



Station de l'Institut technique de l'horticulture

22 rue de Normandie
76 640 Fauville en Caux



44, rue d'Alésia
75 682 PARIS

ASTREDHOR PROGRAMME NATIONAL DE RECHERCHE APPLIQUEE ET D'ETUDES 2012

*Développement d'un test de détection précoce
de la fusariose du cyclamen*

*Rapport 2012
(F. RAYNAL, A. LANGLOIS)*

PROJET D'ACTION : SITUATION

Début de l'action : 2011

Durée prévue : 2 ans

TITRE : *Développement d'un test de détection précoce de la fusariose du cyclamen*

Titre abrégé : test de détection précoce de la fusariose sur cyclamen

MOTS CLES (5 au maximum): Détection précoce, Souche, *Fusarium oxysporum*, Résistance

Chef de projet (nom, coordonnées...) :

Agnès LANGLOIS

Directrice scientifique et technique

Station AREXHOR Seine-Manche

22, rue de Normandie

76640 FAUVILLE EN CAUX

Tél. : 02 35 95 97 17

agnes.langlois@astredhor.fr

Si le projet s'inscrit dans un programme plus global, indiquer le chef de file de ce programme (nom, organisme, coordonnées...) :

aucun projet

PARTENAIRES qui travaillent directement avec le chef de projet :

- INSTITUT TECHNIQUE DU LIN, 2 Chemin du Moulin, 27 170 ECARDENVILLE LA CAMPAGNE

Nom du partenaire: Emmanuelle Cariou-Pham, Dr – Ingénieur, Team Manager Téléphone/fax : 01 30 79 95 89/ 01 30 79 95 90, Mail : emmanuelle.cariou@lin-itl.com

- EYRAUD PRODUCTIONS: Les Ambreux, RN 82 - 42210 St-Laurent la Conche -

Nom du partenaire : Philippe Eyraud, directeur, Tel 04 77 27 47 57, Fax 04 77 27 47 58, Mail : philippe.e@eyraud-productions.com

LIEUX DE REALISATION :

- AREXHOR SEINE MANCHE, laboratoire de La Vatine Horticole, 32 rue Alfred Kastler, 76 135 MONT SAINT AIGNAN

- INSTITUT TECHNIQUE DU LIN, Laboratoire du Centre de Grignon, Campus AGROPARISTECH, Avenue Lucien Brétignières, 78 850 THIVERVAL GRIGNON

AUTRES PARTENAIRES du programme global notamment :

- Laboratoire Université de Rouen : Pr Azeddine DRIOUICH, Directeur-adjoint du laboratoire Glyco-MEV, animateur du réseau GRR VATA (Végétal, Agronomie, Transfert des Agroressources et des Agrotechnologies), Faculté des Sciences , Université de Rouen, 76 821 Mont Saint Aignan, Cedex, Tél : 02 35 14 65 35/fax : 02 35 14 66 15 ; Mail : Azeddine.Driouich@univ-rouen.fr

EXPERTS CONNUS SUR LE SUJET :

- Claude Alabouvette, conseiller scientifique, AGRENE, 47 rue Constant Pierrot, 21000 Dijon ; Mail : c.ala@agrene.fr

- Christian STEINBERG : directeur UMR INRA-Université de Bourgogne, Microbiologie du Sol et de l'Environnement ; Mail : christian.steinberg@dijon.inra.fr

DESCRIPTION DE L'ACTION

I. OBJECTIFS

I. 1. Enjeux :

La fusariose du cyclamen continue de sévir sur les exploitations horticoles. La recherche de méthodes de lutte est un axe très étudié au sein du réseau ASTREDHOR. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucune matière chimique efficace de façon préventive ou curative. Aujourd'hui, une approche de protection intégrée qui mêle à la fois mesures prophylactiques, optimisation des pratiques culturales, moyens de lutte biologique en combinaison avec des moyens chimiques s'avère nécessaire pour contrôler la maladie. Un autre axe assez peu étudié consiste également à améliorer la qualité sanitaire des jeunes plants, voire à développer des variétés tolérantes lorsque ceci s'avère possible.

I. 2. Résultats attendus :

De récents travaux de comparaison d'isolats de fusariose de cyclamen effectués par le laboratoire mutualisé de l'ITL et de Terres d'Innovation, en collaboration avec la station AREXHOR Seine Manche a permis de mettre en évidence par les techniques de biologie moléculaire, des profils similaires pour des fusarioses de pathogénie proche. Un marqueur RAPD semble inféodé aux souches virulentes. Il est par conséquent proposé que ces travaux soient poursuivis afin qu'ils puissent déboucher sur des tests de détection précoces de la maladie notamment sur jeunes plants. A plus long terme, cet outil associé à un test biologique en serre pourrait permettre de réaliser de la sélection de plantes plus résistantes.

II. SITUATION ACTUELLE DU SUJET DE RECHERCHE

II. 1. Synthèse bibliographique permettant de situer le projet :

La fusariose vasculaire est une maladie redoutable des végétaux. Il existe dans le sol un champignon, *Fusarium oxysporum*, qui dans la plupart des cas vit en saprophyte. Cependant, ce champignon comprend des souches particulières ou formes spéciales, qui elles sont pathogènes et très spécialisées.

Fusarium oxysporum f.sp.cyclaminis est l'agent de la fusariose vasculaire du cyclamen. Ce champignon qui se situe dans le sol est uniquement inféodé au cyclamen. Connue depuis les années 1930 en Europe, cette maladie cryptogamique est apparue en France en 1973 (Rouxel et Grouet, 1974).

- *Cycle de développement du champignon* : Les *Fusarium* sont des champignons qui se conservent habituellement dans les sols. La culture du cyclamen étant généralement réalisée hors sol sur des substrats neufs ou désinfectés, la contamination d'une serre est donc souvent liée à l'introduction de jeunes plants contaminés mais ne présentant aucun symptôme apparent. Une fois introduit dans la serre, les techniques culturales modernes du cyclamen facilitent sa propagation et son maintien d'une année sur l'autre. Les spores du champignon produites en très grand nombre sont véhiculées par l'eau ou par les outils au moment du repotage et pénètrent par les racines. 20 mm de tiges avec des fructifications rosées de *F. oxysporum* contiennent près de 20 millions de spores. Il suffit de 50 000 spores pour tuer une plante dans un pot d'un litre (Morel Diffusion, 2007). Le champignon ayant un optimum de croissance à 28°C, les symptômes apparaissent plus rapidement et d'une plus forte intensité au printemps lors de journées ensoleillées et en été. Enfin les supports de culture, les pots, les tablettes, le système d'irrigation, les tuyauteries et les bacs de solutions fertilisantes peuvent être pollués par les spores du champignon ce qui assure ainsi la pérennité de l'inoculum (Wuster, 1995). Il n'est pas encore clairement établi si l'apparition tardive des symptômes est due à des nouvelles inoculations venant de la serre via un sol infesté, ou le vent ou la présence de mouches des terreaux ou si l'infection apparaît dès la phase jeune plant et qu'elle

reste latente jusqu'à ce que les conditions deviennent favorables au déclenchement de la maladie (Elmer W.H, 2003).

Reste que, concernant le jeune plant, en général les jeunes plants âgés de 3 à 4 mois ne présentent pas de symptômes de Fusariose, cependant des prélèvements suivis d'isolements systématiques effectués à ce stade de végétation révèlent qu'il peut y avoir entre 2 et 5% de tubercules contaminés. Un établissement peut donc être contaminé par l'intermédiaire de jeunes plants qu'il a reçu du sélectionneur (Grouet, 85). Des travaux récents effectués par notre station AREXHOR Seine Manche confirme ces résultats (rapport technique Seine Manche, 2009 et 2010) Ainsi, l'utilisation de plants indemnes de *F. oxysporum* est la première condition nécessaire pour obtenir un bon état sanitaire dans une culture de cyclamen. L'incidence économique de la fusariose sur la culture en cours est d'autant moins importante que sa détection et son éradication sont précoces. Les mesures prophylactiques sont par ailleurs indispensables ; il est en effet conseillé en fin de culture d'effectuer une désinfection complète des poteries, supports de culture et système d'irrigation. Le choix du substrat a également une grande importance sur le développement de la maladie. A l'heure actuelle des substrats variés sont proposés sur le marché et tous ne présentent pas la même réceptivité vis-à-vis de la fusariose. Certains produits dérivés de l'industrie du bois freinent nettement le développement de la maladie (Grouet et Lesaint, 1984)

A ce jour, il n'existe aucune matière active chimique efficace de façon préventive et encore moins curative. De nouveaux produits dits phytostimulants ou antagonistes appliqués préventivement semblent apporter quelques pistes prometteuses (Stapel et al., 2006) mais dans bien des cas si ces produits parviennent à retarder la maladie ils n'arrivent pas seuls à l'éradiquer. La combinaison de moyens chimiques et biologiques apporterait dans ce cas de meilleurs résultats (Elmer W.H., 2004). Reste que les producteurs ont à ce jour peu de références et peu d'homologations de ces nouveaux produits aussi leur confiance est encore très limitée dans ces nouveaux moyens de lutte biologique.

Concernant les analyses moléculaires, beaucoup de travaux ont été effectués sur *Fusarium oxysporum* concernant les cultures de melon, tomate, pois en particulier ; quelques travaux également sont relevés sur cultures florales (œillet, lys, argyranthemum, bulbes) mais aucun sur cyclamen.

Concernant les analyses moléculaires, beaucoup de travaux ont été effectués sur *Fusarium oxysporum* concernant les cultures de melon (An ChongYing et al. 2009), tomate (Wu *et al.* 2010) en particulier. Quelques travaux également sont relevés sur cultures florales (œillet, lys, Shahn *et al.* 2009, argyranthemum, bulbes) mais aucun sur cyclamen. Ces travaux portent sur la mise en place de carte génétique, de QTLS pour l'amélioration des plantes avec un objectif de sélection assistée par marqueur pour introduire des caractères de résistance à la fusariose vasculaire dans les cultures d'intérêt agronomique. D'autres travaux portent sur des études de population de *F. oxysporum* avec repérage des races dans les territoires cultivés (tomate, Baysal *et al.*, 2009; melon, Shafagh *et al.* 2008;) et des analyses génétiques qui démontrent toute la complexité des populations de *F. oxysporum*. : diversité des formes spéciales, des races, des CVG (Corell, 19991). Différents types de marqueurs ont été utilisés pour analyser *F. oxysporum* (ISSR, SCAR, RAPD, etc..., Mutlu, *et al.* 2008; Larsen et al. 2001). Pour des raisons de rapidité d'exécution, nous avons choisi d'utiliser la RAPD, suivi de SCAR pour identifier un marqueur au sein de populations de *F. oxysporum f. sp. cyclaminis*. Cette technique a déjà été utilisée sur les pathogènes du lin (*Verticillium dahliae*, Cariou, 2010) en vue de réaliser du diagnostic moléculaire sur plantes malades. Compte tenu du manque d'information sur les populations de *Fusarium oxysporum f. sp. cyclaminis*, une collection de souches de *Fusarium oxysporum f. sp. cyclaminis* sera donc réalisée au cours de ce projet. Ces souches doivent être représentatives des souches présentes chez les distributeurs, producteurs et sélectionneurs de plants et correspondre à leur évolution. Son élargissement à des souches provenant de pays européens voisins permettrait d'appréhender l'origine polyphylétique ou monophylétique du pouvoir pathogène des souches.

On ne sait pas s'il existe des CVG (Vegetativ Compatibility Group) au sein de population de *Fusarium oxysporum f. sp. cyclaminis* et il n'existe pas davantage d'informations à propos de l'existence ou non de races. Il est donc important de vérifier l'absence d'effet souche sur le comportement des variétés de cyclamen au moment de la réalisation du test biologique sur les variétés de cyclamen.

Aussi, ce projet propose d'apporter des solutions aux producteurs en s'appuyant sur le développement d'un test moléculaire pour le dépistage précoce de la fusariose du cyclamen sur jeune plant afin d'en limiter la propagation et propose de mettre au point en parallèle un test biologique pour identifier les variétés, géniteur ou lignées de cyclamen moins sensibles à la fusariose vasculaire afin d'apporter des solutions génétiques complémentaires au dépistage.

II. 2. Bilan des résultats acquis sur le sujet :

Notre station AREXHOR Seine Manche a mené en 2010 un travail en collaboration avec le laboratoire de l'ITL associé à Terres d'Innovation, dont l'ASTREDHOR fait partie intégrante. Nous avons envoyé à ce laboratoire plusieurs échantillons de plants de cyclamen. A partir de ces échantillons, le laboratoire a constitué une collection comprenant quelques isolats de *Fusarium oxysporum* f *sp.cyclaminis*. Ensuite une étude a été menée en vue d'identifier dans un premier temps leur pouvoir pathogène et dans un deuxième temps un marqueur moléculaire associé aux isolats pathogènes de *F. oxysporum* en vue de mettre au point un test de diagnostic simple et plus fiable que les isolements en boîte de Pétri classique qui ne permettent pas actuellement, d'identifier d'un point de vue morphologique les isolats pathogènes des isolats non pathogènes de *Fusarium* (Cariou, 2010). Les premiers résultats nécessitent d'être confirmés en particulier en élargissant la collection d'isolats sur laquelle repose le test moléculaire et en apportant des éléments techniques d'amélioration du test du pouvoir pathogène de ces isolats, éléments indispensables à la bonne interprétation des données moléculaires.

