



HAL
open science

Caractérisation des agents phytopathogènes responsables des pertes de la filière ail : mise au point d'une méthode de détection

Paul L. Chretien

► To cite this version:

Paul L. Chretien. Caractérisation des agents phytopathogènes responsables des pertes de la filière ail : mise au point d'une méthode de détection. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0363 . tel-03211009

HAL Id: tel-03211009

<https://theses.hal.science/tel-03211009v1>

Submitted on 28 Apr 2021

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

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

THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

Ecole Doctorale 536 Agrosociétés & Sciences

Spécialité / Discipline de doctorat :
BIOLOGIE

Laboratoire Pathologie Végétale – INRAE PACA

Présentée par
Paul Chrétien

Caractérisation des agents phytopathogènes responsables des pertes de la filière ail

Mise au point d'une méthode de détection

Soutenue publiquement le 18/02/2021 devant le jury composé de :

Marie-Hélène Balesdent, Directrice de recherche, INRAE

Philippe Reignault, Professeur, ANSES

François Lecompte, Chargé de recherche, INRAE

Frédéric Suffert, Ingénieur de recherche, INRAE

Christel Leyronas, Ingénieure de recherche, INRAE

Cindy Morris, Directrice de recherche, INRAE

Céline Vézian, Responsable R&D, Alinéa coopérative

Rapporteuse

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Directrice de thèse

Invitée

À toi qui retombera sur ces pages.
À toi l'Homme que je serai demain.

Résumé

Depuis le début des années 2000 et ce, malgré un haut niveau d'exigence sanitaire, la filière française de l'ail subit des pertes de plus en plus importantes liées à l'émergence d'une maladie fongique entraînant le pourrissement des bulbes lors du stockage. Les pertes subies par certains producteurs peuvent atteindre les 90%. En 2016, une collaboration naît entre INRAE et la filière française afin de comprendre les tenants et aboutissants de cette maladie. Dans le but de développer une méthode de lutte efficace et durable contre la pourriture brune de l'ail il a fallu 1) établir les causes de la maladie, 2) caractériser les agents responsables, 3) élucider le processus de pénétration des gousses et 4) mettre au point une méthode de détection des microorganismes.

La première étape a été de constituer une collection de souches à partir d'un échantillonnage de 5493 gousses provenant de 354 têtes collectées pendant 3 saisons, dans les deux bassins principaux de production et sur le plus de variétés d'ail possibles conduisant à la mise en collection de plus de 1000 souches fongiques. Grâce à l'identification moléculaire, deux espèces fongiques isolées de symptômes ont été identifiées : *F. proliferatum*, majoritaire, et *F. oxysporum*. Grâce aux séquences d'ADN du gène *tef-1α* dit de ménage (translation elongation factor 1 alpha) un haplotype majoritaire au sein de l'espèce *F. proliferatum* a pu être décrit en plus d'une vingtaine d'autres haplotypes appartenant aux deux espèces identifiées.

Un test d'agressivité sur ail a été développé afin de valider les postulats de Koch et de caractériser le pouvoir pathogène des souches de *F. proliferatum* et *F. oxysporum*. Un panel représentatif de souches a été formé. L'ensemble des souches sélectionnées ont recréé des symptômes sur ail avec des niveaux d'agressivité variables. La diversité d'agressivité des souches a été mise en parallèle avec la diversité génétique observée précédemment : certains haplotypes ont montré une agressivité statistiquement supérieure aux autres.

Afin de comprendre quand et comment *F. proliferatum* arrivait à pénétrer au sein des gousses, des observations histologiques du plateau racinaire (zone de croissance des racines) ont été réalisées en partenariat avec Avignon Université et la plateforme de microscopie 3A. Les résultats montrent que, lorsque le champignon est inoculé à la base de la gousse, il peut pénétrer au niveau de blessures naturelles (ex : sortie des racines), que le plateau racinaire peut constituer un environnement favorable à son développement et que la dégradation des tissus par le mycélium se fait à distance et dans toutes les directions.

Enfin, grâce aux séquences d'ADN obtenues lors de l'identification moléculaire, des amorces LAMP ont pu être conçues et testées *in vitro*, première étape de la méthode de détection de *F. proliferatum*. Ces amorces ont montré une spécificité vis-à-vis de l'espèce *F. proliferatum*. Les tests *in vivo* en cours viendront dessiner la forme finale de la méthode de détection. Cette méthode sera transmise aux acteurs de la filière française et permettra d'élucider le cycle biologique de *F. proliferatum* sur l'ail et à l'avenir de prévenir le risque sur gousses.

Mots clés : *Allium sativum*, *Fusarium*, émergence, étiologie, détection moléculaire

Abstract

Since the early 2000s and despite a high level of sanitary requirements, the French garlic sector has suffered increasingly significant losses linked to the emergence of a fungal disease causing rotting of the bulbs during storage. The losses endured by some producers can reach 90%. In 2016, a collaboration was established between INRAE and the French garlic industry in order to clarify the etiology of this disease and to develop diagnostic methods in view of the long terms goal of developing effective and sustainable methods of control. The specific objectives of this collaboration were to 1) establish the causes of the disease, 2) characterize the causative agents, 3) elucidate the process of clove penetration and 4) develop a method for detecting the pathogen(s) involved.

The first step was to build a collection of strains from a sample of 5,493 cloves from 354 heads collected over 3 seasons, in the two main production basins and on as many varieties of garlic as possible leading to a collection of > 1000 fungal strains. Through molecular identification, two fungal species associated with symptoms were identified: *F. proliferatum*, the dominant pathogen, and *F. oxysporum*. Based on the DNA sequences of the so-called housekeeping gene (translation elongation factor 1 alpha) a predominant haplotype within the strains of *F. proliferatum* was described in addition to twenty other minor haplotypes among the two identified species.

A test of aggressiveness on garlic was developed to validate Koch's postulates and to characterize the pathogenicity of strains of *F. proliferatum* and *F. oxysporum*. A representative panel of strains was chosen. All of the selected strains recreated garlic symptoms with varying levels of disease intensity. The variability of the aggressiveness of the strains was compared with the genetic diversity observed previously: some haplotypes showed statistically superior aggressiveness than others.

In order to understand when and how *F. proliferatum* penetrates into cloves, histological observations of the root plateau (root growth zone) were carried out in partnership with Avignon University and the 3A microscopy platform. The results showed that, when the fungus is inoculated at the base of the clove, it can penetrate at the level of natural wounds (at the exit point of roots, for example). The root plate can constitute an environment favorable to fungal development and degradation of the tissue by the mycelium happens at a distance from the mycelial front and in all directions.

Finally, based on DNA sequences obtained during molecular identification, LAMP primers were designed and tested in vitro as the first step in the method for detecting *F. proliferatum*. These primers showed specificity to *F. proliferatum*. The in vivo tests in progress will delimit the final form of the detection method. This method will be passed on to stakeholders in the French garlic sector and will make it possible to elucidate the biological cycle of *F. proliferatum* on garlic and, in the future, to limit the occurrence of this disease.

Keywords : *Allium sativum*, *Fusarium*, emergence, etiology, molecular detection

Remerciements

Avant toute chose, je profite de ces premières pages pour remercier, noir sur blanc, toutes les personnes qui se sont retrouvées à cette position, pas toujours très aisée, entre ma thèse et moi.

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer la qualité et la rigueur des travaux effectués tout au long de ces 3 années de thèse. De ce fait, je remercie Marie-Hélène Balesdent, Phillipe Reignault, François Lecompte et Frédéric Suffert d'avoir accepté d'apporter leurs expériences et leurs expertises sur mon travail. Je remercie également chaleureusement Véronique Edel-Hermann, Renaud loos, Philippe Nicot et Anne-Sophie Walker d'avoir répondu présent lors de la formation du comité de thèse. Leurs conseils et leurs encouragements m'ont été très bénéfiques.

Cette expérience de thèse n'aurait clairement pas été la même sans ma directrice de thèse Christel Leyronas. Ces trois années d'échange, de collaboration et de partage ont eu un fort impact sur ma façon d'être et de voir le monde. Je ne te remercierai jamais assez pour ta disponibilité, ta compréhension, ton écoute, tes conseils et tes capacités organisationnelles hors-pair. Tu as été là aux moments où j'en ai eu le plus besoin. J'espère que tu encadreras de nombreux autres thésards car, c'est certain, ils vivront une très bonne première expérience du monde de la recherche.

Je tiens également à remercier Cindy Morris, ma co-directrice de thèse. Quelques jours après mon arrivée à Avignon, quelqu'un m'a dit : « Une fois que tu auras rencontré Cindy, tu t'en souviendras longtemps. ». Je réalise maintenant à quel point c'est vrai. Je te remercie pour les nombreuses discussions enrichissantes que nous avons eues sur des sujets incroyablement variés. Je te remercie également pour ta disponibilité au congrès FEMS de Glasgow. Et le plus important, je te remercie de m'avoir fait reprendre confiance en moi en me prouvant que la passion, la vraie, viscérale, existe bel et bien.

L'unité de Pathologie Végétale a été pour un cadre exceptionnellement positif pour ma thèse. Je veux remercier toutes les personnes faisant vivre ces lieux car j'ai été ravi de rencontrer chacun d'entre vous. Je remercie Marc Bardin de m'avoir accueilli au sein de cette unité de recherche, pour son accessibilité et sa bienveillance. Je remercie Claire et Magali D avec qui j'ai partagé de nombreuses très agréables heures sous la hotte du laboratoire Botrytis, au MEB et sur le terrain. Je remercie Magali E, véritable personnification de la Provence pour sa bonne humeur, son humour à toute épreuve et pour avoir su garder le secret des chocolats entre nous. Je remercie Jeff pour nos longues conversations à refaire le monde. Je remercie Isabelle pour m'avoir ouvert les portes du monde microscopique et m'avoir laissé jouer avec le MEB de l'unité. Je remercie les équipes de viro et de bactério qui regorgent de personnes formidables. Je remercie Michel R pour avoir été toujours très arrangeant avec moi. Je remercie Véronique pour nos conversations à midi, toujours intéressantes. Je remercie Cécile D pour son don de la pédagogie, tout en humour et en finesse. Je remercie l'équipe des serres pour m'avoir fait découvrir l'envers du décor d'un laboratoire de recherche. Je remercie tous le personnel du LBM qui m'a permis de réaliser bon nombre d'expériences. Enfin, je tiens à

remercier Pascale et Claudine, complices aux grands cœurs, véritables gardiennes de ces lieux.

Je remercie de tout mon cœur Erine, Alice, Maria et Jeanne qui ont été bien plus que des partenaires de manips mais de vraies amies. Je suis certain qu'on se reverra bientôt et j'espère que vous trouverez toutes les quatre votre voie.

Je remercie Sandrine et Mohamed pour leur accueil, leur expertise et leur chaleur humaine au sein du laboratoire de microscopie d'Avignon Université. Travailler avec vous a été un vrai bonheur.

Je tiens à remercier le petit monde en ébullition qu'est l'ail Français avec qui j'ai eu la chance de travailler. Plus précisément, je tiens à remercier Hervé Hel qui m'a accordé rapidement son entière confiance et a su m'intégrer dans ce nouvel environnement. Un immense merci à Céline Vézian pour sa disponibilité, ses conseils et sa profonde empathie. Sans oublier tous les acteurs de Top'Alliance Alinéa avec qui j'ai eu la chance d'échanger, en particulier Daniele Gauze et Kevin Feral. Je remercie évidemment Gaël Bardou qui m'a fait prendre conscience des enjeux concrets de ces travaux, instillant au projet tout son caractère important.

Dans la Drôme j'ai eu la chance de faire la rencontre de Raphaël Reboul qui m'a transmis sa passion de l'ail et du monde agricole qu'il défend avec vigueur. Je te remercie de toujours m'avoir tiré vers le haut. Je remercie Héléne qui a été ma partenaire d'aventure à chaque excursion sur le terrain. Fidèle à ta classe tu as été un vrai rempart contre tout ce qui empêchait ce projet de se mener à bien. Je tiens à remercier le GIE de l'ail drômois et en particulier Sarah Franco pour m'avoir expliqué le fonctionnement de la filière. Je remercie Top Semence pour leur collaboration, notamment Pierrick, précurseur de cette thèse sans qui les bases n'auraient pas été aussi bien posées. Je remercie enfin la FNAMS de m'avoir montré, dès le début de ma thèse, des essais variétaux au champ.

Je tiens à remercier tout particulièrement les agriculteurs qui ont su accorder leur confiance aux scientifiques que nous sommes malgré le fossé qui sépare nos mondes.

Je remercie Marie Turner et Miekat de Vegenov pour leur superbe accueil en terres bretonnes. Ce fut un vrai plaisir de travailler et d'échanger avec vous et de me balader sur le sable en longeant les côtes de Saint-Pol.

Je remercie les loups de La Meute Sauvage pour avoir été mes compagnons de route pendant près de 2 ans, pour avoir été présents tous les soirs et m'avoir remonté le moral quand j'en avais besoin.

Je remercie mes amis de Nancy et d'ailleurs, loin des yeux mais pas loin du cœur, pour avoir gardé contact malgré la distance. J'ai hâte de tous vous retrouver en Mars !

Enfin je remercie mes parents qui m'ont soutenu dans tout mon parcours et qui ont répondu présent tout au long de ces 3 années de thèse. Merci pour tout.

Table des matières

Liste des figures.....	1
Liste des tableaux.....	3
Contexte	5
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	7
I. <i>Allium sativum</i> L.	8
I.1 Utilisation historique	8
I.2 L'ail comme médicament à l'époque moderne	8
I.3 Description anatomique	9
II. La culture de l'ail.....	11
II.1 L'ail en France	11
II.2 La profession française de l'ail.....	11
II.3 Itinéraire de culture	12
II.4 Des labels de qualité pour faire face aux maladies et à la concurrence	15
II.5 Production mondiale	17
III. Une maladie émergente	18
III.1 Confusion de plusieurs symptômes	18
III.2 Pertes économiques	18
III.3 Vers la description d'un nouvel agent pathogène	18
IV. <i>Fusarium</i> sur ail ?	22
IV.1 Le genre <i>Fusarium</i>	22
IV.2 Cycle de vie et voies de dissémination	26
IV.2.1 Mise en dormance	26
IV.2.2 Levée de la dormance	26
IV.2.3 Pénétration des tissus	26
IV.2.4 Développement au sein de l'hôte	27
IV.2.5 Dispersion	27
IV.3 Toxines produites par les espèces du genre <i>Fusarium</i>	29
Objectifs.....	30
Chapitre 2 : Etiologie et Caractérisation	31
Avant-propos.....	32
Chapitre 3 : Interactions hôte-pathogène	73
Avant-propos.....	74
Chapitre 4 : Méthode de détection.....	85
I. Introduction.....	86
II. Matériel et Méthodes.....	88
1. Conception des amorces	88
1.1 Choix de la région candidate	88
1.2 Choix des amorces.....	88
2. Tests in vitro	88
2.1 Conditions optimales d'amplification.....	90
2.2 Spécificité	90
2.3 Limite de détection	91

III. Résultats	92
III.1 Caractéristiques des amorces	92
III.2 Comportement des amorces in vitro	92
III.2.1 Conditions optimales d'amplification.....	92
III.2.2 Spécificité des amorces	95
III.2.3 Limite de détection	95
IV. Discussion.....	98
IV.1 Qualités in vitro de la méthode	98
IV.2 Manipulations à venir.....	99
IV.3 Perspectives du développement de la méthode	99
Chapitre 5 : Discussion et perspectives.....	101
Références bibliographiques.....	107
Annexes	119

Liste des figures

Figure 1.1 Dessin d'un plant d'ail et de son bulbe.....	10
Figure 1.2 Schéma de l'itinéraire de culture d'ail semence et de consommation sur deux années consécutives.....	13
Figure 1.3 Photographies illustrant les différentes étapes de récolte au séchage des bulbes. ..	14
Figure 1.4 Etapes de l'obtention d'un plant certifié en 6 générations successives.	16
Figure 1.5 Production mondiale d'ail de 2000 à 2018.....	17
Figure 1.6 Gousses d'ail atteintes de symptômes de type waxy-breakdown (A) et gousses décomposées et effondrées sur elles-mêmes (B).....	19
Figure 1.7 Différents types de symptômes observés sur gousses après 3-4 semaines de stockage.....	20
Figure 1.8 Les différents types de spores produites par <i>Fusarium oxysporum</i>	23
Figure 1.9 Schéma simplifié du cycle de développement type d'une espèce de <i>Fusarium</i> et les potentielles sources d'inoculum.	28
Figure 4.1 Schéma simplifié d'une LAMP.....	87
Figure 4.2 Echelle colorimétrique mise au point pour la détermination des résultats des tests LAMP.	89
Figure 4.2 Réactions LAMP obtenues dans les conditions optimales d'amplification définies ci-avant (65 °C et 35 min).....	94

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Données bibliographiques recueillies sur les 7 espèces du genre <i>Fusarium</i> isolées d'ail.....	24
Tableau 4.1 Caractéristiques du jeu d'amorces sélectionné.....	93
Tableau 4.2 Réactions LAMP dans des différentes conditions de temps et de températures. ..	93
Tableau 4.3 Réactions LAMP en présence d'ADN de souches de <i>F. proliferatum</i> isolées d'ail espagnol.	96
Tableau 4.4 Résultats des réactions LAMP en présence d'ADN de souches de <i>F. proliferatum</i> isolées sur différents hôtes.	96
Tableau 4.5 Réactions LAMP en présence d'ADN de souches de <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>B. cinerea</i> et <i>S. sclerotiorum</i>	96
Tableau 4.6 Réactions LAMP en présence de mélanges d'ADN de souches de <i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i> et <i>F. verticillioides</i>	97
Tableau 4.7 Réactions LAMP en présence de concentrations décroissantes d'ADN de <i>F. proliferatum</i>	97

Contexte

Avec 28,5 millions de tonnes produites en 2018 contre 11 millions en 2000, la production d'ail dans le monde est en pleine explosion ces dernières années (FAOSTATS, 2020). Cependant, depuis le début des années 2000, des symptômes allant du brunissement des gousses à la dégradation complète des têtes d'ail apparaissent chaque année et touchent de plus en plus de cultivateurs français. Ces symptômes entraînent une perte financière de plus en plus importante pour la production française (ail semence et de consommation) malgré des critères de production très exigeants.

La filière française a d'abord considéré deux pistes : évaluation de la présence de symptômes lors du stockage des bulbes et l'effet des filets anti-insecte sur l'expression de la maladie [H HUNYADI, 2016]. Malgré l'acquisition de données intéressantes sur la diversité des insectes présents au champ et l'impact de pratiques culturales, les travaux se concluent par une impossibilité de poursuivre les expérimentations en l'absence de données plus fondamentales sur l'identification de l'agent pathogène et de son mode de développement.

Afin de mieux comprendre cette maladie émergente, une collaboration entre les regroupements de producteurs (Top'Alliance Alinéa, Prosemail et le Syndicat de l'Ail Rose de Lautrec) et l'unité de Pathologie Végétale d'INRAE a été établie en 2016 autour de ce projet de thèse CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche). Le financement de cette convention CIFRE a été assuré d'une part par la filière ail française et d'autre part par l'ANRT (Association Nationale Recherche Technologie).

Plusieurs questions de recherche ont été posées :

- Quelles sont les agents pathogènes présents sur l'ail français dans les deux bassins principaux de production (Sud-Ouest et Drôme) ? Au sein des différentes variétés d'ail ?
- Quelle est la diversité génétique intra- et inter-espèces de ces agents pathogènes ?
- Existe-t-il une diversité d'agressivité au sein des souches retrouvées sur l'ail ?
- Comment l'agent pathogène pénètre-t-il dans les gousses ?
- Comment détecter l'agent pathogène avant l'apparition des symptômes ?

En parallèle du montage du dossier CIFRE, un CDD de 3 mois (15 Novembre 2017 au 15 Février 2018) m'a été accordé afin de commencer l'échantillonnage et les premiers isolements fongiques. Puis, après obtention des financements, la thèse a officiellement débuté le 1^{er} Mars 2018. Le but de ces travaux a été d'éclaircir l'étiologie de la maladie et de mettre au point d'une méthode de détection des agents pathogènes de l'ail pour progresser vers la compréhension de l'épidémiologie de la fusariose de l'ail.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. *Allium sativum* L.

I.1 Utilisation historique

Il existe des traces d'utilisation de l'ail par l'Homme datant d'il y a plus de 5000 ans [Rivlin, 2001] bien que la divergence des espèces du genre *Allium* soit estimée à environ 30 millions d'années [Timetree website]. Depuis que nous en avons les traces, les bienfaits de l'ail ont été observés et exploités. Les bâtisseurs de pyramides en donnaient à leurs esclaves pour promouvoir leur vigueur. Associé à la guerre lors de la Grèce antique, les soldats en consommaient avant les batailles et les athlètes avant les compétitions. L'ail est également cité dans le corpus hippocratique et on lui confère des vertus pour les fonctions pulmonaires et urinaires.

Depuis les travaux de Pasteur en 1858 et jusqu'à la découverte des antibiotiques, l'extrait d'ail a été utilisé pour traiter de nombreuses maladies mortelles comme le typhus, le choléra, la diphtérie ou encore la tuberculose. Des études plus récentes sur les composants moléculaires de ces extraits ont décrit un florilège de molécules et leurs effets ont été étudiés contre des agents pathogènes fongiques, bactéries et viraux [Lanzotti et al, 2013]. Une vingtaine de composés organo-sulfurés aux propriétés antimicrobiennes ont été découverts depuis avec en tête l'allicine. L'activité inhibitrice de cette molécule a depuis été démontrée contre 18 espèces fongiques (*Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*...) [Tariq & Magee, 1990 ; Curtis et al, 2004], 24 espèces bactériennes (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*...), 6 parasites (*Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Leptomonas colosoma*) et 6 virus (Herpes simplex virus, Parainfluenza virus, Rhinovirus...).

L'ail a également été consommé depuis longtemps comme condiment mais aussi comme conservateur, par exemple associé à de la viande crue en Asie il y a près de 4000 ans [Rivlin, 2001]. Preuve de son importance dans la culture chinoise, en mandarin traditionnel, le mot ail n'est formé que d'un seul symbole (蒜 ; prononcer [suàn]) et signifie littéralement « acide » [Fenwick et al, 1985]. L'ail s'est rapidement étendu au reste du monde et est apparu dans les plats de l'Égypte antique, du bassin méditerranéen et du reste de l'Europe à partir du Moyen-Âge. L'ail semble être arrivé en Amérique avec les colons français et espagnols même si un bulbe proche poussait déjà sur place et était utilisé par les natifs américains dans leur thé. De nos jours, l'ail est encore très utilisé dans la cuisine de tous les pays du monde et ne manque pas d'inspirer la gastronomie moderne dans des préparations sucrées ou de la cuisine moléculaire [This, 2006 ; Ail Rose de Lautrec Label Rouge IGP website].

I.2 L'ail comme médicament à l'époque moderne

Le XXIème siècle a vu l'avènement des médecines non-conventionnelles/douces/alternatives très souvent en provenance de l'Asie Orientale qui prônent en partie les soins par les plantes [Coulter & Willis, 2004]. L'ail n'est pas écarté, au contraire, ses vertus observées au cours de l'histoire ont fait l'objet de nombreux projets de recherche attestant de son efficacité contre certains organismes pathogènes et pathologies physiologiques [Ankri & Mirelman, 1999 ; Borlinghaus et al, 2014 ; Krishnaswamy, 2015]. Lorsque l'on cherche le mot clé « garlic » avec le moteur de recherche Google on obtient les résultats tels que : « 11 Proven Health Benefits of

Garlic - Healthline », « Garlic - Wikipedia », « Garlic : Proven health benefits and uses – Medical News Today » et « Les bienfaits de l'ail – The benefits of garlic - HelenaMyBeauty ». De plus, la première recherche associée à « Garlic » est « Garlic health benefits ». Ces résultats montrent bien que dans la société actuelle, l'ail est, plus que tout autre aliment, passé du côté des alicaments [Passeport Santé website].

1.3 Description anatomique

L'ail cultivé ou ail commun (*Allium sativum*) est une plante vivace herbacée monocotylédone pouvant atteindre 150 cm de hauteur et originaire d'Asie centrale, d'une région entre l'Oural et la Chine actuelle.

La partie consommée est la tête composée de gousses sessiles (de 10 à 20 en moyenne en fonction des variétés) disposées en couronne(s) autour d'une hampe florale (pour les variétés dites « à bâton »). Chaque gousse, formée d'une gaine foliaire charnue et d'un bourgeon central, est protégée par une tunique. Cet ensemble de gousses est relié par un plateau racinaire liégeux. La tête est enveloppée par des feuilles dont le nombre et la sénescence augmente avec la croissance de la plante. Tandis que les variétés sans hampe florale ont perdu leur capacité à produire des graines, les autres développent une inflorescence composée de fleurs et de bulbilles pouvant atteindre 2,5 cm de diamètre (Figure 1.1) [Tela Botanica website ; PROTA4U website].

HARDNECK GARLIC

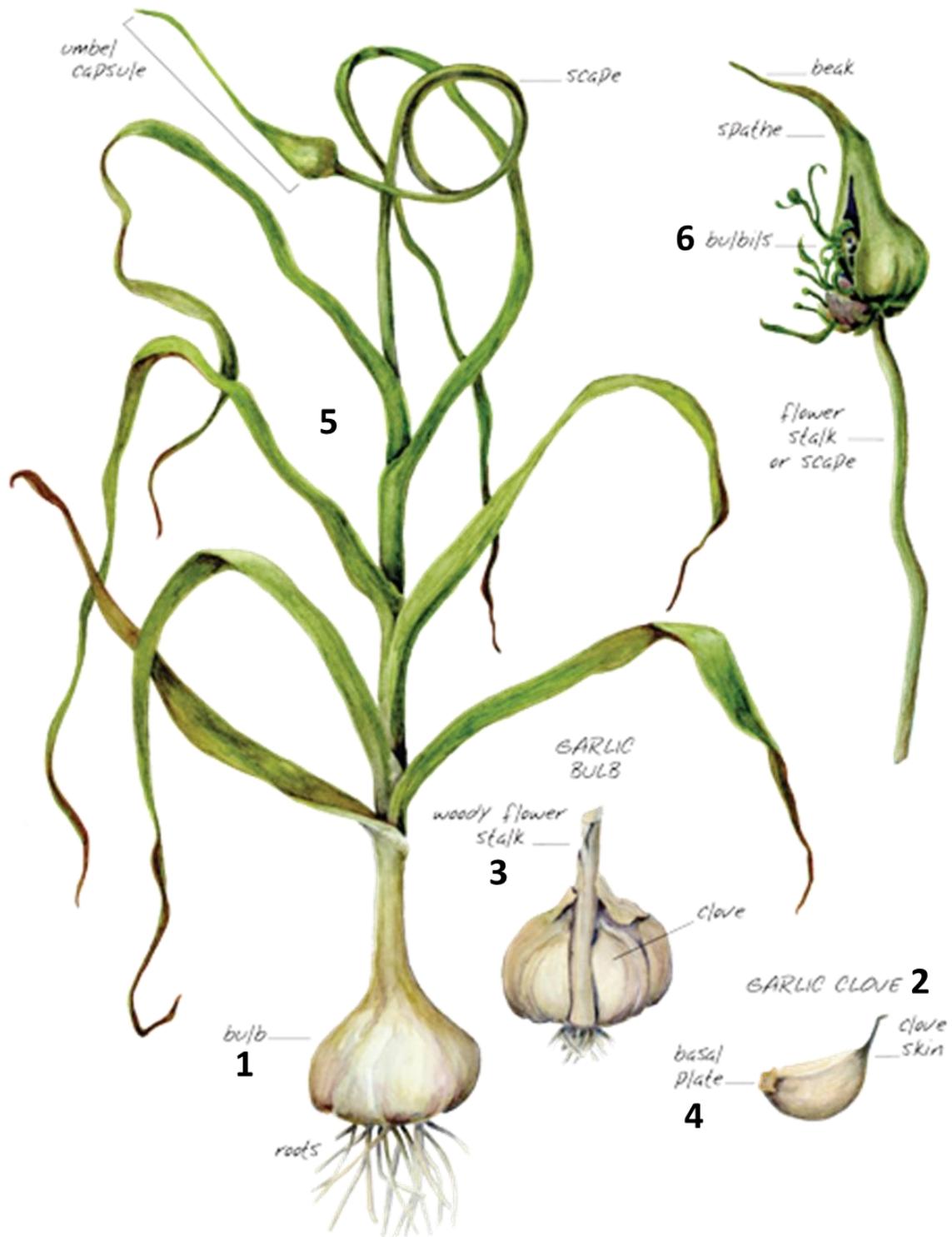


Figure 1.1 Dessin d'un plant d'ail et de son bulbe [UAF website].

1 Bulbe ou caïeu. **2** Gousse d'ail. **3** Hampe florale caractéristique des variétés à bâton. **4** Plateau racinaire liégeux. **5** Tige avec feuilles. **6** Bulbilles.

II. La culture de l'ail

II.1 L'ail en France

La France compte actuellement 31 variétés d'ail au catalogue des plants certifiés (des variétés d'ail rose de printemps ou d'hiver, des variétés d'ail violet d'automne plus ou moins précoces et des variétés d'ail blanc d'automne). Les variétés se différencient par leur date de plantation (de Septembre à Mars), leur origine géographique, leur couleur, la présence de hampe florale et leur durée de dormance. Dans la pratique, seule une dizaine de variétés avec un meilleur rendement sont cultivées, les autres sont utilisées en cas d'imprévu climatique et/ou économique nécessitant une plantation plus précoce ou plus tardive. L'ensemble de ces variétés ont été obtenues à partir de variétés foraines (variétés cultivées jadis puis délaissées avec le temps, elles possèdent une plus grande diversité génétique et n'ont jamais été certifiées) au sein d'organismes et instituts comme INRAE, TOP Semence ou le CTIFL [Prosemail website].

La grande majorité de la production française est regroupée en deux bassins : un bassin dans le Sud-Est de la France (Drôme) et un bassin dans le Sud-Ouest (Gers, Haute-Garonne, Tarn, Tarn-et-Garonne). En 2019, le bassin Sud-Ouest représentait 1842 hectares et le bassin Sud-Est 526 pour une quantité globale de 20 000 tonnes [RNM, 2020]. Malgré cette différence de surface, la Drôme produit 70% des semences utilisées en France, toutes régions confondues. Les deux bassins produisent des aulx blancs, roses et violets mais les variétés peuvent différer.

Classiquement, la culture de l'ail s'effectue sur 6 générations. Une partie de la première génération est sauvegardée tous les ans pour conserver une lignée pure génétiquement et donc garantir les traits variétaux (robustesse, production, qualités organoleptiques...). De la deuxième à la cinquième génération, les plants sont utilisés pour produire des semences (conservées par les agriculteurs multiplicateurs ou vendues à d'autres) et augmenter ainsi la production. La sixième génération est celle qui est vendue en tant qu'ail de consommation sur les marchés ou en grande surface.

II.2 La profession française de l'ail

De nombreux acteurs se regroupent derrière le terme « filière française de l'ail ». Dans le bassin Sud-Ouest, la coopérative Alinéa regroupe les producteurs, centralise les produits et met à disposition des équipements pour le séchage et le stockage des bulbes. Sa filiale, Top'Alliance, gère la partie commercialisation auprès de la grande distribution, des grossistes et de la restauration. Le syndicat de l'Ail Rose de Lautrec travaille étroitement avec Top'Alliance Alinéa, notamment sur la qualité des produits (Label Rouge) et la recherche face aux agents pathogènes.

Dans le bassin Sud-Est, la majorité des producteurs de semences sont regroupés sous l'association Prosemail. Créée dans les années 70 pour coordonner la production de plants certifiés d'ail et d'échalote avec INRAE, elle effectue maintenant des actions techniques sur le terrain et des actions promotionnelles auprès des agriculteurs et jardiniers amateurs. La gestion des financements est confiée au GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants). Les deux missions principales du GNIS sont de donner l'accès aux agriculteurs et jardiniers à des semences de qualité et de service public pour apporter des garanties sur la

qualité des semences et plants. En parallèle de Prosemail, l'APAD (Association des Producteurs d'Ail de la Drôme) regroupe plusieurs adhérents dont le GIE de l'ail drômois (organisation de producteurs qui concentre et distribue les aulx produits dans la Drôme) ou Allicop (union de sociétés coopératives agricoles).

Au niveau international, l'ANIAIL (Association Nationale Interprofessionnelle de l'AIL) a pour but de réglementer les importations d'ail provenant de l'étranger et d'harmoniser les prix de vente avec les concurrents européens. Au niveau national, son rôle est de fédérer la filière autour de projets stratégiques communs. Elle représente également la filière ail auprès des pouvoirs publics et promeut l'ail français sur le marché français.

11.3 Itinéraire de culture

Chaque année, la plantation s'effectue à deux périodes : d'octobre à décembre pour les aulx blancs et violets d'automne et de novembre à mars pour les aulx de printemps (principalement de l'ail rose) (Figure 1.2). La date de plantation varie principalement en fonction des conditions climatiques, la mise en terre nécessitant un sol sec, et des variétés plus ou moins précoces [Prosemail website].

La plantation est entièrement automatisée à l'aide de planteuses à guidage GPS. Pendant tout le cycle de développement des aulx, un soin tout particulier est apporté à ne pas blesser les caïeux : hauteurs de chute réduites au maximum, matériaux mous et amortissant, tri à la main (critère indispensable à la validité du Label Rouge « Ail Rose de Lautrec »). Lors de leur développement, les plants sont arrosés en cas de temps trop sec. Un désherbage mécanique ou chimique est systématiquement effectué. Lors de la mise en réserve, certaines variétés dites à « bâton » subissent le despouillage, c'est-à-dire la coupe de la hampe florale afin d'augmenter le poids final des têtes [Ricard, 2017]. La récolte s'effectue de mi-juin à début août à l'aide de machines agricoles. Les plants sont automatiquement sortis du sol, équeutés et placés dans des palox en bois. C'est dans ces mêmes palox que les aulx sont séchés dans des tours de séchage avec de l'air chaud provenant de l'extérieur. Le séchage doit s'effectuer immédiatement après la récolte et sa durée est de minimum 20 jours et pouvant aller jusqu'à un mois. Par manque de moyen, les fanes sont laissées au champ et sont enterrées pour servir d'engrais naturel. Anciennement brûlées à même la parcelle, les normes européennes ont interdit cette pratique au début des années 2000 (Figure 1.3).

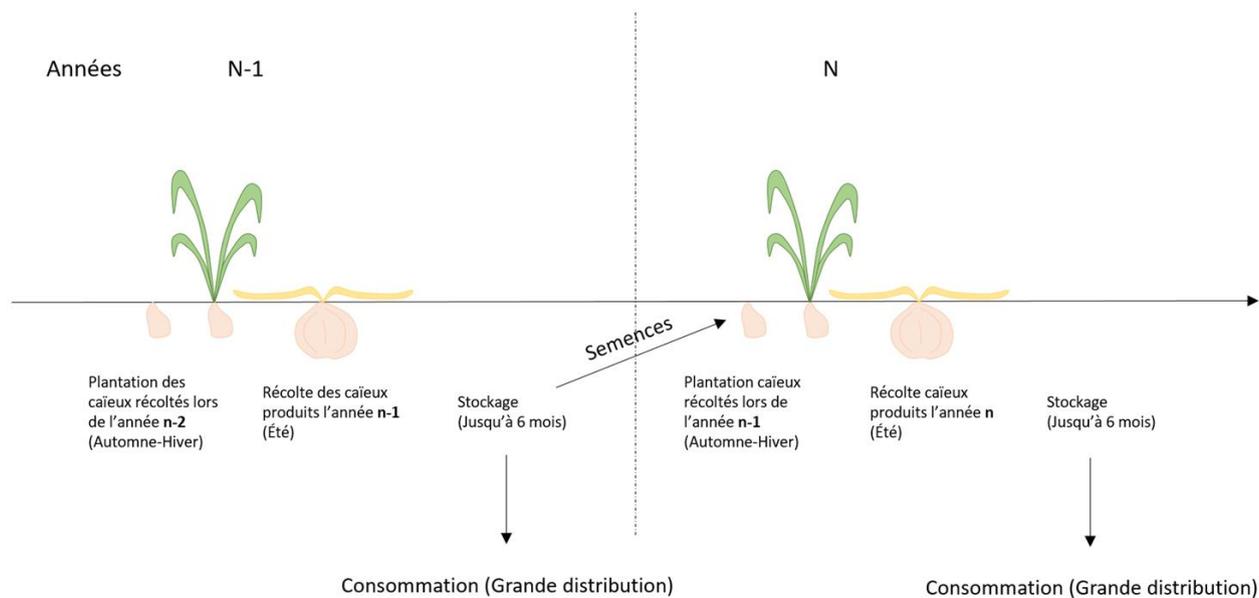


Figure 1.2 Schéma de l'itinéraire de culture d'ail semence et de consommation sur deux années consécutives.



