<i>F. poae</i>	MIAE00299	CBS 597.96	FPO1	Poland	1991
	<i>F. redolens</i>	MIAE01652		E003	France	2009
	<i>F. sambucinum</i> species complex	MIAE00301	CBS 533.96	FSA2	Poland	1991
		MIAE01623	CBS 123657, FGSC #9075, NRRL 31084	PH1	USA (Michigan)	Unknown
	<i>F. solani</i>	MIAE01653		E006	France	2009
	<i>F. sporotrichioides</i>	MIAE00304	CBS 534.96	FSP01	Poland	1989
	<i>F. tricinctum</i> species complex	MIAE00305	CBS 144.78	FTR1	Unknown	Unknown
		MIAE00286	ATCC 24362, CBS 121.73, IMI 145562	FAV5	United-Kingdom	Unknown

Chapitre IV : Développement d'un outil moléculaire de détection de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

Soil-borne fungi	<i>Aspergillus</i> sp.	MIAE01778		SYS419	France	2010
	<i>Trichoderma gamsii</i>	MIAE00029		MIAE 29	Unknown	Unknown
	<i>Verticillium dahliae</i>	MIAE00048		MIAE 48	Unknown	Unknown
Microorganisms pathogenic on cyclamen	<i>Botrytis cinerea</i>	MIAE01777		BOT2 bis	France	1991
	<i>Colletotrichum</i> sp.	MIAE01743	C27-1-3, NRRL 62813		USA (Michigan)	Unknown
	<i>Phytophthora tropicalis</i>	MIAE01718		PO199	Unknown	Unknown
	<i>Rhizoctonia solani</i>	MIAE01476		C1	France	2013
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>		ATCC 15713, CCM 1008, DSM 30168, LMG 2404, MPL-EC-WT-1, NCPPB 312, NRRL B-4072		USA (Illinois)	Unknown
Microorganisms isolated from cyclamen seeds	<i>Alternaria concatenata</i>	MIAE01797		morph 10	France	2013
	<i>Geomyces</i> sp.	MIAE01794		morph 14	France	2013
	<i>Geomyces pannorum</i>	MIAE01798		morph 24	France	2013
	<i>Paraphoma fimeti</i>	MIAE01799		morph 26	France	2013
	<i>Penicillium</i> sp.	MIAE01795		morph 1	France	2013
		MIAE01812		morph 22	France	2013
	<i>Penicillium polonicum</i>	MIAE01796		morph 2	France	2013
	Undefined genus in Heliales	MIAE01793		morph 9	France	2013

<sup>a</sup> Collection MIAE, Microorganisms of Interest for Agriculture and Environment, INRA, Dijon, France; b ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia; BBA, Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Berlin, Germany; CBS, Centraal-bureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands; CCM, Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic ; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; FGSC, Fungal Genetics Stock Center, Manhattan, New York ; IMI, Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), Oxford, United Kingdom ; LMG, Belgian co-ordinated collections of microorganisms (BCCM/LMG); FRC, Fusarium Research Center, State College, Pennsylvania; MAFF, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan; NCPPG, National Collection of Plant Pathogenic Bateria, York, United-Kingdom ; NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service (ARS), Peoria, Illinois.

To overcome this problem, the selected markers are commonly used to design specific primers (sequenced characterized amplified region, SCAR) (Bhagyawant, 2016). Following this strategy, specific molecular markers have been developed to detect the *formae speciales basilici* (Chiocchetti *et al.*, 2001), *eustomae* (Li *et al.*, 2010), *phaseoli* (Alves-Santos *et al.*, 2002), *cucumerinum* and *radicis-cucumerinum* (Lievens *et al.*, 2007). In other examples, some SCAR primers allowed the specific detection of races of *F. oxysporum* (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003; Luongo *et al.*, 2012).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Focy) is the *forma specialis* which causes Fusarium wilt of cyclamen. This is the worldwide major disease of this ornamental plant. Although, Focy can be latently present into the plant, the disease usually breaks out during summertime or at the end of the production cycle (Tompkins and Snyder, 1972; Grouet, 1985). Typical symptoms are a progressive yellowing and wilting of leaves and flowers and brown-dark punctuations inside the tuber indicating the presence of the fungus into xylem vessels (Rouxel and Grouet, 1974). Methods of control of the pathogen are limited and producers urgently need to improve the control of the disease (Elmer and Daughtrey, 2012). The genetic diversity of Focy was first assessed in 1995 using strains originating from seven countries and later on in 2012 with Argentinian strains (Woudt *et al.*, 1995; Lori *et al.*, 2012). A recent study updated knowledge on the genetic diversity of *forma specialis cyclaminis* using a worldwide collection of strains by sequencing part of the translation elongation factor 1- $\alpha$  and the full-length nuclear ribosomal intergenic spacer region (Lecomte *et al.*, 2016). A high genetic diversity was found since 6 two-locus sequences types (ST) were identified. The aim of the present study is to search for a molecular marker specific of Focy *via* a RAPD-SCAR approach and to set up a tool of detection of the pathogen *in planta*.

## Materials and Methods

### Microbial isolates

We collected 138 strains of microorganisms from international collections and from plant samples. The collection included 42 strains of Focy, 26 strains of other *F. oxysporum formae speciales*, 16 strains of soil-borne *F. oxysporum*, 9 strains of non-pathogenic *F. oxysporum* isolated from cyclamen, 29 strains of other *Fusarium* species of which 11 were isolated from cyclamen, 3 strains of soil-borne fungi other than *Fusarium* spp., 5 strains of microorganisms pathogenic on cyclamen, including an oomycota and 8 fungal strains isolated from cyclamen seeds (Table 1). The pathogenicity of the Focy strains was checked in a previous study (Lecomte *et al.*, 2016). Each fungal strain was cultured on potato dextrose agar (PDA) (39 g/L Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) slopes for 15 days. A spore suspension was made by adding 750  $\mu$ L of potato dextrose broth (PDB) (24 g/L, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and mixing properly using a vortex shaker. Around 500  $\mu$ L of the suspension was added to 600  $\mu$ L of ¼ glycerol in a cryotube. The fungal strains were stored at -80 °C. The oomycota strain was grown on corn meal agar (17 g/L CMA, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) for one week and several agar disks

were placed in a tube containing seeds of hemp (15 mL/tube sterile water; 6 sterile seeds of hemp/tube). The inoculated tube was conserved at room temperature.

### Bioassay to evaluate the detection of Focy *in planta*

A bioassay was carried out in climatic chamber to determine the sensitivity of the detection tool set up in this study during the evolution of the disease. The assay included 3 treatments of 150 plants each: inoculation with Focy at the sowing (sowing treatment), inoculation with Focy at the one-leave stage (post-sowing treatment) and inoculation with tap water (control treatment). Seeds of *Cyclamen persicum* (Melody red, Zoetermeer, Varinova) were sown in sowing trays using peat (substrate n°11, Pindstrup, Ryomgaard, Denmark). Cyclamens were grown in a germination chamber at 18 °C. When the first leave appeared, seedlings were transferred in a climatic chamber (20 °C night and 25 °C day, 10 h of photoperiod). Inoculum of the aggressive strain of Focy MIAE01666 was produced as described by Lecomte *et al.*, (2016). Five mL of inoculum at 10<sup>4</sup> conidia/mL (sowing treatment) or 10<sup>6</sup> conidia/mL (post-sowing treatment) were added to the top of each cell close to the tuber. Five mL of water were added close to each tuber in the control treatment. Tubers were sampled weekly from the one-leave stage up to 4 weeks later. For the post-sowing treatment, the first sampling was not performed since it corresponded to the moment of inoculation. Three pools of 10 tubers per treatment were collected for each sampling. Cyclamen tissues were surface-sterilized 20 s with 70 % ethanol and rinsed 20 s with sterile water twice. Plant material was preserved at -80 °C.

### DNA extractions from microorganisms and plant tissues

Fungal and oomycota strains were cultured in PDB for 2 days. The mycelium was harvested by filtration and placed at – 80 °C for one night. Mycelium and plant material were freeze-dried and ground in liquid nitrogen with a mortar and a pestle. DNA was extracted using the DNeasy plant mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. For the extraction of bacterial DNA, two bacterial colonies were suspended in 100 µL of lysis solution (0.05 M NaOH, 0.25 % sodium dodecyl sulfate) and incubated 15 min at 100 °C. The suspension was centrifuged for 1 min at 15,000 g and the supernatant was conserved. DNA concentrations were estimated using a spectrophotometer.

### RAPD analyses and amplification conditions

A total of 63 primers from the Operon kits (Eurofins, Luxembourg, Luxembourg) were tested using 6 Focy strains (MIAE01658, MIAE01663, MIAE01668, MIAE01681, MIAE01684 and MIAE01685) representative of the genetic diversity of Focy (Lecomte *et al.*, 2016) and 1 non Focy strain (MIAE00047). Primers producing an amplification pattern with a clear band only

present for all Focv strains were further tested against all the 138 strains (Table 1). PCR amplifications were performed in a final volume of 20  $\mu$ L containing 4 ng of DNA, 200  $\mu$ M dNTP, 0.5  $\mu$ M of primer, 1 U of Taq DNA polymerase (MP Bio, Carlsbad, USA) and 1x PCR buffer. PCR amplification was performed in a Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) as follows: an initial denaturation step of 3 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 40 °C and 1 min 30 s at 72 °C, and a final elongation step of 5 min at 72 °C. Five  $\mu$ L of PCR products were revealed by electrophoresis on a 1 % agarose gel. A ladder (low molecular weight DNA ladder, Biolabs, Ipswich, Massachusetts) was used as size standard.

## DNA cloning and sequencing

A RAPD band specific for all Focv strains was purified from the gel using the MinElute gel extraction kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) and ligated into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. The vector was integrated into competent JM109 *Escherichia coli* cells (Promega, Madison, USA). The insert was amplified and sequenced in the two directions using primers SP6 and T7 (Eurofins, Luxembourg, Luxembourg). Sequencing was performed by Beckman Coulter Genomics (Brea, USA). Sequences of the two strands were assembled and their ends cleaned using SeqMan 6.0 (DNASTAR Lasergene, GATC Biotech, Kronstanz, Germany) and VecScreen (National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA) to remove the remaining sequences of primers.

## Design of SCAR primers and setting up of conditions for conventional PCR

The sequence of the cloned fragment was compared to known sequences and available genomes of *F. oxysporum* using the sequence database of the European Nucleotide Archive (ENA, Cambridge, United Kingdom). Sequences with high similarity with the sequence of the cloned fragment were downloaded and aligned with the cloned fragment sequence using SeaView (Gouy et al., 2010). Differences of sequences between the cloned fragment and sequences from the database were used to design a primer pair. Primers were synthesized by Eurofins.

Two Focv strains (MIAE00190 and MIAE01685) and two non Focv strains (MIAE00047 and MIAE00461) were used to set up specific PCR conditions. Once the PCR conditions were optimized, the specificity of the primers was tested with the DNA of the collection of 138 strains (Table 1) and DNA of non-inoculated cyclamen. Amplification was performed by PCR in a final volume of 20  $\mu$ L containing 10 ng of DNA, 200  $\mu$ M dNTP, 0.2  $\mu$ M of primer, 3 U of Taq DNA polymerase (MP Bio) and 1x PCR buffer. PCR amplification was performed in a Mastercycler as follows: an initial denaturation step of 2 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 68 °C and 30 s at 72 °C, and a final elongation step of 5 min at 72 °C. The sensitivity of the primers in PCR was determined by testing serial dilutions of Focv DNA from 10 ng to 1 pg.



The quality of all DNA which were not amplified by the designed primers was confirmed using the primers ITS1F/ITS4 (White *et al.*, 1990; Gardes and Bruns, 1993) to amplify the nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) of fungi and oomycota strains according to the procedure described by Edel-Hermann *et al.* (2012) and the primers 1492r/27f (Lane, 1991) to amplify the 16S rDNA of the bacteria according to the procedure described by Martin-Laurent *et al.* (2001). The quality of plant DNA was confirmed by PCR amplification with primers 28KJ/28C (Cullings, 1992). The PCR products were visualized by electrophoresis on a 2 % agarose gel.

### Setting up of conditions for real-time PCR

Real-time PCR reactions were performed in a final volume of 15  $\mu$ L containing 5  $\mu$ L of DNA, 0.2  $\mu$ M of each primer and 7.5  $\mu$ L of the SYBR green master mix (Absolute qPCR SYBR Green kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Amplifications were monitored using a StepOne Plus system (Applied Biosystems, Foster city, USA). The program used was: an initial denaturation step of 15 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 68 °C and 30 s at 72 °C. A dissociation curve was included at the end of the program by heating to 95 °C for 15 s, cooling to 60 °C for 1 min and slowly heating to 95 °C for 15 s to evaluate potential primer dimers and nonspecific amplification products. In order to construct a standard curve based on known quantities of target DNA, the plasmid containing the cloned fragment of the strain MIAE01684 was linearized using the restriction enzyme *Pst*I (Promega, Madison, USA). A range of 10-fold serial dilutions of the linearized plasmid was added twice in each microplate in order to obtain a standard curve from  $10^2$  to  $10^8$  copies. The threshold automatically calculated by the apparatus was used to determine the Ct value for each PCR reaction. The standard curve was obtained by plotting Ct values versus known quantity of DNA and was used to estimate the number of DNA copies in samples. Reactions were performed with Focy DNA as well as with DNA from contaminated or healthy cyclamens originating from the bioassay. The sensitivity of the primers was determined in real-time PCR by testing 10-fold dilutions of Focy DNA and DNA extracted from seedlings of the bioassay. All real-time PCR reactions were performed twice in separate assays.

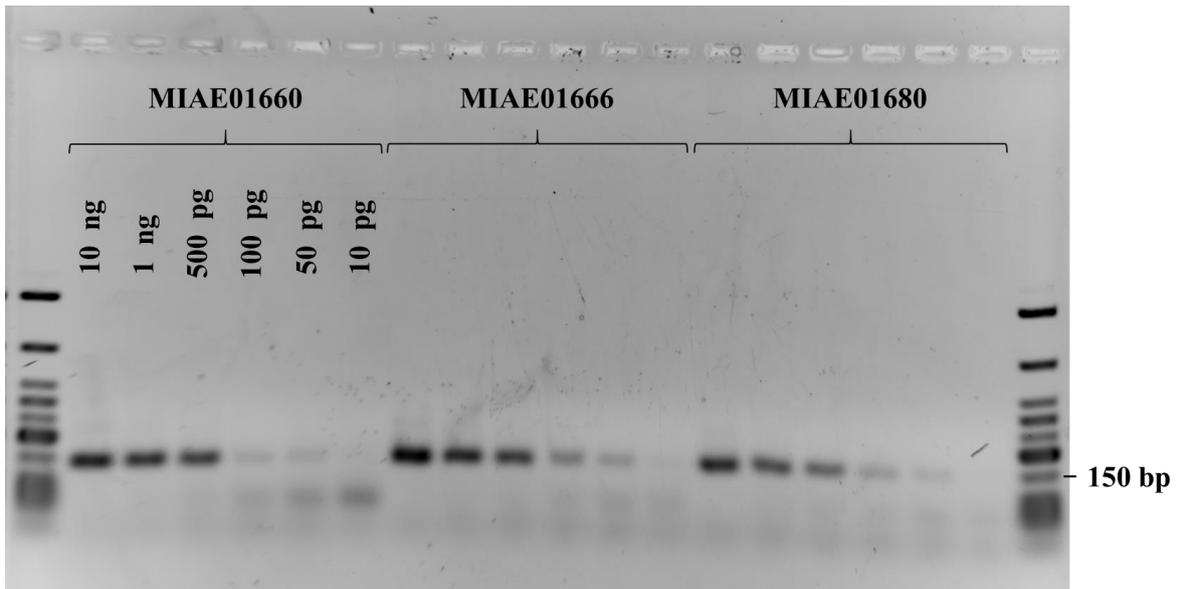


Figure 1: Sensitivity of the specific primers Focy F3/Focy R3 with concentrations ranging from 10 ng to 10 pg of DNA of three different strains of Focy (MAIE 01660, MIAE01666 and MIAE01680).

## Results

### Development of a RAPD-SCAR based detection assay

The comparison of random amplified polymorphic DNA profiles revealed a band of 1650 bp for all the Focy strains of the collection. This band was missing from the profiles of amplification of the 96 other strains. The selected fragment was cloned and sequenced for the Focy strain MIAE01684. The resulting sequences showed 95 % to 99 % of similarity with sequences coding for an unidentified protein present in the genome of a non pathogenic strain of *F. oxysporum* (AFMM01000254), strains belonging to the *formae speciales cubense* (AMGQ01000222, AMGQ01000651) *lycopersici* (AAXH01000833, AAXH01000852, AAXH01000904), *pisi* (AGBI01001057), and *vasinfectum* (AGNC01001041). Similar sequences were found in different chromosomes of a genome and sometimes several times in one chromosome. The sequences were aligned with the sequence of the cloned fragment of Focy. Four mismatches were found between the Focy sequence and other sequences. A primer pair was designed by including one mismatch at the 3' end of each primer. The primers named Focy F3 and Focy R3 were 20 bp long and were designed to amplify a 140 bp fragment. The primer pair yielded a PCR product from the DNA of the 42 Focy strains. Amplification was neither obtained with the 96 other strains of the collection nor with non-inoculated cyclamen. Cyclamen DNA and DNA of the non Focy microorganisms of the collection were successfully amplified using other primers (data not shown). The detection threshold of the primer pair in the PCR assay was of 50 pg of DNA of Focy for the three strains tested in the PCR assay (Figure 1).

### Detection of Focy *via* real-time PCR

The real-time PCR assay had a linear range of quantification from 102 to 108 copies of target sequence par PCR. The efficiency of the reaction reached 77 %. The dissociation curve showed no unspecific amplification except some primerdimers when low concentrations of DNA were tested. The DNA of several Focy strains was detected in the real-time PCR assay until 5 pg of DNA.

The specific molecular tool was used to detect Focy *in planta* in preliminary assays. Typical symptoms of Fusarium wilt of cyclamen were not observed during the bioassay. Moreover, no brown punctuations were observed when tubers were cut. The tool allowed the *in planta* detection of Focy DNA at different sampling times of the bioassay. However, this is still an ongoing experimentation.

## Discussion

*Fusarium oxysporum* is a highly diverse fungus gathering strains that are either pathogenic or non-pathogenic on plants. Therefore it is extremely important to be able to identify strains. Consequently, the development of tools allowing a fast, reliable and specific identification of pathogenic strains of *F. oxysporum* is highly requested for scientific as well as for agricultural concerns. In this study, a molecular marker specific to Focy was identified by RAPD and it enabled the development of specific SCAR primers. The specificity of the tool was ensured by testing a large collection of strains. The primers supported a reliable detection of Focy by conventional PCR and by real-time PCR in cyclamen tubers.

A PCR product was obtained with all 42 strains of Focy strains, which represent the genetic diversity of the *forma specialis* in the world (Lecomte *et al.*, 2016). No cross-reactions were observed with the other strains tested including 26 other *formae speciales* among which some are pathogenic on horticultural crops such as *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, 20 non pathogenic strains of *Fusarium* spp. isolated from cyclamen as well as 5 other microorganisms pathogenic on cyclamen. On the *forma specialis ciceris*, a SCAR marker detected only Californian isolates of the race 1B/C (Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz, 2003). On the opposite, the Focy specific primers allowed the detection of Focy regardless of the geographic origins of the strains.

The specificity of the primers relies on only one base per primer placed at the 3' end. Other studies demonstrated that such a little difference is enough to differentiate strains and to develop a specific molecular tool (Holmberg *et al.*, 2009). As an example, Edel-Hermann *et al.* (2011) designed primers to specifically identify the non-pathogenic strain of *F. oxysporum* Fo47 based on only one mismatch with other strains. Similar tools were successfully developed to detect *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* race 1 and *F. oxysporum* f. sp. *basilici* (Haan & Doorn, 2000; Pasquali *et al.*, 2006). Jiménez-Gasco and Jiménez-Díaz (2003) also developed 4 primer pairs allowing specific identification of races 0, 1A, 5 and 6 of the *forma specialis ciceris* through a RAPD-SCAR approach.

The detection threshold of Focy DNA in real-time PCR is ten times lower than the threshold in conventional PCR. Indeed, it is commonly believed that the real-time PCR achieves a more sensitive detection than the conventional PCR (Valasek and Repa, 2005). The first results obtained in real-time PCR with the cyclamen samples demonstrated that the fungus can be detected *in planta* although no symptoms of Fusarium wilt were observed. However, all the samples have not been tested yet, because the efficiency of reaction is not optimized. This efficiency will be improved by adjusting several parameters (e.g. primers concentration, SYBR qPCR kit, PCR additives) since the efficiency assuredly affects the detection threshold of the primers (Bustin and Nolan, 2013). The samples of the bioassay will all be tested after optimization of the amplification conditions. Finally, the detection assay will be used on environmental samples such as peat, water or samples from the production (e.g. pot, cyclamen seeds, and cyclamen plants).

To our knowledge, this is the first tool enabling *in planta* detection of Focy using real-time PCR. Such specific molecular detection is more than suitable for strains or *formae speciales*

belonging to a highly diverse pathogen as *F. oxysporum*. However detection tools of *formae speciales* are still very rare. These tools give powerful opportunities to monitor the pathogen in production before to start the production or before the onset of symptoms. Thereby, they enable a drastic management of the culture by eliminating sources of contamination to anticipate the spread of the pathogen and the disease risk and thus ensure the health status of the culture in order to provide buyers a product of quality. Since 2 to 5 % of cyclamen seedlings can latently be contaminated while asymptomatic (Grouet, 1985), the early detection of the pathogen will certainly limit economic losses in production. Moreover, the detection of the pathogen in water, substrate, seeds or tubers in production will permit the use of the most adapted method of control to prevent the pathogen introduction or to limit its spread in production. Since molecular tools of detection are also available for biological control agents (Cipriani *et al.*, 2009; Edel-Hermann *et al.*, 2011; Soto-Muñoz *et al.*, 2015), they will undoubtedly be useful to achieve a better understanding of the interactions between these microorganisms.

### **Acknowledgements**

The authors thank Gladys Lori, Wade Elmer, Andrea Minuto, Katrin Balke, Szkuta Grazyna, the Agricultural Research Service (ARS) collection, and the National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS) Genebank for providing strains.

Charline Lecomte was financially supported by a PhD funding from the French National Association of Technical Research (ANRT) (CIFRE n°2012/2833). This work was also supported by the Compte d'Affectation Spéciale "Développement Agricole et Rural" (CASDAR) (FuCy project n°1284).



## Chapitre V :

Identification d'agents de lutte  
biologique efficaces contre  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*



## Avant-propos

*F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Focy) est l'un des agents pathogènes les plus dangereux pour la production de cyclamen. Lorsqu'il s'y développe, les pertes peuvent atteindre jusqu'à 50 % de la production. Actuellement, aucun moyen de lutte ne permet de maîtriser la maladie. La profession floricole est dans l'attente urgente de solutions de lutte efficaces. Différentes études ont obtenu des résultats prometteurs en utilisant des microorganismes comme agents de lutte biologique (ALB). Cependant, pour l'instant aucun produit de lutte biologique pour lutter contre la fusariose du cyclamen n'est disponible sur le marché. En outre, la lourdeur des processus réglementaires d'autorisation de mise sur le marché ralentit leur commercialisation et donc leur disponibilité pour les producteurs. Pour répondre à l'attente de la production, nous avons sélectionné 7 produits commercialisés soit en tant que produit de protection des plantes, contre des maladies autres que la fusariose du cyclamen, soit en tant que matière fertilisante. Pour des raisons de confidentialité, nous ne pouvons pas dévoiler le nom des produits et des entreprises productrices, leur composition exacte et leurs applications. L'efficacité des 7 produits, utilisés seuls ou en combinaison, a été évaluée au cours d'un premier essai en serre. Une souche de Focy très agressive a été utilisée et différents rapports Focy/ALB ont été testés. Certains produits ont eu un effet négatif sur le développement des jeunes plantes de cyclamen en l'absence du pathogène. A l'issue de cet essai, les 3 meilleurs produits ont été sélectionnés pour être testés à nouveau lors d'un second essai dupliqué sur deux sites expérimentaux différents (Bourgogne et Normandie). L'efficacité des 3 produits a été évaluée contre deux souches de Focy et sur un plus grand nombre de plantes. A nouveau, différents rapports Focy/ALB ont été testés. L'absence de maladie en Normandie ne permet pas d'exploiter les résultats obtenus sur ce site. En revanche, en Bourgogne, une réduction significative de la maladie a été enregistrée avec le produit à base de *Bacillus* sp. Globalement, ces essais nous ont permis d'obtenir des premiers résultats intéressants qui nécessitent d'être répétés. Les résultats de ces travaux sont présentés et discutés dans ce chapitre. Ils ont également fait l'objet d'une publication dans le journal de vulgarisation scientifique Phytoma (Annexe 9).



## I. Introduction

La fusariose vasculaire constitue l'une des maladies les plus préjudiciables au cyclamen. La gestion de cette maladie en production est compliquée. En effet, les sources de contamination peuvent être multiples. *F. oxysporum* est particulièrement adaptable à de nombreuses conditions environnementales. Les conidies du champignon peuvent être disséminées par de nombreux vecteurs abiotiques (substrat, eau, vent) et biotiques (arthropodes, matériel végétal, plantes relais). Ses chlamydospores peuvent survivre plusieurs mois dans divers substrats présents dans les serres (Rekah *et al.*, 2000, 2001; Vakalounakis et Chalkias, 2004; Gruyer *et al.*, 2013; Scarlett *et al.*, 2014; Steinberg *et al.*, 2015). En outre, la maladie peut se déclarer à tout moment pendant le cycle de production. La présence latente du champignon dans la plante pendant plusieurs semaines à plusieurs mois rend difficile son contrôle et imprévisible l'explosion de la maladie (Rouxel et Grouet, 1974; Elmer et Daughtrey, 2012). Les moyens de lutte disponibles sont peu nombreux et ne permettent souvent que de retarder l'apparition de la maladie. En effet, la mise en place de mesures de prophylaxie permet de limiter l'introduction de sources d'inoculum potentielles et la propagation de l'agent pathogène. Il s'agit d'un prérequis à la mise en place et au bon déroulement de la culture, qui n'est cependant pas suffisant pour limiter la gravité de la maladie, si le pathogène est introduit accidentellement. De plus, bien que des différences de sensibilité inter et intraspécifique aient été observées, aucun cultivar de cyclamen résistant à la maladie n'existe pour l'instant (Orlicz-Luthardt, 1998; Ewald *et al.*, 2000). Les fongicides autorisés sont, quant à eux, peu nombreux et d'une efficacité insuffisante pour préserver l'état sanitaire de la culture (Gullino *et al.*, 2002; Elmer et McGovern, 2004). Pour pallier au manque de moyen de lutte efficace contre la fusariose du cyclamen, la lutte biologique apparaît comme une alternative à promouvoir. La lutte biologique vise à utiliser les agents ou les produits naturels qui nuisent à des ravageurs de plantes ou à des microorganismes pathogènes de plantes (Directive européenne 2009/128/CE). Pour la fusariose du cyclamen, il s'agira essentiellement des microorganismes de lutte biologique et des substances naturelles, comme détaillé dans le chapitre I. Les microorganismes et les substances naturelles agissent directement ou indirectement sur l'agent pathogène par différents modes d'action (Bakkali *et al.*, 2008; Alabouvette *et al.*, 2009; Ben-Jabeur *et al.*, 2015). Ces moyens de lutte peuvent également être combinés à d'autres moyens de lutte. Pour lutter contre Focv, il a par exemple été proposé de combiner fongicides et microorganismes antagonistes (Minuto *et al.*, 1995; Daughtrey et Tobiasz, 2004; Elmer et McGovern, 2004). Des résultats prometteurs ont été obtenus avec la lutte biologique pour lutter contre la fusariose du cyclamen (Alabouvette *et al.*, 1993; Maya et Matsubara, 2013a). Ainsi, la sévérité de la maladie est diminuée de près de 40 % avec la bactérie *Serratia marcescens* (Someya *et al.*, 2000). En revanche, aucune substance naturelle n'a été évaluée pour lutter contre Focv. Actuellement, aucun produit de lutte biologique n'est disponible sur le marché pour lutter contre la fusariose du cyclamen. En outre, la lourdeur des processus réglementaires d'autorisation de mise sur le marché (AMM) ralentit leur commercialisation et donc leur

Tableau 5 : Composition et concentrations des produits de protection des plantes ou de matière fertilisante utilisés dans cette étude.

Code des produits	Composition	Allégation	Concentration annoncée (en UFC/g de produit) <sup>a</sup>	Concentration effective (en UFC/g de produit)
1	<i>Gliocladium</i> sp.	Produit de protection des plantes (PPP)	2.10 <sup>8</sup>	2.10 <sup>8</sup>
2	<i>Bacillus</i> sp.	Matière fertilisante	2.10 <sup>9</sup>	2,4.10 <sup>8</sup>
3	<i>Glomus</i> sp.	Matière fertilisante	4.10 <sup>3</sup>	Non vérifié
4	<i>Pseudomonas</i> sp. et <i>Trichoderma</i> sp.	Matière fertilisante	10 <sup>9</sup> (bactérie) et 4.10 <sup>6</sup> (champignon)	10 <sup>9</sup> (bactérie) et 9.10 <sup>6</sup> (champignon)
5	<i>Trichoderma</i> sp.	Confidentiel	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>
6	<i>Fusarium</i> sp.	Aucune	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>
7	<i>Trichoderma</i> sp.	PPP	10 <sup>7</sup>	2,7.10 <sup>8</sup>

Tableau 6 : Concentrations apportées en Focy et en produit, et rapports de concentration correspondant.

Concentration apportée en Focy (UFC/L de substrat)	Concentration apportée en produit (ALB) (UFC/L de substrat)	Rapport de concentration Focy/ALB évalués
10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	1/10
	10 <sup>7</sup>	1/100
10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	1/10
	10 <sup>8</sup>	1/100

disponibilité pour les producteurs. Ces derniers se trouvent démunis face à cet agent pathogène.

Afin d'identifier un ou plusieurs agents de lutte biologique (ALB) efficaces pour améliorer rapidement le contrôle de la fusariose du cyclamen, sept produits déjà autorisés en France ont été testés dans deux essais successifs conduits en serre en 2014 et 2015. Ces produits, à base de microorganismes sont autorisés soit en tant que matière fertilisante, soit en tant que produit de protection des plantes (PPP), mais pas pour lutter contre la fusariose du cyclamen. Lors du premier essai, l'efficacité des sept produits a été évaluée pour garder trois produits prometteurs qui ont été testés à nouveau lors du second essai. Les résultats de ces travaux sont présentés et discutés dans ce chapitre.

## II. Matériels et méthodes

Les détails relatifs aux matériels et méthodes utilisés pour conduire les tests effectués ont été présentés dans le chapitre 2. Néanmoins nous rappellerons ici les grandes lignes concernant la réalisation de ces tests. La sélection des 7 produits s'est faite de telle sorte que des espèces microbiennes largement décrites dans la littérature pour leurs activités antagonistes et disponibles sur le marché européen soient représentées. L'identité des produits a été vérifiée par séquençage de régions d'ADN discriminantes au niveau de l'espèce. La concentration des produits a été vérifiée par suspensions-dilutions et étalement sur milieu de culture. Lors du premier essai réalisé en 2014 les 7 produits ont été testés seuls ou en combinaison pour lutter contre la souche agressive Focy 43T3 (MIAE01507) (Tableau 5). Les combinaisons d'ALB 1 + 2 et 2 + 3 regroupent des produits provenant du même fournisseur afin d'en faciliter la mise à disposition ultérieure auprès des utilisateurs si la combinaison s'avère efficace. Les produits 2 et 4 ont été associés pour évaluer la combinaison de deux souches bactériennes. Les produits ont été apportés au semis et au repotage à  $10^6$  UFC/L de substrat, tandis que l'agent pathogène a été apporté une semaine après le repotage à  $10^6$ ,  $10^5$  ou  $10^4$  UFC/L de substrat, de telle sorte que les rapports Focy/ALB soient de 1/1, 1/10 et 1/100. En 2015, l'activité antagoniste des 3 produits retenus a été testée à nouveau au cours d'un essai en serre dupliqué, en Bourgogne (Bretenièrre) et en Normandie (Mont-Saint-Aignan). Leurs efficacités ont été évaluées avec les souches agressives Focy 43T3 et Focy 14 (MIAE01685). Les produits ont été apportés au semis et au repotage à  $10^6$ ,  $10^7$  ou  $10^8$  UFC/L de substrat. Les souches pathogènes ont été apportées deux semaines après le repotage à  $10^5$  ou  $10^6$  UFC/L de substrat, de telle sorte que les rapports Focy/ALB soient de 1/10 et 1/100.

Chapitre V : Identification d'agents de lutte biologique efficaces contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

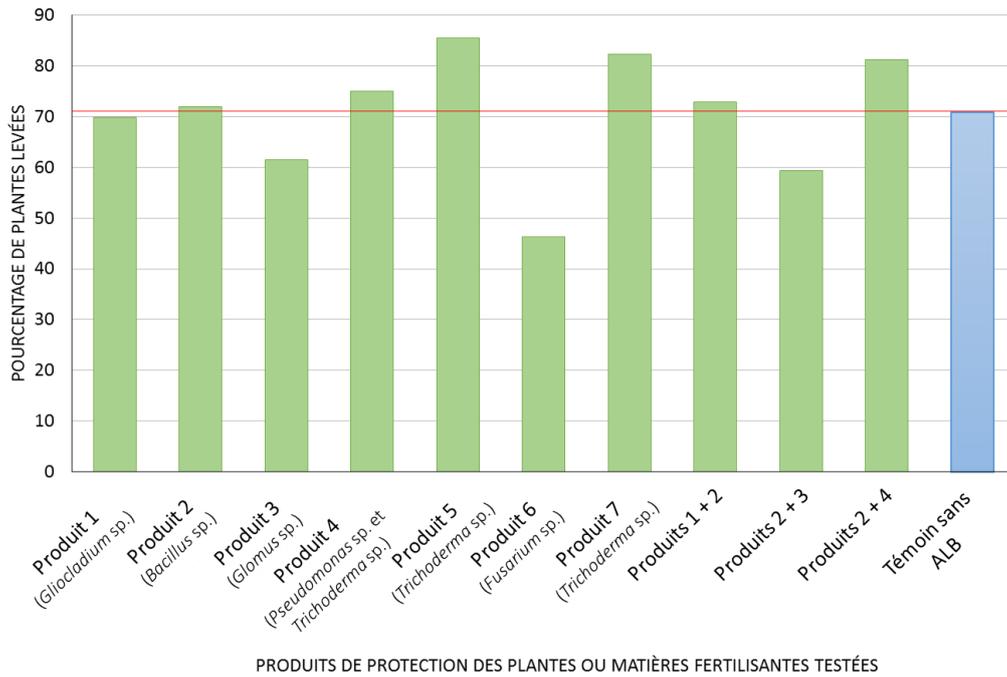


Figure 14 : Pourcentage de plantes levées selon les produits testés.

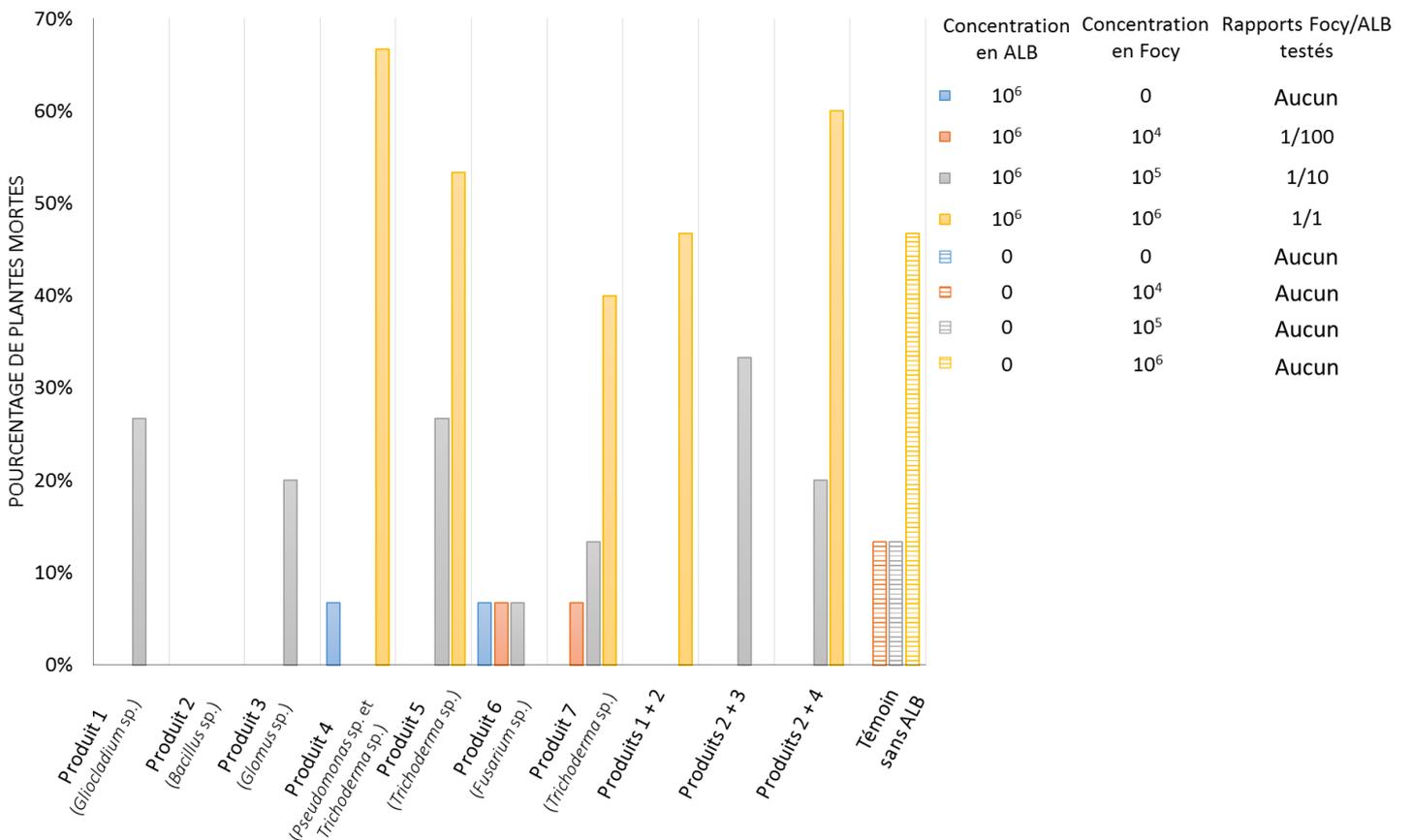


Figure 15 : Pourcentage de plantes mortes selon les agents de lutte biologique (ALB) et les rapports Foc/ALB testés lors du premier essai.

