

ORSAY
n° d'ordre :

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

pour obtenir

Le Grade de DOCTEUR en SCIENCES

de l'Université Paris XI Orsay

par

Thierry JAUNET

**Sujet : Caractérisation, pathogénie et épidémiologie de
Pseudomonas fuscovaginae, agent de la pourriture brune des
gaines du riz (*Oryza sativa*).**

soutenue le 13 janvier 1995 devant la Commission d'examen

MM.

M. DRON
P. LEMANCEAU
F. RAPILLY
P. NORMAND
J.L. NOTTEGHEM

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

ORSAY
n° d'ordre :

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

pour obtenir

Le Grade de DOCTEUR en SCIENCES

de l'Université Paris XI Orsay

par

Thierry JAUNET

**Sujet : Caractérisation, pathogénie et épidémiologie de
Pseudomonas fuscovaginae, agent de la pourriture brune des
gaines du riz (*Oryza sativa*).**

soutenue le 13 janvier 1995 devant la Commission d'examen

MM.

M. DRON
P. LEMANCEAU
F. RAPILLY
P. NORMAND
J.L. NOTTEGHEM

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Remerciements

Mes remerciements s'adressent tout d'abord au CIRAD-CA et tout particulièrement à Jean-Loup Nottéghem qui m'ont accordé leur confiance et m'ont offert les conditions scientifiques et logistiques les plus favorables pour la réalisation de mes travaux aussi bien à Montpellier qu'à Madagascar.

Je tiens à remercier Michel Dron qui en m'acceptant dans sa formation doctorale témoigna du crédit qu'il m'accordait.

Je remercie vivement Monsieur Frantz Rapilly qui accepta de parrainer ma thèse. La qualité de son encadrement en épidémiologie a permis d'orienter et d'approfondir mes réflexions sur les travaux menés à Madagascar.

Les travaux réalisés sur la caractérisation génétique de *Pseudomonas fuscovaginae* n'auraient pu être réalisés sans l'appui scientifique et technique de Roger Frutos et de son laboratoire IGEPAM. Je les remercie donc ainsi que Philippe Lemanceau pour l'intérêt qu'il porta à ces travaux de phylogénie et pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie la direction scientifique du FO.FI.FA. à Madagascar ainsi que Madame Jacqueline Rakotoarisao, chef du Département de Recherche Rizicole, pour m'avoir permis de mener à bien mes études épidémiologiques sur les hauts plateaux. Mais ma reconnaissance va aussi au personnel scientifique et technique du FO.FI.FA. et du projet CEE/Riz d'altitude sans qui ces travaux n'auraient pu se concrétiser. Je tiens à remercier tout particulièrement Roger Déchanet pour sa connaissance encyclopédique de Madagascar et de la riziculture malgache et pour l'intérêt qu'il montra pour mes travaux.

Je remercie Philippe Normand d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie tout le laboratoire de phytopathologie du CIRAD-CA qui sut supporter avec patience mes humeurs vagabondes et mon instinct inné de l'ordre.

Ma gratitude va aussi à mes pairs et compagnons d'incertitude Jean Carlier et Didier Tharreau qui furent plus indulgents avec moi que je ne le fus avec eux.

Enfin, je n'oublie pas de remercier ma famille et mes ami(e)s qui furent, sont et seront toujours présents et qui n'ont nul besoin d'être cités ici pour recevoir toute ma reconnaissance. Mais dans le souci de ne blesser personne, que tous ceux qui considèrent devoir être remerciés le soient aussi.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

1 L'HOTE	1
2 LA MALADIE ET L'AGENT PATHOGENE	2
2.1 Distribution et spectre d'hôte	2
2.2 Etiologie	3
2.3 Epidémiologie et méthodes de lutte	4
3 EPIDEMIOLOGIE DES BACTERIES DE LA PHYLLOSHERE	5

CHAPITRE I

CARACTERISATION DE L'AGENT PATHOGENE

1 INTRODUCTION	8
2 MATERIELS ET METHODES	12
2.1 Isolement de l'agent pathogène	12
2.2 Caractérisation biochimique	13
2.3 Caractérisation sérologique	13
2.3.1 matériel	13
2.3.2 méthode	13
2.4 Caractérisation du pouvoir pathogène	14
2.4.1 matériel végétal	14
2.4.2 préparation de l'inoculum	14
2.4.3 inoculation sur	14
2.4.4 caractérisation de la virulence par inoculation au stade gonflement	15
2.5 Polymorphisme génétique et pouvoir pathogène	15
2.5.1 isolats	15
2.5.2 amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)	16

2.5.3 clonage et analyse de certains produits de PCR	16
2.5.4 analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction du gène de l'ARNr 16S	16
2.5.5 pouvoir pathogène des différents génotypes ADNr 16S	17
3 RESULTATS	18
3.1 Isolement, profil biochimique, et pouvoir pathogène	18
3.2 Caractérisation sérologique	18
3.3 Comparaison de la virulence de <i>P. fuscovaginae</i> et d'isolats de <i>Pseudomonas</i> fluorescents après inoculation du riz au stade gonflement	19
3.4 Polymorphisme génétique et pouvoir pathogène	21
3.4.1 amplification de la séquence codante de l'ARNr 16S	21
3.4.2 caractérisation par RFLP des isolats de <i>Pseudomonas</i> isolés de riz .	22
3.4.3 pouvoir pathogène des différents génotypes	23
4 DISCUSSION	24

CHAPITRE II

ETUDE DE L'EXPRESSION DU POUVOIR PATHOGENE

1 INTRODUCTION	31
2 MATERIELS ET METHODES	33
2.1 Matériel	33
2.1.1 isolat	33
2.1.2 variétés	33
2.2 Méthode	33
2.2.1 effet du stade et du type de gaine sur la réceptivité	33
2.2.2 effet de la température	34
2.2.2.1 sur la virulence	34
2.2.2.2 sur la multiplication bactérienne	34
2.2.2.3 sur le temps d'incubation et le développement dans le temps des symptômes.	35

3 RESULTATS	35
3.1 Effet du stade et du numéro d'ordre de la gaine sur la réceptivité	35
3.2 effet de la température	36
3.2.1 sur la virulence	36
3.2.2 sur la multiplication <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	36
3.2.3 sur le temps d'incubation	38
3.2.4 sur le développement des symptômes	39
4 DISCUSSION	40

CHAPITRE III

EPIDEMIOLOGIE DE LA POURRITURE DES GAINES

1 INTRODUCTION	45
2 MATERIEL ET METHODE	46
2.1 Matériel	46
2.2 Méthode	47
2.2.1 Méthodes culturales et essais mis en place	47
2.2.2 Modèle d'échantillonnage	47
2.2.3 Mesure de l'incidence	48
2.2.4 Distribution spatiale de la maladie	48
2.2.5 Recherche de bactéries pathogènes dans le milieu	48
2.2.6 Traitement de semence	49
2.2.6.1 Au champ	49
2.2.6.2 Au laboratoire	49
3 RESULTATS	50
3.1 Description des paramètres de l'épidémiologie de la pourriture des gaines ..	50
3.1.1 L'inoculum primaire	50
3.1.1.1 dans le milieu	50
3.1.1.2 sur les semences	51
3.1.2 Relation maladie-altitude	51
3.2 Etude de la dynamique de la pourriture des gaines	52

3.2.1 Dynamiques d'évolution de l'hôte et de la maladie	53
3.2.1.1 dans le temps	53
3.2.1.2 dans l'espace	54
3.2.2 Détermination de la période de contamination	54
3.2.3 Rôle potentiel d'un inoculum secondaire	56
4 DISCUSSION GENERALE	57
CONCLUSION GENERALE	66

INTRODUCTION GENERALE

1 L'HOTE

La riziculture distribuée du 45° de latitude nord au 35° de latitude sud représente une culture de première importance dans l'agriculture mondiale. Le riz qui représente 25% de la production céréalière mondiale est la nourriture de base de près de 50% de la population mondiale (FAO, 1993).

Le riz est une plante monocotylédone de la famille des Poacées, de la tribu des Oryzées, du genre *Oryza* L.. L'espèce *Oryza sativa*, la plus cultivée, est divisée en 2 sous-espèces adaptées à différents environnements climatiques: la sous-espèce *indica* dans les zones tropicales et la sous-espèce *japonica* dans les zones tempérées et tropicales d'altitude (Second, 1986). Dans cette dernière sous-espèce on distingue aussi un sous-groupe *javanica* présent dans les zones de climat tropical.

Le cycle de développement du riz présente des caractéristiques comparables à celles des principales céréales cultivées : blé, orge (figure 1 ; Barbier, 1994). La période végétative (germination, levée, tallage) est dépendante de la température pour l'apparition des feuilles et des talles. La structure et le développement du tallage est synchrone avec l'apparition des feuilles (figure 2) : 3 phyllochrones séparent l'apparition de la première feuille de la première talle d'un même brin (brin maître, talles primaire ou secondaire), un phyllochrone sépare ensuite l'apparition des autres talles de ce brin. Le nombre de talles émises durant la période végétative résulte de la combinaison de facteurs agronomique (densité de plantes, nutrition azotée) et de facteurs du milieu (oxygénation du sol, conditions climatiques). Le passage de la phase végétative à la phase reproductrice (montaison, gonflement, épiaison, exertion totale) dépend de la température et de la longueur du jour (Tsunoda, 1984). Les deux sous-espèces *indica* et *japonica* diffèrent quant à l'importance de ces deux facteurs : les variétés *indica* traditionnelles sont fortement dépendantes de la photopériode alors que les variétés *japonica* dépendent de la somme des degré-jours.

La riziculture pratiquée dans les zones tropicales d'altitude et tempérées est principalement limitée par la température (Satake, 1976 ; Tsunoda, 1984). Cette contrainte majeure représentée par les basses températures en début et fin de cycle induit un rallongement du cycle végétatif (zéro de croissance de 13°C ; Barbier, 1994) ainsi qu'une stérilité des épillets (entre 15°C et 20°C ; Satake, 1976). En Asie du Sud et du Sud-Est, 7 millions d'hectares sont touchés par ce problème (Shahi & Kush, 1986). A Madagascar, 50% de la production locale de riz est issue

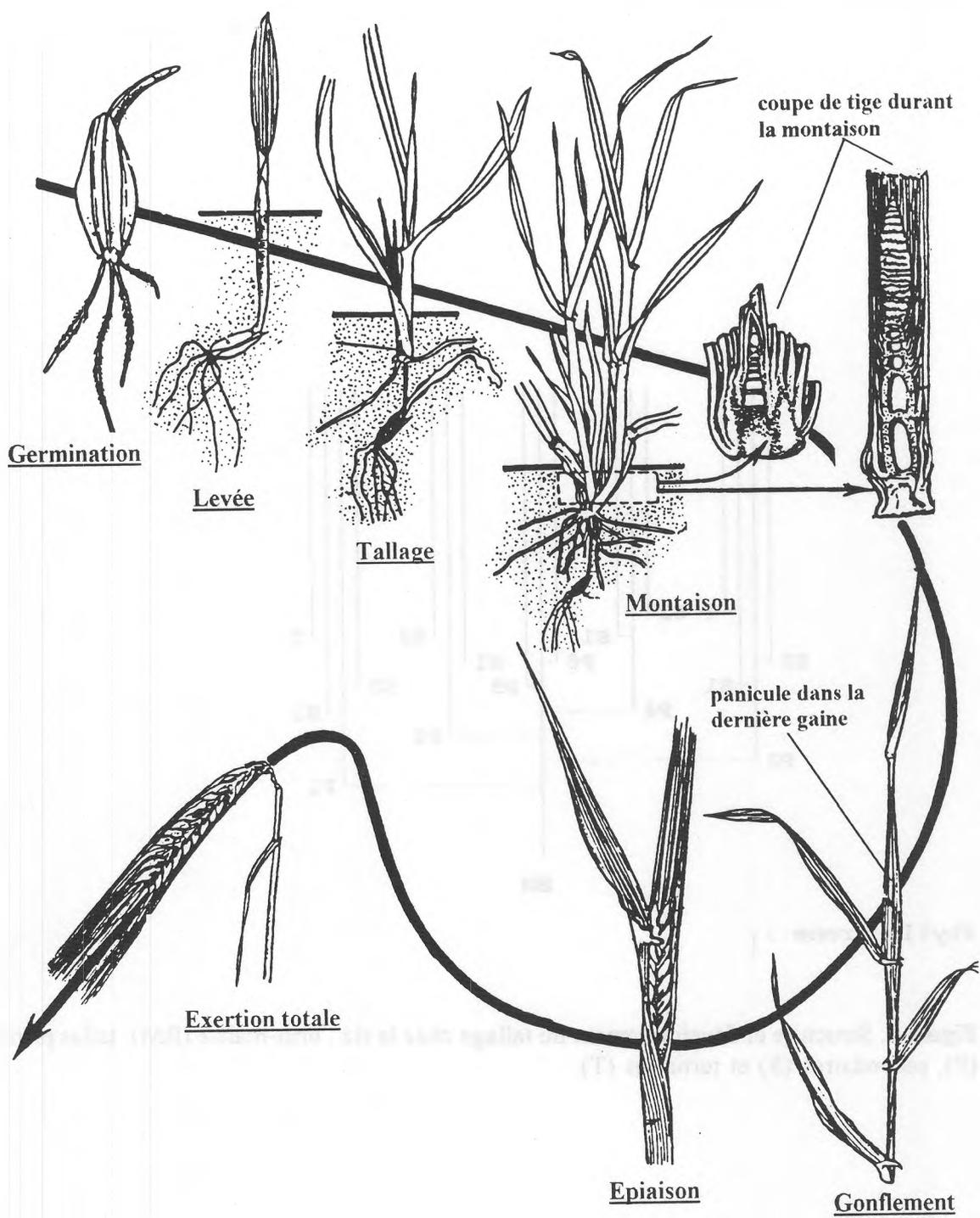
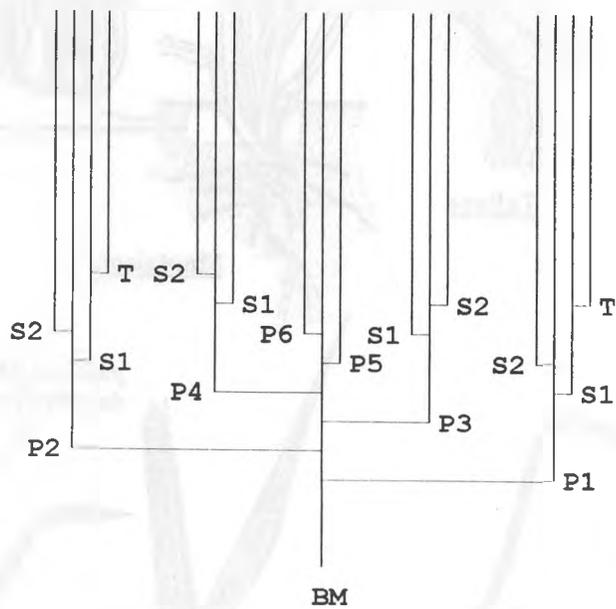


Figure 1 : Stades phénologiques du cycle des céréales



Phyllochrone : [

Figure 2. Structure et développement du tallage chez le riz : brin-maître (BM), talles primaires (P), secondaires (S) et tertiaires (T).