Figure 1.3 Photographies illustrant les différentes étapes de récolte au séchage des bulbes.

A Guidé par GPS, le tracteur récolteur passe entre les lignes de plants, deux doigts en métal (pointe de flèche blanche) placés à quelques centimètres au-dessus du sol se coincent au niveau de la « tige » et arrachent les plants. **B** Bulbe d’ail rose coupé transversalement, on peut observer les deux couronnes de caïeux ainsi que le vestige de la hampe florale au milieu. **C** Les plants sont ensuite acheminés par des systèmes de courroies (pointe de flèche jaune), équeutés et les bulbes tombent dans les palox en bois (pointe de flèche blanche). Les fanes tombent au sol. **D** Dans un hangar, tours de séchages constituées de palox déposés les uns sur les autres et ventilés par l’air chaud extérieur acheminé par les gros tuyaux visibles en arrière-plan. L’air circule grâce à des systèmes de ventilation et des grilles entre les palox (non-visibles sur cette image).

II.4 Des labels de qualité pour faire face aux maladies et à la concurrence

Le cahier des charges est rédigé par les producteurs selon des conditions de production strictes édictées par l'Etat et soumises à des contrôles réguliers [INAO website]. L'obtention d'un plant d'ail certifié de semences est le fruit de 6 étapes (F0 à F6) correspondant à 6 années de production (Figure 1.4). Chaque génération étant un clone de la précédente, une attention particulière est portée sur l'absence d'agent pathogène et sur la pureté variétale (99% minimum). Ainsi, le matériel de départ est régénéré *in vitro* à partir de cellules méristématiques afin d'éliminer toute présence de virus OYDV (Onion Yellow Dwarf Virus) et LYSV (Leek Yellow Stripe Virus). Une partie des plants en F1 sont destinés à servir de matériel de départ F0 chaque année. Selon le GNIS, le coût d'inscription d'une variété va de 500€ pour les variétés anciennes à 10.000€ pour les variétés agricoles récentes des sélectionneurs, en fonction de l'importance des tests demandés par l'État [GNIS website].

A chaque étape, les plants contaminés (lignée entière pour F1 et F2) sont éliminés. Plusieurs contrôles visuels sont également effectués afin de permettre la certification en F6. A cette étape on doit avoir, après épuration, moins d'1% de plants virosés, moins d'1% de plants atteints par la pourriture blanche (*Sclerotium cepivorum*) et une absence totale de plants atteints par l'anguillule des céréales et des bulbes (le nématode *Ditylenchus dipsaci*). Pour des raisons économiques, les caïeux des lignées F3 à F5 sont séparés et vendus comme semence auprès des agriculteurs producteurs tandis que les têtes des lignées F6 sont vendues en majorité aux grandes surfaces ou sur les marchés pour la consommation.

A ces contrôles s'ajoutent un grand nombre de règles de culture telles que l'interdiction de planter deux espèces du genre *Allium* sur la même parcelle à moins de 5 ans d'intervalle par exemple, toujours dans le but de limiter la prolifération d'organismes pathogènes. Dans la Drôme et le quart Sud-Ouest, les rotations de culture sont souvent effectuées avec du blé, du maïs, du tournesol et du colza.

De tous les pays du monde où il est cultivé, c'est en France que l'ail détient le plus de labels de qualité. On dénombre 4 IGP (Indication Géographique Protégée), 1 AOP (Appellation d'Origine Protégée) et 1 Label Rouge pour l'Ail Rose de Lautrec. Ces signes de qualité, plus exigeants que les normes européennes en vigueur, témoignent d'une culture contrôlée, issue d'un savoir-faire local strictement réglementé. C'est grâce à ces labels de qualité que la filière française arrive à s'imposer sur le marché européen et mondial en proposant des produits de haute qualité vendus plus chers que ceux de ces principaux concurrents commerciaux comme l'Espagne et la Chine.

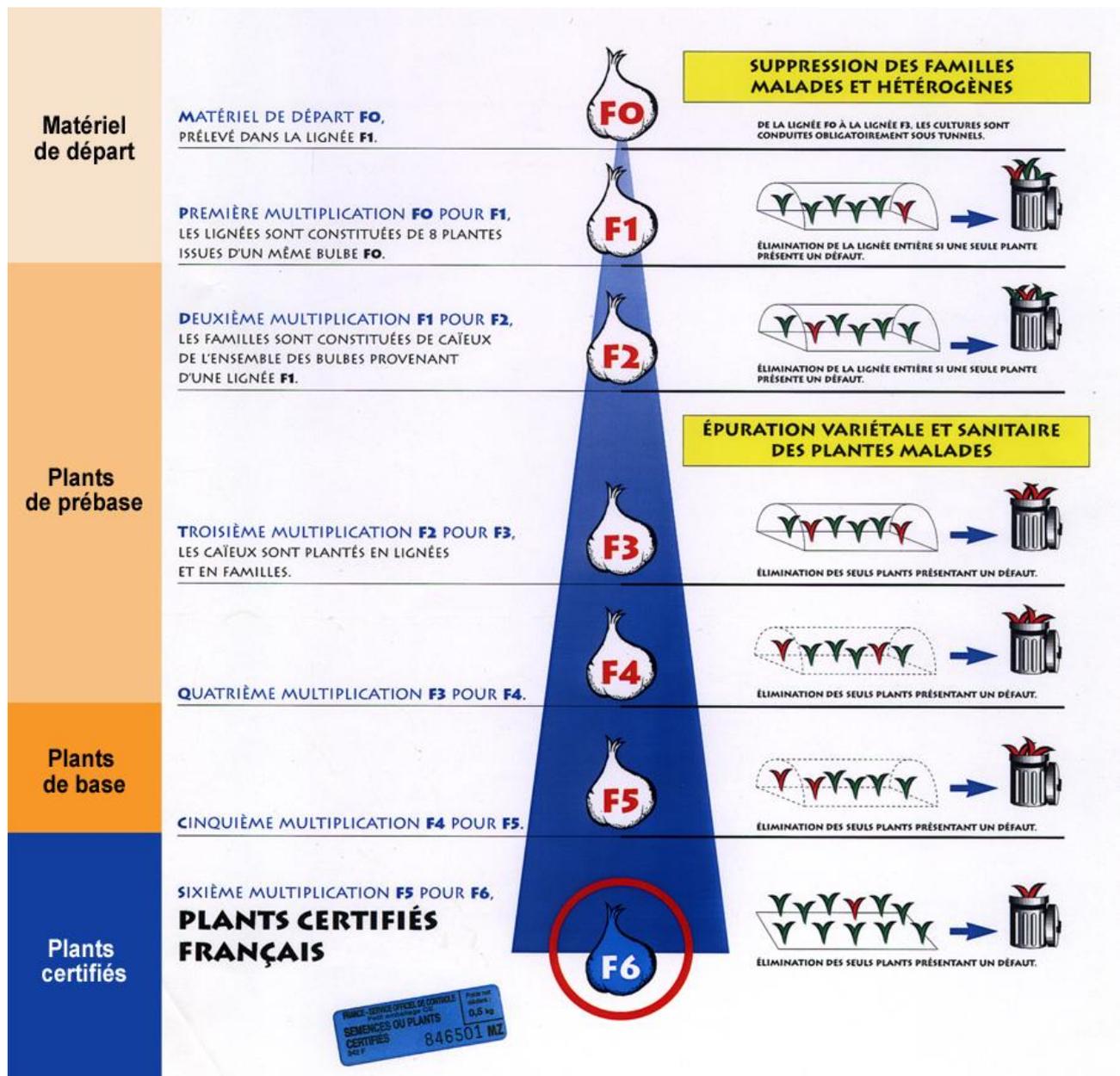


Figure 1.4 Etapes de l'obtention d'un plant certifié en 6 générations successives [Prosemail website].

II.5 Production mondiale

Depuis les années 2000, l'ail a pris de plus en plus d'importance dans la production agricole. En effet, de 2000 à 2018 la production mondiale d'ail (de semence et de consommation confondus) a été multipliée par 2,5 passant de 11 millions à 28,5 millions de tonnes (Figure 1.5). Tandis que sur la même durée, par exemple, les productions de blé, pommes et tomates n'ont augmenté respectivement que d'un facteur 1,3, 1,4 et 1,66 [FAO website].

Cette augmentation est fortement corrélée avec l'évolution de la production chinoise qui est passée de 7,5 millions à 21 millions de tonnes produites sur la même durée. Ce qui fait de la Chine le premier producteur mondial avec 75% de la quantité totale.

De 2000 à 2017, 1,5 millions de tonnes d'ail ont circulé dans le monde dont 1,3 millions de tonnes en provenance de la Chine. Cependant, la France reste indépendante vis-à-vis de ses semences et importe une quantité négligeable de caïeux en provenance de l'étranger.

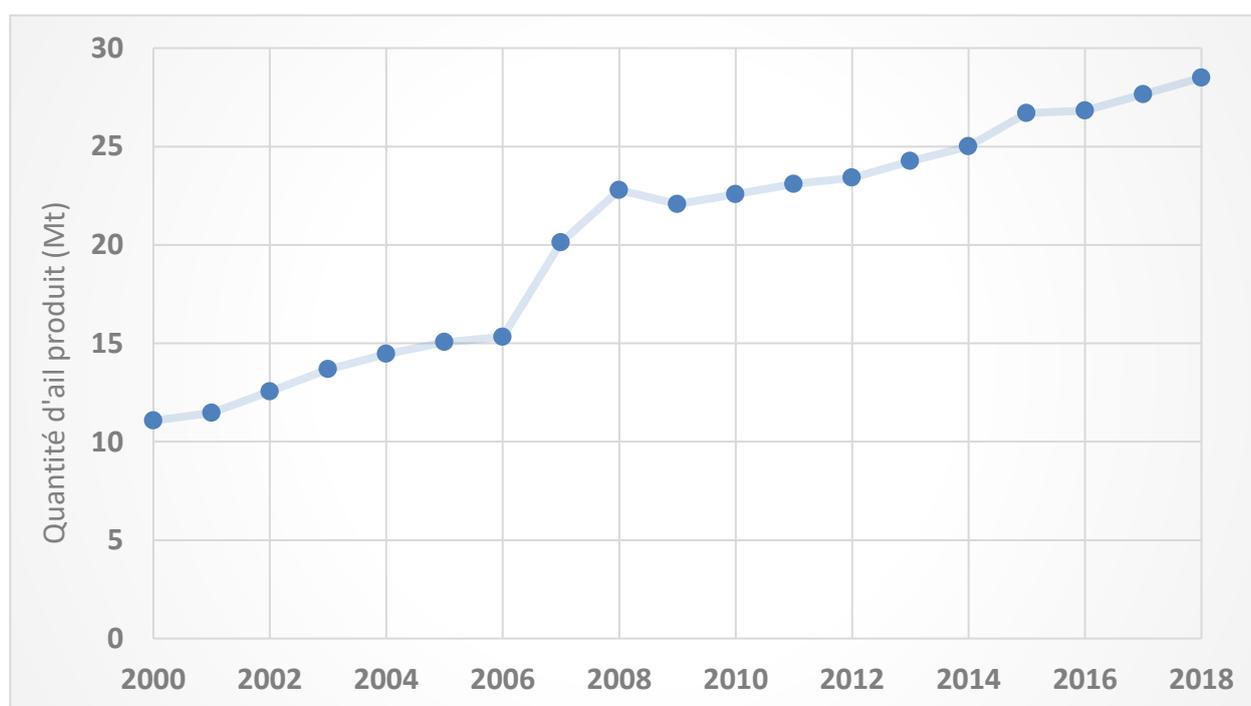


Figure 1.5 Production mondiale d'ail de 2000 à 2018.

III. Une maladie émergente

III.1 Confusion de plusieurs symptômes

Depuis le début des années 2000, les producteurs français constatent de plus en plus de symptômes sur les têtes d'ail alors qu'au champ, les plants avaient l'air sain. A première vue, ces symptômes semblent être majoritaires sur ail rose et ressemblent au « waxy-breakdown » (Figure 1.6) : une maladie qui entraîne un ramollissement des gousses qui deviennent collantes, cireuses (d'où le nom de « waxy ») et prennent une couleur translucide orangée ainsi qu'une forte odeur désagréable. Le waxy-breakdown est peu étudié et de ce fait encore mal connu, mais il aurait une origine physiologique [Jenderek & Hannan, 2003 ; Schwartz & Krishna Mohan, 2016]. Cependant, les nouveaux cas présentent plutôt une coloration brune au niveau des gousses et du plateau racinaire, des têtes qui s'effondrent sur elles-mêmes, une forte odeur d'ail en décomposition (Figure 1.6). Le développement d'un mycélium blanc/rose au niveau des blessures ou des racines peut être observé au bout de 3-4 semaines de stockage (Figure 1.7). La confusion entre les deux maladies a été entretenue pendant plusieurs années pour différentes raisons. D'abord, l'extérieur des bulbes non épluchés ne permet pas de faire la différence. Ensuite, seul un nez habitué saura reconnaître l'odeur d'un bulbe atteint de waxy d'un bulbe atteint d'autre chose. Enfin, il est possible que certaines gousses présentant des symptômes de type waxy-breakdown aient été infectés par la suite par un champignon opportuniste.

III.2 Pertes économiques

Le ramollissement des gousses, la dégradation partielle des têtes et la forte odeur qui s'en dégage ne sont évidemment pas compatibles avec la commercialisation des aulx et obligent les producteurs à jeter une partie de leur production. Une seule gousse contaminée entraîne la non-conformité et donc la destruction du bulbe entier. D'abord négligeables, les pertes ne cessent d'augmenter jusqu'en 2017 où elles atteignent jusqu'à 90% en fonction des exploitations et des variétés. Commercialement, l'ail rose est le plus touché et plusieurs agriculteurs cessent la production de ces variétés. L'apparition soudaine et les pertes importantes engendrées par cette maladie ont généré des tensions au sein de la filière : les producteurs d'ail de consommation accusant les producteurs de semence de leur avoir vendu des gousses contaminées et les producteurs de semence accusant l'Espagne et la Chine d'avoir exporté cette maladie.

III.3 Vers la description d'un nouvel agent pathogène

Dès le 19^{ème} siècle, de nombreux rapports sont faits sur les nématodes [Moore, 1946] ou sur les virus à mosaïque [Ahlawat, 1974] vis-à-vis des maladies de l'ail, mais rien n'a été décrit en ce qui concerne des symptômes similaires à ceux actuellement observés. Ce n'est qu'en 1986 qu'une équipe japonaise s'intéresse à 3 souches isolées de lésions sur gousses d'ail identifiées comme appartenant à l'espèce *F. oxysporum* f. sp. *allii*. Les souches montrent bien une spécificité et une agressivité importante sur *Allium sativum* et moindre sur d'autres espèces du genre [Matuo et al, 1986]. C'est la première preuve de pourriture de l'ail engendrée par un microorganisme du genre *Fusarium*.

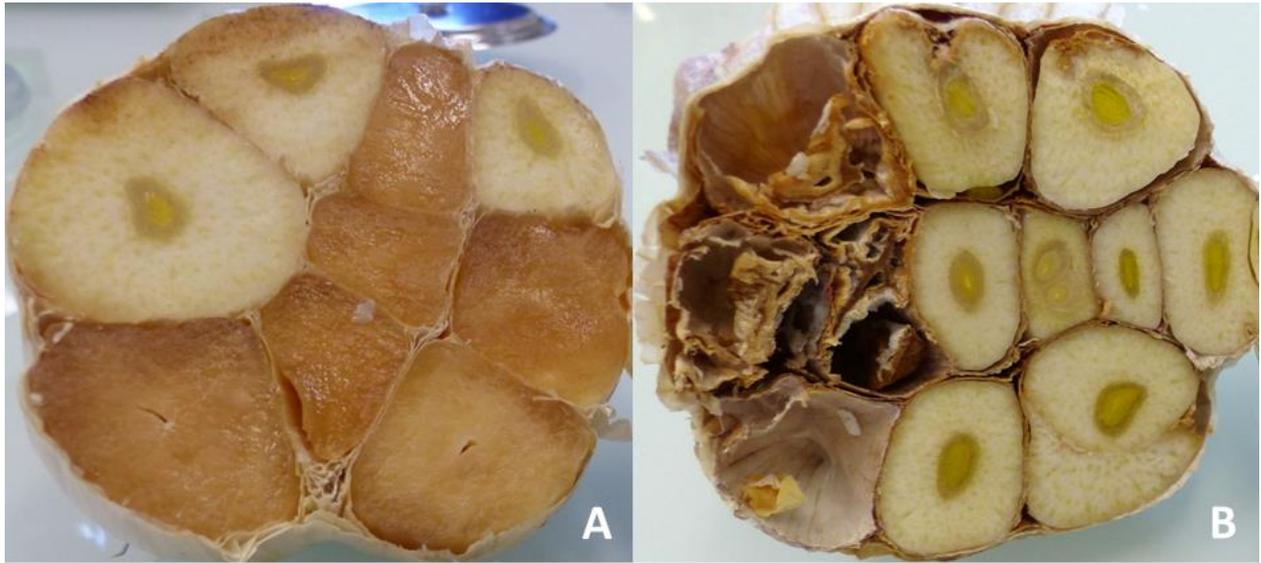


Figure 1.6 Gousses d'ail atteintes de symptômes de type waxy-breakdown (A) et gousses décomposées et effondrées sur elles-mêmes (B).

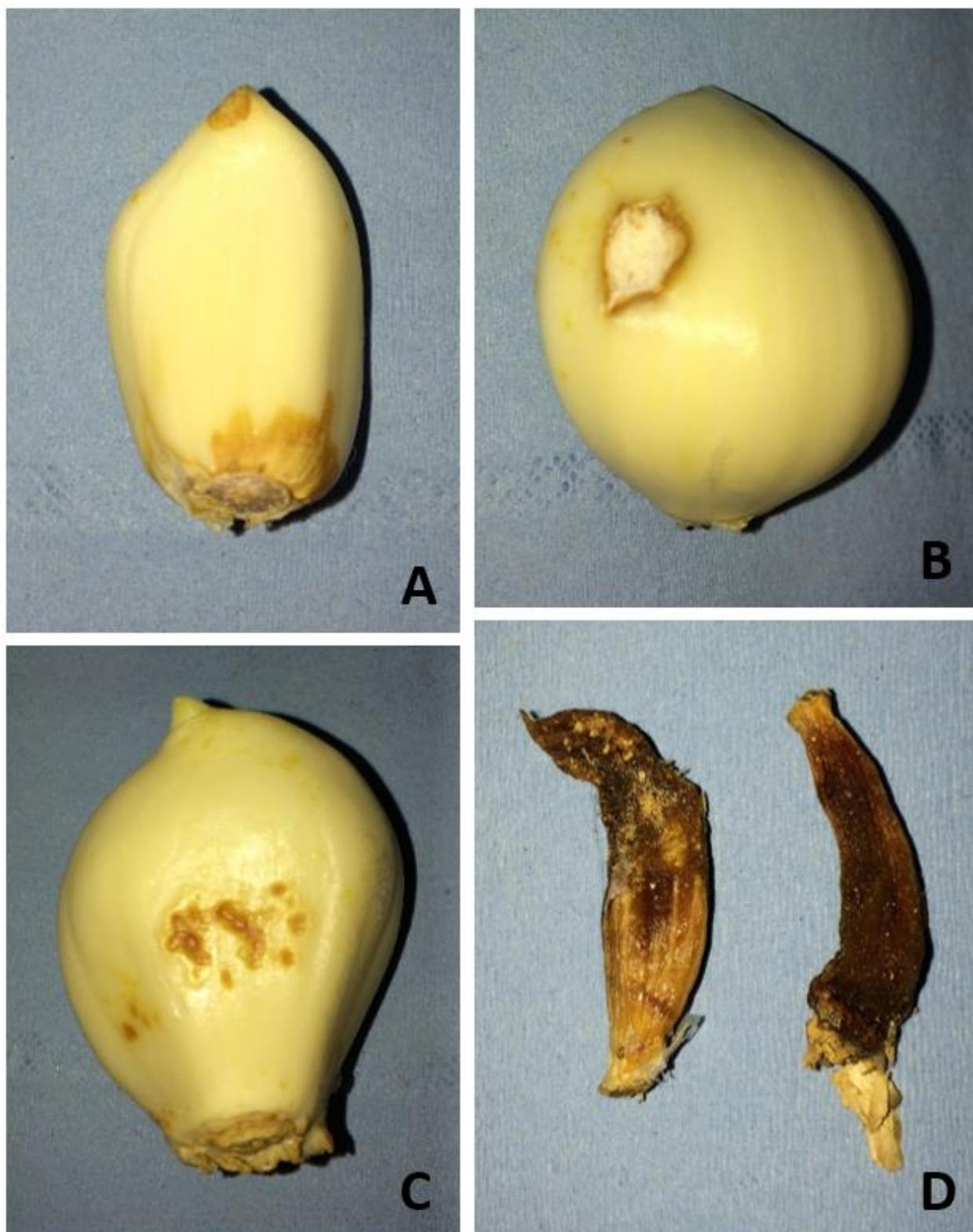


Figure 1.7 Différents types de symptômes observés sur gousses après 3-4 semaines de stockage.

A Nécrose des tissus partant du plateau et de la zone apicale. **B** Surinfection d'une blessure causée par un choc, mycélium blanc visible. **C** Surinfection de galeries creusées par des acariens. **D** Gousses entièrement dégradées.

Depuis une quinzaine d'années, la dénomination *F. oxysporum* f. sp. *allii* a complètement disparu. Les publications plus récentes indiquent *F. oxysporum* f. sp. *cepae* comme agent pathogène de l'ail sans que les postulats de Koch n'aient jamais vraiment été démontrés. En parallèle de cette nomenclature en « forme spéciale » problématique [Šišić et al, 2018], un florilège de « First reports » sont apparus et portent tous sur un nouveau champignon pathogène émergent de l'ail : *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, forme sexuée *Gibberella intermedia*, identifié pour la première fois en 1976 [Bacon & Nelson, 1994]. La recherche « *Fusarium proliferatum* garlic » effectuée avec l'algorithme de Google Scholar délivre 33 résultats sur la période pré-2000 et 1140 sur la période post-2000.

IV. *Fusarium* sur ail ?

Au total, 7 espèces du genre *Fusarium* ont été détectées au sein de gousses présentant des symptômes tels que décrits précédemment : *F. acuminatum* [Ignjatov et al, 2017], *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani* et *F. tricinctum* (Tableau 1.1). Les observations de ces symptômes sont corrélées avec plusieurs autres à la même période et dans plusieurs pays à travers le monde : Amérique du Nord [Dugan, 2003], Espagne [Palmero, 2010], Inde [Sankar et Babu, 2011] etc. (Tableau 1.1).

IV.1 Le genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* est un vaste taxon, regroupant 386 espèces [Catalogue of Life website], appartenant à la division des champignons ascomycètes. Le nom « *Fusarium* » provient de la forme de ses macrospores ressemblant à des fuseaux (*fusus* en latin). Lorsqu'ils sont connus, les téléomorphes des espèces du genre *Fusarium* appartiennent au genre *Gibberella*. La majorité des souches ont été décrites comme hétérothalliques [Hornok et al. 2007] à l'exception de *F. graminearum*.

Le genre *Fusarium* est le groupe phytopathogène qui a le plus large spectre d'hôte. On considère que plus de 80% des espèces végétales peuvent être infectés par des individus du genre *Fusarium* [Leslie & Xu, 2010]. Certaines maladies sont largement étudiées : FHB (*Fusarium* Head Blight du blé) [Snijders, 1990 ; Bushnell et al, 2003 ; Osborne & Stein, 2007] or maize ear rot [Logrieco et al, 2002 ; Munkvold, 2003 ; Duan et al, 2016].

Les espèces du genre *Fusarium* produisent différents types de spores à des fréquences variables constituant ainsi un bon outil de caractérisation [Leslie & Summerell, 2006]. La production de spores peut se faire de manière sexuée ou asexuée. De manière asexuée, des microconidies et des macroconidies sont produites en grande quantité, variable selon les espèces. Par exemple, l'espèce *F. oxysporum* ne semble se reproduire que de manière asexuée. Les individus de l'espèce *F. proliferatum* produisent parfois des microconidies au bout de fausses têtes en mono- ou polyphialides. La reproduction sexuée permet le développement d'ascospores. En cas de conditions défavorables au développement des individus, des chlamydospores, plus résistantes aux conditions environnementales sont produites par plusieurs espèces du genre (*F. oxysporum* par exemple) [Figure 1.8].

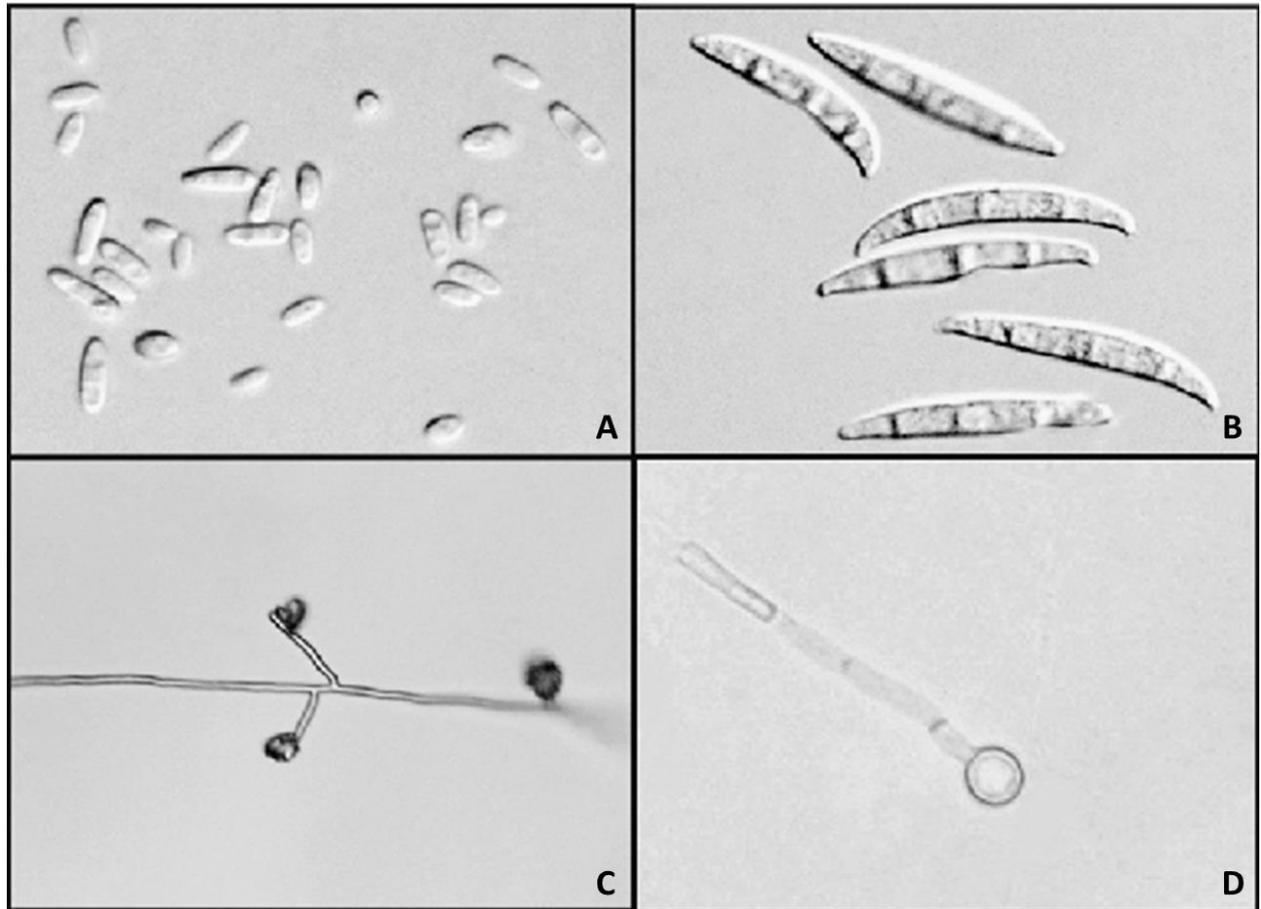


Figure 1.8 Les différents types de spores produites par *Fusarium oxysporum* [Fourie et al, 2011].

A Microconidies. **B** Macroconidies en fuseau. **C** Microconidies au bout de « fausses-têtes » en polyphialides. **D** Chlamydospore.

Tableau 1.1 Données bibliographiques recueillies sur les 7 espèces du genre *Fusarium* isolées d'ail.

Espèce	Présence sur ail	Gamme d'hôte	Mode de vie ⁵		Cycle de développement	Méthodes de lutte	Références
			Sexué	Asexué			
<i>F. acuminatum</i>	Serbie, 2017 ¹	Céréales : Présent de manière sporadique ² . Maïs : En association avec d'autres agents pathogènes ³ . Pois : Présent ⁴ .	Téléomorphe : <i>Gibberella acuminata</i> .	Microconidies et macroconidies produites en grande quantité.	Espèce peu étudiée, très souvent retrouvée en co-infection ⁶ .	Pas de données	¹ [Ignjatov et al, 2017] ² [Logrieco et al, 2003] ³ [Mao et al, 2007] ⁴ [Safarieskandari et al, 2020] ⁵ [Leslie & Summerell, 2006] ⁶ [Booth, 1971]
<i>F. culmorum</i>	USA, 1976 ⁷	Blé (un des agent principaux du <i>Fusarium</i> Head Blight) ⁸ .	Téléomorphe : Inconnu, des spores issues de la reproduction sexuée n'ont jamais été observées.	Production de conidies et de chlamydoconidies en abondance.	L'infection débute lorsque des spores entre en contact avec les épis. La pénétration dépend en majorité de facteurs environnementaux comme la température ou l'humidité. Des conidies sont produites sur les grains et sont dispersées par le vent ou la pluie. Les voies de colonisation de l'hôte ne sont pas encore élucidées ⁵ .	Chimique : l'utilisation d'antifongiques est efficace (jusqu'à 90% de réduction d'incidence de la maladie) mais difficile à mettre en place. Biocontrôle : encore au stade de recherche mais quelques résultats prometteurs (60% de réduction d'incidence de la maladie) avec <i>Phoma betae</i> . Itinéraire de culture : rotation avec du maïs permet de réduire la population de <i>F. culmorum</i> . Sélection de cultivars résistants : des cultivars ont permis de réduire la concentration en DON (Deoxynivalenol) dans les grains ⁵ .	⁷ [Schwartz & Krishna Mohan, 2016] ⁸ [Wagacha & Muthomi, 2007]
<i>F. oxysporum</i>	Isolé d'ail sans que le postulat de KOCH n'ait été réalisé ⁹ . Confondu avec <i>F. proliferatum</i> sous le nom de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>garlic</i> .	Très étudié, on recense plus de 100 formes spéciales ¹⁰ .	Téléomorph : associé au genre <i>Gibberella</i> mais pas d'espèce connue.	Production de micro et macroconidies ainsi que de chlamydoconidies en abondance qui servent de forme de résistance au sein des tissus.	La pénétration se fait par les hyphes au travers de l'épiderme. Agent pathogène majoritairement vasculaire, chez certaines formes spéciales, les racines et les bulbes peuvent également être touchés ⁵ .	La méthode la plus efficace semble être l'utilisation de variétés résistantes ou la stérilisation des sols quand cela est possible ⁵ .	⁹ [Brayford, 1996] ¹⁰ [Edel-Hermann & Lecomte, 2019]

<i>F. proliferatum</i>	Espèce la plus retrouvée : - Etats-Unis, 2003 ¹¹ - Serbie, 2007 ¹² - Espagne, 2010 ¹³ - Inde, 2011 ¹⁴ - Italie, 2012 ¹⁵ - Mexique, 2012 ¹⁶ - Egypte, 2013 ¹⁷	Très polyphage : - Maïs ¹⁸ - Blé ¹⁹ - Soja ²⁰ - Sorgho ²¹ - <i>Aloe Vera</i> ²² - Tomate ²³	Téléomorphe : <i>Gibberella intermedia</i> .	Production de nombreuses micro- et macroconidies. Aucune preuve de production de chlamydo-spores à ce jour.	Il n'y a actuellement aucune information sur le cycle de développement de <i>F. proliferatum</i> sur ail. Les recherches actuelles portent sur la présence de l'agent pathogène ou sur sa capacité à produire des toxines ²⁴ . Les seules informations proviennent des producteurs : une absence totale de symptôme à la récolte et des pertes importantes lors du stockage. L'inoculum pourrait provenir du sol, de l'air et/ou de l'eau. Sorgho : Les hyphes pénètrent rapidement au travers des racines, colonisent l'endoderme et envahissent la plante via le système vasculaire ²⁵ .	Aucune méthode de lutte efficace n'a été développée à ce jour mais de nombreuses recherches sont en cours comme l'utilisation de tebuconazole ²⁶ ou d'antioxydants ²⁷ .	¹¹ [Dugan et al, 2003] ¹² [Stankovic et al, 2007] ¹³ [Palmero et al, 2010] ¹⁴ [Sankar & Babu, 2012] ¹⁵ [Tonti et al, 2012] ¹⁶ [Ochoa-Fuentes et al, 2012] ¹⁷ [Moharam et al, 2013] ¹⁸ [Bacon, 1994] ¹⁹ [Desjardins & Proctor, 2007] ²⁰ [Chang et al, 2014] ²¹ [Leslie et al, 1990] ²² [Avasthi et al, 2018] ²³ [Gao et al, 2016] ²⁴ [Gálvez et al, 2017] ²⁵ [Ndambi et al, 2012] ²⁶ [Marín et al, 2013] ²⁷ [Torres et al, 2003]
<i>F. trincinctum</i>	Serbie, 2016 ²⁸	La pathogénicité de cette espèce est très peu documentée car elle est vue comme saprophyte ou faible opportuniste.	Aucun téléomorphe connu à ce jour.	Production de micro- et macroconidies ainsi que de chlamydo-spores.	Pas de données.	La recherche de méthode de lutte a pour but de limiter la présence de toxines dans les produits alimentaires. De la solarisation des sols avec ajout de composte a été testé sur cultures d'oignons ²⁹ .	²⁸ [Ignjatov et al, 2016] ²⁹ [Carriero et al, 2013]
<i>F. solani</i>	Egypte, 2013 ¹⁷	C'est l'une des rares espèces de <i>Fusarium</i> couramment retrouvée dans les climats tropicaux. Elle est capable d'infecter de très nombreux hôtes mais est relativement absente des plantes se développant dans les climats tempérés ⁵ .	Téléomorphe : <i>Nectria haematococca</i> . Des périthèces sont régulièrement observées sur le terrain.	Production de micro- et macroconidies ainsi que de chlamydo-spores.	Espèce tellurique. Les sources principales d'inoculum sont les semences ³⁰ . Cependant le cycle de développement n'a pas encore été élucidé.	Compétition avec <i>Trichoderma asperellum</i> et <i>Bacillus</i> spp. à l'étude ³¹ .	³⁰ [Secor & Gudmestad, 1999] ³¹ [Pastrana et al, 2016]
<i>F. verticillioides</i>	Pouvoir pathogène faible à inexistant ³²	Espèce connue comme ravageur du maïs et très étudiée dans ce contexte précis ⁵ .	Téléomorphe : <i>Gibberella moniliformis</i> .	Production de micro- et macroconidies mais absence de chlamydo-spores.	La pénétration de l'hôte se fait par les grains ou par des blessures au niveau des tiges. Les premiers symptômes apparaissent au niveau des épis de maïs et s'accroissent tout au long du développement des grains. <i>F. verticillioides</i> est également capable d'adopter un mode de vie endophyte dans le maïs ⁵ .	La méthode la plus employée pour lutter contre <i>F. verticillioides</i> est l'enrobage des grains avec des agents de biocontrôle tels que <i>Trichoderma harzianum</i> ³³ ou <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ³⁴ .	³² [Dugan et al, 2007] ³³ [Chandra Nayaka et al, 2010] ³⁴ [Pereira et al, 2009]

IV.2 Cycle de vie et voies de dissémination

Les nombreuses espèces du genre *Fusarium* présentent des similitudes dans leur cycle biologique (Figure 1.9). Bien qu'appartenant à un genre commun, elles peuvent également différer sur certains aspects, notamment en termes de dissémination.