Les concentrations sont données en UFC/L de substrat.

### III. Résultats

#### III.1 Vérification de l'identité et des concentrations des ALB

Avant de mettre en place cet essai, la concentration et l'identité des différents produits ont été vérifiées afin de s'assurer de la concentration apportée. Ces informations n'ont pas pu être vérifiées pour le produit à base d'une souche de *Glomus* sp. Pour l'ensemble des produits, les microorganismes présents dans le produit sont ceux indiqués par le fournisseur (Tableau 6). La concentration effective correspond à celle annoncée pour les produits 1, 4 et 5. Elle est inférieure à celle annoncée pour les produits à base de *Fusarium* sp. (6) et de *Bacillus* sp. (2) et supérieure à celle annoncée pour celui à base de *Trichoderma* sp. (7). La concentration des produits a également été évaluée pour l'essai de 2015. La concentration des 3 produits était conforme à celle annoncée. Pour calculer la quantité de produits à apporter pour atteindre les concentrations souhaitées, les concentrations obtenues à l'issue des tests microbiologiques ont été utilisées.

#### III.2 Premier essai : sélection d'agents de lutte biologique efficaces pour lutter contre Focv

Avant même que la souche pathogène ne soit apportée, certains produits ont montré un impact sur les cyclamens. Un effet négatif des produits 6 (*Fusarium* sp.) et 3 (*Glomus* sp.) sur le nombre de plantes levées a été observé (Figure 14). Ce nombre atteignait respectivement 61 % et 46 % de plantes levées contre 71 % dans la modalité témoin. Le même effet est constaté pour la combinaison (2 + 3) incluant le produit 3 (*Glomus* sp.) avec 59 % de plantes levées. A l'inverse, les produits 4 (*Pseudomonas* sp. et *Trichoderma* sp.), 5 et 7 (2 souches de *Trichoderma* sp.) ont un nombre plus important de plantes levées de 75 %, à 85 %. La seule combinaison incluant le produit 4 (*Pseudomonas* sp. et *Trichoderma* sp.) montre la même tendance que le produit 4 utilisé seul avec 81 % de plantes levées. De plus, des problèmes de développement du champignon *Botrytis* (imputable à un excès d'humidité) dans un premier temps et de manque d'eau dans un second temps ont perturbé le développement des cyclamens préalablement à l'apport du champignon pathogène. Ces différents facteurs expliquent que le nombre de 20 plantes par modalité initialement prévu a été diminué à 15.

Les premiers symptômes ont été observés 6 semaines après inoculation (semaine 29). Cependant, la progression de la maladie était très faible. Par conséquent, il a été décidé d'inoculer à nouveau les cyclamens dans les mêmes conditions. Les résultats finaux ne permettent que de dégager des tendances (Figure 15). Dans la modalité témoin, le nombre de plantes mortes atteint 47 % avec la plus forte concentration et seulement 13 % avec les deux autres concentrations testées. L'ensemble des observations et des résultats ont conduit à éliminer certains des produits et combinaisons : Les produits 3 (*Glomus* sp.) et 6 (*Fusarium* sp.) et la combinaison comprenant le produit 3 (2+3), ayant montré une phytotoxicité avant l'apport

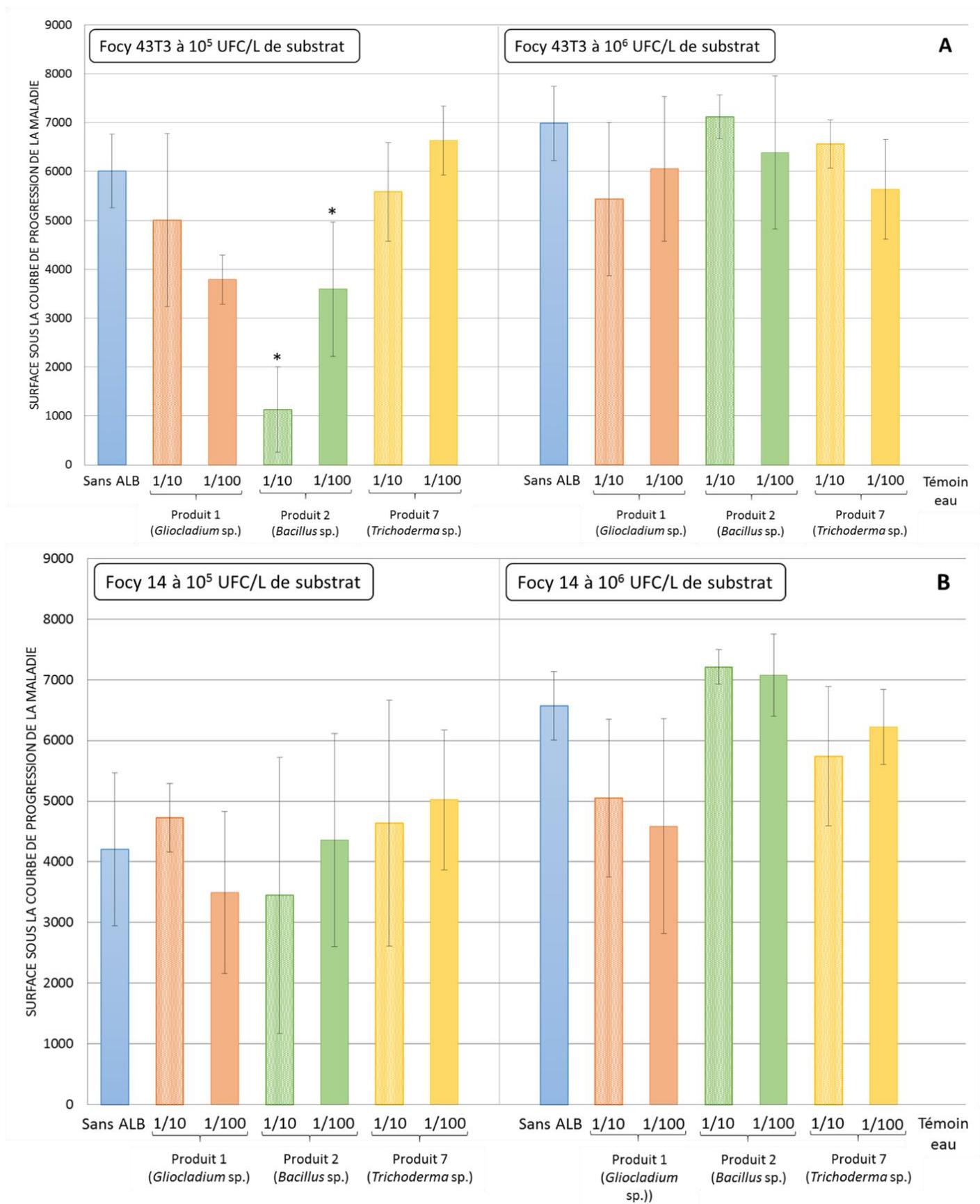


Figure 16 : Sévérité de la maladie avec la souche Focy 43T3 (A) et avec la souche Focy 14 (B) pour chacun des trois produits et pour les différents rapports Focy/ALB testés dans le deuxième essai. Les résultats significativement différents du témoin sans ALB sont indiqués par des astérisques.

du pathogène, n'ont pas été retenus. Les deux combinaisons (1+2 et 2+4) et le produit 4 (*Pseudomonas* sp. et *Trichoderma* sp.) montrent autant voire plus de plantes mortes que dans la modalité témoin avec la plus forte dose de Focy. Ils n'ont pas été retenus. Afin de ne pas garder deux microorganismes appartenant au même genre microbien, nous avons décidé d'éliminer le produit à base de *Trichoderma* sp. le moins efficace, c'est-à-dire le 5. Par conséquent, les produits 1 (*Gliocladium* sp.), 2 (*Bacillus* sp.) et 7 (*Trichoderma* sp.) ont été conservés pour la suite des tests. La présence de *F. oxysporum* dans les tubercules de plantes symptomatiques et asymptomatiques a été vérifiée par isolements sur milieu gélosé pendant et à la fin de l'essai. Le champignon a bien été ré-isolé des plantes inoculées avec Focy.

### III.3 Deuxième essai : confirmation des résultats de lutte biologique obtenus lors du premier essai

Ce deuxième essai avait pour but de vérifier les résultats obtenus avec les 3 produits (1,2 et 7) retenus lors du premier essai. A partir du rempotage, les deux essais ont été menés avec une semaine de décalage. Les premiers symptômes ont été observés 4 semaines après inoculation (semaine 31) pour l'essai en Bourgogne et 5 semaines après inoculation (semaine 33) pour l'essai en Normandie. Cependant, lors de l'essai en Normandie, des contaminations croisées ont été observées entre les différentes modalités. En outre, la maladie a été très peu sévère, ne permettant pas une bonne discrimination des modalités. Par conséquent, seuls les résultats de l'essai réalisé à Bretenière seront présentés. L'incidence de la maladie a atteint 100 % avec la souche la plus agressive à la plus forte concentration de champignon pathogène et 4 mois après inoculation (fin de l'essai). Ce résultat confirme la forte agressivité des deux souches de Focy utilisées. Cependant, comme lors du test de pathogénicité (Chapitre III), la souche Focy 14 apparaît plus agressive que la souche Focy 43T3. Les trois produits n'ont pas montré d'effet négatif sur les plantes en cours de l'essai, même à la concentration la plus élevée (Figure 16) Les différentes modalités y sont comparées selon leur surface sous la courbe de progression de la maladie. Lorsque les cyclamens ont été inoculés avec la souche la plus agressive (Focy 14), aucune différence significative en termes de protection n'a été enregistrée, quels que soient le produit et les rapports Focy/ALB considérés. En revanche, lorsque la souche Focy 43T3, a été inoculée à la concentration la plus faible ( $10^5$  UFC/L de substrat), le produit 2 (*Bacillus* sp.) réduit de manière significative l'incidence de la maladie (Figure 17). Le pourcentage de plantes saines est en effet de 30 % lorsque le rapport Focy 43T3/produit 2 est de 1/100, et d'environ 75 % avec le rapport 1/10. Sans ALB et à la même concentration de Focy 43T3, moins de 5 % de plantes sont saines. Aucun effet des produits n'est enregistré avec Focy 43T3 à la plus forte concentration ( $10^6$  UFC/L de substrat).

Chapitre V : Identification d'agents de lutte biologique efficaces contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*

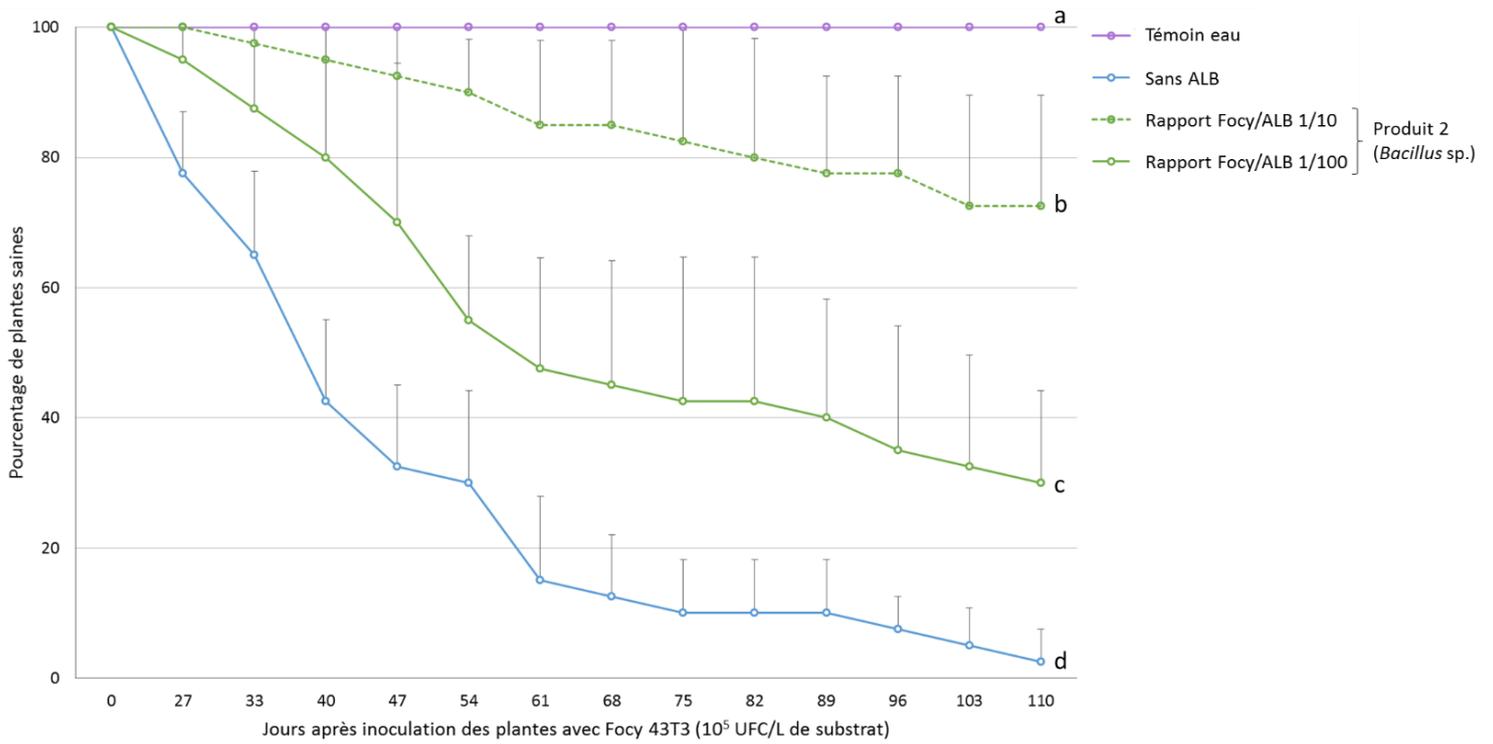


Figure 17 : Evolution du pourcentage de plantes saines, c'est-à dire commercialisables, au cours du temps en présence de la souche *Focys* 43T3 (inoculée à  $10^5$  UFC/L de substrat) et du produit 2 inoculé à  $10^6$  ou  $10^7$  UFC/L de substrat et dans les témoins sains (inoculés à l'eau).

## IV. Discussion

L'essai de 2014 et l'essai effectué en Normandie en 2015 n'ont pas permis l'expression de l'agressivité des souches de Focy. En effet, en 2014, la semaine suivant l'inoculation de l'agent pathogène, de forts pics d'hygrométrie (plus de 70 %) combinés à des températures moyennes n'excédant pas 25 °C ont été enregistrés. Ces conditions sont certainement responsables du retard d'expression de la maladie lors de ce premier essai puisqu'elle est favorisée par des pics de fortes chaleurs (supérieure à 25 °C) et une faible hygrométrie (Rattink, 1980; Grouet, 1985). Il a par ailleurs été montré que les températures supérieures à 30 °C sont responsables d'une augmentation de l'incidence de la maladie (Daughtrey *et al.*, 1995). De plus, les cyclamens restent souvent asymptomatiques jusqu'à ce qu'un stress thermique et/ou hydrique survienne (Elmer et Daughtrey, 2012). Une semaine avant l'apparition des symptômes, l'hygrométrie était moins importante (46 à 59 %) et les températures étaient supérieures à 25 °C, ce qui a probablement favorisé la progression du champignon dans les tissus vasculaires et l'expression des symptômes. En revanche, la sévérité de la maladie est restée faible, malgré l'apport d'un second inoculum de Focy. Ce résultat confirme que le développement et la sévérité de la maladie sont dépendants des facteurs climatiques d'une part et des facteurs culturels d'autre part.

L'efficacité des agents de lutte biologique dépend énormément de la qualité (*i.e.* pureté, viabilité, concentration, formulation) des produits (Fravel, 2005). Cet aspect est d'ailleurs abordé dans le Chapitre I de ce manuscrit. Au cours de l'essai de 2014, nous avons constaté que la concentration de certains produits n'est pas conforme à la description du produit. D'autres produits montrent un effet négatif sur la plante. L'un de ces produits, le produit 3 est formulé à base de *Glomus* sp. L'effet observé pourrait être lié au coût énergétique que représente l'établissement de la symbiose pour une jeune plante (Peng *et al.*, 1993). Les cyclamens sauvages ou cultivés entretiennent des symbioses avec des champignons mycorhiziens comme *Septoglomus constrictum* ou *Glomus fasciculatum* (Maya et Matsubara, 2013b; Rydlová *et al.*, 2015). Lorsque l'inoculum du champignon mycorhizien est apporté trois mois après semis, l'association symbiotique du cyclamen et d'une souche de *G. fasciculatum* réduit significativement l'incidence de la fusariose vasculaire en induisant les réactions de défense de la plante (Maya et Matsubara, 2013a). Ce résultat souligne l'intérêt que peuvent représenter les candidats mycorhiziens pour la protection des plantes contre des agents d'origine tellurique comme Focy malgré le coût énergétique de la symbiose. Le second produit ayant montré un effet négatif sur la levée des cyclamens est à base d'une souche de *Fusarium* sp. (6). Le microorganisme pourrait être à l'origine de ce manque à la levée puisque certaines souches de *Fusarium* sp. sont responsables de fontes de semis (Mao *et al.*, 1997). Il est également possible que le formulant utilisé soit à incriminer. En effet, si le formulant influence l'efficacité du produit, il pourrait également avoir un effet direct sur la plante.

La maladie s'est installée lors de l'essai mené en Bourgogne en 2015. Parmi les trois produits retenus suite à l'essai de 2014, seul un à base d'une souche de *Bacillus* sp. a permis de diminuer significativement la maladie. De manière surprenante, la meilleure efficacité a été

enregistrée avec le rapport Focy/ALB de 1/10. L'effet antagoniste est moins important lorsque la bactérie est 100 fois plus présente que le pathogène. De plus, ce résultat n'a été obtenu qu'avec la souche pathogène la moins agressive. L'efficacité de ce produit semble donc dépendre de l'agressivité de la souche pathogène à laquelle il est confronté et du rapport Focy/ALB utilisé.

L'absence de relation dose-réponse au-delà d'un certain seuil d'inoculum d'ALB a déjà été observée et aboutit à l'établissement d'un plateau (Alabouvette *et al.*, 1993 ; Raaijmakers *et al.*, 1995). Dans notre cas, l'augmentation de la dose aboutit à une diminution de l'efficacité de la protection. Deux hypothèses peuvent être avancées : i) L'inhibition du phénomène de quorum sensing dont il a été montré qu'il jouerait un rôle dans le contrôle des agents pathogènes serait liée à l'inoculation massive de la bactérie (Wei et Zhang, 2006). En effet ce phénomène permet aux microorganismes de coordonner leur réponse et leur densité à leur environnement grâce à un dialogue moléculaire (Shiner, 2005). ii) L'inoculation à forte dose correspond à un apport massif de formulant. Il constitue le composant majeur d'un produit formulé à base de microorganisme. Si la valeur nutritive du formulant est attractive pour le microorganisme pathogène, il est possible qu'à forte dose le produit favorise l'agent pathogène (Couteaudier et Alabouvette, 1990).

Le microorganisme qui s'est révélé le plus efficace appartient au genre bactérien *Bacillus*. Ce genre comprend plusieurs espèces comme l'espèce *B. thuringiensis* connue pour son activité antagoniste envers les insectes, ou comme *B. subtilis* ou *B. amyloliquefaciens*, utilisées contre les microorganismes phytopathogènes, (Schnepf et Crickmore, 1998; Schisler *et al.*, 2004; Cavaglieri *et al.*, 2005; Abdullah *et al.*, 2008). Les espèces de ce genre bactérien sont connues pour produire des molécules impliquées dans le mécanisme d'antibiose (Kim et Chung, 2004; Ongena et Jacques, 2008; Arguelles-Arias *et al.*, 2009). Wang *et al.* (2012) ont constaté que des composés antifongiques sont impliqués dans l'antagonisme d'une souche de *B. amyloliquefaciens* contre *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. La souche que nous avons utilisée lors de notre essai a également été testée en confrontation avec Focy sur milieu gélosé et effectivement, un halo d'inhibition a pu être observé, ce qui suggère que l'antibiose est un des mécanismes ayant contribué à réduire l'activité infectieuse de Focy dans notre essai. L'utilisation d'une souche de *Bacillus* sp. pour lutter contre Focy n'a jamais été relatée dans la littérature.

De manière générale, ces premiers résultats ne permettent pas d'identifier clairement un agent de lutte biologique pour lutter efficacement contre la fusariose du cyclamen parmi les produits et combinaisons de produits testés. A l'exception du produit 5, les produits testés n'avaient jamais été éprouvés contre les fusarioses, et en particulier celle du cyclamen ; ils sont commercialisés en tant que biofertilisants ou agents de lutte contre d'autres agents pathogènes. Au même titre que la relation qui lie un microorganisme pathogène et sa gamme de plantes hôtes peut être plus ou moins spécifique, il est possible qu'un microorganisme antagoniste soit spécifique d'un microorganisme pathogène donné. Ainsi, le parasitisme des

agents de lutte biologique requiert la reconnaissance spécifique de l'agent pathogène hôte (Monteiro *et al.*, 2010; Daguerre *et al.*, 2014). Une étude a montré que les spores du mycoparasite *Sphaerodes mycoparasitica* germent principalement en présence d'un de ses hôtes, des espèces de *Fusarium* sp. (Goh et Vujanovic, 2010). En outre, les molécules antifongiques produites par un ALB agissent sur un spectre d'hôte plus ou moins limité (Otto-Hanson *et al.*, 2013).

Globalement, ces résultats soulignent les difficultés à surmonter pour évaluer l'efficacité de potentiels ALB. De nombreux facteurs influencent le développement de la maladie qu'ils soient abiotiques ou biotiques. La première condition pour évaluer l'efficacité d'ALB est de se placer dans des conditions permettant d'induire la maladie. Il est ensuite nécessaire de maîtriser les conditions d'application des ALB et de respecter les paramètres climatiques nécessaires au développement de la culture. Ainsi, ce travail apporte des premiers résultats concernant la lutte biologique contre la fusariose du cyclamen. De manière générale, les résultats obtenus sont préliminaires et nécessitent d'être confirmés. Un essai de confirmation est d'ailleurs prévu pour l'été 2016. Cet essai suivra les mêmes conditions (concentrations, rapports, souches de Focv et produits testés) que l'essai de confirmation mené en 2015.

L'exploitation des microorganismes déjà commercialisés semblait être une piste prometteuse pour la lutte contre la fusariose du cyclamen. Les résultats des essais nous invitent à plus de circonspection. Ils montrent notamment que tout microorganisme n'est pas forcément agent de lutte biologique de fait. Un certain nombre de conditions sont requises pour qu'un microorganisme soit sélectionné et exerce l'activité de contrôle pour laquelle il a été retenu. Dans notre cas, les produits testés n'avaient pas été sélectionnés pour lutter contre Focv en condition de culture horticole. Par ailleurs d'autres sources de produits de lutte biologique devraient être étudiées. L'étude bibliographique présentée dans le Chapitre I souligne que les sources de produits de lutte biologique sont particulièrement abondantes mais méconnues et trop peu exploitées. Les souches de *Fusarium* sp. endophytes du cyclamen ou les microorganismes isolés des graines de cyclamen pourraient constituer de bons candidats (Backman et Sikora, 2008). Il serait également intéressant de rechercher des substances naturelles ou des molécules élicitrices des défenses du cyclamen. Finalement, des combinaisons des différentes méthodes de lutte (biologique, chimique) devraient être testées, dans le but d'une part d'obtenir une efficacité de protection plus importante et d'autre part d'apporter une protection de la culture durant toute la période de production.



# Chapitre VI : Discussion générale et perspectives



## I. Discussion générale

Comme précisé dans l'introduction, la fusariose vasculaire est une des maladies les plus préoccupantes sur cyclamen. Pourtant les connaissances sur celle-ci sont limitées et de nombreuses questions restent en suspens, à commencer par les différentes sources potentielles de contamination au cours du cycle de culture. En effet, plusieurs supports de culture sont susceptibles d'abriter des propagules du pathogène au cours du cycle de culture, mais dans la plupart des cas, il ne s'agit que d'hypothèses. La contamination possible des graines de cyclamen divise les auteurs. Il est peu probable que le champignon puisse être présent dans la graine car il n'a jamais été isolé de fleurs ou de fruits de cyclamen (Grouet, 1985). En revanche, lorsque le fruit déhiscent s'ouvre, les graines sont en contact direct avec le sol ou le substrat, où elles peuvent être contaminées (Gerlach, 1954; Tompkins et Snyder, 1972; Rattink, 1982). Peu d'articles relatent la contamination de l'eau par des propagules de *Focv*. Les seules références relatent le risque relatif à l'utilisation de systèmes d'irrigation en circuit fermé ou de systèmes en subirrigation lorsque des plantes sont contaminées en culture (Grouet, 1985; Stelder, 1991; Minuto et Garibaldi, 1998). Aucune étude n'a été menée sur la propagation du champignon par des insectes vecteurs. Finalement, les sources de contamination sont mal connues. Une meilleure compréhension de ces risques de contamination permettrait d'adapter les mesures de prophylaxie et de lutte à mettre en place. Ces mesures sont peu nombreuses et d'une efficacité limitée. Dans ce contexte, la profession horticole est démunie et dans l'attente de solutions. C'est à ce niveau qu'intervient l'institut technique Astredhor, en lien direct avec les producteurs. Le projet FuCy a été développé dans le cadre d'une collaboration entre Astredhor, l'INRA et Agrene, pour répondre à l'attente des floriculteurs. L'objectif du projet était double : i) identifier un marqueur moléculaire spécifique de *Focv* pour permettre sa détection en production et mieux connaître les sources de contamination et ii) identifier un ou plusieurs agents de lutte biologique efficaces contre le pathogène. Pour répondre au premier objectif, une collection de souches de *Focv*, la plus vaste possible, a été constituée. La pathogénicité des souches a été évaluée et la diversité génétique de *Focv* a été caractérisée et a abouti à l'identification d'un outil de détection moléculaire spécifique de *Focv*. Avant d'être pleinement opérationnel, cet outil doit encore être validé par quelques tests en laboratoire et un essai en situation de production. Pour atteindre le second objectif, des tests de lutte biologique ont été menés pour identifier un ou plusieurs ALB efficaces parmi 7 produits déjà commercialisés. Un candidat semble prometteur mais là encore, une validation est nécessaire avant la mise à disposition auprès des producteurs.

Les difficultés rencontrées pour atteindre ces objectifs relèvent certes de la biologie de la plante et des contraintes liées à sa production mais aussi et surtout de la biologie et des caractéristiques particulières de l'agent pathogène responsable de la fusariose du cyclamen. En effet, jusqu'à présent nous avons essentiellement parlé de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*. L'espèce *F. oxysporum*, quant à elle, comprend une telle diversité de génotypes que l'on parle du complexe d'espèces *F. oxysporum* (Fosc) (O'Donnell *et al.*, 2009). Le mot-clé qui la caractérise est assurément «diversité», qu'il soit question de sa biologie, de son écologie, de sa

pathogénicité ou de sa génétique. *F. oxysporum* est une espèce passionnante à bien des égards. Ainsi, l'espèce regroupe une grande diversité de souches pathogènes de plantes, de souches «non pathogènes», de souches endophytes ou même de souches pathogènes opportunistes de l'homme. De plus, l'espèce se caractérise par une grande plasticité écologique puisque le champignon est isolé de niches écologiques diverses et variées (Sangalang *et al.*, 1995; Latiffah *et al.*, 2010; Manshor *et al.*, 2012; Sautour *et al.*, 2012). Les souches de *F. oxysporum* sont principalement saprophytes et sont capables de survivre dans le sol pendant de nombreuses années. Les souches pour lesquelles aucune plante hôte n'a été identifiée sont dites «non pathogènes». Certaines d'entre elles ont d'ailleurs été fortement étudiées pour leur activité antagoniste contre des microorganismes phytopathogènes incluant des souches de *F. oxysporum* (Alabouvette *et al.*, 1993, 2007, 2009). Certaines souches sont capables de pénétrer dans les racines de plantes, d'atteindre le cylindre central, plus particulièrement le xylème, et d'induire des symptômes tandis que d'autres souches n'atteignent pas le xylème et restent endophytes (Olivain et Alabouvette, 1999). Il est ainsi possible d'isoler, d'une espèce de plante, des souches de *F. oxysporum* pathogènes ou non pathogènes, comme cela a été montré chez la tomate et plus récemment chez le cyclamen (Demers 2015). Le caractère pathogène des isolats obtenus doit alors être attesté par vérification de leur virulence sur plante. Ce sont les raisons pour lesquelles la constitution d'une collection représentative de la diversité des populations pathogènes de la plante hôte d'intérêt est capitale pour entreprendre toute étude relative au pathosystème. Les souches de *F. oxysporum* phytopathogènes sont caractérisées par une grande spécificité d'hôte et organisées en formes spéciales et races. Cependant dans certains cas, la relation qui lie une forme spéciale à sa plante hôte n'est pas spécifique d'une espèce végétale mais plutôt d'une famille végétale. C'est par exemple le cas de la famille des Solanacées et de celles des Astéracées (Clark *et al.*, 1998; Palmero *et al.*, 2014). Il est important de noter que la forme spéciale ne désigne pas un rang taxonomique inférieur à l'espèce mais permet d'ordonner des souches selon leur aptitude à être pathogène d'une plante donnée (Gordon et Martyn, 1997). De plus, la grande diversité écologique de *F. oxysporum* ne se traduit pas par des différences morphologiques entre souches. Ainsi, rien ne ressemble plus à une souche non pathogène de *F. oxysporum* qu'une souche phytopathogène de la même espèce. La technique principalement employée pour identifier une forme spéciale est le test de pathogénicité sur sa plante hôte. L'accessibilité grandissante aux séquences d'ADN et à l'étude de parties ciblées des génomes, depuis l'introduction de la PCR en 1986 (Mullis *et al.*, 1986), a nourrit l'espoir de s'affranchir de cette contrainte. Ainsi, les marqueurs moléculaires (régions codantes ou non codantes du génome) de *F. oxysporum* sont utilisés pour étudier sa phylogénie, pour caractériser sa diversité génétique et pour rechercher une partie du génome spécifique d'une souche ou d'un groupe de souches (Edel *et al.*, 2001; Lievens *et al.*, 2012; Southwood *et al.*, 2012). De nombreuses études ont ainsi révélé que le pouvoir pathogène des formes spéciales est souvent polyphylétique et parfois monophylétique. L'origine multiple du pouvoir pathogène d'une forme spéciale laisse présager que cette dernière est caractérisée par une grande diversité génétique. C'est le cas des formes spéciales *cubense*, *eustomae* (Abo *et al.*, 2005; Bertoldo *et al.*, 2015) et *cyclaminis* avec notre étude. Plus généralement, cette grande

variabilité génétique est soulignée par de nombreuses études portant sur *F. oxysporum* (Edel *et al.*, 2001; Lori *et al.*, 2004; Laurence *et al.*, 2012) qui confirment que la forme spéciale peut regrouper des souches génétiquement distantes. Ces études portent principalement sur une seule forme spéciale correspondant au pathosystème d'intérêt. Cependant certaines études incluant des souches appartenant à différentes formes spéciales ont montré que des souches de formes spéciales différentes pouvaient être génétiquement proches (O'Donnell *et al.*, 2009). Ainsi une souche de *F. oxysporum* pathogène de la banane peut être génétiquement plus proche d'une souche de *F. oxysporum* pathogène de l'œillet que d'une autre souche pathogène de la banane (Baayen *et al.*, 2000). Par ailleurs, les premières études portant sur le génome de souches phytopathogènes de *F. oxysporum* révèlent que près de 4 % des séquences sont des éléments transposables (Ma *et al.*, 2010). Ces derniers, qui jouent un rôle majeur dans le dynamisme évolutif des génomes, sont majoritairement retrouvés dans des régions génomiques propres à *F. oxysporum* et absentes des génomes des autres espèces de *Fusarium* (Kazazian, 2004; Ma *et al.*, 2010). Ces régions font parties du «accessory genome» du champignon, par opposition aux régions génomiques conservées entre espèces de *Fusarium*. Ce génome «accessoire» serait acquis par transfert horizontal entre souches et serait à l'origine de l'émergence de nouvelles souches pathogènes de plantes (Ma, 2014; Ma *et al.*, 2010). De plus, la multiplicité des échanges de matériel végétal dans le monde, engendrée par la mondialisation, contribue à la dispersion des souches phytopathogènes. La description de cette diversité s'impose donc comme un préalable nécessaire à la recherche d'un marqueur moléculaire permettant d'identifier une forme spéciale. Ceci requiert la collecte de souches d'origines géographiques variées pour garantir l'universalité de l'outil qui sera développé. C'est pourquoi, durant ces travaux, nous nous sommes attachés à constituer une collection la plus cosmopolite possible de souches de Focv. Celle-ci comprend 74 souches associées à la fusariose du cyclamen qui proviennent de 9 pays différents, dont 5 européens.

Les marqueurs moléculaires que nous avons choisi d'utiliser pour identifier les souches et décrire la diversité génétique de la forme spéciale (ITS, *EF-1 $\alpha$*  et IGS) sont largement utilisés dans la littérature. L'ITS, défini comme le code-barres fongique, est classiquement utilisé pour l'identification taxonomique de souches fongiques. Dans le cas de *Fusarium*, les séquences de l'ITS ne sont pas assez polymorphes pour différencier certaines espèces proches (O'Donnell et Cigelnik, 1997). Les séquences du gène codant l'*EF-1 $\alpha$*  nous ont permis de confirmer l'identification spécifique. De nombreux marqueurs moléculaires existent et sont souvent combinés, comme le montre une étude de 2014 utilisant 32 marqueurs génétiques différents pour étudier la forme spéciale *ciceris* (Demers *et al.*, 2014). L'*EF-1 $\alpha$*  est, au même titre que l'IGS, l'un des marqueurs moléculaires les plus utilisés et les plus efficaces pour décrire la diversité génétique de *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 2009; Demers *et al.*, 2015). En revanche, la taille des séquences de l'IGS utilisée diffère d'une étude à l'autre (Silva *et al.*, 2014). Pour Focv, nous avons décidé d'utiliser les séquences pleines longueurs de l'IGS. L'utilisation de ces deux marqueurs moléculaires a révélé qu'une grande diversité génétique caractérise la forme spéciale *cyclaminis*. Nous avons décrit une diversité plus importante que celle décrite dans la

littérature sans avoir recours aux VCG, technique très discriminante mais très chronophage (Woudt *et al.*, 1995; Lori *et al.*, 2012).

Pour identifier un marqueur moléculaire présent uniquement chez Focy, nous avons pris le risque d'utiliser une technique moléculaire de recherche aléatoire de polymorphisme entre séquences d'ADN. En effet, les gènes impliqués dans la pathogénicité représenteraient des cibles idéales pour développer un outil de détection. Malheureusement les déterminants génétiques du pouvoir pathogène de *F. oxysporum* ne sont pas identifiés. Les études les plus avancées portent sur la forme spéciale *lycopersici* (Rep, 2005; Ma *et al.*, 2010). Elles ont mis à jour un groupe de protéines nommées SIX et des chromosomes surnuméraires qui sont impliqués dans la pathogénicité. Hormis pour la forme spéciale *lycopersici*, la définition d'un outil de détection spécifique d'une forme spéciale ne peut pas se baser sur les déterminants génétiques du pouvoir pathogène (Rep *et al.*, 2004). La stratégie adoptée dans notre étude repose donc sur une amplification aléatoire d'ADN jusqu'à obtention d'un fragment spécifique permettant de définir des amorces spécifiques de Focy. Cette stratégie nous a permis de mettre au point un outil spécifique de la forme spéciale utilisable en PCR classique et en PCR en temps réel. Des outils de détection spécifiques sont par exemple disponibles pour les formes spéciales *cucumerinum*, *radicis-cucumerinum*, et *vasinfectum* (Assigbetse *et al.*, 1994; Lievens *et al.*, 2007) et peuvent permettre de détecter le champignon cible dans le sol ou la plante (Garcia-Pedrajas *et al.*, 1999; Alves-Santos *et al.*, 2002). Cependant, le nombre d'outil développés reste marginal par rapport à la diversité des souches de *F. oxysporum* phytopathogènes. Malgré la grande diversité génétique de Focy, nous avons identifié un marqueur moléculaire commun aux différents groupes génétiques de la forme spéciale. La comparaison de la séquence de ce fragment, avec les génomes de *F. oxysporum* disponibles dans les bases de données révèle que la séquence est également présente chez d'autres souches de *F. oxysporum* phytopathogènes et non pathogènes. Les séquences de bases de données sont fortement similaires et codent pour une protéine non identifiée. Ce fragment ne serait donc pas lié à la spécificité d'hôte de Focy. Cependant, les différences de séquences présentes uniquement chez Focy nous ont permis de définir un couple d'amorces spécifiques de la forme spéciale. Les faibles différences nucléotidiques spécifiques de Focy pourraient donc être liées à la spécificité d'hôte de la forme spéciale.

Lorsqu'il est question du pouvoir pathogène des formes spéciales de *F. oxysporum*, à nouveau l'emploi du mot «diversité» est de rigueur. La gamme de plantes hôtes de l'espèce est très variée, incluant des plantes de grande culture (coton, banane), des plantes ornementales (cyclamen, lys, œillet), des plantes maraîchères (basilic, melon, tomate) et même une plante parasite (orobanche). Ainsi, plus de 150 formes spéciales et races de *F. oxysporum* sont décrites dans la littérature, auxquelles s'ajoutent les souches pathogènes non assignées à une forme spéciale. De plus, au sein d'une forme spéciale, des différences d'agressivité peuvent être constatées entre les souches. Sur lys, une grande gamme d'agressivité est observée parmi les 30 souches de *F. oxysporum* isolées de cette plante (Baayen *et al.*, 1998). L'agressivité varie de faible à forte selon la souche considérée mais également selon le niveau de sensibilité du cultivar utilisé (Löffler *et al.*, 1995). La même observation a été faite pour les formes spéciales

*cucumerinum* et *radicis-cucumerinum*, pathogènes du concombre, et la forme spéciale *lilii*, pathogène du lys (Löffler *et al.*, 1995; Vakalounakis *et al.*, 2004). Dans le cas de Focy, il faut tout d'abord rappeler qu'aucune source de résistance n'a été identifiée chez le cyclamen, bien que des différences de sensibilité existent (Orlicz-Luthardt, 1998). Cependant, une même souche de Focy évaluée sur deux cultivars différents ne montrera pas le même niveau d'agressivité. Il y aurait donc une interaction cultivar de cyclamen-souche de Focy reposant sur la sensibilité de la plante et l'agressivité de la souche et pouvant déterminer le niveau de la maladie. Cependant, les composantes végétales (réactions de défense) et microbiennes (définition des déterminants génétiques et de leur niveau d'expression) n'ont pour l'instant pas été étudiées pour ce pathosystème. En outre, la souche de *F. oxysporum* testée et le cultivar choisi ne sont certainement pas les seuls déterminants du résultat d'un test de pathogénicité. Les facteurs climatiques pourraient également influencer les résultats du test. Par exemple, il a été montré que certaines souches des formes spéciales *lycopersici* et *radicis-lycopersici*, pathogènes de la tomate, sont plus agressives lorsque leur pathogénicité est évaluée à 28 °C tandis que d'autres le sont plus à 24 °C (Edel-Hermann *et al.*, 2012). De manière similaire, la fusariose du cyclamen ne se déclarera pas ou très peu sans un stress hydrique et/ou thermique. En effet, Focy peut être latent dans le cyclamen sans induire de symptômes. L'augmentation du flux de xylème, stimulé par les conditions climatiques ou par le stade phénologique de la plante (redistribution des ressources nutritives pendant la floraison par exemple), favorise la progression du champignon dans les tissus conducteurs et accélère donc leur obstruction. L'expression de la pathogénicité des formes spéciales de *F. oxysporum* pourrait également dépendre des conditions culturales. Lorsque le pH de la solution nutritive est neutre ou proche de la neutralité, la sévérité de la maladie est moindre que celle observée à pH plus acide dans le cas du gerbera, de l'œillet et du lin (Duijff *et al.*, 1995; Minuto *et al.*, 2008). Le même résultat a été observé avec le pH du substrat pour le cyclamen (Gerlach *et al.*, 1997; Elmer et Daughtrey, 2012). Chez *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, le pH extracellulaire agit sur l'expression d'un facteur de transcription impliqué dans l'agressivité du champignon (Caracuel *et al.*, 2003a, 2003b). Ce même mécanisme pourrait être celui agissant dans le cas des autres formes spéciales.

