

**AFPP-CINQUIEME CONFERENCE INTERNATIONALE
SUR LES METHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE - 11 AU 13 MARS 2015**

**SELECTION D'AGENTS DE LUTTE BIOLOGIQUE EFFICACES POUR LUTTER CONTRE LA FUSARIOSE
VASCULAIRE DU CYCLAMEN**

C. LECOMTE¹, V. EDEL-HERMANN², A. LANGLOIS³, F. ROBERT¹, C. ALABOUVETTE⁴, C. STEINBERG²

¹ Astredhor, 44 rue d'Alésia, 75682 Paris, France

² INRA Dijon, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, 21035 Dijon, France

³ Arexhor Seine Manche, 22 rue de Normandie, 76640 Fauville en caux, France

⁴ Agrene, 47 rue C. Pierrot Dijon, France

E-mail : charline.lecomte@dijon.inra.fr

RESUME

La fusariose vasculaire du cyclamen, causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* est la maladie la plus préjudiciable pour cette culture. Elle peut entraîner plus de 50 % de pertes. Les moyens de contrôle permettant de limiter son impact sont limités mais des travaux précédents ont montré des résultats prometteurs en lutte biologique. Le but de cette étude est de sélectionner un ou plusieurs agents de lutte biologique efficaces parmi les produits déjà commercialisés afin d'apporter rapidement une solution aux horticulteurs.

Mots-clés : biocontrôle, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, horticulture, trachéomycose.

ABSTRACT

Fusarium wilt of cyclamen caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* is the most damaging disease for the plant. It can be responsible for more than fifty percent losses. The ways to control the pathogen are limited. Previous studies have shown promising results using biocontrol microorganisms. The aim of this study is to screen biocontrol agents among already marketed products in order to rapidly propose a solution to horticulturists.

Keywords: biocontrol, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, horticulture, tracheomycosis.

INTRODUCTION

Fusarium oxysporum est un champignon tellurique dont la présence dans les sols peut être qualifiée d'ubiquitaire. L'espèce regroupe des champignons saprophytes, pathogènes opportunistes de l'homme, antagonistes d'autres champignons ou phytopathogènes (Burgess, 1981; Gordon and Martyn, 1997; Summerell and Leslie, 2011). Ces derniers montrent une spécificité d'hôte très étroites et sont regroupés en formes spéciales (Snyder and Hansen, 1940). La forme spéciale *cyclaminis* (appelée FoCy) est donc responsable de la fusariose vasculaire sur cyclamen uniquement (Gerlach, 1954).

La fusariose vasculaire est la maladie la plus dommageable sur cyclamen (Minuto *et al*, 1995). Le champignon pénètre par les racines jusqu'à atteindre le xylème où il continue sa progression entraînant le flétrissement total du feuillage et la mort de la plante. Cette maladie est présente partout dans le monde (Woudt *et al*, 1995) et est responsable de pertes économiques pouvant atteindre plus de 50 % des plantes (Orlicz-Luthardt, 1998; Elmer, 2002; Lori *et al*, 2012).

Malheureusement, les moyens de lutte contre ce pathogène sont limités. La mise en place de mesures de prophylaxie est largement conseillée. La lutte variétale est inexistante, bien que des niveaux de sensibilité différents soient constatés par les horticulteurs et que des espèces sauvages de cyclamen aient été notées « résistantes » (Orlicz-Luthardt 1998; Fravel *et al*, 2003). L'utilisation de matières actives comme le thiophanate-méthyl, l'acibenzolar-S-méthyl ou l'azoxystrobine permettent de retarder le développement de la maladie (Elmer, 2006) ou de diminuer le nombre de plantes mortes (Gullino *et al*, 2002), mais seulement pour les doses d'application les plus élevées. L'utilisation de sels comme le chlorure de sodium n'a qu'un effet marginal sur la sévérité de la maladie (Elmer, 2002). Par contre, l'étude des communautés fongiques de la rhizosphère du cyclamen a révélé l'activité antagoniste de certains d'entre eux suggérant l'utilisation d'agents de lutte biologique pour contrôler FoCy (Kurzawińska, 2010). Minuto *et al* (1995) ont ainsi montré que certaines souches antagonistes de *F. oxysporum* ou de *F. moniliforme* utilisées seules ou en combinaison permettent une diminution significative de l'incidence ou de la gravité de la maladie. La bactérie *Serratia marcescens* utilisée en combinaison avec de la chitine réduit la sévérité de la fusariose du cyclamen de plus de 40 % (Someya *et al*, 2000) de même que la souche antagoniste *F. oxysporum* Fo47 contrôle le pathogène dans certaines conditions (Alabouvette *et al*, 2009). Enfin, une utilisation combinée de la lutte chimique et de la lutte biologique améliore la maîtrise de la maladie (Minuto *et al*, 1995; Elmer and McGovern, 2004). Cependant, ces résultats acquis en laboratoire ou en expérimentations n'ont jusqu'ici pas abouti à la commercialisation d'un agent de lutte biologique contre la fusariose du cyclamen.