IV.2.1 Mise en dormance

En Hiver, les températures basses et l'absence de plantes en croissance bloque le cycle de *Fusarium* et nécessite donc l'entrée dans une phase de dormance. Plusieurs stratégies sont employées par ces espèces fongiques pour survivre lors de cette période. *F. oxysporum* par exemple, est capable de maintenir un état de dormance sous forme de chlamydospores (spores rondes, sans cloison et à paroi épaissie) et/ou dans les débris végétaux en décomposition [Nelson, 1981]. Les chlamydospores permettent une résistance au froid mais également à la chaleur et à la dessiccation [Bennett, 2012].

Sur les résidus de blé infectés par *F. graminearum*, on retrouve de nombreuses apothécies (fruits de la reproduction sexuée du champignon (*Gibberella zeae*) au niveau de l'hôte) contenant des ascospores. Ces spores serviront de source d'inoculum au printemps, une fois les températures de nouveau favorables au développement de l'agent pathogène [Guenther & Trail, 2005].

IV.2.2 Levée de la dormance

La germination des spores de *Fusarium* est une étape critique dans le cycle de développement du champignon phytopathogène : elle ne se fait que lorsque les conditions environnementales (physico-chimiques et présence d'une source d'énergie (hôte compatible ou matière morte à décomposer)) sont réunies [Nelson, 1981]. Plusieurs facteurs internes et externes influencent la levée de la dormance.

Le facteur externe majeur influençant la germination des spores chez *Fusarium* est la présence d'exsudats racinaire, véritables signaux chimiques indiquant la présence proche d'hôtes et le renouveau de la croissance végétale. Par exemple, les sucres et acides organiques libérés par les plants de tomate dans le sol stimulent la germination des spores de *F. oxysporum* [Steinkellner et al, 2004]. D'autres facteurs externes entrent en jeu comme une activité de l'eau élevée ou une augmentation de la température à au moins 10°C pendant plusieurs heures [Beyer et al, 2004].

IV.2.3 Pénétration des tissus

La pénétration peut s'effectuer au niveau de blessures, d'ouvertures naturelles telles que les stomates ou directement au travers de l'épiderme sain via la sécrétion d'enzymes de dégradation [Knogge, 1996]. Chaque espèce de *Fusarium* a ses voies d'entrée préférentielles. Bien connus pour être des champignons telluriques, certaines espèces peuvent se disséminer et avoir un mode d'infection aérien [West, 2017]. De plus, les espèces pathogènes du genre ne développent pas de structures spécialisées d'infection type appressorium/haustorium [Kikot, 2009].

IV.2.4 Développement au sein de l'hôte

Chez certaines espèces (ex : *F. verticillioides*), après avoir pénétré les tissus racinaires, le champignon adopte un mode de vie hémibiotrophe, se développe de manière extra- et intracellulaire et envahit la totalité de la plante par le biais des tissus vasculaires [Bacon & Yates, 2006]. D'autres espèces (ex : *F. graminearum*) sont capables d'entrer par des ouvertures naturelles comme les stomates ou même directement au travers de l'épiderme [Mary Wanjiru et al, 2002]. Sur l'orge il a été observé que le mycélium de *F. pseudograminearum* est capable de ressortir par les stomates et d'envahir les tissus environnants en période de sécheresse [Liu & Liu, 2016].

Des formes endophytes d'espèces du genre *Fusarium* ont été retrouvées dans plus de 200 espèces végétales cultivées ou sauvages. La majorité de ces formes ont été observées et isolées dans les tissus vasculaires [Kuldau & Yates, 2000]. Ce type d'interaction très répandue au sein du genre pose évidemment des questions sur la pathogénicité latente des souches et sur la nécessité de détecter précocement la présence de ces micro-organismes.

IV.2.5 Dispersion

La dispersion des espèces du genre *Fusarium* d'une plante à l'autre se fait majoritairement par le vent ou par « splashing » lorsque les gouttes de pluies projettent en l'air les spores au sol [Leslie & Xu, 2010]. Largement produites mais plus fragiles, les microconidies permettent la dispersion à courte distance et sont responsables d'auto-infections. Leur relative sensibilité aux facteurs environnementaux (UV, pH, température) ne leur permet pas de conserver un pouvoir pathogène sur de longues périodes. Les ascospores et macroconidies sembleraient plus résistantes aux conditions extérieures et sont donc de meilleures candidates pour la dispersion à longue distance [Zeller et al, 2004 ; Schmale et al, 2006].

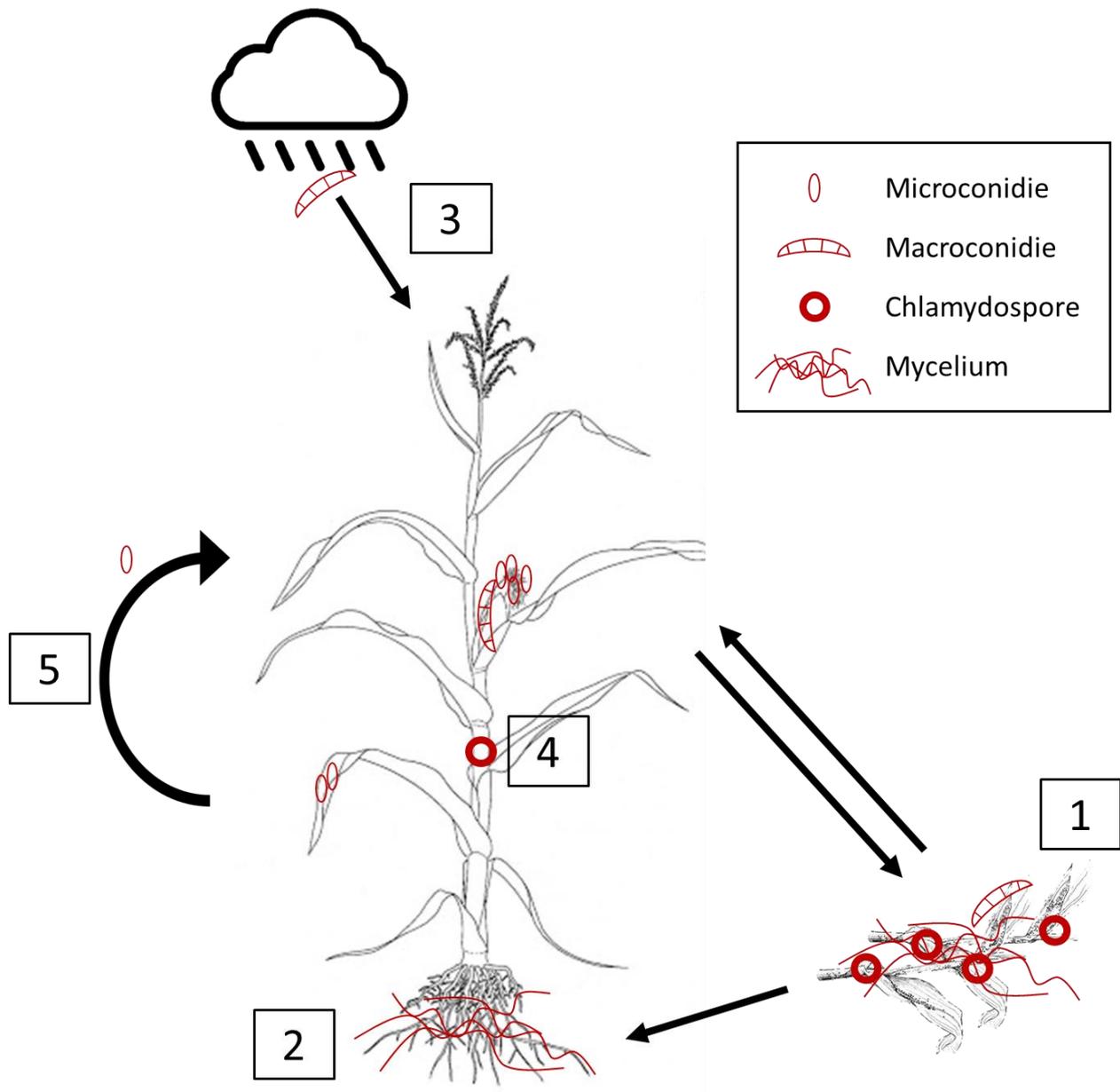


Figure 1.9 Schéma simplifié du cycle de développement type d'une espèce de *Fusarium* et les potentielles sources d'inoculum.

1 Inoculum tellurique dans les débris végétaux en décomposition. **2** Contact entre le mycélium et les racines dans la rhizosphère. **3** Inoculum aérien dans la pluie. **4** Présence de chlamydospores dans les tissus vasculaires. **5** Auto-contamination via microconidies.

IV.3 Toxines produites par les espèces du genre *Fusarium*

Il est impossible de parler du genre *Fusarium* sans évoquer son pouvoir toxigène. A cette date, plus de sept classes de gènes de biosynthèse de mycotoxines ont été retrouvés dans l'ADN des espèces du genre *Fusarium* [Desjardins & Proctor, 2007]. Produits du métabolite secondaire, ces toxines sont synthétisées lors du stockage des denrées et se retrouvent dans les aliments destinés à l'alimentation humaine et/ou animale [Logrieco et al, 2002 ; Schollenberger et al, 2005]. On retrouve des mycotoxines produites par les espèces de *Fusarium* dans le monde entier et sur un très grand nombre de produits animaux et végétaux [D'Mello et al, 1999]. La dangerosité de certaines de ces toxines (fumonisines B1/2/3, trichotécènes, déoxynivalenol...) vis-à-vis de l'Homme [McKean et al, 2006] a été à l'origine de nombreuses évaluations des risques [Galtier et al, 2009]. Ces toxines peuvent perturber la synthèse protéique, d'ADN ou le maintien des membranes cellulaires et ont une forte influence sur l'apoptose. Ces molécules ont également un effet délétère sur les cellules sexuelles, le cycles hormonaux et la reproduction. Métabolisées dans le foie, des nécroses tissulaires sont régulièrement observées dans cet organe. En fonction des doses ingérées, la toxicité peut-être aiguë ou chronique et entraîner des cancers du foie, des insuffisances cardiaques ou la mort [Askun, 2018].

Peu étudiées avant les années 2000, de nombreuses études prouvent actuellement l'émergence de nouvelles toxines telles que la fusaproliferine, la beauvericine, les enniatines et la moniliformine [Jestoi, 2008].

Devant l'importance des risques sanitaires et la diversité de molécules que représentent les mycotoxines produites par les espèces de *Fusarium*, il est important de détecter au plus tôt, c'est-à-dire avant le stockage, la présence de ces toxines ou des agents pathogènes toxigènes dans les denrées alimentaires [Wenda-Piesik et al, 2017]. Tous les produits à destination de la consommation humaine ou animale sont strictement contrôlés et doivent présenter des concentrations inférieures aux seuils fixés par la commission européenne.

Objectifs

Etant donné l'ampleur croissante des dommages sur l'ail, des pertes économiques et les incertitudes étiologiques et épidémiologiques, l'objectif global des recherches de cette thèse a été d'établir des connaissances sur la maladie. Ces connaissances sont indispensables à la mise au point de moyens de détection de(s) l'(les) agents(s) pathogène(s) responsable(s) des dégâts sur l'ail et à l'élucidation des processus épidémiologiques impliqués. Une méthode de détection de ce type permettra de développer des moyens de gestion de la maladie à toutes les étapes de la production de l'ail. Des objectifs précis ont été décrits :

1. Etablir les causes étiologiques de la maladie à travers une collecte d'échantillons, des isolements microbiologiques, la constitution d'une collection de souches, la validation du pouvoir pathogène et l'identification moléculaire des agents pathogènes.
2. Caractériser le niveau d'agressivité relatif des souches entre elles.
3. Caractériser le processus de pénétration des gousses, le développement de l'agent pathogène au sein des tissus de l'ail et la cinétique de dégradation des structures cellulaires de l'hôte au travers d'observations microscopiques.
4. Mettre au point une méthode de détection sur la base de recherche de marqueurs moléculaires spécifiques aux souches pathogènes, tests *in silico*, validation sur ADN pur et sur échantillons de terrains. Evaluation de la façon de transmettre cet outil à la Profession de l'ail et de ses applications au terrain.

Chapitre 2 : Etiologie et Caractérisation

Avant-propos

Lorsqu'on travaille sur les maladies des plantes, notamment lorsque l'on fait face à une maladie émergente, donc peu connue, la toute première étape sur le chemin de la mise au point d'une méthode de protection des cultures, c'est d'identifier le (ou les) agent(s) pathogène(s) responsable(s) des symptômes.

Avant le début du projet de thèse et dans le but d'avoir une vision de ce qui se passait dans les bassins de production, quelques isollements microbiologiques ont été réalisés sur un petit nombre de gousses d'ail symptomatiques fournies par les producteurs du bassin Sud-Est. Une dizaine de souches ont alors pu être isolées à partir de nécroses. Lors du CDD que j'ai effectué juste avant le démarrage de la thèse, ces souches ont été identifiées sur des critères morphologiques et moléculaires. L'identification de l'espèce émergente *F. proliferatum* sur l'ail en France a donné lieu à la publication d'un « First report » dans la revue Plant Disease.

Une étude plus conséquente sur l'étiologie de la maladie en France, la caractérisation des souches et de l'étude de la variabilité génétique de la population de *Fusarium* spp. sur le territoire a été menée dans le cadre de la thèse. Les résultats de ces travaux sont détaillés et discutés dans ce chapitre.

First report of *Fusarium proliferatum* causing garlic clove rot in France.

C. Leyronas¹, P.L. Chrétien¹, C. Troulet¹, M. Duffaud¹, F. Villeneuve², C.E. Morris¹, H. Hunyadi³

¹ Pathologie Végétale, INRA, 84140, Montfavet, France

² Ctifl, Centre opérationnel de Lanxade, 24130 Prignonrieux, France

³ Prosemail, 69008 Lyon, France

Corresponding author: christel.leyronas@inra.fr

Garlic (*Allium sativum* L.) is an essential ingredient of French gastronomy. Yearly, about 20,000 tons of garlic for consumption and 4,000 tons of garlic seeds are produced in France with strict quality criteria. However, tan lesions have been observed in the past few years on cloves during the dry storage period, especially on pink garlic. First symptoms appear generally two months after harvest. Externally, the bulbs are free from symptoms. But when opened, cloves may appear softened and brown. When clove tissues are completely covered by tan lesions, they may become covered with white mycelium. Yearly, the disease causes 10% crop loss of pink garlic on average thereby inducing significant economic losses.

In January 2017, 9 bulbs were collected from three varieties of pink garlic (varieties of the Cledor and Flavor garlic types, without flower stalks), in the major garlic producing regions of Southern France. These bulbs were produced in the field and were stored in wooden crates for 6 months before being analyzed. Diseased cloves were peeled and then surface disinfested with 70% alcohol for 30 s and rinsed in 3 successive baths of sterile water. Internal symptomatic tissues were then removed (5x5 mm pieces) and placed on potato dextrose agar and incubated at 21°C. A total of 10 cultures were obtained and were single-spore purified. The colonies were white to light pink with aerial mycelium and sometimes with violet pigment underneath. Microscopic observations showed hyaline and septate hyphae, slightly curved macroconidia with 2 to 3 septa measuring 17.5 to 30 x 3.7 to 7.5 µm (23.2 x 5.7 on average) and non-septate microconidia measuring 7.5 to 12.5 x 2.5 to 5.0 µm, (9.7 x 4.3 on average) (n=25). No chlamydospores were observed. These morphological characteristics were consistent with the description of *Fusarium* species in general (Leslie and Summerell 2006) but molecular analyses were needed to confirm exact species identity.

The strains were further identified by PCR and sequencing. Firstly *Fusarium proliferatum* specific primers Fp3-F and Fp4-R were used (Jurado et al. 2006). For all the strains, a 240 bp amplicon was obtained as expected. To confirm the identity of strains, two different primer sets ITS1/ITS4 and EF1/EF2 were used. Primers ITS1/ITS4 (White et al. 1990) resulted in a 600-bp amplicon. BLASTn analyses showed 100% similarity with MH055399.1 (*F. proliferatum* isolate DSM 106835). Primers EF1/EF2 (O'Donnell et al. 1998) resulted in a 650-bp amplicon (GenBank accession no. MH628463) that was 99% similar to the sequence KX215078.1 (*F. proliferatum* isolate G3-1) in GenBank.

Pathogenicity tests were conducted by soaking cloves (pink cultivars) in a suspension of 10⁶ spores mL⁻¹ for 24h. Ten cloves were inoculated with each of the 10 strains previously isolated. Controls were soaked in sterile water. All cloves were incubated in the dark at 23°C at 100% relative humidity. After 4 days of incubation, characteristic symptoms (tan lesions, white mycelium) developed on cloves for all strains tested. No symptoms appeared on control

cloves. The fungus was re-isolated from symptomatic cloves and was identified as *F. proliferatum*.

F. proliferatum has been reported previously in several European countries (Stankovic et al. 2007; Palmero et al. 2010; Tonti et al. 2012). To our knowledge this is the first report of *F. proliferatum* causing rot of garlic in France.

References:

- Leslie, J.F., and Summerell, B.A. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 224-226, 2006.
Jurado, M., et al. Systematic and Applied Microbiology 29: 681, 2006.
White, T.J., Academic press, San Diego, CA, pp. 315-322, 1990.
O'Donnell, K., et al. PNAS 95:2044, 1998.
Stankovic, S., et al. European Journal of Plant Pathology 118: 165-172, 2007.
Palmero, D., et al. Plant Disease 94: 277-277, 2010.
Tonti, S., Journal of Phytopathology 160: 761-763, 2012.

1 Etiology of garlic rot, an emerging disease in France.

2 Paul L. Chrétien

3 Cindy E. Morris,

4 Magali Duffaud,

5 Christel Leyronas*, corresponding author: christel.leyronas@inrae.fr

6 INRAE, Pathologie Végétale, F-84140, Montfavet, France

7 8 **Abstract**

9 The incidence of garlic rot has constantly increased in France since the early 2000s. In order to
10 set up an efficient method of garlic protection against this disease, its etiology has to be
11 clarified. To achieve this goal, a 3-year survey was conducted in the two main French basins of
12 garlic production. Fungi were isolated from 5493 garlic cloves belonging to pink, purple and
13 white types. Sequencing of the translation elongation factor 1 alpha gene of 1171 strains
14 revealed that 94 % of the strains belong to the species *Fusarium proliferatum* and 6 % belong
15 to *F. oxysporum*. The pathogenicity of both species on garlic was confirmed by artificial
16 inoculations and re-isolations. There was significantly more *F. oxysporum* in symptomatic
17 garlic cloves coming from the southeast basin (9.44 %) than from the southwest basin (2.76 %).
18 This study confirms that garlic rot is present in pink, purple and white types. But, pink type
19 garlic harbors *F. oxysporum* significantly less frequently (1.59 %) than do white (9.39 %) and
20 purple (7.34 %) types. Based on the sequencing of *rpb1*, *rpb2*, *ITS* and *IGS* regions of a
21 subsample of strains, the French population of *F. proliferatum* shows a very low genetic
22 diversity.

23 **Keywords**

24 *Allium sativum*, molecular identification, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum*

25 **Introduction**

26 The worldwide production of garlic (*Allium sativum* L.) has been regularly increasing over the
27 last twenty years. In 2018, more than 28 million of tons garlic were produced on more than 1.5
28 million ha mostly localized in tropical and temperate regions (Food and Agriculture
29 Organization of the United Nations). In addition to its organoleptic contribution to various
30 cuisines, garlic has been reported to have properties that promote human health, including about
31 twenty organosulfur compounds with antimicrobial properties. Recently, garlic extract has been
32 used as a biocontrol product to protect crops against fungal diseases (Curtis et al., 2004;
33 Slusarenko et al., 2008). The antimicrobial properties of garlic constitute quite a paradox since
34 garlic can be attacked by several fungal diseases (rust, white rot...). The most recently reported
35 disease is garlic rot. This disease manifests itself during storage and inside collapsed garlic
36 heads, where cloves show brown discoloration and the development of white/pink mycelia.
37 Garlic heads with such symptoms can no longer be commercialized. Since 1986 when these
38 symptoms were first described in Japan (Matuo et al., 1986), similar symptoms have been
39 observed in every garlic production area. It has been reported in North America (Dugan et al.,
40 2003; Ochoa-Fuentes et al., 2013), Europe (Koleva, 2004; Stankovic et al., 2007; Palmero et
41 al., 2010; Tonti et al., 2012; Ignjatov et al., 2017), North Africa (Moharam et al., 2013) and
42 Asia (Sankar & Babu, 2011).

43 In France, ranking 6th among European producers, garlic rot disease appeared in 2006. In spite
44 of intensive control and certification of seeds and plants, losses due to this disease are
45 increasing. It can put French garlic producers in situations where they stop production of some
46 cultivars and incur drastic losses of income (Chrétien et al., 2020). Producers of pink cultivars
47 of garlic are particularly concerned since they have the impression that pink cultivars are more
48 sensitive to the disease. In order to protect high quality standards and labels of French garlic
49 there is a need to set up efficient, sustainable and environment-friendly methods of avoiding

50 infection of garlic and the concomitant losses. To avoid infection it is necessary to determine
51 when and how initial infection occurs. This will require early tracing of garlic health that is
52 founded on comprehensive knowledge of the causal agent(s). To date, seven species of
53 *Fusarium* have been isolated from garlic rot symptoms in different countries: *F.*
54 *proliferatum* (Dugan et al., 2003; Stankovic et al., 2007; Palmero et al., 2010; Sankar & Babu,
55 2011; Tonti et al., 2012; Moharam et al., 2013; Ochoa-Fuentes, 2013; Ignjatov et al., 2018), *F.*
56 *acuminatum* (Ignjatov et al., 2017), *F. culmorum* and *F. graminearum* (Koleva, 2004), *F.*
57 *oxysporum* and *F. solani* (Moharam et al., 2013) and *F. tricinctum* (Ignjatov et al., 2016). In
58 France, we have reported the presence of *F. proliferatum* on pink garlic (Leyronas et al., 2018).
59 The objective of the present study is to elucidate the etiology of garlic rot disease in France.
60 The specific goals were to 1) identify *Fusarium* species isolated from different garlic types
61 produced in the two main French basins of production, 2) verify the virulence and
62 aggressiveness of these species on garlic, 3) assess their intra and inter specific genetic diversity
63 and 4) determine if the causal agent(s) is(are) uniformly distributed between the two main
64 French production regions and the different cultivars produced.

65

66 **Materials and methods**

67 **1. Origin of garlic cloves**

68 Sampling was carried out in the two main French basins of garlic production (the southwest
69 basin and the southeast basin) in 2017, 2018 and 2019. The two basins, 200 km apart, are
70 separated by the Massif Central Mountain range. The southeast basin is subject to
71 Mediterranean climate whereas the southwest basin is subject to a modified oceanic climate.
72 Both basins soil is mostly acid and calcareous. Some garlic cultivars are cultivated in a single
73 basin but the majority is cultivated in both. Three types of garlic are cultivated in both these
74 basins. The white type is planted in late autumn. It has large heads with about ten cloves per

75 head and has the sweetest taste of all garlic types. The purple type is planted in early autumn.
76 It has a stronger taste and an intense purple color. The pink type is planted in spring. It has
77 smaller, yet more numerous cloves per head. Some pink cultivars maintain a vestige of the floral
78 stalk right in the middle of the head whereas floral stalks are completely absent from white and
79 purple types.

80

81 Garlic heads were collected during the storage period (i.e. 3 weeks after harvest) and sent to the
82 laboratory. For each basin, several cultivars of white (n=3), pink (n=4) and purple (n=1) garlic
83 were studied. The cultivar names are not disclosed here to respect confidentiality agreements
84 that are required when collaborating with the garlic production industry. For each cultivar,
85 several batches (n=1 to 15) were used. A batch correspond to a parcel where the garlic cultivar
86 is cultivated. Disease incidence on heads in a lot was determined by the number of garlic heads
87 needed to be peeled in order to obtain three symptomatic heads. A symptomatic head was
88 defined by the presence of at least three cloves showing discoloration from brown to orange
89 with dry or water-soaked lesions to complete degradation. The clove incidence was determined
90 based on the number of symptomatic cloves inside a garlic head out of the total number of
91 cloves in that head. These two types of disease incidence were calculated for the 2018 and 2019
92 crop seasons.

93

94 **2. Fungal isolation and purification**

95 One isolate was collected from each symptomatic clove. All cloves were surface-disinfected in
96 a 1 % chlorine bleach bath for 1 minute. They were then rinsed in 3 successive baths of sterile
97 water for 1 minute each. The excess water was removed with sterile absorbent paper. The
98 symptomatic region was cut out and placed on Potato Dextrose Agar medium (PDA; Difco
99 Laboratories). Petri plates were stored at room temperature (20 °C) and under natural light until

100 fungal colonies appeared (from 2 days to 2 weeks). The *Fusarium*-like colonies (white to
101 slightly pink, orange or purple mycelium and cottony appearance) growing out from the
102 samples were transferred to new PDA plates. Isolates were then purified on agar-water medium.
103 A mycelial plug carrying a single piece of hyphal tip was excised from the growing margin of
104 each *Fusarium*-like colony and transferred to PDA. After 14 days of incubation at 21 °C,
105 mycelium and spores were collected from the surface of the agar and stored at -20 °C in 25 %
106 glycerol buffer before further analyses.

107

108 **3. Molecular identification of strains**

109 Among the 2729 strains isolated from symptomatic garlic, 1171 were chosen for molecular
110 identification to represent the two basins of production, the 8 garlic cultivars and the three
111 sampling campaigns (see Table 1 for distribution). The mycelium was collected from 2-week-
112 old colonies growing on PDA by gently rubbing the agar surface with a sterile cotton swab.
113 DNA was extracted in 96 well-plate according to the DNeasy® 96 Plant Kit Qiagen protocol.
114 For each strain, a partial region of the translation elongation factor 1 alpha gene (*tef-1 α*) was
115 amplified with the primers EF1 (5'-ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC-3') and EF2 (5'-GGA
116 RGT ACC AGT SAT CAT GTT-3') (O'Donnell & Cigelnik, 1997). The PCR program was as
117 follow: of 15 min at 95 °C, 35 cycles at 94 °C for 30 s, 57 °C for 90s and 72 °C for 60 s then
118 60 °C for 30 min. Reactions were performed in 30 μ L of reaction volume with 1X Qiagen
119 Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, The Netherlands), 0.4 μ M of each primer and 2
120 μ L of DNA. The amplified fragments were visualized on 1.5 % agarose electrophoresis gels
121 after a 45 min run at 100 V. The amplified regions were sent to GenoScreen (Lille, France) for
122 direct Sanger Sequencing with primer EF1.

123

124 The sequences were analyzed with Geneious prime v10.0.4 (Biomatters, Auckland, New

125 Zealand). Raw sequences showing more than 15 % of Low-Quality bases were removed from
126 further analyses. The remaining sequences were aligned with Geneious using default
127 parameters and species were identified using both databases of Fusarium MLST
128 (<https://Fusarium.mycobank.org/>) and Fusarium ID (<http://isolate.Fusariumdb.org/blast.php>).
129 Neighbor-joining trees were built with the Geneious Tree Builder default parameters (1000
130 bootstrap replicates and 50% consensus support threshold) to visually confirm the molecular
131 identification (not shown). The sequence of *tef-1α* of *F. dimerum* from the *MIAE strain*
132 *collection* (Héraud et al., 2010) was used to root the tree where necessary.

133

134 **4. *Fusarium* sp. genetic diversity**

135 In addition to the *tef-1α* region (~600 bp), 4 other DNA regions were selected to assess the
136 genetic diversity of the *Fusarium proliferatum* strains: *rpb1* (RNA polymerase subunit 1)
137 (~1400 bp), *rpb2* (RNA polymerase subunit 2) (~1100 bp), *ITS* (internal transcribed spacer)
138 (~500 bp) and *IGS* (intergenic spacer) (~550 bp). A sub-sample of 95 strains representing the
139 different types of garlic, the two production basins and the 3 years of sampling was chosen for
140 the *rpb1* and *rpb2* regions. They were amplified for all of these strains with the primers RPB1-
141 Af (5'-GAR TGY CCD GGD CAY TTY GG-3') / RPB1-Cr (5'-CCN GCD ATN TCR TTR
142 TCC ATR TA-3') (Matheny et al., 2002) and RPB2-5F2 (5'-GGG GWG AYC AGA AGA
143 AGG C-3') / fRPB2-7cR (5'-CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT-3') (Liu et al., 1999; Šišić et
144 al., 2018). The *rpb1* PCR program consisted of 15 min at 95 °C, 40 cycles at 94 °C for 30 s, 55
145 °C for 90 s and 72 °C for 90 s then 1 final elongation of 10 min at 72 °C. The *rpb2* PCR program
146 consisted of 15 min at 95 °C, 5 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 90 s and 72°C for 2 min, 5
147 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 90 s and 72 °C for 2 min, 30 cycles at 94 °C for 30 s, 54°C
148 for 90 s and 72 °C for 2 min then final elongation of 10 min at 72 °C.

149

150 The *ITS* region of 19 strains, representing the 2018 sampling campaign of pink garlic, was
151 amplified with the primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS4 (5'-TCC
152 TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990). The following program was used: 1
153 cycle of 15 min at 95 °C, 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 90 s and 72 °C for 1 min then 1
154 cycle of 30 min at 60 °C.

155

156 A total of 192 strains representing the different types of garlic, the 2 production basins and the
157 first 2 years of sampling underwent amplification for the *IGS* region. Gib2-F (5'-GAG GCG
158 CGG TGT CGG TGT GCT TG-3') and Fgc-R (5'-CTC TCA TAT ACC CTC CG-3') primers
159 were used (Jurado *et al.*, 2006). The following program was applied: 1 cycle of 15 min at 95
160 °C, 35 cycles at 94 °C for 30 s, 58 °C for 1 min and 72 °C for 2 min then 1 cycle of 10 min at
161 72 °C. The presence of all PCR products was confirmed by gel electrophoresis previously to
162 sequencing by the Sanger One Shot Sequencing method (GenoScreen, Lille, France). We were
163 able to correctly amplified 14 *IGS* sequences and compiled them with the 52 sequences used
164 by Jurado *et al.* (2012).

165

166 Due to lack of polymorphisms for the *rpb1*, *rpb2* and *ITS* region sequences, three consensus
167 trees were constructed with sequences of the *tef-1 α* and *IGS* regions. All *tef-1 α* sequences
168 obtained during the molecular identification of strains (n=1171) were included in the analysis
169 in addition to 139 sequences of *F. proliferatum* strains and 118 sequences of *F. oxysporum*
170 strains isolated from garlic, maize (*Zea mays*), onion (*Allium cepa*), welsh onion (*Allium*
171 *fistulosum*) and wheat (*Triticum* sp.) from the GenBank collection
172 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). These reference strains had been isolated from
173 China, Finland, France, Iran, Japan, Malaysia, Mexico, Serbia, South Africa, Spain and in the
174 USA (Table 2).

175

176 Sequences were analyzed with Geneious prime v10.0.4 (Biomatters, Auckland, New Zealand).
177 They were aligned (Pairwise alignment) and ends were trimmed. Unique sequences were
178 extracted and underwent iterative pairwise alignment and trimming until all sequence lengths
179 were strictly identical. Maximum-likelihood trees of the *F. proliferatum* and the *F. oxysporum*
180 sequences were constructed with MEGA-X v10.1.8 software. For each tree, the best model was
181 chosen using ModelTest include in the software. All trees were constructed using the bootstrap
182 method with 1000 replicates. Gaps and missing data were treated as deletions.

183

184 To the 1171 *tef-1α* sequences of strains isolated from French garlic, we added 12 *tef-1α*
185 sequences from strains isolated from Spanish garlic, non-garlic sources or garlic leaf debris.
186 Spanish strains were provided by D. Palmero from the Madrid Polytechnic University
187 (Universidad Politécnica de Madrid). Non-garlic hosts or strains were provided by R. Ioos from
188 the ANSES Plant Health Laboratory (ANSES Laboratoire de la Santé des Végétaux) in
189 Malzéville. Haplotypes analyzes were conducted on these 1183 strains and compared with
190 aggressiveness tests.

191

192 **5. Confirmation of pathogenicity and symptom assessment**

193 A total of 122 strains of *F. proliferatum* were used to represent the two basins of production,
194 the 8 garlic cultivars and the three sampling campaigns (Table 1). Four strains of *F. oxysporum*
195 were also tested. Explants (n=3) of 7-day-old colonies were transferred into 300 ml Erlenmeyer
196 flasks containing 150 ml of PDB (Potato Dextrose Broth, Difco Laboratories). The strains grew
197 under constant agitation (100 rpm) at 21 °C, with a 12 h-photoperiod ($\sim 25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). After
198 8 days, the suspensions were filtered through cheesecloth filters (pores 25-35 μm in diameter).
199 The spore concentrations were determined using a Malassez cell and then adjusted to 1.0×10^6

200 spores.mL⁻¹.

201 Garlic cloves were provided by Top'Alliance Alinéa. The same pink garlic cultivar (Agri-
202 Obtentions INRA) was used throughout all the experiments. The healthy cloves (n=12 per
203 *F. proliferatum* strain) were peeled and disinfected (3 min in 1% bleach + 1 min in sterile water
204 thrice). They were then placed in a beaker containing the calibrated suspension of spores with
205 constant stirring (100 rpm) at 21 °C and with a photoperiod of 12 h (~ 25 µmol.m⁻².s⁻¹). The
206 cloves serving as negative control were soaked in sterile water. After 24 h each garlic clove was
207 placed in a cell culture plate well, basal plate downward, in a moisture-saturated plastic box
208 and then stored at 23 °C in total darkness for 18 days.

209

210 The area of resulting garlic lesions was monitored from the 4 to 18 days after inoculation and
211 the disease scores were noted on days 4, 6, 8, 11, 13, 15 and 18. We developed a notation scale,
212 from 0 to 5, based on the extent of brown lesions on the cloves (Figure 1). These notes were
213 used to compute the area under the disease progression curves (AUDPC). The strain FA3-E01
214 was used as a reference for aggressiveness. For each strain, an index of aggressiveness (IA) was
215 calculated relative to that of strain FA3-E01 as follows: $IA_{\text{strain}} = 100 * (AUDPC_{\text{strain}} /$
216 $AUDPC_{\text{FA3-E01}})$.

217

218 **6. Statistical analyses**

219 All statistical analyzes were conducted with RStudio software (v 1.2.1335) and Statistica
220 software (v. 10). Incidences of garlic rot on all garlic types were compared with ANOVAs and
221 Tukey's HSD *post hoc* test. Relative aggressiveness of haplotypes were compared with
222 ANOVAs. A generalized linear model (GLM) was used to explore the proportional differences
223 of *Fusarium* species. A linear model (LM) was used to compare the link between
224 aggressiveness and several factors.