Les plantes ornementales sont en général produites, non pas dans du sol en plein champ, mais dans des substrats de compositions diverses selon la plante, la région et les habitudes des producteurs. Ces substrats sont, malgré tout, des milieux complexes, rarement désinfectés et dont les caractéristiques biotiques et abiotiques déterminent le comportement de l'agent pathogène et celui des agents de lutte biologique (ALB) qui pourraient être introduits pour contrôler la maladie. Il est cependant possible de faire l'analogie avec ce qu'il se passe dans le sol et pour lequel, plus d'études ont été conduites et ont montré le rôle important que cet environnement joue dans l'expression d'une maladie. Ce rôle est d'autant plus important que l'agent pathogène est tellurique. Qui plus est, les composantes physico-chimique et biologique d'un sol ont longtemps été étudiées pour comprendre la résistance de certains sols aux fusarioses. Un sol est dit «résistant» à une maladie lorsque l'incidence de la maladie y est faible malgré la présence de l'agent pathogène (Baker and Cook, 1974). L'étude des populations

microbiennes antagonistes d'un sol résistant a contribué au développement des moyens de lutte biologique. L'apport exogène d'un microorganisme, qu'il soit pathogène ou antagoniste va modifier les rapports et les interactions entre microorganismes. Le formulant utilisé pour introduire le microorganisme peut parfois apporter des nutriments favorables au développement de l'ALB et à celui des communautés microbiennes de la rhizosphère. Le formulant peut également apporter des éléments fertilisants favorables au développement des plantes. La résultante des composantes biologique et physico-chimique d'un sol, des caractéristiques génétiques de la plante et de l'agent pathogène, ainsi que des conditions climatiques va déterminer le développement de la maladie. Ceci explique la variabilité des résultats ou parfois la faible efficacité qui peut être obtenue avec un ALB en conditions non contrôlées. Cependant, la qualité de l'inoculum (production en masse et formulation) permet d'améliorer les performances antagonistes de l'ALB ou, du moins, de limiter la variabilité de son efficacité (Alabouvette *et al.*, 2001). La littérature sur la lutte biologique contre les souches phytopathogènes de *F. oxysporum* est riche (Fravel *et al.*, 2003; Olivain et Trouvelot, 2003; Olivain *et al.*, 2004). Ainsi, de nombreuses souches microbiennes ont été évaluées quant à leurs aptitudes antagonistes, incluant beaucoup de souches «non pathogènes» de l'espèce (Alabouvette *et al.*, 2009). Ces dernières agissent par compétition spatiale ou nutritive, ou par induction des réactions de défenses de la plante (Lemanceau *et al.*, 1993; Eparvier et Alabouvette, 1994; Olivain *et al.*, 1995; Aimé *et al.*, 2013). Concernant Focy, les premiers résultats obtenus avec les différents microorganismes évalués sont encourageants mais des efforts restent à fournir pour obtenir un contrôle efficace et durable. La meilleure efficacité de contrôle est obtenue avec une souche bactérienne. De manière générale, la lutte biologique contre les souches pathogènes de *F. oxysporum* permet de diminuer l'impact de la maladie ou de la retarder, mais certainement pas de contrôler totalement la maladie. C'est la raison pour laquelle cette méthode de lutte doit s'inscrire dans un système de lutte intégrée.

Le premier test de lutte biologique que nous avons mené a donné des résultats peu discriminants, ce qui n'a pas facilité la sélection des microorganismes à conserver pour la suite des tests. En effet, juste après l'inoculation, les conditions météorologiques (hygrométrie élevée et température peu élevée) n'ont pas favorisé le développement de la maladie, notamment dans les témoins positifs. De manière similaire, l'incidence de la maladie était faible lors de l'essai de confirmation mené à Mont-Saint-Aignan. En revanche, lors de l'essai de confirmation mis en place à Bretenière la même année, la maladie s'est déclarée et un des produits testés s'est montré efficace. Cependant, pour le premier essai comme pour ceux qui ont suivi, nous avons décidé d'évaluer l'efficacité des produits dans des conditions proches de celles de production. Les essais ont été menés en serre dans des conditions partiellement contrôlées, c'est-à-dire avec des graines de cyclamen qui n'ont pas été nettoyées avant la mise en place des essais, un substrat non stérile, l'apport de solution nutritive non stérile et l'irrigation à l'eau du robinet. Sachant que le développement de la maladie est multi-facteurs dépendant, l'utilisation de telles conditions était un pari risqué. Nous avons donc exploité les résultats de tests de pathogénicité (non présentés) réalisés en 2013 pour optimiser le protocole et définir une échelle de notation. En outre, les produits que nous avons évalués étant déjà

commercialisés, la production des microorganismes et la formulation sont optimisées pour obtenir la meilleure efficacité des microorganismes. De plus, le but de ces tests était de fournir un produit utilisable à la fin de l'essai, il était donc important de tester ces produits dans des conditions proches de celles dans lesquelles ils seront utilisés. Par ailleurs, la mise en place d'un test en serre est très chronophage puisqu'au moins 6 à 7 mois séparent le semis de la fin de l'essai. Il n'est pas possible de raccourcir les essais puisqu'ils sont dépendants de la plante étudiée.

## II. Perspectives

Le travail de thèse s'inscrivait dans le cadre d'un projet CASDAR avec pour objectif très appliqué de pouvoir fournir des réponses utilisables rapidement par les producteurs qui souffrent réellement d'une absence de moyens de lutte pour contrôler la fusariose du cyclamen. Les résultats présentés dans ce manuscrit permettent de répondre en partie aux objectifs fixés initialement. Certains travaux engagés nécessitent d'être poursuivis, ces perspectives à court terme sont présentées ci-dessous.

- L'outil moléculaire que j'ai développé permet une détection du pathogène en PCR classique et en PCR en temps réel. Cependant, l'efficacité des réactions en PCR en temps réel n'est pas satisfaisante. Un travail d'optimisation de l'amplification sera réalisé en faisant varier des paramètres tels que la concentration en amorces du mélange réactionnel. Le seuil de détection de l'ADN de champignon dans différents substrats (eau, substrat, graine, tubercule) et au cours d'une cinétique de développement de la maladie sera déterminé. Enfin, l'efficacité de cet outil pourrait être validée par une série de tests sur des échantillons provenant de la production (plantes, eau, substrat, supports de culture). A l'issue de l'optimisation et de la définition de ses limites de détection, l'outil sera à la disposition des laboratoires de diagnostic interagissant avec la profession horticole. Les producteurs pourront alors faire appel à ces laboratoires pour détecter un risque, sur plante ou sur des supports de culture, et adapter en conséquence les moyens de lutte à déployer en culture.

- Les deux essais de lutte biologique mis en place durant cette thèse ont permis d'obtenir des résultats préliminaires. Bien que les résultats de tels tests dépendent de nombreux facteurs, un agent de lutte biologique a montré des résultats prometteurs. Il apparaît nécessaire de répéter ce test de lutte biologique. Une répétition de ce test est d'ailleurs d'ores et déjà programmée pour l'été 2016 et aura lieu à Mont-Saint-Aignan. Les ou les produits identifiés à l'issue de ces tests pourraient rapidement venir s'ajouter aux moyens de lutte disponibles pour les producteurs. Par ailleurs, d'autres sources d'agents de lutte biologique restent à exploiter. Les souches de *Fusarium* sp. non pathogènes et endophytes du cyclamen pourraient être de bons candidats au même titre que les microorganismes isolés des graines de cyclamen.

## Chapitre VI : Discussion générale et perspectives

Néanmoins, la problématique de la fusariose du cyclamen peut s'élargir à celle des fusarioses des plantes ornementales, voire aux fusarioses d'une manière générale. S'inscrire dans cette problématique permet d'envisager des perspectives à long terme dans un objectif finalisé, telles que la sélection d'agents de lutte biologique, l'amélioration de la sélection variétale, ou encore la définition d'indicateurs de l'état sanitaire de la production et de son environnement. La recherche de solutions de lutte face aux fusarioses requiert des connaissances plus académiques qui relèvent de la biologie des organismes interagissant avec le pathosystème. Ainsi, l'étude des génomes des *F. oxysporum* pathogènes et non pathogènes pourrait permettre d'identifier les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène, et ceux impliqués dans l'antagonisme. Plus globalement, ce type d'étude permettrait d'asseoir nos connaissances relatives à Fosc, ce complexe d'espèces à la plasticité écologique remarquable (cf. chapitre d'ouvrage présenté en Annexe 10). Les perspectives envisagées à long terme qu'ouvrent mes travaux de thèse sont présentées ci-dessous.

Les sources de microorganismes ou substances de lutte biologique sont infinies. Les microorganismes antagonistes et leurs modes d'action sont étudiés depuis de nombreuses années, tandis que les substances naturelles n'ont reçu que peu d'attention. La définition qui en est donnée dans les textes européens reste d'ailleurs très vague. De plus, les démarches européennes aboutissant à la mise sur le marché des produits de lutte biologique agissent comme un frein à leur commercialisation. Pourtant, dans un contexte où l'utilisation des produits de lutte se veut compatible avec le développement durable, les solutions de lutte biologique offrent des perspectives attrayantes, notamment pour lutter contre les fusarioses. Des verrous administratifs et scientifiques restent donc à franchir.

Dans ce contexte, les mécanismes d'action des substances naturelles sur les microorganismes phytopathogènes, leur spécificité d'action et leur stabilité dans l'environnement nécessitent d'être étudiés. La majorité des études sur l'activité antimicrobienne de ces molécules a porté sur des pathogènes humains ou des microorganismes se développant dans les produits alimentaires. Le potentiel antimicrobien de ces cocktails de molécules est largement sous-exploité en agriculture. En outre, l'efficacité de ces substances est rarement testée *in vivo*. Considérant que les substances naturelles n'ont jamais été testées contre Focy et que les moyens de lutte contre ce pathogène sont peu nombreux, l'efficacité de ces produits contre ce pathogène devraient être évaluée au cours d'un essai en serre. Les produits les plus couramment utilisés, comme certaines huiles essentielles (*Citrus*, clou de girofle, menthe, thym) pourraient notamment être sélectionnés dans un premier temps.

Cependant, l'efficacité de la lutte biologique est limitée et doit s'inscrire dans un système de lutte intégrée. Pour lutter contre les fusarioses en général et celle du cyclamen en particulier, la sélection variétale constitue l'un des meilleurs moyens de lutte sous réserve d'identifier des sources de résistances chez la plante hôte. Chez le cyclamen, peu d'études ont été menées concernant l'identification de sources de résistances à la maladie chez la plante. La

pléidie rencontrée au sein du genre *Cyclamen* complique d'autant plus le problème, car certains croisements engendrent des hybrides non viables (Grey-Wilson, 1997). De plus, le cyclamen étant une plante d'ornement, le premier critère des sélectionneurs reste l'esthétique de la plante. L'amélioration de la sélection variétale du cyclamen nécessite donc de passer outre différents verrous. Cependant, la recherche de génotypes sauvages pourrait permettre d'identifier des sources de résistance, qui pourraient être utilisées pour développer des cultivars résistants. La caractérisation de la diversité (génétique et agressivité) de l'agent pathogène permettra certainement d'améliorer cette sélection et de mettre en évidence l'existence potentielle de *loci* affectant des caractères quantitatifs (QTL, quantitative trait loci).

La prophylaxie qui consiste à mettre en place des mesures visant à limiter le risque de contamination et de propagation de l'agent pathogène dans la serre au cours de la production, repose tout d'abord sur la vérification de l'état sanitaire des supports de culture. Pour les souches pathogènes de *F. oxysporum*, ces mesures de prévention nécessitent de pouvoir identifier spécifiquement les formes spéciales. Dans le cas plus particulier de la fusariose du cyclamen, malgré l'obstacle lié à la grande diversité intraspécifique de *F. oxysporum*, l'étude moléculaire a permis de développer un outil capable de détecter FocY dans différents types de substrats incluant des tubercules asymptomatiques. Il est également possible d'imaginer que cet outil permettra d'établir une certification sanitaire (relative au seuil de détection de l'outil) des graines et jeunes plants de cyclamen. Nous proposons de combiner cet outil avec des outils de détection d'autres pathogènes dont certains sont encore à développer, soit uniquement sur cyclamen soit plus globalement sur plantes d'ornement. Ces outils pourraient être proposés à des laboratoires de diagnostic et être combinés sous forme de puces à ADN pour faire un diagnostic sanitaire à un temps donné de la production horticole (culture et son environnement).

Par ailleurs, l'espèce *F. oxysporum* constitue un modèle d'étude idéal pour comprendre ce qui différencie une souche pathogène d'une souche antagoniste. L'avènement des nouvelles techniques de séquençage à haut débit démocratise l'accès aux séquences génomiques dans le cadre d'études génomiques d'envergure, comme le montre le «1000 fungal genomes project» du centre américain «Joint Genome Institute» (JGI, <http://jgi.doe.gov/>) qui vise à enrichir les connaissances sur la diversité des génomes fongiques. A plus petite échelle, des études comparatives de génomes de souches de *F. oxysporum* pathogènes et non pathogènes ont été menées (Ma *et al.*, 2013; Jonkers *et al.*, 2014; Ma, 2014). Cette même démarche pourrait être entreprise concernant les génomes et les transcriptomes de formes spéciales pathogènes de plantes ornementales, incluant différentes souches de FocY et des souches de *F. oxysporum* non pathogènes, endophytes ou non. Le but serait non seulement d'identifier les gènes impliqués dans la pathogénicité, mais également de mieux comprendre les déterminants de la spécificité d'hôte d'une forme spéciale. De façon similaire, les résultats de l'analyse des séquences générées pourraient permettre de comprendre ce qui différencie une souche pathogène d'une souche non pathogène endophyte. Enfin, cette étude participera à une meilleure compréhension des déterminants de l'antagonisme de certaines souches de *F.*

*oxysporum*. Ce type d'analyse permettrait plus globalement d'asseoir nos connaissances relatives à Fosc.

Nos objectifs initiaux étaient d'identifier un marqueur moléculaire spécifique de Focy et d'identifier un ou plusieurs ALB efficaces contre le pathogène. Les démarches entreprises au sein de l'UMR Agroécologie avec la participation active des différents partenaires (Astredhor, Arexhor, Agrene) et les conseils pertinents du comité de pilotage (Marie-Agnès Jacques de l'INRA d'Angers et Marc Bardin de l'INRA d'Avignon), nous ont permis d'atteindre ces objectifs. Des expérimentations en cours ou à venir permettront de corroborer et de compléter nos résultats actuels. La fusariose du cyclamen reste néanmoins une maladie complexe et les mécanismes de l'interaction plante-pathogène-agent de lutte biologique, régulés par les facteurs de l'environnement, sont loin d'être tous expliqués. Je pense que le travail réalisé dans le cadre de cette collaboration a ouvert des pistes prometteuses pour le contrôle de la fusariose du cyclamen. Je souhaite qu'il contribue à l'amélioration de la lutte contre ce pathogène et à une meilleure compréhension de la maladie.

# Références bibliographiques

## A

- Abadie, C., Edel, V., and Alabouvette, C. (1998) Soil suppressiveness to Fusarium wilt: influence of a cover-plant on density and diversity of Fusarium populations. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 643–649.
- Abdullah, M.T., Ali, N.Y., and Suleman, P., (2008) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Prot* **27**: 1354–1359.
- Abo, K., Klein, K.K., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Traore, D., and Steinberg, C. (2005) High genetic diversity among strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from cotton in Ivory coast. *Phytopathology* **95**: 1391–1396.
- Affre, L. (1996) Variation du système de reproduction et structuration génétique des populations chez quatre espèces du genre *Cyclamen* (Primulaceae).
- Affre, L., Thompson, J.D., and Debussche, M. (1995) The reproductive biology of the Mediterranean endemic *Cyclamen balearicum* Willk. (Primulaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **118**: 309–330.
- Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., and Olivain, C. (2013) The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**: 918–26.
- AIPH and Union Fleurs (2011) International statistics, Flowers and plants.
- Ajit, N.S., Verma, R., and Schanmugam, V. (2006) Extracellular chitinases of fluorescent *Pseudomonads* antifungal *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. *Curr. Microbiol.* **52**: 310–316.
- Alabouvette, C. and Cordier, C. (2011) Risks of microbial biocontrol agents and regulation: are they in balance? In, *Regulation of biological control agents*, pp. 157–174.
- Alabouvette, C., Edel, V., Lemanceau, P., Olivain, C., Recorbet, C., and Steinberg, C. (2001) Diversity and interactions among strains of *Fusarium oxysporum*: application to biological control. In, *Biotic interactions in plant pathogen associations*, pp. 131–157.
- Alabouvette, C., Heiling, U., and Cordier, C. (2012) Microbial control of plant diseases. In, *Beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment*, pp. 96–111.
- Alabouvette, C., La Broise, D., Lemanceau, P., Couteaudier, Y., and Louvet, J. (1987) Utilisation de souches non pathogènes de *Fusarium* pour lutter contre les fusarioses: situation actuelle dans la pratique. *EPPO Bull.* **17**: 665–674.
- Alabouvette, C., Lemanceau, P., and Steinberg, C. (1993) Recent advances in the biological control of Fusarium wilts. *Pestic. Sci.* **37**: 365–373.
- Alabouvette, C., Olivain, C., and Floriane, L. (2007) Using strains of *Fusarium oxysporum* to control Fusarium wilts: dream or reality? In, *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management*, pp. 157–177.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., and Steinberg, C. (2009) Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* **184**: 529–544.
- Alam, S.B., Benyelles, N.G., Dib, M.E.A., Djabou, N., Tabti, L., Paolini, J., et al. (2014) Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western Algeria against five fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Appl. Bot. Food Qual.* **87**: 56–61.
- Alves-Santos, F.M., Benito, E.P., Eslava, A.P., and Diaz-Minguez, J. (1999) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3335–3340.
- Alves-Santos, F.M., Ramos, B., García-Sánchez, M.A., Eslava, A.P., and Díaz-Minguez, J.M. (2002) A DNA-based procedure for *in planta* detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* **92**: 237–244.

## Références bibliographiques

- Antoun, H. and Prévost, D. (2006) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In, *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer Science & Business Media, pp. 1–38.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., *et al.* (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial cell factories* **8**: 63.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1950) Biological races of the *Fusarium* causing wilt of cowpea and soybeans. *Phytopathology* **40**: 181–193.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1971) Races of the Aster-wilt *Fusarium*. *Phytochemistry* **61**: 820–824.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1978) *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilts of the Cucurbitaceae. *Phytopathology* **68**: 19–28.
- Armstrong, G.M. and Armstrong, J.K. (1981) *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In, *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. pp. 391–399.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., and Billington, R.V. (1975) *Fusarium oxysporum forma specialis voandzeiae*, a new form species causing wilt of Bambarra groundnut. *Mycologia* **67**: 709–714.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., and Littrell, R.H. (1970) Wilt of *Chrysanthemum* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, *forma specialis* nov. *Phytopathology* **60**: 496–498.
- Armstrong, G.M., Armstrong, J.K., and Netzer, D. (1978) Pathogenic races of the cucumber-wilt *Fusarium*. *Plant Dis. Report.* **62**: 824–828.
- Arzoo, K., Biswas, S.K., and Rajik, M. (2012) Biochemical evidences of defence response in tomato against *Fusarium* wilt induced by plant extracts. *Plant Pathol. J.* **11**: 42–50.
- Assigbetse, K.B., Fernandez, D., Dubois, M.P., and Geiger, J.-P. (1994) Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* **84**: 622–626.
- Atkinson, G. (1892) Some diseases of cotton.
- Authority, E. food safety (2012) Peer review of the pesticide risk assessment of the active. *EFSA J.* **10**: 266.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., *et al.* (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**: 426–436.

## B

- Baayen, R.P., Dreven, F. van, Krijger, M.C., and Waalwijk, C. (1997) Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**: 395–408.
- Baayen, R.P., Förch, M.G., Waalwijk, C., Bonants, P.J.M., Löffler, H.J.M., and Roebroeck, E.J.A. (1998) Pathogenic, genetic and molecular characterisation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**: 887–894.
- Baayen, R.P., O'Donnell, K., Bonants, P.J., Cigelnik, E., Kroon, L.P., Roebroeck, E.J., and Waalwijk, C. (2000) Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. *Phytopathology* **90**: 891–900.
- Baayen, R.P. and Rijkenberg, F.H.J. (1999) Fine structure of the early interaction of lily roots with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**: 431–443.
- Babič, M.N., Zalar, P., Ženko, B., Schroers, H.-J., Džeroski, S., and Gunde-Cimerman, N. (2015) *Candida* and *Fusarium* species known as opportunistic human pathogens from customer-accessible parts of residential washing machines. *Fungal Biol.* **119**: 95–113.

## Références bibliographiques

- Babu, G.D.K., Shanmugam, V., Ravindranath, S.D., and Joshi, V.P. (2007) Comparison of chemical composition and antifungal activity of *Curcuma longa* L. leaf oils produced by different water distillation techniques. *Flavour Fragr. J.* **22**: 191–196.
- Backman, P.A. and Sikora, R.A. (2008) Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control* **46**: 1–3.
- Baker, K.F. (1948) Fusarium wilt of garden stock (*Mathiola incana*). *Phytopathology* **38**: 399–403.
- Baker, K.F. (1953) Fusarium wilt of China Aster.
- Baker, K.F. and Cook, R.J. (1974) Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman and Company.
- Baker, R. (1968) Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **6**: 263–294.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem. Toxicol.* **46**: 446–475.
- Bald, J.G., Suzuki, T., and Doyle, A. (1971) Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* to Easter lily, *Narcissus* and *Gladiolus*. *Ann. Appl. Biol.* **67**: 331–342.
- Barrera-Necha, L.L., Garduno-Pizana, C., Garcia-Barrera, L.J., Garduño-Pizaña, C., and Garcia-Barrera, L.J. (2008) *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathol. J.* **8**: 17–21.
- Baser, K. and Buchbauer, G. (2009) Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition CRC Press.
- Bassi, A.J. and Goode, M.J. (1978) *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* seedborne in spinach. *Plant Dis. Report.* **62**: 203–205.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K., and Kaur, S. (2008) Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *For. Ecol. Manage.* **256**: 2166–2174.
- Beale, R. and Pitt, D. (1990) Biological and integrated control of Fusarium basal rot of *Narcissus* using *Minimedusa polyspora* and other micro-organisms. *Plant Pathol.* **39**: 477–488.
- Beale, R. and Pitt, D. (1995) The antifungal properties of *Minimedusa polyspora*. *Mycol. Res.* **99**: 337–342.
- Beardsell, D. and Nichols, D. (1981) Capillary mat watering for indoor plants. *Australian horticulture* **79**: 74–76.
- Ben Marzoug, H.N., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., et al. (2010) *Eucalyptus (gracilis, oleosa, salubris, and salmonophloia)* essential oils: their chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities. *J. Med. Food* **13**: 1005–1012.
- Benhamou, N., Garand, C., and Goulet, A. (2002) Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4044–4060.
- Ben-Jabeur, M., Ghabri, E., Myriam, M., and Hamada, W. (2015) Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **94**: 35–40.
- Bennett, S. and Grimshaw, J. (1991) Cytological studies in *Cyclamen* subg. *Cyclamen* (Primulaceae). *Plant Syst. Evol.* **176**: 135–143.
- Bergman, B. (1965) Field infection of tulip bulbs by *Fusarium oxysporum*. *Netherlands J. Plant Pathol.* **71**: 129–135.
- Bertetti, D., Pensa, P., Ortu, G., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2015) First report of wilt and rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *echeveriae* on Mexican hens (*Echeveria tolimanensis*) in Italy. *Prot. delle Colt.* 36–39.
- Bertetti, D., Pensa, P., Poli, A., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2012) *Fusarium oxysporum*, new pathogen of *Crassula ovata* and *Cereus peruvianus monstrosus* grown in Italy. *Prot. delle Colt.* 31–32.

## Références bibliographiques

- Bertetti, D., Pensa, P., Poli, A., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2013) First report of wilt and rot caused by *Fusarium oxysporum* on crested molded wax agave (*Echeveria agavoides*) cultivated in Italy. *Prot. delle Colt.* 30–33.
- Bertoldo, C., Gilardi, G., Spadaro, D., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2015) Genetic diversity and virulence of Italian strains of *Fusarium oxysporum* isolated from *Eustoma grandiflorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* **141**: 83–97.
- Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., and Corbo, M. (2013) Ultrasound and antimicrobial compounds: a suitable way to control *Fusarium oxysporum* in juices. *Food Bioprocess Technol.* **6**: 1153–1163.
- Bhagyawant, S.S. (2016) RAPD-SCAR markers: an interface tool for authentication of traits. *J. Biosci. Med.* **4**: 1–9.
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M. (1983) An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiol. Plant Pathol.* **23**: 323–343.
- Blasdale, W. (1954) *Cyclamen persicum*: Its natural and cultivated forms.
- Boerema, G.H. and Hamers, M.E.C. (1988) Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 3a: Fungi on bulbs: Liliaceae. *Netherlands J. Plant Pathol.* **94**: 1–29.
- Boerema, G.H. and Hamers, M.E.C. (1989) Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 3b: Fungi on bulbs: Amaryllidaceae and Iridaceae. *Netherlands J. Plant Pathol.* **95**: 1–29.
- Bohn, G.W. and Tucker, C.M. (1940) Studies on *Fusarium* wilt of the Tomato. I. Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill, and its inheritance in hybrids. *Res. Bull. Missouri Agric. Exp. Stn.* **311**: 1–82.
- Bolckmans, K. (2008) Biocontrol files. *Canada's Bull. Ecol. pest Manag.* 1–10.
- Bongini, V. (1940) Note fitopatologiche. *Laboratorio Sperimentale Nazionale Ricerca Osserv Fitopatolog Torino* **18**: 1–34.
- Bosland, P.W. and Williams, P.H. (1987) An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility, and geographic origin. *Can. J. Bot.* **65**: 2067–2073.
- Bowers, J.H. and Locke, J.C. (2000) Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant Dis.* **84**: 300–305.
- Boyette, C., Abbas, H., and Connick, J.W.J. (1993) Evaluation of *Fusarium oxysporum* as a potential bioherbicide for sicklepod (*Cassia obtusifolia*), coffee senna (*C. occidentalis*), and hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). *Weed Sci.* **14**: 678–681.
- Bozin, B. and Mimica-Dukic, N. (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 1822–1828.
- Brayford, D. (1996) *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Mycopathologia* **133**: 47–48.
- Broadfoot, W. (1926) Studies on the parasitism of *Fusarium lini* Bolley. *Phytopathology* **16**: 951–978.
- Buchbauer, G. (2009) Biological activities of essential oils. In, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications, second edition.*, pp. 235–273.
- Bullock, S., Summerell, B.A., and von Richter, L. (1998) First record of vascular wilt of flannel flower caused by *Fusarium oxysporum*. *Australas. Plant Pathol.* **27**: 49–50.
- Burgess, L.W. (1981) General ecology of the Fusaria. In, *Fusarium: diseases, biology and taxonomy.*, pp. 225–235.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223–253.
- Bustin, S. and Nolan, T. (2013) Analysis of mRNA expression by real-time PCR. In, *Real-time PCR.*, pp. 51–88.

## C

- Caracuel, A., Casanova, C., Roncero, M., Di Pietro, A., and Romas, J. (2003a) pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-type Na<sup>+</sup>-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* **2**: 1246–1252.
- Caracuel, Z., Martínez-Rocha, A.L., Di Pietro, A., Madrid, M.P., and Roncero, M.I.G. (2005) *Fusarium oxysporum gas1* encodes a putative beta-1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **18**: 1140–1147.
- Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Espeso, E.A., González-Verdejo, C.I., García-Maceira, F.I., and Di Pietro, A. (2003b) The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* **48**: 765–779.
- Carver, C.E., Pitt, D., and Rhodes, D.J. (1996) Aetiology and biological control of Fusarium wilt of pinks (*Dianthus caryophyllus*) using *Trichoderma aureoviride*. *Plant Pathol.* **45**: 618–630.
- Catti, A., Pasquali, M., Ghiringhelli, D., Garibaldi, A., and Gullino, M.L. (2007) Analysis of vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* from *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*. *J. Phytopathol.* **155**: 61–64.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, M.I., Chulze, S., and Etcheverry, M. (2005) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Res. Microbiol.* **156**: 748–754.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. Ben, Rouabhia, M., Mahdouani, K., and Bakhrouf, A. (2007) The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother. Res.* **21**: 501–506.
- Chandel, S., Kaur, M., and Tomar, M. (2004) Effect of plant extracts against Fusarium wilt of carnation. *Indian Perfum.* **48**: 193–195.
- Chandrashekar, M. and Diriwaechter, G. (1983) Soft rot of cyclamen in Australia caused by *Erwinia carotovora* sp. *carotovora*. *Australas. Plant Pathol.* **12**: 60–62.
- Chatterjee, C. and Rai, J. (1974) Fusarium wilt of *Eruca vesicaria*: observation on comparative pathogenicity of some strains of *Fusarium oxysporum*. *Indian Phytopathol.* **28**: 309–311.
- Cheon, I., Oh, W., Park, J., and Kim, K. (2006) Long day and high photosynthetic photon flux promote the growth and the flowering of *Cyclamen persicum*. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **47**: 353–358.
- Chiasson, H., Delisle, U., Bostanian, N.J., and Vincent, C. (2008) Recherche, développement et commercialisation de Facin, un biopesticide d'origine végétale. Etude d'un cas de réussite en Amérique du Nord. In, *Biopesticides d'origine végétale 2ème édition.*, pp. 451–463.
- Chiocchetti, A., Sciaudone, L., Durando, F., Garibaldi, A., and Migheli, Q. (2001) PCR Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* on Basil. *Plant Dis.* **85**: 607–611.
- Cho, W. and Shin, H. (2004) List of plant diseases in Korea.
- Chohan, S., Atiq, R., Mehmood, M.A., Naz, S., Siddique, B., and Yasmin, G. (2011) Efficacy of few plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, the cause of corm rot of *Gladiolus*. *J. Medici* **5**: 3887–3890.
- Chung, W., Wu, R., Hsu, C., Huang, H., and Huang, J. (2011) Application of antagonistic rhizobacteria for control of Fusarium seedling blight and basal rot of lily. *Aust. Plant Pathol.* **40**: 269–276.
- Cianchetta, A.N. and Davis, R.M. (2015) Fusarium wilt of cotton: Management strategies. *Crop Prot.* **73**: 40–44.
- Cipriani, M., Stea, G., Moretti, A., Altomare, C., Mulè, G., and Vurro, M. (2009) Development of a PCR-based assay for the detection of *Fusarium oxysporum* strain FT2, a potential mycoherbicide of *Orobanche ramosa*. *Biol. Control* **50**: 78–84.
- Clark, C.A., Hyun, J.-W., and Hoy, M.W. (1998) Relationships among wilt-inducing isolates of *Fusarium oxysporum* from sweet potato and tobacco. *Plant Dis.* **82**: 530–536.

## Références bibliographiques

- CNIH (1986) Le cyclamen.
- Cohen, S. and Heald, F. (1941) A wilt and root rot of asparagus caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Plant Dis. Report.* **25**: 503–509.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., and Barka, E.A. (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4951–4659.
- Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S., Humber, R.A., Lumsden, R.D., *et al.* (1996) Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. *Biol. Control* **7**: 333–351.
- Cordova-Albores, L.C., Rios, M.Y., Barrera-Necha, L.L., and Bautista-Baños, S. (2014) Chemical compounds of a native *Jatropha curcas* seed oil from Mexico and their antifungal effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Ind. Crops Prod.* **62**: 166–172.
- Correll, J.C.C. (1991) The relationship between *formae speciales*, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**: 1061–1064.
- Correll, J.C.C., Klittich, C.J.R., and Leslie, J.F. (1987) Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **77**: 1640–1646.
- Costa, S.N., Bragança, C.A.D., Ribeiro, L.R., Amorim, E.P., Oliveira, S.A.S., Dita, M.A., *et al.* (2015) Genetic structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in different regions from Brazil. *Plant Pathol.* **64**: 137–146.
- Couteaudier, Y. (1990) Quantitative comparison of *Fusarium oxysporum* competitiveness in relation to carbon utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**: 261–267.
- Couteaudier, Y. and Alabouvette, C. (1981) *Fusarium* wilt diseases in soilless cultures. In, *Symposium on substrates in horticulture other than soils in situ* **126**, pp. 153–158.
- Correll, J.C. (1991) The relationship between *formae speciales*, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**: 1061–1064.
- Couteaudier, Y. (1990) Quantitative comparison of *Fusarium oxysporum* competitiveness in relation to carbon utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**: 261–267.
- Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 564–582.
- Crall, J. (1963) Physiologic specialization in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Phytopathology* **53**: 873.
- Crupi, F. and Rispoli, G. (2002) *Citrus* juices technology. In, *Citrus: the genus Citrus.*, pp. 77–113.
- Cuboni, G. (1908) Malattie di garofani prodotte da *Fusarium dianthi*. Relazione sulle malattie delle piante studiate durante il bienno.
- Cullings, K.W. (1992) Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol. Ecol.* **1**: 233–240.
- Cuvier, G. (1818) Dictionnaire des Sciences naturelles.

## D

- Dababat, A.E.F.A. and Sikora, R.A. (2007) Induced resistance by the mutualistic endophyte, *Fusarium oxysporum* strain 162, toward *Meloidogyne incognita* on tomato. *Biocontrol Sci. Technol.* **17**: 969–975.
- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., and Steinberg C. (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal Biology Reviews* **28**: 97–125.
- Dar, G., Beig, M., Ahanger, F., Ganai, N., and Ahangar, M. (2011) Management of root rot caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* in blue pine (*Pinus wallichiana*) through use of fungal antagonists. *Asian J. Plant Pathol.* **5**: 62–67.

## Références bibliographiques

- Dar, W., Beig, M., Ganie, S., Bhat, J., and Razvi, S. (2013) In vitro study of fungicides and biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *pini* causing root rot of Western Himalayan fir (*Abies pindrow*). *Sci. Res. Essays* **8**: 1407–1412.
- Daughtrey, M. and Tobiasz, M. (2004) Suppression of Fusarium wilt of cyclamen with bioantagonists and fungicides. In, *2005 APS annual meeting*. p. 168.
- Daughtrey M., Wick R., and Peterson J., (1995). Compendium of flowering potted plant diseases.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., *et al.* (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 414–430.
- Debussche, M. and Thompson, J.D. (2003) Habitat differentiation between two closely related Mediterranean plant species, the endemic *Cyclamen balearicum* and the widespread *C. repandum*. *Acta Oecologica* **24**: 35–45.
- Demers, J.E., Garzón, C.D., and Jiménez-Gasco, M.D.M. (2014) Striking genetic similarity between races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* confirms a monophyletic origin and clonal evolution of the chickpea vascular wilt pathogen. *Eur. J. Plant Pathol.* **139**: 309–324.
- Demers, J.E., Gugino, B.K., and Jiménez-Gasco, M.D.M. (2015) Highly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field-grown tomato plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 81–90.
- Di Pietro, A., García-MacEira, F.I., Méglecz, E., and Roncero, M.I. (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **39**: 1140–1152.
- Di Pietro, A. and Roncero, M.I. (1998) Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **11**: 91–98.
- Ding, J., Wu, Y., Zheng, H., Fu, W., Reardon, R., and Liu, M. (2006) Assessing potential biological control of the invasive plant, tree-of-heaven, *Ailanthus altissima*. *Biocontrol Sci. Technol.* **16**: 547–566.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., *et al.* (2011) *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 749–759.
- Duchesne, L.C., Peterson, R.L., and Ellis, B.E. (1988) Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and *Pinus resinosa* induces resistance to *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Bot.* **66**: 558–562.
- Duijff, B.J., Erkelens, A., Bakker, P.A.H.M., and Schippers, B. (1995) Influence of pH on suppression of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r. *J. Phytopathol.* **143**: 217–222.
- Duijff, B.J., Meijer, J.W., Bakker, P.A., and Schippers, B. (1993) Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Netherlands J. Plant Pathol.* **99**: 277–289.

## E

- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Recorbet, G., and Alabouvette, C. (2001) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**: 61–71.
- Edel-Hermann, V., Aimé, S., Cordier, C., Olivain, C., Steinberg, C., and Alabouvette, C. (2011) Development of a strain-specific real-time PCR assay for the detection and quantification of the biological control agent Fo47 in root tissues. *FEMS Microbiol. Lett.* **322**: 34–40.
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Mounier, A., and Steinberg, C. (2015) *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *J. Microbiol. Methods* **111**: 64–71.
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., and Steinberg, C. (2012) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and related species pathogenic on tomato in Algeria and other Mediterranean countries. *Plant Pathol.* **61**: 787–800.
- EFSA (2012) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Trichoderma asperellum* strain T34. *EFSA J* **10**:2666.