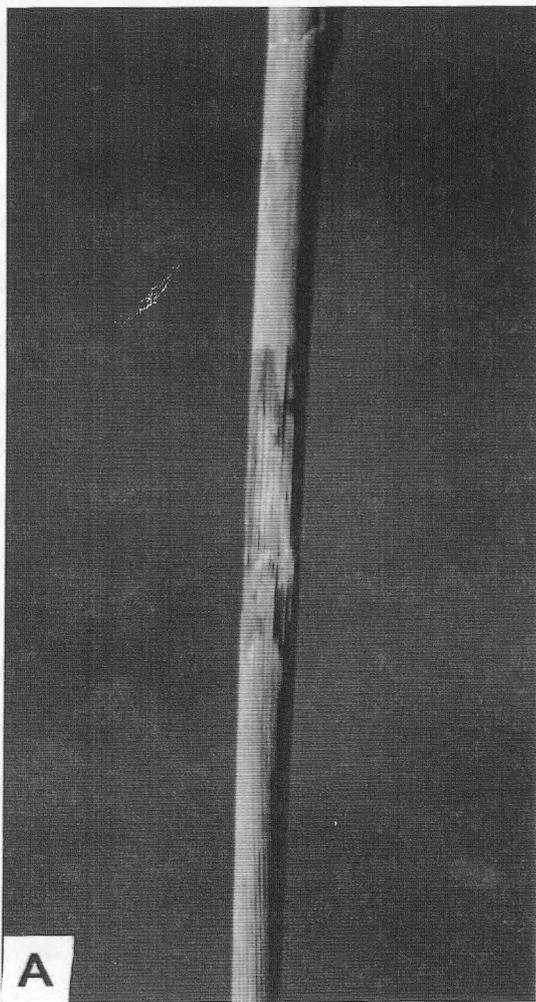
d'une riziculture pratiquée entre 1000 mètres et 2000 mètres d'altitude, représentant 600 000 hectares (Chabanne & Rollin, 1990). La température journalière moyenne à 1600 mètres d'altitude est de 12°C en Août, le mois le plus froid, et de 20°C en Janvier-Février (Chabanne & Rollin, 1990). L'étude des variations des températures en fonction de l'altitude met en évidence une diminution de 0,5°C par 100 mètres de dénivelé. Cette forte contrainte due à la température ne permet de pratiquer qu'une seule culture par an d'octobre à mai. Les variétés traditionnellement cultivées dans cette région des hauts plateaux de Madagascar se divisent en deux grands groupes : les Rojo (Rojofotsy, Rojomena) cultivées entre 700 à 1500 mètres et les Latsika (Latsidahy, Latsibavy, Latsika, Tokambana) cultivées au-dessus de 1500 mètres (Déchanet *et al.*, 1990). Des études génétiques de ces deux groupes à l'aide de marqueurs isozymiques (Rabary *et al.*, 1989) ont mis en évidence que les Latsika font partie de la sous-espèce *japonica* alors que les Rojo sont classées dans un groupe enzymatique typique de Madagascar intermédiaire entre les sous-espèces *indica* et *japonica*, mais plus proche des *indica* (divergence nucléotidique de 12%) que des *japonica* (divergence nucléotidique de 40%). L'appartenance des Latsika à la sous-espèce *japonica* des riz des zones tempérées permet d'expliquer leur présence en haute altitude à Madagascar.

La seconde contrainte limitant le développement de la riziculture en altitude à Madagascar est d'ordre phytopathologique et est représentée par *Pseudomonas fuscovaginae*, agent de la pourriture brune des gaines.

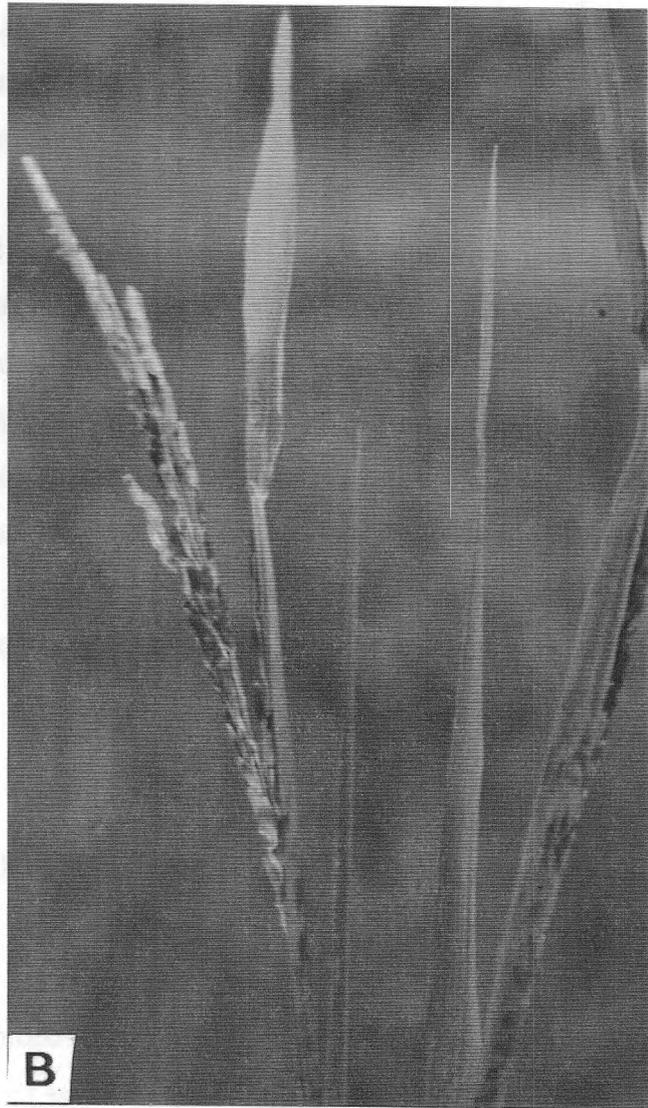
2 LA MALADIE ET L'AGENT PATHOGENE

2.1 Distribution et spectre d'hôte

Plusieurs espèces bactériennes sont décrites comme agent de pourritures de gaines (Ou, 1985). En zone tropicale de basse altitude, *P. syringae* pv. *syringae* apparaît par sa distribution mondiale comme la principale espèce (Ou, 1985). Les autres espèces occasionnant des pourritures de gaines dans ces régions sont des *Pseudomonas* spp. fluorescents (Nieves Mortensen *et al.*, 1992 ; Van Outryve *et al.*, 1992) et *Erwinia caratovora* (Ou, 1985). Dans les régions tropicales d'altitude et tempérées, le principal agent causal bactérien des pourritures de gaines est *Pseudomonas fuscovaginae* Tanii, Miyajima & Akita (Miyajima *et al.*, 1983). Cette espèce classée biochimiquement dans le biovar V des *Pseudomonas fluorescens* a été décrite pour la



A



B

Planche 1 : Symptômes dus à *P. fuscovaginae* sur la gaine paniculaire (A) et sur panicule (B).

première fois au Japon dans l'île d'Hokkaido en 1976 (Tanii *et al.*, 1976). Mais dans certaines de ces régions, d'autres *Pseudomonas* fluorescents ont été décrits à Madagascar, au Burundi et en Colombie (Duveiller *et al.*, 1988 ; Rott *et al.*, 1991 ; Zeigler & Alvarez, 1990).

P. fuscovaginae est présent dans toutes les régions tropicales où la riziculture est limitée par les basses températures : Nord du Japon, Népal, Madagascar, Burundi et Colombie (Duveiller *et al.*, 1988 ; Rott *et al.*, 1989b ; Shakya & Manandhar, 1992 ; Tanii *et al.*, 1976 ; Zeigler & Alvarez, 1987).

Dans certaines de ces régions, le pathogène a aussi été isolé à partir de pourriture d'autres plantes cultivées : blé au Mexique, sorgho et maïs au Burundi et ail à l'Ile de la Réunion (Duveiller *et al.*, 1989 ; Duveiller & Maraïte, 1990 ; Girard *et al.*, 1992). Néanmoins aucune spécificité d'hôte n'a été mise en évidence parmi les souches de *P. fuscovaginae*.

2.2 Etiologie

Symptômes. Après pénétration de la gaine paniculaire par les stomates de la face adaxiale, l'agent pathogène se multiplie fortement à l'intérieur des tissus de l'hôte et induit l'apparition des symptômes. Les symptômes de pourriture sur gaine paniculaire débutent par une tache vert foncée, irrégulière (planche 1A). La croissance de la tache sur toute la gaine paniculaire évolue vers une nécrose des tissus (Jaunet 1991 ; Miyajima, 1983). L'agent pathogène produit aussi des symptômes sur les grains qui présentent des taches brunes et peuvent être stériles (planche 1B). De plus, lorsque les symptômes sont sévères, ils sont associés à un blocage de l'émergence paniculaire.

Rôle d'une toxine dans la production des symptômes. Les symptômes de pourritures de gaines produits par *P. syringae* pv. *syringae* sont imputables à un groupe de toxines (syringomycine, syringotoxine et syringostatine) impliquées dans le pouvoir pathogène (Gross, 1991). Ces toxines sont des lipopeptides cycliques qui s'insèrent dans les membranes lipidiques et provoquent la mort cellulaire par l'altération de la respiration et la sortie du potassium. L'expression des syringomycines chez *P. syringae* pv. *syringae* n'est pas constitutive. Elle est régulée positivement par le fer, par différents composés phénoliques de la plante et surtout par le sucrose et le D-fructose. Cette production est réprimée par le phosphate (Quigley & Gross, 1994 ; Gross, 1991). La production *in vitro* d'une toxine dont l'étude n'a pas mis en évidence de différence avec la syringotoxine a été démontrée pour *P. fuscovaginae* et l'injection de la toxine purifiée dans des gaines paniculaire de riz induit une pourriture des tissus et un blocage de l'émergence

paniculaire (Pelsser *et al.*, 1992). Les études sur la synthèse *in vivo* et la régulation de la syringotoxine chez *P. fuscovaginae* n'ont cependant pas encore été abordées.

2.3 Epidémiologie et méthodes de lutte

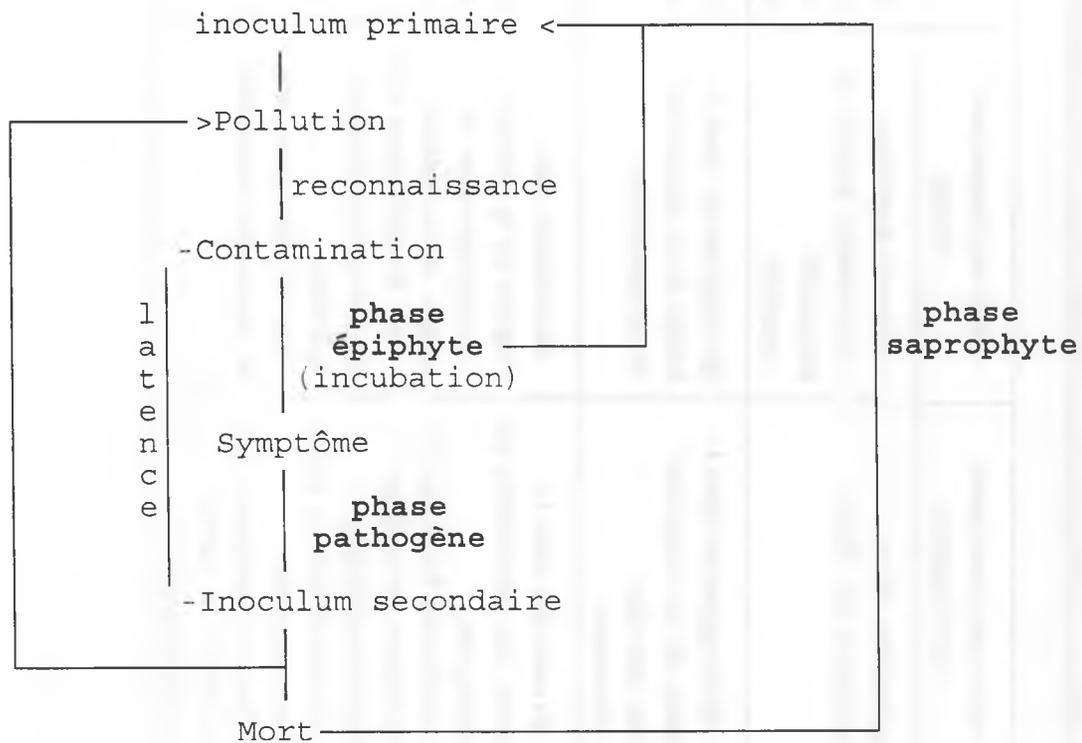
Les études épidémiologiques sur la pourriture brune des gaines ont porté essentiellement sur les pertes occasionnées par la maladie et les sources d'inoculum.

Les pertes de rendement dus à *P. fuscovaginae* peuvent atteindre 58% au Japon où 160 000 hectares étaient affectés par la pourriture brune des gaines en 1976 (Miyajima, 1983), 40% à Madagascar (Déchanet *et al.*, 1990) et de 6% à 12% au Burundi (Détry, 1994).