225

226 **Results**

227 **1. Garlic rot incidence**

228 A total of 132 batches (from 132 fields) were analyzed in 2018 and 2019 representing 394 garlic
229 heads and 5493 cloves. Symptoms were observed on all garlic types and on each lot. Globally,
230 55 % of the peeled cloves presented typical *Fusarium* symptoms. There were no significant
231 differences among garlic types in the head incidence (number of heads needed to be peeled in
232 order to obtain three symptomatic heads): 3.46 heads for pink cultivars (n=48 batches), 3.94 for
233 purple cultivars (n=31 batches) and 3.70 for white cultivars (n=53 batches) (p=0.34). No
234 significant differences were observed among garlic types (p>0.31). However, contrary to
235 expectations, the clove incidence in heads was significantly lower on pink garlic cultivars than
236 on the two other types: 44 % of symptomatic garlic cloves per infected head for pink cultivars
237 (n=144 heads), 59 % for purple cultivars (n=92) and 60 % for white cultivars (n=158)
238 (p<10⁻¹²).

239

240 **2. *Fusarium* species isolated from garlic symptoms**

241 From the 3853 symptomatic cloves selected for isolation, 2729 strains were obtained. Of these
242 strains, 1366 underwent molecular characterization that led to identification of 1171 of them
243 (Table 1). The majority of strains isolated from garlic belonged to the species *F. proliferatum*
244 (94.03 %): at least one strain of *F. proliferatum* was isolated from each garlic lot. The rest of
245 the strains were identified as *F. oxysporum* (5.97 %). A single strain identified as *F. solani* was
246 isolated from purple garlic harvested in the southwest basin in 2018.

247

248 The proportions of *F. proliferatum* and *F. oxysporum* isolated from the three garlic types
249 differed between the two production areas (Figure 2). Significantly more *F. oxysporum* strains

250 were isolated from garlic cloves harvested in the southeast basin (9.44 %) than in the southwest
251 basin (2.76 %) ($p < 10^{-8}$). Significantly fewer *F. oxysporum* strains were isolated from pink type
252 garlic (1.59 %) than from white type (9.39 %) or purple type garlic (7.34 %) ($p < 10^{-6}$). No
253 significant differences of proportion of *F. oxysporum* were observed between strains isolated
254 from white and purple garlic cloves ($p = 0.31$).

255

256 The 1171 strains identified originated from 289 garlic heads. We observed *F. proliferatum*
257 strains as the only species present in 234 garlic heads (81.0 %), *F. oxysporum* strains as the only
258 species present in 18 garlic heads (6.2 %) and the co-presence of both species in 37 garlic heads
259 (12.8 %).

260

261 **3. Intra and inter specific diversity of *Fusarium* strains isolated from garlic.**

262 The 19 *ITS* sequences (492 bases) did not show any polymorphism and were not included in
263 further analyzes. Both *rpb1* (592 bases) and *rpb2* (904 bases) region alignments were made
264 with 86 and 93 *F. proliferatum* DNA sequences respectively. We observed only two haplotypes
265 for both regions. One major haplotype of *rpb1* and *rpb2* was present in 81 and 88 strains
266 respectively and one minor present in 5 strains (FA84-E01, FA85-E08, FA92-E03, FA110-E05
267 and FA122-E11). These 5 strains carried one identical mutation in both loci.

268

269 We added our *F. proliferatum* partial *IGS* sequences ($n = 14$) to all the *F. proliferatum* sequences
270 obtained by Jurado et al. (2012) leading to two clusters (Figure 3) that each represented distinct
271 monophyletic groups. One contained strain FA122-E11 and the other contained the 13 others
272 strains.

273

274 The strains collected in this study were dominated by a *tef-1 α* gene haplotype of *F. proliferatum*

275 that accounted for more than 75 % of the strains collected from garlic (Haplotype 1, Table 3).
276 Strains from garlic (from cloves or leaf debris from France and elsewhere) constituted 25
277 additional haplotypes of which 17 haplotypes represented less than 1 % of the strains collected
278 from garlic. The strains tested for aggressiveness on garlic represented 8 of the 9 haplotypes
279 with more than 10 strains in the collection and 3 of the haplotypes with fewer than 10 strains.

280

281 To those sequences, we added 80 *tef-1α* GenBank database sequences corresponding to strains
282 isolated from different hosts and geographical areas. Of these 119 *tef-1α* haplotypes, 66
283 corresponded to strains of *F. proliferatum*. The 505 bp sequences of these 66 haplotypes showed
284 high nucleotide identity with each other, ranging from 99.8 to 98.41 % except for the sequence
285 of KU847789 sequence whose similarity to other sequences ranged from 98.03 to 96.45 %.
286 Sequences of *F. proliferatum* strains from French garlic cloves were partially clustered but no
287 correlation with geographic origin of host could be determined (Figure 4a). The 5 strains
288 representing the minor *rpb1/rpb2* haplotype were also clustered in a unique branch on the tree
289 obtained with the partial *tef-1α* sequences. *F. oxysporum* sequences (574 bp) showed 99.87 %
290 to 96.03 % nucleotide identity. Sequences of *F. oxysporum* strains isolated on French garlic
291 cloves showed affiliation across the whole range of available sequences of *F. oxysporum* from
292 the GenBank database (Figure 4b).

293

294 Out of the 289 garlic heads used to obtain the 1171 *Fusarium* strains, 193 (67 %) hosted a single
295 haplotype among the strains isolated from that head. More specifically, 154 garlic heads hosted
296 strains from the *F. proliferatum* haplotype 1, 22 garlic heads hosted strains from a single other
297 *F. proliferatum* haplotype and 17 garlic heads hosted strains from a single *F. oxysporum*
298 haplotype. The rest of the garlic heads (n=96, 33 %) were infected by multiple haplotypes at
299 the same time. Up to 58 garlic heads were infected by several *F. proliferatum* haplotypes, 37

300 garlic heads were infected by *F. proliferatum* and *F. oxysporum* haplotypes, and 1 head was
301 infected by multiple *F. oxysporum* haplotypes.

302

303 **4. Pathogenicity of *F. proliferatum* and *F. oxysporum* strains isolated from garlic**

304 After 4 days of inoculation, thick white aerial mycelium appeared on the basal plate of the
305 inoculated cloves. After a maximum of 6 days, all tested strains caused dry brown-orange
306 lesions on soft tissues cloves, starting just above the basal plate. Depending on the strain
307 inoculated, the lesions progressed upwards until 25 to 100 % of the surface was covered.
308 Globally, the cloves of negative controls did not show any lesions. However, after 15 days,
309 some of them started to develop small brown lesions and some mycelium. This mycelium was
310 identified as *F. proliferatum*.

311

312 All tested strains of *F. proliferatum* were able to cause symptoms on cloves of pink type garlic,
313 regardless of their basin of origin and their garlic type of origin (pink, white, violet). However,
314 they displayed a wide range of aggressiveness from 51.8 % to 154.8 % compared to a reference
315 strain (Figure 5). Differences among strains were significant ($p < 10^{-16}$).

316

317 In order to determine which factors were responsible for the variability of aggressiveness of
318 strains, linear models were applied. In the first model (GLM) we evaluated the influence of
319 three factors concerning the origin of the strains: the type of garlic (pink, purple or white) from
320 which the strain was isolated, the basin of production and the cropping season. All factors and
321 interactions were significant except for the type factor but they explained only 15% of the
322 variability of aggressiveness observed ($R^2 = 0.15$) (Table 4). In the second model (LM) we
323 evaluated the influence of strains alone and obtained a significant impact of this factor on the
324 variability of aggressiveness explaining 59 % of the variability observed ($R^2 = 0.59$) (Table 4).

325

326 We then assessed the variability in aggressiveness of strains in terms of the *tef-1α* haplotypes
327 we identified. Although most of the haplotypes inoculated on garlic were as aggressive as the
328 reference strain (Figure 6), there was a significant effect of haplotype on aggressiveness
329 (ANOVA, $p < 0.00$). Most of the haplotypes that corresponded to *F. oxysporum* were only about
330 60 % as aggressive as their *F. proliferatum* counterparts in artificial inoculation (Figure 6).
331 Nevertheless, some of the rarer haplotypes of *F. proliferatum* were markedly less aggressive
332 than the dominant haplotypes. These results confirmed what we observed with the linear
333 models: the genetic diversity of strains seems to be the key to the variability in aggressiveness
334 observed among strains.

335

336 **Discussion**

337 The results of the present study confirm that garlic rot disease is well established in France and
338 it concerns all types of garlic cultivars produced in France: pink, purple and white. Based on
339 the frequency of symptomatic cloves in symptomatic heads, pink cultivars show a lower
340 incidence of damage for individual cloves compared to heads of purple and white types. This
341 is surprising since growers in the French garlic industry have the impression that pink cultivars
342 are the most sensitive. This impression might be due to the discrepancy between what is
343 observed on farms and what is noted in the lab at a given time. We peeled the cloves and noted
344 symptoms as small as brown spots, undetectable by the methods used by producers when
345 evaluating their stocks, thereby likely explaining this discrepancy. We can also assume that
346 lesions do not evolve in the same way in the different types of garlic. For example, in the case
347 of garlic seed, since pink cultivars are sown later in the season, lesions have more time to evolve
348 between harvest and sowing, sometimes toward complete clove destruction.

349 The molecular identification of 1171 strains, completed with inoculation tests of a

350 representative subsample of strains, showed that *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* are
351 responsible for garlic rot in France. A population of *F. proliferatum* with little genetic diversity
352 represents the dominant species. This result is consistent with the French first report (Leyronas
353 et al. 2018) and with the report of *F. proliferatum* as the responsible agent for garlic rot in
354 Serbia, Spain, Mexico and Egypt (Stankovic et al., 2007; Palmero et al., 2012; Ochoa-Fuentes
355 et al., 2013; Elshahawy et al., 2017). Considering *F. oxysporum*, it has also been reported as
356 responsible for garlic symptoms in the USA and Egypt (Dugan et al., 2007; Moharam et al.,
357 2013). Even though *F. oxysporum* represents a small percentage of the strains isolated from
358 French garlic, garlic producers need to be wary of a possible emergence of this species. The
359 number of *F. oxysporum* strains isolated on purple garlic in the South-East basin seems to
360 increase every year and could be a problem in the future. Furthermore, in Italy, *F. oxysporum*
361 is isolated more frequently from garlic symptoms compared to what we now observe in France
362 (Mondani et al., 2020).

363 In this work, we highlighted the low diversity of *tef-1a*, *rpb1*, *rpb2*, *ITS* and *IGS* regions of *F.*
364 *proliferatum* strains collected from French garlic. The same low genetic diversity of the *tef-1a*
365 region has been described among different *Fusarium* species (Stepien et al., 2011) and different
366 garlic strains in Spain (Gálvez et al., 2017). However, two different monophyletic groups were
367 defined with the *IGS* region for the 14 strains sequenced in the present study. These groups
368 matched to the two types observed by Jurado et al. (2012) with strains collected in Europe,
369 America and Saudi Arabia without correlation with geographical origin or host origin (11
370 different hosts from 5 botanical families). The first group contained 13 of the 14 strains
371 sequenced for the *IGS* region. The second group contained only one strain (FA122-E11) that
372 also belonged to the minor haplotype in the *rpb1* and *rpb2* regions. Despite the low diversity in
373 both *rpb1* and *rpb2* regions, this seems to confirm the presence of two groups inside *F.*
374 *proliferatum* isolated on French garlic.

375 We described 31 haplotypes among the strains isolated in the collection from different garlic
376 sources and other hosts in France and other countries. For a third of studied garlic heads, we
377 found multiple haplotypes on the same head and sometimes multiple species at the same time.
378 This observation implies that the presence of one haplotype does not prevent other pathogens
379 from infecting the same head. The inoculum, therefore, is not necessarily limited to one strain
380 at one time and multiple independent infections of a same head are possible. This raises
381 questions about the window of opportunity for infection and if it is prolonged throughout the
382 cropping season.

383 The present study is the first step of a global research project aiming to set up a protection
384 method of garlic against this emerging disease. We have clarified the disease etiology in France.
385 The next step is to better understand disease epidemiology in order to determine how disease
386 development can be reduced or even stopped. Some of our ongoing projects are studying traits
387 characterization and identification of inoculum reservoirs. The results will be the object of
388 further publications.

389

390 **Acknowledgments**

391 This study benefited from a PhD scholarship provided by ANRT (Association Nationale
392 Recherche Technologie, CIFRE grant n°2017/1440) and by the French garlic industry
393 (Coopérative Alinéa, Prosemail, Syndicat de l'Ail Rose de Lautrec). This study was supported
394 in part by a grant from the Plant Health and Environment research division (OCARINA project)
395 of INRAE (National Research Institute for Agriculture, Food and Environment). The authors
396 thank the French garlic industry for providing garlic bulbs used in the present study and the
397 FNAMS for providing onions plants used to isolate *Fusarium* strains.

398 The authors thank Claire Troulet, Magali Eygrier, Erine Amorim-Pinto, Alice Alarçon, Emma
399 Borelly and Jeanne Hamet for their technical help. The authors are grateful to Dr. Loup

400 Rimbaud for his help on statistical analyzes, Dr. Cécile Desbiez and Caroline Guilbaud for their
401 help on phylogeny. We also thank the INRAE Molecular Biology Lab of Avignon (LBM) for
402 having made available the molecular biology equipment. The authors thank the staff of the
403 INRAE Experimental facilities of the Plant Pathology research unit (IEPV,
404 <https://doi.org/10.15454/8DGF-QF70>) as well who ensured the maintenance of the incubation
405 chambers that allowed us to do this work.

406

407 **Conflict of interest**

408 The authors have no conflict of interest to disclose.

409 **References**

- 410 Bilal, L., Asaf, S., Hamayun, M., Gul, H., Iqbal, A., Ullah, I. *et al.* (2018). Plant growth
411 promoting endophytic fungi *Asprgillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1
412 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis*, 76, 117-127.
- 413 Chrétien, P.L., Laurent, S., Bornard, I., Troulet, C., El Maâtaoui, M. and Leyronas, C. (2020).
414 Unraveling the infection process of garlic by *Fusarium proliferatum*, the causal agent of root
415 rot. *Phytopathologia Mediterranea*, 59, 285-293.
- 416 Curtis, H., Noll, U., Störmann, J. and Slusarenko, A.J. (2004). Broad-spectrum activity of the
417 volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic
418 bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65, 79-89.
- 419 Dugan, F.M., Hellier, B.C. and Lupien, S.L. (2003). First report of *Fusarium proliferatum*
420 causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology*, 52, 426-426.
- 421 Dugan, F.M., Hellier, B.C. and Lupien, S.L. (2007). Pathogenic Fungi in Garlic Seed Cloves
422 from the United States and China, and Efficacy of Fungicides Against Pathogens in Garlic
423 Germplasm in Washington State. *Journal of Phytopathology*, 155, 437-445.
- 424 Elshahawy, I.E., Saied, N.M. and Morsy, A.A. (2017). *Fusarium proliferatum*, the main cause
425 of clove rot during storage, reduces clove germination and causes wilt of established garlic
426 plants. *Journal of Plant Pathology*, 99, 85-93.
- 427 Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020, October 10). *Production*
428 *quantities of Garlic by country*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- 429 Gálvez, L., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Stępień, Ł. and Palmero, D. (2017). *Fusarium*
430 *proliferatum* – Causal agent of garlic bulb rot in Spain: Genetic variability and mycotoxin
431 production. *Food Microbiology*, 67, 41–48.

432 González, V. and Tello, M.L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in
433 central Spain. *Fungal Diversity*, 47, 29-42.

434 Héraud, C., Steinberg, C., Corberand, T., Gautheron, N., Revellin, C., Edel-Hermann, V. *et al.*
435 (2010). MIAE: collection de reference dédiée aux microorganismes d'intérêt agro-
436 environnemental. Journées Jean Chevaugnon 2010: 8èmes rencontres de Phytopathologie-
437 Mycologie de la Société Française de Phytopathologie (SFP), Aussois, France, 1 p.

438 Ignjatov, M., Milošević, D., Nikolić, Z., Gvozdanović-Varga, J., Tatić, M., Popović, T. *et al.*
439 (2016). First Report of *Fusarium tricinctum* Causing Rot of Garlic Bulbs in Serbia. *Plant*
440 *Disease*, 101, 382-382.

441 Ignjatov, M., Bjelić, D., Nikolić, Z., Milošević, D., Gvozdanović-Varga, J., Marinković, J. *et*
442 *al.* (2017). First Report of *Fusarium acuminatum* Causing Garlic Bulb Rot in Serbia. *Plant*
443 *Disease*, 101, 1047.

444 Ignjatov, M., Milosević, D., Ivanović, Ž., Karaman, M., Vlajić, S., Nikolić, Z. *et al.* (2018).
445 Morphological and pathogenic properties of *Fusarium proliferatum* isolates: The causal agent
446 of garlic (*Allium sativum* L.): Rot in Serbia. *Ratarstvo i Povrtarstvo*, 55, 125–129.

447 Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V. and González-Jaén, M.T. (2006). PCR-based
448 strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic*
449 *and Applied Microbiology*, 29, 681-689.

450 Jurado, M., Marín, P., Vázquez, C. and González-Jaén, M.T. (2012). Divergence of the IGS
451 rDNA in *Fusarium proliferatum* and *Fusarium globosum* reveals two strain specific non-
452 orthologous types. *Mycological Progress*, 11, 101-107.

453 Koleva, K. (2004). Variety of species and spread of fungi of genus *Fusarium* related to rotting
454 of garlic. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 10, 177–180.

455 Kwon, S.-I., Dohlen, C.D. von and Anderson, A.J. (2001) Gene sequence analysis of an
456 opportunistic wheat pathogen, an isolate of *Fusarium proliferatum*. *Canadian Journal of*
457 *Botany*, 79, 1115-1121.

458 Leyronas, C., Chrétien, P.L., Troulet, C., Duffaud, M., Villeneuve, F., Morris, C.E. *et al.*
459 (2018). First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Garlic Clove Rot in France. *Plant*
460 *Disease*, 102, 2658.

461 Liu, Y.J., Whelen, S. and Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes:
462 evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1799-1808.

463 Matheny, P.B., Liu, Y.J., Ammirati, J.F. and Hall, B.D. (2002). Using RPB1 sequences to
464 improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales). *American Journal*
465 *of Botany*, 89, 688-698.

466 Matuo, T., Miyagawa, M. and Saito, H. (1986). *Fusarium oxysporum* f. sp. garlic n. f. sp.
467 causing basal rot of garlic. *Japanese Journal of Phytopathology*, 52, 860-864.

468 Mohana Kumara, P., Zuehlke, S., Priti, V., Ramesha, B.T., Shweta, S., Ravikanth, G. *et al.*
469 (2012). *Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook.f,
470 produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anti-cancer activity. *Antonie van*
471 *Leeuwenhoek*, 101, 323-329.

472 Moharam, M.H.A., Farrag, E.S.H. and Mohamed, M.D.A. (2013). Pathogenic fungi in garlic
473 seed cloves and first report of *Fusarium proliferatum* causing cloves rot of stored bulbs in upper
474 Egypt. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 46, 2096-2103.

475 Mondani, L., Chiusa, G., Pietri, A. and Battilani P. (2020). Monitoring the incidence of dry rot
476 caused by *Fusarium proliferatum* in garlic at harvest and during storage. *Postharvest Biology*
477 *and Technology*, 111407. In Press.

478 Ochoa-Fuentes, Y.M., Delgado-Ortiz, J.C., Chàvez, E.C., Hernández-Castillo, F.D., Olivas,
479 A.F., Morales *et al.* (2013). The first report of *Fusarium proliferatum* causing garlic bulb rots
480 in Mexico. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 570-573.

481 O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997). Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within
482 a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. *Molecular*
483 *Phylogenetics and Evolution*, 7, 103-116.

484 Palmero, D., De Cara, M., Iglesias, C., Moreno, M.M., González, N. and Tello, J.C. (2010).
485 First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Rot of Garlic Bulbs in Spain. *Plant Disease*,
486 94, 277-277.

487 Sankar, N.R. and Babu, G.P. (2012). First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Rot of
488 Garlic Bulbs (*Allium sativum*) in India. *Plant Disease*, 96, 290-290.

489 Shvetsova, S. V., Zhurishkina, E. V., Bobrov, K. S., Ronzhina, N. L., Lapina, I. M., Ivanen *et*
490 *al.* (2015). The novel strain *Fusarium proliferatum* LE1 (RCAM02409) produces α - L -
491 fucosidase and arylsulfatase during the growth on fucoidan: Alfa-L-fucosidase and
492 arylsulfatase from the novel strain *Fusarium proliferatum*. *Journal of Basic Microbiology*, 55,
493 471–479.

494 Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Al-Hatmi, A.M.S., Karlovsky, P., Ahmed, S.A., Maier, W. *et al.*
495 (2018). The 'forma specialis' issue in *Fusarium*: A case study in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*.
496 *Scientific Reports*, 8, 1252.

497 Slusarenko, A.J., Patel, A. and Portz, D. (2008). Control of plant diseases by natural products:
498 Allicin from garlic as a case study. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 313-322.

499 Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A. and Moretti, A. (2007). Pathogenicity and
500 mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia.

501 *European Journal of Plant Pathology*, 118, 165-172.

502 Stępień, Ł., Koczyk, G. and Waśkiewicz, A. (2011). Genetic and phenotypic variation of
503 *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics*, 52,
504 487–496.

505 Tonti, S., Prà, M.D., Nipoti, P., Prodi, A. and Alberti, I. (2012). First Report of *Fusarium*
506 *proliferatum* Causing Rot of Stored Garlic Bulbs (*Allium sativum* L.) in Italy. *Journal of*
507 *Phytopathology*, 160, 761-763.

508 White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. B. and Taylor J.W. (1990). Amplification and direct
509 sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Pcr Protocols*, 31, 315-322.

510 **Table 1.** Distribution of fungal strains among production basin, garlic type and crop season for
 511 which molecular identification was completed. Numbers in brackets refers to the number of strains
 512 for which aggressiveness tests were carried out.

Garlic type	South-East basin			South-West basin			Type total
	2017	2018	2019	2017	2018	2019	
White	13 (3)	155 (10)	39 (6)	12 (6)	28 (6)	71 (4)	318 (35)
Pink	13 (6)	150 (4)	34 (2)	170 (31)	72 (2)	71 (4)	510 (49)
Violet	65 (13)	103 (3)	51 (6)	6 (6)	91 (6)	27 (4)	343 (38)
Yearly total	91 (22)	408 (17)	124 (14)	188 (43)	191 (14)	169 (12)	
Totals	623 (53)			548 (69)			1171 (122)

513
 514 **Table 2.** Characteristics of species and strains of *Fusarium* including GenBank accession
 515 numbers, used for construction of phylogenetic trees. The strains and sequences obtained in this
 516 research are in bold face. *Ac*: *Allium cepa*, *Ad*: *Arundo donax*, *Af*: *Allium fistulosum*, *Ao*:
 517 *Asparagus officinalis*, *As*: *Allium sativum*, *Ch*: *Chamaerops humilis*, *Hv*: *Hordeum vulgare*, *Ms*:
 518 *Musa sapientum*, *Ta*: *Triticum aestivum*, *P*: *Pinus*, *Pc*: *Phoenix canariensis*, *Pd*: *Phoenix*
 519 *dactylifera*, *Pr*: *Phoenix reclinata*, *W*: *Washingtonia*, *Zm*: *Zea mays*. NA: Not Available.

Loci	Species	Strain	Host	Origin	GenBank acc.
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA3-E01	<i>As</i>	France	MW051796
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA44-E14	<i>As</i>	France	MW051797
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA64-E07	<i>As</i>	France	MW051798
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA66-E08	<i>As</i>	France	MW051799
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA76-E05	<i>As</i>	France	MW051800
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA84-E01	<i>As</i>	France	MW051801
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA85-E08	<i>As</i>	France	MW051802
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA92-E03	<i>As</i>	France	MW051803
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA96-E04	<i>As</i>	France	MW051804
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA110-E05	<i>As</i>	France	MW051805

<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA111-E04	As	France	MW051806
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA122-E11	As	France	MW051807
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA122-E12	As	France	MW051808
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA122-E13	As	France	MW051809
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA160-E03	As	France	MW051810
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA161-E04	As	France	MW051811
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA165-E06	As	France	MW051812
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA239-E09	As	France	MW051813
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA253-E07	As	France	MW051814
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA442-E01	As	France	MW051815
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA537-E09	As	France	MW051816
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	FA575-E02	As	France	MW051817
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	SPR 11 A Sci2	As	USA	NA
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	OB3	Ac	France	MW051818
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	LSVM674	Ta	NA	NA
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	1	As	USA	KJ128964
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	B1	As	Serbia	KX092460
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	BL11	As	Serbia	KX611147
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	BL8	As	Serbia	KX611149
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	JBL6	As	Serbia	MH161452
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	PBL70/1-1	As	Serbia	MH496028
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	UR01	Ac	NA	EU220408
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	P57G	Ac	Malaysia	KU847789
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	WF22	Ta	China	KP054293
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	WF29	Ta	China	KP054292
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	WF49	Ta	China	KP054291
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	T1.12	Ta	Mexico	KU508347
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	G16FX3-16	Ta	China	KY081485
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	129b	Ta	China	KY466788
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	wxwh63	Ta	USA	MG826912
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	R11	Zm	NA	KF562151
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	R24	Zm	NA	KF575334
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	R31	Zm	NA	KF575336
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	R37	Zm	NA	KF575339
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	R44	Zm	NA	KF575340
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	15	Zm	NA	KM583805
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	B52c	Zm	Malaysia	KP340030
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	Fp_hap1	Zm	China	KT716224
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	Fp_hap4	Zm	China	KT716227

<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	Fp_hap6	Zm	China	KT716229
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	magh26	Zm	Iran	MG734635
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	prp2-1	Zm	China	MH448807
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	wx8-4	Zm	China	MH448808
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	ynx10-2	Zm	China	MH448809
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	ynx8-4	Zm	China	MH448810
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	dz1-1	Zm	China	MH448814
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	w2-2-3	Zm	China	MH448816
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	C12171	Zm	China	MN696137
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	C17009	Zm	China	MN696128
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	C17059	Zm	China	MN696108
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	C17068	Zm	China	MN696103
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	C17076	Zm	China	MN696098
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	C17091	Zm	China	MN696088
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	C17136	Zm	China	MN696069
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	EF21	Zm	Spain	MN861758
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	F71	Zm	Spain	MN861790
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA23-E08	As	France	MW051819
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA105-E02	As	France	MW051820
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA154-E05	As	France	MW051821
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA155-E02	As	France	MW051822
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA261-E01	As	France	MW051823
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA318-E14	As	France	MW051824
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA340-E03	As	France	MW051825
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA531-E04	As	France	MW051826
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	FA537-E04	As	France	MW051827
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	A-P4-T-PI2	As (leaves)	France	MW051828
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	A-P5-T-PI4	As (leaves)	France	MW051829
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	O2A	Ac	France	MW051830
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	O4A	Ac	France	MW051831
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	MR 20 B Sci1	As	USA	NA
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	JBL1	As	Serbia	MH161445
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fs-N1	Af	Japan	AB898831
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fs-N4	Af	Japan	AB898832
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fs-N8	Af	Japan	AB898833
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	AF31	Af	Japan	AB938026
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	AF74	Af	Japan	AB938032
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	AF96	Af	Japan	AB938042
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	EZA	Ac	NA	EU220394

<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	NL104-2	Ac	NA	EU220398
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	UR17-8	Ac	NA	EU220399
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fot-Yoko3	Ac	NA	EU220400
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	UR17-5	Ac	NA	EU220401
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Foc-06	Ac	NA	EU220402
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	NL106-2	Ac	NA	EU220404
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	STEU6639	Ac	South Africa	GU165891
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	STEU6643	Ac	South Africa	GU165895
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	STEU6663	Ac	South Africa	GU165934
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	STEU6665	Ac	South Africa	GU165936
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	STEU6669	Ac	South Africa	GU165940
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	STEU6671	Ac	South Africa	GU165941
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	STEU6690	Ac	South Africa	GU165960
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fox006	Ac	Finland	KT239475
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fox072a	Ac	Finland	KT239476
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fox125a	Ac	Finland	KT239473
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fox194	Ac	Finland	KT239474
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fox212	Ac	Finland	KT239479
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	Fox215f	Ac	Finland	KT239478
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	LMSA 1.09.131	Ta	NA	JF278593
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	WF42	Ta	China	KP054290
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	WF50	Ta	China	KP054288
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	G13AY2-31	Ta	China	KX663603
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	G14WX2-5	Ta	China	KX702531
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	R6.7	Ta	Mexico	KU508359
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	N369	Ta	South Africa	MG588085
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	TK22	Zm	Malaysia	KF575348
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	798CS	Zm	Mexico	KR905564
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	mdae57	Zm	Iran	MG734611
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	c7-3	Zm	China	MH448804
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	x1-4	Zm	China	MH448805
<i>tef-1a</i>	<i>F. proliferatum</i>	NRRL 52743	NA	NA	JF740819
<i>tef-1a</i>	<i>F. oxysporum</i>	NRRL 46589	NA	NA	FJ985438
<i>tef-1a</i>	<i>F. verticillioides</i>	NRRL 25117	NA	NA	JF740743
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA20-E01	As	France	MW051832
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA37-E09	As	France	MW051833
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA74-E05	As	France	MW051834
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA76-E08	As	France	MW051835
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA79-E05	As	France	MW051836

IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA89-E01	As	France	MW051837
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA89-E02	As	France	MW051838
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA90-E01	As	France	MW051839
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA122-E11	As	France	MW051840
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA205-E01	As	France	MW051841
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA207-E08	As	France	MW051842
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA216-E08	As	France	MW051843
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA256-E05	As	France	MW051844
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FA315-E08	As	France	MW051845
IGS	<i>F. proliferatum</i>	Fp101	Ta	France	GQ495206
IGS	<i>F. proliferatum</i>	Fp102	Ta	France	GQ495207
IGS	<i>F. proliferatum</i>	Fp103	Ta	France	GQ495208
IGS	<i>F. proliferatum</i>	Fp175	Ta	France	GQ495209
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpB12	Hv	Spain	GQ495212
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpB15	Hv	Spain	GQ495213
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpB20	Hv	Spain	GQ495214
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpB21	Hv	Spain	GQ495215
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpB22	Hv	Spain	GQ495216
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpB23	Hv	Spain	GQ495217
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpC3	Zm	Spain	GQ495218
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpC24	Zm	Spain	GQ495219
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpO24	Zm	Spain	GQ495220
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpMM1-1	Zm	Spain	GQ495193
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpMM1-2	Zm	Spain	GQ495211
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpMM1-3	Zm	Spain	GQ495194
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpMM3-1	Zm	Spain	GQ495195
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpMM4-1	Zm	Spain	GQ495196
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpMM4-2	Zm	Spain	GQ495197
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpMM6-1	Zm	Spain	GQ495198
IGS	<i>F. proliferatum</i>	FpMM6-2	Zm	Spain	GQ495199
IGS	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 1506	Zm	Italy	GQ495181
IGS	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 2191	Zm	Italy	GQ495183
IGS	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 2298	Zm	Italy	GQ495184
IGS	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 1682	Zm	Canada	GQ495182
IGS	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 2620	Zm	Slovakia	GQ495187
IGS	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 2644	Zm	Slovakia	GQ495188
IGS	<i>F. proliferatum</i>	Gf26	P	Spain	GQ495200
IGS	<i>F. proliferatum</i>	Gf29	P	Spain	GQ495201
IGS	<i>F. proliferatum</i>	Gf31	P	Spain	GQ495202

<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	Gf33	<i>P</i>	Spain	GQ495203
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	Gf34	<i>P</i>	Spain	GQ495204
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	Gf37	<i>Ms</i>	Ecuador	GQ495205
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 1451	<i>Ao</i>	Italy	GQ495178
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 1456	<i>Ao</i>	Italy	GQ495179
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 1486	<i>Ao</i>	Italy	GQ495180
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 2341	<i>Pd</i>	Saudi Arabia	GQ495185
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 2343	<i>Pd</i>	Saudi Arabia	GQ495186
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 4285	<i>Pc</i>	Spain	GQ495189
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 4291	<i>Pr</i>	Spain	GQ495190
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 4293	<i>Ch</i>	Spain	GQ495191
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	ITEM 4306	<i>W</i>	Spain	GQ495192
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	Fp2287	NA	NA	GQ495210
<i>IGS</i>	<i>F. proliferatum</i>	MPD 4853	NA	NA	GQ495221
<i>IGS</i>	<i>F. verticillioides</i>	FvMM2-4	<i>Zm</i>	Spain	GQ495173

522 **Table 3.** Distribution of the strains used in this study in the different haplotypes according to the
523 nucleotide sequence of a 574-bp region of the translation elongation factor 1 alpha gene
524 (tef-1 α). Nearly all strains were isolated from garlic cloves from French production regions unless
525 indicated otherwise in the table.

Haplotype	Number of strains in this study					Species ^b
	Total	Tested for pathogenicity ^a	From non-garlic source	From garlic leaf debris	From garlic outside of France	
1	892	96	0	0	6	<i>F. proliferatum</i>
2	74	4	0	0	1	<i>F. proliferatum</i>
3	38	6	4	0	0	<i>F. proliferatum</i>
4	31	5	1	2	3	<i>F. oxysporum</i>
5	28	1	2	2	1	<i>F. oxysporum</i>
6	24	1	0	0	1	<i>F. proliferatum</i>
7	24	4	0	0	5	<i>F. proliferatum</i>
8	15	0	1	0	0	<i>F. oxysporum</i>
9	14	1	1	0	0	<i>F. proliferatum</i>
10	7	1	0	0	1	<i>F. proliferatum</i>
11	5	0	4	0	1	<i>F. proliferatum</i>
12	5	1	2	0	0	<i>F. proliferatum</i>
13	3	0	0	0	0	<i>F. oxysporum</i>
14	2	0	0	0	0	<i>F. oxysporum</i>
15	2	0	0	0	0	<i>F. oxysporum</i>
16	2	0	0	1	0	<i>F. oxysporum</i>
17	2	0	0	0	1	<i>F. oxysporum</i>
18	2	0	0	0	0	<i>F. proliferatum</i>
19	1	0	0	0	0	<i>F. proliferatum</i>
20	1	0	0	0	0	<i>F. proliferatum</i>
21	1	0	0	0	1	<i>F. proliferatum</i>
22	1	0	1	0	0	<i>F. proliferatum</i>
23	1	0	1	0	0	<i>F. proliferatum</i>
24	1	0	0	0	0	<i>F. proliferatum</i>
25	1	0	0	0	0	<i>F. proliferatum</i>
26	1	0	0	0	0	<i>F. proliferatum</i>
27	1	0	1	0	0	<i>F. proliferatum</i>
28	1	1	0	0	0	<i>F. proliferatum</i>
29	1	0	0	1	0	<i>F. tricinctum / F. accuminatum</i>
30	1	0	1	0	0	<i>F. solani</i>
31	1	0	1	0	0	<i>F. solani</i>

526

527 ^aStrains were randomly selected for tests of aggressiveness on garlic without prior knowledge of

528 their haplotype. Aggressiveness tests were conducted in 18 blocks over 1 year under comparable
 529 conditions (on cultivar Edenrose, inoculum of 10^6 spores.ml⁻¹, incubation at 23 °C) and the
 530 behavior of all strains was compared to the same reference strain FA3-E01 used in all blocks.

531 ^bSpecies identification is based on similarity with reference strains in phylogenetic analyses and
 532 according to comparison with databases of *Fusarium* MLST (<https://Fusarium.mycobank.org/>)
 533 and *Fusarium* ID (<http://isolate.Fusariumdb.org/blast.php>).

534

535 **Table 4.** Variability in the aggressiveness index of *F. proliferatum* strains in relation with different
 536 factors: the type of garlic, the basin of production and the cropping season or with the strain factor
 537 alone. df: degree of freedom. MS: Mean Square.