## Références bibliographiques

- Ehlers, R.-U. (2011) Regulation of biological control agents and the EU policy support action REBECA. In, *Regulation of biological control agents*, pp. 1–24.
- Elad, Y. and Baker, R. (1985) The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **75**: 1053–1059.
- Elliott, M. (2011) First Report of *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *palmarum* on Canary Island date palm in Florida. *Plant Dis.* **95**: 356.
- Elliott, M., Jardin, E. Des, O'Donnell, K., Geiser, D., Harrison, N., and Broschat, T. (2010) *Fusarium oxysporum* f. sp. *palmarum*, a novel *forma specialis* causing a lethal disease of *Syagrus romanzoffiana* and *Washingtonia robusta* in Florida. *Plant Dis.* **94**: 31–38.
- Elmer, W.H. (2001) Seeds as vehicles for pathogen importation. *Biol. Invasions* **3**: 263–271.
- Elmer, W.H. (2002) Influence of inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* and sodium chloride on cyclamen and the development of *Fusarium* wilt. *Plant Dis.* **86**: 389–393.
- Elmer, W.H. and Daughtrey, M. (2012) *Fusarium* wilt of Cyclamen. In, *Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops*, pp. 213–219.
- Elmer, W.H., Daughtrey, M., Rane, K., and Jimenez-Gasco, M.M. (2007) First report of *Fusarium* wilt of *Coreopsis verticillata* “Moonbeam” caused by *Fusarium oxysporum* in a Midwestern nursery. *Plant Dis.* **91**: 1519.
- Elmer, W.H. and Marra, R.E. (2015) First report of crown rot of bloodroot (*Sanguinaria canadensis*) caused by *Fusarium oxysporum* in the United States. *Crop Prot.* **73**: 50–59.
- Elmer, W.H. and McGovern, R.J. (2004) Efficacy of integrating biologicals with fungicides for the suppression of *Fusarium* wilt of cyclamen. *Crop Prot.* **23**: 909–914.
- Elmer, W.H. and O'Dowd, E. (2001) First report of *Fusarium* wilt of *Exacum affine* caused by *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis.* **85**: 1120.
- El-Mougy, N., Shaban, A., and Abdel-Kader, M. (2015) Evaluation of seed coating with some essential oils and bio-agents against root rot disease of faba bean. *Evaluation* **4**:
- Elzein, A., Brändle, F., Cadisch, G., Kroschel, J., Marley, P., and Thines, M. (2008) *Fusarium oxysporum* strains as potential *Striga mycoherbicides*: molecular characterization and evidence for a new *forma specialis*. *open Mycol. J.* **2**: 89–93.
- Engelhard, A.W. and Woltz, S.S. (1971) *Fusarium* wilt of *Chrysanthemum*: symptomatology and cultivar reactions. In, *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, pp. 351–354.
- Enya, J., Togawa, M., Takeuchi, T., Yoshida, S., Tsushima, S., Arie, T., and Sakai, T. (2008) Biological and phylogenetic characterization of *Fusarium oxysporum* complex, which causes yellows on *Brassica* spp., and proposal of *F. oxysporum* f. sp. *rapae*, a novel *forma specialis* pathogenic on *B. rapa* in Japan. *Phytopathology* **98**: 475–483.
- EPA, U. (2011) *Trichoderma asperellum* strain T34 (119209) Fact Sheet.
- Eparvier, A. and Alabouvette, C. (1994) Use of ELISA and GUS-transformed strains to study competition between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. *Biocontrol Sci. Technol.* **4**: 35–47.
- EU (2009a) Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. <http://eur-lex.europa.eu/search.html?qid=1456841738609&text=2009/128&scope=EURLEX&type=quick&lang=en>. Accessed January 2016.
- EU (2009b) Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. <http://eur-lex.europa.eu/search.html?qid=1456841000072&text=1107/2009&scope=EURLEX&type=quick&lang=en>. Accessed January 2016

## Références bibliographiques

European commission (2015) Civil Dialogue Group, Horticultural products, flowers and ornamental plants.

Ewald, A., Orlicz-Luthardt, A., Winkelmann, T., Schwenkel, H.G., and Cadic A. (2000) Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. × *Cyclamen purpurascens* Mill.: propagation, somaclonal variation, resistance to *Fusarium* wilt and suitability as an outdoor crop. In: *Proceedings of the Nineteenth International Symposium on Improvement of Ornamental Plants. Breeding ornamentals in the future: goals, genes, tools*, Angers, France, 27-30 July, 1998. 309–310.

## F

Fantino, M., Contarini, M., and Pasini, C. (1985) The behaviour of various products in controlling *Fusarium oxysporum* in *Ixia* spp. In, *IV International Symposium on Flower Bulbs* **177.**, pp. 473–476.

Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., and Rossman, A.Y. (1989) *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS press. APS Press.

Fernandez, D., Ouinten, M., Tantaoui, A., Geiger, J.P., Daboussi, M.J., and Langin, T. (1998) *Fot 1* insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 633–636.

Foster, V. (1955) *Fusarium* wilt of cattleyas. *Phytopathology* **45**: 599–602.

FranceAgriMer (2015a) Synthèse FranceAgriMer Toussaint 2014.

FranceAgriMer (2015b) Végétaux d'ornement: achats des ménages en 2014.

Fravel, D. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 337–359.

Fravel, D., Connick, J.W.J., and Lewis, J. (1998) Formulation of microorganisms to control plant diseases. In, Netherlands, S. (ed), *Formulation of microbial biopesticides*, pp. 187–202.

Fravel, D., Olivain, C., and Alabouvette, C. (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.* **157**: 493–502.

Fujinaga, M., Ogiso, H., Shinohara, H., Tsushima, S., Nishimura, N., Togawa, M., *et al.* (2005) Phylogenetic relationships between the lettuce root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* races 1, 2, and 3 based on the sequence of the intergenic spacer region of its ribosomal DNA. *J. Gen. Plant Pathol.* **71**: 402–407.

Fujinaga, M., Ogiso, H., Tuchiya, N., Saito, H., Yamanaka, S., Nozue, M., and Kojima, M. (2003) Race 3, a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* determined by a differential system with commercial cultivars. *J. Gen. Plant Pathol.* **69**: 23–28.

Fujinaga, M., Ogiso, H., Tuchiya, N., and Saito, H. (2001) Physiological specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, a causal organism of *Fusarium* root rot of crisp head lettuce in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **67**: 205–206.

Fuqua, C., Parsek, M., and Greenberg, E., (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual review of genetics* **35**: 439–468.

## G

Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M., and Golakiya, B. (2013) Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 133–142.

Garcia-Pedrajas, M.D., Baidridge, B.W., Heale, J.B., Perez-Artes, E., and Jimenez-Diaz, R.M. (1999) A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in artificial and natural soils. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**: 251–259.

## Références bibliographiques

- Gardes, M. and Bruns, T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**: 113–118.
- Gardner, D. (1980) *Acacia koa* seedling wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *koa*, f. sp. nov. *Phytopathology* **70**: 594–597.
- Garibaldi, A. (1977) Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and varietal susceptibility. *Acta Hortic.* **71**: 101.
- Garibaldi, A. (1981) Ulteriori ricerche sulla specializzazione biologica di *Fusarium oxysporum* Schlecht, f. sp. *dianthi* (Prill, et Del.) Snyd. et Hans. Riv. di Ortoflorofruttic. Ital. 353–358.
- Garibaldi, A. (1987) Research on substrates suppressive to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *Acta Hortic.* **221**: 271–277.
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Pensa, P., Ortu, G., and Gullino, M.L. (2015) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *echeveriae* causing wilt on *Echeveria tolimanensis* in Italy. *Plant Dis.* **99**: 1448.
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Pensa, P., Ortu, G., and Gullino, M.L. (2016a) First report of *Fusarium oxysporum* causing wilt of *Euphorbia mammillaris* var. *variagata* in Italy. *J. Plant Pathol.* **1**:
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Pensa, P., Ortu, G., and Gullino, M.L. (2016b) First report of stem rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* on *Mammillaria zeilmanniana* in Italy. *J. Plant Pathol.* **1**:
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Pensa, P., Poli, A., and Gullino, M.L. (2011a) First report of *Fusarium oxysporum* causing wilt on Jade plant (*Crassula ovata*) in Italy. *Plant Dis.* **95**: 1191.
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Pensa, P., Poli, A., and Gullino, M.L. (2013) First report of crown and stem rot of crested molded wax agave (*Echeveria agavoides*) caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. *Plant Dis.* **97**: 288.
- Garibaldi, A., Bertetti, D., Rapetti, S., and Gullino, M.L. (2011b) First report of a new *Fusarium oxysporum* causing carnation wilt in Colombia. *J. Plant Pathol.* **93**:
- Garibaldi, A., Brunatti, F., and Gullino, M.L. (1987) Evaluation of several antagonists and different methods of application against *Fusarium* wilt of carnation. *EPPO Bull.* **17**: 625–629.
- Garibaldi, A., Gilardi, G., and Gullino, M.L. (2003) First report of *Fusarium oxysporum* on *Eruca vesicaria* and *Diploaxis* spp. in Europe. *Plant Dis.* **87**: 201.
- Garibaldi, A., Gilardi, G., and Gullino, M.L. (2005) *Fusarium* wilt of Bitterroot (*Lewisia cotyledon*) in Italy caused by *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis.* **89**: 684.
- Garibaldi, A. and Gullino, M.L. (1985) Wilt of *Ranunculus asiaticus* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ranunculi forma specialis* nova. *Phytopathol. Mediterr.* **24**: 213–214.
- Garibaldi, A., Martini, P., Repetto, L., Odasso, M., Bertetti, D., Poli, A., and Gullino, M.L. (2012) First report of *Fusarium oxysporum* causing wilt on Iceland poppy (*Papaver nudicaule*) in Italy. *Plant Dis.* **96**: 1823.
- Garibaldi, A., Minuto, A., and Gullino, M.L. (1998) First report of *Fusarium* wilt on Paris daisy (*Argyranthemum [Dendranthema] frutescens*). *Plant Dis.* **82**: 1403.
- Garibaldi, A., Pensa, P., Bertetti, D., Ortu, G., and Gullino, M.L. (2014) First report of dry and soft rot of *Cereus marginatus* var. *crinata* caused by *Fusarium oxysporum* in Italy. *Plant Dis.* **98**: 1441.
- Gerlach, W. (1954) Untersuchungen über die Welkekrankheit des Alpenveilchens (Erreger: *Fusarium oxysporum* Schl. f. *cyclaminis* n. f.). *Phytopathol. Zeitschrift* **22**: 125–176.
- Gerlach, W. (1972) *Fusarium*-Fäule und andere pilzliche Krankheiten gärtnerisch wichtiger Kakteen in Deutschland). *J. Phytopathol.* **74**: 197–217.
- Gerlach, W., Kalthoff, F., and Fischer, P. (1997) High pH-values for wilt control. *Dtsch. Gartenbau.* 884–888.
- Gerlach, W.W.P. and Schubert, R. (2001) A new wilt of *Cyclamen* caused by *Phytophthora tropicalis* in Germany and The Netherlands. *Plant Dis.* **85**: 334.
- Germain, E.D.S.P. (1870) Nouveau dictionnaire de botanique.

## Références bibliographiques

- Gilardi, G., Sendhilvel, V., Garibaldi, A., and Gullino, M. (2008) Lamb's lettuce (*Valerianella olitoria*): new host of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *J. Plant Dis. Prot.* **115**: 229–233.
- Goh, Y. and Vujanovic, V. (2010) Ascospore germination patterns revealed ascomycetous biotrophic mycoparasite specificity to *Fusarium* hosts. *Botany* **88**: 1033–1043.
- Gordon, T.R. and Martyn, R.D. (1997) The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**: 111–128.
- Gordon, W. (1965) Pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Bot.* **43**: 1309–1318.
- Gouy M., Guindon S. and Gascuel O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution* **27**, 221–224.
- Granja, E., Benitez, S., and Sanjuanello, D. (2014) Effect of antagonists and plant extracts in the control of *Protea* wilt (*F. oxysporum*). *Am. J. Plant Sci.* **5**: 3203–3212.
- Grattidge, R. and O'Brien, R. (1982) Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Dis.* **66**: 165–166.
- Gregory, P. (1932) The *Fusarium* bulb rot of *Narcissus*. *Ann. Appl. Biol.* **19**: 475–514.
- Grey-Wilson, C. (1986) *Cyclamen purpurascens* Primulaceae. *Curtis's Bot. Mag.* **3**: 104–109.
- Grey-Wilson, C. (1988) The genus *Cyclamen*. *Kew Mag. Monogr.*
- Grey-Wilson, C. (1997) *Cyclamen: a guide for gardeners, horticulturists and botanists* BT Batsfor. London.
- Grey-Wilson, C. and Wilford, R. (1998) Plate 347. *Cyclamen colchicum*. *Curtis's Bot. Mag.* **15**: 180–185.
- Gross, D. and Leach, L. (1973) Stalk blight of sugarbeet seed crops caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae*. *Phytopathology* **63**: 1216.
- Grouet, D. (1985) La fusariose vasculaire du cyclamen. *Phytoma* **372**: 49–50.
- Gruyer, N., Dorais, M., Zagury, G.J., and Alsanius, B.W. (2013) Removal of plant pathogens from recycled greenhouse wastewater using constructed wetlands. *Agricultural Water Management* **117**: 153–158.
- Gullino, M.L. (2012) *Fusarium* wilts of bulb crops. In, *Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops.*, pp. 199–204.
- Gullino, M.L., Clini, C., and Garibaldi, A. (2005) Life without methyl bromide: the Italian experience in replacing the fumigant. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **70**: 13–25.
- Gullino, M.L., Daughtrey, M.L., Garibaldi, A., and Elmer, W.H. (2015) *Fusarium* wilts of ornamental crops and their management. *Crop Prot.* **73**: 50–59.
- Gullino, M.L., Katan, J., and Garibaldi, A. (2012) *Fusarium* wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops.
- Gullino, M.L., Minuto, A., Gilardi, G., and Garibaldi, A. (2002) Efficacy of azoxystrobin and other strobilurins against *Fusarium* wilts of carnation, cyclamen and Paris daisy. *Crop Prot.* **21**: 57–61.
- Gupta, R. and Vakhlu, J. (2015) Native *Bacillus amyloliquefaciens* W2 as a potential biocontrol for *Fusarium oxysporum* R1 causing corm rot of *Crocus sativus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **143**: 123–131.
- Gurjar, M.S., Ali, S., Akhtar, M., and Singh, K.S. (2012) Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agric. Sci.* **3**: 425–433.

## H

- Haan, D. and Doorn, V. (2000) PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* race 1, causal agent of Gladiolus yellows disease, from infected corms. *Plant Pathol.* **49**: 89–100.
- Hageskal, G., Knutsen, A., Gaustad, P., de Hoog, G., and Skaar, I. (2006) Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7586–7593.
- Haglund, W. and Kraft, J. (1970) *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, race 5. *Phytopathology* **60**: 1861–1862.

## Références bibliographiques

- Haglund, W. and Kraft, J. (1979) *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, race 6: Occurrence and distribution. *Phytopathology* **69**: 818–820.
- Haglund, W. and Pepin, H. (1987) Fusarium wilt of peas in British Columbia. *Can. J. Plant Pathol.* **9**: 59–62.
- Hahm, Y.I. (1998) Occurrence of Fusarium wilt on lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *eustomae*. *Korean J. Plant Pathol.* (Korea Republic).
- Hare, W. (1953) A new race of Fusarium causing wilt of cowpea. *Phytopathology* **43**: 291.
- Harman, G.E. (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **96**: 190–194.
- Harter, L. (1929) Fusarium disease of beans. *Phytopathology* **19**: 82.
- Harveson, R. and Rush, C. (1997) Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from sugar beet as determined by vegetative compatibility. *Plant Dis.* **81**: 85–88.
- Hassan, N., Elsharkawy, M.M., Shimizu, M., and Hyakumachi, M. (2014) Control of root rot and wilt diseases of roselle under field conditions. *Mycobiology* **42**: 376–384.
- Hauschild, R., Speiser, B., and Tamm, L. (2011) Regulation according to EU directive 91/414: data requirements and procedure compared with regulation practices in other OECD countries. In, Regulation of biological control agents., pp. 25–78.
- Haware, M.P. and Nene, Y.L. (1982) Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Dis.* **66**: 809–810.
- Hepting, G.H. (1939) A vascular wilt of the mimosa tree (*Albizzia julibrissin*).
- Hildebrand, F. (1898) Die Gattung *Cyclamen* L. Eine Systematische und biologische monographie.
- Hirano, Y. and Arie, T. (2006) PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Gen. Plant Pathol.* **72**: 273–283.
- Hirano, Y. and Arie, T. (2009) Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on nucleotide sequences of polygalacturonase genes. *Microbes Environ.* **24**: 113–120.
- Holmberg, A., Melin, M., Levendors, J., and Sundh, I. (2009) Development and evaluation of SCAR markers for a *Pseudomonas brassicacearum* strain used in biological control of snow mould. *Biol. Control* **48**: 181–187.
- Holmes, A., Govan, J., and Goldstein, R. (1998) Agricultural use of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*: a threat to human health? *Emerg. Infect. Dis.* **4**: 221.
- Holmes, E.A., Bennett, R.S., Spurgeon, D.W., Colyer, P.D., and Davis, R.M. (2009) New genotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from the Southeastern United States. *Plant Dis.* **93**: 1298–1304.
- <http://www.intracen.org/itc/sectors/floriculture/>
- Huang, C. and Lindhout, P. (1997) Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica* **93**: 145–153.
- Huang, H., Phillippe, L., Marshall, H., Coliicut, L., and Neish, G. (1992) Wilt of hardy *Chrysanthemum* caused by a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Plant Pathol.* **1**: 57–61.
- Huang, L.-W., Wang, C.-J., Lin, Y.-S., Chung, W.-C., and Chung, W.-H. (2014) Stem rot of Jewel orchids caused by a new forma *specialis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *anoectochili* in Taiwan. *Plant Pathol.* **63**: 539–547.
- Imamura, Y., Chandra, J., Mukherjee, P., Lattif, A., Szczołka-Flynn, B., Pearlman, E., et al. (2008) *Fusarium* and *Candida albicans* biofilms on soft contact lenses: model development, influence of lens type, and susceptibility to lens care solutions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 171–182.
- Imle, E.P. (1942) Bulb rot diseases of lilies.

- Intracen (2016) International trade centre, floriculture. <http://www.intracen.org/itc/sectors/floriculture/>. Accessed January 2016
- Ishizaka, H. (1994) Chromosome association and fertility in the hybrid of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton and its amphidiploid. *Breed. Sci.* **44**: 367–371.
- Ishizaka, H. (2003) Cytogenetic studies in *Cyclamen persicum*, *C. graecum* (Primulaceae) and their hybrids. *Plant Syst. Evol.* **239**: 1–14.
- Ishizaka, H. (2008) Interspecific hybridization by embryo rescue in the genus *Cyclamen*. *Plant Biotechnol.* **25**: 511–519.
- Ishizaka, H. and Uematsu, J. (1995) Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture. *Euphytica* **82**: 31–37.
- Isman, M.B. (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* **19**: 603–608.
- ISO (2013) ISO 9235:2013 Aromatic natural raw – vocabulary. [http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=51017](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=51017). Accessed January 2016

J

- Jacobson, D. and Gordon, T. (1988) Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* **78**: 668–672.
- Jagdale, G.B., Casey, M.L., Grewal, P.S., and Lindquist, R.K. (2004) Application rate and timing, potting medium, and host plant effects on the efficacy of *Steinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture. *Biol. Control* **29**: 296–305.
- Jain, S., Akiyama, K., Mae, K., Ohguchi, T., and Takata, R. (2002) Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **41**: 407–413.
- Jarvis, W. and Shoemaker, R. (1978) Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology* **68**: 1679–1680.
- Jiménez-Díaz, R., Alcalá-Jiménez, A., Hervás, A., and Trapero-Casas, J. (1993) Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*-*Cicer arietinum* pathosystem. In, the 3rd European Seminar on *Fusarium* mycotoxins, taxonomy, pathogenicity and host resistance., pp. 87–94.
- Jiménez-Díaz, R., Trapero-Casas, A., and de la Colina, J. (1989) Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* infecting chickpeas in southern Spain. In, Vascular wilt diseases of plants., pp. 515–520.
- Jiménez-Gasco, M. and Jiménez-Díaz, R.M. (2003) Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology* **93**: 200–209.
- Jiménez-Gasco, M., Milgroom, M., and Jimenez-Diaz, R. (2002) Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. *Plant Pathol.* **51**: 72–77.
- Joffe, A. and Palti, J. (1977) Species of *Fusarium* found in uncultivated desert-type soils in Israel. *Phytoparasitica* **5**: 119–122.
- John, R.P., Tyagi, R.D., Prévost, D., Brar, S.K., Pouleur, S., and Surampalli, R.Y. (2010) Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Prot.* **29**: 1452–1459.
- Johnson, J. (1921) *Fusarium*-wilt of tobacco. *J. Agric. Res.*
- Johnson, L.F., Curl, E.A., Bond, J.H., and Fribourg, H.A. (1960) Methods for studying soil microflora-plant disease relationships.

## Références bibliographiques

- Jones, K.A. and Burges, H.D. (1998) Technology of formulation and application. In, *Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*, pp. 5–30.
- Jonghe, de J. (1844) Monographie du genre *Cyclamen*, de sa culture et de sa multiplication.
- Jonkers, W., Xayamongkhon, H., Haas, M., Olivain, C., van der Does, H., Broz, K., *et al.* (2014) EBR1 genomic expansion and its role in virulence of *Fusarium* species. *Environ. Microbiol.* **16**: 1982–2003.

## K

- Kadoglidou, K., Lagopodi, A., Karamanoli, K., Vokou, D., Bardas, G.A., Menexes, G., and Constantinidou, H.-I.A. (2011) Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, and *Verticillium dahliae*. *Eur. J. plant Pathol.* **130**: 297–309.
- Kaiser, W., Alcalá-Jiménez, A., Hervás-Vargas, A., Trapero-Casas, J., and Jiménez-Díaz, R. (1994) Screening of wild *Cicer* species for resistance to races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Dis.* **78**: 962–967.
- Katan, J. (2000) Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. *Crop Prot.* **19**: 725–731.
- Katan, T. (1999) Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* **27**: 51–64.
- Katan, T. and Primo, P. Di (1999) Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*: supplement (1999). *Phytoparasitica* **27**: 273–277.
- Kazazian, H.H. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **303**: 1626–1632.
- Kawai, I., Suzuki, H., and Kawai, K. (1958) On the pathogenicity of the wilt *Fusarium* of the cucurbitaceous plants and their forms. *Shoznoka Agric. Exp. Stn. Bull.* **3**: 49–68.
- Kawano, T. (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep.* **21**: 829–837.
- Kelly, A., Bainbridge, B., Heale, J., Pérez-Artes, E. and Jiménez-Díaz, R. (1998) *In planta* polymerase chain reaction detection of the wilt inducing pathotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 397–409.
- Kessel, G., Haas, de B., Lombaers-van der Plas, C., Meijer, E., Dewey, F., Goudriaan, J., *et al.* (1999) Quantification of mycelium of *Botrytis* spp. and the antagonist *Ulocladium atrum* in necrotic leaf tissue of *Cyclamen* and *Lily* by fluorescence microscopy and image analysis. *Phytopathology* **89**: 868–876.
- Khare, M. (1981) Diseases of lentils.
- Khristova, E. (1958) New diseases on decorative plants in Bulgaria and their control. *Ovoshtarst & Gradinarst* **1**: 38–41.
- Killian, C. and Maire, R. (1930) “Baïoud”, a disease of the Date Palm. *Bull. la société d'histoire Nat. l'Afrique du Nord* **21**: 89–101.
- Kim, P.I. and Chung, K.C. (2004) Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS microbiology letters* **234**, 177–183.
- Kistler, H.C. (1997) Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **87**: 474–479.
- Kistler, H.C., Alabouvette, C., Baayen, R.P., Bentley, S., Brayford, D., Coddington, A., *et al.* (1998) Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **88**: 30–32.
- Kitazawa, K. (1989) *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *adzukicola* nf sp., a wilt fungus of *Phaseolus angularis*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **55**: 76–78.

## Références bibliographiques

- Klisiewicz, J. and Houston, B. (1962) Fusarium wilt of safflower. *Plant Dis. Report.* **46**: 748–749.
- Komada, H. (1975) Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* **8**: 114–124.
- Kommedhal, T., Abbas, H., Burnes, P., and Mirocha, C. (1988) Prevalence and toxigenicity of *Fusarium* spp. from soils of Norway near the Arctic Circle. *Mycologia* **80**: 790–794.
- Koul, O., Walia, S., and Dhaliwal, S.G. (2008) Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic. Int.* **4**: 68–84.
- Koyyappurath, S., Atuahiva, T., Le Guen, R., Batina, H., Le Squin, S., Gautheron, N., et al. (2015) *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. *Plant Pathol.* **65**: 612–625.

## L

- L'Haridon, F., Aimé, S., Duplessis, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., and Olivain, C. (2011) Isolation of differentially expressed genes during interactions between tomato cells and a protective or a non-protective strain of *Fusarium oxysporum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **76**: 9–19.
- Lagopodi, A., Ram, A., Lamers, G., Punt, P., Van den Hondel, C., Lugtenberg, B., and Bloemberg, G. (2002) Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 172–179.
- Lamarck, J.D. and Candolle, A.D. (1805) Flore française ou descriptions succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France.
- Lane, D. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115–176.
- Langerak, C.J. (1977) The role of antagonists in the chemical control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi*. *Netherlands J. Plant Pathol.* **83**: 365–381.
- Laskaris, T. (1949) Fusarium stem canker and wilt of delphinium. *Phytopathology* **39**: 913–919.
- Latiffah, Z., Mah Kok, F., Heng Mei, H., Maziah, Z., and Baharuddin, S. (2010) *Fusarium* species isolated from mangrove soil in kampung pantai acheh, balik pulau, pulau pinang, Malaysia. *Trop. life Sci. Res.* **21**: 21–9.
- Laurence, M.H., Burgess, L.W., Summerell, B.A., and Liew, E.C.Y. (2012) High levels of diversity in *Fusarium oxysporum* from non-cultivated ecosystems in Australia. *Fungal Biol.* **116**: 289–297.
- Leach, J. and Currence, T. (1938) Fusarium wilt of muskmelon in Minnesota. *Minnesota Agric. Exp. Stn. Bull.* 129.
- Lecomte, C., Edel-Hermann, V., Cannesan, M., Gautheron, N., Langlois, A., Alabouvette, C., et al. (2016) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*: underestimated genetic diversity. *Eur. J. plant Pathol.* **145**: 421–431.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A., De Kogel, W.J., Alabouvette, C., and Schippers, B. (1992) Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of Fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2978–2982.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A., De Kogel, W.J., Alabouvette, C., and Schippers, B. (1993) Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 74–82.
- Leslie, J.F. (1993) Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 127–150.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. (2006) The *Fusarium* laboratory manual.
- Li, R.-Y., Wu, X.-M., Yin, X.-H., Long, Y.-H., and Li, M. (2015) Naturally produced citral can significantly inhibit normal physiology and induce cytotoxicity on *Magnaporthe grisea*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **118**: 19–25.

## Références bibliographiques

- Li, Y., Garibaldi, A., and Gullino, M.L. (2010) Genetic variability analysis and molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *eustomae* isolated from *Eustoma grandiflorum* in northern Italy. *J. Phytopathol.* **158**: 546–553.
- Licata, M., Tuttolomondo, T., Dugo, G., Ruberto, G., Leto, C., Napoli, E.M., *et al.* (2015) Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian oregano biotypes. *J. Essent. Oil Res.* **27**: 293–306.
- Lievens, B., Claes, L., Vakalounakis, D.J., Vanachter, A.C.R.C. and Thomma, B.P.H.J. (2007) A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environ. Microbiol.* **9**: 2145–2161.
- Lievens, B., Hanssen, I.M., and Rep, M. (2012) Recent developments in the detection and identification of *formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum*: from pathogenicity testing to molecular diagnostics. In, Gullino, M.L., Katan, J., *et* Garibaldi, A. (eds), *Fusarium wilts of greenhouse vegetable ornamental crops*, pp. 47–55.
- Lievens, B., Rep, M., and Thomma, B.P.H.J. (2008) Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. **788**: 781–788.
- Lin, Y., Du, D., Si, C., Zhao, Q., Li, Z., and Li, P. (2014) Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. *Biol. Control* **71**: 7–15.
- Linderman, R.G. (1981) *Fusarium* disease of flowering bulb crops. In, *Fusarium, disease, biology and taxonomy*, pp. 129–141.
- Lindford, M. (1928) A *Fusarium* wilt of peas in Wisconsin. *Wisconsin Agric. Exp. Stn. Bull.* **85**: 28–30.
- Lioussanne, L. (2010) The role of the arbuscular mycorrhiza-associated rhizobacteria in the biocontrol of soilborne phytopathogens. *Spanish J. Agric. Res.* **8**: 51–61.
- Löffler, H.J.M., Straathof, T.P., Mouris, J.R., and Baayen, R.P. (1995) Durability of resistance in lily to basal rot: evaluation of virulence and aggressiveness among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii*. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 261–271.
- Lomas-Cano, T., Palmero-Llamas, D., de Cara, M., García-Rodríguez, C., Boix-Ruiz, A., Camacho-Ferre, F., and Tello-Marquina, J.C. (2014) First report of *Fusarium oxysporum* on sweet pepper seedlings in Almería, Spain. *Plant Dis.* **98**: 1435.
- Lops, F., Cibelli, F., Raimondo, M., and Carlucci, A. (2013) First report of stem wilt and root rot of *Schlumbergera truncata* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum* in Southern Italy. *Plant Dis.* **97**: 846.
- Lori, G., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., and Alabouvette, C. (2004) Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. *Phytopathology* **94**: 661–668.
- Lori, G., Petiet, P.M., Malbrán, I., Mourellos, C.A., Wright, E.R., and Rivera, M.C. (2012) *Fusarium* wilt of cyclamen: Pathogenicity and vegetative compatibility groups structure of the pathogen in Argentina. *Crop Prot.* **36**: 43–48.
- Louvet, J., Rouxel, F., and Alabouvette, C. (1976) Recherches sur la résistance des sols aux maladies. I. Mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance d'un sol au développement de la. *Ann. Phytopathol.*
- Luongo, L., Vitale, S., Haegi, A., and Belisario, A. (2012) Development of SCAR markers and PCR assays for *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 2 specific detection. *J. Plant Pathol.* **94**: 193–199.

## M

- Ma, L.-J. (2014) Horizontal chromosome transfer and rational strategies to manage *Fusarium* vascular wilt diseases. *Mol. Plant Pathol.* **15**: 763–766.
- Ma, L.-J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., *et al.* (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367–373.
- Ma, L.-J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., *et al.* (2013) *Fusarium* pathogenomics. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**: 399–416.
- Mandeel, Q., Abbas, J., and Saeed, A. (1995) Survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain: II. Spectrum of species on five isolation media. *Sydowia* **47**: 223–239.
- Manocha, M.S. (1991) Physiology and biochemistry of biotrophic mycoparasitism. In, *Handbook of Applied Mycology: Volume 1: Soil and Plants*. CRC Press, pp. 273–300.
- Manshor, N., Rosli, H., Ismail, N.A., Salleh, B., and Zakaria, L. (2012) Diversity of *Fusarium* species from highland areas in Malaysia. *Trop. life Sci. Res.* **23**: 1–15.
- Mao, W., Laewis, J., Hebbar, P., et Lumsden, R. (1997) Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Disease* **81**: 450–454.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., and Catroux, G. (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2354–2359.
- Martín-Urdíroz, M., Roncero, M.I.G., González-Reyes, J.A., and Ruiz-Roldán, C. (2008) ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot. Cell* **7**: 112–121.
- Martini, P., Repetto, L., Gullone, C., Savona, S., Rapetti, S., Brunelli, A., *et al.* (2006) Control of *Fusarium* wilt of *Ranunculus*. In, *Phytopathological Meeting 2006, Riccione (RN), 27-29 March 2006. Proceedings, second volume*. Università di Bologna, pp. 391–396.
- Martyn, R. and Vakalounakis, D. (2012) *Fusarium* wilts of greenhouse cucurbits: melon, watermelon, and cucumber. In, *Fusarium wilts of greenhouse vegetable and ornamental crops*, pp. 159–176.
- Marziano, F., Aloj, B., and Noviello, C. (1987) *Fusarium oxysporum* f.sp. *bouvardiae* f.sp. nov. agent of fusarial wilt of *Bouvardia longiflora*. *Ann. della Fac. di Sci. Agrar. della Univ. degli Stud. di Napoli portico* **21**: 13–19.
- Massey, L.M. (1926) *Fusarium* rot of *Gladiolus* corms. *Phytopathology* **16**: 509–510.
- Matsuo, T. and Ishigami, K. (1958) On the wilt of *Solanum melongena* L. and its causal fungus *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* n.f. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **23**: 189–192.
- Matsuo, T., Matsuda, A., Ozaki, K., and Kato, K. (1975) *Fusarium oxysporum* f. sp. *arctii* nf causing wilt of brudock. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **41**: 77–80.
- Matsuo, T., Tooyama, A., and Isaka, M. (1979) *Fusarium* basal rot of *Allium bakeri* regel and its causal fungus, *Fusarium oxysporum* schl. f. sp. *allii* n. f. *Japanese J. Phytopathol.* **45**: 305–312.
- Matsuo, T. and Yamamoto, I. (1967) On *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* nf causing wilt of *Lagenaria vulgaris* var. *hispidia*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **8**: 61–63.
- Maya, M.A. and Matsubara, Y. (2013a) Influence of arbuscular mycorrhiza on the growth and antioxidative activity in cyclamen under heat stress. *Mycorrhiza* **23**: 381–390.
- Maya, M.A. and Matsubara, Y. (2013b) Tolerance to *Fusarium* wilt and anthracnose diseases and changes of antioxidative activity in mycorrhizal cyclamen. *Crop Prot* **47**: 41–48.

## Références bibliographiques

- Mbofung, G.Y., Hong, S.G., and Pryor, B.M. (2007) Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1-alpha, and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Phytopathology* **97**: 87–98.
- McCarroll, N. (2002) A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **512**: 1–35.
- McClellan, W. (1945) Pathogenicity of the vascular *Fusarium* of *Gladiolus* to some additional iridaceous plants. *Phytopathology* **35**: 921–930.
- McClellan, W. and Stuart, N. (1947) The influence of nutrition on *Fusarium* basal rot of *Narcissus* and on *Fusarium* yellows of *Gladiolus*. *Am. J. Bot.* **88–93**.
- McDonald, J. and Leach, L. (1976) Evidence for an expanded host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae*. *Phytopathology* **66**: 822–827.
- McKnight (1951) A wilt disease of the passion vines (*Passiflora edulis*) caused by a species of *Fusarium*. *Queensl. J. Agric. Sci.* **8**: 1–4.
- Mehta, C.M., Palni, U., Franke-Whittle, I.H., and Sharma, A.K. (2014) Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Manag.* **34**: 607–622.
- Mercier, S. and Louvet, J. (1973) Recherches sur les fusarioses. X-Une fusariose vasculaire (*Fusarium oxysporum*) du palmier des Canaries (*Phoenix canariensis*). *Ann. Phytopathol.* **5**: 203–211.
- Michielse, C.B., van Wijk, R., Reijnen, L., Cornelissen, B.J.C., and Rep, M. (2009) Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. *Genome Biol.* **10**: 1–18.
- Migheli, Q., Briatore, E., and Garibaldi, A. (1998) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4, and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**: 49–57.
- Miller, P. (1785) Dictionnaire des jardinier.
- Minuto, A., Gaggero, L., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2008) Influence of pH, nutrient solution disinfection and antagonists application in a closed soilless system on severity of *Fusarium* wilt of gerbera. *Phytoparasitica* **36**: 294–303.
- Minuto, A. and Garibaldi, A. (1998) Diffusione di *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* in colture con irrigazione a flusso e riflusso. *Colt. Protette.* **10**: 21–26.
- Minuto, A., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2007) *Gerbera jamesonii*, *Osteospermum* sp. and *Argyranthemum frutescens*: new hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *J. Phytopathol.* **155**: 373–376.
- Minuto, A., Migheli, Q., and Garibaldi, A. (1995) Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen. *Crop Prot.* **14**: 221–226.
- Mirtalebi, M., Banihashemi, Z., and Linde, C.C. (2013) Phylogenetic relationship of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in Iran. *Eur. J. Plant Pathol.* **136**: 749–762.
- Mishra, P.K., Mukhopadhyay, A.N., and Fox, R.T. V (2000) Integrated and biological control of gladiolus corm rot and wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Ann. Appl. Biol.* **137**: 361–364.
- Moghaddam, M. and Mehdizadeh, L. (2015) Variability of total phenolic, flavonoid and rosmarinic acid content among Iranian basil accessions. *LWT - Food Sci. Technol.* **63**: 535–540.
- Mohan, M., Haider, S.Z., Andola, H.C., and Purohit, V.K. (2011) Essential oils as green pesticides: for sustainable agriculture. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **2**: 100–106.
- Monteiro, V., do Nascimento Silva, R., Steindorff, A., et al. (2010) New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current microbiology* **61**: 298–305.
- Montesinos, E. (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* **6**: 245–252.

## Références bibliographiques

- Moore, W.C. (1948) Report on fungus, bacterial and other diseases of crops in England and Wales for the years 1943-1946. H.M. Stationery Office.
- Moussa, E. and Hague, N. (1988) Influence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *glycines* on the invasion and development of *Meloidogyne incognita* on soybean. *Rev. Nématol.* **11**: 437–439.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the Polymerase Chain Reaction. In, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263–273.
- Munk, W. and Beijer, J. (1971) Bud necrosis, a storage disease in tulips. I Symptoms and the influence of storage conditions. *Netherlands J. Plant Pathol.* **77**: 97–105.

## N

- Nakahara, K., Alzoreky, N., Yoshihashi, T., Nguyen, H., and Trakoontivakorn, G. (2003) Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). *JARQ* **37**: 249–252.
- Negi, P.S. (2012) Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *Int. J. Food Microbiol.* **156**: 7–17.
- Nelson, P.E. (1964) Carnation as symptomless carrier of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology* **54**: 323–329.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Cook, R.J. (1981) *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Pennsylvania State University Press.
- Nelson, P.E., Toussoun, T., and Marasas, W.F.O. (1983) *Fusarium species, an illustrated manual for identification* Pennsylvan.
- Netzer, D. (1976) Physiological races and soil population level of *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytoparasitica* **4**: 131–136.
- Netzer, D. and Weintal, C. (1987) *Fusarium* wilt of common heliotrope (*Heliotropium europaeum*). *Phytoparasitica* **15**: 139–140.
- Nicot, P., Alabouvette, A., Bardin, M., Blum, B., Köhl, J., and Ruocco, M. (2012) Review of factors influencing the success or failure of biocontrol: technical, industrial and socio-economic perspectives.
- Nishimura, N. and Kudo, K. (1994) *Fusarium oxysporum* f. sp. *colocasiae* nf sp. causing dry rot of taro (*Colocasia esculenta*). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **60**: 448–453.
- Nosir, W., McDonald, J., and Woodward, S. (2010) The efficiency of *Trichoderma harzianum* and *Aneurinobacillus migulanus* in the control of *Gladiolus* corm rot in soil-less culture system. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* **5**: 436–445.
- Nosir, W., McDonald, J., and Woodward, S. (2011) Impact of biological control agents on fusaric acid secreted from *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen in *Gladiolus grandiflorus* corms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 21–27.
- Noviello, C. and Snyder, W. (1962) *Fusarium* wilt of hemp. *Phytopathology* **52**: 1315–1317.