Différentes sources d'inoculum de *P. fuscovaginae* ont été identifiées. Le premier réservoir pourrait être constitué par les plantes à partir desquelles l'agent pathogène a été isolé : les plantes hôtes cultivées (blé, maïs, sorgho, ail) et de nombreuses adventices des rizières (Miyajima, 1983 ; Ntibishimirwa, 1991). Une survie saprophyte du pathogène a été mise en évidence sur des résidus de récolte au Japon et au Burundi (Miyajima, 1983 ; Ntibishimirwa, 1991) et sur les semences au Burundi (Détry, 1994), au Japon (Miyajima, 1983), à Madagascar (Jaunet, 1991) et en Colombie (Zeigler & Alvarez, 1987). La première méthode de lutte envisagée a été de limiter la transmission potentielle par les semences. Différents traitements de semences sont efficaces pour éliminer l'agent pathogène des semences (Goto *et al.*, 1988). Au champ les traitements de semences ont permis de réduire les épidémies de pourriture brune de gaine au Japon mais non au Burundi (Détry, 1994). Dans ce dernier pays et à Madagascar, un projet financé par la Communauté Economique Européenne a été initié afin de développer la lutte génétique par la création et l'amélioration variétale. A Madagascar, cette création variétale a été basée principalement sur les variétés du type Latsika présentant une tolérance à la maladie (Déchanet *et al.*, 1990). Cette création a été conduite par croisements simples mais aussi avec une population dont le brassage est assuré par une stérilité mâle génique.

3 EPIDEMIOLOGIE DES BACTERIES DE LA PHYLLOSHERE

Le cycle épidémique de base des bactéries phytopathogènes de la surface foliaire (phyllosphère) peut être schématisé ainsi (adapté d'après Rapilly, 1991) :



Ce cycle peut être décomposé dans le temps en trois phases principales : une phase épiphyte sur l'hôte, une phase pathogène et une phase saprophyte (Blakeman, 1992). La vie épiphyte est définie comme la capacité de l'agent pathogène à se multiplier sur l'hôte sans produire de symptôme (Leben, 1965). Cette phase épiphyte est donc assimilable au temps d'incubation défini par Van der Plank : le temps nécessaire pour le symptôme de se développer (Van der Plank, 1963). Les conditions du passage de la phase épiphyte à la phase pathogène dépendent essentiellement de la taille de la population bactérienne (Hirano & Upper, 1983 ; Hirano & Upper, 1990 ; Lindemann *et al.*, 1984). La croissance de cette population dépend, elle-même, du stade physiologique de l'hôte et des conditions climatiques. Les propagules constituant l'inoculum secondaire sont les bactéries elle-même. La période de latence, c'est-à-dire, le temps séparant la contamination de l'émission d'inoculum secondaire (Van der Plank, 1963) est donc équivalente à la période d'incubation chez les bactéries pathogènes de la phyllosphère. A l'issue de la phase pathogène, une phase saprophyte peut être mise en évidence sur les résidus de

Tableau 1. Attributs de l'agent pathogène et de l'hôte et leurs relations à différents niveaux hiérarchiques environnemental (adapté d'après Zadocks & Schein, 1979 et Hirano & Upper, 1983) :

		micro-environnement : phyllosphère	méso-environnement : champ	macro-environnement : atmosphère, régions
Attributs :	de l'agent pathogène	probabilité de se multiplier sur l'hôte	- diversité génétique - distribution spatiale et temporelle - quantité	diversité inter et intra-spécifique liée aux conditions biotiques et abiotiques
	de l'hôte	- développement dans le temps de la réceptivité d'un individu - résistance	développement dans le temps de la réceptivité de la population	diversité génétique liée aux conditions abiotiques
Relations hôte-pathogène		- dynamique dans le temps des populations du pathogène - conditions biotiques et abiotiques du passage épiphyte-pathogène - évolution dans le temps des symptômes - flux du pathogène vers les méso- et macro-environnement	- distribution dans l'espace de la maladie - dynamique dans le temps de la maladie - flux du pathogène vers les micro-environnement : pollution - flux du pathogène vers le macro-environnement	- conditions biotiques et abiotiques de la distribution régionale de la maladie - flux atmosphérique vers les méso- et micro-environnement

récolte ou les semences (Hirano & Upper, 1983 ; Schuster & Coyne, 1974). Les bactéries issues de cette phase saprophyte constituent une partie de l'inoculum primaire. Mais l'essentiel de cet inoculum est constitué des bactéries épiphytes transportées dans les aérosols (Blakeman, 1992 ; Lindeman *et al.*, 1982 ; Lindemann & Upper, 1985).

Dans le cadre de l'étude de ce cycle épidémique, il est nécessaire de définir les éléments y intervenant (approche analytique) ainsi que les relations entre ces différents éléments (approche synthétique) (Zadocks & Schein, 1979).

Ces deux approches peuvent être appliquées à différents niveaux hiérarchiques pour les bactéries phytopathogènes de la phyllosphère (tableau 1). Le micro-environnement correspondant à la phyllosphère est l'espace dans lequel se déroule le développement de l'agent pathogène au sein de la plante. De la probabilité de se multiplier *in planta* de l'agent pathogène, de la réceptivité de l'hôte et de sa résistance dépendent les différentes phases de ce développement (épiphyte et pathogène). Ces différents facteurs et leurs relations peuvent aussi être sous la dépendance des facteurs abiotiques (température, humidité).

Le méso-environnement est défini par les populations de l'hôte et de l'agent pathogène au sein du champ et leur interaction. Les facteurs précédents doivent être intégrés au niveau des populations pour permettre d'expliquer en partie le développement de la maladie au champ. Mais des facteurs propres aux populations de l'agent pathogène doivent aussi être pris en compte : qualité, quantité et distribution. L'interaction de ces différents facteurs implique donc qu'au champ la probabilité d'une plante d'être malade est le produit de 3 probabilités non indépendantes : la probabilité pour la plante d'être réceptive, la probabilité pour la plante d'avoir une population bactérienne de taille donnée et la probabilité de cette population d'être pathogène (Hirano & Upper, 1983).

Le macro-environnement peut être divisé en deux espaces. L'atmosphère au-dessus du champ intervient dans les phénomènes de dissémination de l'agent pathogène et de pollution de l'hôte par l'agent pathogène. L'espace géographique intègre les environnements précédents auxquels s'ajoute la diversité génétique de l'hôte et de l'agent pathogène liée aux conditions climatiques et agronomiques régionales.

4 ETUDES ENTREPRISES

Les études entreprises au cours de cette thèse ont eu pour objet d'analyser les facteurs intervenant dans les différents environnements épidémiologiques de la pourriture des gaines du riz causée par *P. fuscovaginae*. Nous nous sommes attachés à comprendre les paramètres liés à la distribution de l'agent pathogène dans les zones d'altitude.

Nous avons tout d'abord analysé les caractéristiques phénotypiques, génétiques et pathogénique de *P. fuscovaginae* afin de pouvoir le différencier des autres *Pseudomonas* fluorescents isolés de pourriture de gaine (Chapitre I).

Dans une deuxième partie, nous avons étudié, en conditions contrôlées, l'effet des températures sur les différentes composantes de la relation hôte-parasite au niveau du micro-environnement de la gaine paniculaire (Chapitre II).

En dernier lieu, nous avons analysé la dynamique de la pourriture des gaines à Madagascar en relation avec l'altitude et la réceptivité de la population hôte (Chapitre III).

CHAPITRE I
CARACTERISATION DE L'AGENT PATHOGENE

1 INTRODUCTION

Pseudomonas fuscovaginae est le principal agent causal des pourritures des gaines dans les régions où les basses températures sont limitantes pour la riziculture. Néanmoins, dans les principales régions où l'agent pathogène a été décrit, des études ont permis de mettre en évidence la présence d'autres *Pseudomonas* fluorescents responsables de pourritures de gaines. Ils ont notamment été isolés au Burundi (Duveillier *et al.*, 1988), en Colombie (Zeigler & Alvarez, 1990) et à Madagascar (Rott *et al.*, 1991). Il apparaît donc important de déterminer les agents causaux des pourritures des gaines et leur diversité. Notre étude devait donc de façon précise s'articuler autour de la recherche des espèces présentes et de la variabilité au sein de ces espèces. Nous avons pris en compte des caractères phénotypiques et génotypiques.

L'étude des variations phénotypiques en bactériologie est basée sur les caractéristiques physiologiques et biochimiques, sérologiques et pathogéniques. Les caractères physiologiques et biochimiques de *P. fuscovaginae* conduisent à le classer dans le biovar V des *Pseudomonas fluorescens* (Rott *et al.*, 1989b). L'analyse phénotypique des 6 biovars de *Pseudomonas fluorescens* a mis en évidence que cette espèce constitue un groupe taxonomique hétérogène qui fût remanié à plusieurs reprises (Barrett *et al.*, 1986 ; Palleroni, 1984 ; Stanier *et al.*, 1966). Des études sur les caractéristiques physiologiques de *Pseudomonas fuscovaginae* ont permis de mettre en évidence que l'agent pathogène est variable. En effet, R.S. Zeigler a mis en évidence que l'espèce *fuscovaginae* se divisait en 2 groupes physiologiques (Zeigler & Alvarez, 1990) d'une part et, d'autre part, P. Rott a montré que *P. fuscovaginae* n'est pas homogène pour 11,5% de 87 caractères biochimiques testés (Rott *et al.*, 1989b). La poursuite de l'étude de P. Rott sur 136 isolats de pourriture de gaine a permis de mettre au point une caractérisation de *P. fuscovaginae* basée en partie sur 8 tests biochimiques (Rott *et al.*, 1991). Dans notre étude nous utiliserons ces tests pour mettre en évidence la présence de *P. fuscovaginae*.

Les caractéristiques sérologiques sont fréquemment utilisées pour une étude phénotypique des espèces bactériennes. L'utilisation de la sérologie en phytobactériologie peut fournir une aide au diagnostic (Mc Laughlin & Chen, 1990 ; Clark, 1981) et a permis de différencier des sérovars chez *Xanthomonas albilineans* (Rott *et al.*, 1994), des pathovars de *Xanthomonas campestris* (Alvarez & Lou, 1985 ; Benedict *et al.*, 1989) et de *P. syringae* (Grondeau *et al.*,

1992 ; Mazarei *et al.*, 1992). Une variabilité sérologique a été mise en évidence chez *P. fuscovaginae* (Rott *et al.*, 1989b ; Rott *et al.*, 1991 ; Zeigler & Alvarez, 1990). Nous avons tenté dans notre étude d'améliorer un test sérologique permettant le diagnostic de *P. fuscovaginae*.

L'analyse de la variation du pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes peut, tout d'abord, être entreprise par l'étude de la virulence des différentes espèces considérées. Le concept de virulence se réfère dans notre étude aux processus d'établissement de l'agent pathogène dans l'hôte plutôt qu'aux processus impliqués dans la production des symptômes (Shaner *et al.*, 1992). La virulence est donc assimilée à la probabilité de l'agent pathogène de se multiplier dans l'hôte. Des études menées sur les bactéries phytopathogènes ont permis d'émettre des hypothèses, dérivées de la toxicologie, permettant d'expliquer leur virulence (Ercolani, 1984). La première hypothèse suppose que la probabilité d'une cellule bactérienne d'être virulente est dépendante de la dose d'inoculum. Aucune cellule bactérienne de l'inoculum ne se multiplie en-deçà d'une dose seuil et toutes les cellules bactériennes se multiplient au-delà. Cette hypothèse d'action coopérative se caractérise donc par une probabilité d'être virulente ne pouvant prendre que les valeurs de 0 en-deçà de la dose seuil ou de 1 au-delà. Les études menées sur les interactions incompatibles ont permis de mettre en évidence que la probabilité des bactéries de se multiplier dans une plante non-hôte suit le modèle de l'action coopérative (Ercolani, 1984). Au contraire, la seconde hypothèse postule que chaque cellule bactérienne est indépendante des autres et donc que la probabilité pour une cellule bactérienne de se multiplier *in planta*, donc d'être virulente, est indépendante de la dose d'inoculum. La fréquence de plantes malades est donc distribuée donc selon une loi normale en fonction du logarithmique de la dose (Finney, 1952). La fréquence de plantes malades évolue, alors, selon une fonction normale cumulée (sigmoïde) avec l'augmentation du logarithme de la dose. Pour la plupart des interactions compatibles, la probabilité de se multiplier *in planta* est expliquée par l'hypothèse de l'action indépendante (Bowman & Sequiera, 1981; Civerolo, 1975; Ercolani, 1984 ; Lum & Kelman, 1981 ; Mew *et al.*, 1982).

L'analyse phénotypique permet donc de déterminer les espèces isolées de pourriture de gaines. Mais l'étude des phénotypes n'apparaît pas adaptée pour l'analyse et la compréhension des variations entre ces espèces. L'analyse de cette variation au niveau du génotype est rendue possible par les outils moléculaires disponibles. Néanmoins et de façon similaire au phénotype,

l'intégralité du génotype ne peut être analysée directement. Deux types d'approches ont été élaborées pour étudier la variabilité génétique. La première est basée sur l'analyse de séquences précises par leur séquençage ou leur polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). Les différents types de séquences étudiées pour la phylogénie sont les séquences de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène et les séquences de gènes conservés (Brygoo, 1993). Le second type d'approche s'appuie sur une analyse indirecte de la totalité du génome. Cette analyse peut être basée sur le polymorphisme de longueur des fragments de restriction de la totalité du génome mis en évidence par des séquences-sonde. Ces sondes peuvent être des séquences prise au hasard ou une séquence multicopie comme la séquence de l'ARNr (Grimond & Grimond, 1986) ou une séquence répétée dispersée. Cette analyse peut aussi être basée sur le polymorphisme de longueur de fragments d'amplification (RAPD).

L'analyse indirecte de la totalité du génome par RFLP a permis d'étudier les variations génétiques par des séquences non déterminées pour *X. campestris* pv. *citri* (Gabriel *et al.*, 1988 ; Graham *et al.*, 1990), *Xyllela fastidiosa* (Chen *et al.*, 1992), *E. chrysanthemi* (Boccarda *et al.*, 1991), et par des séquences répétées dispersées pour *X. oryzae* pv. *oryzae* (Leach *et al.*, 1992) et *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* (Mogen *et al.*, 1990).