Factor	df	MS	p-value
<i>Generalized linear model (p<10⁻¹⁶, R² = 0.15)</i>			
Year	2	13560.3	10 ⁻¹¹
Basin	1	27216.1	10 ⁻¹²
Type	2	2822.6	0,07
Year x Basin	2	15391.1	10 ⁻¹²
Year x Type	4	10552.7	10 ⁻¹⁵
Basin x Type	2	11379.5	10 ⁻⁹
<i>Linear model (p<10⁻¹⁶, R² = 0.59)</i>			
Strain	121	5185	<10 ⁻¹⁶

538

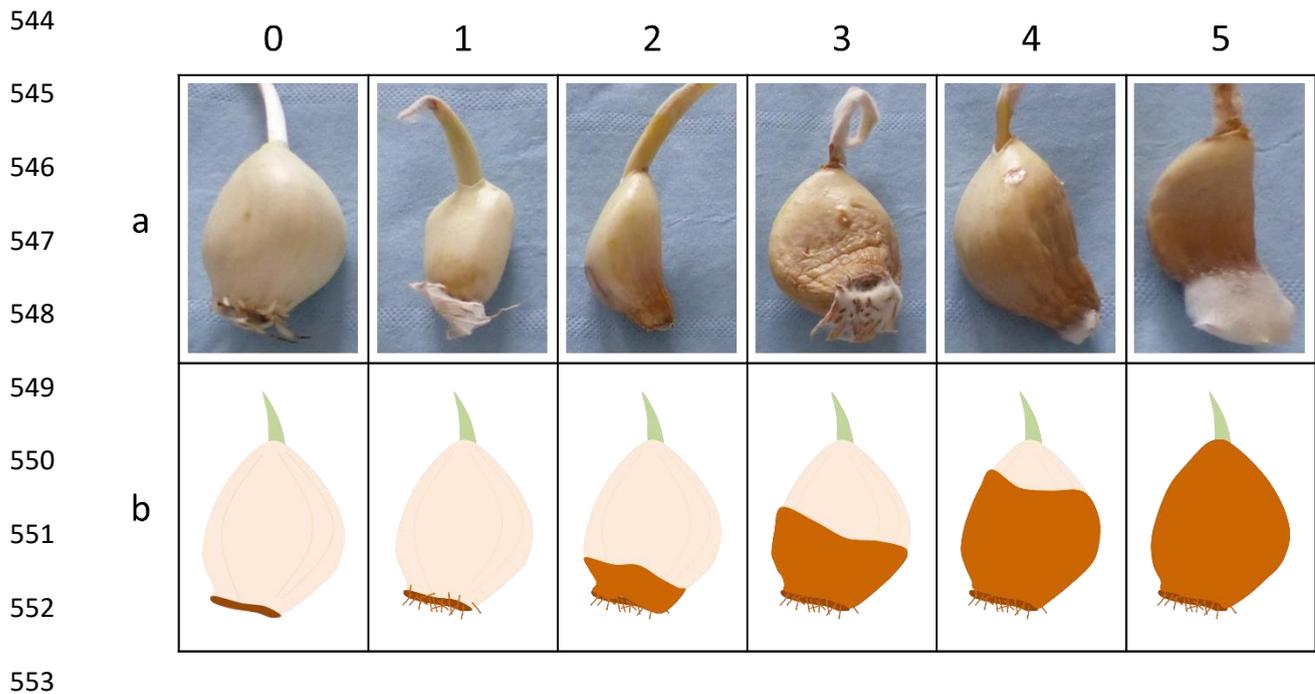
539

540

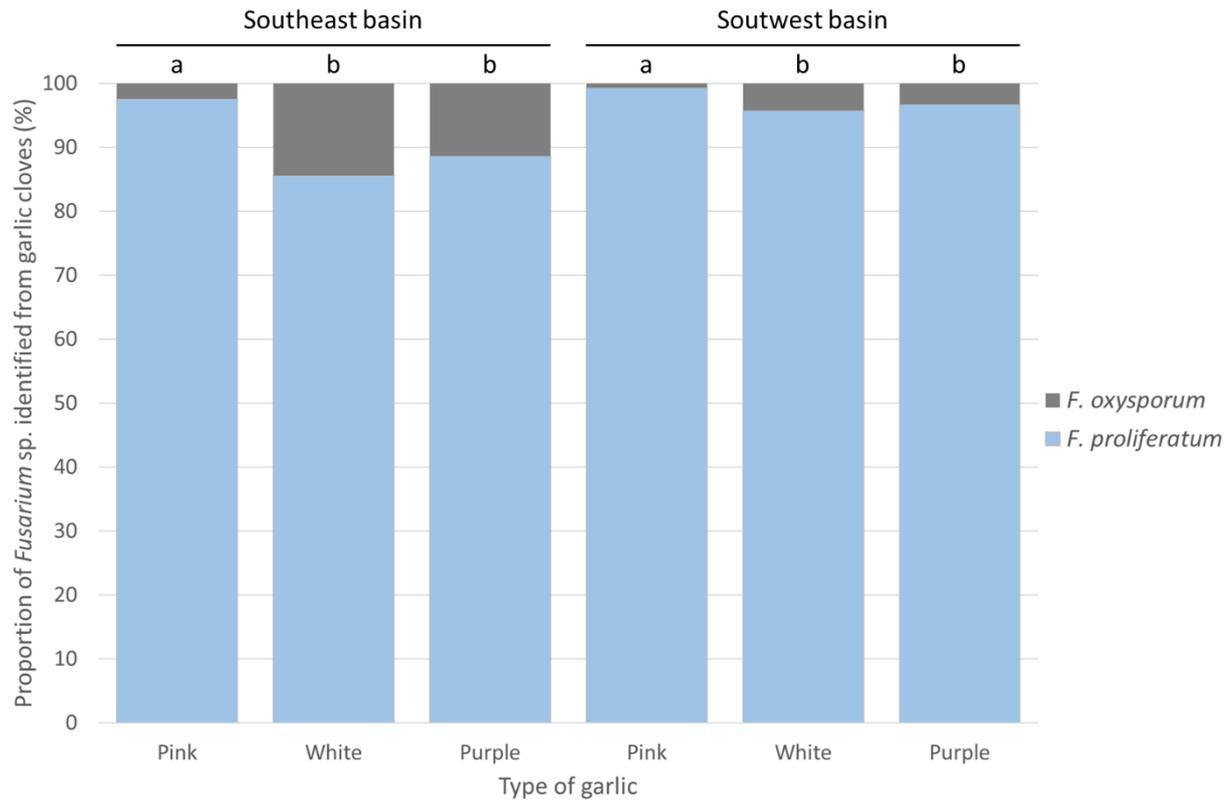
541

542

543



554 **Figure 1.** Symptoms notation scale for garlic cloves, pictured (a) and schematized (b).
 555 0: Absence of symptoms. 1: Mycelium on basal plate. 2: Browning on 25% of the clove.
 556 3: Browning of 50% of the clove. 4: Browning of 75% of the clove. 5: Browning of the entire
 557 surface of the clove. A bonus of 0,5 was added if the browning also started at the top of the clove
 558 or if more than 3 brown spots were found on the clove.



559

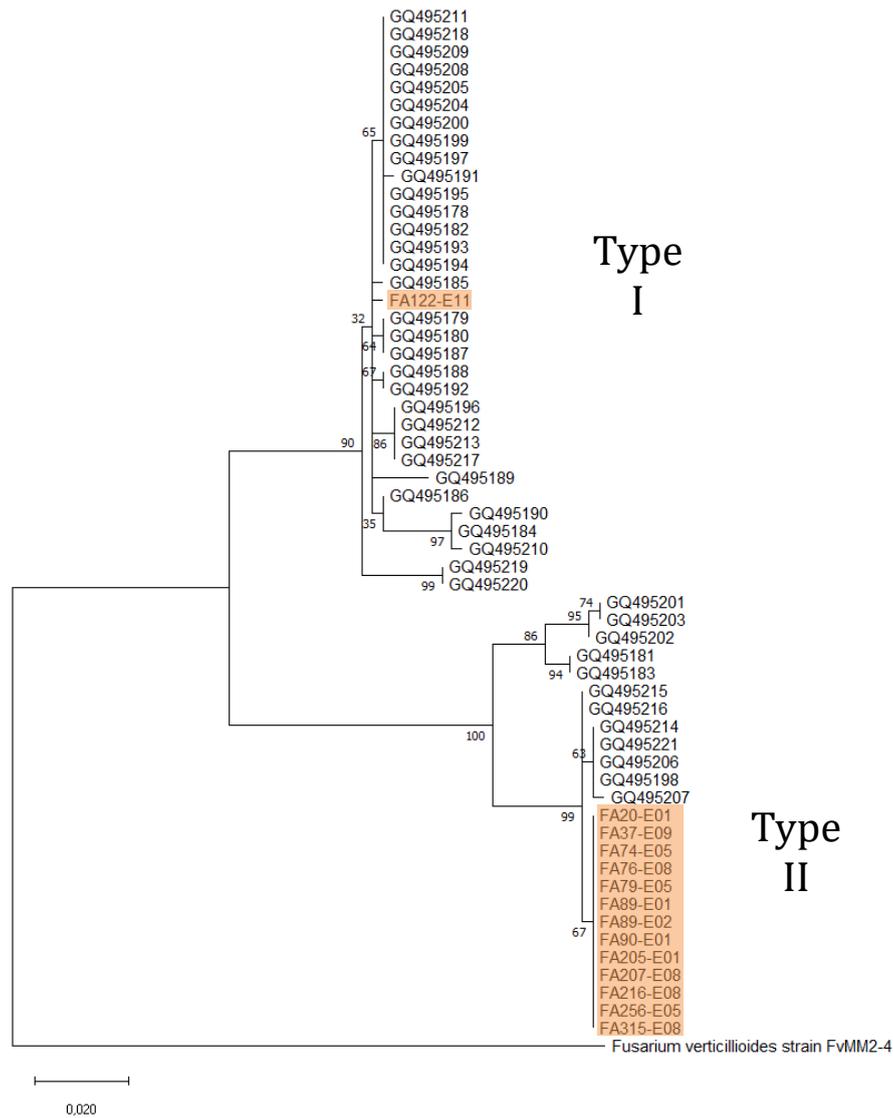
560

561 **Figure 2.** Proportions of *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* isolated from symptoms of
 562 pink, white and purple garlic cloves harvested in the two major French basins of production.

563 Proportions represented by bars associated with the same letter are not significantly different

564 ($p > 0.05$) based on a Generalized Linear Model.

565



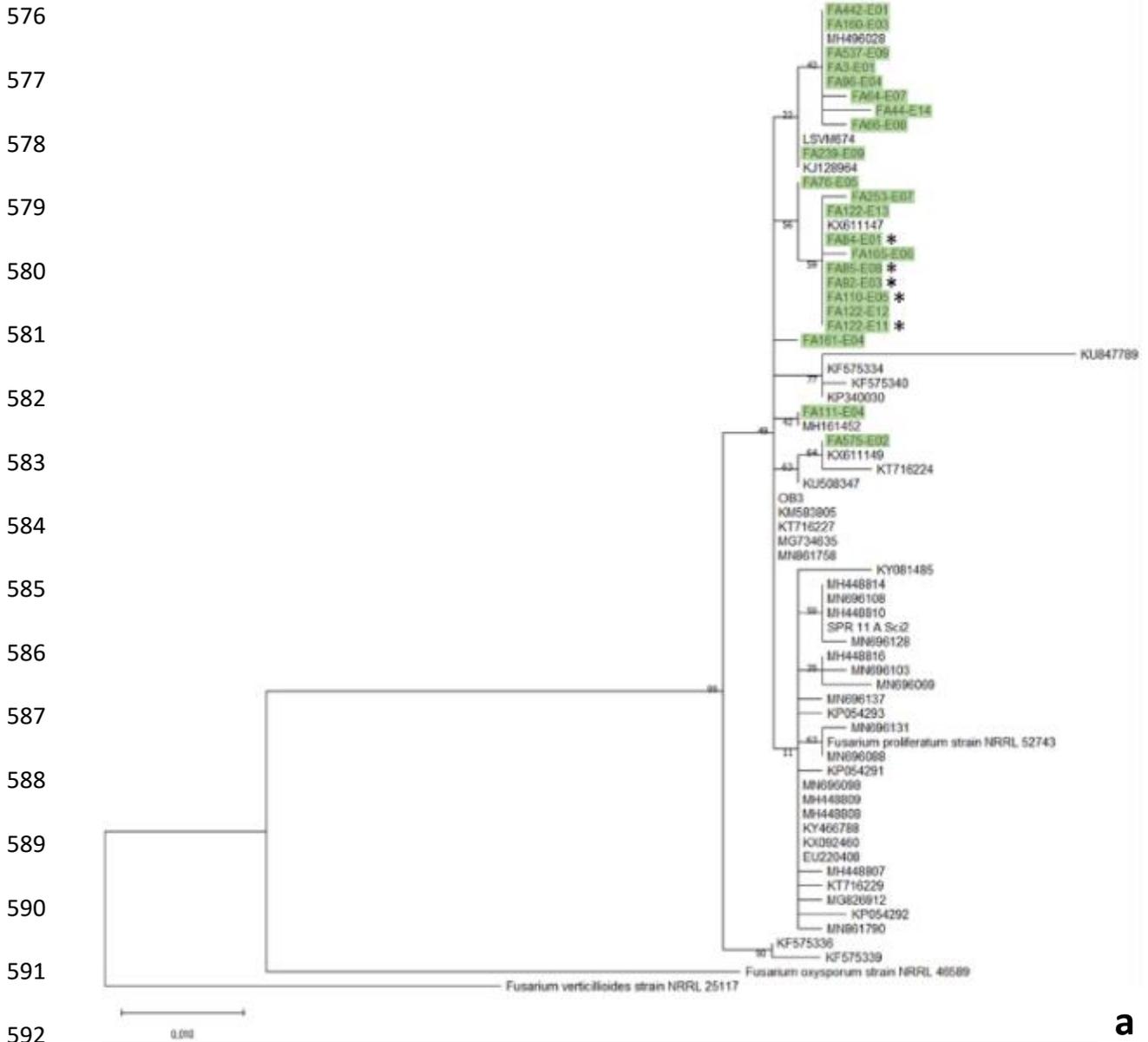
566

567

568 **Figure 3.** Maximum-Likelihood tree obtained from the *F. proliferatum* partial IGS sequences with
 569 the Kimura-2 parameter model. Strains isolated from garlic cloves in France are highlighted.
 570 Bootstrap values (n=1000) are indicated for each node. The scale bar represents a genetic distance
 571 of 0.02. *Fusarium verticillioides* FvMM2-4 sequence (Jurado *et al.*, 2012) was used as an
 572 outgroup. Type I and II are monophyletic but non-orthologous groups previously described by
 573 O'Donnell *et al.* (1997).

574

575



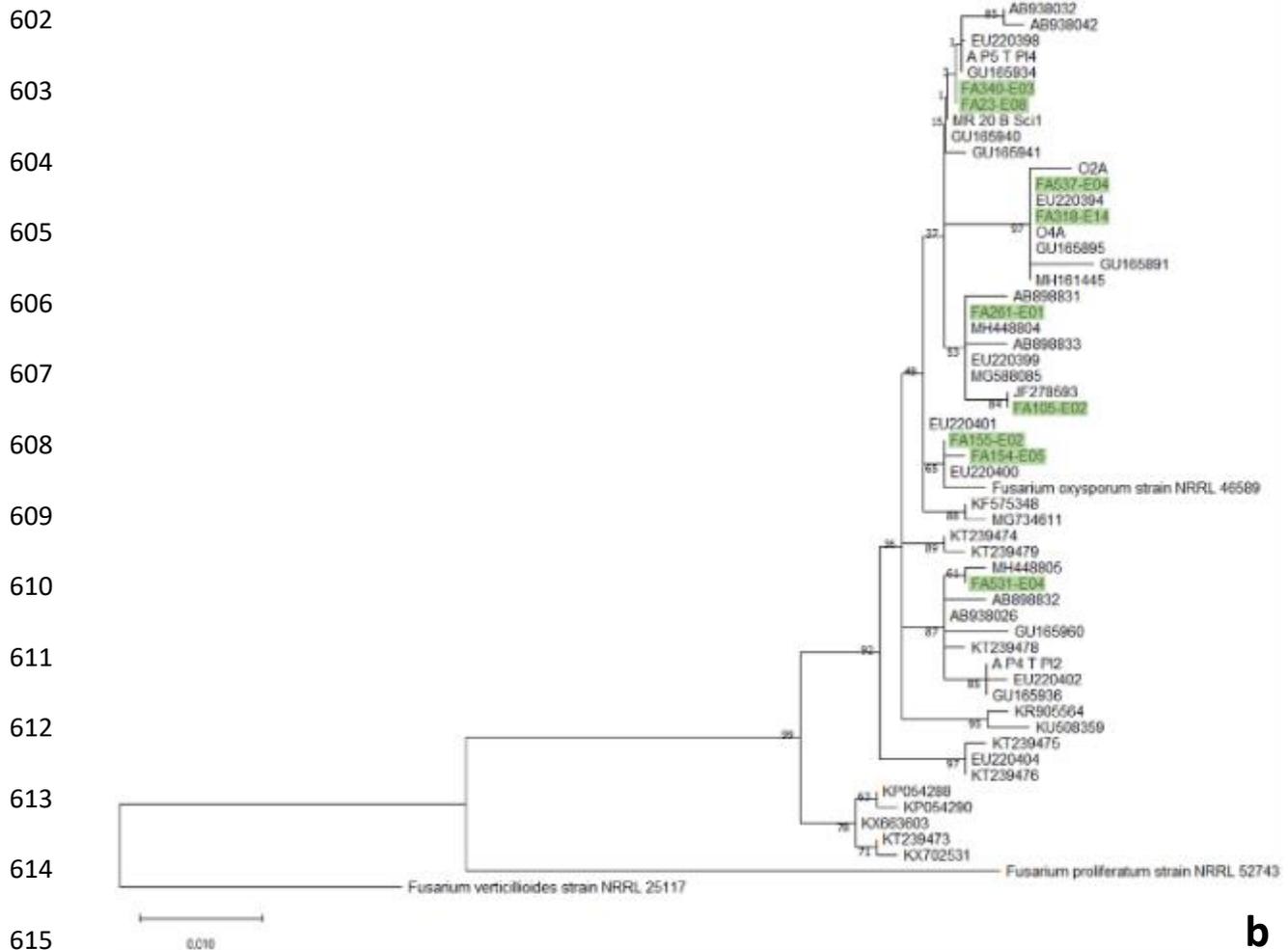
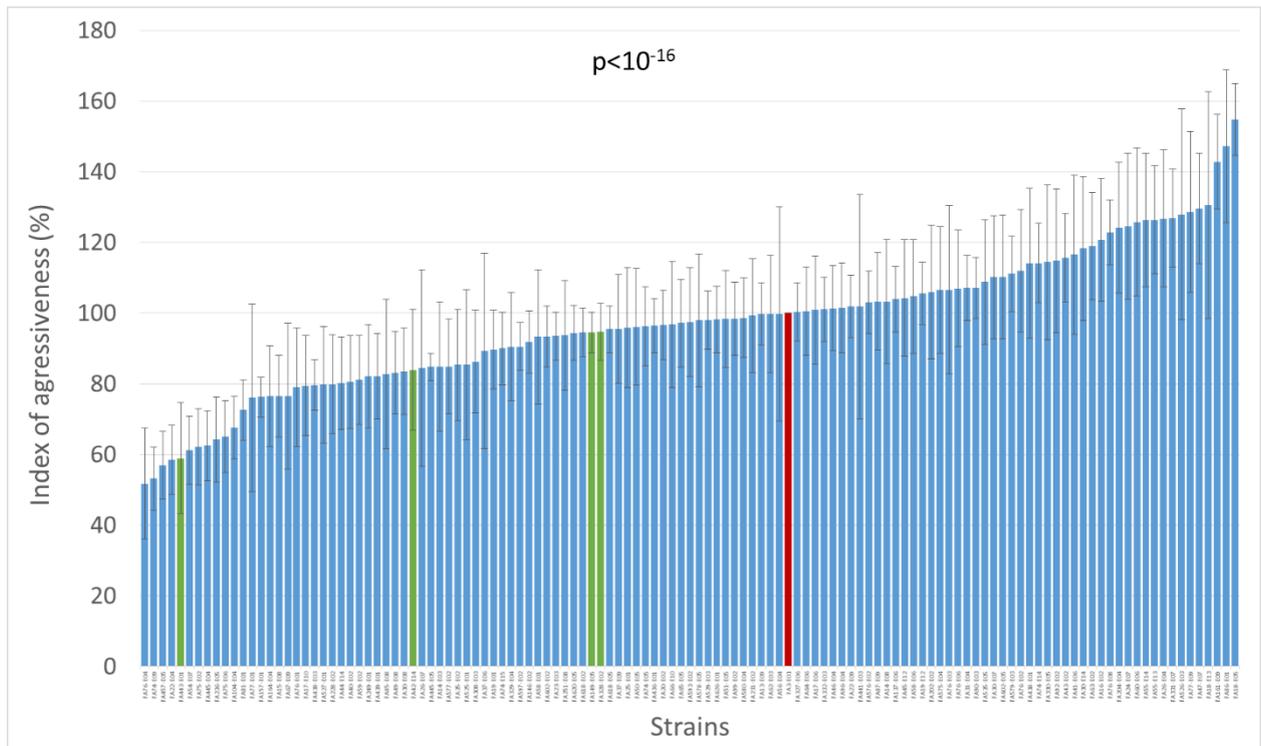


Figure 4. Maximum-Likelihood trees obtained from the *Fusarium proliferatum* (a) and *F. oxysporum* (b) partial *tef-1α* region sequences with the Kimura-2 model and discrete gamma distribution. Strains isolated from garlic cloves in France are highlighted. Asterisks indicate strains that carried a SNP in both the *rpb1* and *rpb2* regions. Bootstrap values (n=1000) are indicated for each node. The scale bar represents a genetic distance of 0.01. *F. verticillioides* strain NRRL 25117 sequence from the ARS culture collection (<https://nrrl.ncaur.usda.gov/>) was used as an outgroup in both trees.



628

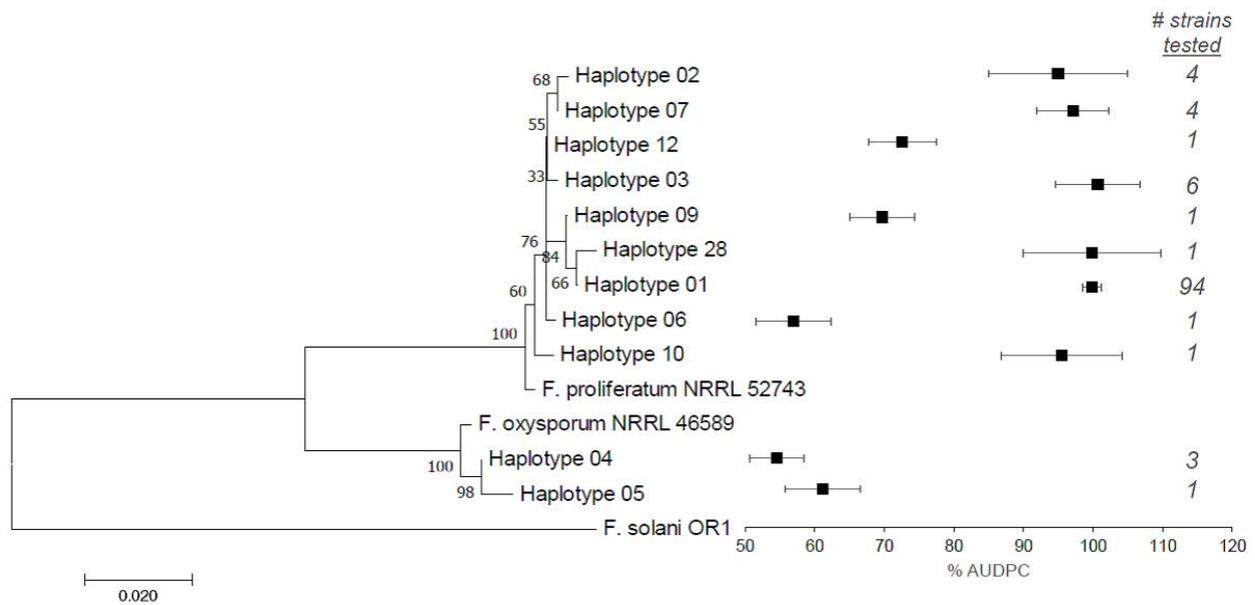
629 **Figure 5.** Distribution of the aggressiveness in % relative to the reference strain FA3-01 (in red)
 630 of 122 *Fusarium proliferatum* strains and 4 *F. oxysporum* strains (in green) on pink garlic. Each
 631 histogram represents the mean of twelve values. Verticals bars indicate the standard deviation of
 632 the mean.

633

634

635

636



637

638 **Figure 6.** Neighbor-joining tree obtained with the *tef-1α* sequences of 117 out of 126 *Fusarium*
 639 spp. strains tested for aggressiveness on garlic. The amount of disease induced, expressed as the
 640 percent of the area under the disease progress curve (% AUDPC) relative to reference strain is
 641 indicated for the 11 haplotypes described in the tree. The mean and 95 % confidence intervals of
 642 the % AUDPC for all strains tested (accounting of the 12 replicate inoculations per strain for all
 643 strains per haplotype) are indicated for each haplotype (ANOVA, $p < 10^{-2}$).

644

Chapitre 3 : Interactions hôte-pathogène

Avant-propos

Le manque de connaissances sur le cycle de développement de *Fusarium proliferatum* est un véritable frein dans la compréhension du développement de la pourriture de l'ail et donc dans le développement d'une méthode de lutte durable. A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à la pénétration de l'agent pathogène au sein de la matrice ail. L'objectif de ces travaux ont été de comprendre comment, et au bout de combien de temps, *F. proliferatum* infecte les bulbes et les dégradations tissulaires induites. Essentiellement connu comme champignon pathogène tellurique, les observations microscopiques ont été focalisées sur la zone du plateau racinaire.

Ce travail a été réalisé en partenariat avec le Pr. Mohamed EL MAATAOUI et Sandrine LAURENT d'Avignon Université pour la partie microscopie optique et Isabelle BORNARD de la plateforme de microscopie 3A d'INRAE Avignon pour la partie microscopie électronique. Il s'est déroulé dans le cadre du projet ROCAIL (Caractérisation des *Fusarium* sp. engendrant des pertes sur ail rose en conservation) financé par la Structure Fédérative de Recherche TERSYS.



Citation: P.L. Chrétien, S. Laurent, I. Bornard, C. Troulet, M. El Maâtaoui, C. Leyronas (2020) Unraveling the infection process of garlic by *Fusarium proliferatum*, the causal agent of root rot. *Phytopathologia Mediterranea* 59(2): 285-293. DOI: 10.14601/Phyto-11103

Accepted: June 1, 2020

Published: August 31, 2020

Copyright: © 2020 P.L. Chrétien, S. Laurent, I. Bornard, C. Troulet, M. El Maâtaoui, C. Leyronas. This is an open access, peer-reviewed article published by Firenze University Press (<http://www.fupress.com/pm>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Competing Interests: The Author(s) declare(s) no conflict of interest.

Editor: Antonio Moretti, National Research Council, (CNR), Bari, Italy.

Author's contributions: PLC, IB, SL, CT & MEM performed experiments and analysed the results.

IB & PLC performed the electron microscopy experiments and realized the figures.

PLC, SL, MEM and CL participated to the redaction of the manuscript.

CL led the research project and supervised the redaction of the manuscript.

Research Papers

Unraveling the infection process of garlic by *Fusarium proliferatum*, the causal agent of root rot

PAUL L. CHRÉTIEN¹, SANDRINE LAURENT², ISABELLE BORNARD¹, CLAIRE TROULET¹, MOHAMED EL MAÂTAOUI², CHRISTEL LEYRONAS^{1,*}

¹ INRAE, Pathologie Végétale, 84140 Montfavet, France

² Avignon Université, Qualisud UMR95, 84000 Avignon, France

*Corresponding author: christel.leyronas@inrae.fr

Summary. Since the mid-2000s, and despite demanding production rules, *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg has been found on garlic heads during storage inducing root and bulbs rots. Brown spots on the surface of garlic cloves and water-soaking of heads were noted. Histological observations of the fungus during early stages of infection were made from clove to the cellular levels. *Fusarium proliferatum* germinates, colonizes roots and degrades the outer root and parenchyma cell layers 72 h post inoculation. Conidium germination and host colonization are facilitated by the emergence of garlic roots, creating cellular debris and natural wounds. Hyphae of the pathogen did not penetrate healthy host cells and appeared to degrade them before penetration. These results provide understanding of when and how quickly *F. proliferatum* penetrates garlic bulbs. This is a primary step towards elucidating the life cycle of this pathogen during the garlic drying process, and development of an efficient and sustainable bulb rot management strategy.

Keywords. Histology, electron microscopy, garlic rot, host-parasite interaction.

INTRODUCTION

From Hippocratic medicine (Totelin 2015) to modern and sophisticated molecular cuisine (This 2006), garlic has been used throughout history and has a special place in human civilization. World garlic production reached a peak of more than 26 million tons produced in 2016, rising from 11 million in 2000 (FAOSTAT, 2018). Global average price is \$US 2.35 kg⁻¹ and continues to increase (Tridge, 2019). China produces and exports the most of the world's garlic (80% of world production and 25 millions of tons per year).

France ranks 6th among European producers of garlic, with 21,000 tons produced each year in two main areas of cultivation: the South-East and the South-West of the country. Quality is an important objective for French producers in that French garlic benefits from high quality standards and certification, which ensure control of production such as the restricted geographic areas of production (one AOP – Appellation d'Origine Protégée – and four IGP – Indication Géographique Protégée – labels) (INAO, 2019). For the seed

certification, garlic production in each field must be separated by 5 years, in order to reduce propagation of the nematode *Ditylenchus dipsaci* (Robert and Matthews 1995) and white rot caused by *Sclerotium cepivorum* (Basallote-Ureba and Melero-Vara 1993). All certified varieties are free from *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) and *Leek yellow stripe virus* (LYSV), and have been obtained by meristem culture. In the field, all plants that show differences compared to the source material are destroyed. During all production steps before and after storage, damaged garlic heads are destroyed. Despite these control and certification standards for seed and plants, *Fusarium* rot of garlic emerged in France in approx. 2006 (Ricard 2017). During storage, browning of cloves commences from the basal plates and extends to the tops of the heads. Tissues become soft and water-soaked before complete rotting. Losses are variable: less than 1% in 2006 year, increasing to 25% on average in 2015. Some plots have been more affected than the others (from 1 to 80%), and high losses drastically reduce the volumes sold and therefore the income for producers. In extreme cases, farmers have ceased producing several varieties that were highly susceptible to root rot.

Eight *Fusarium* species have been found on sympomatic garlic, with the majority being *F. proliferatum* followed by *F. oxysporum* and then *F. solani* (Koleva 2004; Stankovic *et al.*, 2007; Ochoa-Fuentes *et al.*, 2012; Moharam *et al.*, 2013; Delgado-Ortiz *et al.*, 2016; Ignjatov *et al.*, 2017). The disease caused by *F. proliferatum* on garlic is common wherever the crop is grown, and was first reported in 2002 in Germany (Seefelder *et al.*, 2002) and in 2003 in North America (Dugan *et al.*, 2003). The number of countries affected by *F. proliferatum* on garlic has increased to include Serbia in 2007 (Stankovic *et al.*, 2007), India in 2012 (Sankar and Babu 2012) and Egypt in 2013 (Moharam *et al.*, 2013). In France, the pathogen was recently identified as *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg in 2018 (Leyronas *et al.*, 2018). *Fusarium proliferatum* is within the *F. fujikuroi* species complex native to Asia (O'Donnell *et al.*, 2013), and is responsible for bulb, root or fruit diseases on many crop plants, including onion (Toit *et al.*, 2003), soybean (Diaz Arias *et al.*, 2011), chive (Yamazaki *et al.*, 2013), lily (Lebiush-Mordechai *et al.*, 2014), welsh onion (Alberti *et al.*, 2017), peach (Xie *et al.*, 2018) and strawberry (Borrero *et al.*, 2019).

There is no officially accepted prophylactic or chemical control method for *Fusarium* spp. on garlic in France. One of the hurdles to developing control methods is the lack of knowledge of the pathogen infection processes into garlic bulbs. Mycelium starts to develop around the basal plates of bulbs where the roots emerge

(Stankovic *et al.*, 2007; Tonti *et al.*, 2012). Fungal growth also occurs on the bulb apices, where the skin cracks as leaves emerge. Then tissues become brown, and wilt from the bottom to the top at a regular rate. Wilting also starts from wounds on the bulb surfaces. Microscope observations have been made of infection of sorghum plants, showing that hyphae of *F. proliferatum* quickly penetrate (about 2 weeks after sowing) the endodermal and xylem parenchyma layers of roots, colonize complete root cortices (Ndambi *et al.*, 2012).

The objectives of the present study were to investigate the infection processes of garlic by *F. proliferatum*, and in particular to determine when and where the pathogen conidia enter host tissues. Observations were focused on the basal parts of the garlic heads, including the roots and tissues around the heads and the basal plates. Using light and electron microscopy, interactions were observed at different scales, from overall aspects to histological levels.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of biological material

Biological material

A *F. proliferatum* strain (FA3-E01) isolated from pink garlic cloves cultivated in France during the summer 2017 was used in this study. This strain was previously purified and added to a laboratory fungal collection, and this strain has been shown to be aggressive on garlic bulbs (Leyronas *et al.*, 2018).

All garlic cloves used in this study were from a single lot of pink garlic from the south of France harvested in late June 2018. The cloves were all asymptomatic at the time of inoculation.

Preparation of conidium suspensions

Inoculum was produced on potato dextrose agar medium (Difco Laboratories) at 21°C under cool white light (12 h photoperiod, 23.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Mycelium plugs were taken from 1-week old cultures and were added on 250 mL capacity Erlenmeyer flasks containing 150 mL of potato dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit). The flasks were placed on a rotary shaker at 100 rpm at 21°C under cool white light (12 h photoperiod, 23.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). After 7 d, the medium was filtered through etamine filters (25–35 μm pores) to remove mycelium fragments and retain microconidia. The concentration was evaluated with a haemocytometer, and

adjusted to 1.0×10^6 conidia mL^{-1} using sterile deionized water. This concentration was known to recreate symptoms on cloves.

Inoculation of garlic cloves

Healthy peeled cloves of pink garlic ($n = 6$) were surface-disinfected with 1% NaOCl for 1 min and rinsed in 3 successive baths of sterile water. Disinfected cloves were soaked in 200 mL of conidial suspension (or sterile water for negative control) inside a beaker placed on a rotary shaker at 100 rpm for 24 h at 21°C. The cloves were then placed inside a sterile plastic box at 23°C with saturated humidity and constant obscurity. Samples were collected after 6, 12, 24, 48 and 72 h for microscopic analyses.

Observations of samples at different scales

Sample preparation for light microscopy

All samples were first observed with an illuminated binocular magnifier. General structures of cloves, basal plates and tissues were described.

Control (uninoculated) and inoculated garlic cloves were longitudinally sliced and fixed in FAA (1/1/8, V/V/V, 37% formalin/glacial acetic acid/90% ethanol). To promote penetration of the fixative products, samples were subjected to vacuum for 20 min. After 48 h of fixation, the specimens were rinsed in distilled water and stored in 70% ethanol at 4°C until required. They were then dissected to collect 5 x 5 mm basal fragments that were processed for cytohistology. Briefly, the samples were dehydrated in a graded ethanol series (80-100%) and infiltrated in methacrylate resin (Kit Technovit 7100, Heraeus-Kulzer GmbH), according to the manufacturer instructions). Sections (3 μm thick) were serially cut using a retraction microtome (Supercut 2065, Reichert-Young), and collected on microscope slides. For routine observations, sections were stained by toluidine blue, a metachromatic dye (Clark, 1981). For each treatment, sections were stained to visualize major cell components using periodic acid-Schiff's reagent (PAS) for polysaccharides (starch and cellulose) (pink) and naphthol blue-black (NBB) for protein (blue) (El Maâtaoui and Pichot 1999). All microscope analyses were performed using a Leica DMR photomicroscope equipped for bright field, dark field, phase contrast and UV illuminations. Images were captured using a Leica DFC 300 FX digital camera and processed using Leica LAS software. For each treatment, approx. 60 serial sections from

five different garlic cloves were analyzed, and representative images were selected to illustrate the major histological traits. Attention was paid to initiation of infection, mycelium progression in clove tissues, and cyto-pathological effects.