Cette étude s'insère dans un projet qui vise d'une part à mettre au point un kit de détection précoce du pathogène à travers la recherche d'un marqueur moléculaire spécifique, et d'autre part à identifier un ou plusieurs agent(s) de lutte biologique efficaces. Les travaux présentés ici s'intègrent dans le second objectif. Pour apporter une solution de lutte rapide aux producteurs, nous avons décidé d'éprouver des agents de lutte biologique (ALB) ou des matières fertilisantes à base de microorganismes déjà disponibles sur le marché mais non préconisés pour l'instant pour lutter contre FoCy. La concentration et l'identité de ces ALB et matières fertilisantes seront déterminées avant de tester leur efficacité.

MATERIELS ET METHODES

- Souche pathogène

La souche MIAE 01507 (Collection de Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnemental, INRA Dijon) de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* utilisée pour ces expérimentations a montré une forte agressivité lors de précédents tests de pathogénicité (données non montrées). Elle a été isolée d'une jeune plantule symptomatique en 2009 en Normandie.

- Agents de lutte biologique

Les ALB et les matières fertilisantes utilisés sont déjà commercialisés, mais aucun n'a d'allégation de lutte contre FoCy. Dans la mesure où les expérimentations sont en cours de duplication, nous conserverons un code pour identifier les 7 produits testés. Les produits 1, 5, 6 et 7 sont des champignons saprophytes, le produit 3 est un champignon mycorhizien, le produit 2 est une bactérie et le produit 4 est un mélange champignon-bactérie.

Pour chacun de ces produits, la densité d'inoculum présent par gramme de produit a été évaluée par la méthode de suspension-dilution-étalement sur boîte de Petri contenant le milieu gélosé approprié.

L'ALB numéro 3 étant un microorganisme biotrophe obligatoire, nous n'avons pas estimé la concentration de cet agent de lutte et avons pris en compte la concentration annoncée par le fournisseur.

Les agents de lutte biologique présents dans chacun des produits ont été identifiés par une méthode moléculaire après avoir été purifiés et multipliés sur milieu gélosé.

Pour les ALB fongiques, les régions d'ADN EF-1 α (Elongation Factor 1 alpha) et l'ITS (Internal Transcribed Spacer) ont été amplifiées par PCR en utilisant les amorces EF1 (5'-ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC-3') et EF2 (5'-GGA (G/A)GT ACC AGT (G/C)AT CAT GTT-3'), puis ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') et ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al*, 1990 ; Gardes and Bruns, 1993 ; O'Donnell *et al*, 1998).

Pour les ALB bactériens, la région d'ADN ribosomique 16S a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces 1492r (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') et 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') (Gurtler and Stanisich, 1996).

Les séquences consensus ont été comparées aux séquences de la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information) en utilisant le programme informatique BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) afin de vérifier l'identité des souches.

- Sélection d'agents de lutte biologique efficaces *in vivo*

Les 7 ALB seuls et les trois combinaisons 1 + 2, 2 + 3 et 2 + 4 ont été testées.

Des graines de la variété Swan rose flammé (Eyraud-productions) appartenant à l'espèce *Cyclamen persicum* ont été utilisées.