Dans l'étude de la variabilité des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène, le problème majeur attaché à cette analyse est la détermination de leur spécificité. En effet, bien que les bactéries ne possèdent pas de reproduction sexuée, il existe des mécanismes de transferts de matériel génétique. Ces transferts, dits horizontaux, peuvent avoir lieu entre espèces plus ou moins éloignées génétiquement. Il a été montré, par exemple, des transferts de gènes plasmidiques de résistance à certains antibiotiques entre des bactéries appartenant entre différents genres du groupe Gram négatif (Leung *et al.*, 1993). De même, une forte homologie a été mise en évidence pour les gènes d'avidité (*avr*) et de réponse hypersensible (*hrp*) entre les différents pathovars de l'espèce *P. syringae* (Hirano & Upper, 1990). Chez le pathovar *syringae* de cette espèce, l'étude RFLP de deux gènes impliqués dans la synthèse et l'excrétion de la syringomycine permet de distinguer ce pathovar des autres pathovars de l'agent pathogène et d'étudier la variabilité au sein de ce pathovar (Quigley & Gross, 1994). Or, il a été montré que *P. fuscovaginae* produit *in vitro* une toxine analogue à la syringotoxine (Pelsser *et al.*, 1992). Cette toxine n'étant pas spécifique d'une seule espèce, elle apparaît peu adaptée pour une étude phylogénétique.

Au contraire, la séquence codant pour l'ARN ribosomique 16S présente des caractéristiques d'un grand intérêt pour les études phylogénétiques. En effet, cette séquence soumise à une forte pression de sélection possède un très faible taux de mutation et une évolution concertée entre les différentes copies présentes dans le génome (Hillis & Dixon, 1991 ; Weisburg *et al.*, 1991 ; Woese, 1987). L'étude de cette séquence dans différents genres a permis d'approfondir les relations phylogénétiques pour *Streptomyces* spp. (Stackebrant *et al.*, 1992), le groupe II ARNr des *Pseudomonadacea* (Li *et al.*, 1993), les genres *Xanthomonas* et *Pseudomonas* (Maes, 1993 ; DeParasis & Roth, 1990), ainsi que *Rhizobium* (Young *et al.*, 1991). L'analyse de la séquence de l'ARN ribosomique 16S permet de classer les *Pseudomonas fluorescens* dans le sous-groupe g-3 des eubactéries pourpres avec les autres espèces de *Pseudomonas* fluorescents (*putida*, *syringae*) et les espèces du genre *Xanthomonas* (Woese, 1987). Au sein de la famille des *Pseudomonadacea* comprenant 4 groupes par l'analyse de l'homologie ARNribosomique-ADN, l'espèce *fluorescens* est classée dans le groupe I avec *P. syringae* (Palleroni, 1986). Une analyse récente du polymorphisme de longueur des fragments de restriction du gène de l'ARNr 16S amplifié chez les espèces de ce groupe I ARNr (Laguerre *et al.*, 1994) a permis de confirmer l'hétérogénéité génétique de l'espèce *fluorescens* en mettant en évidence que :

- le biovar IV n'est pas différent de *P. syringae*,
- le biovar VI n'est pas différent de *P. putida* bv. B,
- le biovar V constitue un sous-groupe des *P. fluorescens*,
- le biovar II se divise en 2 sous-groupes.

Les résultats obtenus dans cette dernière étude sur des espèces proches de *P. fuscovaginae* nous a conduit à initier une analyse génétique de *P. fuscovaginae* et des *Pseudomonas* fluorescents isolés de pourriture de gaines par les méthodes de PCR/RFLP en utilisant le gène de l'ARNr 16S.

La caractérisation de *P. fuscovaginae* et sa différenciation des autres *Pseudomonas* agent des pourritures de gaines se baseront, dans notre étude, d'une part sur le phénotype de l'agent pathogène : physiologie, biochimie, sérologie et pathogénie et d'autre part sur son génotype par l'analyse du gène de l'ARN ribosomique 16S.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Isolement de l'agent pathogène

Les talles présentant une pourriture sur la gaine paniculaire sont, après prélèvement, découpées en morceaux d'environ 1 cm et conservées à l'abri de l'humidité dans du chlorure de calcium. Les panicules présentant des grains tâchés sont égrainées et conservées individuellement de façon identique.

La gaine est broyée dans de l'eau distillée stérile à l'aide d'un broyeur à bille CLINISCIENCE. Après 30 minutes de macération à température ambiante, 50 microlitres du jus sont étalés sur 2 boîtes de milieu King B semi-sélectif (Rott *et al.*, 1989a). Ce milieu permet un meilleur isolement de *P. fuscovaginae* grâce à la présence de 4 antibiotiques permettant l'élimination d'une partie de la flore saprophyte et par la présence de caséine augmentant la production de pigments fluorescents visibles sous lumière ultra-violet. Après 48 heures de croissance à 27°C, les colonies fluorescentes sous lumière ultra-violet et présentant des morphologies différentes sont repiquées individuellement sur du milieu King B. Les différents isolats sont repiqués sur milieu King B jusqu'à obtention de colonies pures. Après obtention de colonies pures, un ensemencement dense est pratiqué à partir de plusieurs colonies d'une même boîte. La totalité des bactéries est mise en suspension dans de l'eau distillée stérile après 48 heures de croissance et conservée à -20°C après 48 heures de croissance.

Les grains vides tachés d'une même panicule sont regroupés et traités de manière identique aux gaines.

Les isolats sont nommés selon la codification suivante :

- 1- localité d'origine : V (Vinaninony), F (Faratsiho), Sd (Soanindrarinny), S, Sbi et Sbp (Sambaina) pour les localités de Madagascar ; Lum (Lumle) pour le Népal ;
- 2- type d'organe : gr (grains), rien (gaine) ;
- 3- numéro d'échantillon ;
- 4- numéro d'isolat.

A titre d'exemple, l'isolat Sd8.1 est l'isolat numéro 1 de l'échantillon 8 provenant de Soanindrarinny.

2.2 Caractérisation biochimique

Seuls les isolats produisant des symptômes de pourriture de gaine lors de l'inoculation sur plantule (cf section 2.4.3) sont caractérisés biochimiquement. Cette caractérisation est basée sur 8 tests qui permettent d'identifier *P. fuscovaginae* (Rott *et al.*, 1991) : présence de la cytochrome oxydase et de l'arginine dihydrolase, production de levane à partir de saccharose, production de 2-céto-gluconate à partir de gluconate, production d'acides sur milieu minéral en présence de saccharose, tréhalose, sorbitol et inositol (Annexe 1).

2.3 Caractérisation sérologique

2.3.1 matériel

Sérums : les sérums sont prélevés de lapins immunisés avec les isolats de *Pseudomonas fuscovaginae* GR2 de Madagascar (Rott *et al.*, 1989b) et 6801 du Japon. Ce dernier isolat est une sous-culture de l'isolat de référence NCPPB3085.

Isolats bactériens : 37 isolats de *P. fuscovaginae* et 19 isolats de *Pseudomonas* fluorescents ont été testés (tableau 1).

2.3.2 méthode

Purification des anticorps : les immunoglobulines G (IgG) sont purifiées à partir des sérums bruts par précipitation en condition de faible force ionique (Annexe 2) (Hardie & Van Regenmortel, 1977). Un aliquote des IgG purifiées est conjugué avec la phosphatase alcaline (Avrameas, 1969).

Test ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) : le test ELISA est réalisé selon le protocole DDAS (Double Direct Antibody Sandwich) présenté en annexe 2 (Ternick & Avrameas, 1987). Les concentrations optimales d'IgG et de conjugué pour le sérum anti-GR2 ont été précédemment déterminées (Jaunet, 1990). Elles sont déterminées pour le sérum anti-6801. Les concentrations d'IgG de 10, 5, 2,5, 1, 0,5 et 0,1 microgrammes par millilitre sont testées avec les dilutions de conjugué de 1/500, 1/1000, 1/2500 et 1/5000.

Espèce	Pays	Localité	Année	Nom d'isolat
<i>P. fuscovaginae</i> (suite)				S3B
				S4A2
				S5A
				S6A
				S7A
				S9A
				S10A1
<i>Pseudomonas fluorescents</i> ¹	Madagascar	Vinaninony	1991	V10'
				V11'3
				V11'3
			1992	V1A
			V3A	
			V4A	
		V4B		
		V5A		
		V9B		
		Faratsiho	1991	F2.1
				F7.3
				Fgr9.1
		Soanindrariny	1992	Sd1.1
				Sd6.1
				Sd7.1
Sd7.4				
Sd9.1				
Sd4				
Sambaina	1992	S4B		
		S10A2		

¹ : les isolats de *Pseudomonas fluorescents* sont faiblement pathogènes ou pathogènes (en gras) sur plantules.

2.4 Caractérisation du pouvoir pathogène

2.4.1 matériel végétal

Variétés. Les variétés étudiées sont la variété Dourado précoce (n° GERVEX¹ 336) et la variété Latsidahy (n° GERVEX 8479). Ces 2 variétés font partie du groupe morphologique japonica essentiellement constitué des variétés des zones tempérées. La variété Dourado précoce est originaire du Brésil et est cultivée en moyenne et basse altitude alors que la variété Latsidahy originaire de Madagascar est cultivée aux altitudes supérieures à 1650 mètres.

Méthode de culture. Les variétés sont semées en bacs ou en pot dans du terreau Neuhaus n°9 (Société PROVEG). Les plants sont placés en serres jusqu'à l'inoculation avec un arrosage quotidien d'une solution nutritive (Annexe 3). Les plants sont placés, 24 heures avant l'inoculation, en cellule climatique 18°C jour et nuit, 12 heures de jour, 80% d'humidité relative.

2.4.2 préparation de l'inoculum

Après 24 heures de croissance à 27°C sur milieu King B, les bactéries sont mises en suspension dans de l'eau distillée stérile. La concentration bactérienne de la suspension est ajustée à 10⁹ unités formant colonie par millilitre (ufc/ml) soit une Densité Optique (DO) de 0,6 à une longueur d'onde de 530 nm.

2.4.3 inoculation sur jeune plante

La variété Dourado précoce est semée en bac de terreau en 8 lignes avec environ 30 graines par ligne. La croissance des plants a lieu en serre jusqu'au stade 3-4 feuilles. Environ 100 microlitres de suspension bactérienne ajustée à 10⁷ ufc/ml sont injectés dans la gaine foliaire à l'aide d'une seringue de 1 ml. Vingt plants sont inoculés par isolat. Après inoculation les jeunes plantes sont replacées en cellule climatique à 18°C. Les plantes malades sont dénombrées 7 jours après l'inoculation.

¹ : GERVEX : GEstion des Ressources Variétales et Expérimentations, Collection du Laboratoire des Semences du CIRAD-CA.

Tableau 1. Isolats de *P. fuscovaginae* testés avec les IgG des antiserums GR2 et 6801 par test immuno-enzymatique.

Espèce	Pays	Localité	Année	Nom d'isolat	
<i>P. fuscovaginae</i>	Népal	Lumle	1992	Lum2	
				Lum3	
				Lum5.2	
				Lum6.1	
				Lum7	
	Madagascar	Vinaninony		1991	V3
					V4.2
					V6'
					V7.1
					V7.3
				1992	V2
					V6A
					V9A
					V10A
		Faratsiho		1991	F2.2
					F3
					F4
					F5
					Fgr2
	Soanindrariny		1992	Fgr3	
				Fgr4	
				Fgr5	
				Sd7.2	
				Sd8.1	
	Sambaina		1991	Sbp2	
Sbi7					
Sbi9					
Sbpgr2					
			1992	S2A	
				S3A1	

Tableau 2. Isolats de *P. fuscovaginae* et de *Pseudomonas* fluorescents testés pour leur virulence.

Espèce	Localité	Isolat
<i>P. fuscovaginae</i>	Soanindrarinny	Sd7.2
		Sd8.1
	Sambaina	S3A1
		S6A
		S10A1
<i>P. fluorescents</i>	Soanindrarinny	Sd1.1
		Sd6.1
		Sd9.1
	Sambaina	S10A2
		S4B

Tableau 3. Isolats et souches étudiés pour l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S.

Souches et isolats	Origine	Espèces ou groupes biochimiques
LMG2257 ^T	sol, USA	<i>P. putida</i> bv. A
CFBP2130	eau, USA	<i>P. putida</i> bv. C*
CFBP2102 ^T	eau, G.B.	<i>P. fluorescens</i> bv. I
LMG2215 ^T	<i>Cichorium intybus</i> , USA	<i>P. fluorescens</i> bv. II.1
LMG2238 ^T	<i>Pastinaca sativa</i> , USA	<i>P. fluorescens</i> bv. II.2
CFBP2127	oeuf, USA	<i>P. fluorescens</i> bv. III*
CFBP2129	sol	<i>P. fluorescens</i> bv. IV*
CFBP2131	sol	<i>P. fluorescens</i> bv. V*
CFBP2124	eau, USA	<i>P. fluorescens</i> bv. VI*
CFBP1392 ^T	<i>Syringa vulgaris</i> , G.B.	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> *
LMG2258 ^T , BCE3 ^T , 6801 ^T	<i>Oryza sativa</i> , Japon	<i>P. fuscovaginae</i>
V3, V4.2, V6A, V6', V7.1, V9A, V10A, Sd7.2, Sd 8.1, S4A2, Sbi7, Sbgp2, F2.2, F3, F4, F5	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G1, <i>P. fuscovaginae</i>
Lum3, Lum5.2, Lum6.1	<i>Oryza sativa</i> , Népal	G1, <i>P. fuscovaginae</i>
Sd4	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G2
V10'	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G3
Vgr11'.3	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G4
F2.1	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G5
Fgr9.1	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G6
V4A, Sd1.1, S4B, F7.3	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G7
5200	<i>Oryza sativa</i> , Philippines	G7
31.713	<i>Oryza sativa</i> , Indonésie	G7
Lum6.2	<i>Oryza sativa</i> , Népal	G8
6031	<i>Oryza sativa</i> , Philippines	G9
Lum10	<i>Oryza sativa</i> , Népal	G10
V1A	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G11
V3A	<i>Oryza sativa</i> , Madagascar	G12

^T : souches types de référence,

* : souches pour lesquelles les profils de restriction proviennent des travaux de L. Riggotier-Gois (1993).

2.4.4 caractérisation de la virulence par inoculation au stade gonflement

Isolats bactériens : 5 isolats de *P. fuscovaginae* et 5 isolats de *Pseudomonas* fluorescents sont étudiés. Les isolats sont présentés dans le tableau 2. Les 10 isolats sont pathogènes sur riz sur jeune plante par inoculation à la seringue (cf 2.4.3).

Inoculation : la suspension bactérienne à 10^9 ufc/ml est diluée à 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ufc/ml dans de l'eau distillée stérile. Les plants sont inoculés par dépôt de 100 μ l d'une suspension bactérienne à l'intérieur de la gaine paniculaire à l'aide d'une micropipette. Trente gaines sont inoculées par concentration bactérienne et par isolat. Les plantes sont inoculés avec les 10 isolats à la température de 18°C.