Des prélèvements faits par notre station sur jeunes plants ont confirmé par ailleurs la présence du pathogène sur 1 à 2% des échantillons analysés, avec des variétés qui apparaissent plus sensibles que d'autres (comptes rendus AREXHOR Seine-manche, 2009-2010).

III. GAINS OU AVANTAGES ATTENDUS

III. 1. Intérêt scientifique et technique :

La fusariose vasculaire est une maladie redoutable des végétaux. A ce jour, il n'existe aucune matière active chimique efficace de façon préventive et encore moins curative. Aussi la mise au point de test de dépistage précoce s'avère un enjeu clef **pour la filière horticole**, ceci en vue d'améliorer la qualité sanitaire des cultures. En perspectives, le développement de ces tests de diagnostic permettra d'apporter dans un premier temps des éléments de compréhension sur le couple hôte/pathogène et par la suite d'étudier l'incidence des autres facteurs de production, en particulier les phénomènes de réceptivité des matrices de culture à cette maladie. Par ailleurs, il sera possible d'extrapoler ces tests non seulement à d'autres couples hôtes/pathogènes du sol des cultures horticoles mais également de considérer le rôle de la flore endogène associée dans le processus infectieux (flores antagonistes, auxiliaires, opportunistes,...).

Grâce à **son laboratoire de diagnostic moléculaire**, devenu le laboratoire de **Terres d'Innovation**, (association regroupant 5 instituts techniques dont l'ANITTA, l'IFPC, l'ASTREDHOR, l'ITEIPMAI et l'ITL), l'ITL, s'attache à mettre au point du diagnostic moléculaire en s'appuyant sur la bibliographie existante - détection de *Phytophthora* sur les mous de jus de pomme à cidre (Lee et al., 1993), détection de Stolbur sur lavandin (anonyme, OEPP)- mais aussi lorsqu'aucune référence n'existe, il s'attache à mettre au point des marqueurs moléculaires spécifiques d'espèces comme la verticilliose du lin (Utilisation d'un SCAR pour la détection moléculaire du *Verticillium* dans les sols et adaptation consécutive de l'itinéraire technique du lin fibre, *Linum usitatissimum* sur les parcelles à risque, (communication sous presse 4^{ème} conf. Internationale de Lille). Les travaux engagés sur la fusariose vasculaire du cyclamen ne sont pas sans rapport avec la fusariose du lin et permettront d'apporter également des éléments de compréhension de cette maladie au sens large avec un véritable intérêt de la liniculture française et européenne.

Les acteurs privés de la filière représentés par **Eyraud Productions** partenaire du projet, sont quant à eux intéressés par la caractérisation fine de géiteurs vis à vis de la fusariose du cyclamen ce qui leur permettra de mieux connaître leur matériel de sélection donnant la possibilité de créer des variétés tolérantes.

III. 2. Intérêt socio-économique :

Notre ambition est de mettre à disposition des producteurs horticulteurs des solutions innovantes et respectueuses de l'environnement, sur la base de l'exploitation des relations plante-microorganismes dans les sols. L'utilisation réduite de produits chimiques, la limitation des risques d'accumulation de résistances, l'amélioration de la qualité du matériel végétal et des solutions nutritives par des techniques de dépistage et de protection biologique garantiront aux producteurs un bon état sanitaire de leur culture. La réduction des intrants contribuant ainsi à un meilleur respect de l'environnement et une amélioration globale du produit, toutes ces mesures ne peuvent que satisfaire le consommateur final. Ces travaux seront ainsi directement valorisables par AREXHOR Seine Manche et directement transférable, par leur intermédiaire, à tous les producteurs et acteurs de la filière horticole

IV. PROGRAMME DE TRAVAIL

IV. 1. Plan de recherche et rôle de chaque partenaire :

Action 1: Mise en place **d'une collection élargie d'isolats/souches de *F. oxysporum*** (diversité des formes spéciales, du pouvoir pathogène, minimum 50 isolats), transfert de la collection Terres d'Innovation, de la technique de conservation (culture en tubes sur milieu malt agar et conservation à 4-5°C) et de repiquage du **partenaire 2** au **partenaire 1**. La plupart des tests préliminaires (Cariou, 2010) ont été réalisés à l'aide d'isolats pour constituer les inocula. Or, compte-tenu de la diversité génétique de ce champignon (Bayraktar *et al.*, 2007), il serait préférable de réaliser des cultures monospores et de conserver des souches et non plus des isolats ce qui semble beaucoup plus adapté à la fois pour la réalisation de tests biologiques du pouvoir pathogène (meilleur niveau de reproductibilité des tests) mais aussi pour le typage moléculaire du champignon (homogénéité des profils de bandes en fonction des caractères morphologiques et de virulence des souches). Pour chacun des isolats, une culture monospore sera réalisée en préparant une gamme de dilution de suspension de spores de l'isolat. Chaque suspension de la gamme sera étalée sur boîte de Pétri contenant du milieu Malt Agar et mis en culture pendant 7 jours à température ambiante. Après incubation, le nombre de colonies par boîte déterminera le niveau de dilution approprié permettant de réaliser une culture monospore de *F. oxysporum*.

Action 2: Mise au point d'un test **d'infection semi artificielle en serre des bulbes de cyclamen**. Le partenaire 2 a déjà mis en place quelques tests préliminaires (Cariou, 2010) qui peuvent servir de base à la réalisation d'un test plus fin et surtout reproductible afin d'identifier le pouvoir pathogène de l'ensemble des souches de *F. oxysporum* détenues dans la collection mutualisée ITL-Terres d'Innovation-Astredhor-AREXHOR Seine Manche. Les tests actuels sont réalisés sur jeunes plants âgés de 6 mois depuis la germination des graines de cyclamen (levée de dormance incluse) à l'aide d'une suspension de *F. oxysporum* à 10^6 spores/ml de culture sur une variété de cyclamen sensible à la fusariose. Les conditions de cultures en serre à 18-20°C restent à définir en particulier pour accélérer la végétation du cyclamen et ramener le délai entre la date de germination et la date de l'infection des bulbes à 3 mois. La gamme de concentration en inoculum reste également à définir en particulier pour pouvoir 1-juger rapidement du pouvoir pathogène des souches et 2- juger de la sensibilité des variétés de cyclamen à la fusariose, une concentration de 10^6 spores/ml de culture étant assez élevée et probablement trop discriminante pour juger des variétés. Le nombre de répétition sera également à définir (entre 2 et 5 l'optimum se situant autour de 3). Le **partenaire 2** transférera sa technique d'infection au **partenaire 1** qui testera les éléments d'amélioration du test en collaboration avec le **partenaire 2**. Le passage de la collection de souches de

champignon définie dans l'action 2 sur la variété sensible à la fusariose sera réalisé par les deux **partenaires 1 et 2**.

Action 3: Mise au point d'un marqueur moléculaire associé au pouvoir pathogène. Les souches caractérisées du point de vue de leur pouvoir pathogène dans l'action précédente seront également caractérisées d'un point de vue moléculaire afin d'associer le caractère du pouvoir pathogène aux marqueurs RAPD (Bayraktar et al., 2007). L'ITL possède déjà une expertise dans le domaine du typage (Roose-Amsaleg *et al.* 2006). Des expérimentations préliminaires sur un ensemble de 12 isolats de *F. oxysporum*, comprenant des isolats de la forme spéciale *cyclaminis* mais aussi *lini* tendent à montrer des profils RAPD (Rapid Amplification Polymorphism DNA) similaires selon l'origine des prélèvements de bulbes de cyclamen, le mode d'isolement du champignon et sa virulence. Au cours de l'Action 3, l'ensemble de la collection sera repiquée pour procéder aux extractions d'ADN des cultures fongiques (kit Wizard® Genomic DNA Purification de la société Promega) et aux analyses RAPD à l'aide de 13 amorces RAPD courtes (10 nucléotides) et quelques amorces longues (25 pb) afin d'identifier un profil moléculaire associé aux souches agressives de foc. Les profils de bandes de chaque souche, seront croisés avec les résultats du test du pouvoir pathogène. Quelques bandes seront ainsi choisies, clonées et séquencées pour définir d'autres amorces permettant d'obtenir un SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) corrélée au pouvoir pathogène des foc.

Action 4: Suivi d'une campagne de prélèvements avec analyses sur jeunes plants (partenaire 1) par les méthodes traditionnelles d'analyse sur milieu Malt Agar et **validation du test moléculaire**.

Culture traditionnelle : Une désinfection préalable des bulbes de cyclamen (Domestos 10% pendant 2mn suivi de 3 rinçages) permet d'éliminer une grande partie des populations de champignons saprophytes (Cariou, 2008). Les fragments de bulbes d'1 à 2mm sont déposés sur le milieu de culture et incubés pendant 7 jours à température ambiante. Les résultats seront donnés par le pourcentage de colonisation des fragments de bulbe. Pour chaque échantillon, quelques bulbes de cyclamen seront testés en biologie moléculaire à l'aide du ou des SCARs définis dans l'action précédente (**partenaire 2**). En parallèle, une enquête sera distribuée au producteur pour tenter d'identifier la source de contamination (substrats, fluide, température de la serre..etc) des plants (**partenaire 1**).

Action 5: Tests d'infections semi- artificielle (serre) de l'ensemble des variétés, lignées et espèces apparentées (50 numéros) Détermination du phénotype de sensibilité à la maladie des variétés de cyclamen, numéro de lignées ou géniteurs fournis par Eyraud Productions (**partenaire 1 et 3**). Dans cet objectif, un panel de souches sera choisi en fonction des résultats de l'action 4, pour être testé sur l'ensemble des entrées fournies par Eyraud Plants afin de vérifier l'absence d'effet race-spécifique. **Définition des géniteurs candidats à la sélection de variétés tolérantes.**

Action 6: Rédaction d'articles, comptes-rendus, pilotage du projet et rédaction d'un itinéraire technique adapté à la fusariose du cyclamen (**l'ensemble des partenaires**).

- Calendrier des travaux : diagramme de Gantt

Il permet de représenter les tâches (phases du projet) dans le temps avec des segments proportionnels à la durée (une case cochée = un mois)

Phases du projet (**l'implication des partenaires dans les différentes phases du projet aura été précisée au point III-1**)

Mois Action	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	■	■	■															■	■	■				
2	■	■	■	■	■	■	■	■	■															
3						■	■	■	■	■	■	■												
4																			■	■	■	■	■	■
5													■	■	■	■	■	■	■	■	■			
6	■					■							■									■	■	■

IV. 2. Rôle de chaque partenaire

Le rôle de chaque partenaire est précisé dans le plan d'actions

Noms des partenaires :

Partenaire 1 : AREXHOR Seine Manche

Partenaire 2 : Institut Technique du Lin

Partenaire 3 : Eyraud Productions

IV.3. Moyens en personnel (mois par catégorie pour chaque partenaire) et équipements nécessaires :

- **Equipe AREXHOR Seine Manche** : un chef d'équipe (directrice scientifique), un responsable d'essai (Ingénieur) et un stagiaire cycle Master (6 mois) par an au sein d'un laboratoire équipé en matériel de microbiologie (étuve, hotte à flux laminaire, laverie, autoclave, chambre de culture)
- **Equipe labo ITL** : un chef d'équipe (docteur-Ingénieur), deux AI (Assistante Ingénieur) au sein d'un laboratoire équipé en matériels de biologie moléculaire (thermocycleurs, centrifugeuses, qPCR), en matériels de microbiologie, (hottes à flux laminaire, microscopes), 40m² de serre.
- **Partenaire privé Eyraud Productions** : fournitures de graines (surface de multiplication en serre et au champ)

IV.4. Formes de valorisations envisagées

- **Communication aux congrès suivants** : CIMA Congrès Maladie de l'AFPP (Association Française de Protection des Plantes),
- **Articles de vulgarisation** (PHYTOMA ou CULTIVAR, Lien Horticole..).
- **Séminaires et communications professionnelles**: Conseil Intermétier, Journées techniques professionnelles inter-institut

V. RESULTATS DU PROGRAMME MENE EN 2011 et 2012 PAR AREXHOR SEINE MANCHE

V.1. Mise en place d'une collection d'isolats/souches de *F. oxysporum sp. cyclaminis* à partir de campagnes de diagnostic (Action 1)

- a) Collection établie à partir de deux campagnes de diagnostics précoces (2009-2010)

Deux campagnes de diagnostic précoces du *Fusarium* sur jeunes plants de cyclamen ont été entreprises en 2009 et 2010 par Arexhor Seine Manche. La campagne de diagnostic de 2009 s'est effectuée sur 622 échantillons, prélevés dès la réception sur les entreprises horticoles, représentant 8 entreprises, 5 fournisseurs et 35 variétés. Nous avons relevé un pourcentage moyen de 2% d'échantillons contaminés par *Fusarium* sur les jeunes plants. En 2010, la campagne de diagnostic a été élargie à 1198 échantillons représentant 10 entreprises, 7 fournisseurs et 72 variétés. Nous avons

relevé un pourcentage moyen de 1,34% d'échantillons présentant du *Fusarium* (cf. rapports d'essai AREXHOR Seine Manche, 2009,2010).