Sample preparation for scanning electron microscopy

Garlic tissue samples were fixed in 2.5% (v/w) glutaraldehyde for 1 h and then washed three times with 0.2M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). The samples were then dehydrated with a series of ethanol baths of increasing concentration (30% to 100%). The ethanol was replaced by HMDS until it completely invaded the samples and evaporated. After drying, the samples were mounted on aluminium stubs, sputter-coated with a layer of gold, and then observed with an FEI/Philips XL30 scanning electron microscope at 10 kV.

RESULTS

Structure of healthy garlic tissues

Each peeled garlic clove usually had bulbil-like morphostructure, with a basal plate supporting a fleshy external leaf or scale (Figure 1A) attached to a short stem (not shown) that bore numerous root primordia (Figure 1B). After clove germination, root emergence took place between the external scale and the abscission zone of the basal plate, thus enlarging the space at the junction between the external scale and the abscission zone. Microscope analyses of sections from the abscission zone showed that this area was composed of thick-walled, dead cells (Figure 1C). Condensation and retraction of cytoplasm and degradation of chromatin inside nuclei indicated that the cells were dying. Inside cloves, roots embedded in leaf parenchyma (Figure 1D) created each an aperture and many dead collapsed cells while emerging (Figure 1E).

Progression of *Fusarium proliferatum* in cloves

After 72 hpi, hyphae adhered and colonized the junctions between roots and parenchyma of external scale edges (Figure 2A). Inoculated conidia germinated on the surface of epidermis cells (Figure 2B). Mycelium then invaded the entire area composed of the parenchyma of the external scale and suberized tissue (Figure 2C). Abscission zones (AZ) were covered with white mycelium (not shown). Microscope analyses of these areas

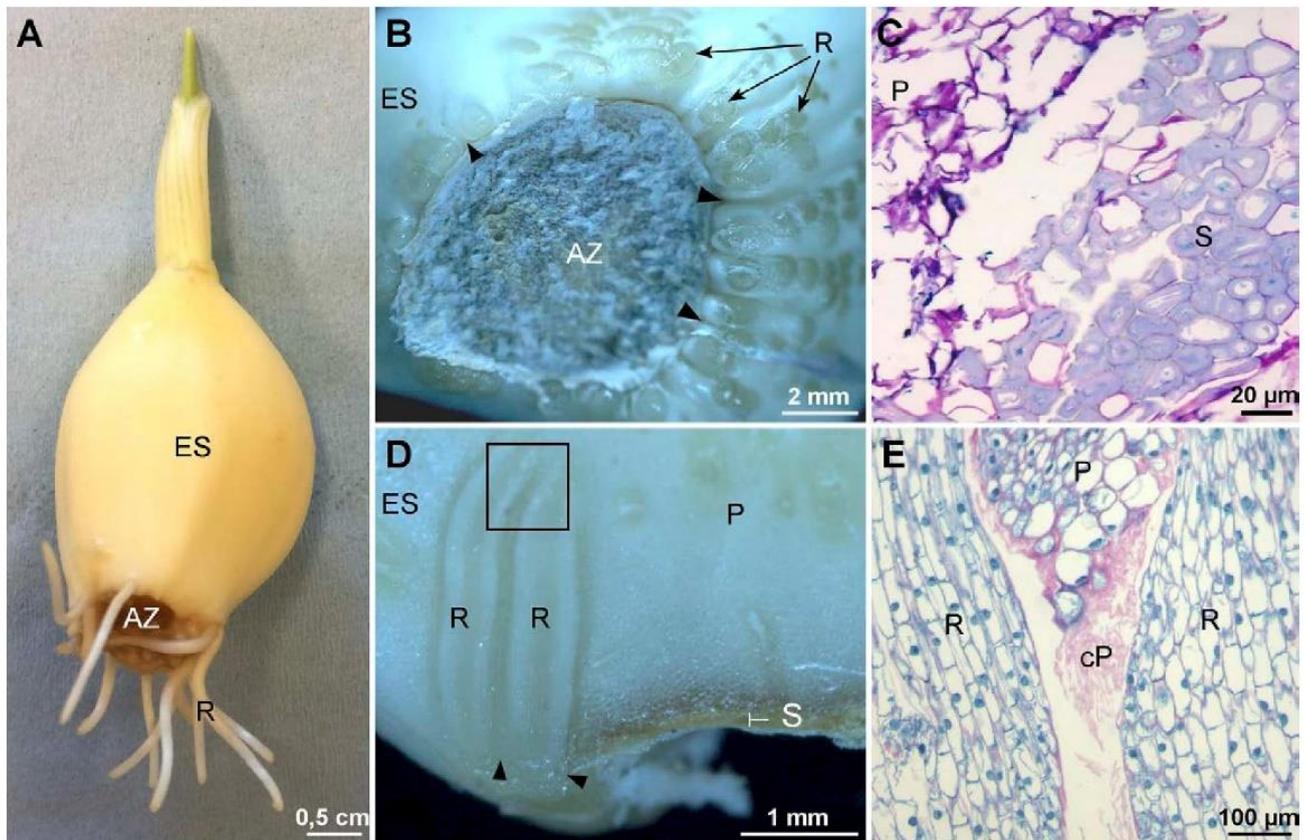


Figure 1. Morphology and structure of healthy garlic cloves. A, Peeled clove after 3 d in sterile distilled water. B, Abscission zone. C, Section of the abscission zone. D, Longitudinal section of the basal part of an ungerminated clove. E, Section from the area indicated by a square in D. ES: external scale, AZ: abscission zone, R: roots, P: parenchyma, S: thick-walled cells, cP: collapsed parenchymatous cells. Black arrowheads indicate junctions between roots and between AZ boundaries and root primordia. A, B and D, Stereomicrographs. C and E, Light micrographs of PAS/NBB stained samples.

showed dense mycelium growth in the cellular debris close to suberized tissue (Figure 2D). On each clove, a coat of white hyphae appeared all around the roots from the base to the top and at the edge of the external scale (Figure 2E). Specific infection structures were not observed. *Fusarium proliferatum* proliferated as mycelium in a saprophyte-like manner.

Browning of cloves progressed from the base to the top at 72 hpi. The boundary between healthy and diseased tissues was easily discernible, and mycelium entirely covered roots (Figure 3A). At 48 hpi, germinated conidia and mycelium were observed against de-structured suberized regions (Fig. 3B). The pathogen was also observed to be growing inside collapsed dead cells from the external clove scales resulting from the root emergence (Figure 3C). At 72 hpi and beneath the mycelium coat, root tissues were degraded and hyphae penetrated only inside the first layers of dead cells (Figure 3D).

De-structuring of clove cell layers

In tissues infected by *F. proliferatum*, the cells died and shrank particularly within the parenchyma of external scales and in the superficial layers of the roots (Figure 4A and B). Three levels of degraded tissue could be discerned; entirely degraded tissue, collapsed cells filled with secondary metabolites (deep blue) and dead matrices of cells filled with fungal mycelium (III), a border between dead and healthy cells (II) and healthy parenchyma cells (I) (Figure 4B). The dead cells accumulated proteins, as indicated by the azure colour of their contents.

DISCUSSION

This study has clarified the pathway by which *F. proliferatum* enters garlic cloves. *Fusarium* species (e.g. *F. oxysporum*, *F. solani* and *F. verticillioides*) are well

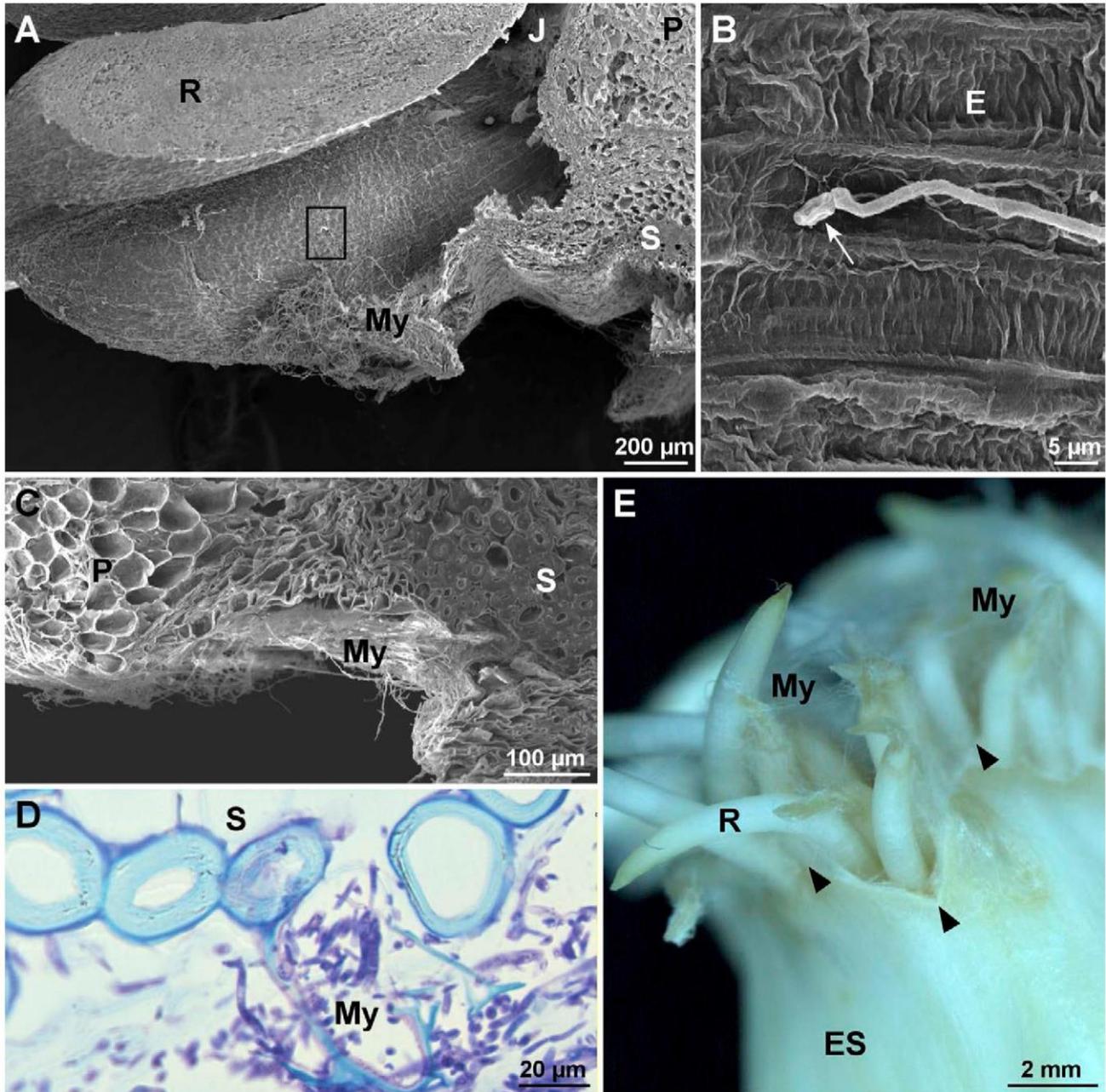


Figure 2. Mycelium development of *Fusarium proliferatum*. A, SEM micrograph of a germinating garlic root. B, High magnification of the area indicated by the square in A. C, Section of the basal part of an infected clove. D, Detail of suberized tissue. E, Basal part of a clove 72 h post inoculation. R: roots, J: junction, P: parenchyma, My: mycelium, E: epidermis, S: thick-walled cells, ES: external scale. White arrow in B indicates a germinated conidium. Black arrowheads in E indicate junctions between roots and between the abscission zone boundary and root primordia. A and B, Scanning electron micrographs. D, Light micrograph after TB staining. E, Stereomicrograph.

known for their capacity to infect vascular and root tissues causing wilt on plants (Agrios, 2005). In the present study, rapid degradation of garlic root cells was observed after inoculation with *F. proliferatum*, but the pathogen did not invade host conductive tissues. *Fusarium pro-*

liferatum progressed from the points of infection in all directions. Proliferation of the fungus in garlic tissue was reduced in the presence of thick-walled cells, and was directed toward the parenchyma. Although this pathogen possesses the enzymes required to degrade

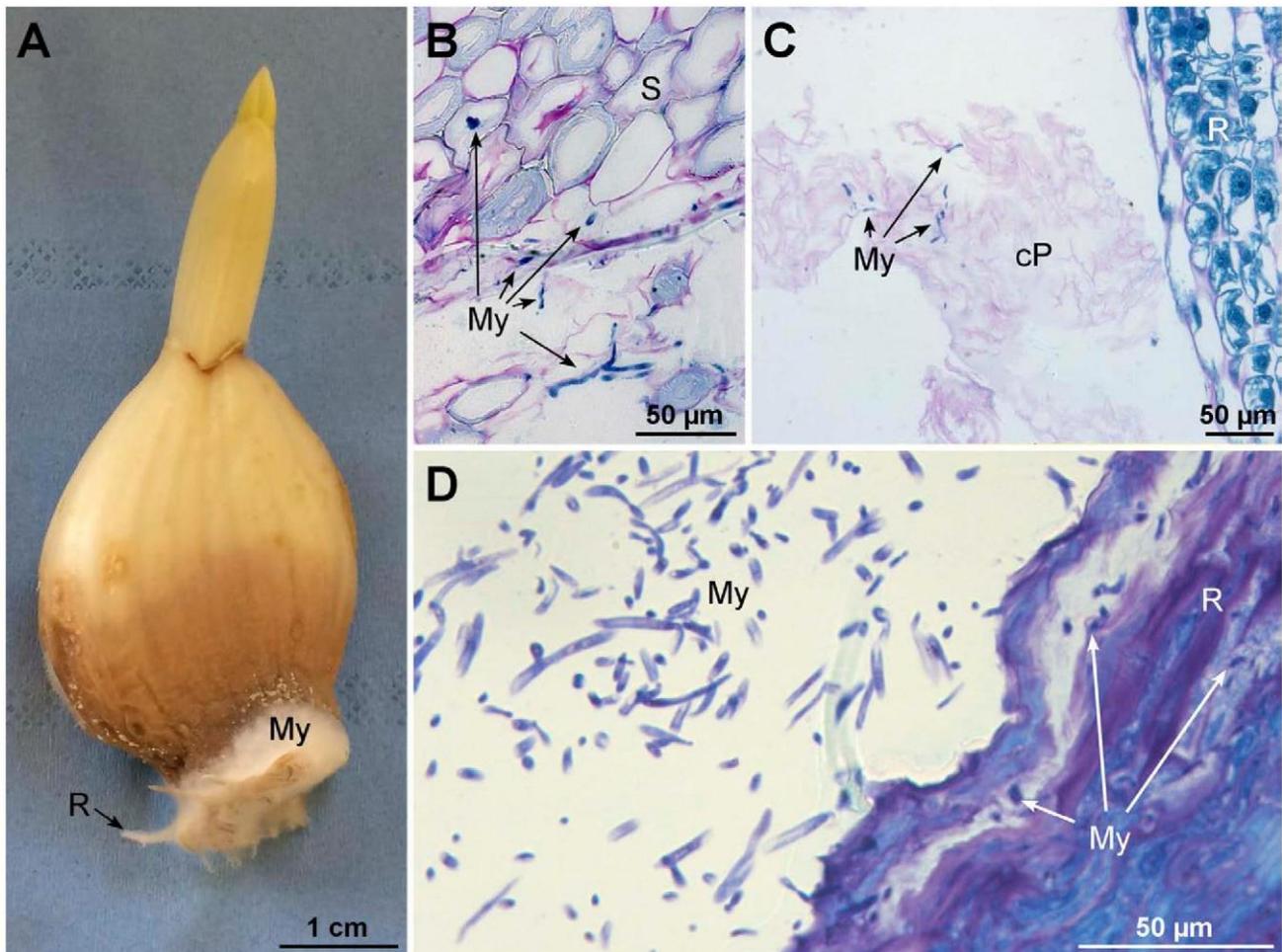


Figure 3. Morphology and cytohistological aspects of *Fusarium proliferatum* infected garlic cloves 48–72 h post inoculation. A, Image of an infected clove. B and C, Micrographs illustrating the progression of clove infection 48 h post inoculation. D, Detail of the decayed root tissue. R: roots, My: mycelium, S: thick-walled cells, cP: collapsed parenchyma cells. A, Stereomicrograph. B and C, Light micrographs after PAS/NBB staining. D, Light micrograph with TB staining.

suberized cells, such as laccases (Regalado *et al.*, 1999; Hernández Fernaud *et al.*, 2006), chitinases, glucosidases and galactosidases (Keshri and Magan 2000), *F. proliferatum* probably takes the path of least host resistance.

Fusarium proliferatum rapidly infected garlic root tissues before infecting clove tissues. Germination of roots may have triple positive indirect effects on the development of the root rot. First, while emerging, roots degrade parenchyma cells and release cellular debris that may be utilized for growth of the fungus. Second, the physical barrier of the host epidermis breaks and allows penetration of the pathogen into host tissues. In some preliminary experiments, we have observed that *F. proliferatum* was unable to enter through intact garlic epidermis surfaces. Third, the presence of host and non-host roots in the soil are known to induce germination

of fungal conidia and attract hyphae of *F. oxysporum* (Nelson 1981). Further studies could assess if this is also the case for *F. proliferatum* and garlic roots.

In the present study, *F. proliferatum* was observed to colonize decayed host tissues, but not to penetrate healthy cells. Tissues destroyed beyond the margins where fungal growth occurred were seen, indicating that the fungus deployed strategies, such as enzymes and toxin production, to destroy host tissues prior to colonization. The limits between dead and living cells were clearly visible. This could indicate activity of the many organosulfur compounds produced and stored inside garlic cells. These molecules are responsible for the characteristic fragrance of garlic. These compounds, such as alliin, have been widely studied as potential biocontrol agents against fungi, bacteria and

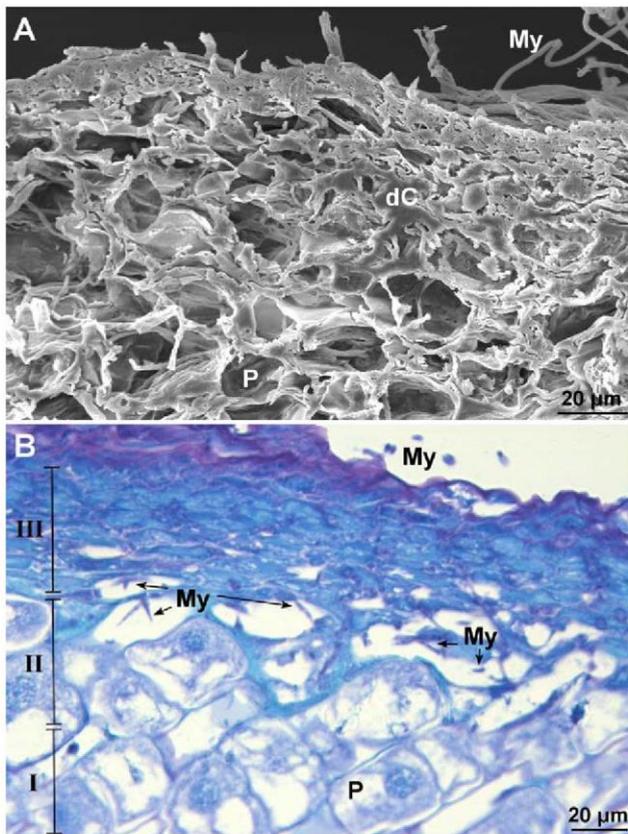


Figure 4. Histopathological effects of *Fusarium proliferatum* on infected clove tissues. A and B, Detail of the first root cells layers 72 h post inoculation. My: mycelium, dC: dead cells, P: parenchyma. A, Scanning electron micrograph. B, Light micrograph after TB staining.

other pests (Curtis *et al.*, 2004). Alliin is synthesized from a precursor molecule (alliin) through the action of alliinase activated when cells are damaged. The fact that *F. proliferatum* is able to grow, colonize and develop on a matrix containing organosulfur compounds was interesting. Previous studies have found that garlic extracts inhibit *F. proliferatum* on culture media at pH 3 to 7 (Chen *et al.*, 2018). One hypothesis to explain pathogenicity is the production of desulfurization enzymes (sulfatases) by some *F. proliferatum* strains (Shvetsova *et al.*, 2015). This overcoming of host resistance could also be linked to glutathione metabolism (Leontiev *et al.*, 2018). Another example of fungi being able to grow in the presence of organosulfur is *Coriolus versicolor* known to degrade this type of compound in wood (Linder 2018). One hypothesis about the emergence of root rot of garlic is that some pathogen strains may have acquired resistance to garlic compounds. In further studies, we will assess the impacts of garlic

extracts on *in vitro* development of several *F. proliferatum* strains, and evaluate the ability of *F. proliferatum* strains, collected from other crops, to develop disease symptoms on garlic.

Like most *Fusarium* spp., *F. proliferatum* has a soil-borne phase. The present study showed that this fungus can penetrate garlic cloves at the outline/contour of their basal plates when the roots emerge. This indicates that *F. proliferatum* remains dormant in the soil, is attracted to germinating garlic cloves (at early stages of their development), and then penetrates through wounds without generating visible symptoms. Airborne phases cannot be excluded. *Fusarium proliferatum* is a prolifically sporulating species, and in Spain, conidia collected in rainwater were shown to be aggressive on garlic (Gil-Serna *et al.*, 2016). In the field, sprouting garlic leaves take funnel shapes, and rainwater is directly led to germinated cloves where the epidermis is weakened. In further experiments, it could be interesting to test independent inoculation of shoots and of the basal plates could be investigated. Knowledge of the origin of inoculum that induces rot on garlic is crucial for development of efficient, sustainable and environmentally-friendly root rot management strategies.

Through of French and European actions, French garlic producers are encouraged to reduce their use of phytosanitary products (European Directive 2009/128/EC). There is a need for efficient alternative disease control methods, among which are aimed at management of garlic root rot. Soil solarization could be explored to control the soil-borne population of *Fusarium* spp. In Japan, this method was efficient for control *Fusarium* wilt of strawberry caused by *F. oxysporum*, in fields and greenhouses (Koike and Gordon 2015). Results could be linked to heat alone or to selection of antagonistic soil microorganisms. In another research, solarization with *Medicago sativa* amendment was shown to be an efficient, non-chemical, method for control of *Fusarium* wilt of cucumber caused by *F. oxysporum* (Yao *et al.*, 2016). Although soil solarization has proved to be efficient against species other than *F. proliferatum*, it would be worth testing this method for garlic crops. The use of biocontrol agents such as bacteria applied on garlic cloves may also be promising. Four strains of *B. subtilis* have been shown to reduce severity of disease caused by *F. proliferatum* strains on garlic (Bjelic *et al.*, 2018).

Biocontrol and solarization need to be applied at the right time, in optimum conditions, to have appropriate activity during or before crop planting. To this end, some of our current studies are focusing on the impacts of abiotic factors on *F. proliferatum* mycelium growth and sporulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the microscopy facilities of the Platform 3A, funded by the European Regional Development Fund, the French Ministry of Research, Higher Education and Innovation, the Provence-Alpes-Côte d'Azur region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon. The authors thank M. Duffaud for her work in the purification of strains included in the laboratory fungal collection. We thank Top'Alliance Alinéa for providing the garlic cloves.

LITERATURE CITED

- Agrios GN, 2005. *Plant Pathology*. 5th edition. Elsevier.
- Alberti I., Prodi A., Montanari M., Paglia G., Asioli C., Nipoti P., 2017. First report of *Fusarium proliferatum* associated with *Allium fistulosum* L. in Italy. *Journal of Plant Diseases and Protection* 125: 231–233.
- Basallote-Ureba M.J., Melero-Vara J.M., 1993. Control of garlic white rot by soil solarization. *Crop Protection* 12: 219–223.
- Bjelić D., Ignjatov M., Marinković J., Milošević D., Nikolić Z., Gvozdanić-Varga J., Karaman M., 2018. *Bacillus* isolates as potential biocontrol agents of *Fusarium* clove rot of garlic. *Zemdirbyste-Agriculture* 105: 369–376.
- Borrero C., Capote N., Gallardo M.A., Avilés M., 2019. First report of vascular wilt caused by *Fusarium proliferatum* on strawberry in Spain. *Plant Disease* 103: 581.
- Clark G., 1981. *Staining Procedures*. 4th Edition. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Chen C., Liu C.-H., Cai J., Zhang W., Qi W.-L., ... Yang Y., 2018. Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts. *Food Control* 86: 117–125.
- Curtis H., Noll U., Störmann J., Slusarenko A.J., 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 79–89.
- Delgado-Ortiz J.C., Ochoa-Fuentes Y.M., Cerna-Chávez E., Beltrán-Beache M., Rodríguez-Guerra R., Aguirre-Urbe L.A., Vázquez-Martínez O., 2016. Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. *Revista Argentina de Microbiología* 48: 222–228.
- Díaz Arias M.M., Munkvold G.P., Leandro L. F., 2011. First Report of *Fusarium proliferatum* causing root rot on soybean (*Glycine max*) in the United States. *Plant Disease* 95: 1316.
- Dugan F.M., Hellier B.C., Lupien S. L., 2003. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology* 52: 426.
- El Maâtaoui M., Pichot C., 1999. Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens* L. *Planta* 208: 345–351.
- European Parliament. Establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. DIRECTIVE 2009/128/EC.
- Hernández Fernaud J.R., Marina A., González K., Vázquez J., Falcón M.A., 2006. Production, partial characterization and mass spectrometric studies of the extracellular laccase activity from *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 212–221.
- FAOSTAT, 2018. Production/Yield quantities of Garlic in World + (Total). Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Accessed September 6, 2018.
- Gil-Serna J., Gálvez L., París M., Palmero D., 2016. *Fusarium proliferatum* from rainwater and rooted garlic show genetic and pathogenicity differences. *European Journal of Plant Pathology* 146: 199–206.
- Ignjatov M., Bjelić D., Nikolić Z., Milošević D., Gvozdanić-Varga J., Marinković J., Ivanović Ž., 2017. First report of *Fusarium acuminatum* causing garlic bulb rot in serbia. *Plant Disease* 101: 1047.
- INAO, 2019. Les signes officiels de la qualité et de l'origine, SIQO. Available at: <https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQO>. Accessed June 6, 2019.
- Keshri G., Magan N., 2000. Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* 89: 825–833.
- Koike S.T., Gordon T.R., 2015. Management of *Fusarium* wilt of strawberry. *Crop Protection* 73: 67–72.
- Koleva K., 2004. Variety of species and spread of fungi of genus *Fusarium* related to rotting of garlic. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 10: 177–180.
- Lebiush-Mordechai S., Erlich O., Maymon M., Freeman S., Ben-David T., ... Tsrur Lahkin L., 2014. Bulb and root rot in lily (*Lilium longiflorum*) and onion (*Allium cepa*) in Israel. *Journal of Phytopathology* 162: 466–471.
- Leontiev R., Hohaus N., Jacob C., Gruhlke M.C.H., Slusarenko A.J., 2018. A comparison of the antibac-

- terial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. *Scientific Reports* 8: 1–19.
- Leyronas C., Chrétien P.L., Troulet C., Duffaud M., Ville-neuve F., Morris C.E., Hunyadi H., 2018. First Report of *Fusarium proliferatum* causing garlic clove rot in France. *Plant Disease* 102: 2658.
- Linder T., 2018. Assimilation of alternative sulfur sources in fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34: 51.
- Moharam M.H.A., Farrag E.S.H., Mohamed M.D.A., 2013. Pathogenic fungi in garlic seed cloves and first report of *Fusarium proliferatum* causing cloves rot of stored bulbs in upper Egypt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46: 2096–2103.
- Ndambi B., Cadisch G., Elzein A., Heller A., 2012. Tissue specific reactions of sorghum roots to the mycoherbicide *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* versus the pathogenic *F. proliferatum*. *Biocontrol Science and Technology* 22: 135–150.
- Nelson P.E., 1981. Chapter 3: Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: Fungal Wilt Diseases of Plants. M.E. Mace, A.A. Bell & C.H. Beckman, eds. Academic press, New York, U.S., p. 51–80.
- Ochoa Fuentes Y.M., Cerna Chávez E., Gallegos Morales G., Landeros Flores J., Delgado Ortiz J.C., ... Olalde Portugal V., 2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Micología* 36: 27–32.
- O'Donnell K., Rooney A.P., Proctor R.H., Brown D.W., McCormick S.P., ... Aoki T., 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52: 20–31.
- Regalado V., Perestelo F., Rodríguez A., Carnicero A., Sosa F.J., De la Fuente G., Falcón M.A., 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 388–390.
- Ricard P., 2017. Les premiers pas vers l'étiologie et l'épidémiologie d'une maladie multifactorielle et en expansion : la fusariose de l'ail (*Allium sativum* L.). <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01618306>. Accessed 14 Oct 2019.
- Roberts P.A., Matthews W.C., 1995. Disinfection alternatives for control of *Ditylenchus dipsaci* in garlic seed cloves. *Journal of Nematology* 27: 448–456.
- Sankar N.R., Babu G.P., 2012. First Report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs (*Allium sativum*) in India. *Plant Disease* 96: 290.
- Seefelder W., Gossmann M., Humpf H.-U., 2002. Analysis of fumonisin B(1) in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2778–2781.
- Shvetsova S.V., Zhurishkina E.V., Bobrov K.S., Ronzhina N.L., Lapina I.M., ... Kulminskaya A.A., 2015. The novel strain *Fusarium proliferatum* LE1 (RCAM02409) produces α -L-fucosidase and arylsulfatase during the growth on fucoidan: Alfa-L-fucosidase and arylsulfatase from the novel strain *Fusarium proliferatum*. *Journal of Basic Microbiology* 55: 471–479.
- Stankovic S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A., Moretti A., 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 118: 165–172.
- Toit L.J., Inglis D.A., Pelter G.Q., 2003. *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease* 87: 750.
- Tonti S., Prà M.D., Nipoti P., Prodi A., Alberti I., 2012. First Report of *Fusarium proliferatum* causing rot of stored garlic bulbs (*Allium sativum* L.) in Italy. *Journal of Phytopathology* 160: 761–763.
- This H., 2006. Molecular gastronomy: exploring the science of flavor. Columbia University Press.
- Totelin L., 2015. When foods become remedies in ancient Greece: The curious case of garlic and other substances. *Journal of Ethnopharmacology* 167:3 0–37.
- Tridge, 2019. Garlic (*Allium sativum*) – Garlic Price Trend. Available at: <https://www.tridge.com/products/garlic>. Accessed August 10, 2019.
- Xie S.H., Zhang C., Chen M.S., Wei Z.P., Jiang Y.B., Lin X., Zheng Y.Q., 2018. *Fusarium proliferatum* : a new pathogen causing fruit rot of peach in Ningde, China. *Plant Disease* 102: 1858.
- Yamazaki M., Morita Y., Kashiwa T., Teraoka T., Arie T., 2013. *Fusarium proliferatum*, an additional bulb rot pathogen of Chinese chive. *Journal of General Plant Pathology* 79: 431–434.
- Yao Y., Xue Z., Hong C., Zhu F., Chen X., ... Yang X., 2016. Efficiency of different solarization-based ecological soil treatments on the control of *Fusarium* wilt and their impacts on the soil microbial community. *Applied Soil Ecology* 108: 341–351.

Chapitre 4 : Méthode de détection

I. Introduction

Classiquement en phytopathologie, la présence d'un agent pathogène est détectée par l'expression des symptômes qu'il déclenche chez son hôte [Agris, 2005]. Lorsque les symptômes apparaissent assez tôt, il est souvent possible d'identifier les plants malades et de les détruire pour stopper la propagation de l'agent pathogène. En revanche, lorsque les symptômes apparaissent tardivement, *a fortiori* après la récolte, il est impossible de séparer les hôtes sains des hôtes infectés et des traitements physiques ou chimiques doivent être appliqués afin de limiter les dégâts aux récoltes et l'accumulation de composés toxiques.

Sur l'ail, les symptômes apparaissent en post-récolte après 2 à 3 semaines de stockage. Les gousses deviennent molles, brunâtres et développent une forte odeur. Invendables, les têtes ainsi dégradées doivent être identifiées, triées et jetées. C'est pourquoi il est important pour les cultivateurs de pouvoir identifier les lots « à risque » avant que les symptômes n'apparaissent, c'est-à-dire juste après la récolte.

Un test moléculaire est apparu comme une solution fiable permettant la détection de la présence d'ADN de l'agent pathogène avant que les symptômes ne soient visibles à l'œil nu. Il a donc fallu trouver une méthode moléculaire, facile d'utilisation, rapide et interprétable par des personnes étrangères aux laboratoires.

La LAMP (*Loop-mediated isothermal AMPlification* ou Amplification isotherme médiée par les boucles) est une technique d'amplification d'ADN rapide (~30min), spécifique (3 couples d'amorces) et isotherme (1 seul cycle à 1 température donnée). Elle nécessite 4 amorces différentes (+2 favorisant la formation de boucles) amplifiant 6 régions distinctes (Figure 4.1). La complémentarité des régions amplifiées entraîne la formation de structures en épingle à cheveux [Notomi et al, 2000] facilement détectables par virement coloré ou fluorescence [Zhang et al, 2019]. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite ni équipement de laboratoire onéreux, ni produits toxiques et peut-être déployée en dehors du contexte d'un laboratoire de recherche. Les points limitants sont la mise au point des amorces qui demande des connaissances de biologie moléculaire, la sensibilité de la réaction aux composants du substrat (matière végétale, sol...) et la méthode d'extraction d'ADN dans le substrat qui peut nécessiter plus de matériel et de précautions.

A la suite de discussions entre les membres du comité de pilotage (Top'Alliance Alinéa, Prosemail, le Syndicat de l'Ail Rose de Lautrec et INRAE) et sur la base des premiers résultats de l'étude d'étiologie, il a été décidé de focaliser le test de détection sur l'espèce *F. proliferatum*.

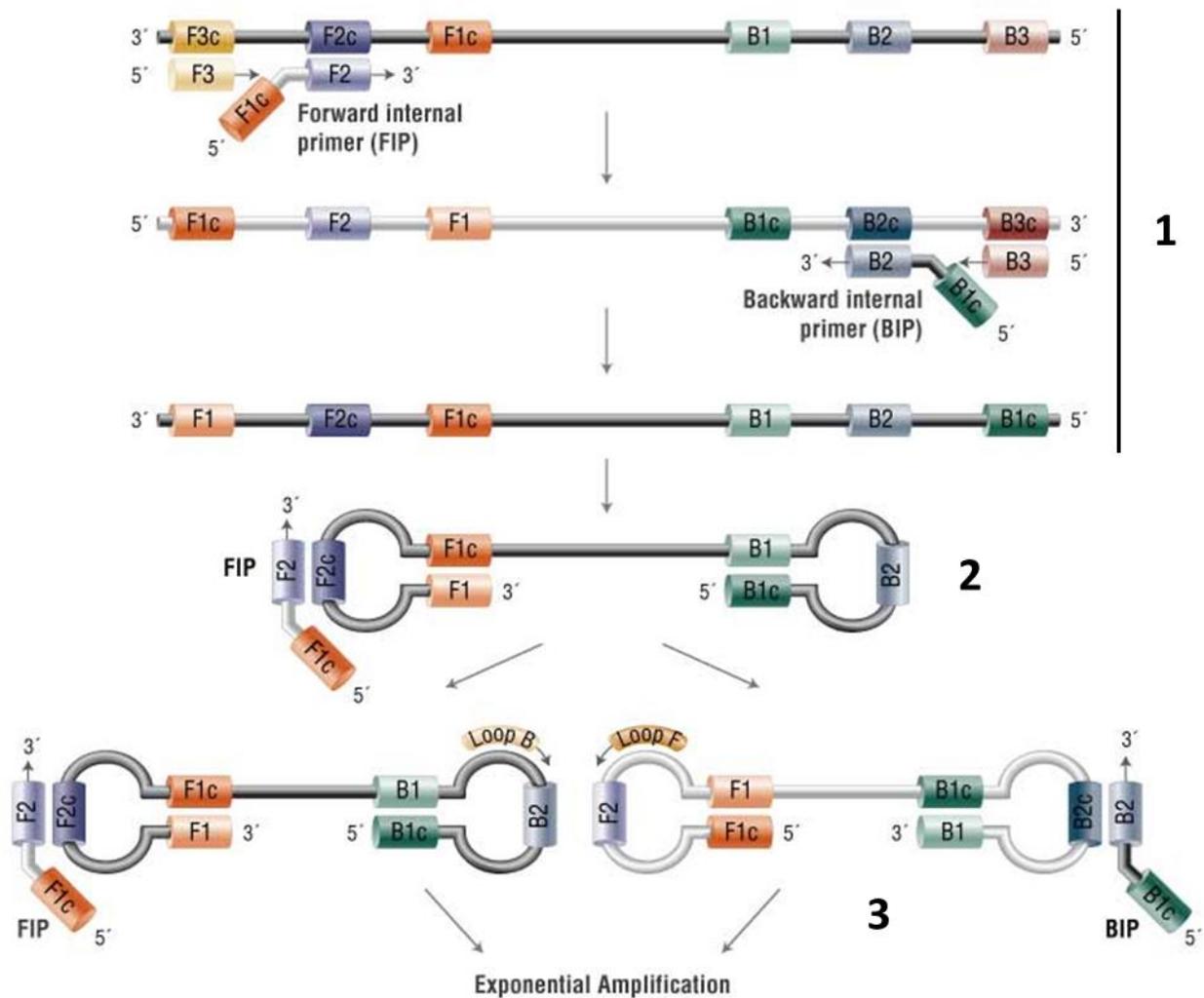


Figure 4.1 Schéma simplifié d'une LAMP [New England Biolabs website].