Comptage : Les plants présentant des pourritures de gaine sont dénombrés 15 jours après l'inoculation.

Analyse : les courbes dose (logarithme de la quantité de bactéries inoculées)-réponse (fréquence de gaines malades) obtenues sont analysées par une transformation probit des fréquences de gaines malades. Cette transformation permet de linéariser les courbes normales sigmoïdes par la formule : $\text{probit} = 5 + (y_i - m)/s$, y étant la fréquence de gaines malades à la dose i , m la fréquence moyenne de gaines malades et s l'écart type de cette fréquence (Finney, 1952). L'analyse statistique de l'ajustement linéaire et l'estimation des doses d'inoculum efficaces pour 20, 50 et 90% de gaines malades permettent la comparaison des différents isolats testés. Le calcul du probit empirique et ces analyses sont traités par la version 4.6 du logiciel DL50 du CIRAD-CA.

2.5 Polymorphisme génétique et pouvoir pathogène

2.5.1 isolats

Les isolats étudiés sont présentés dans le tableau 3. Les isolats de Madagascar et du Népal ont été isolés au CIRAD. Les isolats des Philippines et d'Indonésie ont été isolés respectivement à l'IRRI (International Rice Research Institute, Philippines) et à l'Institut de Pathologie des Semences en Suède. Les souches identifiées de *Pseudomonas fuscovaginae* sont des sous-clones de l'espèce type (NCPB3085) du Japon provenant de Colombie, du Japon et du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gent en Belgique (LMG). Les souches standard de

Pseudomonas spp. fluorescents proviennent du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gent et de la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP, Angers, France). La souche DH5a d'*Escherichia coli* (BRL) a été utilisée pour le clonage de certains produits d'amplification.

2.5.2 amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les amorces utilisées pour l'amplification correspondent aux extrémités 5' (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') et 3' (5' - TAAGGAGGTGATCCAGGC - 3') du gène de l'ARNr 16S d'*E. coli* (Weisburg, 1991).

2.5.3 clonage et analyse de certains produits de PCR

Les isolats de *P. fuscovaginae* présentent, à l'issue de l'amplification, un fragment supplémentaire au fragment attendu. Les produits de PCR des isolats F2.2, Sd8.1, V3, V10A, S6A, Lum3, BCE3, LMG2258, et 6801 ont été clonés dans la souche DH5a d'*Escherichia coli* après insertion dans le plasmide pGEM-T (PROMEGA) (Annexe 4).

Le fragment supplémentaire cloné de l'isolat V10A est séquencé par la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Des amorces correspondant aux extrémités 5' et 3' de la séquence sont synthétisées. Une amplification par PCR est effectuée avec les souches LMG2257 (*P. putida* bv. A), LMG2215 (*P. fluorescens* bv. II.1), CFBP2131 (*P. fluorescens* bv. V), CFBP2129 (*P. fluorescens* bv. IV) et CFBP1392 (*P. syringae* pv. *syringae*), et les isolats LMG2258, Sd8.1, 6801 et F2.2 de *P. fuscovaginae*. Après marquage au P³² du produit de PCR de l'isolat Sd8.1, les produits de PCR des différentes souches sont hybridés avec cette sonde (Annexe 4).

2.5.4 analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction du gène de l'ARNr 16S

La présence d'un fragment supplémentaire dans les échantillons de *P. fuscovaginae* conduit à la production de fragments de restriction qui peuvent interférer avec l'analyse RFLP du gène de l'ARNr 16S. Le fragment supplémentaire cloné de l'isolat V10A et les fragments attendus clonés des isolats F2.2, Sd8.1, V3, V10A, S6A, Lum3, BCE3, LMG2258, et 6801 sont purifiés par ultra-centrifugation sur gradient de chlorure de césium (Annexe 4) et amplifiés avec les amorces correspondant à l'ADNr 16S.

Les produits de PCR sont digérés par 9 endonucléases de restriction : *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI*, *NdeII*, *MspI*, *DdeI* et *TaqI* selon le protocole du fournisseur. Huit µl des produits de PCR sont incubés avec 10 unités d'enzyme. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve à 3% (FMC) dans du tampon TAE 1x (Sambrook *et al.*, 1989) à 6 v/cm pendant une heure.

Lors de l'étude du polymorphisme de longueur de fragments de restriction, les résultats de L. Riggotier-Gois (1993) pour certaines souches de référence sont intégrés à nos résultats. Ce polymorphisme est analysé selon Nei (1987) à partir des différents fragments. La similarité entre deux isolats X et Y est calculée par l'équation :

$$S = 2.M_{xy}/(M_x + M_y)$$

M_{xy} est le nombre de fragments communs pour les 9 enzymes de restriction entre les 2 isolats et $(M_x + M_y)$ est le nombre de fragments totaux pour chacun des 2 isolats. La distance génétique, assimilable un pourcentage de divergence nucléotidique, entre les 2 isolats X et Y est estimée par les équations 5.54 et 5.55 décrite par Nei. Cette distance est calculée par le programme RESTSITE v.1.1 (Miller, 1990).

Des arbres phylogénétiques sont reconstruits à partir des divergences nucléotidiques par les algorithmes développés par Saitou et Nei (1987) et Fitch et Margoliash (1967). La première méthode, "neighbor-joining method", est basée sur le principe d'évolution minimum qui a pour objet d'obtenir l'arbre dont la longueur est minimale. Cet arbre phylogénétique est construit par association successive de paire d'isolats dont la distance est minimum. La seconde méthode est basée sur la recherche parmi toutes les topologies d'arbre possibles celle qui minimise la différence entre les divergences nucléotidiques et les distances arborées.

Les différents arbres phylogénétiques sont reconstruits par le programme PHYLIP v3.42 (Felsenstein, 1990).

2.5.5 pouvoir pathogène des différents génotypes ADNr 16S

Cinq plants de la variété Dourado précoce sont inoculés au stade gonflement aux concentrations déterminées dans l'étude de la virulence au stade gonflement. Le nombre de plants malades est noté après 7 jours et la taille des symptômes est mesurée.

Tableau 4. Caractéristiques des groupes biochimiques (a) et distribution des isolats faiblement pathogènes et pathogènes au stade plantule dans ces groupes (b).

a.

Tests biochimiques	groupes biochimiques :											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Oxydase de Kovac	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Production de levane	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Production de 2-cétogluconate	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Production d'acides à partir de :												
Saccharose	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Tréhalose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Inositol	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-

b.

groupes biochimiques	nombre de souches	pouvoir pathogène sur jeune plante ^a	
		faible	fort
1	50 (47,2%)	0	50 (100%)
2	4 (3,8%)	4 (100%)	0
3	1 (0,9%)	1 (100%)	0
4	1 (0,9%)	1 (100%)	0
5	1 (0,9%)	1 (100%)	0
6	1 (0,9%)	1 (100%)	0
7	38 (35,8%)	30 (79%)	8 (21%)
8	1 (0,9%)	1 (100%)	0
9 ^b	nd	nd	nd
10	1 (0,9%)	0	1 (100%)
11	6 (5,7%)	4 (67%)	2 (33%)
12	2 (1,8%)	0	2 (100%)
Total	106	43 (41%)	63 (59%)

^a : faiblement pathogène = moins de 50% de plants malades, ^b : ce groupe biochimique correspondant à

3 RESULTATS

3.1 Isolement, profil biochimique, et pouvoir pathogène sur jeune plante

Pour chaque échantillon de gaine, seuls les isolats présentant des caractéristiques coloniales différentes ont été conservés. La liste de ces isolats est présentée en annexe 5. Au total 162 isolats ont été isolés à partir des 62 échantillons collectés à Madagascar et 10 au Népal. Parmi ces isolats, 35% ne sont pas pathogènes après inoculation sur jeune plante, 26% sont faiblement pathogènes (moins de 50% des plantes inoculées malades) et 39% sont pathogènes (plus de 50% des plantes inoculées malades). La caractérisation biochimique des 106 isolats pathogènes et faiblement pathogènes permet de les classer dans 11 groupes en fonction de leur profil biochimique (tableau 4). Le groupe 1 correspond au profil de *P. fuscovaginae* et représente 47% des isolats caractérisés. Les groupes 2 à 8 correspondent à des espèces fluorescentes positives pour l'oxydase de Kovac (*P. fluorescens* ou *P. putida*). Ces groupes contiennent 44% des isolats, le groupe 7 étant majoritaire avec 36% des isolats. Les groupes 10, 11 et 12 correspondent à des espèces fluorescentes négatives pour l'oxydase de Kovac et peuvent être considérés comme des *P. syringae*. Ces 3 groupes représentent 9% des isolats. La distribution des isolats pathogènes au sein de ces groupes met en évidence que tous les isolats des groupes 1 et 12 et l'isolat du groupe 10 sont pathogènes, 33% des isolats du groupe 11 et 21% du groupe 7. *Pseudomonas fuscovaginae* représente 79% des isolats pathogènes isolés de pourriture des gaines et des grains. Tous les isolats appartenant aux groupes 2, 3, 4, 5, 6 et 8 sont faiblement pathogènes. Malgré le faible échantillonnage du Népal, il faut noter que les 2 isolats Lum6.2 et Lum10 n'appartenant pas à l'espèce *fuscovaginae* présentent des profils biochimiques (respectivement groupe 8 et 10) typiques du Népal, absents de Madagascar.

3.2 Caractérisation sérologique

Les 19 isolats de *Pseudomonas* fluorescents ne réagissent pas avec les 2 antisérums testés. Les 37 isolats de *P. fuscovaginae* peuvent être répartis dans trois groupes en fonction de leur affinité pour les deux antisérums (figure 1). Pour 29% d'entre d'eux, la densité optique est en moyenne

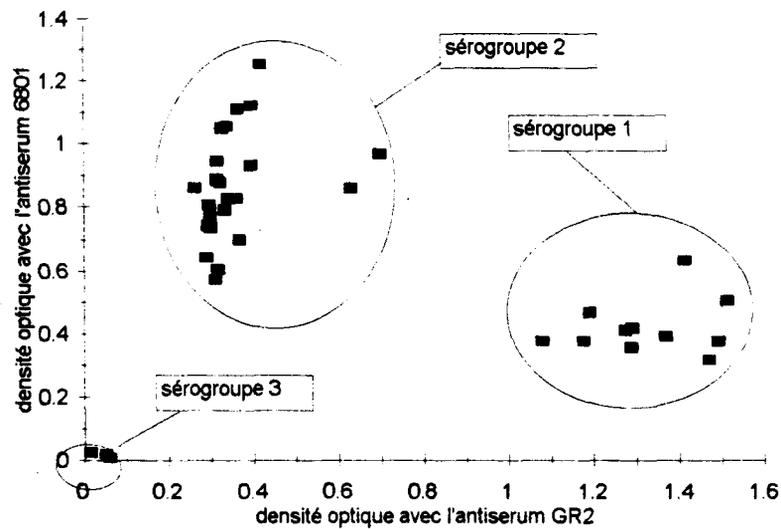


Figure 1. Mise en évidence de 3 groupes sérologiques au sein de *P. fuscovaginae* avec les antiserums préparés contre les souches GR2 et 6801.

Tableau 5. Densité optique (D0) moyenne^a pour chaque antiserum pour les témoins et pour chaque sérogroupe de *P. fuscovaginae*.

Echantillon	Antiserum :	
	GR2	6801
Témoin :		
négatif ^b	0,08 +/- 0,01	0,07 +/- 0,01
souche GR2	2,14 +/- 0,04	0,03 +/- 0,01
souche 6801	0,36 +/- 0,02	0,83 +/- 0,07
Sérogroupe :		
1	1,32 +/- 0,09	0,50 +/- 0,06
2	0,36 +/- 0,04	0,87 +/- 0,07
3	0,03 +/- 0,03	0,02 +/- 0,01

^a : moyenne de 2 séries de tests avec au sein de chaque séries 2 répétitions par échantillons, la densité optique des souches et sérogroupe est donnée après soustraction de la densité optique du témoin négatif.

^b : tampon PBS,

de deux fois plus importante avec l'antiserum GR2 qu'avec l'antiserum 6801 (tableau 5). Pour 63% une réponse opposée est observée : densité optique deux fois plus importante avec l'antiserum 6801 qu'avec l'antiserum GR2. Les autres isolats (8%) ne présentent aucune affinité avec les deux antisérums. Les cinq isolats du Népal sont répartis dans les sérogroupes 1 (3 isolats) et 3 (2 isolats).