Les ALB ont été incorporés au substrat au semis et au repotage (stade 3-4 feuilles) dans des quantités suffisantes pour apporter 10⁶ propagules/L de substrat. Le calcul a été réalisé sur la base des concentrations mesurées et non sur celle des concentrations annoncées par les fournisseurs sauf dans le cas de l'ALB 3 (champignon mycorhizien) pour lequel, selon les indications du fournisseur, l'équivalent de 100 spores/L a été apporté. L'agent pathogène, préalablement cultivé en milieu liquide a été inoculé par inondation une semaine après semis aux concentrations de 10⁴, 10⁵ et 10⁶ propagules/L de substrat afin d'être dans les rapports ALB/agent pathogène 100/1, 100/10 et 100/100. Quinze plantes par modalité ont été inoculées. L'ensemble des plantes a été placé de façon aléatoire dans la serre. Un second inoculum d'agent pathogène a été apporté 11 semaines après repotage, dans les mêmes proportions que celles apportées après le semis. Des modalités témoins sans ALB et/ou sans agent pathogène ont été préparées. Les plantes sans microorganismes reçoivent uniquement de l'eau au moment de l'inoculation.

Les plantes étaient arrosées par goutteur tous les 2 à 3 jours et la régulation climatique de la serre était fixée de telle sorte que la température puisse s'élever au-delà des 25 °C. A l'apparition des premiers symptômes, des notations ont été effectuées deux fois par semaine suivant l'échelle de notation allant de 0 à 3 présentée en Annexe 1. Pour chaque plante morte, un isolement a été réalisé sur malt agar antibiotiques (250 mg/L acide citrique, 100 mg/L streptomycine, 50 mg/L chlortétracycline, 10 g/L agar, 15 g/L malt) à partir de tubercule stérilisé en surface. Une fois développés, les isolats sont repiqués sur milieu Corn Leaf Agar ou CLA (20 g/L agar, feuilles d'œillet stériles) afin de les identifier morphologiquement.

- Identification des mécanismes d'action des agents de lutte biologique *in vitro*

Des confrontations duales ALB-souche MIAE 01507 sur malt agar antibiotique pendant 5 jours ont révélé le type d'antagonisme potentiellement exercé par chacun des ALB vis-à-vis de l'agent pathogène en conditions contrôlées.

RESULTATS

- Evaluation de la concentration des agents de lutte biologique

Les concentrations attendues et les concentrations mesurées sont présentées dans le Tableau I. Pour les ALB 1, 4 et 5 les concentrations annoncées et mesurées sont les mêmes. En revanche, pour les ALB 2 et 6, la concentration annoncée est 10 à 100 fois supérieure à la concentration déterminée par analyse microbiologique à réception du produit. Pour le 7, au contraire la concentration annoncée est 10 fois plus faible que la concentration déterminée dans le produit

Tableau I : Concentrations attendues et effectives des différents ALB testés. (Expected and effective concentrations for each tested BCA.)

Numéros des produits	Concentrations annoncées	Concentrations effectives
1	2.10^8 ufc/g	$1,73.10^8$ ufc/g
2	2.10^9 ufc/g	$2,4.10^8$ ufc/g
4 (champignon)	4.10^6 ufc/g	9.10^6 ufc/g
4 (bactérie)	1.10^8 ufc/g	1.10^8 ufc/g
5	10^9 ufc/g	$9,6. 10^8$ ufc/g
6	10^7 ufc/g	10^5 ufc/g
7	10^7 ufc/g	$2,7.10^8$ ufc/g

ufc : Unité Formant Colonie

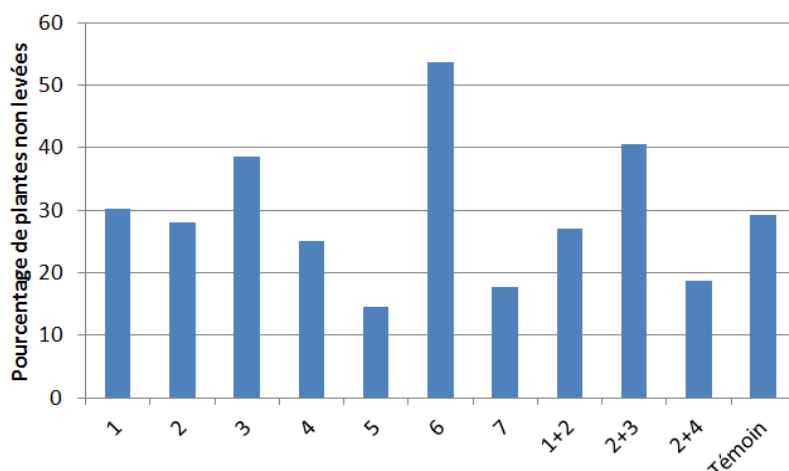
- Identification taxonomique des agents de lutte biologique

Le séquençage des marqueurs moléculaires a permis de vérifier l'identité taxonomique pour les ALB 2, 4, 5, 6 et 7 au niveau de l'espèce. Seule l'identité de l'ALB 1 ne correspond pas à celle annoncée par le fournisseur et l'identité de l'ALB 3 n'a pas pu être déterminée avec nos outils moléculaires.