## O

- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**: 103–116.
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P.R., Crous, P.W., Glenn, A., *et al.* (2009) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet. Biol.* **46**: 936–948.

## Références bibliographiques

- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., and Ploetz, R.C. (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 2044–2049.
- O'Donnell, K., Rooney, A.P., Proctor, R.H., Brown, D.W., McCormick, S.P., Ward, T.J., *et al.* (2013) Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet. Biol.* **52**: 20–31.
- O'Donnell, K. and Sutton, D. (2010) Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3708–3718.
- Okwu, D.E., Awurum, A.N., and Okoronkwo, J.I. (2007) Phytochemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of extracts from *Citrus* plants against *Fusarium oxysporum* of okra plant (*Hibiscus esculentus*). *African Crop Sci. Conf. Proc.* **8**: 1755–1758.
- Olivain, C. and Alabouvette, C. (1999) Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytol.* **141**: 497–510.
- Olivain, C., Alabouvette, A., and Steinberg, C. (2004) Production of a mixed inoculum of *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas fluorescens* C7 to control Fusarium diseases. *Biocontrol Sci. Technol.* **14**: 227–238.
- Olivain, C., Steinberg, C., and Alabouvette, C. (1995) Evidence of induced resistance in tomato inoculated by nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. In, *Environmental biotic factors in integrated plant diseases control*, pp. 427–430.
- Olivain, C. and Trouvelot, S. (2003) Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5453–5462.
- Ongena, M. and Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology* **16**: 115–125.
- Ooi, K.H. and Salleh, B. (1999) Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum*, the causal organism of vascular wilt on roselle in Malaysia. *Biotropia*. **12**: 31–41.
- Orlicz-Luthardt, A. (1998) Studies on the resistance of cyclamen to Fusarium wilt. In, *Beiträge zur Züchtungsforschung*, pp. 48–49.
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Mayayo, E., and Di Pietro, A. (2004) *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infect. Immun.* **72**: 1760–1766.
- Ortu, G., Bertetti, D., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2013) A new *forma specialis* of *Fusarium oxysporum* on *Crassula ovata*. *J. plant Pathol.* **95**: 33–39.
- Ortu, G., Bertetti, D., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2015c) *Fusarium oxysporum* f. sp. *echeveriae*, a novel *forma specialis* causing crown and stem rot of *Echeveria agavoides*. *Phytopathol. Mediterr.* **54**: 64–75.
- Ortu, G., Bertetti, D., Martini, P., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2015b) *Fusarium oxysporum* f. sp. *papaveris*: a new *forma specialis* isolated from Iceland poppy (*Papaver nudicaule*). *Phytopathol. Mediterr.* **54**: 76–85.
- Ortu, G., Bertetti, D., Martini, P., Pensa, P., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2015a) New Fusarium wilts on ornamental and aromatic plants. *Prot. delle Colt.* 23–29.
- Otto-Hanson, L., Grabau, Z., Rosen, C., Salomon, C. and Kinkel, L. (2013) Pathogen variation and urea influence selection and success of *Streptomyces* mixtures in biological control. *Phytopathology* **103**: 34–42.
- Ouellette, G., Baayen, R., Simard, M., and Rioux, D. (1999) Ultrastructural and cytochemical study of colonization of xylem vessel elements of susceptible and resistant *Dianthus caryophyllus* by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Can. J. Bot.* **77**: 644–663.

Owen, J. (1956) Cucumber wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* n. f. *Phytopathology* **46**: 153–157.

P

Palmero, D., Iglesias, C., De Cara, M., Lomas, T., Santos, M., and Tello, J. (2009) Species of *Fusarium* isolated from river and sea water of southeastern Spain and pathogenicity on four plant species. *Plant Dis.* **93**: 377–385.

Palmero, D., Rubio-Moraga, A., Galvez-Patón, L., Nogueras, J., Abato, C., Gómez-Gómez, L., and Ahrazem, O. (2014) Pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from corms of *Crocus sativus*. *Ind. Crops Prod.* **61**: 186–192.

Palmucci, H. and Wright, E. (1990) Marchitamiento del cyclamen causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*. *Revista de la Facultad de Agronomía* **11**: 107–112.

Park, D. (1959) Some aspect of the biology of *Fusarium oxysporum* Schl. in soil. *Ann. Bot.* **23**: 35–49.

Park, D. (1963) Evidence for a common fungal growth regulator. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **46**: 541–548.

Pasquali, M., Acquadro, A., Balmas, V., Migheli, Q., Lodovica Gullino, M., and Garibaldi, A. (2004) Development of PCR primers for a new *Fusarium oxysporum* pathogenic on Paris daisy (*Argyranthemum frutescens* L.). *Eur. J. Plant Pathol.* **110**: 7–11.

Pasquali, M., Dematheis, F., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2007) Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. *Phytopathology* **97**: 987–996.

Pasquali, M., Piatti, P., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2006) Development of a Real-time Polymerase Chain Reaction for the detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from basil seed and roots. *J. Phytopathol.* **154**: 632–636.

Patel, P. (1985) Fungal, bacterial and viral diseases of cowpeas in the USA. In, *Cowpea research, production and utilization.*, pp. 205–213.

Patel, P., Prasad, N., Mathur, R., and Mathur, B. (1957) *Fusarium* wilt of cumin. *Curr. Sci* **26**: 181–182.

Paulitz, T.C., Park, C.S., and Baker, R. (1987) Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.* **33**: 349–353.

Pax, F. (1889) Primulaceae. In, *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* **4**: 98–116.

Peer, R. Van, Niemann, G., and Schippers, B. (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* **81**: 728–734.

Peng, S., Eissenstat, D.M., Graham, J.H., Williams, K. and Hodge, N.C. (1993) Growth depression in mycorrhizal *Citrus* at high-phosphorus supply (Analysis of Carbon Costs). *Plant Physiology* **101**: 1063–1071.

Pennycook, S. (1989) Plant diseases recorded in New Zealand.

Pertot, I. (2014) Developing a microbial biofungicide: an overview analysis from cradle to grave. In, *Biocontrol of plant diseases: "from the field to the laboratory and back again."*, p. 11.

Philogène, B., Regnault-Roger, C., and Vincent, C. (2005) Botanicals: yesterday's and today's promises. In, *Biopesticides of plant origin.*, pp. 1–15.

Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A., and Harvala, C. (2003) Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 3294–3301.

Pitta, A.P.B. and Teranishi, J. (1979) Ocorrência da murcha (*Fusarium oxysporum* Schl. f. *cyclaminis* n.f.) do Ciclamen (*Cyclamen persicum* Mill). *Biologico* **45**: 213–216.

- Ploetz, R. (2006a) Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* **96**: 653–656.
- Ploetz, R. (2006b) Fusarium-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology* **96**: 648–652.
- PMRA (2013) Registration Decision RD2013-19 - *Trichoderma asperellum* strain T34.
- Poli, A., Gilardi, G., Spadaro, D., Gullino, M.L., Garibaldi, A., Spadaro, D., *et al.* (2012) Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cichorii* pathogenic on chicory (*Cichorium intybus*). *Phytoparasitica* **40**: 383–391.
- Pontin, M., Bottini, R., Burba, J.L., and Piccoli, P. (2015) *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. *Phytochemistry* **115**: 152–160.
- Postma, J. and Luttikholt, A. (1996) Colonization of carnation stems by a nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum* and its effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Can. J. Bot.* **74**: 1841–1851.
- Pozzebon, A., Boaria, A., and Duso, C. (2015) Single and combined releases of biological control agents against canopy and soil-dwelling stages of *Frankliniella occidentalis* in cyclamen. *BioControl* **60**: 341–350.
- Prasad, N., Mehta, P., and Lal, S. (1952) Fusarium wilt of guava (*Psidium guajava* L.) in Uttar Pradesh, India. *Nature* **169**: 753.
- Priest, M. and Letham, D. (1996) Vascular wilt of *Phoenix canariensis* in New South Wales caused by *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.* **25**: 110–113.
- Puhalla, J.E. (1984) Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* in California and their genetic interrelationships. *Rev. Can. Bot.* **62**: 546–550.
- Puhalla, J.E. (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* **63**: 328–335.
- Punja, Z. and Parker, M. (2000) Development of Fusarium root and stem rot, a new disease on greenhouse cucumber in British Columbia, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Can. J. Plant Pathol.* **22**: 349–363.

## R

- Raabe, R. (1957) Fusarium wilt of *Hebe buxifolia*. *Phytopathology* **47**: 532.
- Raabe, R. (1985) Fusarium wilt of *Hebe* species. *Plant Dis.* **69**: 450–451.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., van Oorschot, M., van der Sluis, I., Schippers, B., and Bakker, P.A.H.M. (1995) Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **85**: 1075–1080.
- Raeisi, S., Mirjalili, M.H., Nadjafi, F., and Hadian, J. (2015) Variability in the essential oil content and composition in different plant organs of *Kelussia odoratissima* Mozaff. (Apiaceae) growing wild in Iran. *J. Essent. Oil Res.* **27**: 283–288.
- Rattink, H. (1980) Verwelkingsziekte bij *Cyclamen*. *Vakbl. voor Bloemist.* **4**: 111–113.
- Rattink, H. (1982) Verwelkingsziekte bij *Cyclamen*. *Bloemisterijonderzoek Ned.* **198**: 111–113.
- Rattink, H. (1986) Some aspects of the etiology and epidemiology of Fusarium wilt on cyclamen. In, *International Symposium over Fytofarmacie en Fytiatrie* (Belgium).
- Raudales, R.E., Parke, J.L., Guy, C.L., and Fisher, P.R. (2014) Control of waterborne microbes in irrigation: A review. *Agric. Water Manag.* **143**: 9–28.
- Recorbet, G., Steinberg, C., Olivain, C., Edel, V., Trouvelot, S., Dumas-Gaudot, E., *et al.* (2003) Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* **159**: 73–92.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., and Arnason, J.T. (2012) Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu. Rev. Entomol.* **57**: 405–424.

## Références bibliographiques

- Reimherr, P. (1985) Atlas of diseases and pests of cyclamen.
- Rekah, Y., Shtienberg, D., and Katan, J. (2000) Disease development following infection of tomato and basil foliage by air-borne conidia of the soilborne pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *basilici*. *Phytopathology* **90**: 1322–1329.
- Rekah, Y., Shtienberg, D., and Katan, J. (2001) Role of the Shrub *Tamarix nilotica* in Dissemination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Disease* **85**: 735–739.
- Renard, J., Gascon, J., and Bachy, A. (1972) Research on vascular wilt disease of the oil palm. *Oleagineux* **27**: 581–591.
- Rep, M. (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**: 19–27.
- Rep, M., van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H., et al. (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Mol. Microbiol.* **53**: 1373–1383.
- Riaz, T., Khan, S.N., and Javaid, A. (2009) Effect of co-cultivation and crop rotation on corm rot disease of *Gladiolus*. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **121**: 218–222.
- Riaz, T., Khan, S.N., and Javaid, A. (2010) Management of Fusarium corm rot of *Gladiolus* (*Gladiolus grandiflor* sect. *blandus* cv. Aarti) by using leaves of allelopathic plants. *African J. Biotechnol.* **9**: 4681–4686.
- Risser, G., Banihashemi, Z., and Davis, D. (1976) A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. *Phytopathology* **66**: 1105–1106.
- Risser, G. and Mas, P. (1965) Mise en évidence de plusieurs races de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Ann. d'amélioration des plantes* **15**: 405–408.
- Rivelli, V. (1989) A wilt of pepper incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici forma specialis nova*.
- Robin, A. (2006) Interactions plantes-microorganismes associées à la dynamique du fer dans la rhizosphère.
- Rodríguez, M.A., Cabrera, G., and Godeas, A. (2006) Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 575–586.
- Rodriguez-Galvez, E. et Mendgen, K. (1995) The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. *Protoplasma* **189**: 61–72.
- Rodríguez-Molina, M.C., Morales-Rodríguez, M.C., Palo, C., Osuna, M.D., Iglesias, M.J., and García, J.A. (2013) Pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD analysis of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Extremadura. *Eur. J. Plant Pathol.* **136**: 639–650.
- Roebroek, E.J.A. and Mes, J.J. (1992) Physiological races and vegetative compatibility groups within *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Netherlands J. Plant Pathol.* **98**: 57–64.
- Rongyi, Z., Zhiqiong, T., and Shanying, C. (2003) First report of leaf rot caused by *Fusarium oxysporum* and *Pythium aphanidermatum* on *Aechmea fasciata* in Hainan Province, China. *Plant Dis.* **87**: 599.
- Rosado-Álvarez, C., Molinero-Ruiz, L., Rodríguez-Arcos, R., and Basallote-Ureba, M.J. (2014) Antifungal activity of asparagus extracts against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **171**: 51–57.
- Rouxel, F., Alabouvette, C., and Louvet, J. (1977) Recherches sur la résistance des sols aux maladies. II. Incidence de traitements thermiques sur la résistance microbiologique d'un sol à la fusariose vasculaire du melon. *Ann. Phytopathol.* **9**: 183–192.
- Rouxel, F., Alabouvette, C., and Louvet, J. (1979) Recherches sur la résistance des sols aux maladies. IV. Mise en évidence du rôle des *Fusarium* autochtones dans la résistance d'un sol à la fusariose vasculaire du melon. *Ann. Phytopathol.* **11**: 199–207.
- Rouxel, F. and Grouet, D. (1974) Première observation de la fusariose vasculaire du cyclamen en France. *Ann. Phytopathol.* **6**: 475–478.

Rozier, F. (1805) Cours complet d'agriculture, théorique, pratique, économique et de médecine rurale et vétérinaire, suivi d'une méthode pour étudier l'agriculture par principes; ou dictionnaire universel d'agriculture.

Rydlová, J., Sýkorová, Z., Slavíková, R., and Turis, P. (2015) The importance of arbuscular mycorrhiza for *Cyclamen purpurascens* subsp. *immaculatum* endemic in Slovakia. *Mycorrhiza* **25**: 599–609.

## S

Safaiefarahani, B. and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. (2014) Identification and morphological characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *opuntiarum*, the causal agent of basal stem rot of cactus in Fars province. *Iran. J. Plant Pathol.* **50**:

Salie, F., Eagles, P.F.K., and Leng, H.M.J. (1996) Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. *J. Ethnopharmacol.* **52**: 27–33.

Samuel, S. and Muthukkaruppan, S.M. (2011) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and fungi associated with rice, mangrove and effluent contaminated soil. *Curr. Bot.* **2**: 22–25.

Sands, D., Ford, E., and Miller, R. (1997) Characterization of a vascular wilt of *Erythroxylum coca* caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli forma specialis* nova. *Plant Dis.* **81**: 501–504.

Sangalang, A., Burgess, L., Backhouse, D., Duff, J., and Wurst, M. (1995) Mycogeography of *Fusarium* species in soils from tropical, arid and Mediterranean regions of Australia. *Mycol. Res.* **99**: 523–528.

Sant, D., Casanova, E., Segarra, G., Avilés, M., Reis, M., and Trillas, M.I. (2010) Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. *Biol. Control* **53**: 291–296.

Sasaki, K., Nakahara, K., Tanaka, S., Shigyo, M., and Ito, S.-I. (2015) Genetic and pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolated from onion and Welsh onion in Japan. *Phytopathology* **105**: 525–532.

Sautour, M., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., Sixt, N., Laurent, J., Dalle, F., *et al.* (2012) *Fusarium* species recovered from the water distribution system of a French university hospital. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **215**: 286–292.

Scarlett, K., Tesoriero, L., Daniel, R., and Guest, D. (2014) Sciarid and shore flies as aerial vectors of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in greenhouse cucumbers. *Journal of Applied Entomology* **138**: 368–377.

Scher, F. and Baker, R. (1980) Mechanism of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology* **70**: 412–417.

Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W., and Jackson, M.A. (2004) Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* **94**: 1267–1271.

Schmidt, E. (2015) Production of essential oils. In, *Handbook of essential oils: science, technology, and applications, second edition.*, pp. 83–118.

Schneider, R. and Norelli, J. (1981) A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* in California (Abstr.). *Phytopathology* **71**: 108.

Schnepf, E. and Crickmore, N. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews* **62**: 775–806.

Schoch, C.L., Seifert, K. a, Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., and Chen, W. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 6241–6246.

Schoch, C.L., Sung, G.-H., López-Giráldez, F., Townsend, J.P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., *et al.* (2009) The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst. Biol.* **58**: 224–239.

## Références bibliographiques

- Sella, L., Cosmi, T., Giacomello, F., Saccardi, A., and Favaron, F. (2010) First report of *Fusarium oxysporum* on *Dipladenia* sp. in Italy. *J. Plant Pathol.* **92**: 543.
- Sepúlveda Chavera, G.F. and Cortés, V.G. (1999) Mycological notes: some microfungi affecting hybrids of Orchidaceae (*Cattleya* spp.) grown in Arica. *Idesia* **16**: 17–21.
- Shanmugam, V., Kanoujia, N., Singh, M., Singh, S., and Prasad, R. (2011) Biocontrol of vascular wilt and corm rot of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* using plant growth promoting rhizobacterial mixture. *Crop Prot.* **30**: 807–813.
- Sharma, N. and Tripathi, A. (2008) Integrated management of postharvest Fusarium rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. *Postharvest Biol. Technol.* **47**: 246–254.
- Shiner, E. (2005) Interkingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS microbiology reviews* **29**: 935–947.
- Shobha, G. and Kumudini, B. (2012) Antagonistic effect of the newly isolated PGPR *Bacillus* spp. on *Fusarium oxysporum*. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* **1**: 463–474.
- Silva, F.P. d, Vechiato, M.H., and Harakava, R. (2014) *EF-1 $\alpha$*  gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. *Trop. Plant Pathol.* **39**: 64–73.
- Singh, P. and Vijay, K. (2011) Biological control of Fusarium wilt of *Chrysanthemum* with *Trichoderma* and botanicals. *J. Agric. Technol.* **7**: 1603–1613.
- Sivaramakrishnan, S., Kannan, S., and Singh, S.D. (2002) Genetic variability of Fusarium wilt pathogen isolates of chickpea (*Cicer arietinum* L.) assessed by molecular markers. *Mycopathologia* **155**: 171–178.
- Skovgaard, K., Nirenberg, H.I., O'Donnell, K., and Rosendahl, S. (2001) Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. *Ecol. Popul. Biol.* **91**: 1231–1237.
- Smith, E. (1899) The fungus infection of agricultural soils in the United States. *Sci Am Sup.*
- Smith, F.F. (1932) Biology and control of the black vine weevil.
- Smith, S.N. (1971) Relationship of inoculum density and soil types to severity of Fusarium wilt of sweet potato. *Phytopathology* **61**: 1049–1051.
- Smith, S.N., Helms, D.M., Temple, S.R., and Frate, C. (1999) The distribution of Fusarium wilt of Blackeyed cowpeas within California caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 4. *Plant Dis.* **83**: 694.
- Sneh, B., Agami, O., and Baker, R. (1985) Biological control of Fusarium-wilt in carnation with *Serratia liquefaciens* and *Hafnia alvei* isolated from rhizosphere of carnation. *J. Phytopathol.* **113**: 271–276.
- Snyder, W.C. and Hansen, H.N. (1940) The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 64–67.
- Soliman, E.A. (2013) Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and *in vitro* evaluation of antifungal activity. *J. Encapsulation Adsorpt. Sci.* **3**: 48–55.
- Someya, N., Kataoka, N., Komagata, T., Hirayae, K., Hibi, T., and Akutsu, K. (2000) Biological control of *Cyclamen* soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Dis.* **84**: 334–340.
- Soto-Muñoz, L., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Abadias, M., and Torres, R. (2015) Molecular tools applied to identify and quantify the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 in postharvest treatments on oranges. *Postharvest Biol. Technol.* **100**: 151–159.
- Spadaro, D. and Gullino, M.L. (2005) Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* **24**: 601–613.
- Southwood, M.J., Viljoen, A., Mostert, L., Rose, L.J., and McLeod, A. (2012) Phylogenetic and biological characterization of *Fusarium oxysporum* isolates associated with onion in South Africa. *Plant Dis.* **96**: 1250–1261.

## Références bibliographiques

- St-Arnaud, M., Vimard, B., Fortin, J.A., Hamel, C., and Caron, M. (1997) Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Can. J. Bot.* **75**: 998–1005.
- Steinberg, C., Edel, V., Gautheron, N., Abadie, C., Vallaëys, T., and Alabouvette, C. (1997) Phenotypic characterization of natural populations of *Fusarium oxysporum* in relation to genotypic characterization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 73–85.
- Steinberg, C., Laurent, J., Edel-Hermann, V., et al. (2015) Adaptation of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium dimerum* to the specific aquatic environment provided by the water systems of hospitals. *Water research* **76**: 53–65.
- Stelder, F. (1991) *Fusarium* kan zich bij *Cyclamen* verspreiden in eb/vloed. *Vakbl. voor Bloemist.* **5**: 72–73.
- Stotzky, G. and Martin, R. (1963) Soil mineralogy in relation to the spread of *Fusarium* wilt of banana in Central America. *Plant Soil* **18**: 317–337.
- Stover, R.H. (1962) Fusarial wilt (panama disease) of bananas and other *Musa* species. *Phytopathology* 1–117.
- Straathof, T.P., Löffler, H.J.M., Roebroek, E.J.A., and Linfield, C.A. (1996) Breeding for resistance to *Fusarium oxysporum* in flower bulbs. In, *VII International Symposium on Flowerbulbs 430.*, pp. 477–486.
- Sun, S. and Huang, J. (1983) A new *Fusarium* wilt of bitter gourd in Taiwan. *Plant Dis.* **67**: 226–227.
- Sviridov, A.A. (1990) Results of breeding castor oil plants for resistance to *Fusarium* wilt. *Sel. i Semenovod.* 12–13.
- Swart, L., Denman, S., Lamprecht, S.C., and Crous, P.W. (1999) *Fusarium* wilt: A new disease of cultivated Protea in Southern Africa. *Australas. Plant Pathol.* **28**: 156–161.
- Szentes, S., Radu, G.-L., Laslo, É., Lányi, S., and Mara, G. (2013) Selection and evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from a raised bog environment. *Crop Prot.* **52**: 116–124.

## T

- Takakuwa, M., Ishizaka, N., Kodama, F., and Saito, I. (1977) Host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, causal fungus of *Fusarium* basal rot of onion. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **43**: 479–481.
- Tamm, L., Speiser, B., and Mercier, T. (2011) Proposals for regulation of botanicals. In, *Regulation of biological control agents.*, pp. 289–303.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729.
- Taylor, A., Vagany, V., Barbara, D.J., Thomas, B., Pink, D.A.C., Jones, J.E., and Clarkson, J.P. (2013) Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay. *Plant Pathol.* **62**: 103–111.
- Tello, F.J., Vares, L., Vares, F., and Mijares, A. (1985) *Fusarium* wilt of cyclamen in Spain. In: *IV International Symposium on Flower Bulbs* **177**: 469–472.
- Thulin, M. and Warfa, A.M. (1989) *Cyclamen* (Primulaceae) in tropical Africa. *Plant Syst. Evol.* **166**: 249–252.
- Timmer, L. (1982) Host range and host colonization, temperature effects and dispersal of *Fusarium oxysporum* f. sp. *citri*. *Phytopathology* **72**: 698–702.
- Tombe, M. and Liew, E. (2010) Fungal diseases of *Vanilla*. In, *Vanilla.*, pp. 125–140.
- Tompkins, C.M. and Snyder, W.C. (1972) *Cyclamen* wilt in California and its control. *Plant Dis. Report.* **56**: 493–497.
- Toole, E.R. (1941) *Fusarium* wilt of the mimosa tree (*Albizzia julibrissin*). *Phytopathology* **31**: 599–616.
- Toussoun, T. (1975) *Fusarium* suppressive soils. In, *Biology and control of soil-borne plant pathogens.*, p. 216.

## Références bibliographiques

- Triolo, E. and Lorenzini, G. (1983) *Fusarium oxysporum* f. sp. *fatshederae*, a new *forma specialis* causing wilt of *Fatskedera lizei*. *Ann. Appl. Biol.* **102**: 245–250.
- Troisi, M., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. (2010) *Gerbera jamesonii*, a new host of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. *J. Phytopathol.* **158**: 8–14.
- Tsrur, L., Hazanovski, M., and Erlich, O. (2007) Host-specific *Fusarium oxysporum* causes wilt of jojoba. *J. Phytopathol.* **155**: 305–308.

## V

- Vakalounakis, D.J. (1996) Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum*. *Plant Dis.* **80**: 313–316.
- Vakalounakis, D.J. and Chalkias, J. (2004) Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in soil. *Crop Prot* **23**: 871–873.
- Vakalounakis, D.J. and Fragkiadakis, G.A. (1999) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* **89**: 161–168.
- Vakalounakis, D.J., Wang, Z., Fragkiadakis, G.A., Skaracis, G.N., and Li, D.-B. (2004) Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCG, and RAPD. *Plant Dis.* **88**: 645–649.
- Valasek, M.A. and Repa, J. (2005) The power of real-time PCR. *AJP Adv. Physiol. Educ.* **29**: 151–159.
- van Arx, J.A. (1952) De voetziekte van *Gerbera*, veroorzaakt door *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Tijdschr. Over Plantenzielten* **58**: 5–9.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., and Lorito, M. (2008) *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* **40**: 1–10.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., and Pérez-Álvarez, J. (2008) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* **19**: 1130–1138.

## W

- Waite, B. (1963) Wilt of *Heliconia* spp. caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 3. *Trop. Agric.* **40**: 299–305.
- Wang, B. and Jeffers, S.N. (2000) *Fusarium* root and crown rot: a disease of container-grown hostas. *Plant Dis.* **84**: 980–988.
- Wang, B., Yuan, J., Zhang, J., Shen, Z., Zhang, M., Li, R., *et al.* (2012) Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biol. Fertil. Soils* **49**: 435–446.
- Wang, Q., Wu, J., Wu, R., Han, N., and Dai, N. (2015b) Two new flavonoids from *Artemisa sacrorum* Ledeb and their antifungal activity. *J. Mol. Struct.* **1088**: 34–37.
- Wang, Y., Wang, C., Yang, L., Wang, X., and Gao, J. (2015a) First report of *Fusarium oxysporum* causing stem rot on *Philodendron oxycardium* in China. *Plant Dis.* **100**: 650.
- Wei, H. and Zhang, L. (2006) Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**: 267–280.
- Werner, M. and Irzykowska, L. (2007) The pathogenicity and DNA polymorphism of *Fusarium oxysporum* originating from *Dianthus caryophyllus*, *Gypsophila* spp., and soil. *Polish Phytopathol. Soc.* **46**: 25–36.

## Références bibliographiques

- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.*, pp. 315–322.
- Wildmer, R. and Lyons, R. (1985) *Cyclamen persicum*. In, *Handbook of flowering.*, pp. 382–390.
- Winks, B. and Williams, Y. (1965) A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. *Queens J. Agric. Anim. Sci.* **22**: 475–479.
- Wollenweber, H. and Reinking, O. (1935) Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung.
- Woo, S., Zoina, A., Sorbo, G. Del, Lorito, M., Nanni, B., Scala, F., and Noviello, C. (1996) Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* **86**: 966–973.
- Woudt, L.P., Neuvel, A., Sikkema, A., van Grinsven, M.Q.J.M., De Milliano, W.A.J., Campbell, C.L., and Leslie, J.F. (1995) Genetic variation in *Fusarium oxysporum* from cyclamen. *Phytopathology* **85**: 1348–1355.
- Wozniak, C.A. (2007) Regulatory impact on insect biotechnology and pest management. *Entomol. Res.* **37**: 221–230.
- Wright, E.R., Rivera, M.C., Mascarini, A., Nuñez, L.S., and Gentile, C.M. (2006) Florist's cyclamen anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Argentina. *Australas. Plant Dis. Notes* **1**: 1–2.
- Wright, G., Guest, D., Wimalajeewa, D., and Van Heeswijck, R. (1996) Characterisation of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**: 451–457.
- Wu, Y., Wang, S., Li, H., and Yuan, H. (1995) A preliminary study on *forma specialies* of groud Fusarium wilt. *Acta Agric. Univ. Henanensis* **30**: 89–93.
- Wunsch, M.J., Baker, A.H., Kalb, D.W., and Bergstrom, G.C. (2009) Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *loti forma specialis* nov., a monophyletic pathogen causing vascular wilt of birdsfoot trefoil. *Plant Dis.* **93**: 58–66.
- Wuttke, H. (1943) Gegen *Fusarium oxysporum* resistente Stämme der gelben Lupine. *Züchter* **15**: 31.

## Y

- Yamamoto, W., Omatsu, T., and Takami, K. (1954) Studies on the corm rots of *Crocus sativus* L. I. on saprophytic propagation of *Sclerotinia gladioli* and *Fusarium oxysporum* f. *gladioli* on various plants and soils. *Sci. Rep. Hyogo Univ. Agric* **1**: 64–70.
- Yang, K., Kim, H., Lee, W., and So, I. (1988) Studies on rhizome rot of ginger caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* and *Pythium zingiberum*. *Korean J. Plant Pathol.*
- Yoo, S., Watanabe, H., Kobayashi, K., Ogoshi, A., and Kodama, F. (1993) Vegetative compatibility grouping of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum* pathogenic to the Liliaceae. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.*
- Yu, T. and Fang, C. (1948) Fusarium diseases of broad bean. III. Root-rot and wilt of broad beans caused by two new forms of Fusarium. *Phytopathology* **38**: 507–594.

## Z

- Zentmeyer, G. (1955) A laboratory method for testing some fungicides with *Phytophthora cinnamomi* as organism. *Phytopathology* **45**: 398–404.
- Zhou, X., Everts, K., and Bruton, B. (2010) Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing Fusarium wilt in watermelon. *Plant Dis.* **94**: 92–98.



# Annexes

## Annexe 1 : Liste des formes spéciales et races de *Fusarium oxysporum*.

Forme spéciale	Race	Plante hôte	Référence
<i>adzukicola</i>	1	<i>Vigna angularis</i> (haricot rouge du Japon)	Kitazawa, 1989
	2		
	3		
<i>adzuki</i>	Aucune	<i>Glycines max</i> (soja)	John <i>et al.</i> , 2010
<i>aechmea</i>	Aucune	<i>Aechmea fasciata</i>	Rongyi <i>et al.</i> , 2003
<i>albedinis</i>	Aucune	<i>Phoenix dactylifera</i> (palmier dattier)	Killian and Maire, 1930
<i>allii</i>	Aucune	<i>Allium chinense</i> (oignon de Chine), <i>Allium sativum</i> (ail)	Matsuo <i>et al.</i> , 1979; Yoo <i>et al.</i> , 1993
<i>angsanae</i>	Aucune	<i>Pterocarpus indicus</i> (amboine)	Ploetz, 2006a
<i>anoectochili</i>	Aucune	<i>Anoectochilus formosanus</i> (orchidée)	Huang <i>et al.</i> , 2014
<i>apii</i>	1	<i>Apium graveolens</i> (céleri jaune)	Schneider and Norelli, 1981
	2	<i>Apium graveolens</i> (céleri jaune et céleri vert)	
	3	<i>Apium graveolens</i> (céleri vert)	
<i>arctii</i>	Aucune	<i>Arctium lappa</i> (grande bardane)	Matsuo <i>et al.</i> , 1975
<i>asparagi</i>	Aucune	<i>Asparagus officinalis</i> (asperge)	Cohen and Heald, 1941
<i>basilici</i>	Aucune	<i>Ocimum basilicum</i> (basilic)	Chiocchetti <i>et al.</i> , 2001
<i>batatas</i>	0	<i>Ipomoea batatas</i> (patate douce); <i>Nicotiana tabacum</i> (tabac)	Clark <i>et al.</i> , 1998; Katan and Di Primo, 1999
	1	<i>Ipomoea batatas</i> (patate douce)	
<i>benincasae</i>	Aucune	<i>Benincasa hispida</i> (courge cireuse)	Wu <i>et al.</i> , 1995
<i>betae</i>	Aucune	<i>Amaranthus retroflexus</i> (amarante réfléchie), <i>Anethum graveolens</i> (aneth), <i>Beta vulgaris</i> (betterave sucrière), <i>Brassica nigra</i> (moutarde noire) <i>Chenopodium album</i> (chénopode blanc)	Gross and Leach, 1973; Mc Donald and Leach, 1976; Harveson and Rush, 1997
<i>bouvardiae</i>	Aucune	<i>Bouvardia longiflora</i>	Marziano <i>et al.</i> , 1987
<i>callistephi</i>	Aucune	<i>Callistephus chinensis</i> (aster de Chine); <i>Rhus</i> sp.	Snyder and Hansen, 1940; Armstrong and Armstrong, 1981
<i>canariensis</i>	Aucune	<i>Phoenix canariensis</i> (dattier des Canaries)	Mercier and Louvet, 1973
<i>cannabis</i>	Aucune	<i>Cannabis sativa</i> (chanvre)	Noviello and Snyder, 1962
<i>capsici</i>	Aucune	<i>Capsicum annuum</i> (poivron)	Rivelli, 1989
<i>carthami</i>	Aucune	<i>Carthamus tinctorius</i> (safran des teinturiers)	Klisiewicz and Houston, 1962
<i>cattleyae</i>	Aucune	<i>Cattleyae</i> sp. (orchidée)	Foster, 1955

Annexe 1 : Liste des formes spéciales et races de *Fusarium oxysporum*.

<i>cepae</i>	Aucune	<i>Allium cepa</i> (oignon); <i>Allium fistulosum</i> (ciboule)	Snyder and Hansen, 1940; Takakuwa <i>et al.</i> , 1977
<i>chrysanthemi</i>	1	<i>Argyranthemum frutescens</i> (marguerite de Paris), <i>Chrysanthemum morifolium</i> (chrysanthème), <i>Gerbera jamesonii</i> (gerbera), <i>Osteospermum</i> sp.	Armstrong <i>et al.</i> , 1970; Huang <i>et al.</i> , 1992; Minuto <i>et al.</i> , 2007
	2		
	3		
<i>ciceris</i>	0	<i>Cicer</i> sp.	Haware and Nene, 1982; Jimenez-Diaz <i>et al.</i> , 1989; Jimenez-Diaz <i>et al.</i> , 1993; Kaiser <i>et al.</i> , 1994
	1A		
	1B/C		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
<i>cichorii</i>	Aucune	<i>Cichorium intybus</i> (chicorée sauvage)	Poli <i>et al.</i> , 2012
<i>citri</i>	Aucune	<i>Citrus</i> sp.	Timmer, 1982
<i>colocasiae</i>	Aucune	<i>Colocasia esculenta</i> (taro)	Nishimura and Kudo, 1994
<i>conglutinans</i>	1	<i>Brassica oleracea</i> (chou pommé), <i>Diplotaxis</i> sp., <i>Eruca vesicaria</i> (roquette cultivée), <i>Valerianella</i> sp.	Smith, 1899; Garibaldi <i>et al.</i> , 2003; Gilardi <i>et al.</i> , 2008
	2		
<i>crassulae</i>	Aucune	<i>Crassula ovata</i> (arbre de Jade)	Ortu <i>et al.</i> , 2013
<i>croci</i>	Aucune	<i>Crocus</i> sp. (crocus)	Boerema and Hamers, 1989
<i>cubense</i>	1	<i>Musa</i> sp. (Gros Michel)	Ploetz, 2006b; Ploetz, 2006a
	2	<i>Musa</i> sp. (Bluggoe)	
	4	<i>Musa</i> sp. (Cavendish)	
	tropical race 4	<i>Musa</i> sp.	
<i>cucumerinum</i>	1	<i>Cucumis sativus</i> (concombre)	Owen, 1956; Armstrong <i>et al.</i> , 1978
	2		
	3		
<i>cumini</i>	Aucune	<i>Cuminum cyminum</i> (cumin)	Patel <i>et al.</i> , 1957
<i>cyclaminis</i>	Aucune	<i>Cyclamen</i> sp. (cyclamen)	Gerlach, 1954
<i>delphinii</i>	Aucune	<i>Delphinium</i> sp.	Laskaris, 1949
<i>dianthi</i>	1	<i>Dianthus caryophyllus</i> (œillet)	

Annexe 1 : Liste des formes spéciales et races de *Fusarium oxysporum*.

	2		Cuboni, 1908; Garibaldi, 1977; Garibaldi, 1981; Wright <i>et al.</i> , 1996; Baayen <i>et al.</i> , 1997
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
	9		
	10		
	11		
<i>echeveriae</i>	Aucune	<i>Echeveria</i> sp.	
<i>elaeidis</i>	Aucune	<i>Elaeis guineensis</i> (palmier à huile)	Renard <i>et al.</i> , 1972
<i>erucac</i>	Aucune	<i>Eruca sativa</i> (roquette)	Chatterjee and Rai, 1974
<i>erythroxyli</i>	Aucune	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Sands <i>et al.</i> , 1997
<i>eustomae</i>	Aucune	<i>Eustoma grandiflorum</i> (lisianthus)	Hahm, 1998
<i>fabae</i>	Aucune	<i>Vicia faba</i> (fève, féverolle)	Yu and Fang, 1948
<i>fatshederae</i>	Aucune	<i>x Fatshedera lizei</i>	Triolo and Lorenzini, 1983
<i>fragariae</i>	Aucune	<i>Fragaria x ananassa</i> (fraisier)	Winks and Williams, 1965
<i>gerberae</i>	Aucune	<i>Gerbera</i> sp. (gerbera)	van Arx, 1952
<i>gladioli</i>	1	<i>Freesia</i> sp. (freesia), <i>Gladiolus</i> sp. (glaïeul), <i>Iris</i> sp. (iris), <i>Ixia</i> sp. (ixia)	Massey, 1926; McClellan, 1945; Roebroek and Mes, 1992
	2		
<i>glycines</i>	Aucune	<i>Glycines max</i> (soja)	Moussa and Hague, 1988
<i>hebes</i>	Aucune	<i>Hebe</i> sp.	Raabe, 1957; Raabe, 1985
<i>heliconiae</i>	Aucune	<i>Heliconia</i> sp.	Waite, 1963; Ploetz, 2006a
<i>heliotropae</i>	Aucune	<i>Heliotropium</i> sp. (héliotrope)	Netzer et Weintal, 1987
<i>hyacinthi</i>	Aucune	<i>Hyacinthus</i> sp. (jacinthe)	Gullino, 2012
<i>koae</i>	Aucune	<i>Acacia koa</i> (koa)	Gardner, 1980
<i>lactucae</i>	1	<i>Lactuca</i> sp. (laitue)	Fujinaga <i>et al.</i> , 2001, 2003
	2		
	3		

Annexe 1 : Liste des formes spéciales et races de *Fusarium oxysporum*.