Les prélèvements de jeunes plants ont été effectués en fonction des plannings et des quantités commandées (Semaine / Quantité / Variété / Fournisseur). Le choix des variétés s'est fait en fonction de leur représentativité sur les entreprises partenaires.

L'échantillonnage s'est fait à hauteur de 0,8 à 1,2% des quantités reçues.

Le matériel végétal analysé correspond au bulbe du jeune plant en mini motte.

Le diagnostic a été effectué pour détecter la présence ou non du champignon pathogène responsable de la maladie de la fusariose sur Cyclamen : *Fusarium oxysporum* f.sp *cyclaminis*.

b) Méthode d'isolement utilisée :

La technique de mise en culture du champignon a été préalablement testée à partir de plantes comportant des symptômes de fusariose. Elles ont servi de « témoin positif » pour la campagne de diagnostic.

Pour rappel, les principaux symptômes sur feuillage sont :

- Décoloration ou tache jaune qui peuvent gagner l'ensemble de la feuille. Les feuilles les plus anciennes sont touchées d'abord avec une progression du pétiole vers le limbe ;
- Le pétiole ramollit, ce qui entraîne la chute des feuilles. Le flétrissement des organes aériens localisés au début à une partie du végétal s'étend ensuite à toute la plante ;
- Sur les plantes très atteintes par le *Fusarium*, des amas blanc-rosés de spores apparaissent à la base des pétioles.
- Au stade final, la plante est complètement affaissée, brunie et desséchée.

Sur bulbe, une coupe transversale de celui-ci permet de voir des ponctuations brun-noir localisées au niveau des faisceaux vasculaires (cf. photo2).



Photo 1 : Symptômes de jaunissement sur feuille



Photo 2 : Symptômes sur bulbe

Le diagnostic est réalisé par une méthode d'isolement à partir de fragments de bulbe.

Procédure suivie : désinfection et mises en culture des bulbes sur milieu gélosé stérile, sous hotte à flux laminaire ; incubation ; lecture.

Rappel des différentes étapes :

➤ Préparation des bulbes :

Préalablement les feuilles et racines sont retirées, les bulbes sont rincés à l'eau claire pour enlever tous résidus de substrat ou autre. Puis, les bulbes sont désinfectés selon la méthode suivante :

- Mise en agitation dans un pot contenant de l'alcool à 70° pendant 2min ;
- Mise en agitation dans un pot contenant de l'hypochlorite de sodium à 5% pendant 10min ;
- Rinçages avec agitation dans un pot d'eau déminéralisée stérilisée, en répétant l'opération 3 fois pendant 5min.

➤ Support de culture :

Un milieu gélosé stérilisé à l'autoclave composé de 1% d'Agar et 1% de Malt est coulé dans des boîtes de Pétri. L'opération se fait sous hotte.

Chaque bulbe analysé est découpé en lamelle (épaisseur : 1mm environ) puis disposé dans une boîte de Pétri contenant le substrat nutritif (cf photo3). Ensuite la boîte est scellée par une bande de film en paraffine.

➤ Incubation :

Les boîtes sont placées dans un incubateur à 28°C pendant 10 jours.

➤ Lecture :

Les boîtes sont observées. D'après nos témoins positifs, la présence du pathogène recherché induit une coloration rose du milieu gélosé et l'apparition d'un tissu de filaments mycéliens mousseux blancs au-dessus et autour des rondelles du bulbe. Ces fructifications visibles du champignon peuvent être observées entre lame et lamelle pour une observation au microscope. Les macroconidies sont caractérisées par une forme de croissant segmenté (cf. photo 4).

Cette procédure avec désinfection permet d'écartier toute confusion de détection avec un éventuel *Fusarium oxysporum* antagoniste.

Si du *Fusarium* semble être observé, les boîtes sont envoyées pour vérification au laboratoire de Terres d'Innovation.



Photo 3 : Lamelles de bulbe contaminé par *Fusarium*, mise en culture en Boite de Pétri



Photo 4 : Macroconidies de *Fusarium* observées au microscope

c) Synthèse des résultats des deux campagnes de diagnostic, réalisation de la collection

Les campagnes réalisées ont permis de mettre en évidence des différences variétales (15 à 20% des variétés analysées ont présenté une contamination, avec des taux variant de 2 à 100% en fonction du nombre d'échantillons analysés) et des degrés de contamination plus ou moins importants selon les fournisseurs (les taux variant de 0 à 4% en moyenne mais pouvant atteindre 40% en prenant en compte parallèlement le facteur variétal). En effet, le choix des Variétés/Fournisseur s'est fait en fonction de leur représentativité sur les 8 à 10 entreprises participant à ces campagnes de diagnostic. Ces deux facteurs sont par conséquent difficilement dissociables.

Suite à ces campagnes, nous avons donc établi une première collection. Celle-ci est composée de 31 isolats de *F. oxysporum* et a été élargie à 3 échantillons supplémentaires issus de plantes malades et isolés pour obtenir une collection totale de 34 isolats (cf. tableau ci-après).

A noter que ces 34 isolats ont été envoyés pour confirmation auprès du laboratoire de Terre d'Innovation.

La collection d'isolats :

Numéro échantillon/isolat	Variété de Cyclamen	Fournisseur de jeunes plants	Semaine de réception	Date de 1ere mise en culture
1	Umbrella	Syngenta	26	30/06/2009
2	Umbrella	Syngenta	26	30/06/2009
3	Swan rose 1758	Eyraudplants	30	30/06/2009
4	Swan rose 1758	Eyraudplants	30	30/06/2009
5	Swan Mélange	Eyraudplants	26	29/06/2009
6	Swan Mélange	Eyraudplants	26	29/06/2009
7	Swan Mélange	Eyraudplants	26	29/06/2009
8	Halios Frangé mélange	Sentier	28	13/07/2009
9	Halios Frangé mélange	Sentier	28	13/07/2009
10	Swan 363 rose flammé	Eyraudplants	28	13/07/2009
11	Swan 363 rose flammé	Eyraudplants	28	13/07/2009
12	Swan 363 rose flammé	Eyraudplants	28	13/07/2009
13	Super Serie Winter rouge ecarlate	Eyraudplants	31	31/07/2009
14	Super serie winter blanc	Eyraudplants	31	30/07/2009
15	Super serie winter blanc	Eyraudplants	31	30/07/2009
16	Mini cyclamen	S&G	/	21/08/2009
17	Mini cyclamen	/	/	13/08/2010
18	Metis Mélange	Sentier	24	22/06/2010
19	Halios Lollipop frangé mélange 257	Beekenkamp	25	08/07/2010
20	Umbrella	Syngenta	26	06/07/2010
21	Umbrella	Syngenta	26	06/07/2010
22	Umbrella	Syngenta	26	06/07/2010
23	Umbrella	Syngenta	26	06/07/2010
24	Umbrella	Syngenta	26	06/07/2010
25	Umbrella	Syngenta	26	06/07/2010
26	Umbrella	Syngenta	26	06/07/2010
27	Umbrella	Syngenta	26	06/07/2010

28	Metis magenta decora (4220)	Beekenkamp	28	21/07/2010
29	Metis Mélange Flammé	Nebelung	29	22/07/2010
30	Metis saumon écarlate	Beekenkamp	30	06/08/2010
31	Metis victoria	Beekenkamp	30	10/08/2010
32	Rainier	Sentier	30	03/08/2010
33	Super Serie Mini Winter Mélange	Saulais	34	01/09/2010
34	XXL Mammouth	Sentier	/	07/07/2010

(en couleur : isolats prélevés sur plantes malades)

V.2. Mise au point d'une collection monosporee (action 1)

a) Intérêt de la culture monospore

A partir de cette collection de 34 isolats conservée jusqu'alors par repiquages successifs, il a été mis au point une technique de conservation sous forme monospore, compte-tenu de la diversité génétique de ce champignon (Bayraktar *et al.*, 2007). Cette technique permet de conserver des souches et non plus des isolats ce qui semble beaucoup plus adapté à la fois pour la réalisation de tests biologiques du pouvoir pathogène (meilleur niveau de reproductibilité des tests) mais aussi pour le typage moléculaire du champignon (homogénéité des profils de bandes en fonction des caractères morphologiques et de virulence des souches).

Cette technique de culture monospore a été transférée par l'ITL à Arexhor Seine Manche. Elle consiste à préparer une gamme de dilution de suspension de spores de l'isolat et ce pour les 34 isolats. Chaque suspension de la gamme est ensuite étalée sur boîte de Pétri contenant du milieu Malt Agar et mis en culture pendant 7 jours à température ambiante. Les souches isolées obtenues sont ensuite mises en culture en tubes sur milieu malt/agar et conservé à 4-5°C.

b) Méthode de culture en monospore

Préparation des milieux

Les proportions utilisées pour la préparation de milieu spécifique au *Fusarium* sp. sont celles décrites dans l'ouvrage « Détection et isolement des champignons du sol » de P.Davet et F.Rouxel aux éditions INRA.

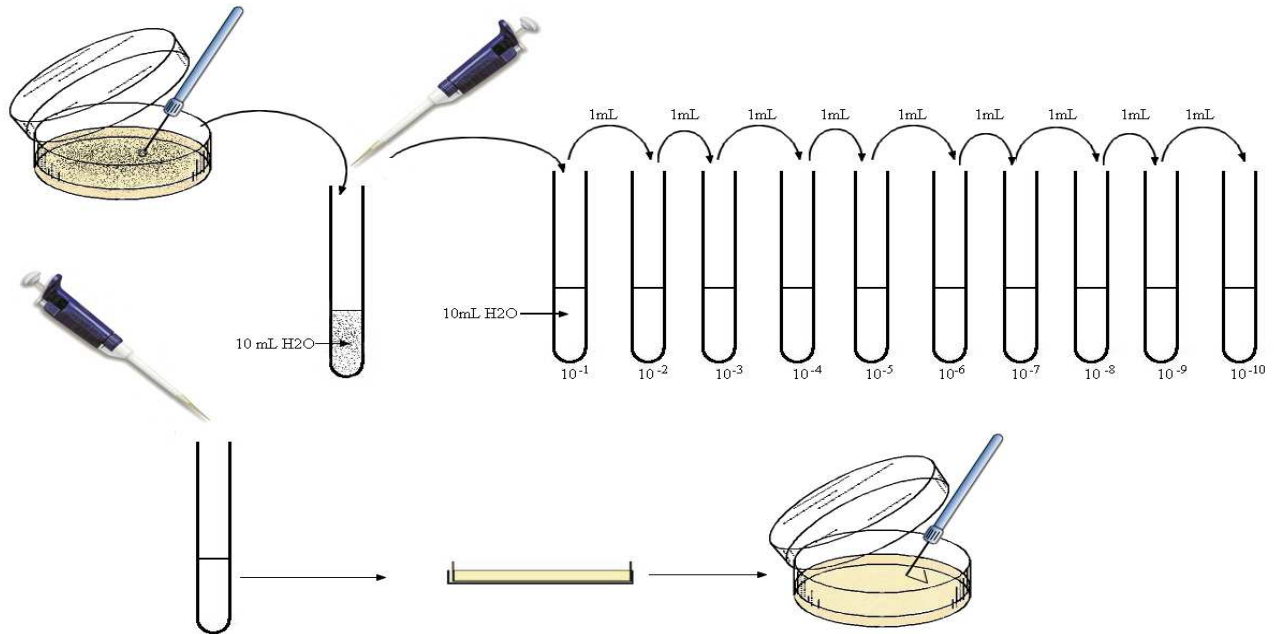
Dans un premier temps, nous préparons une base de milieu constituée de 1% de Malt et 1% d'Agar déshydratés ajouté à de l'eau déminéralisée. La solution est portée à ébullition puis l'Erlenmeyer est rebouché avec un coton cardé puis passé à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes pour la stérilisation. Afin de limiter les risques de contamination, nous ajoutons au milieu, après autoclavage, un antibiotique et un fongicide : la Streptomycine Sulfate à 300mg/L et le PCNB (2, 3, 5,6-Tetrachloronitrobenzene) à 0,25g/L. Ces derniers sont solubilisés dans de l'eau stérile avant d'être incorporés au milieu de base. Le milieu ainsi préparé est ensuite coulé en boîtes de Pétri en conditions stériles sous hotte à flux laminaire.