- Sélection d'agents de lutte biologique efficaces *in vivo*

Des manques à la levée d'importances différentes ont été observés dans la plupart des modalités (Figure 1). Dans la modalité témoin, le manque à la levée atteint 29 %, tandis qu'il atteint 53,7 % dans la modalité 6. Il est également supérieur au témoin pour les modalités 1 (30,2 %), 3 (38,5 %) et 2+3 (40,6 %). Par contre, il est inférieur à celui du témoin pour les 6 autres modalités, le manque à la levée le plus faible étant observé pour la modalité 5 (14,6 %)

Figure 1 : Pourcentage de plantes non levées selon les modalités expérimentales. (Percentages of non-emerged seedlings per treatment.)



Du fait des manques à la levée et de plusieurs incidents rencontrés en cours de culture (attaque de *Botrytis*, manque d'irrigation), nous ne disposions pas d'un nombre suffisant de plantes pour réaliser toutes les inoculations prévues. Ainsi, pour les modalités 1, 2, 3, 6 et 2+3 nous n'avons pas pu tester le rapport ALB /agent pathogène 100/100 (concentration en pathogène 10^6 ufc/L de substrat).

Les premiers symptômes sont apparus 7 semaines après la première inoculation. L'essai a pris fin 15 semaines après le premier apport d'inoculum.

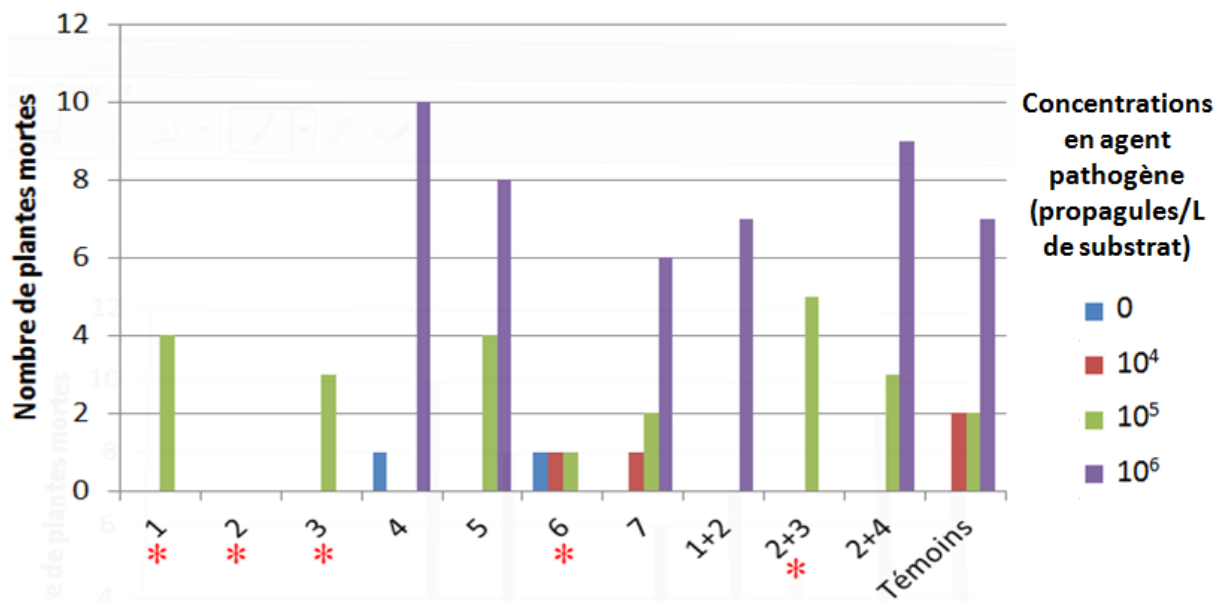
A la concentration 10^6 propagules d'agent pathogène/L de substrat, la modalité témoin montre 7 plantes mortes (Figure 2). Les modalités 4, 5, 2+3 et 2+4 montrent également un nombre de plantes mortes plus important que le témoin et les modalités 7 et 1+2 montrent un nombre de plantes mortes similaire à celui de témoin. Pour les modalités restantes la concentration 10^6 n'a pas pu être testée.