<i>lagenariae</i>	Aucune	<i>Lagenaria</i> sp.	Matsuo and Yamamoto, 1967; Armstrong and Armstrong, 1981
<i>lentis</i>	Aucune	<i>Lens culinaris</i> (lentille)	Khare, 1981
<i>lili</i>	Aucune	<i>Lilium</i> sp. (lys)	Imle, 1942
<i>lini</i>	Aucune	<i>Linum usitatissimum</i> (lin)	Broadfoot, 1926
<i>loti</i>	Aucune	<i>Lotus corniculatus</i> (lotier corniculé)	Wunsch <i>et al.</i> , 2009
<i>luffae</i>	Aucune	<i>Luffa</i> sp.	Kawai <i>et al.</i> , 1958
<i>lupini</i>	Aucune	<i>Lupinus</i> sp. (lupin)	Wuttke, 1943
<i>lycopersici</i>	1	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	Bohn and Tucker, 1940
	2		
	3		Grattidge and O'Brien, 1982
<i>matthiolae</i>	1	<i>Matthiola incana</i> (grande giroflée)	Baker, 1948; Correll, 1991
	2		
<i>medicaginis</i>	Aucune	<i>Medicago sativa</i> (luzerne)	Snyder and Hanson, 1940
<i>melongenae</i>	Aucune	<i>Solanum melongena</i> (aubergine)	Matuo and Ishigami, 1958
<i>melonis</i>	0	<i>Cucumis melo</i> (melon)	Leach and Currence, 1938; Risser and Mas, 1965; Risser <i>et al.</i> , 1976
	1		
	2		
	1-2 W		
	1-2 Y		
<i>momordicae</i>	Aucune	<i>Momordica charantia</i> (margose)	Sun and Huang, 1983
<i>narcissi</i>	Aucune	<i>Narcissus</i> sp. (narcisse)	McClellan and Stuart, 1947
<i>nicotianae</i>	Aucune	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabac)	Johnson, 1921
<i>niveum</i>	0	<i>Citrullus lanatus</i> (pastèque)	Crall, 1963
	1		Armstrong and Armstrong, 1978
	2		Netzer, 1976
	3		Zhou <i>et al.</i> , 2010
<i>opuntiarum</i>	Aucune	<i>Cereus</i> sp., <i>Echinocactus</i> sp. (coussin de belle-mère), <i>Ferocactus</i> sp., <i>Mammillaria zeilmanniana</i> , <i>Notocactus</i> sp., <i>Opuntia</i> sp. (cactus raquette), <i>Schlumbergera truncata</i> (cactus de Noël)	Gerlach, 1972; Lops <i>et al.</i> , 2013; Safaiefarahani and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2014; Garibaldi <i>et al.</i> , 2016
<i>orthoceras</i>	Aucune	<i>Orobanche</i> sp. (orobanche)	Boyette <i>et al.</i> , 1993

Annexe 1 : Liste des formes spéciales et races de *Fusarium oxysporum*.

<i>palmarum</i>	Aucune	<i>Phoenix canariensis</i> (dattier des Canaries), <i>Syagrus romanzoffiana</i> (cocotier plumeux), <i>Washingtonia robusta</i> ,	Elliott, 2011; Elliott <i>et al.</i> , 2010
<i>papaveris</i>	Aucune	<i>Papaver nudicaule</i> (pavot d'Islande)	Katan and Di Primo, 1999; Ortu <i>et al.</i> , 2015b
<i>passiflorae</i>	Aucune	<i>Passiflora</i> spp.	McKnight, 1951
<i>perniciosum</i>	Aucune	<i>Ailanthus altissima</i> (ailante glanduleux), <i>Albizia julibrissin</i> (arbre à soie)	Toole, 1941; Ding <i>et al.</i> , 2006
<i>phaseoli</i>	1	<i>Phaseolis vulgaris</i> (haricot)	Harter, 1929, Woo <i>et al.</i> , 1996; Alves-Santos <i>et al.</i> , 2002
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
<i>pini</i>	Aucune	<i>Abies pindrow</i> ; <i>Pinus resinosa</i> (pin rouge); <i>Pinus wallichiana</i> (pin de l'Himalaya)	Snyder and Hansen, 1940; Duchesne <i>et al.</i> , 1988; Dar <i>et al.</i> , 2011, 2013
<i>pisi</i>	1	<i>Pisum sativum</i> (pois)	Lindford, 1928; Haglund and Kraft, 1970, 1979; Haglund and Pepin, 1987
	2		
	5		
	6		
<i>psidii</i>	Aucune	<i>Psidium guajava</i> (goyavier)	Prasad <i>et al.</i> , 1952
<i>pyranthae</i>	Aucune	<i>Pyracantha</i> sp. (buisson ardent)	Gullino <i>et al.</i> , 2015
<i>radicis-capsici</i>	Aucune	<i>Capsicum annuum</i> (poivron)	Lomas-Cano <i>et al.</i> , 2014
<i>radicis-cucumerinum</i>	Aucune	<i>Cucumis melo</i> (melon), <i>Cucumis sativus</i> (concombre)	Vakalounakis, 1996; Punja <i>et al.</i> , 2000
<i>radicis-lycopersici</i>	Aucune	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	Jarvis and Shoemaker, 1978
<i>radicis-vanillae</i>	Aucune	<i>Vanilla</i> sp. (vanille)	Koyyappurath <i>et al.</i> , 2015
<i>ranunculi</i>	Aucune	<i>Ranunculus asiaticus</i> (renoncule des fleuristes)	Garibaldi and Gullino, 1985
<i>rapae</i>	Aucune	<i>Brassica rapa</i>	Enya <i>et al.</i> , 2008
<i>raphani</i>	Aucune	<i>Diplotaxis</i> sp., <i>Eruca vesicaria</i> (roquette cultivée), <i>Raphanus sativus</i> (radis)	Bosland and Williams, 1987; Catti <i>et al.</i> , 2007
<i>ricini</i>	Aucune	<i>Ricinus communis</i> (ricin commun)	Sviridov, 1990
<i>rosellae</i>	Aucune	<i>Hibiscus sabdariffa</i> (roselle)	Ooi and Salleh, 1999
<i>sesami</i>	Aucune	<i>Sesamum indicum</i> (sésame)	Gordon, 1965

Annexe 1 : Liste des formes spéciales et races de *Fusarium oxysporum*.

<i>simmondsia</i>	Aucune	<i>Simmondsia chinensis</i> (jojoba)	Tsrer <i>et al.</i> , 2007
<i>spinaciae</i>	Aucune	<i>Spinacia oleracea</i> (épinard)	Bassi and Goode, 1978
<i>strigae</i>	Aucune	<i>Striga</i> spp. (striga)	Elzein <i>et al.</i> , 2008
<i>tracheiphilum</i>	1	<i>Chrysanthemum</i> sp. (chrysanthème); <i>Gerbera</i> sp. (gerbera), <i>Vigna unguiculata</i>	Snyder and Hansen, 1940, Armstrong and Armstrong, 1950; Hare, 1953; Patel, 1985; Smith <i>et al.</i> , 1999; Troisi <i>et al.</i> , 2010
	2		
	3		
	4		
<i>tuberosi</i>	Aucune	<i>Solanum tuberosum</i> (pomme de terre)	Nelson <i>et al.</i> , 1981
<i>tulipae</i>	Aucune	<i>Tulipa</i> sp. (tulipe)	Munk and Beijer, 1971
<i>vasinfectum</i>	Aucune	<i>Gossypium</i> sp.	Atkinson, 1892; Cianchetta and Davis, 2015
<i>voandzeiae</i>	Aucune	<i>Voandzeia subterranea</i> (pois de terre)	Armstrong <i>et al.</i> , 1975
<i>zingiberi</i>	Aucune	<i>Zingiber officinale</i> (gingembre)	Yang <i>et al.</i> , 1988

## Annexe 2 : Composition des milieux utilisés dans cette étude.

- **Carnation Leaf Agar (CLA)**

20 mg/L agar

Déposer un morceau de feuille d'œillet stérile sur milieu coulé.

- **CMA**

17 g/L CMA

- **Glycérol ¼**

250 mL/l glycérol

- **Komada (Komada, 1975)**

20 g/L galactose

15 g/L agar

2 g/L asparagine

1 g/L hydrogénophosphate de potassium

0,5 g/L chlorure de potassium

0,5 g/L heptahydrate de sulfate de magnésium

Après autoclavage 40 min à 110 °C, ajouter :

10 gouttes/L tween

1 g/L pentachloronitrobenzène

0,5 g/L bile bovine

0,5 g/L tétraborate de sodium

0,5 g/L streptomycine

Qsp 20 mL eau permutée

Ajuster au pH 5,5.

- **Luria Bertani (LB)**

10 g/L bacto-tryptone

5 g/L extrait de levure

5 g/L chlorure de sodium

- **Malt liquide**

15 g/L extrait de malt

- **Levure Peptone Glucose Agar (LPGA) avec cycloheximide**

15 g/L agar

10 g/L glucose

5 g/L peptone de gélatine

5 g/L extrait de levure

100 mg/L cycloheximide

- **Malt agar**

15 g/L extrait de malt

10 g/L agar

- **Malt agar streptomycine**

1 % agar

1 % malt

300 mg/L streptomycine sulfate

250 mg/L pentachloronitrobenzène

- **Malt agar acide antibiotique**

15 g/L extrait de malt

250 mg/L acide citrique

100 mg/L streptomycine

50 mg/L chlortetracycline

10 g/L agar

- **Malt agar triton**

15 g/L extrait de malt

10 g/L agar

250 mg/l acide citrique

3 mL/L de triton

- **Potato Dextrose Agar (PDA)**

39 g/L PDA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA)

- **Potato Dextrose Broth (PDB)**

24 g/L PDB (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA)

Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN de *Fusarium* :  
minipréparation.



Institut National de la Recherche Agronomique

UMR MSE

Microbiologie du Sol et de l'Environnement

17 rue Sully – BP86510

21065 Dijon Cedex

## MODE OPERATOIRE

Code : **MO-048**

### Extraction d'ADN de

*Fusarium* :

**minipréparation**

Date d'émission : juillet 2005

Date de révision : 09/12/2011

Version : 2

Nombre de pages : 2

Suivi des modifications du mode opératoire : ce MO correspond à MO-97-Minipr-1 (1997). Modification par rapport à la version 1 : volume et temps de centri.

1- Mots clés : extraction ADN, *Fusarium*, minipréparation

2- Objectif / Principe :

Ce mode opératoire décrit une méthode rapide d'extraction d'ADN de *Fusarium* utilisable dans des réactions d'amplification par PCR (polymerase chain reaction).

3- Référence :

Edel, V., C. Steinberg, N. Gautheron, G. Recorbet, C. Alabouvette. 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. FEMS Microbiology Ecology 36:61-71.

4- Durée de l'expérience : ½ jour

5- Matériel nécessaire : bain-marie à 65°C, centrifugeuse pour microtubes

#### Produits nécessaires :

- Tampon de lyse :
  - ✓ 50 mM Tris-HCl pH 7,5
  - ✓ 50 mM EDTA
  - ✓ 3% SDS
- Tampon TE :
  - ✓ Tris HCl 10 mM pH 8
  - ✓ EDTA 1 mM
- Acétate d'ammonium 7,5 M
- Isopropanol : conservé à température ambiante
- Ethanol à 70% : conservé à -20°C.

Ces 3 solutions sont autoclavées à 120°C pendant 30 min ou à 110°C pendant 45 min et conservées à température ambiante. Elles sont ensuite utilisées dans des conditions non stériles.

6- Méthode :

Cultiver chaque souche de *Fusarium* sur milieu potato dextrose agar (MI-012) en petite boîte de Pétri (diamètre 5 cm) pendant 5 à 15 jours.

- Lyse

Pour chaque souche, déposer 1 ml de tampon de lyse dans la boîte de Pétri. Gratter la surface de la culture fongique à l'aide d'une spatule plate. Dans un microtube de 1,5 ml, récupérer le mélange mycélium-spores-tampon de lyse (500 µl minimum). Après chaque souche, essuyer la spatule avec un mouchoir en papier puis la flamber.

Rédigé par : Véronique Edel-Hermann	Vérifié par : Nadine Gautheron	Approuvé par : Dominique Chêneby
Révisé par : Véronique Edel-Hermann	Vérifié par : Nadine Gautheron	Approuvé par : Véronique Edel-Hermann

Lorsque les mélanges mycélium-spoires-tampon de lyse ont été prélevés pour toutes les souches, agiter tous les microtubes au vortex.

Incuber les microtubes au bain-marie à 65°C pendant 30 min (ce temps peut varier de 10 à 60 min). Agiter à nouveau les microtubes au vortex.

Centrifuger à 12000 g pendant 10 min à 15°C. Prélever la phase supérieure (environ 400 µl) et transférer dans un nouveau microtube. Pour cela, sortir au maximum 10 microtubes de la centrifugeuse, prélever les phases supérieures, puis sortir les 10 tubes suivants, etc.

- Précipitation des ADNs

Aux 400 µl de surnageant, ajouter 200 µl d'acétate d'ammonium 7,5 M et 600 µl d'isopropanol. Retourner les tubes pour mélanger (ne pas mélanger au vortex). Centrifuger 15 min à 12000 g à 4°C.

Verser les surnageants en retournant chaque microtube une seule fois (ne pas faire de va-et-vient envers-endroit). Ajouter 300 µl d'éthanol à 70% (conservé à -20°C). Centrifuger 5 min à 12000 g à 4°C.

Verser les surnageants en retournant chaque microtube une seule fois et laisser les microtubes à l'envers sur du papier absorbant. Après quelques minutes, retourner les microtubes sur un portoir, et laisser sécher les culots d'ADN à température ambiante ou à 37°C. Il est également possible de les sécher à l'aide d'un coton-tige. Lorsque les culots sont secs, ajouter 100 µl de tampon TE.

Stocker les suspensions d'ADN dans des microtubes à vis à 4°C.

## Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN de sol.

 <p>UMR MSE Microbiologie du Sol et de l'Environnement 17 rue Sully – BP86510 21065 Dijon Cedex</p>	<b>MODE OPERATOIRE</b>	Code : <b>MO-150</b>
	<b>Extraction d'ADN de 2 g de sol au Fast Prep et purification sur colonnes PVPP / Geneclean®</b>	Date d'émission : 04/04/2011 Date de révision : Version : 1 Nombre de pages : 8

Ce MO est un mix entre MO-142 (partie broyage/lyse, étapes 1 à 7) et MO-071 (partie purification).

**1- Mots clés** : Sol, ADN, microorganisme, extraction, purification, PCR.

### **2- Objectif/principe**

L'objectif est d'extraire l'ADN génomique total à partir de 2 g de sol. Il s'agit d'obtenir des ADN non dégradés et suffisamment purifiés pour qu'ils ne contiennent pas d'impuretés interférant avec les réactions enzymatiques (amplifications par PCR).

Le sol échantillonné est stocké congelé et n'est décongelé que dans le tampon d'extraction. La lyse est mécanique (agitation en présence de billes) et chimique : dénaturation des protéines et des lipides par l'action d'un détergent (SDS) à haute température suivie d'une précipitation des complexes protéines/lipides-SDS dénaturés. Les différents constituants du tampon d'extraction ont les rôles suivants : la forte concentration en EDTA permet de chélater la majorité des cations bivalents ( $Mg^{2+}$ ), cofacteur de nombreuses DNases ; la solution est tamponnée par du Tris pH 8,0, la concentration en NaCl limite les dénaturations partielles possibles de l'ADN à 70°C et libère de nombreuses interactions ADN-protéines ; le SDS facilite la lyse des membranes et la dénaturation des protéines. Pour séparer l'ADN des protéines dénaturées, la déprotéinisation consiste à précipiter les protéines en présence d'une forte concentration en sel. Cette méthode présente deux avantages : les interactions ADN-protéines sont bien détruites et les produits ne sont pas toxiques (contrairement aux solvants organiques, phénol et chloroforme). Les précipités sont séparés par centrifugation à haute vitesse. Le surnageant limpide contient les ADN. Une précipitation à l'isopropanol et un lavage à l'éthanol suivis de deux étapes de purifications finales (PVPP et Geneclean®) permettent d'éliminer d'éventuels éléments polluants (protéines, sucres, macromolécules phénoliques, acides humiques...). Le PVPP, polymère de haut poids moléculaire réalise un complexe avec les composés phénoliques et les alcaloïdes. L'ADN se lie aux colonnes de silice (GeneClean) en présence de fortes concentrations en sels puis est élué en faibles concentrations en sels.

### **3- Consignes de sécurité**

- **Porter obligatoirement une blouse fermée et des gants,**
- **Utiliser obligatoirement un masque à poussières (Ref D. Dutscher 062007, disponible dans le labo 132) pour peser les microbilles de verre et l'acétate de potassium,**
- **Manipuler obligatoirement l'isopropanol sous sorbonne.**

### **4- Durée de l'expérience**

12 à 18 échantillons peuvent être traités simultanément en 1 jour. Les colonnes de purification peuvent être préparées avant l'expérience et conservées à 4°C pendant plusieurs jours (Annexe 2). L'étape 1 du mode opératoire doit être réalisée la veille.

### **5- Matériel et produits**

Préparation des solutions utilisées : description en **annexe 1**.

Matériel spécifique : agitateur FastPrep -24. Voir instruction I-079.

Consommable particulier : Tubes Falcon de 15mL adaptés à l'appareil FastPrep -24.

Rédigé par : V. Edel-Hermann	Vérifié par : N. Gautheron	Approuvé par : V. Edel-Hermann
------------------------------	----------------------------	--------------------------------

## 6- Mode opératoire

### Remarques préliminaires :

- **La veille de l'extraction** : les tubes de billes (étape 1) sont préparés avant le jour de l'extraction pour être incubés à -20°C.
- Régler le bain-marie à 70°C avant les pesées.
- Manipuler les échantillons dans la glace. **Porter des gants.**
- Pré-incuber tous les microtubes dans la glace (sauf pour la purification GeneClean)

<b>Etapes 1 à 7 : phase d'extraction : Broyage/Lyse</b>
---

**IMPORTANT** : Les sols doivent être sortis et conservés dans de la glace le temps des pesées pour éviter de modifier le milieu biologique qu'ils contiennent.

#### 1- Dans un tube Falcon 15ml :

Peser, sur une feuille de papier aluminium, 4 g de billes de 0,1mm en silice. **Porter un masque à poussières.**

Peser dans un Bécher en verre 5 g de billes de 1,4 mm de diamètre en céramique.

Ajouter à la pince 8 billes de verre de 4 mm de diamètre en verre.

**Mettre les tubes de billes à -20°C la veille de l'extraction.**

#### 2- Préparer le tampon de lyse en bonnes proportions :

<u>Concentrations finales</u>	<u>Proportions de tampon :</u>	<u>Rôles des produits :</u>	<u>Pour 100 ml</u>
Tris-HCl 100 mM pH 8	1 ml Tris 1 M pH8	Rôle tamponneur à pH8	10 ml
EDTA 100 mM pH 8	2 ml EDTA 0,5 M pH8	Chélateur des cations bivalents	20 ml EDTA
NaCl 100mM	1 ml NaCl 1 M	Interactions ADN-protéines	10 ml NaCl
SDS 2%	1 ml SDS 20%	Lyse membranaire	10 ml SDS
H <sub>2</sub> O UP	5 ml H <sub>2</sub> O UP		50 ml H <sub>2</sub> O

#### 3- Peser **2g de sol** sur une feuille de papier aluminium puis les transvaser dans les tubes Falcon 15ml contenant les billes ; ou peser directement les 2 g de sol dans le tube contenant les billes.

Ajouter **8 ml** de tampon par échantillon.

Agiter immédiatement le tube pour éviter la création d'un « bouchon » de sol et décoller le sol et les billes du fond de la cupule.

#### 4- Agiter les cupules une à une dans l'agitateur FastPrep -24 à 4 m/sec pendant 90 secondes. **Soit 3 fois 30 secondes**. ATTENDRE 5 minutes entre chaque série de 12 échantillons.

#### 5- Après avoir vortexer les tubes, incuber les au bain-marie à 70°C pendant 30 min, avec agitation au vortex au bout de 15 et 30 minutes.

#### 6- Centrifuger à 7000 g pendant 5 min à 15-20°C pour éviter la cristallisation du SDS.

#### 7- Dès la fin de la centrifugation récupérer 1 ml de surnageant dans un microtube de 1,5 ml. Le reste du surnageant est versé dans un tube de 15ml et conservé à -20°C pour des ré-extractions futures.

## Etapes 8 à 19 : phase de purification

### Déprotéinisation

**8-** Ajouter  $1/10^{\text{ème}}$  du volume d'acétate de potassium 5M. Agiter en retournant 2 fois les tubes. Incuber les tubes dans la glace pendant 15 min.

*Cette étape permet la précipitation des protéines, le froid favorise la formation de cristaux qui vont piéger les protéines.*

**9-** Centrifuger à 14000g pendant 10 min à 4°C, récupérer le surnageant avec une pipette dans un tube de 2 ml froid (on récupère 850 µl à 900 µl de surnageant, variable selon les sols).

*Cette étape de centrifugation à haute vitesse permet d'obtenir un surnageant clair contenant l'ADN et débarrassé des particules en suspension.*

### Précipitation

**10-** Ajouter 1 volume d'isopropanol à -20°C **sous sorbonne**, retourner doucement les tubes 2 fois.

*L'ADN précipite.*

**11-** Placer à -20°C pendant 15 min minimum (ou une nuit à -20°C).

*L'extraction peut être interrompue et reprise plus tard.*

### Lavage

**12-** Centrifuger à 15000 g pendant 20 min à 4°C.

**13-** Eliminer le surnageant avec précaution **sous sorbonne** (retourner les tubes, les maintenir retournés sans va-et-vient, éponger le col des tubes, puis les redresser).

**14-** Laver le culot d'ADN : ajouter 300 µL d'éthanol 70° à -20°C, retourner doucement les tubes une fois, centrifuger à 15000 g pendant 5 min à 4°C.

**15-** Eliminer l'alcool de la même façon qu'à l'étape 13 sans redresser les tubes, les maintenir inversés pendant 5 min, éliminer les restants d'alcool sur les parois des tubes à l'aide d'un coton-tige si nécessaire, sécher les culots d'ADN à l'étuve à 37°C pendant 15 min ou plus si nécessaire (jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'alcool).

### Reprise du culot d'ADN

**16-** Resuspendre le culot d'ADN dans 200 µL de **Tris 10 mM pH 8** : laisser les tubes sur la paillasse pour dissoudre le culot, puis homogénéiser la solution d'ADN à l'aide d'une micropipette en aspirant et refoulant la solution très délicatement. Noter la couleur des solutions d'ADN.

Un ADN dit « non purifié » ou « sale » est obtenu : 100µl seront utilisés pour la suite du mode opératoire (purification) ; les autres 100µl serviront à la quantification sur gel agarose 1% et le restant sera conservé à 20°C pour une purification ultérieure si nécessaire.

*L'ADN non purifié peut être stocké une nuit à 4°C voire un week-end MAXIMUM.*

**17-** Estimer la concentration des ADN sur gel d'agarose par comparaison à une gamme d'ADN (voir **annexe 4 et MO-047**) : déposer 10 µl d'ADN non purifiés, 10 µl d'ADN non purifiés dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  (10 µl d'ADN + 90 µl d'eau UP) : ceci permet de s'assurer d'être dans la gamme d'ADN de thymus de veau ; mais les 2 dilutions ne sont pas nécessaires si les sols sont déjà connus. Pour chaque série d'ADN déposer dans l'ordre :

- 2 µl de 1 Kb

- une gamme d'ADN de thymus de veau : 25 ng = 2.5 µl D2

50 ng = 5 µl D2

100 ng = 10 µl D2

125 ng = 12.5 µl D2

150 ng = 15 µl D2

- la série d'ADN : 10 µl ADN + 2 µl bleu de dépôt ; puis finir par 2 µl de 1 Kb

Gel d'agarose à 1 %, migration 1 h à 100 V.

Pour quantifier les ADN à l'aide de Bioprofil 1D : entourer les pistes d'ADN jusqu'à 1 kb.

*Rq. Ce gel de quantification est généralement effectué à la fin de l'extraction pour quantifier en même temps les ADN purifiés.*

## **Purification**

### **18- 1<sup>ère</sup> purification des ADN : sur colonne de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) :**

Utilisation de colonnes de PVPP préparées selon **annexe 2**. *Manipuler dans la glace.*

Enlever l'embout inférieur de la colonne et centrifuger à 2000 g pendant 4 min à 10°C.

Placer un microtube (à vis) propre sous la colonne.

Déposer l'ADN doucement au centre de la colonne, fermer la colonne avec le capuchon.

Laisser l'ADN pénétrer pendant 5 min dans la colonne.

Centrifuger à 2000 g pendant 4 min à 10°C.

Récupérer la solution d'ADN dans le tube en sortie de colonne.

### **19- 2<sup>ème</sup> purification des ADN sur colonne de PVPP**

Répéter la purification décrite à l'étape 17 sur une nouvelle colonne de PVPP.

(Cette 2<sup>ème</sup> purification peut éventuellement être supprimée si les solutions d'ADN sont parfaitement limpides en sortie de première colonne de PVPP).

### **20- Purification des ADN sur colonne Geneclean®** *Manipuler à température ambiante*

Mesurer le volume de solution d'ADN récupéré après la purification sur colonnes de PVPP.

Ajouter 5 volumes de solution GTGNSS (GeneClean Turbo GNomic Salt Solution).

Déposer le mélange dans une colonne de purification (dans un tube vide fourni dans le kit).

Centrifuger pendant 20 s à 10000 g 20°C. Vider le tube.

Ajouter 500 µL de GTW (GeneClean Turbo Wash) dans la colonne.

Centrifuger pendant 20 ss à 10000 g 20°C. Vider le tube.

Recommencer une fois le lavage avec 500 µL de GTW, centrifuger pendant 20 s à 10000 g.

Vider le tube et centrifuger à vide pendant 4 min à 10000 g pour éliminer l'alcool.

Enlever le capuchon d'un nouveau tube de 1,5 mL (fourni dans le kit), placer la colonne dans ce tube.

Ajouter 30 µL de GTE (GeneClean Turbo Elution Solution) dans la colonne.

Laisser reposer 5 min à température ambiante. Centrifuger pendant 1 min à 10000 g et récupérer la solution d'ADN en sortie de colonne.

Faire une 2<sup>ème</sup> élution avec 30 µL de GTE.

### **21- Estimer la concentration des solutions d'ADN purifié de la même façon qu'à l'étape 17 en déposant 10 µl d'ADN purifié.**

### **22- Aliquoter les solutions pour éviter de décongeler/recongeler les aliquots trop souvent par la suite : 3 tubes de 10 µl et 1 tube contenant le restant. Stocker les solutions d'ADN à -20°C.**

## ANNEXES

### **Annexe 1. Références et conditions de stockage des produits, préparation des solutions stock**

- Billes de verre de 4 mm : stériliser par autoclavage (à sec)
- Billes de 1.4mm : stériliser par autoclavage (à sec)
- Billes de 106 µm (lavées à l'HCl) : Glass beads acid washed 106 µm (Sigma Ref. G4649) à stériliser par autoclavage à sec
- Isopropanol : à conserver à -20°C
- Ethanol absolu 70°C : à conserver à -20°C
- **GeneClean Turbo kit** (Q-BIOgene, Ref. 1102-400), conserver à température ambiante.

#### Préparation des solutions stock :

- + SDS 20%                      + NaCl 1 M                      + Acétate de potassium 5 M
- + Tris-HCl 1 M pH 8           + EDTA 0,5 M pH 8           + Tampon TE pH 8

- Utilisation d'H<sub>2</sub>O ultrapure (UP) pour la préparation des solutions
- Conservation des solutions stock à température ambiante pendant plusieurs mois
- Les références des produits sont données à titre indicatif

#### + SDS 20 % : 100 mL

SDS (Lauryl Sulfate) : Sigma Ref. L-4390

- ① 20 g SDS + H<sub>2</sub>O : qsp 90 mL
- ② Dissoudre au four à micro-ondes
- ③ + H<sub>2</sub>O : qsp 100 mL

Stérilisation pas nécessaire, ne pas autoclaver, conserver à température ambiante.

#### + NaCl 1 M : 100mL

NaCl : Prolabo Ref. 27.810.364 [58,44 g/mol]

- ① 5,84 g NaCl + H<sub>2</sub>O : qsp 100 mL
- ② Autoclavage pendant 20 min à 120°C, conserver à température ambiante.

#### + Tris HCl 1 M pH 8 : 100 mL

Tris : Prolabo Ref. 33.621.260 [121,44 g/mol]

- ① 12,14 g Tris + H<sub>2</sub>O : qsp 90 mL
- ② pH 8 ajusté avec HCl concentré (Prolabo, 33 % = 10 N)
- ③ + H<sub>2</sub>O : qsp 100 mL
- ④ pH 8 réajusté
- ⑤ Autoclavage pendant 20 min à 120°C, conserver à température ambiante.

#### + EDTA 0,5 M pH 8 : 200 mL

EDTA : Sigma Ref. E5134 [372,2 g/mol]

- ① 37,22 g EDTA + H<sub>2</sub>O : qsp 180 mL
- ② pH 8 ajusté avec pastilles NaOH (Normapur Prolabo Ref. 28.244.295)  
Remarque : NaOH nécessaire pour dissolution
- ③ + H<sub>2</sub>O : qsp 200 mL
- ④ pH 8 réajusté

⑤ Autoclavage pendant 20 min à 120°C, conserver à température ambiante.

#### + Acétate potassium 5M : 100 mL. Porter un masque à poussières.

Acétate de potassium : Sigma Ref. P-1190 (98,14 g/mol)

Préparation selon "Molecular Cloning - A Laboratory Manual". 2001. Sambrook & Russell, p. A1.28

- ① Préparer 60 mL d'acétate de potassium 5 M : 29,44 g d'acétate de potassium + H<sub>2</sub>O qsp 60 ml
- ② Ajouter 11,5 mL d'acide acétique glacial
- ③ Ajouter 28,5 mL d' H<sub>2</sub>O
- ④ Autoclaver pendant 20 min à 120°C

↳ La solution ainsi obtenue est 3M en potassium et 5M en acétate.

- + Tampon TE pH 8 : 100 mL [Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8]  
1 mL [Tris HCl 1M] pH8 + 0,2 mL [EDTA 0,5 M] + H<sub>2</sub>O : qsp 100 mL.

## **Annexe 2. Préparation des colonnes de PVPP (prévoir 2 colonnes par échantillon de sol)**

Consommable : Utilisation de colonnes vides Biorad :

- Micro Bio-Spin columns, Ref. 732-6204 (quantité 100)
- End caps for Micro Bio-spin columns, Ref. 731-1660 (quantité 100)

Produits

- PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) Sigma Ref. P6755, conservation à t° ambiante
- H<sub>2</sub>O ultrapure

Remarques préliminaires

Manipuler les colonnes sur la glace. **Porter des gants.**

Fermer les capuchons des colonnes pendant les centrifugations

### Préparation des colonnes de PVPP

- ① Ouvrir le bas de la colonne en cassant l'embout inférieur, placer la colonne dans un microtube de 2 mL. Ajouter 93 à 95 mg de PVPP (équivalent 1,2 cm de hauteur).
- ② 1<sup>er</sup> lavage : ajouter 400 µL d'H<sub>2</sub>O, fermer la colonne avec son capuchon et centrifuger pendant 2 min à 2000 g à 10°C. Vider le tube.
- ③ 2<sup>ème</sup> lavage : ajouter 400 µL d'H<sub>2</sub>O, fermer la colonne avec son capuchon et centrifuger pendant 2 min à 2000 g à 10°C. Vider le tube.
- ④ Obturer le bas de la colonne avec un embout jaune, ajouter 400 µL d'H<sub>2</sub>O dans la colonne.
- ⑤ Conserver les colonnes fermées à 4°C pendant 1 semaine maximum.

## **Annexe 4. Préparation de la gamme d'ADN de thymus de veau pour luanification des ADN sur gel d'agarose**

ADN de thymus de veau de Biorad Ref 1702480 : solution commerciale à 1 mg/ml, aliquotée et conservée à -20°C.

Faire deux dilutions :

- D1 = 50 ng/µl (50µl ADN 1 mg/ml + 750 µl TE pH8 + 200 µl bleu dépôt)
- D2 = 10 ng/µl (10µl ADN 1 mg/ml + 790 µl TE pH8 + 200 µl bleu dépôt)

Les dilutions sont conservées à 4°C pendant un mois maximum. Au-delà, elles sont jetées et réparées.

Annexe 5 : Protocole de clonage.

 <p>Institut National de la Recherche Agronomique</p> <p>UMR MGS Microbiologie et Géochimie des Sols 17 rue Sully – BP86510 21065 Dijon Cedex</p>	<h2>MODE OPERATOIRE</h2>	Code : MO-054
	<p><b>Clonage d'un fragment d'ADN dans le vecteur pGEM®-T easy et transformation de cellules compétentes JM109. (Kit pGEM®-T easy vector systems II, Promega)</b></p>	Date d'émission : juillet 2005 Version : 1 Nombre de pages : 5

Suivi des modifications du mode opératoire : ce MO correspond à MO-00-Clonage-1

1- Mots clés : clonage, transformation, recombinant, vecteur, insert

2- Objectif / Principe :

Clonage d'un produit PCR dans le vecteur pGEM-T easy et transformation de cellules compétentes JM109.

3- Référence :

Promega : Kit pGEM®-T easy vector systems II, technical manual.

4- Durée de l'expérience :

L'expérience s'étale sur deux à trois jours.

5- Matériel nécessaire :

Hotte à flux laminaire (PSM), une étuve (37°C), un bain marie (42°C), glace, réactifs et milieux de culture en annexe.

6- Méthode :

**■ Clonage d'un produit de PCR dans le vecteur pGEM-T : ligation**

Dans la plupart des cas les inserts correspondent à des produits d'amplification obtenus par PCR.

Il est recommandé de les avoir préalablement vérifiés (Agarose), purifiés et dosés (Agarose ou UV 260 nm) avant la ligation dans le vecteur.

Soit **C** (ng.µl<sup>-1</sup>) leur concentration.

Les conditions de ligation se font dans un **rapport molaire insert : vecteur de 3 :1**.

La quantité d'insert **Q** (en ng) à introduire est calculée suivant la formule :

$$Q \text{ (ng)} = [(\text{qté vecteur} \times \text{taille insert}) / \text{taille vecteur.}] \times (3/1)$$

Etant donné que la taille du vecteur est de 3 kb et que l'on en utilise toujours 50 ng par réaction, la formule se simplifie donc à :

$$Q \text{ (ng)} = (50 \times \text{taille insert})$$

Rédigé par : David Bru	Vérifié par : Alain Hartmann	Approuvé par : Dominique Chêneby
---------------------------	---------------------------------	-------------------------------------

Exemple de calcul :

Ainsi, si l'insert que l'on souhaite cloner fait 0,6 kb ; la quantité d'insert à introduire dans le volume réactionnel de ligation correspondra à :

$$Q = 50 \times 0.6 = 30 \text{ ng}$$

### Conditions de ligation :

Produit	Volume à introduire
Volume insert	$V (\mu\text{l}) = \frac{Q (\text{ng})}{C (\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1})}$
Vecteur	1 $\mu\text{l}$ (50 ng)
Tampon 2X	5 $\mu\text{l}$
T4 DNA ligase (3U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O stérile	Qsp 10 $\mu\text{l}$

Garder 1 $\mu\text{l}$  de réaction « avant ajout de ligase » pour contrôler l'efficacité de ligation\*

### Durée de la réaction / temps d'incubation :

Une heure à température ambiante (20 – 25°C) ou une nuit à 4°C.

### ☑ Vérification des ligations par migration électrophorétique :

Gel d'agarose 0.8% dans TAE 1X

- Dépôt :
  - ✓ Réaction avant ajout de T 4DNA ligase : 1  $\mu\text{l}$
  - ✓ H<sub>2</sub>O : 3  $\mu\text{l}$
  - ✓ Bleu de bromophénol (BBP) : 1  $\mu\text{l}$
  - ✓ Produit de ligation : 3  $\mu\text{l}$
  - ✓ H<sub>2</sub>O : 1  $\mu\text{l}$
  - ✓ Bleu de bromophénol (BBP) : 1  $\mu\text{l}$
- Marqueurs :
  - ✓ Ladder 1Kb GibcoBRL : 3 $\mu\text{l}$
  - ✓ Smart Ladder Eurogentec : 1 $\mu\text{l}$  et 5 $\mu\text{l}$
- Migration : 100 V

→ \*vérification de l'intégration de l'insert dans le vecteur :

Comparaison des tailles des vecteurs / vecteurs + insert (avant et après ligation).

### ☑ Transformation de cellules bactériennes compétentes JM109 :

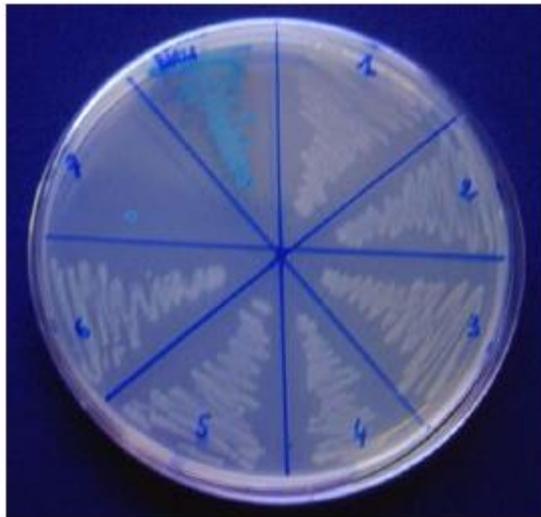
- Matériel à préparer :
  - ✓ Cônes de P1000, P200 et P10 froids (mis au congélateur durant 2 heures minimum).
  - ✓ Tubes Eppendorf de 1,5 ml froids.
  - ✓ Râteaux stériles.
  - ✓ Boîtes de LB/Amp/IPTG/X-Gal (préparation en annexe).