3.3 Comparaison de la virulence de *P. fuscovaginae* et d'isolats de *Pseudomonas* fluorescents après inoculation du riz au stade gonflement

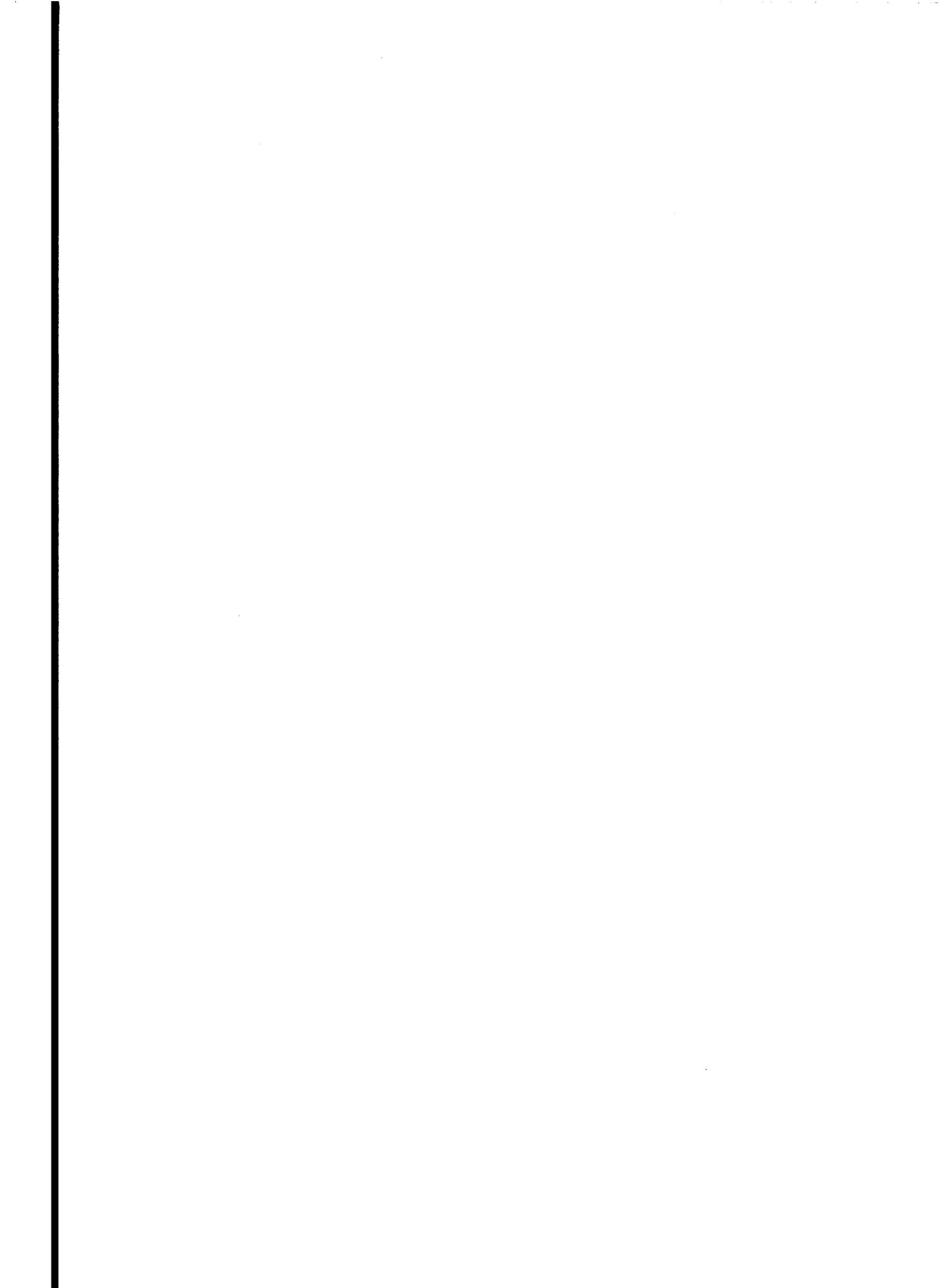
Des plants de riz au stade gonflement ont été inoculés avec cinq isolats de *P. fuscovaginae* et cinq isolats de *Pseudomonas* fluorescents à différentes concentrations afin d'analyser leur virulence.

La fréquence de gaines malades croît selon une courbe sigmoïde en fonction du logarithme de la dose pour les différents isolats de *P. fuscovaginae* sur les variétés Dourado précoce et Latsidahy (figures 2) et les isolats de *Pseudomonas* fluorescents sur la variété Dourado précoce (figure 3). La probabilité du χ^2 de l'ajustement linéaire du probit empirique permet de confirmer cette croissance normale sigmoïde (tableau 6).

Les isolats de *P. fuscovaginae* peuvent être différenciés par la pente du probit empirique de la fréquence de gaines malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum pour la variété Dourado précoce mais aussi pour la variété Latsidahy (tableau 7).

Sur la variété Dourado précoce, les isolats peuvent être divisés en 3 groupes (tableau 6a). On peut former un premier groupe avec les isolats S3A1, S6A et S10A1 pour lesquels la pente du probit est comprise entre 0,59 et 0,72. L'isolat Sd7.2 (pente de 0,50) diffère des isolats S3A1 et S10A1 mais non de l'isolat S6A. Enfin l'isolat Sd8.1 (pente de 0,40) diffère des quatre autres isolats. La comparaison des isolats pour les DE20% et 50% (Dose Efficace) permet de classer les isolats de façon identique pour la virulence (figure 4) : Sd8.1 > Sd7.2 > S3A1, S6A et S10A1. Au contraire, les 5 isolats ne sont pas différenciés par leur DE90% d'environ 10^7 bactéries par gaine.

Sur la variété Latsidahy, les isolats sont distribués dans 2 groupes distincts (tableau 6b). Le premier groupe comprenant les isolats Sd8.1 et Sd7.2 diffère du second groupe comprenant les isolats S3A1, S6A et S10A1 par une pente inférieure d'environ 0,4 contre 0,8 pour les 3 autres



isolats. La comparaison des différentes doses d'inoculum efficaces sur la variété Latsidahy met en évidence que l'isolat Sd8.1 présentent des DE₂₀, 50 et 90% inférieures à celles de 4 autres isolats (figure 4). Les isolats S3A1, S6A et S10A1 présentent des doses d'inoculum efficaces égales alors que l'isolat Sd7.2 diffère de ces isolats par des DE₂₀ et 50% plus faibles. Le classement pour la virulence des isolats par les doses d'inoculum efficaces de 20 et 50% sur la variété Latsidahy est identique à celui obtenus sur la variété Dourado précoce : Sd8.1 > Sd7.2 > S3A1, S6A et S10A1.

La comparaison des 2 variétés pour chacun des isolats met en évidence que la pente du probit de la fréquence de gaines malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum ne diffère pas entre les variétés pour un même isolat (tableau 8). La dose d'inoculum efficace 50% ne diffère pas non plus entre les variétés pour les isolats Sd8.1 et Sd7.2. Par contre la DE_{50%} des isolats S3A1, S6A et S10A1 est supérieure d'une unité logarithme sur la variété Latsidahy par rapport à la variété Dourado précoce (figure 5). Ces 3 isolats sont donc moins virulents sur la variété Latsidahy que sur la variété Dourado précoce.

Au contraire de *P. fuscovaginae*, les 5 isolats de *Pseudomonas* fluorescents ne sont pas différenciés sur la variété Dourado précoce pour la pente du probit de la fréquence de gaines malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum (tableau 9a). De même, la comparaison des DE₂₀, 50 et 90% ne met pas en évidence de différence entre ces isolats (figure 6). Ces doses efficaces sont de 10⁶, 10⁷ et 10⁸ bactéries inoculées par gaine pour 20%, 50% et 90% de gaines malades. Une augmentation d'un facteur 100 suffit donc pour augmenter de 70% la fréquence de malades.

La comparaison des pentes du probit de la fréquence de gaines malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum des isolats de *P. fuscovaginae* et des isolats de *Pseudomonas* fluorescents permet de mettre en évidence que seul l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae* diffère des 5 isolats de *Pseudomonas* fluorescents (tableau 9b). Au contraire, les isolats S3A1 et S10A1 ne sont pas différents des 5 isolats de *Pseudomonas* fluorescents. Les isolats Sd7.2 et S6A ont un comportement intermédiaire : Sd7.2 différant de 4 isolats (Sd1.1, Sd9.1, S10A2 et S4B) et S6A de 2 isolats (Sd1.1 et S4B). La comparaison de ces isolats pour les différentes doses efficaces permet de mettre en évidence que tous les isolats de *P. fuscovaginae* présentent des DE₂₀, 50 et 90% inférieures à celles des isolats de *Pseudomonas* fluorescents.

De plus, il est également possible de déterminer deux concentrations d'inoculum pour discriminer le pouvoir pathogène de *P. fuscovaginae*, l'espèce la plus virulente, de ceux des

Tableau 7. Test t de student de non parallélisme entre les droites de régression estimées pour

a. la variété Dourado précoce inoculée avec 5 isolats de *P. fuscovaginae*.¹

isolats :	isolats :			
	Sd8.1	Sd7.2	S3A1	S6A
Sd8.1	/			
Sd7.2	2,23	/		
S3A1	4,38	2,53	/	
S6A	3,47	1,49	1,02	/
S10A1	3,71	2,40	0,51	1,30

¹ : t de student théorique à 5% pour 12 degrés de liberté = 2,17 ; les tests significatifs sont en italique.

b. sur la variété Latsidahy inoculée avec 5 isolats de *P. fuscovaginae*.

isolats	isolats :			
	Sd8.1	Sd7.2	S3A1	S6A
Sd8.1	/			
Sd7.2	0,55 ¹			
S3A1	2,81 ²	3,15 ²	/	
S6A	3,16 ³	3,41 ³	0,46 ⁴	/
S10A1	2,99 ²	3,35 ²	0,21 ³	0,71 ⁴

t de student théorique à 5% : ¹ pour 12 degrés de liberté = 2,17 ; ² : pour 11 ddl = 2,20 ; ³ : pour 10 ddl = 2,22 ; ⁴ : pour 9 ddl = 2,26 ; les tests significatifs sont en italique.

Tableau 8. Comparaison entre la variété Dourado précoce et la variété Latsidahy du taux d'augmentation de la fréquence de gaines malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum et la dose d'inoculum efficace de 50% (DE50) pour les 5 isolats de *P. fuscovaginae*.

Isolat	test t de student de non parallélisme	log[DE50] Latsidahy	log[DE50] Dourado
Sd8.1	1,23 ¹	2,7 +/- 0,5	3,3 +/- 0,5
Sd7.2	2,02 ³	4,0 +/- 0,3	3,9 +/- 0,4
S3A1	0,79 ²	5,8 +/- 0,3	5,0 +/- 0,3
S6A	1,27 ¹	6,1 +/- 0,4	4,7 +/- 0,4
S10A1	0,06 ²	5,6 +/- 0,3	4,9 +/- 0,3

¹ : t de student théorique à 5% pour 12 degrés de liberté = 2,17 ; ² : t de student théorique à 5% pour 11 degrés de liberté = 2,20 ; ³ : t de student théorique à 5% pour 10 degrés de liberté = 2,22.

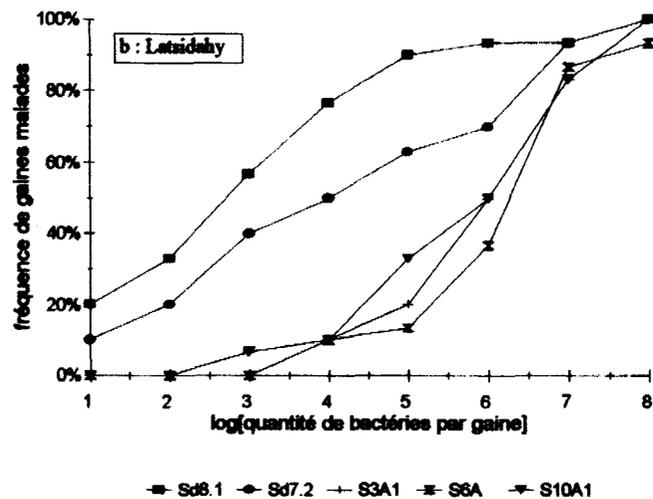
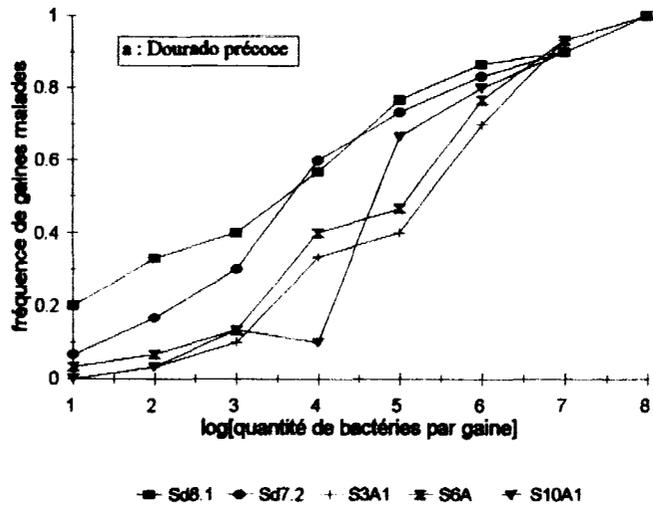


Figure 2: Fréquence de gaines paniculaires malades en fonction du logarithme de la quantité de bactéries inoculées pour les variétés Dourado précoce (a) et Latsidahy (b) inoculées avec 5 isolats de *P. fuscovaginae* (Sd8.1, Sd7.2, S3A1, S6A et S10A1)

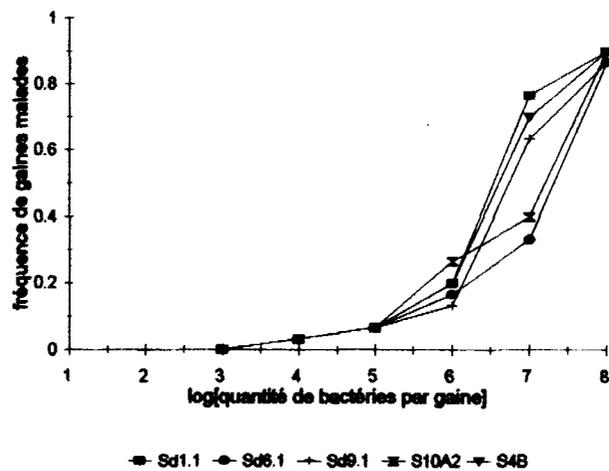


Figure 3: Fréquence de gaines paniculaires malades en fonction du logarithme de la quantité de bactéries inoculées pour la variété Dourado précoce inoculée avec 5 isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Sd1.1, Sd6.1, Sd9.1, S10A2 et S4B).