1 Amplification primaire et synthèse de brins d'ADN sens et antisens en même temps initiés par l'attachement des amorces F3/B3 et des demi-amorces F2/B2. **2** Formation de boucles par complémentarité des régions F2/F2c et B1/B1c et attachement des amorces hybrides (FIP/BIP). **3** Amplification exponentielle.

F3 : Amorce « Forward » complémentaire de la région F3c sur le brin 3'-5'.

B3 : Amorce « Backward » complémentaire de la région B3c sur le brin 5'-3'.

F1c-F2 (FIP) : Amorce « Forward » hybride complémentaire de la région F1 sur le brin 3'-5' et de la région F2c sur le brin 5'-3'.

B2-B1c (BIP) : Amorce « Backward » hybride complémentaire de la région B2c sur le brin 5'-3' et de la région B1 sur le brin 3'-5'.

Loop B (LB) / Loop F (LF) : Amorces Loop favorisant la formation de structures en épingle à cheveux.

II. Matériel et Méthodes

1. Conception des amorces

1.1 Choix de la région candidate

Une banque d'ADN fongiques de 96 souches représentatives des 3 années de production, des deux bassins et des différentes variétés cultivées a été constituée. Les régions candidates ont été comparées selon trois critères : l'information totale (taille de l'amplicon), l'homogénéité des séquences (nombre de SNP dans l'alignement) et le nombre de souches de *F. proliferatum* portant une mutation (haplotypes).

Pour des raisons de confidentialité et en accord avec la convention de recherche signée par les différents acteurs et financeurs de la thèse, les noms des régions candidates et les séquences des amorces ne seront pas dévoilées dans ce document.

1.2 Choix des amorces

Les amorces ont été générées à l'aide du logiciel PrimerExplorer V5. Un « score polymorphisme » a été accordé à chaque jeu d'amorces afin de les comparer. Lorsqu'un polymorphisme commun à *F. oxysporum* et *F. verticillioides* (les deux espèces les plus proches génétiquement de *F. proliferatum* au niveau de notre région candidate) était recouvert par l'une des amorces du jeu, un point lui était ajouté. Au contraire, lorsqu'un polymorphisme commun entre *F. proliferatum* et *F. oxysporum* ou *F. verticillioides* était recouvert par l'une des amorces du jeu, un point lui était retiré. De ce fait, le jeu d'amorces avec le score le plus élevé aurait, théoriquement, le plus de chances d'être spécifique de *F. proliferatum*. La valeur de dG des dimères (énergie nécessaire pour séparer un dimère d'oligonucléotides) a également été prise en compte : plus la valeur est faible, moins les dimères d'amorces auraient de chance de se former et de subsister.

Au total, 5 jeux d'amorces ont été sélectionnés et celui qui présentait le meilleur score a été testé *in vitro*. Ce jeu d'amorces est composé de trois différents couples d'amorces :

- F3/B3 : Amorces flanquant spécifiquement la région-cible.
- FIP/BIP : Amorces hybrides de 40 paires de bases dont la moitié de la séquence est spécifique d'une région du brin sens et dont l'autre moitié est spécifique du brin antisens. Elles fonctionnent en miroir et permettent la formation de boucles (Figure 3.1).
- LF/LB : Amorces « Loop » optionnelles mais favorisant la formation de boucles.

2. Tests in vitro

Pour tous les tests *in vitro*, les mélanges réactionnels (25 µL) ont été constitués de 12,5 µL de WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix, 2,5 µL de mélange d'amorce (0,4 µL des amorces FIP/BIP, 0,05 µL des amorces F3/B3, 0,1 µL des amorces LF/LB et 1,4 µL d'eau ultra pure) et de 9 µL d'eau ultra pure. Le kit colorimétrique contient un indicateur coloré qui vire du rose au jaune quand le pH diminue lorsque des protons sont libérés par l'activité de l'ADN polymérase lors de la réaction. La lecture des résultats a été réalisée visuellement (Figure 4.2).

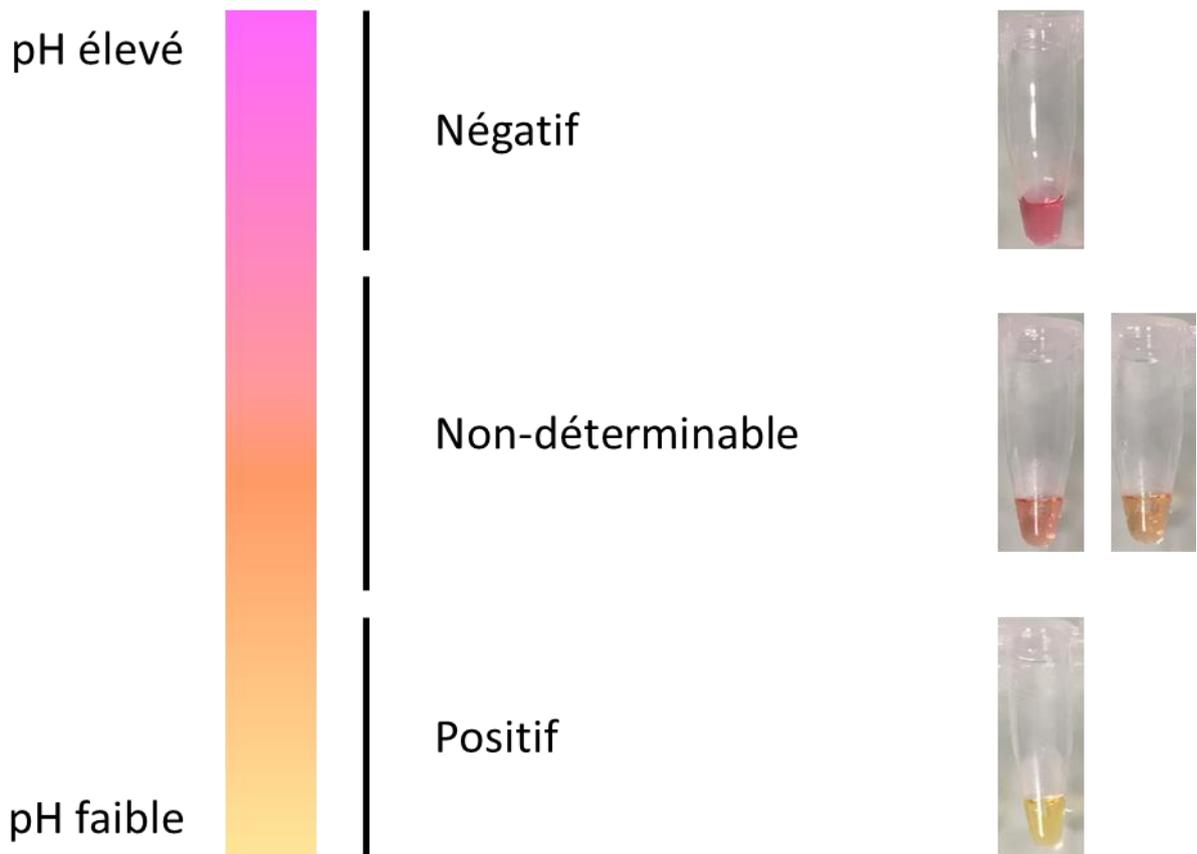


Figure 4.2 Echelle colorimétrique mise au point pour la détermination des résultats des tests LAMP.

Un résultat négatif correspond à une coloration rose.

Un résultat positif correspond à une coloration jaune.

Toute coloration intermédiaire ne permet pas de déterminer la nature du résultat.

2.1 Conditions optimales d'amplification

Les premières conditions testées ont été celles conseillées par le fournisseur (WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix) : 65 °C pendant 30 minutes. Ces conditions de température et de durée ont ensuite été ajustées au fur et à mesure des tests afin d'augmenter la spécificité du test. L'ensemble des tests ont été effectués en duplicat (deux tubes par souche) à l'aide d'un thermocycleur SureCycler® 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies®, California).

2.2 Spécificité

La spécificité correspond au pourcentage de résultats négatifs trouvés parmi les résultats négatifs attendus. Afin d'avoir un regard le plus exhaustif possible sur la spécificité des amorces, elles ont été soumises à un panel représentatif détaillé dans les sous-parties suivantes. Les conditions optimales d'amplification déterminées précédemment ont été appliquées dans tous les essais.

2.2.1 Spécificité inter-espèce

Afin de ne détecter que les souches de *F. proliferatum*, les amorces ont été confrontées aux ADN d'espèces les plus proches génétiquement (au niveau de la région cible). Sur cette région, les séquences de souches de *F. proliferatum* différaient d'une base. Deux souches, représentant les deux haplotypes ont donc été systématiquement testées :

- 1 souche de *F. proliferatum* (Haplotype 1 ; Souche FA79-E05)
- 1 souche de *F. proliferatum* (Haplotype 2 ; Souche FA122-E11)
- 2 souches de *F. oxysporum* (Souches FA35-E03 et FA242-E07)
- 2 souches de *F. solani* (Souches FA112-E04 et FA412-E01, isolées d'oignons fournis par la FNAMS)
- 2 souches de *F. verticillioides* (Souches Fv63, recodée FA659-E01 de l'unité MycSA – INRAE Bordeaux) et LSVM875, recodée FA660-E01 du Laboratoire de la Santé des Végétaux, ANSES Malzéville))
- 1 souche de *Botrytis cinerea* (Souche SOL 261 de la collection *Botrytis* - Unité Pathologie végétale INRAE Avignon)
- 1 souche de *Sclerotinia sclerotiorum* (Souche SS_2906 de la collection *Sclerotinia* – unité PV INRAE Avignon)

2.2.2 Spécificité vis-à-vis de souches de *F. proliferatum* isolées sur d'autres hôtes

Il était également intéressant de voir si les amorces allaient détecter tous les ADN de souches de *F. proliferatum* ou uniquement ceux de souches isolées d'ail. Deux souches isolées d'ail espagnol ont également été ajoutées :

- 1 souche isolée sur blé (Souche LSVM857, recodée FA433-E01 du Laboratoire de la Santé des Végétaux, ANSES Malzéville)
- 1 souche isolée sur maïs (Souche LSVM703, recodée FA430-E01 du Laboratoire de la Santé des Végétaux, ANSES Malzéville).
- 2 souches isolées d'ail espagnol (Souches FPG20-CL et FPG56-CM, recodées respectivement FA418-E01 et FA419-E01 de Université Polytechnique de Madrid)

2.2.3 Spécificité des amorces en mélange

La présence d'ADN d'une autre espèce ne devrait pas empêcher la détecter de l'ADN cible. Dans cette condition, 1µL de chaque ADN a été utilisé dans le mélange réactionnel. La quantité d'ADN du témoin positif (*F. proliferatum* seul) et la quantité d'eau ultra pure du témoin négatif ont été doublés de la même manière :

- Mélange *F. proliferatum* (FA122-E11) + *F. oxysporum* (FA35-E03)
- Mélange *F. proliferatum* (FA122-E11) + *F. solani* (FA112-E04)
- Mélange *F. proliferatum* (FA122-E11) + *F. verticillioides* (FA659-E01)

2.3 Limite de détection

Afin de déterminer la limite de détection *in vitro*, des concentrations décroissantes d'ADN cible (1 ng à 10⁻⁶ ng) ont été utilisées. Les conditions optimales d'amplification déterminées précédemment ont été appliquées.

III. Résultats

III.1 Caractéristiques des amorces

La région génomique qui possédait la séquence de plus grande taille, le plus petit nombre de mutations (au sein des souches de *F. proliferatum*) et le plus petit nombre de souches concernées par cette mutation, a été sélectionnée pour la mise au point des amorces. La présence d'une mutation a été prise en compte lors du design, le but étant que les deux haplotypes de *F. proliferatum* soient amplifiés. Deux souches de référence, représentatives des deux haplotypes ont été choisies : FA79-E05 (sans mutation) et FA122-E11 (portant la mutation).

Le logiciel PrimerExplorerV5 génère des dizaines de jeux d'amorces. Cinq ont été sélectionnés en fonction de la position des oligonucléotides recouvrant ou non des mutations spécifiques à *F. oxysporum* et/ou *F. verticillioides*. Des scores allant de -5 à +3 ont été obtenus ainsi que des valeurs de dG comprises entre -1,85 et -2,46 (minimum, en comparant les amorces d'un même set 2 à 2).

Un jeu avec un score de +3, un dG de -2,01 et au moins une mutation favorable (spécifique à *F. oxysporum* ou *F. verticillioides*) sur chacune des 6 amorces, a été choisi (Tableau 4.1).

III.2 Comportement des amorces in vitro

La présentation des résultats suit le code couleur décrit dans la figure 3.2 correspondant au virement coloré du test LAMP : jaune = positif, orange = non déterminable et rose = négatif. Les mentions suivantes ont également été indiquées : P = Positif, N = Négatif et ND = Non Déterminable.

III.2.1 Conditions optimales d'amplification

Les conditions retenues sont une température de 65 °C et un cycle de 35 minutes. Ces conditions permettent une meilleure distinction visuelle des couleurs entre les résultats positifs (jaune vif) et les résultats négatifs (rose) (Figure 4.2). De plus, aucun faux positif ni faux négatif n'a été observé (Tableau 4.2).

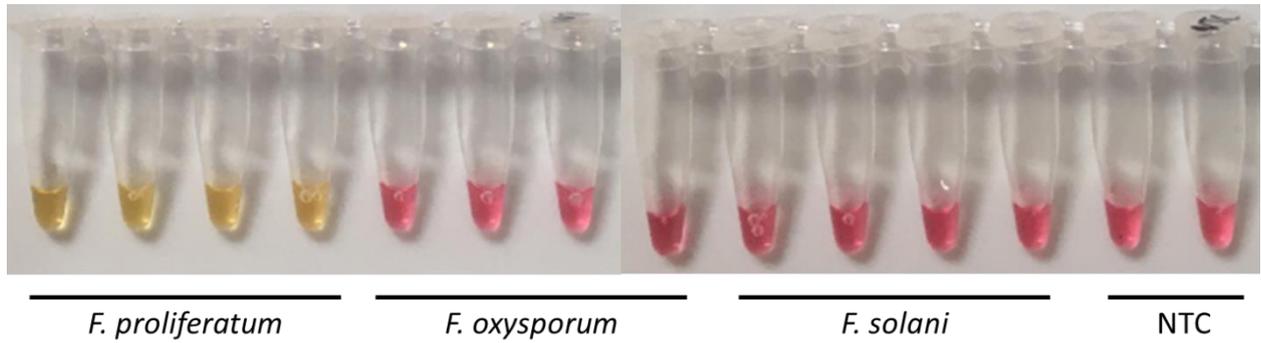
Tableau 4.1 Caractéristiques du jeu d’amorces sélectionné.

Amorce	Taille (pb)	Tm (°C)
F3	20	59,31
B3	18	60,42
FIP	41	ND
BIP	41	ND
LF	18	60,37
LB	24	62,68

Tableau 4.2 Réactions LAMP dans des différentes conditions de temps et de températures.

Température (°C)	60	65	65	65
Durée (min)	30	30	40	35
<i>F. proliferatum</i> (FA122-E11)	ND	P	P	P
	ND	P	P	P
<i>F. proliferatum</i> (FA79-E05)	ND	P	P	P
	ND	ND	P	P
<i>F. oxysporum</i> (FA35-E03)	N	N	N	N
	N	N	N	N
<i>F. oxysporum</i> (FA242-E07)	N	N	N	N
	N	N	ND	N
<i>F. solani</i> (FA112-E04)	N	N	N	N
	N	N	N	N
<i>F. solani</i> (FA412-E01)	N	N	N	N
	N	N	N	N
Témoin négatif	N	N	N	N
	N	N	N	N

Figure 4.2 Réactions LAMP obtenues dans les conditions optimales d'amplification définies ci-avant (65 °C et 35 min).



NTC : Non Template Control (Témoin Négatif)

III.2.2 Spécificité des amorces

Les souches de *F. proliferatum* isolées d'ail espagnol ont été amplifiées de la même manière que la souche issue de la collection (Tableau 4.3). L'origine géographique ne semble donc pas interférer avec l'amplification.

La souche isolée sur blé a été amplifiée de la même manière que la souche issue de la collection. Un faux négatif a été obtenu pour l'un des deux tubes contenant l'ADN de la souche isolée sur maïs. La réaction a été répétée dans les mêmes conditions et l'ADN a été correctement amplifié dans les deux tubes avec une coloration légèrement moins marquée que le témoin positif (Tableau 4.4). L'hôte d'origine où ont été isolées les souches de *F. proliferatum* ne semble donc pas non plus empêcher la réaction de correctement s'effectuer.

En plus des souches testées au point III.2.1 (*F. oxysporum* et *F. solani*), l'ADN des souches de *B. cinerea* et *S. sclerotiorum* n'a pas été amplifié dans nos conditions. L'ADN d'une des deux souches de *F. verticillioides* (FA660-E01) a été détecté dans les deux tubes. Les résultats obtenus pour l'autre souche (FA659-E01) sont moins clairs : tantôt non déterminables, tantôt négatif ou positif en fonction des conditions de température et de durée appliquées (Tableau 4.5).

Quel que soit le mélange d'ADN de souches effectué, la présence d'ADN de *F. proliferatum* a été détecté (Tableau 4.6). Ce résultat est encourageant même s'il ne permet pas de déterminer si l'amplification est due à l'ADN de la souche de *F. proliferatum* et/ou de l'ADN de la souche de *F. verticillioides* dans la dernière condition.

III.2.3 Limite de détection

A partir d'une concentration de 10^{-2} ng/ μ L, l'ADN de la souche de *F. proliferatum* n'est plus détecté dans nos conditions optimales d'amplification (Tableau 4.7). Par comparaison, dans 100 μ L d'extraction pure d'ADN de *F. proliferatum* (à partir de 100 mg de mycélium) on obtient entre 10 et 100 ng/ μ L d'ADN. Si l'on estime la quantité de jus extractible d'une gousse à une dizaine de μ L (nombreux constituants agglutinants), il suffirait en théorie d'avoir entre 1 et 0,1 mg de matériel fongique, extractible dans la matrice ail à tester, pour obtenir un résultat positif.

Tableau 4.3 Réactions LAMP en présence d'ADN de souches de *F. proliferatum* isolées d'ail espagnol.

Température (°C)	65
Durée (min)	35
<i>F. proliferatum</i> (FA79-E05)	P
	P
<i>F. proliferatum</i> ail espagnol (FA418-E01)	P
	P
<i>F. proliferatum</i> ail espagnol (FA419-E01)	P
	P
Témoin négatif	N
	N

Tableau 4.4 Résultats des réactions LAMP en présence d'ADN de souches de *F. proliferatum* isolées sur différents hôtes.

Température (°C)	65
Durée (min)	35
<i>F. proliferatum</i> (FA79-E05)	P
	P
<i>F. proliferatum</i> maïs - 2 essais	P
	N
	P
<i>F. proliferatum</i> blé	P
	P
Témoin négatif	N
	N

Tableau 4.5 Réactions LAMP en présence d'ADN de souches de *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *B. cinerea* et *S. sclerotiorum*.

Température (°C)	65	60	65
Durée (min)	35	30	40
<i>F. proliferatum</i> (FA122-E11)	P	ND	P
	P	ND	P
<i>F. verticillioides</i> (FA659-E01) - 4 essais distincts	ND	ND	P
	ND	ND	ND
	ND		
	N		
<i>F. verticillioides</i> (FA660-E01)	P		
	P		
<i>B. cinerea</i> (SOL 261)	N		
	N		
<i>S. sclerotiorum</i> (SS_2906)	N		
	N		
Témoin négatif	N		
	N		

Tableau 4.6 Réactions LAMP en présence de mélanges d'ADN de souches de *F. proliferatum*, *F. oxysporum* et *F. verticillioides*.

Température (°C)	65
Durée (min)	35
<i>F. proliferatum</i> (FA122-E11)	P
	P
<i>F. proliferatum</i> + <i>F. oxysporum</i>	P
	P
<i>F. proliferatum</i> + <i>F. solani</i>	P
	P
<i>F. proliferatum</i> + <i>F. verticillioides</i>	P
	P
Témoin négatif	N
	N

Tableau 4.7 Réactions LAMP en présence de concentrations décroissantes d'ADN de *F. proliferatum*.

Température (°C)	65
Durée (min)	35
<i>F. proliferatum</i> (FA122-E11)	P
	P
<i>F. proliferatum</i> (10 ⁻¹ ng)	P
	P
<i>F. proliferatum</i> (10 ⁻² ng)	N
	N
<i>F. proliferatum</i> (10 ⁻³ ng)	N
	N
<i>F. proliferatum</i> (10 ⁻⁴ ng)	N
	N
<i>F. proliferatum</i> (10 ⁻⁵ ng)	N
	N
<i>F. proliferatum</i> (10 ⁻⁶ ng)	N
	N
Témoin négatif	N
	N

IV. Discussion

Le logiciel PrimerExplorer V5 a permis de générer des dizaines de jeux d'amorces automatiquement et avec une prise en main très rapide. Le premier jeu d'amorces sélectionné a montré une bonne spécificité pour l'espèce *F. proliferatum*, preuve de l'impressionnante efficacité du logiciel de conception.

IV.1 Qualités in vitro de la méthode

Quel que soit l'hôte ou le pays d'origine des souches de *F. proliferatum* testées, leur ADN a été amplifié dans nos conditions expérimentales. Ce résultat est cohérent avec l'homogénéité génétique des souches de *F. proliferatum* décrite dans le chapitre 1 de ce document.

Cependant, les ADN des deux souches de *F. verticillioides* (l'espèce la plus proche génétiquement au niveau de la région cible) ont également été amplifiés. Malgré cette faiblesse de spécificité, les résultats de cette mise au point sont intéressants étant donné qu'aucune souche de *F. verticillioides* n'a été isolée d'ail en France depuis le début de ces travaux. De plus, seules 2 mentions de *F. verticillioides* sur ail peuvent être retrouvées dans la littérature :

- Dugan, 2007 : Deux souches isolées d'ail produits aux Etats-Unis et en Chine avec des niveaux d'agressivité légèrement supérieurs à celui du témoin négatif
- Ochoa-Fuentes, 2012 : Travail sur souches isolées d'ail produit au Mexique sans confirmation d'agressivité par le postulat de Koch
- Stankovic, 2007 : Les chercheurs précisent que *F. verticillioides* et *F. proliferatum* sont souvent confondus lorsqu'identifiés uniquement sur des critères morphologiques. Seules les identifications moléculaires ou identifications par profil mycotoxique permettraient la distinction.

Au vu des connaissances actuelles, il semble raisonnable de penser que *F. verticillioides* n'est pas présent sur l'ail en France et donc ne fait pas partie des agents pathogènes responsables des symptômes. Il faut toutefois garder en tête que *F. verticillioides* peut-être présent dans l'environnement en tant que microorganisme saprophyte et qu'il faut donc rester prudent en utilisant ces amorces sur une autre matrice que des têtes d'ail, pour explorer les potentielles sources d'inoculum par exemple.

Dans l'avenir il est possible d'imaginer la conception de nouvelles amorces sur une autre région-cible. Ces nouveaux jeux d'amorces pourraient également être choisis suivant une autre logique : plutôt que de chercher à répartir les polymorphismes sur l'ensemble des 6 amorces, il pourrait être intéressant de cibler une région génomique très polymorphe par rapport à *F. verticillioides* pour une des amorces flanquantes (F3/B3).

Enfin, il pourrait être intéressant de tester des amorces développées récemment par une autre équipe destinées à la détection de *F. proliferatum* sur le maïs. Leurs résultats montrent une spécificité *in vitro* vis-à-vis de cette espèce, excluant l'espèce *F. verticillioides* [Wang, 2020].

IV.2 Manipulations à venir

L'objectif de la méthode de détection LAMP développée ici est de pouvoir être appliqué au terrain sur gousses d'ail. La matrice ail, de par son pH légèrement acide [Wang, 2014] et sa composition riche en composés soufrés très réactifs (notamment avec les protéines) [Borlinghaus, 2014], a probablement des risques d'interférer avec la réaction LAMP. C'est pourquoi les prochaines expérimentations au laboratoire auront pour but de tester la stabilité de la réaction LAMP en présence de jus d'ail ou bien directement sur gousses d'ail naturellement ou artificiellement contaminées par des espèces du genre *Fusarium*.

Aux mélanges réactionnels habituels contenant de l'ADN pur de *F. proliferatum* ou d'autres espèces, seront ajoutés 1 µL de jus d'ail obtenu par broyage mécanique d'une gousse d'ail asymptomatique. Les gousses seront stérilisées en surface et rincées dans 3 bains consécutifs d'eau stérile afin d'éliminer la flore naturellement présente en surface. Le plateau racinaire, source potentielle d'inoculum, sera préalablement retiré avant le broyage.

Si la présence de jus d'ail n'interfère pas dans la réaction LAMP et la détection de *F. proliferatum*, les tests « directs » sur gousses pourront être effectués. Après épluchage, les gousses naturellement contaminées seront triées par ordre d'importance des symptômes (nombre de répétition à définir) tandis que les gousses asymptomatiques seront inoculées de la même manière que pour les tests d'agressivité décrits dans le chapitre 1. Dans les deux cas, la présence d'ADN cible sera testée sur le broyat obtenu, avec ou sans purification préalable.

IV.3 Perspectives du développement de la méthode

Le point fort de cette méthode est le peu de matériel nécessaire sa réalisation. La méthode nécessitera au minimum les amorces, le mélange réactionnel commercial pour la réaction LAMP, un système de chauffage permettant de maintenir une température constante (bain-marie, plaque chauffante) et un système de broyage (mortier, presse).

Cette relative simplicité technique pourra permettre de tester de nombreux lots après la récolte et avant la mise en tour de séchage. On peut imaginer l'échantillonnage d'un nombre x de gousses au sein de y lots provenant d'une même parcelle à broyer et tester. Afin de limiter l'impact de la flore externe naturelle des gousses, il semble plus prudent de laver à l'eau claire et d'éplucher les gousses destinées au broyage. Une analyse de risques pourra déterminer un nombre seuil de résultats positifs au-delà duquel les gousses du lot risquent de développer de nombreux symptômes et donc des pertes économiques. Il suffirait en théorie d'avoir entre 1 et 0,1 mg de matériel fongique, extractible dans la matrice ail à tester, pour obtenir un résultat positif. *In vitro*, 1 cm² de mycelium correspond à entre 1 et 2,5 mg de biomasse fongique, dépendant de l'espèce et du milieu utilisé [Reeslev & Kjølner, 1995].

Les nombreuses possibilités d'application de la méthode vont nécessiter de réfléchir aux contraintes. Il est important de se questionner sur le type d'extraction d'ADN nécessaire au bon déroulement de la réaction LAMP. De nombreux broyats/lysats contiennent trop de molécules inhibitrices et ainsi empêchent la bonne détection de la cible. Dans l'unité de Pathologie Végétale d'INRAE Avignon, les agents travaillent actuellement à l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de terrain par des méthodes simples ne nécessitant pas de kits commerciaux pour

la détection de bactéries. Les premiers résultats semblent indiquer qu'uniquement la détection au sein de la matrice « eau » est possible dans ces conditions. Les cellules fongiques étant plus difficilement lysables que les cellules bactériennes, ces résultats indiquent qu'il sera probablement nécessaire d'ajouter à la liste un kit d'extraction commercial et du matériel basique de laboratoire (centrifugeuse, broyeur, micropipettes). La détection directe d'ADN fongique sur du jus d'ail confirmera si cette étape d'extraction est nécessaire ou non.

Enfin, si la méthode de détection LAMP ne convient pas suffisamment à la détection de *F. proliferatum* sur ail, d'autres méthodes récentes permettent de détecter la présence d'un agent pathogène avant l'apparition de symptômes visibles à l'œil nu. Les méthodes de détection par amplification d'ADN par PCR, qPCR ou RT-PCR permettent d'avoir une confirmation précise et spécifique de la présence d'un agent pathogène (ex : *Fusarium* sp.) sur son hôte [Jurado et al, 2005 ; Hogg et al, 2007]. Les méthodes moléculaires de détection ne nécessitent pas nécessairement de cultiver l'agent pathogène et sont donc plus rapides et plus encore plus précoces. Cependant, ces méthodes nécessitent souvent un investissement important en termes de matériel de laboratoire et de personnel qualifié.

C'est également le cas de l'imagerie infrarouge qui a permis de discriminer des grains de maïs sains de grains infectés [Williams et al, 2010]. Couplée avec de l'analyse multispectrale d'image, l'imagerie peut également être utilisée directement au champ [Dammer, 2011].

S'il s'avère que les souches de *Fusarium* présentes sur l'ail produisent des toxines, leur détection peut également se faire de manière indirecte au sein de la matrice végétale en plus de donner une indication sur les risques que comporte l'utilisation de ces lots. La détection de toxines peut se faire par chromatographie ou immunologie [Ji et al, 2019]. Cependant, la production de toxines par les champignons phytopathogènes nécessite un certain temps de multiplication au sein de l'hôte et ne permet pas forcément une détection précoce de l'agent causal.

Chapitre 5 : Discussion et perspectives

En 2016, à cause de la pourriture de l'ail, la filière française vit une crise sanitaire entraînant de lourdes pertes économiques allant jusqu'à l'arrêt de la production de certaines variétés (roses notamment). Conscients du problème et forts de leurs interactions, les acteurs de la filière des bassins sud-est et sud-ouest lancent des actions techniques afin de comprendre les tenants et aboutissants de cette maladie émergente. Cette même année, ils sollicitent l'unité de recherche Pathologie Végétale d'INRAE Avignon pour monter un projet afin de lancer des recherches plus fondamentales, tout en étant à visée appliquée, sur la pourriture de l'ail. De cette collaboration naît le projet de thèse dont les résultats ont été présentés dans ces pages. Le financement est assuré par trois organismes de la filière ail (Top'Alliance Alinéa, Prosemail et le Syndicat de l'Ail Rose de Lautrec) et par l'ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) sous la forme d'une convention CIFRE.

Ces trois années ont été pour moi une occasion unique d'approfondir mes connaissances scientifiques tout en développant de nombreuses compétences humaines, sociales et de résistance au stress. Le contact avec la filière s'est fait très tôt lors d'assemblées générales et de conseils d'administration qui m'ont permis dans un premier temps de découvrir le réseau ail, ses enjeux, ses acteurs et sa culture. Dans un second temps, j'ai pris conscience de la gravité de la situation et de la responsabilité qui m'incombait. Une relation d'égal à égal s'est rapidement installée entre les différents responsables et moi, m'accordant leur entière confiance en échange d'un travail continu, d'une communication accessible, régulière et d'une écoute réciproque. C'est dans ce cadre extrêmement favorable que j'ai pu aborder les inquiétudes d'une filière face à un problème nouveau et grandissant par le prisme de la recherche fondamentale et appliquée.

La particularité de la pourriture (brune) observée sur ail c'est que les symptômes ne s'expriment que lors du stockage, mais pas en cours de culture au champ. Il est donc difficile d'étudier son développement épidémiologique et de mettre en œuvre des moyens de lutte. Ainsi deux points sont apparus indispensables à aborder dans le cadre de cette thèse : mettre au point une méthode de détection de(s) agent(s) pathogène(s) responsable(s) des symptômes et pour cela il était indispensable d'identifier clairement ces agents pathogènes et d'évaluer leur niveau d'agressivité afin de cibler au mieux la méthode de détection.

Pour l'étiologie, nous avons établi un plan d'échantillonnage le plus large possible en termes de variétés et de parcelles, sur les 3 années de la thèse, afin d'avoir une image la plus globale possible du problème. Le genre des agents pathogènes ayant déjà été plus ou moins déterminé dans la bibliographie, ces travaux ont permis d'identifier les deux espèces majoritairement responsables des symptômes sur ail en France : *F. proliferatum* et *F. oxysporum*. L'étude de la diversité génétique des souches isolées a permis de mettre en évidence des co-infections par, soit plusieurs individus d'une même espèce, soit des individus de plusieurs espèces au niveau d'une même tête d'ail. Il pourrait être intéressant de tester l'effet de co-infections en conditions contrôlées afin de déterminer la nature des interactions entre agents pathogènes et d'évaluer si l'intensité des symptômes et/ou leurs conditions d'apparition sont liées à la présence d'une ou des deux espèces. Cela permettra de déterminer si un suivi de l'évolution des espèces présentes sur l'ail en France est nécessaire.

Grâce à la bibliographie, dès le départ on s'attendait à être confronté à des espèces du genre *Fusarium*. Une question est apparue très précocement : comment un individu du genre *Fusarium* a-t-il réussi à s'adapter à la matrice ail, alors que cette même matrice, sous forme d'extrait d'ail, riche en radicaux soufrés hautement réactifs (ex : allicine) [Ankri & Mirelman, 1999], notamment

avec les protéines, est utilisée par ailleurs pour lutter contre des espèces du genre *Fusarium* ? [Tariq & Magee, 1990]. Plusieurs hypothèses ont alors été posées. La première est l'adaptation aux composés organo-sulfurés [Shvetsova et al, 2015] a peut-être été développée par quelques individus et s'est transmise à la population générale. Dans ce cas, l'émergence proviendrait d'un individu mutant ou d'une souche importée d'une zone géographique éloignée. Une autre hypothèse serait que l'adaptation s'est faite au niveau du comportement de la souche lors de la pénétration de l'hôte. On peut imaginer que le mode de vie hémibiotrophe et de dégradation à distance des tissus végétaux de *F. proliferatum* et *F. oxysporum* [Sharafaddin et al, 2019] leur permettrait de ne jamais entrer en contact avec de fortes concentrations en allicine. L'émergence proviendrait donc plutôt de changements climatiques ou au niveau des pratiques de production [Anderson et al, 2004] (despoulinage, arrêt des brûlis de fanes au champ, intensification de la production).