▪ Protocole :

1. Régler le bain-marie à 42°C.
2. Décongeler les cellules compétentes (JM 109) dans glace et sous hotte (5 minutes).
3. Aliquoter le produit de ligation dans les tubes froids en fonction du nombre de transformations à réaliser.
4. Ajouter les cellules, sur glace, à la ligation froide : en général on réalise 2 essais par clonage :
  - ✓ 1 µl de ligation + 50 µl de cellules
  - ✓ 4 µl de ligation + 50 µl de cellules
5. Mélanger délicatement la réaction par tapotage du tube.
6. Incuber 20 min sur la glace.
7. Réaliser un choc thermique : 50 secondes à 42°C
8. Déposer immédiatement les tubes dans la glace et les y laisser 2 minutes.
9. Ajouter 950 µl de milieu SOC (liquide et à température ambiante).
10. Agiter les cultures bactériennes 1h30 à 37°C (étuve).
11. Etaler à l'aide d'un râteau stérile chaque réaction sur boîte de LB/Amp/IPTG/X-Gal :  
(Préparation des boîtes contenant déjà l'ampicilline en annexe):
  - ✓ 1 boîte avec 100 µl de transformation
  - ✓ 1 boîte avec 500 µl

Laisser pénétrer et sécher la solution bactérienne en maintenant le couvercle de la boîte de pétri ouvert quelques minutes sous la hotte.

12. Mettre les 400 µl restants à 4°C.
13. Mettre en culture à 37°C durant la nuit.
14. Le lendemain matin, sortir les boîtes de l'étuve et repérer la présence des colonies blanches (clones *a priori* recombinants).
15. Placer les boîtes à l'envers au frigo après les avoir recouvert de parafilm ; pour accentuer la coloration des colonies.  
Repiquer les clones blancs sur boîtes de LB/Amp/IPTG/X-Gal neuves en faisant des « stries » et incuber la nuit à 37°C pour vérifier le phénotype transformant (repiquer en parallèle une colonie bleue comme contrôle).



### Récupération des clones recombinants

Prélever sur les boîtes de Pétri les colonies blanches (Transformées).

Remettre en culture les clones sur milieu LB (liquide 10 ml) + Ampicilline (10 µl initial à 100 mg/ml), pour maintenir la pression de sélection.

### Vérification de la taille du fragment d'ADN cloné

Par PCR (Amorces SP6-T7), préparer le mix de PCR et introduire les cellules recombinantes à l'aide d'un cure dent ou d'une oeuze d'1 µl.

Programmation du thermocycleur :

95°C 4mn

94°C 45 secondes

55°C 45 secondes 35 cycles

72°C 1mn30

72°C 7mn

(NB : insert + Sp6 T7 = 150 bp en plus, visualisables sur gel d'agarose)

### **Cryoconservation :**

600 µl Glycérol (50%)\* + 400 µl de la culture, dans des cryotubes. (\*selon les « écoles »)

*Les étapes suivantes optionnelles peuvent être décrites dans un autre mode opératoire.*

### **Purification du plasmide**

La purification des plasmides est effectuée avec des kits :

Ex : *QIAprep® Spin Miniprep Kit*, QIAGEN à partir de 1.8 ml de culture.

### **Restriction du plasmide (optionnel)**

- **Eco RI** : pour la vérification des inserts, coupure de part et d'autre de l'insert dans le polylinker (2 sites de restriction).

- **Sal I** : pour la linéarisation du vecteur + insert (1 site de restriction), applications telles que l'élaboration de gammes standards pour la PCR quantitative\*.

*\*Vérifier qu'il n'y ait pas de site de restriction dans l'insert.*

Doser le plasmide purifié (UV 260) ou sur gel d'agarose.

*Restriction :*

250 ng de plasmide x µl

TP (ad hoc) : 1 µl

Enzyme : 0.5 µl

H2O qsp 10µl

Incuber une nuit à 37°C.

Vérification de la restriction sur gel d'agarose 1%.

### **ANNEXES :**

#### **Produits utilisés pour le clonage**

##### **Milieu LB (MI-004)**

Bacto-tryptone 1% 10g

Extrait de levure 0.5% 5 g

NaCl 0.5% 5 g

Agar 1.5% 15g

Après autoclavage ajouter pour 1 litre :

**Ampicilline** en concentration finale de 100µg/ml (Soit 1ml de solution stock à 100 mg.ml<sup>-1</sup>)

##### **Préparation des boîtes de Pétri :**

Couler 20 ml de milieu LB + Amp par boîte (sous hotte bactériologique)

Extemporaneément ajouter par boîtes de Pétri

- **IPTG** : étaler 100µl de solution stock (attendre qu'il pénètre dans la gélose)
- **X-Gal** : étaler ensuite 20µl de la solution stock.

**IPTG** : solution stock à 100 mg.ml<sup>-1</sup>

IPTG 1 g

H2O mQ 8 ml

Mélanger et ajuster à 10 ml.

Stériliser par filtration.

Aliquoter et stocker à -20 °C\*

**X-Gal** : solution stock à 50mg.ml<sup>-1</sup>  
x-Gal 250 mg  
Diméthylformamide 5 ml (Toxique !)  
Aliquoter et stocker à -20°C

**Ampicilline** : solution stock à 100 mg.ml<sup>-1</sup>  
Ampicilline 2 g  
H<sub>2</sub>O mQ stérile (filtre 0.22µm) 4 ml  
Ajuster à 20 ml dans un tube stérile de 50 ml  
Aliquoter et stocker à -20°C

**Milieu SOC:**

Bacto-tryptone 2% 20 g  
Extrait de levure 0.5% 5 g  
NaCl 10 mM 0,58 g  
KCl 2,5 mM 0,19 g  
MgCl<sub>2</sub> 10 mM 0,95 g  
MgSO<sub>4</sub> 10 mM 2,46 g  
Glucose 20 mM 3,60 g  
H<sub>2</sub>O qsp 1 litre

## Annexe 6 : Evaluation de la pathogénicité de souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* en chambre climatique.

### Avant-propos

Pour 3 souches, le pouvoir pathogène n'a pas pu être déterminé avec certitude à l'issue de l'essai de pathogénicité. Un essai a été mené en chambre climatique pour évaluer à nouveau la virulence de ces souches. Les résultats sont présentés ici et discutés.

#### I. Matériel et méthode

Le protocole de cet essai est présenté dans le Chapitre II, partie II.4.2. Pour ce test, le cultivar Swan rose flammé, utilisé pour l'essai de pathogénicité en serre, n'a pas pu être utilisé puisque nous ne disposons pas de graines. Le cultivar Melody red a été utilisé car des graines étaient disponibles au laboratoire et pour son bon pourcentage de germination. Les souches testées sont les suivantes : Focy 11, Fo 48 et Fo 53. La souche de *F. oxysporum* non pathogène Fo47 et la souche pathogène Focy 22 ont été incluses comme témoin négatif et positif respectivement. Les souches sont apportées à une concentration de 10<sup>6</sup> UFC/mL. Vingt-quatre plantes sont préparées par modalité. L'une d'entre elles est arrosée à l'eau. Le nombre de plantes mortes est noté à la fin de l'essai.

#### II. Résultats

Une semaine après inoculation, beaucoup de feuilles ont commencé à jaunir (une à plusieurs par plante). Ce jaunissement a été observé pour l'ensemble des modalités inoculées avec une souche de *F. oxysporum*, pathogène ou non. Le nombre de feuilles jaunes était plus grand pour la modalité inoculée avec la souche pathogène Focy 22. Les semaines suivantes, les plantes ont continué leur croissance normalement et aucun autre jaunissement ne s'est développé. Les premiers symptômes de fusariose ont été observés 6 semaines après inoculation. L'essai a pris fin 12 semaines après inoculation. Aucun symptôme n'a été observé ni avec les plantes témoins inoculées à l'eau, ni avec la modalité inoculée avec la souche de *F. oxysporum* non pathogène Fo47 (Figure 18). Les 24 plantes inoculées avec la souche très agressive Focy 22 sont mortes. Sur les 24 plantes inoculées avec la souche Focy 11, 11 plantes sont mortes. L'ensemble des plantes inoculées avec Fo 48 ou Fo 53 étaient saines à la fin de l'essai. Le diamètre des tubercules de la souche Focy 11 était inférieur à ceux des conditions inoculées à l'eau ou avec les souches non pathogènes Fo47 (Figure 19).

#### III. Discussion

Annexe 6 : Evaluation de la pathogénicité de souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* en chambre climatique.

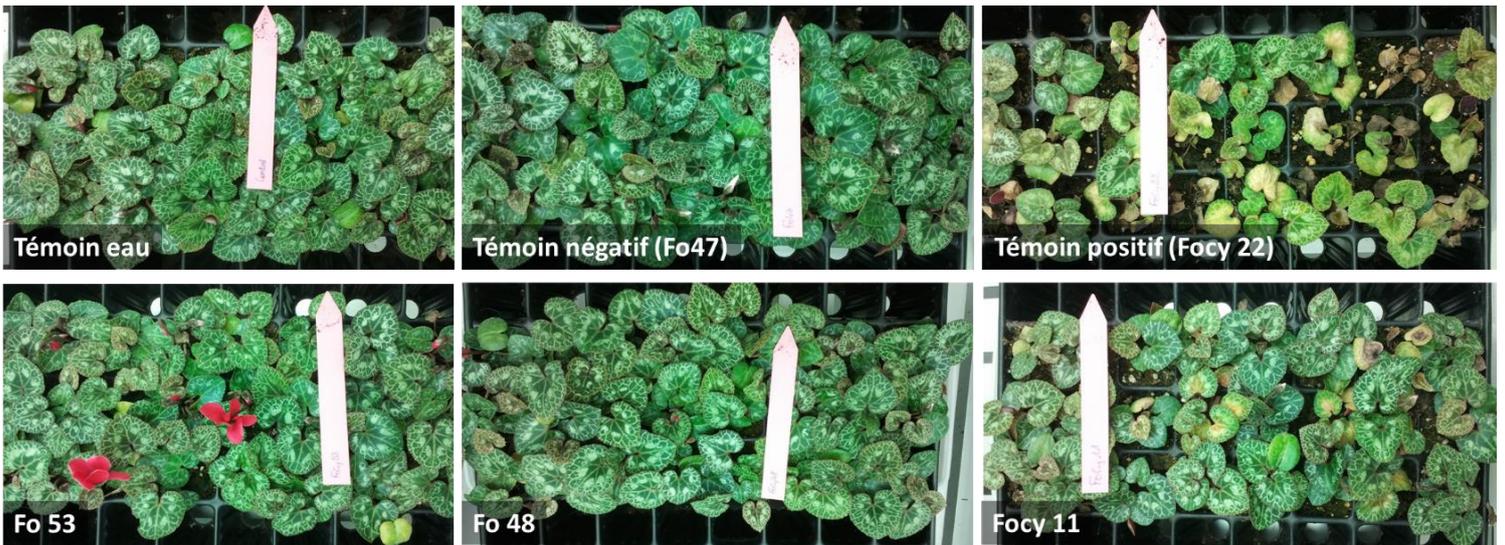


Figure 18 : Photographies des cyclamens inoculés avec différentes souches de *F. oxysporum* (pathogène ou non) ou inoculés à l'eau, à la fin de l'essai.



Figure 19 : Comparaison des tubercules de cyclamen de trois modalités à la fin de l'essai en chambre climatique.

Les tubercules des plantes inoculées avec la souche très agressive Focy 22 étaient trop dégradés à la fin de l'essai et ne sont donc pas présentés.

Annexe 6 : Evaluation de la pathogénicité de souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* en chambre climatique.

Seulement une semaine après inoculation, un jaunissement foliaire a été observé pour chaque plante inoculée avec une souche de *F. oxysporum*, pathogène ou non. Cependant, il ne s'agissait pas de symptômes de fusariose, mais probablement d'un stress dû à l'inoculation de *F. oxysporum* à forte dose. De plus, il est plus complexe d'identifier des symptômes caractéristiques de fusariose sur des jeunes plants de cyclamen. Olivain et Alabouvette (1999) ont étudié le processus de colonisation racinaire puis de pénétration d'une souche de *F. oxysporum* non pathogène et d'une souche de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pathogène de la tomate, en culture hydroponique. Les deux souches avaient pénétré l'épiderme racinaire 24h seulement après inoculation. Dans la présente étude, les conditions de culture ne sont pas les mêmes, la cinétique n'est probablement pas la même. Cependant, étant donné le stade phénologique, il est possible que le jaunissement foliaire observé corresponde au stress induit par la pénétration et la progression des champignons, pathogènes et non pathogènes, dans les tissus racinaires des jeunes plantes.

L'absence de plantes mortes dans les conditions inoculées avec les souches Fo 48 et Fo 53 a confirmé leur non pathogénicité observée lors de l'essai en serre. En revanche, la souche Focy 11 n'a induit aucun symptôme lors de l'essai en serre tandis que dans ce nouvel essai, cette souche a induit 42 % de plantes mortes. Elle est donc virulente et d'une agressivité moyenne en comparaison à la souche très agressive Focy 22 (100 % de plantes mortes). Plusieurs facteurs diffèrent entre l'essai en serre et celui en chambre climatique, à commencer par la concentration de l'inoculum de Focy, le cultivar utilisé et le stade phénologique de la plante. De plus, les conditions de l'essai sont plus contrôlées en chambre climatique qu'en serre. Plusieurs études ont montré que la concentration d'inoculum nécessaire pour induire des symptômes doit se situer entre  $10^3$  et  $10^4$  UFC/g de substrat (Garibaldi, 1987; Elmer, 2002). La concentration utilisée lors de l'essai en serre était de  $10^6$  UFC/mL de substrat et donc suffisante pour induire la maladie. Les différences observées pourraient être attribuées au cultivar utilisé. En effet, pour l'essai en serre, le cultivar utilisé était le Swan rose flammé, tandis que le cultivar Melody red a été utilisé pour l'essai en chambre climatique. Aucun cultivar de cyclamen n'est résistant à la maladie. Il existe cependant différents degrés de sensibilité chez le cyclamen (Huang et Lindhout, 1997; Orlicz-Luthardt, 1998). Le couple souche de Focy et cultivar de cyclamen serait ainsi déterminant pour caractériser l'agressivité d'une souche de Focy.

Annexe 7 : Article de vulgarisation intitulé «Fusariose du cyclamen : connaître, détecter et prévenir» et paru dans le journal Le lien horticole.

# Fusariose du cyclamen : connaître, dé

La fusariose du cyclamen est causée par un champignon complexe dont le développement en pro Astredhor Seine-Manche et une étudiante en thèse décryptent la maladie et évoquent les **nouvell**



Spores (macroconidies) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*.

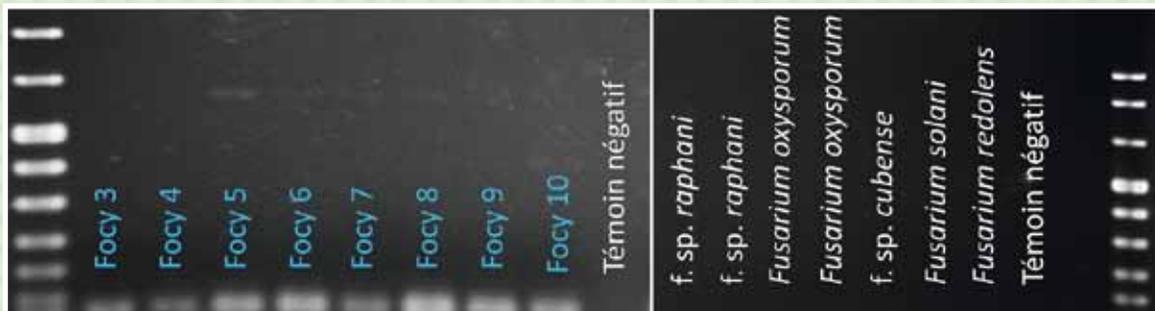


PHOTOS : ASTREDHOR



▲ Symptômes caractéristiques de la fusariose vasculaire du cyclamen.

Des essais de pathogénicité ont été menés sur des souches de *Fusarium oxysporum* sur cyclamen.



◀ Test indiquant la présence (bande blanche) ou l'absence du morceau d'ADN spécifique de Foc3 (absence de bande blanche) chez différents microorganismes. Les noms notés en bleu correspondent à différentes souches de Foc3. Les témoins négatifs correspondent à un traitement à l'eau stérile. Les autres noms correspondent à d'autres formes spéciales de *F. oxysporum* (f. sp. *raphani* pathogène du radis et f. sp. *cubense* pathogène du bananier) et d'autres espèces appartenant au genre *Fusarium*.

L'institut technique horticole avance, depuis 2013, dans la recherche de solutions pérennes, économiques mais également écologiques de lutte contre la fusariose du cyclamen.

**1 UN AGENT PATHOGÈNE COMPLEXE.** *Fusarium oxysporum* est un champignon qui vit en saprophyte dans le sol et peut persister plusieurs années sous forme de spores. Cette espèce complexe comprend de très nombreuses souches qui peuvent être pathogènes de plantes, non-pathogènes, voire antagonistes. Les différentes populations de souches pathogènes de plantes appelées formes spéciales (f. sp.) sont chacune pathogènes d'une espèce. Plus d'une centaine

de formes spéciales sont décrites. Cependant, la seule façon de les distinguer les unes des autres, ou de les distinguer des populations non pathogènes, est de tester leur virulence sur plante. En effet, elles montrent une grande spécificité pour leurs plantes hôtes et sont responsables de la maladie nommée fusariose. Ainsi, les souches nommées *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Foc3) sont agents de la fusariose vasculaire du cyclamen et lui sont strictement inféodées. Décrite pour la première fois à proximité de Berlin en 1930, la maladie a depuis été observée dans de nombreux pays : Angleterre, Argentine, Belgique, Brésil, Bulgarie, États-Unis, Italie, Japon, ou Pays-Bas. En France, sa présence est mentionnée pour la première fois en 1973 (Rouxel et Grouet, 1974). L'in-

cidence de la maladie en production peut s'avérer catastrophique puisque les pertes peuvent atteindre jusqu'à 50 %.

**2 UN CYCLE INFECTIEUX LIÉ AUX CONDITIONS CLIMATIQUES.** Le champignon Foc3 est capable de survivre et de se disséminer grâce à des spores, véhiculés par l'eau, l'air, la microfaune du sol. Lorsqu'elles sont présentes dans le substrat, elles germent, pénètrent par les racines puis colonisent les vaisseaux conducteurs de sève qui s'obstruent, causant ainsi le flétrissement caractéristique de la fusariose. Les sources d'inoculum sont diverses et souvent difficiles à identifier. Les spores pourraient provenir des supports de culture, des pots, des tablettes, du système d'irrigation, des

substrats ou des solutions fertilisantes. C'est en fin de printemps ou en été que les symptômes apparaissent. La maladie se déclare souvent après plusieurs jours consécutifs de fortes amplitudes thermiques. En période de sécheresse, les besoins hydriques augmentent, ce qui accélère la circulation de la sève et permet au pathogène de coloniser la plante plus rapidement. Généralement, les jeunes plants âgés de 3 à 4 mois ne présentent pas de symptômes de fusariose. Cependant, des prélèvements à ce stade révèlent que 2 à 5 % des cyclamens peuvent être contaminés. Des travaux effectués par la station d'expérimentation d'Astredhor Seine-Manche confirment ces résultats (rapports techniques 2009 et 2010). Pour assurer une production

# tecter et prévenir

duction occasionne de lourdes pertes.  
es pistes pour sa gestion.

saine, un moyen de détection précoce du pathogène est nécessaire.

**3 AUCUNE MATIÈRE ACTIVE CURATIVE.** Pour lutter contre la fusariose du cyclamen, les mesures prophylactiques sont indispensables : il est en effet vivement conseillé d'effectuer une désinfection des poteries, supports de culture et système d'irrigation en fin de culture. À ce jour, il n'existe aucune matière active chimique efficace de façon curative. De nouveaux produits dits phytostimulants ou antagonistes appliqués préventivement semblent prometteurs (Van der Gaag *et al.*, 2007). Si ces produits parviennent à retarder la maladie, ils n'arrivent pas à éradiquer le pathogène, ni même à le contrôler. La combinaison de moyens chimiques et biologiques serait le moyen de lutte le plus efficace (Elmer *et al.*, 2002). Mais les producteurs n'ont pas encore accès à ces nouveaux produits.

**4 AVANCÉES SCIENTIFIQUES.** Initié en 2013, le projet Fucy (Fusariose du cyclamen) a été porté par l'institut technique Astredhor et développé collectivement par Astredhor Seine-Manche, l'Inra de Dijon - UMR Agroécologie, pôle Interactions plantes-micro-organismes - (21), et la société Agrene. Sa mission était double : développer un kit de détection précoce du pathogène et identifier un ou plusieurs agents de lutte biologique efficaces contre Focyc. Les travaux menés par Charline Lecomte, étudiante en thèse à Astredhor et à l'Inra de Dijon, ont permis une progression rapide du projet.

## Outil de détection moléculaire

Pour définir un outil spécifique de détection, la première étape a consisté à obtenir des souches de Focyc et à s'assurer de leur pathogénicité. Pour cela, une centaine de souches de *F. oxysporum* provenant de neuf pays différents ont été collectées. Leur pathogénicité a été évaluée pendant deux ans consécutifs (2013 et 2014). Ces travaux ont permis de différencier les souches spécifiquement virulentes sur cyclamen (Focyc) de celles qui ne le sont pas. Ces souches de Focyc ont ensuite été utilisées pour rechercher une région d'ADN présente uniquement chez ce pathogène. Puis d'autres micro-organismes ont été utilisés pour vérifier que cette région d'ADN n'est présente que chez Focyc. Une fois la spécificité de la région d'ADN établie, la détection dans différents supports de production (substrat de culture, eau d'irrigation, tubercule, jeunes plants) est devenue envisageable. Pour cela, la technique de biologie moléculaire appelée PCR (Réaction en chaîne par polymérase) a été utilisée pour développer un outil spécifique. Cette technique, qui consiste à faire des

milliards de copies d'une portion d'ADN ciblée (dans notre cas, la région d'ADN spécifique), ne nécessite qu'une faible quantité d'ADN au départ. Elle rend décelable la région d'ADN spécifique de Focyc dans des plantules apparemment saines, ou dans du substrat ou de l'eau d'irrigation apparemment non contaminés. Cela permet de détecter la présence du pathogène avant qu'il n'infecte l'ensemble de la production. La définition du seuil de détection de l'outil en termes de quantité d'ADN et de stade de développement de la maladie sur plante a été déterminée et l'outil a été adapté pour également quantifier Focyc.

Au bout de trois ans d'étude, le projet Fucy a abouti à la mise au point d'un outil efficace qui permet une détection et une quantification spécifique de Focyc sur plante, dans le substrat et l'eau. Il y a bien sûr un seuil de détection en dessous duquel la technique ne permet pas de cibler la région d'ADN, néanmoins ce seuil est très faible. Cet outil ne devrait pas être disponible directement pour les producteurs mais plutôt pour des laboratoires de diagnostic que les producteurs pourront contacter avant l'installation de leur culture pour une détection précoce du risque de fusariose vasculaire.

## Trois produits biologiques en test

Un essai a été mené en 2014 afin d'évaluer l'efficacité de 7 agents de lutte biologique contre la maladie. Ces agents de lutte biologique sont déjà présents sur le marché mais sans allégation contre Focyc. Ces produits sont composés de bactéries, champignons ou de mélanges de micro-organismes et peuvent agir contre le pathogène. Ils ont été testés à différents rapports de concentrations agent pathogène/produits de lutte biologique. Les agents de lutte ont été appliqués au semis et au rempotage et Focyc a été apporté une semaine après rempotage. Les résultats de 2014 ont permis de sélectionner les trois produits les plus efficaces. Ils sont testés à nouveau cette année sur les sites de Rouen - Astredhor Seine-Manche - (76) et de Dijon (Agréne). Les résultats de ces tests sont attendus très prochainement. Le développement d'un outil de détection précoce de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* et l'identification de produits de lutte biologique efficaces contre ce pathogène devraient permettre d'apporter une double solution de prévention et de lutte pour les producteurs de cyclamen. ■

**Marc-Antoine Cannesan (\*)**  
**et Charline Lecomte (\*\*)**

(\*) Responsable d'expérimentation à Astredhor Seine-Manche.

(\*\*) Doctorante à Astredhor et à l'Inra de Dijon.

**lien**  
HORTICOLE

**OFFRE SPÉCIALE D'ABONNEMENT**



► **UNE EXPERTISE TECHNIQUE CONSOLIDÉE**, pour tous les métiers de la production et du paysage

► **UN TRAITEMENT DE L'ACTUALITÉ** renforcé et enrichi

► **DE NOUVELLES RUBRIQUES**, un partage d'expériences professionnelles et des conseils concrets

► **UNE VEILLE MARKETING ET CONCURRENTIELLE** pour être réactif face à l'évolution des attentes des marchés.

## 6 bonnes raisons DE VOUS ABONNER



**TOUTE L'ACTUALITÉ** de votre secteur



**VOTRE EXEMPLAIRE LIVRÉ CHEZ VOUS**, sans supplément de prix



**VOTRE NEWSLETTER HEBDOMADAIRE**  
« le lien horticoles la lettre » par email



**19 % D'ÉCONOMIE\***



**VOS SERVICES RÉSERVÉS**  
sur [www.lienhorticoles.fr](http://www.lienhorticoles.fr)



**VOTRE APPLICATION MOBILE**  
« Le Lien Horticoles mobile » pour suivre l'actualité où que vous soyez

\*En rapport à l'offre d'abonnement classique. Offre valable jusqu'au 31/12/2015.

**OUI**, je m'abonne et je choisis la formule

**Le Lien Horticoles** (1 an - 43 n°)  
au prix de 118 € TTC seulement au lieu de 129 €.  
+ **la Newsletter** hebdomadaire  
« le lien horticoles la lettre » par email.  
+ **l'application** « Le Lien Horticoles mobile ».  
+ **les services réservés**  
sur [www.lienhorticoles.fr](http://www.lienhorticoles.fr)

**Le Lien Horticoles** (2 ans - 86 n°)  
au prix de 209 € TTC au lieu de 258 €, soit 49 € de réduction.  
+ **la Newsletter** hebdomadaire  
« le lien horticoles la lettre » par email.  
+ **l'application** « Le Lien Horticoles mobile ».  
+ **les services réservés**  
sur [www.lienhorticoles.fr](http://www.lienhorticoles.fr)

**Je souhaite recevoir mon abonnement à l'adresse suivante**  M.  M<sup>me</sup>

Nom \_\_\_\_\_ Prénom \_\_\_\_\_

Société \_\_\_\_\_ Adresse \_\_\_\_\_

Code Postal \_\_\_\_\_ Commune \_\_\_\_\_

Tél. \_\_\_\_\_ Email \_\_\_\_\_

Mieux vous connaître  Pépinière (PEP)  Service espaces verts (SEV)  
 Horticulture (HOR)  Maraîchage (MAR)  Distribution (fleuriste, jardinerie...) (COM GSS)  
 Entrepreneur du paysage, paysagiste (SCE ETP)  Autre activité (précisez) \_\_\_\_\_

### Je vous règle par :

**Chèque bancaire** joint à l'ordre du LIEN HORTICOLE

**Carte bancaire**  n° : \_\_\_\_\_ Date de validité \_\_\_\_\_ Signature CB  
\_\_\_\_\_ Cryptogramme \_\_\_\_\_  
(3 derniers chiffres au dos de votre carte sur la bande de signature)

**Virement** → Domiciliation CRCA Paris Industrie  **Je souhaite vous régler à réception de facture**  
(Étudiants, Étrangers, DOM-TOM, nous consulter)

Code banque	Guichet	N° compte	Clé
18206	00428	60290666450	22

Les renseignements demandés ici sont nécessaires au traitement de votre abonnement, et réservés aux services concernés du Lien Horticoles. Conformément à la loi, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification pour les informations vous concernant. Offre réservée à la France métropolitaine et valable jusqu'au 31.12.2015.

**ABONNEZ-VOUS !**



**Par courrier**  
Renvoyez ce bulletin dûment complété et accompagné de votre règlement sous enveloppe affranchie à :  
**Le Lien Horticoles, 8 Cité Paradis, 75 493 Paris cedex 10**



**Par téléphone 01 40 22 79 85**



**Par fax 01 40 22 70 37**



**Par Internet [www.abonnements-gfa.com](http://www.abonnements-gfa.com)**

Annexe 8 : Article de vulgarisation intitulé «Fusariose du cyclamen : vers un outil de détection précoce» et paru dans le journal Phytoma.



# Fusariose du cyclamen : vers un outil de détection précoce

Dès que les symptômes sont visibles, il est trop tard pour agir. Si l'agent responsable de la fusariose du cyclamen est difficile à identifier rapidement, les outils moléculaires permettent une telle détection. À condition de bien les étalonner...

CHARLINE LECOMTE\*, CLAUDE ALABOUVETTE\*\*, MARC-ANTOINE CANNESAN\*\*\*, AGNÈS LANGLOIS\*\*\*, FABIEN ROBERT\*, CHRISTIAN STEINBERG\*\*\*\* ET VÉRONIQUE EDEL-HERMANN\*\*\*\*

**L**e genre *Cyclamen* regroupe une vingtaine d'espèces originaires des zones montagneuses du Bassin méditerranéen. Une large gamme de cultivars de *Cyclamen persicum* est commercialisée comme plante d'intérieur, d'extérieur et fleurs coupées, tirant parti de sa floraison hivernale, de la diversité de formes et motifs de ses feuilles et des coloris de ses fleurs. La fusariose vasculaire induite par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Focy) est une des maladies les plus préjudiciables de cette plante.

## Pourquoi si nuisible ?

### Des racines aux feuilles

Cette maladie, aujourd'hui observée dans tous les pays producteurs (Figure 1), a été décrite pour la première fois aux environs de Berlin en 1930.

Lorsque le champignon pathogène a pénétré dans les racines de la plante, il colonise les tissus de la racine jusqu'à atteindre les vaisseaux du xylème. Il continue ensuite sa progression dans les vaisseaux, les obstrue et limite la conduction de la sève ascendante. Survient alors un jaunissement progressif du



Photos: A. Stedhor - C. Lecomte. Haut de page: M.-F. Delannoy

▲ Les cyclamens doivent être sains pour être proposés à la vente, donc sans symptôme de fusariose due à « Focy ».

feuillage, d'abord unilatéral puis généralisé. Il en résulte un flétrissement global puis la mort de la plante.

### Incurable dès les symptômes visibles

Bien que le champignon puisse être présent dès le stade jeune plant, la maladie se déclare le plus souvent en fin de cycle de culture et/ou après plusieurs jours consécutifs de fortes amplitudes thermiques. Lorsque les premiers symptômes sont visibles, la plante est condamnée et doit être rapidement extraite des cultures.

La fusariose du cyclamen peut engendrer jusqu'à plus de 50% de pertes en production.

## Fusarium oxysporum, fascinant champignon

### Diversité de l'espèce et spécificité de chaque souche

S'il est des champignons dont la diversité et l'omniprésence fascinent, *Fusarium oxysporum* est de ceux-là. Le sol abrite ainsi des souches de *F. oxysporum* qui peuvent être de simples saprophytes ou des souches pathogènes de plantes, mais aussi des antagonistes d'agents pathogènes.

Les *F. oxysporum* pathogènes sont capables d'induire des nécroses ou des trachéomyces chez de très nombreuses espèces de plantes, à l'exception des Poacées. En revanche, chaque souche de *F. oxysporum* phytopathogène montre une spécificité d'hôte très étroite.

Les souches pathogènes sont donc classées en formes spéciales (en abrégé « f. sp. ») selon l'espèce végétale qu'elles infectent et même, dans certains cas, en races en fonction du cultivar ou de la variété sensible.

### Comment identifier chaque souche ?

Cependant, aujourd'hui, à quelques exceptions près, le seul moyen de distinguer les différentes souches, pathogènes ou non, est de les inoculer sur plante.

## RÉSUMÉ

♦ **CONTEXTE** - *Fusarium oxysporum* est un champignon tellurique omniprésent. Certaines souches de l'espèce sont phytopathogènes. Chaque souche montre une très grande spécificité d'hôte. Les souches sont organisées en formes spéciales selon la plante-hôte. Il n'est possible de distinguer les souches pathogènes des non pathogènes qu'en les inoculant sur plante. Sur cyclamen, les souches responsables de

fusariose vasculaire sont nommées f. sp. *cyclaminis* (Focy). Les moyens de prévenir et/ou lutter contre la maladie sont limités.

♦ **TRAVAUX** - En utilisant une technique de biologie moléculaire, la RAPD-SCAR (Random Amplification of Polymorphic DNA-Sequenced Characterized Amplified Region), un fragment d'ADN spécifique de Focy a été détecté et des amorces spé-

cifiques ont été définies. Des tests ont été menés pour définir la spécificité et la sensibilité des amorces sur différents supports.

Ces amorces seront mises au point en qPCR pour permettre une détection et une quantification de l'agent pathogène sur différents supports.

♦ **RÉSULTATS** - La forme spéciale *cyclaminis* présente une grande diversité génétique. Ce-

pendant, un fragment d'ADN spécifique de Focy a été mis en évidence. Il a permis de définir trois couples d'amorces, dont un a montré une sensibilité de 100% pour Focy et un seuil de détection de 50 pg d'ADN en PCR. Il permet une détection du pathogène sur tubercule contaminé.

♦ **CONCLUSION** - Ces travaux ont abouti à la définition d'un outil moléculaire de détection

spécifique de Focy. Des travaux sont en cours pour mieux définir les seuils de détection sur divers supports et y quantifier le pathogène. L'outil améliorera la compréhension de la maladie et sa maîtrise en détectant précocement le risque.

♦ **MOTS-CLÉS** - Cyclamen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, détection précoce, biologie moléculaire, quantification, protection intégrée.



La mise au point d'un outil moléculaire de détection et de quantification spécifique de l'agent pathogène dans la plante, l'eau et les substrats de culture, sans avoir recours à l'inoculation sur plante, permettrait de mieux décrire la biologie de l'agent pathogène ainsi que l'épidémiologie de la maladie. La recherche et la mise au point d'un tel outil spécifique font l'objet de cet article.

### Recherche d'un moyen de détection précoce de Focv

#### Une démarche en plusieurs étapes

Les travaux présentés ici s'inscrivent dans le projet Fucy (fusariose du cyclamen : détection préventive et contrôle biologique) porté par Astredhor, l'Institut technique de l'horticulture, et mené en collaboration entre l'Inra de Dijon et la société Agrene, sur financements ANRT (Association nationale de la recherche et de la technologie) et CasDar (Compte d'affectation spécial développement agricole et rural).

Le développement d'un outil de détection spécifique de Focv a d'abord nécessité la constitution d'une collection de souches de Focv représentative de la diversité de cette forme spéciale. Le pouvoir pathogène des souches ou isolats collectés a été vérifié par test d'inoculation sur plantes, et leurs identités vérifiées au niveau moléculaire. La diversité génétique de Focv a été caractérisée pour permettre l'identification de zones d'ADN spécifiquement présentes chez cette forme spéciale.

La recherche d'un outil de détection et de quantification a été effectuée en suivant l'approche dite RAPD-SCAR (Random Amplification of Polymorphic DNA-Sequenced Characterized Amplified Region).

#### Constitution de collections de souches

Comme le champignon pathogène est présent dans plusieurs pays, les travaux ont commencé par la constitution d'une collection de souches identifiées comme Focv ou

**Fig. 1 : Pays où la fusariose vasculaire du cyclamen a été décrite**

La fusariose du cyclamen a été décrite dans tous les pays de production depuis son apparition en Europe en 1930.



Photo : Astredhor - C. Lecomte

isolées de cyclamens (sains ou présentant des symptômes). Au total, 74 souches ont été collectées, provenant de 9 pays différents (Allemagne, Angleterre, Argentine, Australie, États-Unis, France, Japon, Italie, Pays-Bas).

De plus, 98 souches microbiennes autres que Focv ont été collectées. Cette seconde collection comprend 42 souches de *F. oxysporum*, 18 *Fusarium* sp., 33 autres genres fongiques, et 5 souches fongiques et bactériennes pathogènes du cyclamen.

#### Caractérisation phénotypique de la collection

Pour caractériser la virulence des souches de la collection, un test de pouvoir pathogène a été mis en place. Des cyclamens (dix plantes par modalité) ont été semés puis inoculés avec les souches à tester à  $5 \times 10^6$  propa-

gules/ml de substrat (Pindstrup n° 4). Des plantes traitées à l'eau ont servi de témoin. À l'apparition de la maladie, des notations ont été faites deux fois par semaine suivant une échelle allant de 0 à 3 selon l'évolution des symptômes. Ces notations permettent d'évaluer la composante quantitative du pouvoir pathogène des souches, c'est-à-dire l'agressivité.

Des isollements à partir de plantes symptomatiques, asymptomatiques et de plantes témoins ont également été effectués.

#### Caractérisation moléculaire

Des outils moléculaires ont été utilisés pour identifier les souches et caractériser leur diversité génétique. Les souches ont été purifiées et leurs ADN ont été extraits. Les régions d'ADN de l'ITS (Internal Transcribed Spacer) et du facteur d'élongation 1 $\alpha$

**La microbiologie  
au service de la santé  
des plantes**

**Une offre de services sur mesure**

- ✎ **Analyses microbiologiques** applicables sur sol, végétaux, amendements et produits
- ✎ **Analyses moléculaires** (marqueurs de souches microbiennes, élicitation des mécanismes de défense...)
- ✎ **Evaluation de l'efficacité de produits** (protection et nutrition des plantes)
- ✎ **Montage et Rédaction de dossiers réglementaires : AMM de produits de protection des plantes** (biologiques et de synthèse), **bio-fertilisant, bio-stimulant, bio-protectant**
- ✎ **R & D** dans les domaines de la **Microbiologie du sol**, évaluation du **potentiel infectieux** et de la **résistance des sols aux maladies**

Laboratoires AGRENE  
Technopole AGRONOV  
RD 31  
F- 21110 BRETENIERE  
Tél. 33 (0)3.80.65.09.52  
contact@agrene.fr

(*EF-1α*) ont été amplifiées par PCR, séquencées puis comparées aux séquences présentes sur NCBI (National Center for Biotechnology Information) pour connaître l'identité de chaque souche au niveau de l'espèce. Les séquences d'ADN du gène *EF-1α* et de l'IGS (InterGenic Spacer) ont été amplifiées puis séquencées. Elles ont servi à caractériser la diversité génétique de Focy.

### Recherche d'amorces spécifiques par RAPD-SCAR

Pour identifier un fragment d'ADN spécifique du pathogène, la technique de RAPD-SCAR a été utilisée. Une souche représentative de chacun des groupes génétiques identifiés précédemment a été utilisée. Au total, 60 amorces aspécifiques de RAPD ont été testées.

Un fragment d'ADN uniquement présent chez Focy a été identifié. Ce fragment a été amplifié pour chacune des souches représentant un groupe génétique. Leurs séquences ont été comparées entre elles et par rapport aux génomes de *F. oxysporum* disponibles dans des bases de données. L'identification de paires de bases spécifiques de Focy a permis de dessiner trois couples d'amorces.