Mise en culture

Dans un second temps, nous préparons les tubes de dilutions : il s'agit d'une série de 10 tubes contenant 9 ml d'eau (10 dilutions) et 1 contenant 10 ml (solution mère) fermés avec des bouchons et stérilisés.

A partir d'une boîte contenant un isolat, nous prélevons du mycélium afin de le mettre en suspension dans la solution mère. Ensuite, s'effectue la dilution de 10 en 10 à partir de cette solution mère concentrée.

Le modèle de la dilution est le suivant :



- 1 : 1/10 : Prélever 1 ml de la solution concentrée avec 9 ml d'eau stérile.
- 2 : 1/10² : Prélever 1 ml de la solution à 1/10 avec 9 ml d'eau stérile.
- 3 : 1/10³ : Prélever 1 ml de la solution à 1/10² avec 9 ml d'eau stérile.
- 4 : 1/10⁴ : Prélever 1 ml de la solution à 1/10³ avec 9 ml d'eau stérile.
- 5 : 1/10⁵ : Prélever 1 ml de la solution à 1/10⁴ avec 9 ml d'eau stérile.
- 6 : 1/10⁶ : Prélever 1 ml de la solution à 1/10⁵ avec 9 ml d'eau stérile.
- 7 : 1/10⁷ : Prélever 1 ml de la solution à 1/10⁶ avec 9 ml d'eau stérile.
- 8 : 1/10⁸ : Prélever 1 ml de la solution à 1/10⁷ avec 9 ml d'eau stérile.
- 9 : 1/10⁹ : Prélever 1 ml de la solution à 1/10⁸ avec 9 ml d'eau stérile.
- 10 : 1/10¹⁰ : Prélever 1 ml de la solution à 1/10⁹ avec 9 ml d'eau stérile.

Une fois les solutions prêtes, nous prélevons 1mL de chaque solution, déposé et étalé de manière homogène dans les boîtes de Pétri préalablement préparées. Cette opération est répétée 6 fois, de manière à obtenir 6 boîtes pour chaque dilution.

Les boîtes sont ensuite placées en chambre climatique à 25°C (éclairage de 12 heures) pendant 5 à 7 jours ce qui permet un développement optimum du *Fusarium*.

Une fois le *Fusarium* développé, nous ne sélectionnons que les boîtes où les spores sont bien isolées, non confluentes.



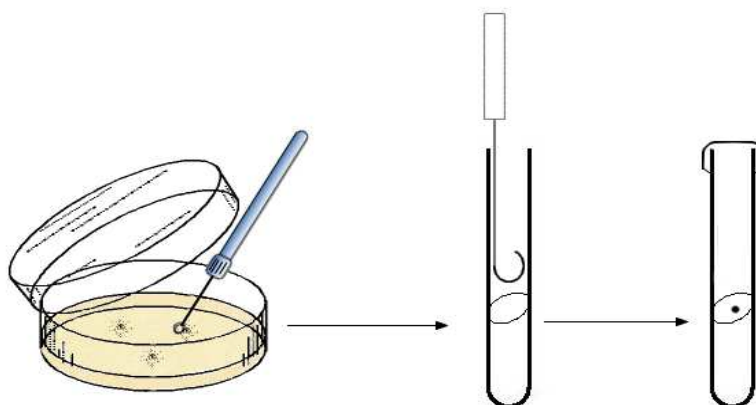
Photos de spores confluentes (boîte rejetée)



Photos de spores non confluentes (boîte conservée)

Repiquage des monospores

Enfin, 6 tubes par isolat sont préparés avant les repiquages des monospores. Ces tubes de culture contiennent 10mL du milieu initialement décrit et figé à 45° pour augmenter la surface du milieu nutritif. Le repiquage s'effectue sous hotte à flux laminaire à partir des boîtes sélectionnées précédemment contenant les spots de spores isolées. Le mycélium de chaque monospore est indépendamment repiqué sur le milieu dans un tube selon le schéma suivant :



Les tubes sont ensuite placés en chambre climatique à 25°C (éclairage de 12 heures) pendant 5 à 7 jours puis stockés en frigo à 4°C.



Photo d'une souche monospore isolée en tube

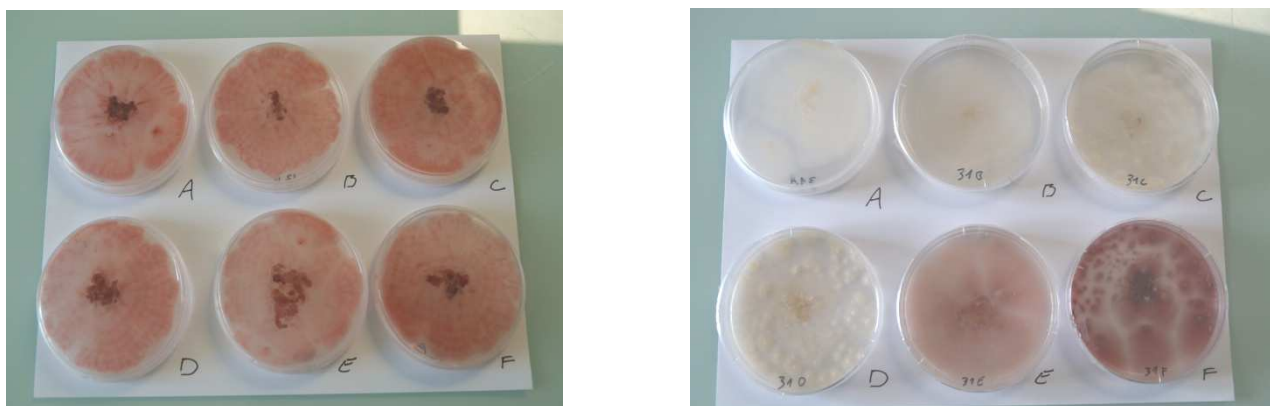
c) Etat d'avancement des cultures de monospores

A ce jour, la totalité de la collection est isolée en tubes de culture monosporee. Nous disposons de 6 tubes par isolat numérotés de A à F soit 6 x 34 souches potentielles (cf liste en annexe 1). Au

vue du développement des différents isolats, il ne nous a pas été permis de déterminer une fourchette de dilution type appropriée, permettant de standardiser la méthode de culture monosporee de *F. oxysporum*. Pour chaque isolat de base, il a été nécessaire de faire toutes les dilutions (de 1 à 10) pour obtenir les monospores, ce qui a nécessité beaucoup de temps. Des comptages sur cellules de Malassez ont été entrepris pour améliorer cette standardisation.

d) Caractérisation morphologique

A l'heure actuelle les différentes souches de *Fusarium* isolées ont été repiquées en boîtes de pétri afin de permettre une observation des caractères macromorphologiques. D'après la collection ainsi obtenue, nous constatons en effet une grande variabilité au sein de l'espèce *Fusarium oxysporum f.sp cyclaminis*. D'une souche à l'autre, différents caractères morphologiques diffèrent. Ces caractères sont variés, mais les principaux sont la pigmentation du thalle, sa croissance, l'aspect et la teinte du mycélium.



Photos présentant les 6 souches (de A à F) de *Fusarium* d'un même isolat montrant ainsi une variabilité morphologique entre deux isolats et au sein d'un même isolat.

Une grille d'évaluation a été établie à partir de données de référence (Assigbetse ; 1988-1989) et une notation à intervalle de temps régulier a été réalisée. (Dernière date d'observation le 21/08/12 : cf. annexe 3)

Les types morphologiques utilisés selon l'ouvrage de référence sont (voir planche photo en annexe 2) :

- Type sporodochial : mycélium duveteux peu épais, parsemé d'amas muqueux de couleur orangée représentant des pionnotes (organe donnant naissance à des macroconidies)
- Type duveteux : mycélium aérien peu épais et relativement peu dense
- Type cotonneux: mycélium aérien épais et très serré
- Type ras : pas de mycélium aérien, aspect muqueux

A noter que pour les 3 isolats pris sur des plantes malades (s 16, 17, 34), il est fait le constat suivant :

- Au sein de l'isolat 34, nous relevons que les souches sont identiques. En effet, elles présentent des caractères semblables. Les six souches présentent une pigmentation du thalle brun/ocre, avec un mycélium duveteux présentant des reflets ocre.
- L'observation des souches de l'isolat 17 montre des variances au niveau de la pigmentation du thalle. En effet, trois des six souches présentent une pigmentation violet clair mais les trois autres présentent une pigmentation tirant sur le rouge. Pour ce qui est du mycélium, celui-ci présente la

même pigmentation pour les six souches, et présente un aspect sporodochial, (présence de fructification orange)

- Pour la souche 16, nous relevons une pigmentation du thalle saumonée semblable entre les différentes souches. Celles-ci présentent un mycélium blanc, toutefois son aspect varie d'une souche à l'autre. Deux souches ont un mycélium sporodochial, les autres présentent un mycélium cotonneux avec des zones rases.

Ainsi, ces observations mettent en évidence une grande disparité entre ces isolats, et au sein d'un même isolat, les souches de chacun pouvant être différentes morphologiquement de celles des autres.

A noter toutefois que les caractères des souches des isolats 16 et 17 se retrouvent chez d'autres isolats. En revanche, les souches de l'isolat 34 sont clairement distinctes des autres souches par la pigmentation de leurs thalles.

V.3. Mise au point d'un test d'infection semi-artificielle (Action 2)

a) Synthèse bibliographique

Diverses techniques peuvent être utilisées pour inoculer les plants. Des études comparatives ont montré qu'une inoculation par le sol avec pour base des grains de millet, était efficace (Elmer, 2002). Plusieurs stations du réseau ASTREDHOR ont mis en place des tests avec inoculation, avec des méthodes différentes :

- l'incorporation du *Fusarium* sur grain de millet dans le substrat au repotage (**Arexhor Pays de Loire, 2005**)
- l'incorporation du *Fusarium* sur grain de millet apporté dans un trou au niveau du substrat une semaine après repotage (**Arexhor Pays de Loire, 2006 et 2007**) à la dose de 10^7 CFU/L de substrat.
- incorporation du *Fusarium* en suspension dans l'eau, à la dose de 10^7 CFU/L de substrat (**Arexhor Pays de Loire, 2008**)
- incorporation du *Fusarium* en suspension dans l'eau, à la dose de 10^5 et 10^6 CFU/L de substrat au repotage des jeunes plants (**RATHO, 1998**)
- incorporation d'un inoculum (souche allemande achetée chez DSMZ) à la dose de 2×10^7 CFU/L de substrat développé sur grains de millet. Les grains sont incorporés au substrat par poquet de 1g/pot, ceci à mi-distance entre la plante et le bord du pot. (**STEPP, 2010**)

Dans l'ensemble, la technique sur grain de millet s'avère en effet satisfaisante. La dose à privilégier se situe autour de 10^7 CFU/litre de substrat. Pour la majorité, les tests d'inoculation ont été réalisés sur des jeunes plants ayant 3 mois de culture et ont été appliqués au moment du repiquage en pot définitif. Après inoculation, les symptômes apparaissent dans un délai de 30 jours à 60 jours, pour des températures voisines de 20°C.

Dans le cadre de notre partenariat avec l'ITL, quelques tests préliminaires (Cariou, 2010) d'infection semi artificielle en serre des bulbes de cyclamen ont été mis en place. Ceux-ci peuvent servir également de base à la réalisation d'un test plus fin et surtout reproductible afin d'identifier le pouvoir pathogène de l'ensemble des souches de *F. oxysporum* de la collection. Les tests ont été réalisés sur des jeunes plants âgés de 6 mois depuis la germination des graines de cyclamen (levée de dormance incluse) à l'aide d'une suspension de *F. oxysporum* à 10^6 CFU/ml de culture (solution d'1 ml injectée par seringue dans un godet de 6 soit l'équivalent de 5×10^6 CFU/L de substrat) sur une variété de cyclamen sensible à la fusariose. Les conditions de cultures en serre à 18-20°C

restent à définir en particulier pour accélérer la végétation du cyclamen et ramener le délai entre la date de germination et la date de l'infection des bulbes à 3 mois. La gamme de concentration en inoculum reste également à définir en particulier pour pouvoir juger rapidement du pouvoir pathogène des souches et juger de la sensibilité des variétés de cyclamen à la fusariose, une concentration de 5×10^6 spores/L de substrat étant assez élevée et probablement trop discriminante pour juger des variétés. Le nombre de répétition sera également à définir (entre 2 et 5 l'optimum se situant autour de 3).

b) Mise au point d'un test d'inoculation au sein d'AREXHOR Seine Manche

En 2011, Arexhor Seine Manche réalise un premier essai d'infection artificielle à partir de l'échantillon n° 34, avec 3 doses d'inoculum (D1, D2 et D3) testées et comparées à une dose nulle (D0). L'inoculum est obtenu à partir du *Fusarium oxysporum* mis en culture sur des grains d'orge puis mélangé dans de l'eau de sorte à obtenir une suspension mère calibrée à $1,8 \cdot 10^9$ CFU/litre. Ce travail est mené en collaboration avec la FREDON Centre. Pour chaque cyclamen en pot de 1l, 100 ml des solutions filles sont apportés en arrosage, soit $1,15 \cdot 10^5$, $2,88 \cdot 10^6$ et $7,2 \cdot 10^7$ CFU/ plante ou litre de substrat (respectivement D1, D2 et D3).