A la concentration 10^5 propagules d'agent pathogène/L de substrat, la modalité témoin montre 2 plantes mortes. Les 1, 3, 5, 2+3 et 2+4 montrent un nombre de plantes mortes supérieur au témoin tandis que les modalités 2, 4, 6, 7 et 1+2 montrent un nombre de plantes mortes inférieur ou égal à celui du témoin.

A la concentration 10^4 propagules d'agent pathogène/L de substrat, le témoin montre 2 plantes mortes. Aucune modalité ne montre un nombre supérieur de plantes mortes. Les modalités 6 et 7 ne montrent qu'une plante morte à cette concentration.

Nous avons constaté la mort d'une plante non inoculée par le pathogène dans les modalités 4 et 6. Aucun *F. oxysporum* n'a été isolé de ces plantes. *F. oxysporum* a été isolé de chacun des prélèvements effectués sur plantes symptomatiques. En revanche, aucun *F. oxysporum* n'a été isolé des plantes non inocuées par l'agent pathogène.

Figure 2: Nombre de plantes mortes par modalité expérimentale selon les concentrations apportées en pathogène. (Number of dead plants by treatment in relation to pathogen concentration.)

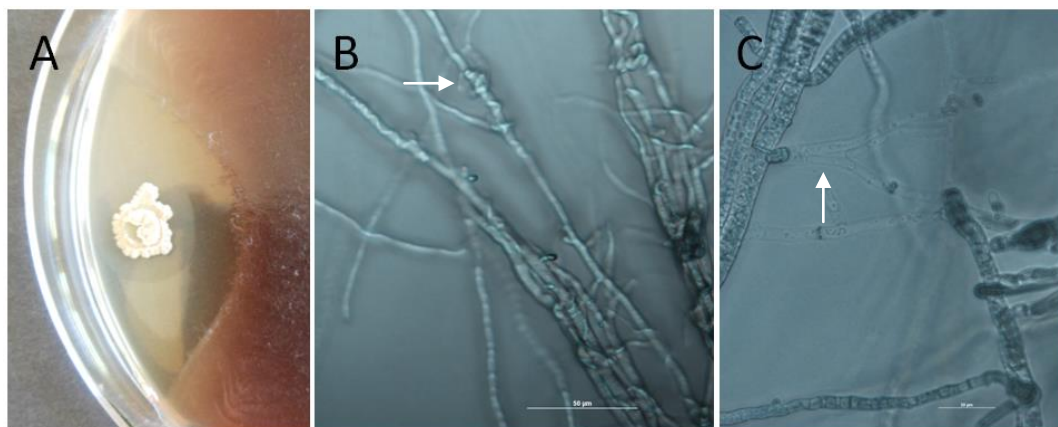


* Modalités pour lesquelles la concentration 10⁶ propagules d'agent pathogène/L de substrat n'a pas pu être testée.

- Identification des mécanismes d'action des agents de lutte biologique *in vitro*

Les observations effectuées indiquent que les agents de lutte biologique étudiés présentent divers modes d'action : antibiose et parasitisme (Figure 3). L'ALB 2 est le seul à induire une zone d'inhibition de croissance de l'agent pathogène, probablement par antibiose (Figure 3A). Les champignons antagonistes des modalités 4, 5 et 7 s'enroulent autour des hyphes du *Fusarium* pathogène, indiquant une interaction de type mycoparasitisme. En outre, une lyse des hyphes de *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* est observée pour les modalités 4 et 7. En revanche, l'observation des zones de contact entre l'agent antagoniste et l'agent pathogène, ne révèle pas d'interaction particulière pour les autres modalités.