Tableau 6. Ajustement linéaire du probit empirique de la fréquence de gaines paniculaires malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum.

a. Pour les 5 isolats de *P. fuscovaginae* après inoculation de la variétés Dourado précoce.

paramètres statistiques	isolat :				
	Sd8.1	Sd7.2	S3A1	S6A	S10A1
pende	0,40	0,50	0,66	0,59	0,72
constante	3,67	3,05	1,69	2,25	1,51
test de non linéarité :					
khi ² calculé	2,18	2,52	3,76	3,66	8,39
degré de liberté	6	6	6	6	6
probabilité du khi ²	90,3%	86,6%	70,9%	72,3%	21,07

b. Pour les 5 isolats de *P. fuscovaginae* après inoculation de la variété Latsidahy

paramètres statistiques	isolat :				
	Sd8.1	Sd7.2	S3A1	S6A	S10A1
pende	0,46	0,43	0,75	0,83	0,73
constante	3,74	3,29	0,67	-0,03	0,91
test de non linéarité :					
khi ² calculé	3,60	4,60	6,89	5,93	4,59
degré de liberté	6	6	5	4	5
probabilité du khi ²	73,1%	60,0%	22,9%	20,5%	46,8%

c. Pour les 5 isolats de *Pseudomonas* fluorescents après inoculation de la variété Dourado précoce.

paramètres statistiques	isolat :				
	Sd1.1	Sd6.1	Sd9.1	S10A2	S4B
coefficient b estimé	0,93	0,76	0,86	0,78	0,90
constante	-1,07	-0,42	-0,84	-0,33	-0,95
test de non linéarité :					
khi ² calculé	5,03	6,59	4,96	4,93	3,58
degré de liberté	3	3	3	3	3
probabilité du khi ²	16,9%	8,6%	17,5%	17,3%	31,0%

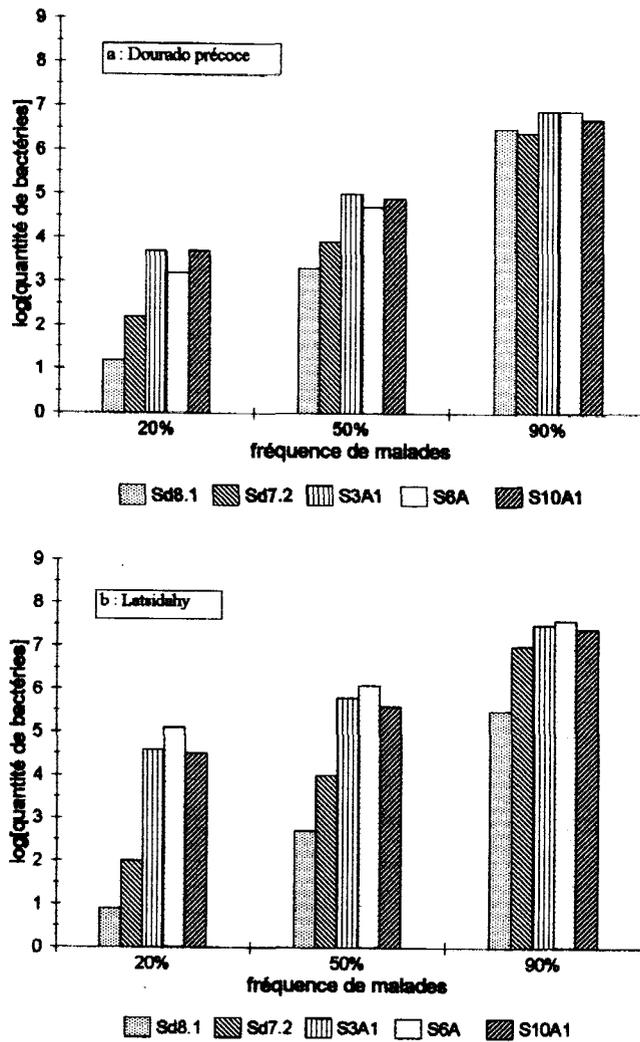


Figure 4: Logarithme de la quantité de bactéries nécessaires pour 20%, 50% et 90% de gaines malades des variétés Dourado précoce (a) et Latsidahy (b) inoculées avec 5 isolats de *P. fuscovaginae* (Sd8.1, Sd7.2, S3A1, S6A et S10A1).

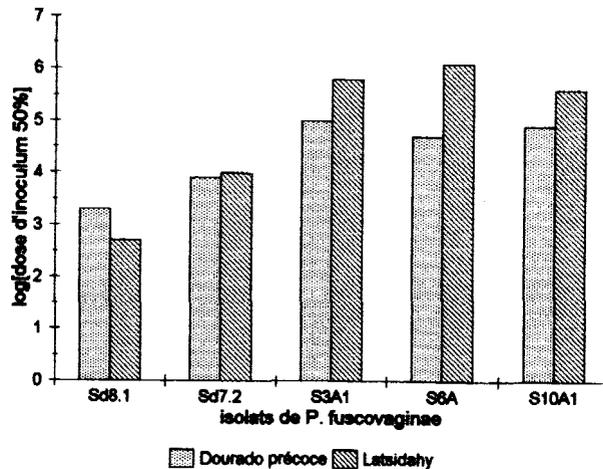
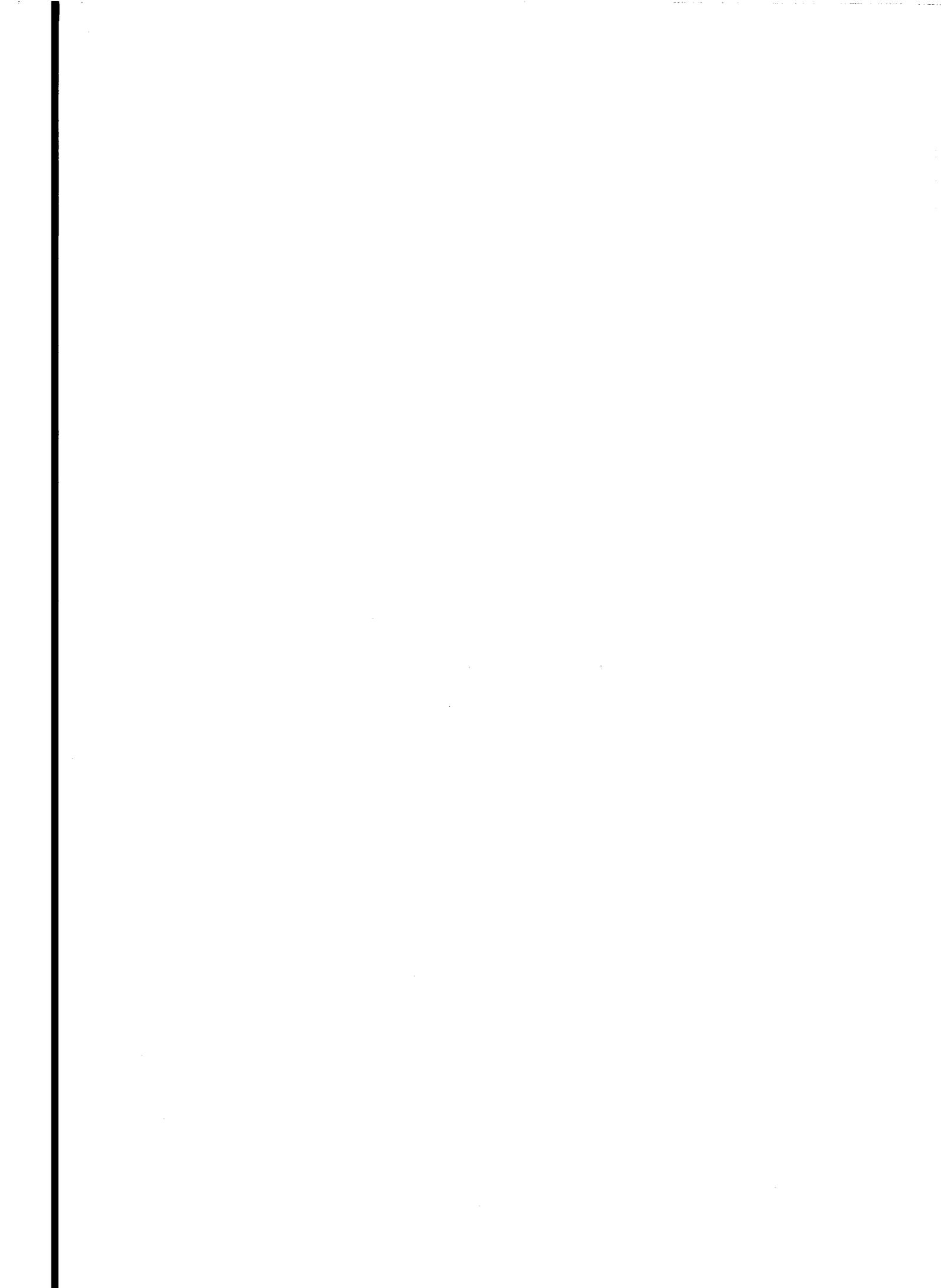


Figure 5: Comparaison du logarithme de la quantité de bactéries nécessaires pour 50% de gaines malades des variétés Dourado précoce et Latsidahy inoculées avec 5 isolats de *P. fuscovaginae* (Sd8.1, Sd7.2, S3A1, S6A et S10A1).



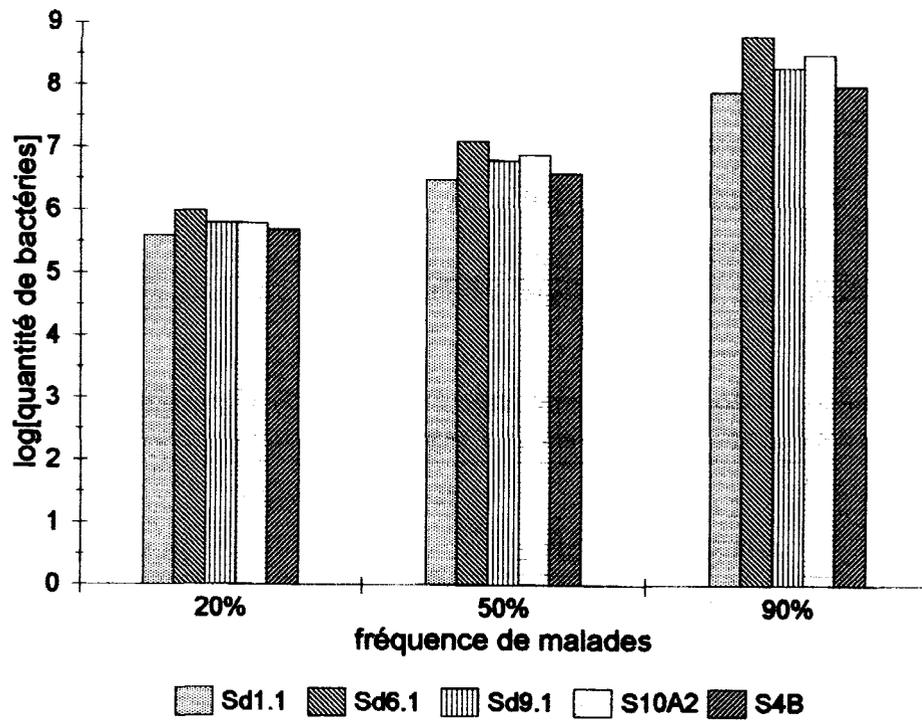


Figure 6: Logarithme de la quantité de bactéries nécessaire pour 20%, 50% et 90% de gaines malades de la variété Dourado précoce inoculée avec 5 isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Sd1.1, Sd6.1, Sd9.1, S10A2 et S4B).

Tableau 9. Comparaison des pentes des droites de régression du probit de la fréquence de gains malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum pour les 5 isolats de *Pseudomonas* fluorescents entre-eux et avec les 5 isolats de *P. fuscovaginae* après inoculation de la variété Dourado précoce.

a. Test t de student de non parallélisme entre les droites de régression estimées.¹

<i>Pseudomonas</i> fluorescents	<i>Pseudomonas</i> fluorescents			
	Sd1.1	Sd6.1	Sd9.1	S10A2
Sd1.1	/			
Sd6.1	0,68	/		
Sd9.1	0,30	0,41	/	
S10A2	0,69	0,05	0,39	/
S4B	0,13	0,61	0,19	0,62

¹ : t de student théorique à 5% pour 6 degrés de liberté = 2,44 ; les tests significatifs sont en italique.

b. Test t de student de non parallélisme entre les droites de régression estimées pour les isolats de *P. fuscovaginae* et les isolats de *Pseudomonas* fluorescents.¹

<i>Pseudomonas</i> fluorescents	<i>P. fuscovaginae</i>				
	Sd8.1	Sd7.2	S3A1	S6A	S10A1
Sd1.1	<i>4,36</i>	<i>3,39</i>	1,85	<i>2,46</i>	1,77
Sd6.1	<i>2,88</i>	2,00	0,68	1,23	0,25
Sd9.1	<i>3,91</i>	<i>2,93</i>	1,41	2,02	0,81
S10A2	<i>3,40</i>	<i>2,38</i>	0,89	1,48	0,35
S4B	<i>4,70</i>	<i>3,58</i>	1,84	<i>2,51</i>	1,09

¹ : t de student théorique à 5% pour 9 degrés de liberté = 2,26 ; les tests significatifs sont en italique.

autres *Pseudomonas* fluorescents. Il apparaîtrait judicieux de choisir les concentrations 10^8 et 10^4 bactéries par gaine : la première est supérieure à la dose efficace 50% de tous les isolats et la seconde est égale à la dose efficace 50% de *P. fuscovaginae* et inférieure la dose efficace 20% des autres isolats.

3.4 Polymorphisme génétique et pouvoir pathogène

3.4.1 amplification de la séquence codante de l'ARNr 16S

L'amplification du gène de l'ARNr 16S génère pour toutes les souches étudiées un produit d'amplification de 1500 paires de bases (pb) correspondant à la taille totale du gène (Weisburg, 1991). Pour les isolats de *P. fuscovaginae*, un fragment d'environ 600 pb est généré en plus du fragment de 1500 pb. Ce fragment n'est jamais obtenu avec les autres espèces de *Pseudomonas* fluorescents (figure 7).