La répartition des deux espèces – *F. proliferatum* et *F. oxysporum* - sur le territoire et leur impact au sein des différentes variétés a permis de mettre en évidence plusieurs biais dans notre perception de cette maladie. Du côté de la profession de l'ail, l'impact de la maladie dépend de la quantité de produit détruit et des pertes économiques engendrées par cette destruction. Sur cette base, les variétés d'ail rose étaient les plus touchées et certains producteurs allaient jusqu'à se tourner vers d'autres types d'aux jugés moins sensibles. Dans mon travail de thèse, j'ai observé que les gousses d'ail rose, considérées comme un bloc unique, présentaient statistiquement moins de symptômes que les gousses d'ail blanc ou violet. Cette divergence de perception peut s'expliquer de plusieurs façons. D'une part, la vente d'ail en France se fait par tête entière et non par gousse. De ce fait, lorsqu'une tête d'ail présente une gousse symptomatique, la tête entière est jetée. Une répartition homogène de gousses symptomatiques au sein des têtes d'ail roses entraînerait donc une destruction d'un nombre supérieur de têtes à une répartition hétérogène de gousses symptomatiques au sein des têtes d'ail d'un autre type. Pour pallier à ce problème, la profession de l'ail française est en pleine évolution vers une diversification des produits destinés à la vente : gousses séparées, poudres, produits fermentés/transférés... D'autre part, la présence de symptômes de manière précoce n'est pas strictement corrélée avec le pourrissement de la gousse concernée. Les mécanismes « d'activation » de la maladie, du passage du stade nécroses au niveau du plateau à la destruction complète de la gousse, n'ont pas encore été élucidés et pourraient très bien être variété-dépendants.

Une fois l'agent pathogène identifié et sa répartition plus finement définie, le travail s'est porté sur sa capacité à produire des symptômes sur son hôte, la cinétique d'apparition des symptômes et les facteurs influençant le niveau d'agressivité des souches (combinaison d'intensité et de vitesse d'apparition des symptômes). Une première expérience préliminaire, par trempage de gousses asymptomatiques dans une suspension de spores, a permis de recréer des symptômes très proches de ce qu'on pouvait observer lors du séchage et du stockage des gousses. Le postulat de Koch a également pu être confirmé. De cette expérience préliminaire, une souche de référence a été utilisée dans tous les tests d'agressivité afin de pouvoir les comparer entre eux en s'affranchissant de l'état des gousses à la réception. Une échelle de notation des symptômes a également été développée de manière à s'affranchir de l'impossibilité technique et pratique de mesurer au laboratoire une surface nécrotique en trois dimensions. Ce protocole d'inoculation et de notation a d'ailleurs servi à l'entreprise Vegenov (R&D et conseil au service des entreprises du végétal) qui est sous contrat avec la coopérative Alinéa pour tester des variétés foraines (anciennement cultivées) à la recherche de variétés d'ail résistantes/tolérantes à la fusariose.

Des souches appartenant à la collection constituée dans la cadre de la thèse, et caractérisées pour leur niveau d'agressivité, ont également été transmises à la société Vegenov (sous Material Transfer Agreement) pour mener à bien ses tests.

Les différents tests d'évaluation de l'agressivité des souches, répartis sur toute la durée de la thèse, ont permis de nombreuses observations. Premièrement, dans nos conditions expérimentales, les souches isolées lors de l'étude étiologique ont toutes été capables de créer des symptômes sur ail à des degrés d'agressivité différents. Deuxièmement, nous avons pu expliquer une partie de la variabilité d'agressivité des souches par des facteurs d'origine géographique, variétale ou d'année d'isolement. Cependant, la majorité de la variabilité était expliquée par la seule variabilité génétique des souches en accord avec les résultats des comparaisons entre niveaux d'agressivité et haplotypes. La faible variabilité génétique des régions génomiques étudiées chez les espèces de *F. proliferatum* isolées dans le monde sur divers hôtes fait écho à la faible diversité des souches isolées d'ail en France. La présence d'une multitude d'haplotypes de *F. proliferatum* et *F. oxysporum* autour d'un haplotype majoritaire ne permet pas de conclure quant à l'origine de l'émergence de cet agent pathogène sur l'ail en France.

Au cours de la thèse, nous avons voulu tester l'hypothèse que la capacité à produire des mycotoxines des souches pouvait être corrélée avec leur agressivité. Des souches présentant différents niveaux d'agressivité, ont été évaluées par l'unité MycSA d'INRAE Bordeaux pour leur capacité à produire des mycotoxines. A cause des confinements successifs et du manque de temps, les expériences n'ont pas pu aller jusqu'au bout mais les résultats préliminaires n'ont pas montré de lien apparent entre quantité de mycotoxines produites et niveau d'agressivité.

Enfin, nous avons observé que les témoins négatifs des tests (gousses stérilisées en surface et plongées dans de l'eau stérile, au lieu d'une suspension de spores) ont systématiquement développé du mycélium et parfois des symptômes typiques de *Fusarium* au bout de 18 jours dans nos conditions expérimentales. Nous avons d'abord conclu au caractère endophyte de nos souches dans l'ail, caractère connu chez les espèces du genre *Fusarium* [Kuldau & Yates, 2000]. Le caractère endophyte de *F. proliferatum* sur ail a récemment été confirmé par Mondani et al. (2020). Nous avons réitéré l'expérience en retirant les plateaux racinaires d'où les hyphes semblaient émerger. Aucun symptôme ni apparition de mycélium n'a été observé dans les mêmes conditions expérimentales (résultats non-montrés). Il semble donc que de l'inoculum de *F. proliferatum* ait été localisé dans les interstices du plateau racinaire et que l'infection des tissus non liégeux (corps blanc de la gousse) puisse avoir lieu à partir de cet inoculum.

Pour comprendre le développement de la maladie et orienter une future méthode de protection de l'ail, il convenait de comprendre comment *Fusarium* s'installait et pénétrait les gousses. En partenariat avec Avignon Université et le plateau de microscopie 3A, des observations microscopiques ont été effectuées sur les gousses à différents stades post-inoculation (avec *F. proliferatum*). L'utilisation de microscopes optique et électronique m'a permis de déterminer de plus en plus finement les tissus impactés, la cinétique d'infection et l'organisation spatiale du mycélium. De ces observations, nous avons conclu à une incapacité des souches de *F. proliferatum* à pénétrer l'épiderme intact des gousses et à l'entrée dans les gousses par des blessures naturelles (germination) ou accidentelles (chocs lors de la récolte et/ou de la calibration des têtes). Ceci coïncide avec ce que nous avons observé lors des tests d'agressivité : les gousses asymptomatiques blessées lors de l'épluchage développaient des symptômes plus

importants et plus rapidement que les autres après avoir été placées dans une suspension de spores.

De plus, le plateau racinaire, de par sa structure rugueuse, pleine d'aspérités et de débris cellulaires, constitue une protection physique vis-à-vis des agressions extérieures et une réserve d'énergie libre, facilement exploitable et importante. De plus on sait que les exsudats racinaires attirent le mycélium de *Fusarium* [Steinkellner et al, 2004] qui entre en dormance au niveau du plateau racinaire. L'infection des gousses lors de leur mise en terre semble donc une hypothèse plausible. On peut imaginer que le mycélium est ensuite réactivé à partir de la récolte puis colonise les tissus des gousses lors du séchage et du stockage. Des essais de stockage des gousses dans des réfrigérateurs menés par la filière, montrent que le froid ralentit significativement l'apparition des symptômes. Cependant, à la sortie des réfrigérateurs, les gousses doivent être utilisées rapidement car les symptômes font leur retour. Au-delà des investissements conséquents que représente l'acquisition de réfrigérateurs de taille industrielle et des coûts énergétiques qu'ils induisent, le froid ne fait que retarder les symptômes mais il ne traite pas la cause de la maladie. Il convient donc de continuer les recherches en ce sens.

Parallèlement à l'hypothèse de l'infection à partir d'inoculum tellurique, l'infection à partir d'inoculum aérien, même si elle n'a pas été testée dans le cadre de cette thèse, ne peut être écartée. En effet, des souches de *F. proliferatum* isolées d'eau de pluie ont été capables de recréer des symptômes sur gousses [Gil-Serna et al, 2016]. L'exploration de réservoirs potentiels d'inoculum de *F. proliferatum* (air, pluie, sol, plantes cultivées en rotation avec l'ail...) est en cours au sein du projet OCARINA (financement département SPE INRAE). S'il s'avère que l'inoculum aérien présente une part non négligeable dans l'émergence de la maladie en France, l'hypothèse de l'introduction d'une souche via l'atmosphère à partir d'une zone géographique éloignée pourrait gagner en crédibilité.

Grâce à l'identification et la caractérisation des agents pathogènes responsables des symptômes sur ail, le développement d'une méthode de détection a pu être initié. Grâce à des discussions avec des collègues travaillant sur des techniques de détection moléculaire et sur la base des critères d'utilisation par des acteurs de terrain, la méthode de détection LAMP est apparue comme la plus simple et la plus pratique à mettre en place. Dans sa forme actuelle, la méthode permet la détection d'ADN de souches de *F. proliferatum in vitro*. Le challenge des prochains mois sera d'adapter cette méthode à la matrice ail et d'autres matrices telles que le sol, l'air, l'eau afin de 1)-trouver un moyen d'identifier les lots d'ail à risque avant le stockage et 2)-élucider l'épidémiologie de la maladie.

Les connaissances acquises lors de ces trois années de thèse, ainsi que toutes celles qui pourront être acquises grâce à l'utilisation de la méthode de détection, devraient permettre de progresser vers la mise en place de méthodes de lutte ciblées à des étapes clés du développement de l'agent pathogène. La bibliographie présente des méthodes de lutte face à *Fusarium* spp. On peut imaginer l'utilisation de produits phytosanitaires en préventif [Patón et al, 2017] comme par exemple en enrobage d'ail semence. Cependant l'utilisation de produits chimiques de synthèse est de moins en moins encouragée afin de protéger l'environnement et la santé humaine (directive cadre européenne 2009/128/CE de l'UE). De ce fait, il serait préférable pour la filière ail de se tourner dès à présent vers des méthodes alternatives pour protéger l'ail vis-à-vis de la fusariose telles que les produits de contrôle biologique [Yao et al, 2016] et/ou de solarisation des sols [Koike & Gordon, 2015]. Une démarche de protection de l'ail, non seulement efficace, mais

aussi respectueuse de l'environnement pourrait ajouter aux critères de qualité que possède déjà l'ail français.

Références bibliographiques

A

Ahlawat YS, 1974. A mosaic disease of garlic in Darjeeling hills. *Science and Culture* **40**, 466-467.

Agrios GN, 2005. Plant Pathology – 5th Edition. USA, FL, Academic Press.

Ail Rose de Lautrec Label Rouge IGP – Les recettes. Available at: <https://www.ailrosedelautrec.com/recettes>. [Accessed 25 November 2020].

Alberti I, Prodi A, Montanari M *et al.*, 2017. First report of *Fusarium proliferatum* associated with *Allium fistulosum* L. in Italy. *Journal of Plant Diseases and Protection* **125**, 231–233.

Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG *et al.*, 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 535–544.

Ankri S, Mirelman D, 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* **1**, 125–129.

Askun T, 2018. Introductory Chapter: *Fusarium*: Pathogenicity, Infections, Diseases, Mycotoxins and Management. IntechOpen, Rijeka, Tulin Askun.

Avasthi S, Gautam AK, Bhadauria R, 2018. First report of leaf spot disease of *Aloe vera* caused by *Fusarium proliferatum* in India. *Journal of Plant Protection Research* **58**, 109-114.

B

Bacon CW, Nelson PE, 1994. Fumonisin Production in Corn by Toxigenic Strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection* **57**, 514–521.

Bacon CW, Yates IE, 2006. Endophytic Root Colonization by *Fusarium* Species: Histology, Plant Interactions, and Toxicity. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, 2006. Microbial Root Endophytes. *Soil Biology*, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 133-152.

Basallote-Ureba MJ, Melero-Vara JM, 1993. Control of garlic white rot by soil solarization. *Crop Protection* **12**, 219–223.

Bennett RS, 2012. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Chlamydozoospores Under Solarization Temperatures. *Plant Disease* **96**, 1564–1568.

Beyer M, Röding S, Ludewig A *et al.*, 2004. Germination and Survival of *Fusarium graminearum* Macroconidia as Affected by Environmental Factors. *Journal of Phytopathology* **152**, 92–97.

Bilal L, Asaf S, Hamayun M *et al.*, 2018. Plant growth promoting endophytic fungi *Asprgillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis*, **76**, 117-127.

Bjelić D, Ignjatov M, Marinković J *et al.*, 2018. *Bacillus* isolates as potential biocontrol agents of *Fusarium* clove rot of garlic. *Zemdirbyste-Agriculture* **105**, 369–376.

Booth C, 1971. The Genus *Fusarium*. Kew, UK, Commonwealth Mycological Institute. pp. 237.

Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke M *et al.*, 2014. Allicin: Chemistry and Biological Properties. *Molecules* **19**, 12591–12618.

Borrero C, Capote N, Gallardo MA *et al.*, 2019. First report of vascular wilt caused by *Fusarium proliferatum* on strawberry in Spain. *Plant Disease* **103**, 581.

Brayford D, 1996. IMI descriptions of fungi and bacteria set 127. *Mycopathologia* **133**, 35-63.

Bushnell WR, Hazen BE, Pritsch C, 2003. Histology and physiology of *Fusarium* head blight. In: Leonard KJ, Bushnell WR, 2003. *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley. St. Paul, MN, APS Press. pp. 44 – 83.

C

Carrieri R, Raimo F, Pentangelo A *et al.*, 2013. *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. *Crop protection* **43**, 31-37.

Catalogue of life: 2019 Annual Checklist – Résultats pour les noms scientifiques (genre : *Fusarium*). Available at: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019/search/scientific/genus/Fusarium/fossil/1/match/1>. [Accessed 25 November 2020].

Chandra Nayaka S, Niranjana SR, Uday Shankar AC *et al.*, 2010. Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* **43**, 264–282.

Chang KF, Hwang SF, Conner RL *et al.*, 2015. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada. *Crop Protection* **67**, 52–58.

Chen C, Liu CH, Cai J *et al.*, 2018. Broad-spectrum antimicrobial activity, chemical composition and mechanism of action of garlic (*Allium sativum*) extracts. *Food Control* **86**, 117–125.

Chrétien PL, Laurent S, Bornard I *et al.*, 2020. Unraveling the infection process of garlic by *Fusarium proliferatum*, the causal agent of root rot. *Phytopathologia Mediterranea*, **59**, 285-293.

Clark G, 1981. Staining Procedures. 4th Edition. Williams & Wilkins. Baltimore. 512p.

Coulter ID, Willis EM, 2004. The rise and rise of complementary and alternative medicine: a sociological perspective. *Medical Journal of Australia* **180**, 587–589.

Curtis H, Noll U, Störmann J *et al.*, 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**, 79–89.

D

Dammer K-H, Möller B, Rodemann B *et al.*, 2011. Detection of head blight (*Fusarium* ssp.) in winter wheat by color and multispectral image analyses. *Crop Protection* **30**, 420–428.

Delgado-Ortiz JC, Ochoa-Fuentes YM, Cerna-Chávez E *et al.*, 2016. Patogenicidad de especies de *Fusarium*

asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. *Revista Argentina de Microbiología* **48**, 222–228.

Desjardins AE, Proctor RH, 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 47-50.

Díaz Arias MM, Munkvold GP, Leandro LF, 2011. First Report of *Fusarium proliferatum* causing root rot on soybean (*Glycine max*) in the United States. *Plant Disease* **95**, 1316.

D’Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC, 1999. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* **80**, 183-205.

Duan C, Qin Z, Yang Z *et al.*, 2016. Identification of Pathogenic *Fusarium* spp. Causing Maize Ear Rot and Potential Mycotoxin Production in China. *Toxins* **8**, 186.

Dugan FM, Hellier BC, Lupien SL, 2003. First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology* **52**, 426.

Dugan FM, Hellier BC, Lupien SL, 2007. Pathogenic Fungi in Garlic Seed Cloves from the United States and China, and Efficacy of Fungicides Against Pathogens in Garlic Germplasm in Washington State. *Journal of Phytopathology* **155**, 437–445.

E

Edel-Hermann V, Lecomte C, 2019. Current Status of *Fusarium oxysporum* *Formae Speciales* and Races. *Phytopathology* **109**, 512–530.

El Maâtaoui M, Pichot C, 1999. Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens* L. *Planta* **208**, 345–351.

Elshahawy IE, Saied NM and Morsy AA, 2017. *Fusarium proliferatum*, the main cause of clove rot during storage, reduces clove germination and causes wilt of established garlic plants. *Journal of Plant Pathology*, **99**, 85-93.

European Parliament. Establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. DIRECTIVE 2009/128/EC.

F

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) – FAOSTATS – Crops - Visualize data. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. [Accessed 25 November 2020].

Fenwick GR, Hanley AB, Whitaker JR, 1985. The genus *allium*— part 1. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **22**, 199–271.

Fourie G, Steenkamp ET, Ploetz RC *et al.*, 2011. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* *formae specialis cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution* **11**, 533–542.

G

Galtier P, Le Bizec B, Leblanc JC *et al.*, 2009. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final. AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments).

Gálvez L, Urbaniak M, Waśkiewicz A *et al.*, 2017. *Fusarium proliferatum* - Causal agent of garlic bulb rot in Spain: genetic variability and mycotoxin production. *Food Microbiology* **67**, 41-48.

Gao M-L, Luan Y-S, Yu H-N, Bao Y-M, 2016. First report of tomato leaf spot caused by *Fusarium proliferatum* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology* **38**, 400–404.

Gil-Serna, J., Gálvez, L., París, M. *et al.* *Fusarium proliferatum* from rainwater and rooted garlic show genetic and pathogenicity differences. *European Journal of Plant Pathology* **146**, 199–206 (2016).

González V and Tello ML, 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, **47**, 29-42.

Guenther JC, Trail F, 2005. The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia* **97**, 229–237.

GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants) – Questions / Réponses sur le GNIS et la filière semences. Available at: <https://www.gnis.fr/questions-reponses-gnis-filiere-semences/#le-gnis-cest-quoi-exactement>. [Accessed 25 November 2020].

H

Héraud C, Steinberg C, Corberand T *et al.*, 2010. MIAE: collection de référence dédiée aux microorganismes d'intérêt agro-environnemental. Journées Jean Chevaugéon 2010: 8èmes rencontres de Phytopathologie-Mycologie de la Société Française de Phytopathologie (SFP), Aussois, France, 1 p.

Hernández Fernaud JR, Marina A, González K *et al.*, 2006. Production, partial characterization and mass spectrometric studies of the extracellular laccase activity from *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **70**, 212–221.

Hogg AC, Johnston RH, Dyer AT, 2007. Applying Real-Time Quantitative PCR to *Fusarium* Crown Rot of Wheat. *Plant Disease* **91**, 1021–1028.

Hornok L, Waalwijk C, Leslie JF, 2007. Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 54–58.

I

INAO (Institut National de l'Origine et de la qualité) – Les signes officiels de la qualité et de l'origine, SIQO. Available at: <https://www.inao.gouv.fr/Les-signes-officiels-de-la-qualite-et-de-l-origine-SIQO>. [Accessed 25 November 2020].

Ignjatov M, Milošević D, Nikolić Z *et al.*, 2016. First Report of *Fusarium tricinctum* Causing Rot of Garlic Bulbs in Serbia. *Plant Disease* **101**, 382–382.

Ignjatov M, Bjelić D, Nikolić Z *et al.*, 2017. First Report of *Fusarium acuminatum* Causing Garlic Bulb Rot

in Serbia. *Plant Disease* **101**, 1047.

Ignjatov M, Milosević D, Ivanović Ž *et al.*, 2018. Morphological and pathogenic properties of *Fusarium proliferatum* isolates: The causal agent of garlic (*Allium sativum* L.): Rot in Serbia. *Ratarstvo i Povrtarstvo*, **55**, 125–129.

J

Jenderek MM, Hannan RM, 2003. Phenotypic characteristics of open pollinated garlic progenies. *HortScience* **38**, 673.

Jestoi M, 2008. Emerging *Fusarium* Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48**, 21–49.

Ji F, He D, Olaniran AO *et al.*, 2019. Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: a review. *Food Production, Processing and Nutrition* **1**, 6.

Jurado M, Vázquez C, Patiño B *et al.*, 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 562–568.

Jurado M, Vázquez C, Marín S *et al.*, 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*, **29**, 681-689.

Jurado M, Marín P, Vázquez C *et al.*, 2012. Divergence of the IGS rDNA in *Fusarium proliferatum* and *Fusarium globosum* reveals two strain specific non-orthologous types. *Mycological Progress*, **11**, 101-107.

K

Keshri G, Magan N, 2000. Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 825–833.

Kikot GE, Hours RA, Alconada TM, 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum* : a review. In: Pathogenesis of *Fusarium graminearum*. *Journal of Basic Microbiology* **49**, 231–241.

Knogge W, 1996. Fungal Infection of Plants. *The Plant Cell*, 1711–1722.

Koike ST, Gordon TR, 2015. Management of *Fusarium* wilt of strawberry. *Crop protection* **73**, 67-72.

Koleva K, 2004. Variety of species and spread of fungi of genus *Fusarium* related to rotting of garlic. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **10**, 177–180.

Krishnaswamy R, 2015. An In-vitro Study on Bacterial Susceptibility and Novel Resistance to Allicin. *International Journal of Scientific and Engineering Research* **6**, 134–137.

Kuldau GA, Yates IE, 2000. Evidence for *Fusarium* Endophytes in Cultivated and Wild Plants. In: Bacon CW, White JF, 2000. Microbial Endophytes. New-York – Basel, Marcel Dekker Inc. pp. 85-119.

Kwon S-I, Dohlen CD von, Anderson AJ, 2001. Gene sequence analysis of an opportunistic wheat pathogen, an isolate of *Fusarium proliferatum*. *Canadian Journal of Botany*, **79**, 1115-1121.

L

Lanzotti V, Bonanomi G, Scala F, 2013. What makes *Allium* species effective against pathogenic microbes? *Phytochemistry Reviews* **12**, 751–772. *Transactions of the British Mycological Society* **29**, 250-258.

Lebiush-Mordechai S, Erlich O, Maymon M et al., 2014. Bulb and root rot in lily (*Lilium longiflorum*) and onion (*Allium cepa*) in Israel. *Journal of Phytopathology* **162**, 466–471.

Leontiev R, Hohaus N, Jacob C et al., 2018. A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. *Scientific Reports* **8**, 1–19.

Leslie JF, Pearson CAS, Nelson PE et al., 1990. *Fusarium* spp. from Corn, Sorghum, and Soybean Fields in the Central and Eastern United States. *Phytopathology* **80**, 343.

Leslie JF, Summerell BA, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. USA: Blackwell Publishing.

Leslie JF, Xu JR, 2010. 38: *Fusarium* Genetics and Pathogenicity. In: Borkovich KA, Ebbole DJ, 2010. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Washington, DC: ASM Press. pp. 607-621.

Leyronas C, Chrétien PL, Troulet C et al. 2018. First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Garlic Clove Rot in France. *Plant Disease*, **102**, 2658.

Linder T, 2018. Assimilation of alternative sulfur sources in fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **34**, 51.

Liu YJ, Whelen S, Hall BD, 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 1799-1808.

Liu X, Liu C, 2016. Effects of Drought-Stress on *Fusarium* Crown Rot Development in Barley. *PLOS ONE* **11**, pp. 13.

Logrieco A, Mulè G, Moretti A et al., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 597–609.

Logrieco A, Bottalico A, Mulé G et al., 2003. Epidemiology of Toxigenic Fungi and their Associated Mycotoxins for Some Mediterranean Crops. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 645–667.

M

Mao W, Carroll RB, Whittington DP, 1998. Association of *Phoma terrestris*, *Pythium irregulare*, and *Fusarium acuminatum* in Causing Red Root Rot of Corn. *Plant Disease* **82**, 337–342.

Marín P, de Ory A, Cruz A et al., 2013. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* **165**, 251–258.

Mary Wanjiru W, Zhensheng K, Buchenauer H, 2002. Importance of Cell Wall Degrading Enzymes

Produced by *Fusarium graminearum* during Infection of Wheat Heads. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 803–810.

Matheny PB, Liu YJ, Ammirati JF *et al.*, 2002. Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales). *American Journal of Botany*, **89**, 688-698.

Matuo T, Miyagawa M, Saito H, 1986. *Fusarium oxysporum* f. sp. garlic n. f. sp. causing basal rot of garlic. *Japanese Journal of Phytopathology* **52**, 860–864.

McKean C, Tang L, Tang M *et al.*, 2006. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 868–876.

Mohana Kumara P, Zuehlke S, Priti V *et al.*, 2012. *Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook.f, produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anti-cancer activity. *Antonie van Leeuwenhoek*, **101**, 323-329.

Moharam MHA, Farrag ESH, Mohamed MDA, 2013. Pathogenic fungi in garlic seed cloves and first report of *Fusarium proliferatum* causing cloves rot of stored bulbs in upper Egypt. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* **46**, 2096–2103.

Mondani L, Chiusa G, Pietri A *et al.*, 2020. Monitoring the incidence of dry rot caused by *Fusarium proliferatum* in garlic at harvest and during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 111407. In Press.

Moore WC, 1946. New and interesting plant diseases. *Transactions of the British Mycological Society* **29**, 250-258.

Munkvold GP, 2003. Epidemiology of *Fusarium* species and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 705–713.

N

Ndambi B, Cadisch G, Elzein A *et al.*, 2012. Tissue specific reactions of sorghum roots to the mycoherbicide *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* versus the pathogenic *F. proliferatum*. *Biocontrol Science and Technology* **22**, 135–150.

Nelson PE, 1981. Chapter 3 – Life Cycle and Epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: Mace ME, Bell AA, Beckman CH, 1981. *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press. pp. 51-80.

New England Biolabs – Isothermal Amplification. Available at: <https://www.neb-online.fr/en/neb-en/pcr-and-dna-amplification/isothermal-amplification-2/>. [Accessed 07 December 2020].

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H *et al.*, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **28**, 63e–663.

O

Ochoa-Fuentes Y, Cerna E, Gallegos MG *et al.*, 2012. Identification of *Fusarium* species in garlic seed from Aguascalientes, Mexico. *Revista Mexicana de micología* **36**, 27-32.

O'Donnell K, Cigelnik E, 1997. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **7**, 103-116.

O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH *et al.*, 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology* **52**, 20–31.

Osborne LE, Stein JM, 2007. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 103–108.

P

Palmero D, De Cara M, Iglesias C *et al.*, 2010. First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Rot of Garlic Bulbs in Spain. *Plant Disease* **94**, 277–277.

Passeport Santé – Qu'est-ce qu'un aliment fonctionnel ? Available at: https://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Dossiers/ArticleComplementaire.aspx?doc=aliments_fonctionnels_definition.do. [Accessed 25 November 2020].

Pastrana AM, Basallote-Ureba MJ, Aguado A *et al.*, 2016. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea* **55**, 109-120.

Pereira P, Nesci A, Etcheverry MG, 2009. Efficacy of bacterial seed treatments for the control of *Fusarium verticillioides* in maize. *BioControl* **54**, 103–111.

Patón LG, Marrero MDR, Llamas DP, 2017. In vitro and field efficacy of three fungicides against *Fusarium* bulb rot of garlic. *European Journal of Plant Pathology* **148**, 321–328.

Prosemail – Bien choisir les variétés d'ail. Available at: <https://ail-echalote-certifie.org/bien-choisir-les-varietes-d-ail/>. [Accessed 25 November 2020].

PROTA4U database – *Allium sativum* L. Available at: <https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?fr=1&g=pe&p=Allium+sativum+L>. [Accessed 25 November 2020].

R

Reeslev M, Kjølner A, 1995. Comparison of Biomass Dry Weights and Radial Growth Rates of Fungal Colonies on Media Solidified with Different Gelling Compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4236-4239.

Regalado V, Perestelo F, Rodríguez A *et al.*, 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 388–390.

Ricard P, 2017. Les premiers pas vers l'étiologie et l'épidémiologie d'une maladie multifactorielle et en expansion : la fusariose de l'ail (*Allium sativum* L.). Sciences du Vivant [q-bio]. [dumas-01618306](#)

Rivlin RS, 2001. Historical Perspective on the Use of Garlic. *The Journal of Nutrition* **131**, 951S-954S.

RNM (Réseau des Nouvelles des Marchés), 2020. L'ail en 2019-2020. Available at: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwju0LXX-J3tAhV_DmMBHdizDx4QFjAAegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fnm.franceagrimer.fr%2Fbilan_campagne%3Fail&usg=AOvVaw2R9Tt0IuD9wLBibNoTKiNI. [Accessed 25 November 2020].

Roberts PA, Matthews WC, 1995. Disinfection alternatives for control of *Ditylenchus dipsaci* in garlic seed cloves. *Journal of Nematology* **27**, 448–456.

S

Safarieskandari S, Chatterton S, Hall LM, 2020. Pathogenicity and host range of *Fusarium* species associated with pea root rot in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1–10.

Sankar NR, Babu GP, 2012. First Report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs (*Allium sativum*) in India. *Plant Disease* **96**, 290.

Schmale DG, Leslie JF, Saleh AA *et al.*, 2006. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology* **96**, 1021–1026.

Schollenberger M, Müller HM, Rühle M *et al.*, 2005. Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 317–326.

Schwartz HF, Krishna Mohan S, 2016. PART I: Infectious/Biotic Disease. In: Schwartz HF, Krishna Mohan S. Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests, Second Edition. USA: APS Press. pp. 8-86.

Secor GA, Gudmestad NC, 1999. Managing fungal diseases of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology* **21**, 213–221.

Seefelder W, Gossmann M, Humpf HU, 2002. Analysis of fumonisin B(1) in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2778–2781.

Sharafaddin AH, Hamad YK, El Komy MH *et al.*, 2019. Cell wall degrading enzymes and their impact on *Fusarium proliferatum* pathogenicity. *European Journal of Plant Pathology* **155**, 871–880.

Shvetsova SV, Zhurishkina EV, Bobrov KS *et al.*, 2015. The novel strain *Fusarium proliferatum* LE1 (RCAM02409) produces α -L-fucosidase and arylsulfatase during the growth on fucoidan: Alfa-L-fucosidase and arylsulfatase from the novel strain *Fusarium proliferatum*. *Journal of Basic Microbiology* **55**, 471–479.

Šišić A, Baćanović-Šišić J, Al-Hatmi AMS *et al.*, 2018. The 'forma specialis' issue in *Fusarium*: A case study in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Scientific Reports* **8**, 1252.

Slusarenko AJ, Patel A, Portz D, 2008. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *European Journal of Plant Pathology*, **121**, 313-322.

Snijders, CHA, 1990. *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **96**, 187–198.

Stankovic S, Levic J, Petrovic T *et al.*, 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium*

proliferatum isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* **118**, 165–172.

Steinkellner S, Mammerler R, Vierheilig H, 2005. Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. *Journal of Plant Interactions* **1**, 23–30.

Stępień Ł, Koczyk G, Waśkiewicz A, 2011. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics*, **52**, 487–496.

T

Tariq V-N, Magee AC, 1990. Effect of volatiles from garlic bulb extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research* **94**, 617–620.

Tela Botanica – eFlore L'encyclopédie botanique collaborative – Description de Coste : *Allium sativum*. Available at: <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-3195-description>. [Accessed 25 November 2020].

This H, 2006. *Molecular gastronomy: exploring the science of flavor*. New York: Columbia University Press.

TimeTree – The Timescale of Life – Taxa Group Allium. Available at: <http://timetree.org/>. [Accessed 03 December 2020].

Toit LJ, Inglis DA, Pelter GQ, 2003. *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease* **87**, 750.

Tonti S, Dal Prà M, Nipoti P *et al.*, 2012. First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Rot of Stored Garlic Bulbs (*Allium sativum* L.) in Italy. *Journal of Phytopathology* **160**, 761–763.

Torres AM, Ramirez ML, Arroyo M *et al.*, 2003. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 319–324.

Totelin L, 2015. When foods become remedies in ancient Greece: The curious case of garlic and other substances. *Journal of Ethnopharmacology* **167**, 30–37.

Tridge, 2019. Garlic (*Allium sativum*) – Garlic Price Trend. Available at: <https://www.tridge.com/products/garlic>. Accessed August 10, 2019.

U

UAF (University of Alaska Fairbanks) – Growing Garlic in Alaska. Available at: <https://www.uaf.edu/ces/garden/garlic/>. [Accessed 25 November 2020].

W

Wagacha JM, Muthomi JW, 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection* **26**, 877–885.

Wang H, Li X, Liu X *et al.*, 2014. Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*

95, 1838-1844.

Wang Y, Wang C, Wang L *et al.*, 2020. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium proliferatum* causing ear and kernel rot on maize. *Crop Protection* **132**, 105142.

West JS, Canning GGM, Perryman SA *et al.*, 2017. Novel Technologies for the detection of *Fusarium* head blight disease and airborne inoculum. *Tropical Plant Pathology* **42**, 203–209.

Wenda-Piesik A, Lemańczyk G, Twarużek M *et al.*, 2017. *Fusarium* head blight incidence and detection of *Fusarium* toxins in wheat in relation to agronomic factors. *European Journal of Plant Pathology* **149**, 515–531.

White TJ, Bruns TD, Lee SB *et al.*, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Pcr Protocols*, **31**, 315-322.

Williams P, Manley M, Fox G *et al.*, 2010. Indirect Detection of *Fusarium Verticillioides* in Maize (*Zea mays* L.) Kernels by near Infrared Hyperspectral Imaging. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **18**, 49–58.

X

Xie SH, Zhang C, Chen MS *et al.*, 2018. *Fusarium proliferatum* : a new pathogen causing fruit rot of peach in Ningde, China. *Plant Disease* **102**, 1858.

Y

Yamazaki M, Morita Y, Kashiwa T *et al.*, 2013. *Fusarium proliferatum*, an additional bulb rot pathogen of Chinese chive. *Journal of General Plant Pathology* **79**, 431–434.

Yao Y, Xue Z, Hong C *et al.*, 2016. Efficiency of different solarization-based ecological soil treatments on the control of *Fusarium* wilt and their impacts on the soil microbial community. *Applied Soil Ecology* **108**, 341-351.

Z

Zeller KA, Bowden RL, Leslie JF, 2004. Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from the United States. *Molecular Ecology* **13**, 563–571.

Zhang SY, Dai DJ, Wang HD *et al.*, 2019. One-step loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Fusarium fujikuroi* in bakanae disease through NRPS31, an important gene in the gibberellic acid bio-synthesis. *Scientific Reports* **9**, 3726.

Annexes

A	2017		2018												2019												2020												2021						
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F					
TAA	•												•											•																					
Prosemail						•					•							•					•																						
SdARL							•																																						
ANIAIL																	•																												

B	2017		2018												2019												2020												2021									
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F								
JDD SPE								•											•																													
FEMS2019									•																																							
JS ED536								•																																								
AB Piacenza																										•																						
JM																																																

C	2017		2018												2019												2020												2021											
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F										
LAMP			•																																															
Zététique								•																																										
Zotero														•																																				
Stats																																																		
JC																																																		
Mycotox																																																		
Ethique																																																		

Annexe 1. Récapitulatif des communications orales effectuées auprès de la profession (A), de présentations défendues lors de colloques et séminaires scientifiques (B) et formations suivies (C).

Signification des abréviations page suivante.

Tableau A

TAA	Top'Alliance Alinéa
Prosemail	Association des producteurs de semences d'ail et d'échalote
SdARL	Syndicat de l'Ail Rose de Lautrec
ANIAIL	Association Nationale Interprofessionnelle de l'AIL

Tableau B

JDD SPE	Journées des Doctorants du département de la Santé des Plantes et Environnement (10èmes journées à Nice et 11èmes à Rennes)
FEMS2019	Federation of European Microbiological Societes (Congrès à Glasgow)
JS ED536	Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale 536 (Avignon Université)
AB Piacenza	Séminaire « Ail blanc de Plaisance : une recherche au service d'une longue tradition de qualité » (Università Cattolica Del Sacro Cuore, Piacenza)
JM	Journées Mycotoxines (8ème édition du congrès à l'Université Bretagne Occidentale)

Tableau C

LAMP	Initiation à la technique LAMP (INRAE Montpellier)
Zététique	Conférence sur la zététique (Avignon Université)
Zotero	Découverte du logiciel Zotero (INRAE Montpellier et INRAE Avignon)
Stats	Notions fondamentales en statistiques et tests d'hypothèse (INRAE Avignon)
JC	Se positionner comme Jeune Chercheur (INRAE Avignon)
Mycotox	Détection et dosage de mycotoxines par la méthode LC-MS (INRAE Bordeaux)
Ethique	Ethique de la recherche (Avignon Université)