Figure 3 : Zones d'interactions entre l'agent pathogène et les agents de lutte biologique et révélant différents modes d'action *in vitro*. A : antibiose ; B : mycoparasitisme, enroulement mycélien (flèche blanche) ; C : mycoparasitisme, lyse mycélienne (flèche blanche). (Interaction between pathogenic and antagonistic microorganisms showing different modes of action *in vitro*. A: antibiosis; B: mycoparasitism, mycelial coiling (white arrow); C: mycoparasitism, mycelial lysis (white arrow).)



DISCUSSION

Lors de cette expérimentation préliminaire, nous avons souhaité éprouver plusieurs préparations microbiennes apportées à 3 concentrations différentes et confrontées à une concentration élevée de l'agent pathogène, de manière à effectuer un premier tri très sélectif des préparations potentiellement intéressantes. Compte tenu de l'espace disponible dans la serre, ce choix délibéré nous a conduit à ne disposer que de 15 plantes par modalité ce qui n'a pas permis un traitement statistique des résultats. Nous devons donc nous contenter d'analyser les tendances qui nous permettront de choisir les préparations à éprouver de nouveau l'année prochaine.

Le manque à la levée constaté pour la modalité 6 est très supérieur à celui observé dans le témoin. Ce manque à la levée pourrait être due à la souche antagoniste elle-même, au formulant ou aux contaminants présents dans cette préparation. La souche ayant, *a priori*, été choisie pour ses capacités protectrices, nous supposons que c'est le formulant qui est responsable de la phytotoxicité. En lutte biologique, il est admis que le choix du formulant est crucial pour la conservation et l'efficacité de la souche (Alabouvette *et al*, 2009). Une même souche peut se révéler inefficace pour lutter contre un agent pathogène donné lorsqu'elle est formulée avec un formulant alors que formulée différemment, elle est très efficace pour lutter contre le même agent pathogène (Minuto *et al*, 1995). L'activité phytotoxique peut s'exercer directement sur la plante hôte ou indirectement *via* la stimulation de l'agent pathogène.

Parmi les préparations éprouvées, la plus efficace est la préparation 2. Le microorganisme utilisé a assuré une protection totale de la culture contre la fusariose du cyclamen pendant les 21 semaines de culture. Nous avons constaté que l'un des modes d'action de cette bactérie est l'antibiose. L'antagonisme microbien fait appel à trois modes d'action principaux : le parasitisme, la compétition nutritive et/ou spatiale et l'antibiose. Cette dernière se définit comme la production par un microorganisme de métabolites secondaires toxiques pour un autre microorganisme (Fravel *et al*, 2003). Ce mécanisme est présent chez les champignons comme chez les bactéries (Sundh and Goettel, 2012). Dans le cas de cette préparation, il serait intéressant d'identifier la ou les molécules à l'origine de cette activité antagoniste vis-à-vis de FoCy. Cette préparation est d'ores et déjà retenue pour de plus amples tests de contrôle de la fusariose du cyclamen.

Les modalités 4 et 5 n'ont montré aucune activité protectrice. En effet, le nombre de plantes mortes est supérieur à celui observé dans les témoins aux concentrations correspondantes. Nos observations indiquent que ces microorganismes agiraient *in vitro* par mycoparasitisme. Ce mécanisme soit n'est pas exprimé dans le substrat de culture, soit n'est pas efficace contre FoCy, bien qu'ayant déjà montré une action de contrôle contre d'autres souches de *F. oxysporum* (Marzano *et al*, 2013). Il faut préciser de nouveau que ces préparations n'ont pas été sélectionnées pour leur efficacité contre la fusariose du cyclamen. Ces préparations ne seront pas éprouvées dans la suite de cette expérimentation.

La modalité 3 ayant entraîné un retard à la croissance certainement imputable au coût énergétique pour la plante de l'installation de la mycorhize, nous avons décidé de ne pas la retenir pour la suite des tests.

Les combinaisons testées ne montrent pas des résultats concluants. L'intérêt d'associer plusieurs microorganismes est d'obtenir un effet synergique de différents modes d'action (Spadaro and Gullino 2005). Dans notre cas, nous n'avons pas observé cet effet. Dans le cas de l'association 2+3, c'est l'effet opposé que nous constatons puisque le mélange des deux produits est moins efficace que chacun des produits apporté séparément.