### Spécificité des couples d'amorces vérifiée

Les spécificités des trois couples d'amorces ont été testées sur les collections de micro-organismes présentées ci-dessus. Le couple le plus spécifique a été sélectionné pour la suite des tests.

### Vérification de la sensibilité du couple d'amorces

Afin de connaître la limite de détection du couple d'amorces sélectionné, l'ADN de trois souches de Focy a été dosé précisément et des dilutions en série ont été faites de manière à apporter : 10 ng, 5 ng, 1 ng, 500 pg, 100 pg, 50 pg, 10 pg, 5 pg et 1 pg par réaction PCR. De l'ADN de cyclamen sain, de cyclamen contaminé par une souche de Focy ou colonisé par une souche non pathogène de *F. oxysporum* a été extrait. Le couple d'amorces a été testé sur ces ADN afin de déterminer si la détection du pathogène sur matériel végétal est possible.

### Résultats déjà acquis Tests de pathogénicité

Le test de pouvoir pathogène a permis d'identifier 45 souches de Focy et 14 souches



Photo : Astredhor - C. Lecomte

▲ Test du pouvoir pathogène de souches de *Fusarium oxysporum* sur cyclamen. Après avoir constitué une grande collection de souches de *F. oxysporum*, un test en serre a été conduit afin de révéler ou non leur virulence sur cyclamen. Ce test a permis d'identifier des souches de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*.

de *F. oxysporum* non pathogènes. Les tests de ré-isollement ont permis de ré-isoler *F. oxysporum*. Parmi les souches de Focy, une grande gamme d'agressivité a été constatée.

### Diversité génétique

L'utilisation combinée des séquences d'*EF-1α* et d'IGS a permis de révéler des groupes de Focy génétiquement distincts. Six groupes de souches pathogènes ont été identifiés. Cette diversité génétique s'avère plus importante que ce qui était décrit jusqu'à présent dans la littérature.

D'autre part, le même travail a été réalisé avec les souches de *F. oxysporum* non pathogènes. Leur diversité génétique est encore plus importante.

### Recherche d'un outil de détection

En utilisant les résultats précédents, un marqueur moléculaire spécifique a été recherché en utilisant la technique de RAPD. Une région non codante d'ADN de 1650 pb a ainsi pu être identifiée. L'étude comparée des séquences d'ADN de cette zone pour différentes souches de *F. oxysporum* a permis de détecter des nucléotides spécifiques à Focy. Ces bases ont été utilisées pour définir trois couples d'amorces.

### Spécificité et sensibilité des couples d'amorces en PCR

La spécificité des couples d'amorces a été testée sur les collections de souches citées ci-dessus. Un des couples s'est montré spécifique de Focy à 100 % (photo ci-dessus). Il a été gardé pour la suite des tests.

Il permet une détection de Focy dans des tubercules de cyclamen contaminés, tandis qu'aucun signal n'est obtenu si le tissu est colonisé par une souche de *F. oxysporum* non pathogène. Le test de sensibilité a permis de déterminer que le seuil de détection de l'outil est de 50 pg d'ADN de Focy.

### Vers l'identification précoce

Les travaux présentés ci-dessus ont mis en évidence la diversité phénotypique et génétique, jusqu'à présent sous-estimée, au sein de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*.

Cette étude a permis d'identifier un fragment d'ADN spécifique de Focy à partir duquel un couple d'amorces a été défini. Cet outil, actuellement testé pour une utilisation en PCR quantitative, devrait donner la possibilité de quantifier l'agent pathogène à partir d'échantillons de tourbe, d'eau et de tubercule contaminés artificiellement ou prélevés dans des exploitations. Les seuils de détection de Focy seront prochainement définis.

De façon générale, ces travaux, menés en étroite collaboration entre l'Inra de Dijon, Astredhor et la société Agrene, apporteront

une meilleure compréhension de la biologie de l'agent pathogène et de l'épidémiologie de la maladie.

Ainsi, le risque de fusariose sur cyclamen pourra être identifié précocement, avant l'apparition de tout symptôme. Une prophylaxie adaptée pourra être mise en place rapidement, afin d'accéder à une meilleure maîtrise de la fusariose en production de cyclamen.

L'outil sera d'autant plus

utile s'il est combiné avec une méthode de lutte préventive telle que la lutte biologique (voir article suivant).

La diversité génétique de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, (Focy) est importante.

< Amplification par PCR d'ADN de *F. oxysporum* avec les amorces spécifiques de Focy. Ces amorces ont été mises au point dans un fragment d'ADN de Focy et permettent de révéler spécifiquement sa présence.

### POUR EN SAVOIR PLUS

📄 AUTEURS : \*C. LECOMTE, \*F. ROBERT, Astredhor, 44, rue d'Alésia, 75682 Paris.

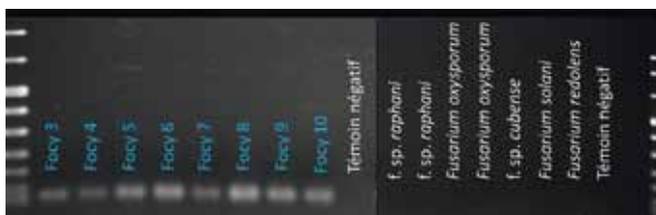
\*\*C. ALABOUVETTE, Agrene, 47, rue C. Pierrot, 21000 Dijon.

\*\*\*M.-A. CANNESAN, \*\*\*A. LANGLOIS, Arexhor Seine-Manche, 22, rue de Normandie, 76640 Fauville-en-Caux.

\*\*\*\*V. EDEL-HERMANN, \*\*\*\*C. STEINBERGN, Inra, UMR 1347 Agroécologie, 17, rue Sully, 21065 Dijon.

📞 CONTACTS : charline.lecomte41@gmail.com  
c.ala@agrene.fr, veronique.edel@dijon.inra.fr

🌐 LIENS UTILES : www.agrene.fr, www.astredhor.fr  
www.dijon.inra.fr/umragroecologie



Annexe 9 : Article de vulgarisation intitulé «Fusariose du cyclamen : travaux sur la lutte biologique» et paru dans le journal Phytoma.



# Fusariose du cyclamen : travaux sur la lutte biologique

Sept micro-organismes potentiellement utilisables contre la fusariose vasculaire du cyclamen ont été testés. Trois semblent prometteurs, dont un plus que les autres, mais cela reste à confirmer.

CHARLINE LECOMTE\*, CLAUDE ALABOUVETTE\*\*, NICOLAS JEANNIN\*\*, VÉRONIQUE EDEL-HERMANN\*\*\*, CHRISTELLE CORDIER\*\*, MARC-ANTOINE CANNESAN\*\*\*\*, AGNÈS LANGLOIS\*\*\*\*, FABIEN ROBERT\* ET CHRISTIAN STEINBERG\*\*\*

**L**a fusariose vasculaire du cyclamen causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (Foc) constitue l'une des maladies les plus dommageables de cette culture ornementale (voir article précédent). La gestion de cette maladie s'avère difficile et les producteurs se trouvent démunis face à cet agent pathogène.

## Pourquoi les producteurs sont démunis

### Prophylaxie nécessaire mais pas suffisante

Le développement de la maladie en serres de production peut engendrer de lourds dégâts et donc de fortes pertes économiques (photo 2 ci-contre).

Le maintien de bonnes conditions sanitaires avant la culture est préconisé. Cela implique d'utiliser des supports de culture propres, des semences et des jeunes plants sains et de désinfecter les serres en interculture.

Il est conseillé de bannir les surfaces de culture poreuses et les systèmes d'irrigation en circuit fermé. Un suivi attentif en cours de culture est également indispensable, chaque plante malade devant être retirée de la serre rapidement. Il est recommandé d'éviter les hausses brutales de température



Photos : Astrethor - Vignettes haut de page : M.-F. Delannoy

< Plants de cyclamen sains (photo 1) et atteints de fusariose vasculaire (photo 2). Ce champignon envahit les vaisseaux de la plante, ce qui cause le flétrissement des parties aériennes.

car les chocs thermiques favorisent l'expression des symptômes de la maladie.

Ces pratiques permettant de limiter les sources d'inoculum potentielles et la propagation de l'agent pathogène sont un prérequis à la mise en place et au bon déroulement de la culture. Cependant, si le pathogène est accidentellement introduit, ces mesures de prophylaxie ne sont pas suffisantes pour limiter la gravité de la maladie.

### Un manque de produits de lutte et de cultivars résistants

Les fongicides autorisés sont peu nombreux et d'une efficacité insuffisante pour préserver l'état sanitaire de la culture. De plus, bien

qu'il existe des différences de sensibilité au niveau inter et intraspécifique, aucun cultivar de cyclamen résistant à la fusariose n'est actuellement disponible sur le marché.

## Pourquoi tester des micro-organismes ?

### Les atouts du biocontrôle

La lutte biologique, ou biocontrôle, se définit comme l'ensemble des moyens de lutte contre les maladies et ravageurs des plantes utilisant des produits ou agents naturels. Plus précisément, elle regroupe l'utilisation des médiateurs chimiques, des substances naturelles, des macro-organismes et des micro-organismes.

## RÉSUMÉ

† **CONTEXTE** - Le cyclamen est une plante ornementale majoritairement produite en Europe. L'une des maladies les plus préoccupantes sur cette culture est la fusariose vasculaire causée par *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*. Les moyens de lutter contre le pathogène sont très limités et les producteurs sont dans l'attente de solutions efficaces.

† **TRAVAUX** - Sept produits de lutte biologique déjà autorisés en France, mais pas pour lutter contre la fusariose du cyclamen, ont été testés seuls ou

en combinaison lors d'un premier test en serre. Les meilleurs produits ont été retenus et testés à nouveau sur un plus grand nombre de plantes et contre deux souches pathogènes au cours d'un essai en serre dupliqué en Normandie et en Bourgogne.

† **RÉSULTATS** - Le premier test a permis de sélectionner les trois produits les plus efficaces. Au cours de cet essai, la phytotoxicité de trois autres produits a été mise en évidence. Lors des seconds tests, la maladie ne s'est pas déclarée

de manière assez forte pour pouvoir conclure à partir de l'essai mené en Normandie. En revanche, en Bourgogne, jusqu'à 100% de plantes mortes ont été atteints avec la souche la plus agressive. Pour ce test, le meilleur résultat de biocontrôle a été obtenu avec le rapport 1/10 entre la souche la moins agressive et l'agent de lutte biologique (ALB) 2.

† **CONCLUSION, PERSPECTIVES** - Les résultats obtenus lors de cette étude permettent de dégager des tendances. L'ALB 2 montre les meilleurs résultats de

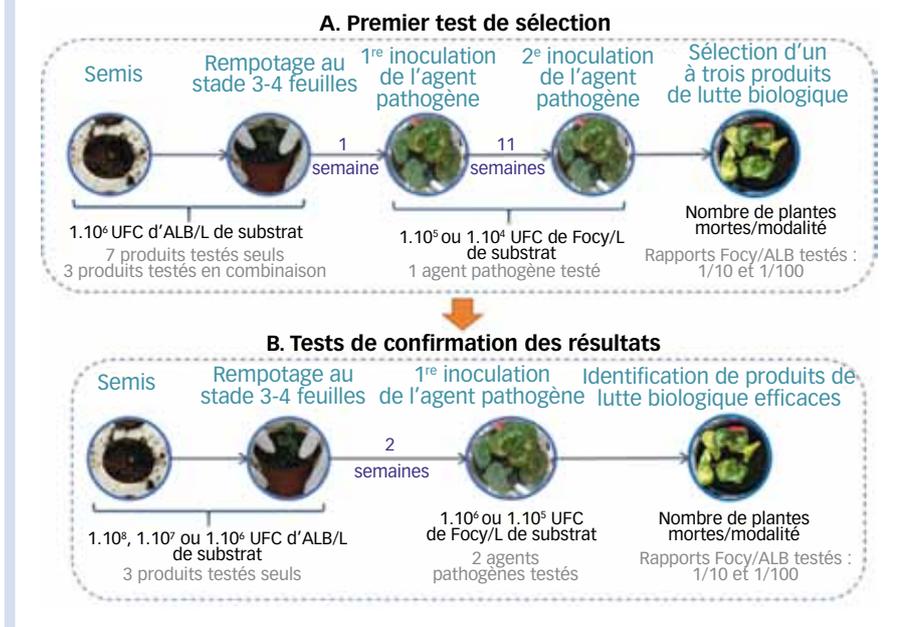
contrôle mais seulement dans une des conditions testées. La grande variabilité de ce type de test est assurément liée aux variations de conditions culturales et environnementales. Afin d'être exploités par la profession floricole, ces essais nécessitent d'être renouvelés au cours de tests intégrant davantage de produits de lutte biologique et de conditions.

† **MOTS-CLÉS** - Contrôle biologique, micro-organismes, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, horticulture.



**Fig. 1 : Protocoles utilisés pour les essais menés en serre**

**Premier test** de sélection sur sept micro-organismes (agents de lutte biologique, ALB) face à la souche 43T3 de Focy. Puis test de confirmation (deux tests jumeaux) sur trois des ALB soumis à deux souches de Focy (43T3 et 14).



Ces méthodes de lutte présentent de nombreux avantages. Elles visent à limiter le développement du pathogène tout en respectant l'environnement et l'applicateur. Elles évitent les contournements de résistance rencontrés en lutte variétale. Cependant, bien que le nombre d'études sur la lutte biologique foisonne, très peu de produits arrivent sur le marché. Il existe des freins au développement de ces méthodes.

#### Freins au biocontrôle

D'abord, le processus de mise au point du produit, allant des premiers tests de sélection jusqu'à la production en masse et à la formulation, est long et fastidieux. De plus, la lourdeur des processus réglementaires d'autorisation de mise sur le marché (AMM) ralentit leur commercialisation. Ce constat est tout particulièrement vrai en Europe. En effet, le processus européen d'homologation d'un produit de lutte biologique est strictement identique à celui exigé pour une substance active de synthèse. Ceci peut décourager certaines entreprises et expliquer le faible nombre de produits de lutte biologique commercialisés en Europe par rapport à d'autres régions du monde, dont les États-Unis.

Aujourd'hui, aucune solution de lutte biologique n'est disponible en Europe pour lutter contre la fusariose du cyclamen. C'est pourquoi cette étude vise à rechercher des agents de lutte biologique (ALB) efficaces contre cette maladie.

#### Recherche sur des produits déjà autorisés en France par ailleurs

Pour cela, le projet Focy (fusariose du cyclamen : détection préventive et contrôle biologique), présenté dans l'article précédent, a débuté en 2013.

Dans le cadre de ce projet visant à proposer le plus rapidement possible des solutions aux producteurs, seules des préparations déjà autorisées en tant que matières fertilisantes ou produits de protection des plantes ont été évaluées. Ainsi, les produits les plus prometteurs devraient pouvoir obtenir rapidement une AMM contre la fusariose du cyclamen.

#### L'expérimentation en serre

##### Deux étapes réalisées

Pour réaliser une première sélection et identifier un ou plusieurs agents de lutte biologique efficace contre Focy, sept produits ont tout d'abord été testés. Les trois les plus prometteurs ont ensuite été testés à plus large échelle afin d'infirmier ou de confirmer les premiers résultats.

Dans les deux cas, différents rapports de concentration entre l'agent pathogène et l'ALB ont été effectués afin de mettre en évidence la dose efficace de produit.

#### Choix des sept ALB (agents de lutte biologique) testés

Pour cette étude, nous avons sélectionné sept produits commercialisés : un à base de bactérie (n° 2), cinq à base de champignons (n° 1, 3, 5, 6, 7), et un mélange de micro-organismes (n° 4). Pour des raisons de confidentialité, la composition, le nom des produits et celui des entreprises ne peuvent pas être dévoilés. Ils ont été choisis car ils mettent en œuvre des genres et espèces microbiens connus pour leurs activités antagonistes.

Les différents produits ont été mélangés au substrat (Pindstrup n° 4), aux concentrations choisies, d'abord au semis puis au repotage des cyclamens (Figure 1). Après semis, les cyclamens ont été placés en chambre de germination à 19°C et 90% d'humidité pendant quinze jours. Après repotage, les paramètres climatiques de la serre ont été réglés pour permettre une fluctuation des températures pouvant atteindre, voire dépasser 30°C.

Selon le stade végétatif et les besoins hydriques, les cyclamens ont été arrosés au minimum deux fois par semaine et jusqu'à plusieurs fois par jour.

#### Les souches d'agents pathogènes

Deux souches de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, codées Focy 43T3 et Focy 14 et provenant respectivement des Pays-Bas et d'Italie, ont été utilisées pour les tests. Ces souches dont la virulence a été vérifiée lors

d'essais précédents (voir article précédent) ont montré de fortes agressivités. Les inoculum ont été préparés en laboratoire sous forme de suspensions de spores. Une à deux semaines après repotage, les souches de Focy ont été apportées à proximité du tubercule. (Figure 1). Les concentrations apportées permettaient de se situer dans les rapports agent pathogène/ALB suivants : 1/10 et 1/100.

Outre les témoins non inoculés, des modalités témoins ont été réalisées en apportant d'une part les deux agents pathogènes et d'autre part les agents de lutte biologique seuls aux mêmes concentrations que celles employées dans les confrontations.

#### Premier test de sélection : sept ALB face à la souche Focy 43T3

Un premier test en serre a été mené afin de sélectionner les meilleurs produits parmi les sept testés. Les ALB ont été apportés à 10<sup>6</sup> unités formant colonie (UFC)/litre de substrat. Une semaine après repotage, la souche Focy 43T3 a été apportée à 10<sup>5</sup> ou 10<sup>4</sup>

Le premier test a permis de sélectionner les trois produits les plus efficaces.



**Tableau 1 : Modalités expérimentales éprouvées lors du test de sélection et des deux tests de confirmation**

ALB (agent de lutte biologique)	Concentration de l'ALB (UFC/l de substrat)	Souches de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>					
		Focy 43T3			Focy 14		Sans Focy
		1 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>6</sup>	1 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>6</sup>	0
1 (champignon)	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Les trois tests	–	Test 2	–	Les trois tests
	1 × 10 <sup>7</sup>	–	Test 2 <sup>(1)</sup>	Test 2	Test 2	Test 2	Test 2
	1 × 10 <sup>8</sup>	–	–	Test 2	–	Test 2	Test 2
2 (bactérie)	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Les trois tests	–	Test 2	–	Les trois tests
	1 × 10 <sup>7</sup>	–	Test 2	Test 2	Test 2	Test 2	Test 2
	1 × 10 <sup>8</sup>	–	–	Test 2	–	Test 2	Test 2
3 (champignon)	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Test 1	–	–	–	Test 1
4 (mélange)	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Test 1	–	–	–	Test 1
5 (champignon)	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Test 1	–	–	–	Test 1
6 (champignon)	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Test 1	–	–	–	Test 1
7 (champignon)	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Les trois tests	–	Test 2	–	Les trois tests
	1 × 10 <sup>7</sup>	–	Test 2	Test 2	Test 2	Test 2	Test 2
	1 × 10 <sup>8</sup>	–	–	Test 2	–	Test 2	Test 2
1 + 2	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Test 1	–	–	–	Test 1
2 + 3	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Test 1	–	–	–	Test 1
2 + 4	1 × 10 <sup>6</sup>	Test 1	Test 1	–	–	–	Test 1
Sans ALB	0	Test 1	Les trois tests	Test 2	Test 2	Test 2	Les trois tests

(1) Test 1 = test de détection. Test 2 = double test de confirmation.

UFC/l de substrat. Cet apport a été réitéré dans les mêmes conditions onze semaines après le premier apport de Focy.

Au total, trente-trois modalités expérimentales ont été testées (Tableau 1) et quinze plantes par condition ont été préparées.

### Les trois meilleurs ALB face aux deux souches de Focy

En 2015, un double test a été réalisé, d'une part en Bourgogne (Dijon) et d'autre part en Normandie (Rouen), pour évaluer l'efficacité des préparations 1, 2 et 7, apportées à 10<sup>8</sup>,

10<sup>7</sup> ou 10<sup>6</sup> UFC/l de substrat (Tableau 1). La démarche expérimentale est identique à celle du premier essai, à ceci près que le nombre de plantes par condition est passé à quarante afin de permettre un traitement statistique des résultats.

Deux semaines après repotage, les souches pathogènes Focy 43T3 ou Focy 14 ont été apportées à 10<sup>6</sup> ou 10<sup>5</sup> UFC/l de substrat. Ces deux souches ont été choisies afin d'évaluer l'efficacité des produits biologiques avec deux souches de forte agressivité mais d'origines géographiques différentes.

### La notation de la maladie

Dès l'apparition des premiers symptômes, l'évolution de la maladie a été notée deux fois par semaine en utilisant une échelle de notation allant de 0 à 3.

Des isolements ont été réalisés à partir de plantes symptomatiques pour vérifier la présence de *F. oxysporum*, et sur plantes asymptomatiques pour vérifier son absence.

### Résultats

#### Test de sélection : effet à la levée

Avant même d'ajouter la souche pathogène, un effet négatif des produits 3 et 6 sur le nombre de plantes levées a été observé. Ce nombre atteignait respectivement 61 % et 46 % contre 71 % dans le témoin. La combinaison incluant le produit 3 a le même effet : 59 % de plantes levées. Ces produits ont donc une phytotoxicité sur cyclamen. En revanche, les modalités 4, 5 et 7 ont un nombre plus important de plantes levées, respectivement 75 %, 85 % et 82 %. La combinaison incluant le produit 4 montre la même tendance que le produit utilisé seul : 81 % de plantes levées (Figure 2A page suivante).

#### Sélection de trois ALB

Après apport de l'agent pathogène, les résultats obtenus permettent seulement de dégager des tendances (Figure 2B).

Les produits 4 et 5 et l'ensemble des combinaisons montrent un taux de plantes mortes plus élevé que dans la condition témoin. Ils ne sont donc pas retenus pour la suite des tests, de même que les produits 3 et 6 qui ont montré une phytotoxicité avant l'apport du pathogène. Pour la suite des tests, les produits 1, 2 et 7 ont été conservés.

#### Agressivité des souches pathogènes et efficacité des trois ALB

En 2015, seul l'essai réalisé à Dijon a permis d'enregistrer un nombre de plantes malades suffisant pour évaluer l'effet des ALB. Dans cet essai, les premiers symptômes sont ap-

# VOLUMATIC<sup>®</sup>



Un petit pas pour l'homme,  
un grand pas pour l'expérimentateur...

- Une précision inégalée de 1% pour mesurer l'eau en expérimentation,
- Moins de pénibilité,
- Des dizaines d'heures de temps gagnées par saison pour des missions plus valorisantes,
- Une fiabilité de plus en expérimentation BPE et BPL,

- Plus de Sécurité au champ (douche de sécurité),
- Commodité (rinçage rapide des seaux et pulvérisateurs),
- Une plus grande efficacité en expérimentation BPE et BPL.

**AGROLIS**  
consulting

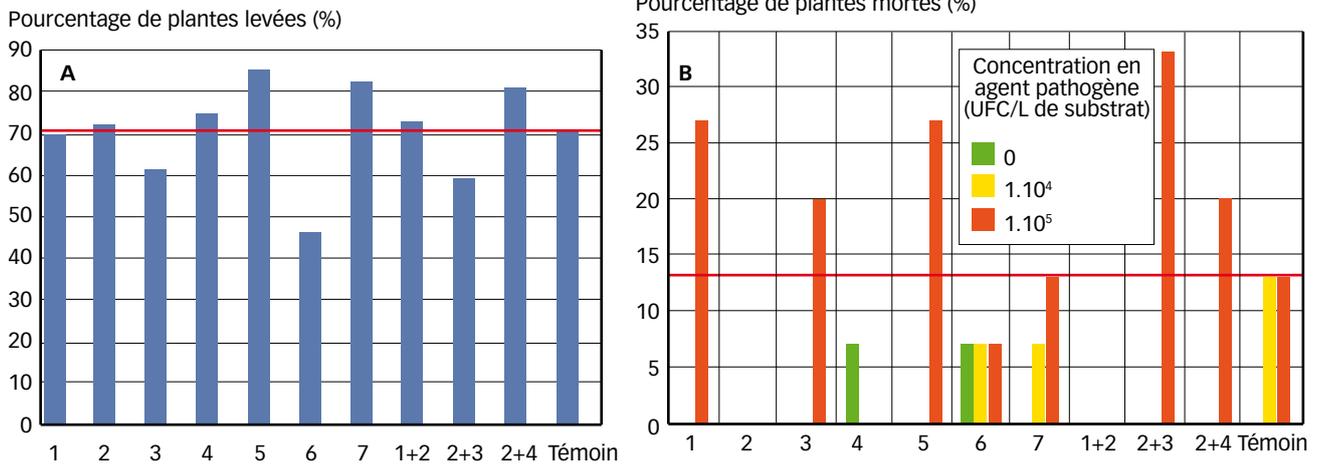
Inspired by crop protection

[www.agrolis.eu](http://www.agrolis.eu)



**Fig. 2 : Résultats obtenus lors du test de sélection, avant (A) puis après (B) l'apport de l'agent pathogène**

En (A), c'est la phytotoxicité de l'ALB qui est évaluée. En (B), c'est son effet contre Focys 43T3 apporté à  $10^4$  ou  $10^5$  UFC/l de substrat. Modalités 1 à 7 : différents ALB (voir matériel et méthodes) ; modalités 1 + 2, 2 + 3, 3 + 4 : association de deux ALB.



parus un mois après l'inoculation des agents pathogènes.

L'incidence de la maladie a progressé dans le temps pour atteindre 100 % de plantes mortes dans les témoins, 4 mois après l'inoculation à la dose la plus forte. Les deux souches pathogènes confirment les fortes agressivités pour lesquelles elles avaient été sélectionnées (voir article précédent).

Cependant, la souche Focys 14 montre une agressivité supérieure à celle de la souche Focys 43T3.

Ainsi pour la dose d'inoculum la plus faible, la souche la plus agressive entraîne des symptômes sur toutes les plantes alors qu'il reste 30 % de plantes parfaitement saines lorsque l'inoculation a été réalisée avec la souche la moins agressive. Aucune des trois

préparations de biocontrôle n'a entraîné le développement de symptômes sur les plantes, même à la concentration la plus forte de  $1 \times 10^8$  UFC/l.

#### Un ALB se détache... vis-à-vis d'une souche

La Figure 3 présente l'évolution de la maladie au cours du temps lorsque les plantes ont été protégées avec l'ALB 2 confronté à la souche pathogène la moins agressive (Focys 43T3). Les résultats sont présentés en pourcentages de plantes sans symptômes, c'est-à-dire commercialisables. La meilleure protection est observée pour la dose 1 d'ALB, soit  $10^6$  UFC/l confronté à  $10^5$  UFC/l de Focys (rapport Focys/ALB de 1/10), avec environ 75 % de plantes saines.

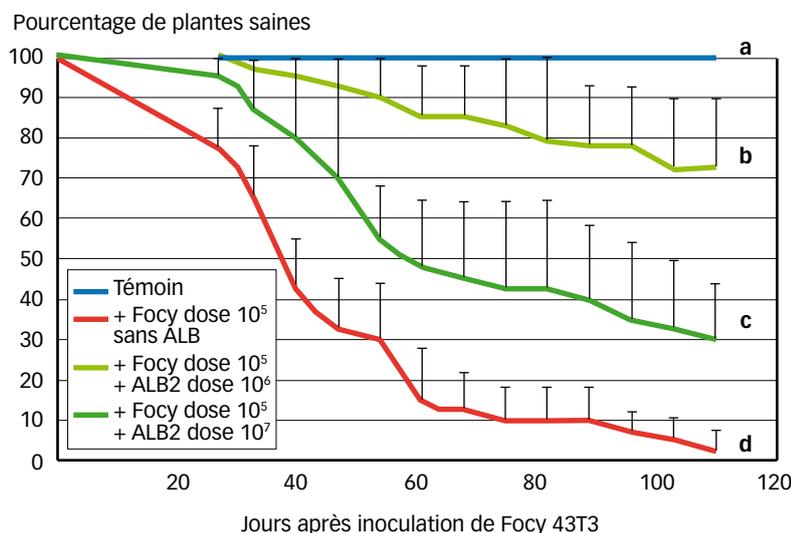
La comparaison de toutes les modalités de biocontrôle est présentée dans les Figures 4A et 4B qui montrent les surfaces sous la courbe d'incidence de la maladie lorsque les agents de biocontrôle ont été confrontés aux souches agressives Focys 43T3 (Figure 4A) et Focys 14 (Figure 4B) inoculées, soit à  $10^5$  soit à  $10^6$  UFC/l.

Pour la souche Focys 43T3 inoculée à la dose la plus faible, outre l'efficacité du produit 2 déjà mentionnée ci-dessus, on observe un effet bénéfique significatif du produit 1 à la dose la plus forte. Aucune autre différence significative n'est enregistrée.

Il n'y a aucun effet des ALB dans les modalités inoculées avec cette souche Focys 43T3 à la dose la plus forte. De même, aucun effet significatif n'est enregistré lorsque les ALB ont été confrontés à la souche pathogène la plus agressive (Focys 14), quelle que soit la dose d'inoculation considérée.

**Fig. 3 : Résultats obtenus lors de l'essai de Dijon (2015)**

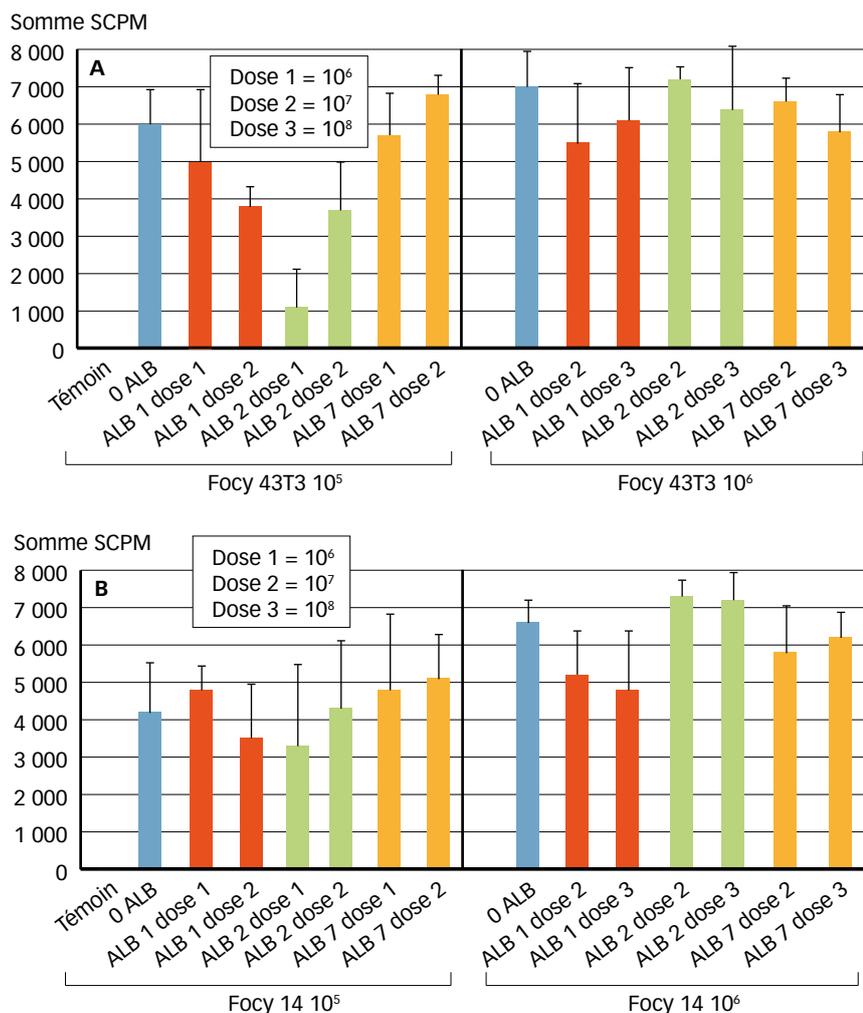
**Évolution du pourcentage** de plantes saines au cours du temps en présence de la souche Focys 43T3 ( $10^5$  UFC/L de substrat) et de l'ALB 2 ( $10^6$  et  $10^7$  UFC/L de substrat), ainsi que dans les témoins sains (non inoculés avec Focys). Après apport du pathogène, le meilleur résultat est obtenu avec la dose d'ALB la plus faible (rapport Focys/ALB de 1/10).





**Fig. 4 : Résultats obtenus lors de l'essai de Dijon en 2015**

**Surface sous la courbe** de progression de la maladie (« SCPM ») pour les souches Focy 43T3 (A) et Focy 14 (B) en présence des ALB 1 (en rouge), 2 (en vert) et 7 (en orange) pour les différents rapports agent pathogène/ALB éprouvés (Dose 1 =  $10^6$  signifie que l'ALB est apporté à  $10^6$  UFC/l de substrat) ; si Focy est apporté à  $10^5$  UFC, le rapport pathogène/ALB est de 1/10.



## Conclusions et perspectives

### Pas d'ALB garanti efficace : difficile de conclure sur seulement trois essais

Les essais menés par Astredhor, l'Inra de Dijon et la société Agrene ne permettent pas d'identifier clairement un agent de lutte biologique pour lutter contre la fusariose du cyclamen parmi les produits testés.

L'essai de 2014 et celui mené en 2015 en Normandie n'ont pas permis l'expression de la forte agressivité des souches de Focy. Ce constat est probablement attribuable à la forte influence des conditions climatiques et culturelles sur l'expression de la maladie. En revanche, la maladie s'est bien installée lors de l'essai mené en Bourgogne en 2015. La conduite d'un essai de lutte biologique est donc loin d'être anodine et nécessite des

conditions optimales pour le développement de l'agent pathogène.

### Un produit prometteur, mais de façon surprenante

Parmi les différents produits testés, seul un produit à base d'une bactérie (un *Bacillus* sp.) a permis de diminuer significativement l'incidence de la maladie.

Mais, de manière surprenante, le meilleur effet obtenu lors du test de 2015 en Bourgogne n'a pas été enregistré avec la dose d'ALB la plus forte mais dans une condition comprenant seulement dix fois plus d'ALB que de Focy.

De plus, ce résultat n'a été obtenu qu'avec la souche pathogène la moins agressive. Certes, une tendance similaire a été obser-

vée avec l'autre souche pathogène, mais elle n'est pas significative. L'efficacité de ce produit semble donc dépendre de l'agressivité de la souche pathogène à laquelle il est confronté.

### Spécificité d'action contre un pathogène

Ces résultats mériteraient d'être confirmés en confrontant cet agent de lutte biologique à des souches pathogènes d'agressivité très différentes, car les deux souches choisies pour cet essai faisaient partie des plus agressives identifiées précédemment (voir article précédent).

De plus, les produits testés n'avaient jamais été éprouvés contre les fusarioses, et en particulier celle du cyclamen ; ils sont commercialisés en tant que biofertilisants ou agents de lutte, mais seulement contre d'autres agents pathogènes.

Or, aujourd'hui, il est établi qu'il existe une spécificité d'action des agents de lutte biologique contre un pathogène donné. Les ALB éprouvés ici n'ayant pas été sélectionnés pour leur activité antagoniste vis-à-vis des *Fusarium oxysporum* et encore moins des Focy, ils ne sont probablement pas les plus efficaces.

### À propos de conditions expérimentales

Globalement, ces résultats soulignent les difficultés à surmonter pour évaluer l'efficacité potentielle d'agents de lutte biologique. De nombreux facteurs influencent le développement de la maladie et la première condition pour évaluer l'efficacité d'ALB est de se placer dans des conditions permettant d'induire la maladie.

Il convient ensuite de bien maîtriser les conditions d'application des agents de lutte biologique et de respecter les paramètres climatiques nécessaires au bon développement de la culture.

Ainsi, ce travail ouvre la voie à la lutte biologique contre la fusariose du cyclamen, à condition d'éprouver un plus grand nombre de produits dans un plus grand nombre de conditions de culture. □

### POUR EN SAVOIR PLUS

**AUTEURS** : \*C. LECOMTE, \*F. ROBERT, Astredhor, 44, rue d'Alésia, 75682 Paris.

\*\*V. EDEL-HERMANN, \*\*STEINBERG CHRISTIAN, Inra, UMR 1347 Agroécologie, 17, rue Sully, 21065 Dijon.

\*\*\*C. ALABOUVETTE, Agrene, 47, rue C. Pierrot, 21000 Dijon.

\*\*\*\*M.-A. CANNESAN, \*\*\*\*A. LANGLOIS, Arexhor Seine-Manche, 22, rue de Normandie, 76640 Fauville-en-Caux.

**CONTACTS** : charline.lecomte@astredhor.fr  
christian.steinberg@dijon.inra.fr, c.ala@agrene.fr

**LIENS UTILES** : www.astredhor.fr, www.inra.fr, www.agrene.fr

Annexe 10 : Chapitre d'ouvrage sur les souches de

*F. oxysporum* non pathogènes.

## Chapter 13: Root interactions with non-pathogenic *Fusarium*

**Hey *Fusarium oxysporum*, what do you do in life when you do not infect a plant?**

**Christian Steinberg<sup>1\*</sup>, Charline Lecomte<sup>1</sup>, Claude Alabouvette<sup>2</sup>, Véronique Edel-Hermann<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>: INRA, UMR1347 Agroécologie, 17 rue Sully - BP 86510, F. 21000 Dijon, France

<sup>2</sup>: 47 r Constant Pierrot 21000 Dijon, France

\* corresponding author

### **Abstract**

In this review, we tried to present *Fusarium oxysporum* in an ecological context rather than to confine it in the too classic double-play of the non-pathogenic fungus that protects the plant against the corresponding *forma specialis*. Moreover, *F. oxysporum* is sometimes one, sometimes the other, and only the fungus can reveal its hidden face, according to it is or not in front of the target plant. Despite the quality and richness of the studies conducted to date, molecular approaches highlight some of the evolutionary mechanisms that explain the polyphyletic nature of this species but still they do not identify a non-pathogenic *F. oxysporum*.

This soilborne fungus has primarily an intense saprophytic life and it finds its place in the functioning of the ecosystem of which it actively occupies all compartments thanks to an impressive metabolic flexibility and a high enzyme potential. This adaptability is exploited by *F. oxysporum* first to get carbon from different organic sources and energy through variable strategies including nitrate dissimilation under severe anaerobic conditions, but also to colonize extreme environments some of which being dramatically anthropized. This adaptability is also exploited by man for bioremediation of polluted sites, detoxification of xenobiotic compounds including pesticides and furthermore for industrial and biotechnological processes. The presence of the fungus in water distribution networks of city stresses again the adaptable nature of the fungus but more precisely, this highlights the presence of clonal populations worldwide and raises the question of the role of man in the transfer of biological resources.

We conclude in a provocative manner by asking if non-pathogenic *Fusarium oxysporum* would not be the all-purpose fungal tool needed to ensure a good soil functioning.