L'inoculation a été réalisée 2 semaines après le repotage sur un dispositif comprenant 4 répétitions de 16 plantes par dose d'inoculum.



Photo de l'essai sous serre en semaine 24

L'inoculation, effectuée par arrosage aux 3 doses différentes $1,15 \cdot 10^5$, $2,88 \cdot 10^6$ et $7,2 \cdot 10^7$ CFU/litre de substrat (respectivement D1, D2 et D3), n'a pas été efficace. N'ayant pas observé de symptôme 10 semaines après l'inoculation (semaine 32), nous avons augmenté les consignes de températures dans la serre de sorte à maintenir des valeurs plus élevées. Deux semaines plus tard (semaine 34), nous effectuons une scarification des bulbes au scalpel sur l'ensemble des modalités pour favoriser le développement de la maladie.

Aucun symptôme n'est apparu sur les plantes quelle que soit la modalité, et ce malgré des interventions visant à affaiblir la culture. Cette absence de symptômes reste encore inexpiquée : perte de virulence de la souche ? dose insuffisante ? mauvaise conservation de la souche ? pré-traitement des bulbes (l'origine des jeunes plants venant de Hollande) ? Ces hypothèses restent à confirmer.

En 2012, un deuxième test a été mis en place. Celui-ci a été réalisé à partir de 3 souches de la collection (n° 8E ; 9B et 16C). 3 doses d'inoculum ont été testées (10^5 ; 10^6 ; 10^7 CFU/L de substrat). Les solutions d'inoculum ont été réalisées à partir de mycélium prélevé dans des boîtes de petri, ces boîtes ayant été préparées au préalable. Les solutions sont ensuite diluées, et font l'objet de comptages en cellules de Mallasez afin de contrôler les concentrations voulues.

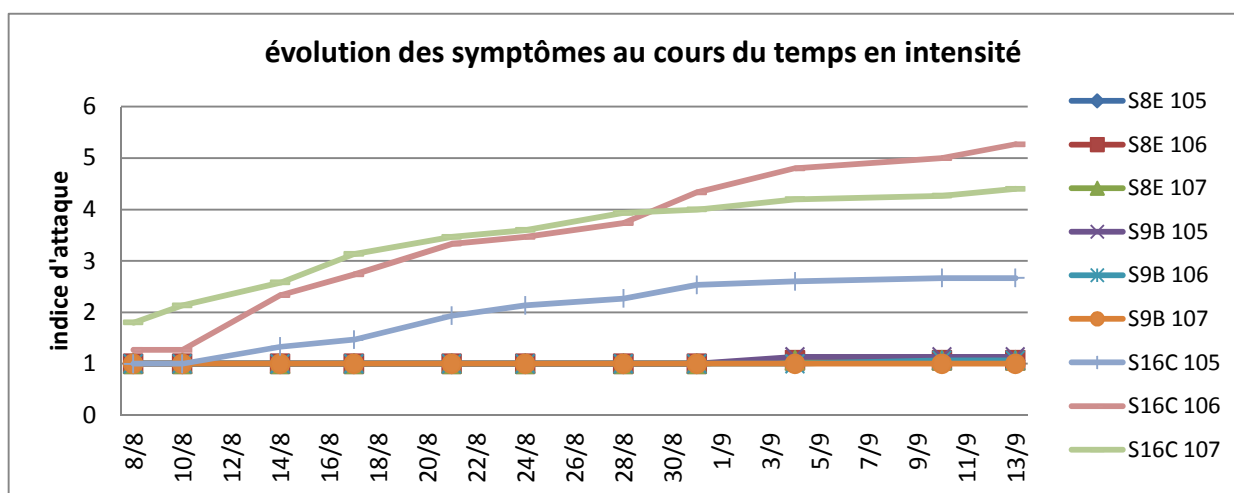
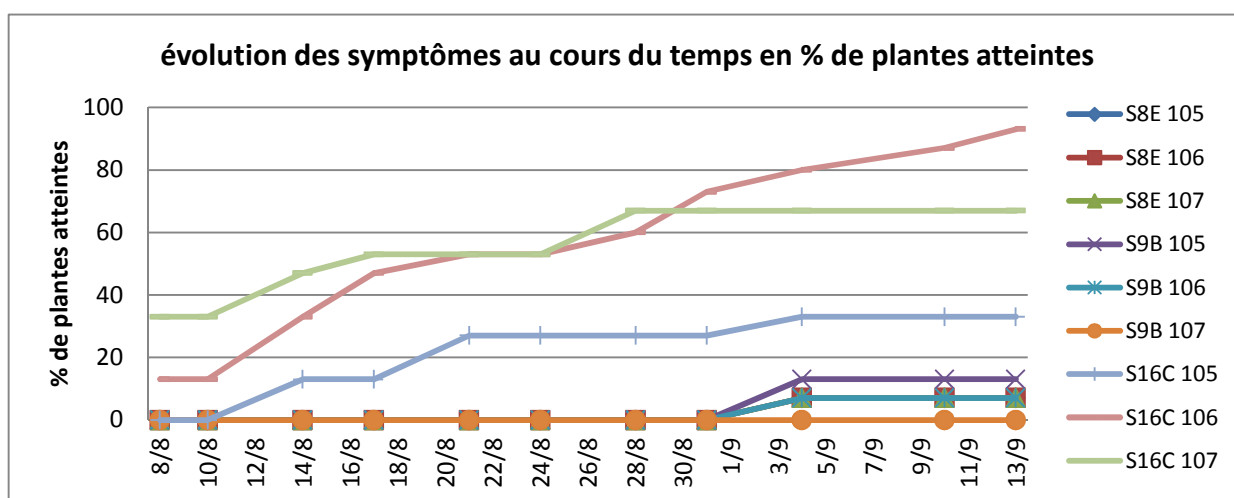
Les inoculations ont été faites sur 5 plantes en 3 répétitions, soit 15 plantes par souche et par dose.

Une fois les solutions prêtes, 20 mL de solution a été apporté par pot (pots de 8,5) au niveau du collet, 6 semaines après le repotage.

Conduite de culture et Notations				
	Semis	Repotage	Inoculation	Observations (2/Sem)
Semaine	10	23	29	32 à 37

3 semaines après l'inoculation, les premiers symptômes sont apparus sur les plantes inoculées. Une notation est alors effectuée 2 fois par semaine pour suivre l'évolution de la maladie. Une grille d'évaluation a été définie pour définir les intensités d'attaque (cf. annexe 4)

1. correspond à une plante saine
2. retard de croissance, début de jaunissement
3. 25% de feuilles jaunies et début de perte de turgescence
4. 50% de feuilles jaunies et début de flétrissement
5. 75% à 100% de feuilles jaunies et flétries
6. plante morte



Nous relevons à partir de ces résultats que les symptômes ne se sont déclarés que pour une seule souche (la souche 16C), et qu'en deux semaines, plus de 50% des plantes sont mortes avec les doses d'inoculum de 10^6 et 10^7 CFU/L de substrat. La courbe d'infestation est par contre moindre pour la dose 10^5 CFU/L. Les deux autres souches (8E et 9B) n'ont pas révélé de pouvoir pathogène.



Photo présentant les symptômes sur une répétition, 6 semaines après l'inoculation (sem35)

Conclusion

L'objectif de ce programme vise au développement d'un test de détection précoce de la fusariose du cyclamen. Ce programme a fait l'objet d'un nouveau projet CASDAR qui débutera en 2013 et s'étalera sur une durée de trois ans. Il regroupe plusieurs partenaires, Arexhor Seine Manche, l'ITL (Institut Technique du Lin) regroupé désormais au sein de ARVALIS, l'INRA de Dijon et Eyraud Production (producteur de jeunes plants de cyclamen). La première étape de ce projet de recherche était la mise en place d'une collection d'isolats/souches de *F. oxysporum*. Elle s'est déroulée sur le site de Mont-Saint Aignan durant les années 2011 et 2012 à partir d'une collection d'isolats réalisée par Arexhor à partir d'échantillons prélevés lors de 2 campagnes de diagnostic précoce et en partenariat avec le laboratoire de terre d'Innovation (ITL). Pour chaque isolat, une culture monosporee a été réalisée en préparant une gamme de dilution de suspension de spores de l'isolat, puis chacun a été caractérisé de manière macromorphologique.

Un test d'infection artificiel a été réalisé avec 3 souches à 3 concentrations différentes. Ce test a été réalisé sur 5 plantes par dose d'inoculum par souche intégrant 3 répétitions. Ce test nous a permis, grâce à une échelle de notation existante, de tester la pathogénicité des souches et ainsi de mettre en évidence la virulence d'une d'entre elles. Ce test nous a permis ainsi de valider la méthode d'inoculation et de définir une dose optimale d'inoculation à retenir pour les prochains tests : 10^6 CFU/L de substrat.

Les perspectives de 2013, sont de poursuivre les travaux d'inoculation, et de tester la pathogénicité de l'ensemble des souches monosporees de la collection, en appliquant la méthodologie définie.

La mise au point d'un marqueur moléculaire associé au pouvoir pathogène de *Fusarium* (travaux réalisés par l'INRA de Dijon) vont pouvoir également être initiés.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-
- Anonyme - OEPP bulletin 37, p536-542
 - Alabouvette, C., C. Olivain, C. Cordier et C. Steinberg. 2003 : Méthodes alternatives de lutte contre les maladies des plantes. *Phytoma*. 566 : 41-44.
 - An ChongYing He XiaoMing Xie DaSen Peng QingWu, 2009 : Research progresses on molecular markers of resistance to *Fusarium* wilt in cucurbitaceae, *China Vegetables*. 8, 7-10. 24.
 - Assigbetse K., 1988-1989 : « étude de la variabilité spontanée chez le *Fusarium oxysporum f.sp.vasinfectum*, agent de la fusariose du cotonnier », Université Paris XI, Université Paris VI, INAPG, rapport de DEA de phytopathologie effectué à l'ORSTOM Montpellier.
 - Baysal, O. Siragusa, M. Ikten, H. Polat, I. Gumrukcu, E. Yigit, F. Carimi, F. Silva, J. A. T. da, 2009 : *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular

markers in West Mediterranean region of Turkey. PMPP Physiological and Molecular Plant Pathology. 74: 1, 68-75. 45 .

- Cariou E., 2001 : La brûlure du lin : étiologie, épidémiologie et stratégies de lutte 109p.
- Cariou E., 2008 : Amélioration de la qualité sanitaire du lin fibre, lutte contre la verticilliose, Annexe 4 Compte Rendu Technique programme du CAS DAR : Innovation végétale en culture spécialisées, 30p.
- Cariou E. (2010) Appui au diagnostic, Annexe 4 Compte Rendu Technique programme du CAS DAR: Amélioration du dispositif recherche-développement par la mise en convergence d'instituts agricoles de cultures spécialisées, 21p.
- Correll J.C., 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. Phytopathology, 81, 9, 1061-1064.
- Elmer, W. 2002. Influence of inoculum density of *Fusarium oxysporum f.sp. cyclaminis* and sodium chloride on cyclamen and the development of Fusarium wilt. Plant Disease : 389-393.
- Grouet, 1985. La fusariose vasculaire du cyclamen. Phytoma, Novembre 1985, p 49-50.
- Grouet D., Lesaint C., 1984 : Etude de la réceptivité de quelques substrats horticoles vis-à-vis des fusarioses vasculaires. PHM revue horticole n°250, 73-77
- Larsen R. C., Hollingsworth C. R., Vandemark G. J., Gritsenko M. A., Gray F. A., 2001 : A rapid method using PCR-based SCAR markers for the detection and identification of *Phoma sclerotoides*: The cause of brown root rot disease of alfalfa, vol. 85, n°6, pp. 607-611.
- Mutlu, N. Boyac, F. H. Gocmen, M. Abak, K. 2008. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a Fusarium wilt resistance gene in eggplant. TAG Theoretical and Applied Genetics. 117: 8, 1303-1312. 39.
- Shafagh, N. Rastegar, M. F. Jafarpour, B., 2008, Physiological race and genetic diversity determination of *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* by differential hosts and molecular marker rapd in northern and Razavi Khorasan provinces. Research Journal of Biological Sciences. 3: 7, 790-793. 8.
- Stapel O., Deogratias J.M., Langlois A., Pajot E., 2006 : « Efficacité prometteuse des phytostimulants contre les maladies sous conditions de production en horticulture ornementale ». AFPP. 3ème conférence internationale sur les moyens alternatifs de protection des cultures, Lille 13-14-15 mars 2006. p 645-655.
- Roose-Amsaleg C., Cariou-Pham E., Vautrin D., Tavernier R. et Solignac M., 2006 : Polymorphic microsatellite loci in flax *Linum usitatissimum*. Molecular Ecology Notes, 6, 796-799.
- Shahin, A. Arens, P. Heusden, S. van Tuyl, J. M. van. 2009. Conversion of molecular markers linked to Fusarium and virus resistance in Asiatic lily hybrids. Acta Horticulturae. 836, 131-136.
- Wu YuanYuan Li HaiTao Zhang ZiJun Zhou QingDao, 2010, Research progress in molecular marker of disease resistant genes in tomato. Guizhou Agricultural Sciences, 2, 27-31.
- Wuster G., 1995. « quel est votre diagnostic » ; PHM revue horticole, mai 1995, N°359, p 55-57.