Nous n'avons pas observé de mode d'action particulier pour les modalités 4 (bactérie) et 6. Cependant, le test choisi ne nous permet pas de mettre en évidence tous les mécanismes d'action de ces microorganismes. D'autres approches expérimentales sont nécessaires pour les identifier.

Les modalités 1, 2 et 7 feront prochainement l'objet des tests supplémentaires afin de confirmer les résultats présentés.

Ces premiers résultats laissent à penser que la lutte biologique est un moyen de lutte efficace contre FoCy. Toutefois, étant donné que le cycle de production du cyclamen est long et que la maladie peut se déclarer à tout moment du cycle, il sera nécessaire de confirmer ces résultats chez l'horticulteur et de connaître la durée de protection que permet ce type de lutte. La mise en place d'une lutte intégrée n'est donc pas à écarter. Le recours à la prophylaxie reste nécessaire et l'utilisation d'autres moyens de lutte complémentaires tels que l'application de métabolites d'origine naturelle incluant notamment des huiles essentielles, des extraits de plantes, ou des substances élicitrices des réactions de défense de la plante pourrait être envisagée et faire l'objet d'études à venir.

BIBLIOGRAPHIE

- Alabouvette C., Olivain C., Migheli Q., Steinberg C., 2009 - Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *The New Phytologist*, 184, 3, 529–44.
- Burgess L.W., 1981 - General ecology of the *Fusaria*. In: Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J. *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Edition Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, 225–235.
- 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 Disease*, 86, 37, 389–393.
- Elmer W.H., 2006 - Effects of acibenzolar-S-methyl on the suppression of Fusarium wilt of cyclamen. *Crop Protection*, 25, 7, 671–676.
- Elmer W.H., McGovern R.J., 2004 - Efficacy of integrating biologicals with fungicides for the suppression of Fusarium wilt of cyclamen. *Crop Protection*, 23, 10, 909–914.

- Gardes M., Bruns T.D., 1993 - ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118.
- Gerlach W., 1954 - Untersuchungen über die Welkekrankheit des Alpenveilchens (Erreger: *Fusarium oxysporum* SCHL. f.sp. *cydaminis* n.f.). *Phytopathologische Zeitschrift*, 22, 125–176.
- Gordon T.R., Martyn R.D., 1997 - The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 111–28.
- Gullino M.L., Minuto A., Gilardi G., Garibaldi A., 2002 - Efficacy of azoxystrobin and other strobilurins against *Fusarium* wilts of Carnation, Cyclamen and Paris daisy. *Crop Protection*, 2, 1, 57–61.
- Gurtler V., Stanisich V.A., 1996 - New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142, 1, 3–16.
- Komada H., 1975 - Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research*, 8, 114–124.
- Kurzawińska H., 2010 - Fungi inhabiting the rhizosphere of Persian Cyclamen and their impact on potential pathogens of the plant. *Phytopathologia*, 57, 5–10.
- 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.
- Marzano M., Gallo A., Altomare C., 2013 - Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biological Control*, 67, 3, 397–408.
- 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.
- 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.
- Orlicz-Luthardt A., 1998 - Studies on the resistance of Cyclamen to *Fusarium* wilt. In: *Beit. Züchtungsforschung*, 4, 48–49.
- Snyder W.C., Hansen H.N., 1940 - The Species Concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27, 64–67.
- Someya N., Kataoka N., Komagata T., Hirayae K., Akutsu K., 2000 - Biological control of Cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Disease*, 84, 3, 334–340.
- Spadaro D., Gullino M.L., 2005 - Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection*, 24, 7, 601–613.
- Summerell B.A., Leslie J.F., 2011 - Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity*, 50, 1, 135–144.
- Sundh I., Goettel M.S., 2012 - Regulating biocontrol agents: a historical perspective and a critical examination comparing microbial and macrobial agents. *BioControl*, 58, 5, 575–593.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J., 1990 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. *PCR protocols. a guide to methods and applications*. Edition Academic Press Limited, London, 315–322.
- 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.

Annexe 1: Echelle de notation des symptômes de la fusariose du cyclamen.

	<u>Stade 0</u> : Plante saine
	<u>Stade 1</u> : Apparition des symptômes (flétrissement et/ou chlorose) sur plus d'une feuille
	<u>Stade 2</u> : Etendu des symptômes (chlorose + perte de turgescence) sur 50 % des feuilles et plus
	<u>Stade 3</u> : Plante morte