Autres références :

- Rapports techniques STEPP: programme national 2003-2006 : « efficacité des phytostimulants contre les maladies et ravageurs en cultures ornementales »
- Rapports techniques Arexhor Seine Manche, 2009, 2010 : « diagnostic précoce de Fusarium sur cyclamen »
- Rapport technique Arexhor Pays de Loire, 2005 : « Etude de l'efficacité du Triatum pour lutter contre la fusariose du cyclamen »
- Rapport technique Arexhor Pays de Loire, 2006 : « Lutte contre fusariose du cyclamen »
- Rapport technique Arexhor Pays de Loire, 2007 : « Etude de diverses méthodes de lutte contre la fusariose du Cyclamen »
- Rapport technique Arexhor Pays de Loire, 2008 : « Contrôle de la fusariose du Cyclamen »
- Rapport technique RATHO, 1998 : « Inoculation de Fusarium pathogène sur cyclamen et protection biologique par antagoniste »

Annexe 1 : liste de la collection établie

Variété	Fournisseur de jeunes plants	Semaine de réception sur l'entreprise horticole	Date de 1 ^{ère} mise en culture	Numéro isolat	Numéro tube	Date repiquage en tube	Code tube
Umbrella	Syngenta	S26 - 2009	30/06/2009	1	1=A	26/03/2012	1/A/12/03/26
				1	2=B	26/03/2012	1/B/12/03/26
				1	3=C	26/03/2012	1/C/12/03/26
				1	4=D	26/03/2012	1/D/12/03/26
				1	5=E	26/03/2012	1/E/12/03/26
				1	6=F	26/03/2012	1/F/12/03/26
Umbrella	Syngenta	S26 - 2009	30/06/2009	2	1=A	31/05/2012	2/A/12/05/31
				2	2=B	31/05/2012	2/B/12/05/31
				2	3=C	31/05/2012	2/C/12/05/31
				2	4=D	31/05/2012	2/D/12/05/31
				2	5=E	31/05/2012	2/E/12/05/31
				2	6=F	31/05/2012	2/F/12/05/31
Swan rose 1758	Eyraudplants	S30 - 2009	30/06/2009	3	1=A	24/04/2012	3/A/12/04/24
				3	2=B	24/04/2012	3/B/12/04/24
				3	3=C	24/04/2012	3/C/12/04/24
				3	4=D	24/04/2012	3/D/12/04/24
				3	5=E	24/04/2012	3/E/12/04/24
				3	6=F	24/04/2012	3/F/12/04/24
Swan rose 1758	Eyraudplants	S30 - 2009	30/06/2009	4	1=A	16/05/2012	4/A/12/05/16
				4	2=B	16/05/2012	4/B/12/05/16
				4	3=C	16/05/2012	4/C/12/05/16
				4	4=D	16/05/2012	4/D/12/05/16
				4	5=E	16/05/2012	4/E/12/05/16
				4	6=F	16/05/2012	4/F/12/05/16
Swan Mélange	Eyraudplants	S26 - 2009	29/06/2009	5	1=A	31/05/2012	5/A/12/05/31
				5	2=B	31/05/2012	5/B/12/05/31
				5	3=C	31/05/2012	5/C/12/05/31
				5	4=D	01/06/2012	5/D/12/06/01
				5	5=E	01/06/2012	5/E/12/06/01
				5	6=F	01/06/2012	5/F/12/06/01
Swan Mélange	Eyraudplants	S26 - 2009	29/06/2009	6	1=A	15/05/2012	6/A/12/05/15
				6	2=B	16/05/2012	6/B/12/05/16
				6	3=C	11/06/2012	6/C/12/06/11
				6	4=D	14/06/2012	6/D/12/06/14
				6	5=E	14/06/2012	6/E/12/06/14
				6	6=F	15/06/2012	6/F/12/06/15
Swan Mélange	Eyraudplants	S26 - 2009	29/06/2009	7	1=A	31/05/2012	7/A/12/05/31
				7	2=B	31/05/2012	7/B/12/05/31
				7	3=C	31/05/2012	7/C/12/05/31
				7	4=D	31/05/2012	7/D/12/05/31
				7	5=E	31/05/2012	7/E/12/05/31
				7	6=F	01/06/2012	7/F/12/06/01
Halios Frangé mélange	Sentier	S28 - 2009	13/07/2009	8	1=A	04/05/2012	8/A/12/05/04
				8	2=B	04/05/2012	8/B/12/05/04
				8	3=C	04/05/2012	8/C/12/05/04
				8	4=D	04/05/2012	8/D/12/05/04

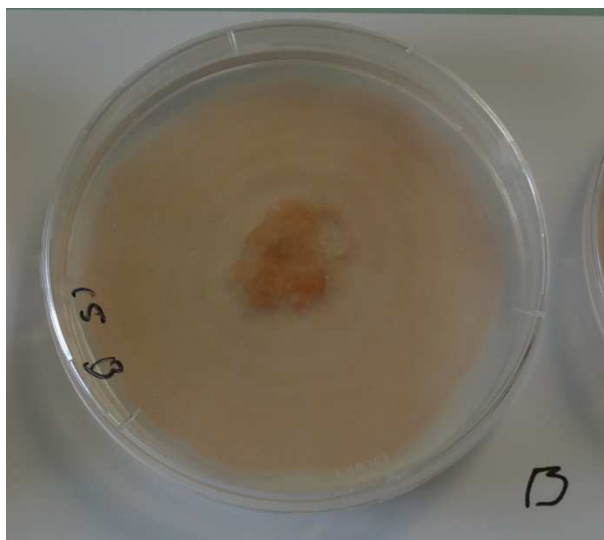
				8	5=E	04/05/2012	8/E/12/05/04
				8	6=F	04/05/2012	8/F/12/05/04
Halios Frangé mélange	Sentier	S28 - 2009	13/07/2009	9	1=A	11/06/2012	9/A/12/06/11
				9	2=B	11/06/2012	9/B/12/06/11
				9	3=C	11/06/2012	9/C/12/06/11
				9	4=D	11/06/2012	9/D/12/06/11
				9	5=E	11/06/2012	9/E/12/06/11
				9	6=F	11/06/2012	9/F/12/06/11
Swan 363 rose flammé	Eyraudplants	S28 - 2009	13/07/2009	10	1=A	04/05/2012	10/A/12/05/04
				10	2=B	04/05/2012	10/B/12/05/04
				10	3=C	04/05/2012	10/C/12/05/04
				10	4=D	04/05/2012	10/D/12/05/04
				10	5=E	04/05/2012	10/E/12/05/04
				10	6=F	04/05/2012	10/F/12/05/04
Swan 363 rose flammé	Eyraudplants	S28 - 2009	13/07/2009	11	1=A	09/05/2012	11/A/12/05/09
				11	2=B	09/05/2012	11/B/12/05/09
				11	3=C	09/05/2012	11/C/12/05/09
				11	4=D	09/05/2012	11/D/12/05/09
				11	5=E	09/05/2012	11/E/12/05/09
				11	6=F	09/05/2012	11/F/12/05/09
Swan 363 rose flammé	Eyraudplants	S28 - 2009	13/07/2009	12	1=A	11/06/2012	12/A/12/06/11
				12	2=B	18/07/2012	12/B/12/07/18
				12	3=C	18/07/2012	12/C/12/07/18
				12	4=D	18/07/2012	12/D/12/07/18
				12	5=E	18/07/2012	12/E/12/07/18
				12	6=F	18/07/2012	12/F/12/07/18
Super Serie Winter rouge ecarlare	Eyraudplants	S31 - 2009	31/07/2009	13	1=A	02/04/2012	13/A/12/04/02
				13	2=B	02/04/2012	13/B/12/04/02
				13	3=C	02/04/2012	13/C/12/04/02
				13	4=D	02/04/2012	13/D/12/04/02
				13	5=E	02/04/2012	13/E/12/04/02
				13	6=F	14/06/2012	13/F/12/06/14
Super serie winter blanc	Eyraudplants	S31 - 2009	30/07/2009	14	1=A	02/04/2012	14/A/12/04/02
				14	2=B	02/04/2012	14/B/12/04/02
				14	3=C	02/04/2012	14/C/12/04/02
				14	4=D	02/04/2012	14/D/12/04/02
				14	5=E	02/04/2012	14/E/12/04/02
				14	6=F	02/04/2012	14/F/12/04/02
Super serie winter blanc	Eyraudplants	S31 - 2009	30/07/2009	15	1=A	14/06/2012	15/A/12/06/14
				15	2=B	14/06/2012	15/B/12/06/14
				15	3=C	14/06/2012	15/C/12/06/14
				15	4=D	14/06/2012	15/D/12/06/14
				15	5=E	14/06/2012	15/E/12/06/14
				15	6=F	14/06/2012	15/F/12/06/14
? (variété de mini cyclamen)	S&G	-	21/08/2009	16	1=A	05/04/2012	16/A/12/04/05
				16	2=B	05/04/2012	16/B/12/04/05
				16	3=C	05/04/2012	16/C/12/04/05
				16	4=D	05/04/2012	16/D/12/04/05
				16	5=E	05/04/2012	16/E/12/04/05
				16	6=F	05/04/2012	16/F/12/04/05
? (variété de mini cyclamen)	-	-	13/08/2010	17	1=A	09/05/2012	17/A/12/05/09
				17	2=B	09/05/2012	17/B/12/05/09
				17	3=C	18/07/2012	17/C/12/07/18
				17	4=D	18/07/2012	17/D/12/07/18

				17	5=E	18/07/2012	17/E/12/07/18
				17	6=F	18/07/2012	17/F/12/07/18
Metis Mélange	Sentier	S24 - 2010	22/06/2010	18	1=A	09/05/2012	18/A/12/05/09
				18	2=B	09/05/2012	18/B/12/05/09
				18	3=C	09/05/2012	18/C/12/05/09
				18	4=D	09/05/2012	18/D/12/05/09
				18	5=E	09/05/2012	18/E/12/05/09
				18	6=F	09/05/2012	18/F/12/05/09
Halios Lollipop frangé mélange 257	Beekenkamp	S25 - 2010	08/07/2010	19	1=A	01/02/2012	19/A/12/02/01
				19	2=B	01/02/2012	19/B/12/02/01
				19	3=C	18/07/2012	19/C/12/07/18
				19	4=D	18/07/2012	19/D/12/07/18
				19	5=E	18/07/2012	19/E/12/07/18
				19	6=F	18/07/2012	19/F/12/07/18
Umbrella	Syngenta	S26 - 2010	06/07/2010	20	1=A	16/05/2012	20/A/12/05/16
				20	2=B	16/05/2012	20/B/12/05/16
				20	3=C	16/05/2012	20/C/12/05/16
				20	4=D	16/05/2012	20/D/12/05/16
				20	5=E	16/05/2012	20/E/12/05/16
				20	6=F	16/05/2012	20/F/12/05/16
Umbrella	Syngenta	S26 - 2010	06/07/2010	21	1=A	16/05/2012	21/A/12/05/16
				21	2=B	16/05/2012	21/B/12/05/16
				21	3=C	16/05/2012	21/C/12/05/16
				21	4=D	16/05/2012	21/D/12/05/16
				21	5=E	16/05/2012	21/E/12/05/16
				21	6=F	16/05/2012	21/F/12/05/16
Umbrella	Syngenta	S26 - 2010	06/07/2010	22	1=A	01/02/2012	22/A/12/02/01
				22	2=B	01/02/2012	22/B/12/02/01
				22	3=C	01/02/2012	22/C/12/02/01
				22	4=D	01/02/2012	22/D/12/02/01
				22	5=E	01/02/2012	22/E/12/02/01
				22	6=F	01/02/2012	22/F/12/02/01
Umbrella	Syngenta	S26 - 2010	06/07/2010	23	1=A	15/05/2012	23/A/12/05/15
				23	2=B	15/05/2012	23/B/12/05/15
				23	3=C	15/05/2012	23/C/12/05/15
				23	4=D	15/05/2012	23/D/12/05/15
				23	5=E	14/06/2012	23/E/12/06/14
				23	6=F	14/06/2012	23/F/12/06/14
Umbrella	Syngenta	S26 - 2010	06/07/2010	24	1=A	19/03/2012	24/A/12/03/19
				24	2=B	19/03/2012	24/B/12/03/19
				24	3=C	19/03/2012	24/C/12/03/19
				24	4=D	23/04/2012	24/D/12/04/23
				24	5=E	23/04/2012	24/E/12/04/23
				24	6=F	23/04/2012	24/F/12/04/23
Umbrella	Syngenta	S26 - 2010	06/07/2010	25	1=A	01/02/2012	25/A/12/02/01
				25	2=B	14/03/2012	25/B/12/03/14
				25	3=C	14/03/2012	25/C/12/03/14
				25	4=D	16/03/2012	25/D/12/03/16
				25	5=E	23/04/2012	25/E/12/04/23
				25	6=F	14/06/2012	25/F/12/06/14
Umbrella	Syngenta	S26 - 2010	06/07/2010	26	1=A	12/03/2012	26/A/12/03/12
				26	2=B	12/03/2012	26/B/12/03/12
				26	3=C	12/03/2012	26/C/12/03/12
				26	4=D	12/03/2012	26/D/12/03/12

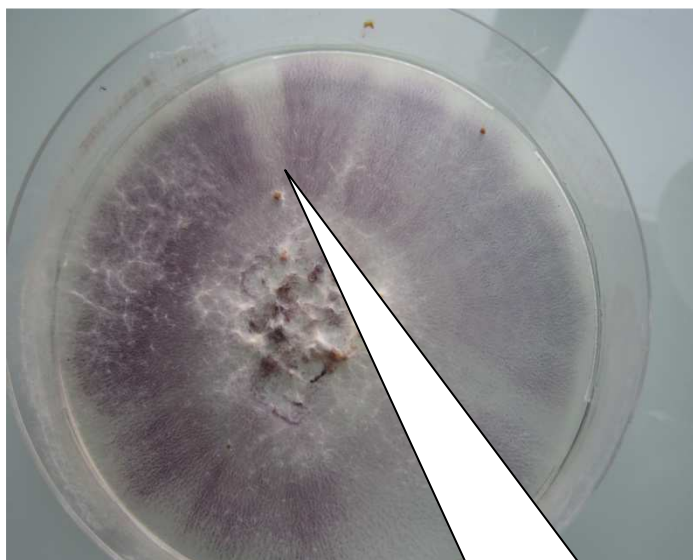
				26	5=E	12/03/2012	26/E/12/03/12
				26	6=F	12/03/2012	26/F/12/03/12
Umbrella	Syngenta	S26 - 2010	06/07/2010	27	1=A	13/03/2012	27/A/12/03/13
				27	2=B	13/03/2012	27/B/12/03/13
				27	3=C	13/03/2012	27/C/12/03/13
				27	4=D	13/03/2012	27/D/12/03/13
				27	5=E	14/03/2012	27/E/12/03/14
				27	6=F	14/03/2012	27/F/12/03/14
Metis magenta decora (4220)	Beekenkamp	S28 - 2010	21/07/2010	28	1=A	11/04/2012	28/A/12/04/11
				28	2=B	11/04/2012	28/B/12/04/11
				28	3=C	11/04/2012	28/C/12/04/11
				28	4=D	11/04/2012	28/D/12/04/11
				28	5=E	11/04/2012	28/E/12/04/11
				28	6=F	11/04/2012	28/F/12/04/11
Metis Mélange Flammé	Nebelung	S29 - 2010	22/07/2010	29	1=A	14/06/2012	29/A/12/06/14
				29	2=B	14/06/2012	29/B/12/06/14
				29	3=C	14/06/2012	29/C/12/06/14
				29	4=D	14/06/2012	29/D/12/06/14
				29	5=E	14/06/2012	29/E/12/06/14
				29	6=F	14/06/2012	29/F/12/06/14
Metis saumon écarlate	Beekenkamp	S30 - 2010	06/08/2010	30	1=A	15/05/2012	30/A/12/05/15
				30	2=B	15/05/2012	30/B/12/05/15
				30	3=C	15/05/2012	30/C/12/05/15
				30	4=D	15/05/2012	30/D/12/05/15
				30	5=E	15/05/2012	30/E/12/05/15
				30	6=F	15/06/2012	30/F/12/05/15
Metis victoria	Beekenkamp	S30 - 2010	10/08/2010	31	1=A	18/04/2012	31/A/12/04/18
				31	2=B	18/04/2012	31/B/12/04/18
				31	3=C	18/04/2012	31/C/12/04/18
				31	4=D	18/04/2012	31/D/12/04/18
				31	5=E	14/06/2012	31/E/12/06/14
				31	6=F	14/06/2012	31/F/12/06/14
Rainier	Sentier	S30 - 2010	03/08/2010	32	1=A	17/04/2012	32/A/12/04/17
				32	2=B	17/04/2012	32/B/12/04/17
				32	3=C	17/04/2012	32/C/12/04/17
				32	4=D	17/04/2012	32/D/12/04/17
				32	5=E	17/04/2012	32/E/12/04/17
				32	6=F	17/04/2012	32/F/12/04/17
Super Serie Mini Winter Mélange	Saulais	S34 - 2010	01/09/2010	33	1=A	15/05/2012	33/A/12/05/15
				33	2=B	15/05/2012	33/B/12/05/15
				33	3=C	16/07/2012	33/C/12/07/16
				33	4=D	16/07/2012	33/D/12/07/16
				33	5=E	16/07/2012	33/E/12/07/16
				33	6=F	16/07/2012	33/F/12/07/16
XXL Mammouth	Sentier	-	07/07/2010	34	1=A	17/04/2012	34/A/12/04/17
				34	2=B	17/04/2012	34/B/12/04/17
				34	3=C	17/04/2012	34/C/12/04/17
				34	4=D	17/04/2012	34/D/12/04/17
				34	5=E	17/04/2012	34/E/12/04/17
				34	6=F	17/04/2012	34/F/12/04/17

En grisé : souches prélevées pour le test d'inoculation.

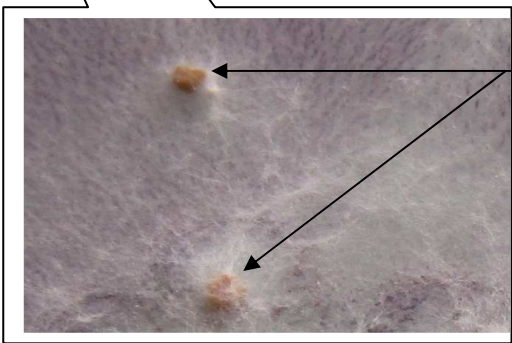
Annexe 2 : résultats de la caractérisation morphologique (planche photo)



Type ras :
Pas de mycélium aérien, aspect muqueux.



Type sporodochial :
Mycélium duveteux peu épais, parsemé d'amas muqueux de couleur orangée représentant des pionnotes (organe donnant naissance à des macroconidies)
Flèches : Pionnotes





Type duveteux :
Mycélium aérien peu épais et relativement peu dense



Type cotonneux :
Mycélium aérien épais et très serré

Annexe 3 : résultats de la caractérisation morphologique (dernier relevé : le 21/08/12 ; date de repiquage le 07/08/12)

échantillons	code échantillon	pigmentation du thalle	croissance	aspect du mycélium	teinte du mycélium
1	1/A/12/03/26	mauve	moyenne / faible	sporodochial	blanc
1	1/B/12/03/26	violet	moyenne / faible	cotonneux	blanc
1	1/C/12/03/26	rose saumon violet	moyenne / faible	cotonneux	blanc
1	1/D/12/03/26	mauve violet	moyenne / faible	cotonneux -	blanc
1	1/E/12/03/26	rose saumon violet	moyenne / faible	cotonneux	blanc
1	1/F/12/03/26	rose saumon violet	moyenne / faible	cotonneux	blanc
2	2/A/12/05/31	mauve clair	moyenne	sporodochial	blanc
2	2/B/12/05/31	mauve clair	moyenne	sporodochial	blanc
2	2/C/12/05/31	mauve clair	moyenne	duveteux ---	blanc
2	2/D/12/05/31	mauve clair	moyenne	sporodochial	blanc
2	2/E/12/05/31	mauve clair	moyenne	sporodochial	blanc
2	2/F/12/05/31	mauve clair	moyenne	duveteux ---	blanc
3	3/A/12/04/24	ivoire	moyenne	cotonneux ras	blanc
3	3/B/12/04/24	ivoire	moyenne	cotonneux ras	blanc
3	3/C/12/04/24	ivoire/violet	moyenne	cotonneux ras	blanc
3	3/D/12/04/24	ivoire	moyenne	cotonneux ras	blanc
3	3/E/12/04/24	ivoire	moyenne	cotonneux ras	blanc
3	3/F/12/04/24	ivoire	moyenne	cotonneux ras	blanc
4	4/A/12/05/16	rose violet clair	forte	sporodochial	blanc
4	4/B/12/05/16	rose violet clair	forte	sporodochial	blanc
4	4/C/12/05/16	rose violet clair	moyenne	sporodochial	blanc
4	4/D/12/05/16	rose violet clair	forte	sporodochial	blanc
4	4/E/12/05/16	rose violet clair	forte	sporodochial	blanc
4	4/F/12/05/16	rose saumon violet	moyenne	sporodochial	blanc
5	5/A/12/05/31	violet clair	moyenne	sporodochial	blanc
5	5/B/12/05/31	violet clair	forte	sporodochial	blanc
5	5/C/12/05/31	violet clair	forte	sporodochial	blanc
5	5/D/12/06/01	violet clair	forte	sporodochial	blanc
5	5/E/12/06/01	violet clair	moyenne	sporodochial	blanc
5	5/F/12/06/01	violet clair	moyenne	sporodochial	blanc
6	6/A/12/05/15	rouge	moyenne/forte	duveteux ---	blanc
6	6/B/12/05/16	rouge	moyenne/forte	duveteux ---	blanc
6	6/C/12/06/11	rouge	moyenne/forte	duveteux ---	blanc
6	6/D/12/06/14	rouge	moyenne/forte	duveteux ---	blanc
6	6/E/12/06/14	rouge	moyenne/forte	duveteux ---	blanc
6	6/F/12/06/15	rouge/ saumon	moyenne/forte	sporodochial	blanc
7	7/A/12/05/31	rouge rose	moyenne	duveteux ras	blanc
7	7/B/12/05/31	violet clair	forte	sporodochial	blanc
7	7/C/12/05/31	violet clair	moyenne	sporodochial	blanc
7	7/D/12/05/31	violet rouge	forte	cotonneux ras	blanc
7	7/E/12/05/31	violet clair	forte	sporodochial	blanc
7	7/F/12/06/01	violet clair	forte	duveteux ras	blanc
8	8/A/12/05/04	rose saumon	forte	duveteux -	blanc
8	8/B/12/05/04	violet rose saumon	forte	cotonneux-	blanc
8	8/C/12/05/04	rose saumon/maron	faible	cotonneux	blanc
8	8/D/12/05/04	rose saumon/maron	faible	cotonneux	blanc
8	8/E/12/05/04	rose saumon/violet	forte	duveteux -	blanc
8	8/F/12/05/04	rose saumon/rose	moyenne	duveteux -	blanc
9	9/A/12/06/11	violet clair	forte	cotonneux / ras	blanc
9	9/B/12/06/11	rose	forte	duveteux ---	blanc / reflet rose
9	9/C/12/06/11	violet violet clair	forte	cotonneux / ras	blanc
9	9/D/12/06/11	violet violet clair	moyenne	cotonneux / ras	blanc
9	9/E/12/06/11	violet violet clair	forte	cotonneux / ras	blanc
9	9/F/12/06/11	violet violet clair	forte	cotonneux / ras	blanc
10	10/A/12/05/04	ivoire	moyenne	ras	
10	10/B/12/05/04	rouge mauve	forte	ras	
10	10/C/12/05/04	rouge mauve	forte	ras	
10	10/D/12/05/04	rouge mauve	forte	ras	
10	10/E/12/05/04	blanc rose	moyenne	ras	
10	10/F/12/05/04	blanc rose	forte	ras	
11	11/A/12/05/09	mauve	forte	sporodochial	blanc / reflet rose
11	11/B/12/05/09	mauve	forte	sporodochial	blanc / reflet rose
11	11/C/12/05/09	mauve	forte	duveteux --/ ras	blanc / reflet rose
11	11/D/12/05/09	mauve	forte	duveteux ---	blanc / reflet rose
11	11/E/12/05/09	mauve	forte	duveteux ---	blanc / reflet rose
11	11/F/12/05/09	mauve rouge	forte	duveteux ---	blanc / reflet rose
12	12/A/12/06/11	rouge mauve	forte	duveteux --/ ras	blanc / reflet rose
12	12/B/12/07/18	violet/rouge	forte	duveteux --/ ras	blanc / reflet rose
12	12/C/12/07/18	violet	forte	duveteux --/ ras	blanc / reflet rose
12	12/D/12/07/18	violet	forte	duveteux --/ ras	blanc / reflet rose
12	12/E/12/07/18	violet	forte	duveteux --/ ras	blanc / reflet rose
12	12/F/12/07/18	violet	forte	duveteux --/ ras	blanc / reflet rose
13	13/A/12/04/02	rose/rouge	faible	duveteux ---	blanc / reflet rose
13	13/B/12/04/02	rose/rouge	moyenne	duveteux ---	blanc / reflet rose
13	13/C/12/04/02	rose/rouge	forte	duveteux ---	blanc / reflet rose
13	13/D/12/04/02	rose/rouge	forte	duveteux ---	blanc / reflet rose
13	13/E/12/04/02	rose/rouge	forte	duveteux ---	blanc / reflet rose
13	13/F/12/06/14	rose/rouge	faible	duveteux ---	blanc / reflet rose
14	14/A/12/04/02	rose saumon/rose	faible	duveteux -	blanc / reflet rose
14	14/B/12/04/02	rose saumon/rose	forte	duveteux -	blanc / reflet rose
14	14/C/12/04/02	rose saumon/rose	moyenne	duveteux -	blanc / reflet rose
14	14/D/12/04/02	rose saumon rouge	moyenne	duveteux -	blanc / reflet rose
14	14/E/12/04/02	rose/rose saumon	forte	duveteux -	blanc / reflet rose
14	14/F/12/04/02	rose saumon rouge	faible	cotonneux-	blanc / reflet rose

échantillons	code échantillon	pigmentation du thalle	croissance	aspect du mycélium	teinte du mycélium
15	15/A/12/06/14	rose saumon/ rose	forte	ras	
15	15/B/12/06/14	rose saumon/ rose	forte	ras	
15	15/C/12/06/14	rose saumon/ rose	forte	ras	
15	15/D/12/06/14	rose saumon/ rose	forte	ras	
15	15/E/12/06/14	rose saumon/ rose	forte	ras	
15	15/F/12/06/14	rose saumon/ rose	forte	ras	
16	16/A/12/04/05	rose saumon clair	forte	sporodochial	blanc
16	16/B/12/04/05	rose saumon	forte+	cotonneux	blanc
16	16/C/12/04/05	rose saumon/ rose	forte+	cotoneux/ ras	blanc
16	16/D/12/04/05	rose saumon clair	forte	cotoneux/ ras	blanc
16	16/E/12/04/05	rose saumon clair	forte+	cotoneux/ ras	blanc
16	16/F/12/04/05	rose saumon clair/ violet	forte	sporodochial	blanc
17	17/A/12/05/09	rouge mauve	forte	duveteux ---	blanc
17	17/B/12/05/09	violet clair	forte	sporodochial	blanc
17	17/C/12/07/18	violet clair	moyenne	sporodochial	blanc
17	17/D/12/07/18	violet clair	forte	sporodochial	blanc
17	17/E/12/07/18	rouge violet clair	forte	sporodochial	blanc
17	17/F/12/07/18	violet rouge	forte	sporodochial	blanc
18	18/A/12/05/09	mauve rouge	forte	duvetaux --	blanc
18	18/B/12/05/09	rose	forte	duvetaux -	blanc
18	18/C/12/05/09	rose	forte	duveteux---	blanc
18	18/D/12/05/09	mauve rouge	forte	duvetaux --	blanc
18	18/E/12/05/09	mauve rouge	forte	duvetaux --	blanc
18	18/F/12/05/09	rouge mauve	forte	duvetaux --	blanc
19	19/A/12/02/01	mauve	forte	ras	blanc
19	19/B/12/02/01	mauve	forte	ras	blanc
19	19/C/12/07/18	rouge violet clair	forte	ras	blanc
19	19/D/12/07/18	rouge violet clair	forte	ras	blanc
19	19/E/12/07/18	mauve	forte	ras	blanc
19	19/F/12/07/18	rouge violet clair	forte	ras	blanc
20	20/A/12/05/16	violet reflet rouge	forte	duvetaux---	blanc
20	20/B/12/05/16	violet reflet rouge	forte	duvetaux---	blanc
20	20/C/12/05/16	violet	forte	duvetaux---	blanc
20	20/D/12/05/16	violet reflet rouge	forte	duvetaux---	blanc
20	20/E/12/05/16	violet	forte	duvetaux---	blanc
20	20/F/12/05/16	violet reflet rouge	forte	duvetaux---	blanc
21	21/A/12/05/16	violet rouge	forte	duvetaux---	blanc
21	21/B/12/05/16	violet rouge	moyenne	duvetaux---	blanc
21	21/C/12/05/16	violet rouge	forte	duvetaux---	blanc
21	21/D/12/05/16	violet rouge	forte	duvetaux---	blanc
21	21/E/12/05/16	violet rouge	moyenne	duvetaux---	blanc
21	21/F/12/05/16	rouge violacé	forte+	duvetaux---	blanc
22	22/A/12/02/01	rouge	faible	duvetaux---	blanc
22	22/B/12/02/01	rouge	moyenne	duvetaux---	blanc
22	22/C/12/02/01	rouge	moyenne	duvetaux---	blanc
22	22/D/12/02/01	rouge	forte	duvetaux---	blanc
22	22/E/12/02/01	rouge	forte	duvetaux---	blanc
22	22/F/12/02/01	rouge	moyenne	duvetaux---	blanc
23	23/A/12/05/15	mauve violet	moyenne	duveteux	blanc
23	23/B/12/05/15	violet	moyenne	duveteux ---	
23	23/C/12/05/15	mauve rose	forte	duveteux	blanc
23	23/D/12/05/15	mauve clair	forte	duveteux	blanc
23	23/E/12/06/14	blanc mauve	moyenne	duveteux	blanc
23	23/F/12/06/14	rouge	moyenne	duveteux ---	
24	24/A/12/03/19	mauve	forte+	ras	
24	24/B/12/03/19	mauve	forte	ras	
24	24/C/12/03/19	mauve	forte	ras	
24	24/D/12/04/23	blanc mauve	moyenne	duveteux-	blanc
24	24/E/12/04/23	mauve clair	moyenne	ras	
24	24/F/12/04/23	blanc mauve	moyenne-	duvetaux	blanc

échantillons	code échantillon	pigmentation du thalle	croissance	aspect du mycélium	teinte du mycélium
25	25/A/12/02/01	violet rouge	forte	sporodochial	
25	25/B/12/03/14	rose violet	forte+	ras/ duveteux ---	
25	25/C/12/03/14	rose violet	forte+	ras/ duveteux ---	
25	25/D/12/03/16	violet	forte	ras/ duveteux ---	
25	25/E/12/04/23	rose violet	forte+	ras/ duveteux ---	
25	25/F/12/06/14	rose violet	forte+	sporodochial	
26	26/A/12/03/12	rouge/ violet	forte	ras	
26	26/B/12/03/12	rouge/ violet	forte	ras	
26	26/C/12/03/12	rouge/ violet	forte	ras	
26	26/D/12/03/12	rouge/ violet	moyenne	ras	
26	26/E/12/03/12	violet	forte	ras	
26	26/F/12/03/12	violet rouge	moyenne	ras	
27	27/A/12/03/13	ivoire reflet rose	faible	cotonneux -/ ras	blanc
27	27/B/12/03/13	rose mauve	moyenne	cotonneux --	blanc
27	27/C/12/03/13	ivoire reflet rose	moyenne	cotonneux	blanc
27	27/D/12/03/13	rose maron	faible	cotonneux	blanc
27	27/E/12/03/14	ivoire reflet rose	faible	cotonneux -	blanc
27	27/F/12/03/14	ivoire reflet rose	faible	cotonneux	blanc
28	28/A/12/04/11	rose/rose saumon	forte+	cotonneux--	blanc
28	28/B/12/04/11	rose/rose saumon	forte	duveteux -	blanc
28	28/C/12/04/11	rose/rose saumon	forte	duveteux -	blanc
28	28/D/12/04/11	rose/rose saumon	forte	duveteux -	blanc
28	28/E/12/04/11	rose/rose saumon	forte	duveteux -	blanc
28	28/F/12/04/11	rose/rose saumon	forte+	duveteux -	blanc
29	29/A/12/06/14	rouge violet	forte+	ras	
29	29/B/12/06/14	rouge violet	forte	ras	
29	29/C/12/06/14	rouge violet	forte	ras	
29	29/D/12/06/14	rouge violet	moyenne	ras	
29	29/E/12/06/14	rouge violet	forte+	ras	
29	29/F/12/06/14	rouge violet	forte	ras	
30	30/A/12/05/15	rose saumon	forte	duveteux-	blanc / reflet rose
30	30/B/12/05/15	rose saumon	forte	duveteux-	blanc / reflet rose
30	30/C/12/05/15	rose saumon	forte	ras	
30	30/D/12/05/15	rose saumon	forte	duveteux-	blanc / reflet rose
30	30/E/12/05/15	rose saumon	forte	duveteux-	blanc / reflet rose
30	30/F/12/05/15	rose saumon	forte	duveteux--	blanc / reflet rose
31	31/A/12/04/18	ivoire	moyenne	duveteux --	blanc
31	31/B/12/04/18	ivoire	moyenne	duveteux --	blanc
31	31/C/12/04/18	ivoire	moyenne	duveteux --	blanc
31	31/D/12/04/18	ivoire	moyenne	duveteux --	blanc
31	31/E/12/06/14	rose	forte	duveteux --	blanc / reflet rose
31	31/F/12/06/14	rouge violacé	moyenne	sporodochial	blanc / reflet rose
32	32/A/12/04/17	rose	forte+	duveteux --	blanc / reflet rose
32	32/B/12/04/17	rose	forte+	duveteux --	blanc / reflet rose
32	32/C/12/04/17	rose/rose foncé	forte+	duveteux --	blanc / reflet rose
32	32/B/12/04/17	rose	forte+	duveteux --	blanc / reflet rose
32	32/E/12/04/17	rose/rouge	forte+	duveteux --	blanc / reflet rose
32	32/F/12/04/17	rose/rose foncé	forte+	duveteux --	blanc / reflet rose
33	33/A/12/05/15	rose/rose foncé	forte	duveteux -	blanc / reflet rose
33	33/B/12/05/15	rose/rose foncé	forte	duveteux -	blanc / reflet rose
33	33/C/12/07/16	rose/rose foncé	forte	duveteux -	blanc / reflet rose
33	33/D/12/07/16	rose/rose foncé	forte	duveteux -	blanc / reflet rose
33	33/E/12/07/16	rose/rose foncé	forte	duveteux -	blanc / reflet rose
33	33/F/12/07/16	rose/rose foncé	forte	duveteux -	blanc / reflet rose
34	34/A/12/04/17	brun/ocre	moyenne	duveteux	blanc / brun
34	34/B/12/04/17	brun/ocre	moyenne	duveteux	blanc / brun
34	34/C/12/04/17	brun/ocre	moyenne	duveteux	blanc / brun
34	34/D/12/04/17	brun/ocre	moyenne	duveteux	blanc / brun
34	34/E/12/04/17	brun/ocre	moyenne	duveteux	blanc / brun
34	34/F/12/04/17	brun/ocre	moyenne	duveteux	blanc / brun

Annexe 4 : échelle de notation appliquée pour définir les intensités d'attaques

	<p>1°: -Plante-saine</p>
	<p>2°: -Retard-de-croissance-et/ou-léger-jaunissement-de-la-plant</p>
	<p>3°: -Début-de-perte-de-turgescence-et/ou-de-chlorose-des-feuilles</p>
	<p>4°: -Etendue-des-symptômes-(chlorose+perte-de-turgescence)-sur-quelques-feuilles-et/ou-début-de-perte-de-turgescence-des-tissus-de-soutien-de-certaines-tiges</p>
	<p>5°: -Etendue-des-symptômes-(chlorose+perte-de-turgescence)-sur-toutes-les-feuilles-et-perte-de-turgescence-des-tissus-de-soutien-de-certaines-tiges</p>
	<p>6°: -Plante-morte-ou-quasiment-morte</p>

1. correspond à une plante saine
2. retard de croissance, début de jaunissement
3. 25% de feuilles jaunies et début de perte de turgescence
4. 50% de feuilles jaunies et début de flétrissement
5. 75% à 100% de feuilles jaunies et flétries
6. plante morte