Le fragment supplémentaire de 598 pb de la souche V10A (pfl) a été séquencé (figure 8). La comparaison de la séquence de 598 pb avec celles figurant dans la banque de données du programme DNASTAR ne permet pas de l'identifier à une séquence déjà décrite. Un cadre de lecture ouvert est mis en évidence sur chacun des brins. Le fragment pfl ne correspondant ni à de l'ADNr ni à une séquence connue, nous avons recherché si cette séquence pouvait être spécifique à *P. fuscovaginae*. Deux amorces correspondant aux extrémités de la séquence de pfl ont été synthétisées. Il s'agit de : 5'-GATCAGGTAGGGCGAACAGA, 5'-CGACGAAAAGGCCCTGATCA. L'amplification de la séquence pfl sur les souches LMG2257 (*P. putida* bv. A), LMG2215 (*P. fluorescens* bv. II.1), CFBP2131 (*P. fluorescens* bv. V), CFBP2129 (*P. fluorescens* bv. IV) et CFBP1392 (*P. syringae* pv. *syringae*), et sur les isolats LMG2258, Sd8.1, 6801 et F2.2 de *P. fuscovaginae*. Pour les 4 isolats de *P. fuscovaginae* (LMG2258, Sd8.1, 6801 et F2.2) l'amplification génère un fragment de 598 pb alors que pour les 5 souches standard (LMG2257, LMG2215, CFBP2131, CFBP2129, et CFBP1392) de nombreux fragments sont générés. L'hybridation des produits de PCR avec la sonde produite avec le fragment pfl de l'isolat Sd8.1 met en évidence la présence du fragment de 598 pb dans les produits d'amplification de toutes les souches standard et de tous les isolats de *P. fuscovaginae*. Il apparaît donc que la séquence pfl n'est pas spécifique de *P. fuscovaginae* mais

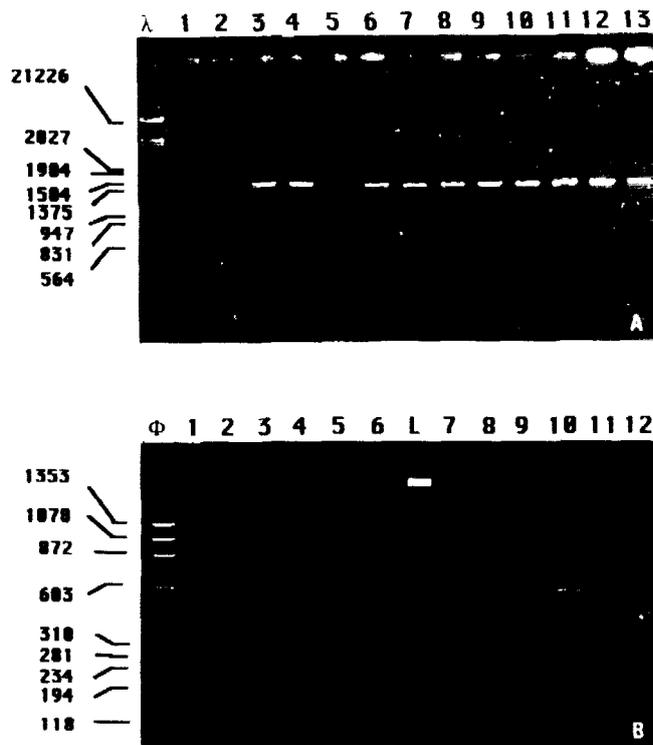


Figure 7.

A. Analyse sur gel d'agarose des produits de PCR amplifiés avec les amorces spécifiques de l'ADNr 16S

λ : ADN de λ digéré par *HindIII* et *EcoRI* ; 1 : Sd8.1* ; 2 : Lum3* ; 3, BCE3* ;
 4 : LMG2158* ; 5 : 6801* ; 6 : LMG2238 ; 7 : LMG2215 ; 8 : LMG2257 ; 9 : V4A ;
 10 : Vgr11'3 ; 11 : V1A ; 12 : V3A ; 13 : F7.3
 * : isolats de *P. fuscovaginae*

B. Analyse sur gel d'agarose de l'ADNr 16S amplifié digéré par l'enzyme de restriction *CfoI*

F : ADN de Fx 174 digéré par *HaeIII* ; 1 : V3A ; 2 : Lum6.2 ; 3 : V4A ; 4 : Sd1.1 ;
 5 : V1A ; 6 : 5200 ; L : 123 pb ladder ; 7 : 31.713 ; 8 : S4B ; 9 : F7.3 ; 10 : lum10 ;
 11: 6031 ; 12 : Fgr9.1

Les tailles sont données en paires de bases.

Figure 8. Séquence du fragment de 598 pb de l'isolat V10A généré par amplification avec les amorces correspondant aux gènes de l'ARNr 16S.

extrémité 5'- aaggaggtgaccagcc**gatcaggtagggcgaacaga**agcccgcgaggttggcgaagctggtt**gatg**ccggcgataccggcc 80
 extrémité 3'- ttctccactggtcggctagtcocatcccgcttgtcttcgggcgctccaaccgcttcgacaactacggccgctatggccgg

gcagccgagacacccccagcagcgtggtgggcaacatccagaacaacgaggaggccgagagcacgcctgcccgcagccag 160
cgtcggctctgtgggggctcgtcgcaccaccggtgtaggtcttggtgctcctccggctctcgtgaggacggcgtcggtc

gcacaggctgagtaccgagcgcagcaggttgccgcccatcagtcgccaggtcagcccgatggcgccggcgatcatgggg 240
cgtgtccgactcatggctcgcgtcgtccaacggcggtagtcaggcggccagtcgggctaccgcccggcgtagtagtcccc

cacaccaggtgccaacgacgttctctgatgcttgctcgcgctacgccccatcagcagcatcgcgacgatggcacagaggta 320
gtgtggtccacggttgagcaaggactacgaacagcggcgatgcgggtagtcgtcgtagcgtgctaccgtgtctccat

gggcaggctggtcagcaggccaatgtgcagtggtcgggagactccggcattgcgccaccagcgtcggcagccagaaggtaa 400
cccgtccgacc**agtc**ggtccggttacacgtcaccagcctctgaggccgtaacgcgtggtcgcagccgctcggctctccatt

tggcgtactggcccatgaccacgcagaagtagatcccatgaccaacgacagtagatgccacgaccaggacagccagagg 480
accgcatgaccgggtactgggtgcgtcttcatctagg**gta**ctggttgctgtcatctacgggtgctggtcctgtcggctctcc

cggcggtaaacggaggaactcccggcgcgaggtgtgggtgacctgcccgctggtgtcttctgccagttccttggtgatc 560
gccgccagttgcctccttgagggccgcggctccacaccactggaacgccgacaacagaagacgggtcaaggaaca**actag**

agggccttttcgtcgtcgtcgtgagccaggatcaaactct -extrémité 3' 598
tcccggaaaagcagcagcgcgactcggctcctagtttgaga -extrémité 5'

Les cadres ouverts de lecteurs sont soulignés et les codons start (ATG) et stop (TGA) sont en gras. Les amorces utilisées pour l'amplification de cette séquence sont en italique.

Tableau 10. Description des 15 géotypes composites du gène de l'ARNr 16S déterminés avec 9 enzymes de restriction.

géotypes 16S ADN _r	Nb d'isolats ou de souches de référence	profils de restriction par digestion avec :								
		<i>AluI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>CfoI</i>	<i>NdeII</i>	<i>MspI</i>	<i>DdeI</i>	<i>TaqI</i>
A	4	b	b	a	a	a	a	a	a	a
B	1	c	a	b	b	c	a	b	d	
C	1	c	a	a	c	a	a	a	b	b
D	2	b	b	b	a	b	b	b	a	a
E	9	a	a	a	a	a	a	a	b	a
F	1	a	a	a	a	a	a	a	c	a
G	1	c	a	a	b	a	a	a	b	
H	1	c	c	a	b	a	a	a	b	b
I	3	a	a	a	a	a	a	a	a	a
J	1	c	a	a	c	a	a	a	a	b
K	1	a	a	c	a	a	a	a	a	a
L	1	b	b	b	a	b	b	a	a	a
M	12	c	a	a	d	a	c	a	a	a
N	1	c	a	a	d	a	a	a	e	a
O	8	c	a	a	d	a	a	a	a	a
P	1	c	a	a	d	a	c	e	a	a

que son amplification avec les amorces correspondant à l'ADNr 16S est spécifique de l'agent pathogène.

3.4.2 caractérisation par RFLP des isolats de *Pseudomonas* isolés de riz

La digestion des produits de PCR avec 9 enzymes de restriction produit entre 3 et 7 fragments selon l'enzyme et l'isolat (figure 7). Parmi les 9 enzymes de restriction utilisées pour l'analyse RFLP, *DdeI* génère 5 types de profil, *HinfI* génère 4 types de profils, *TaqI* 2 types alors que les 6 autres enzymes (*AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *CfoI*, *MspI* et *NdeII*) génèrent 3 types de profils (Annexe 4). La combinaison des différents types de profil pour chaque isolat étudié conduit à la création de 16 génotypes composites de l'ADNr 16S (tableau 10). Les isolats de *P. fuscovaginae* présentent des profils typiques avec les enzymes *HinfI*, *NdeII*, *MspI* et *DdeI*.

La présence du fragment *pf1* dans les échantillons de *P. fuscovaginae* génèrent des fragments de restriction qui peuvent interférer avec l'analyse RFLP du gène de l'ADNr 16S. Après amplification du fragment *pf1* cloné de l'isolat V10A et des fragments clonés de 1500 pb des isolats F2.2, Sd8.1, V3, V10A, S6A, Lum3, BCE3, LMG2258, et 6801, les produits de PCR sont digérés avec les 9 enzymes de restriction. La comparaison des profils du fragment *pf1* et des produits de PCR bruts des isolats de *P. fuscovaginae* permet la soustraction des sous-fragments issus de la digestion du fragment *pf1* dans les produits de PCR de *P. fuscovaginae*. De plus la comparaison entre les profils de ces produits de PCR bruts et ceux des gènes amplifiés de l'ADNr 16S clonés permet de confirmer les profils après soustraction.

La comparaison des groupes obtenus en considérant les caractéristiques biochimiques et les différents génotypes composites met en évidence que le groupe biochimique 1 correspondant à *P. fuscovaginae* est composé de 4 génotypes différents (tableau 11). Deux génotypes, M et O, sont majoritairement représentés avec 12 et 8 isolats, respectivement, alors que le génotype N correspond à seulement un isolat, F2.2. La tendance est inversée avec les autres espèces de *Pseudomonas* pour lesquelles il existe une plus grande variabilité dans les profils biochimiques que dans les génotypes. Au contraire du groupe 1 de *P. fuscovaginae*, le groupe 7 est très homogène pour à la fois la caractérisation biochimique et l'analyse RFLP avec tous les isolats correspondant au génotype E. Ce génotype E est aussi mis en évidence dans les 2 groupes biochimiques 6 et 3. D'autres groupes biochimiques partagent des génotypes similaires. Les groupes 2 et 8 correspondent au génotype D et les groupes 11 et 12 sont représentés par le génotype A. Les groupes biochimiques 4, 5, 9 et 10 correspondent aux génotypes G, F, C et B,

Tableau 11. Distribution des souches standard de *Pseudomonas* fluorescents et des isolats de pourritures de gaine dans les 16 géotypes et les 12 groupes biochimiques.

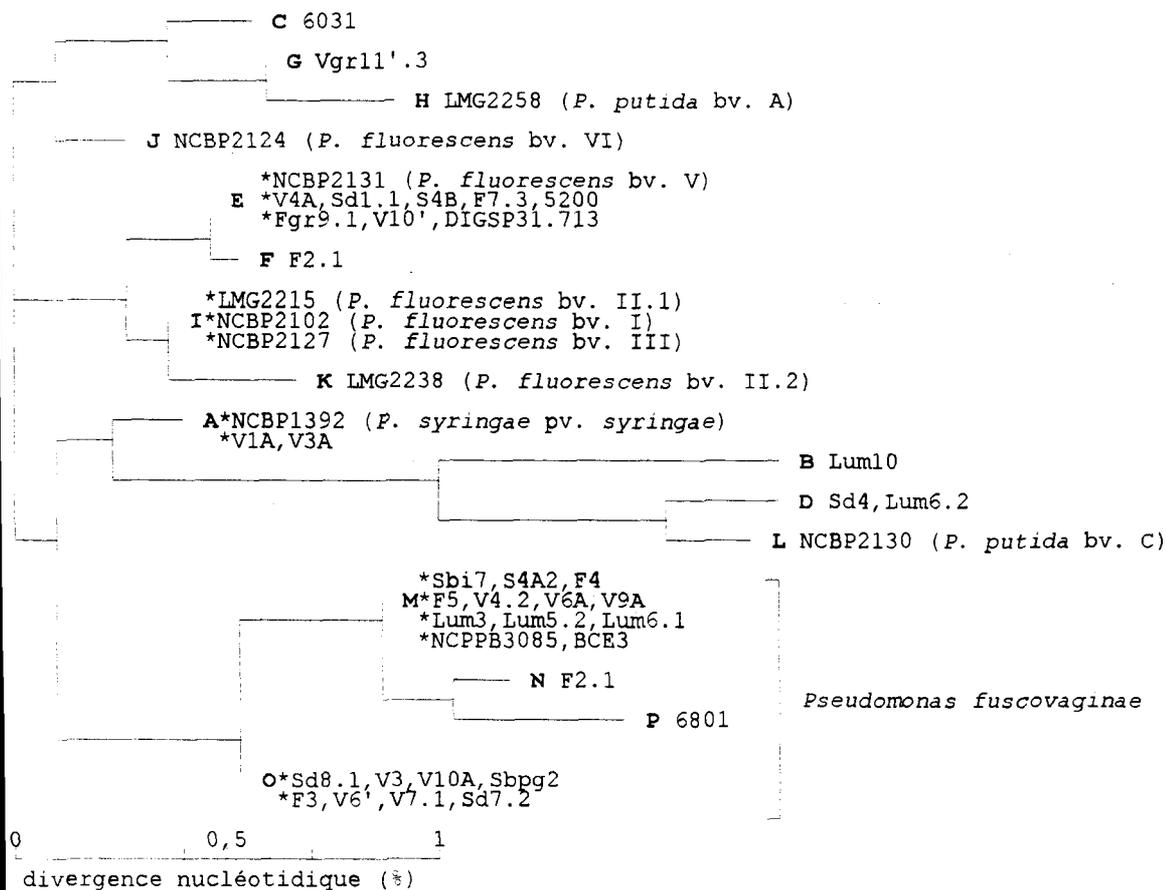
Isolats et souches	Géotype	Groupe biochimique
V1A	A	11
V3A	A	12
CFBP1392	A	nd ^a
CFBP2129	A	nd
Lum10	B	10
6031	C	9
Lum6.2	D	8
Sd4	D	2
V4A	E	7
Sd1.1	E	7
S4B	E	7
F7.3	E	7
31.713	E	7
5200	E	7
Fgr9.1	E	6
V10'	E	3
CFBP2131	E	nd
F2.1	F	5
Vgr11'3	G	4
LMG2257	H	nd
CFBP2102	I	nd
LMG2257	I	nd
CFBP2127	I	nd
CFBP2124	J	nd
LMG2238	K	nd
CFBP2130	L	nd
LMG2158	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
BCE3	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
Sbi7	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
S4A2	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
F4	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
F5	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
V4.2	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
V6A	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
V9A	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
Lum3	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
Lum5.2	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
Lum6.1	M	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
F2.2	N	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
Sd8.1	O	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
Sd7.2	O	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
V3	O	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
V6'	O	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
V7.1	O	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
V10A	O	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
Sbpg2	O	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
F3	O	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)
6801	P	1 (<i>P. fuscovaginae</i>)

^a non déterminé dans notre étude.

Tableau 12. Matrice de similarité des 16 génotypes composites du 16S rDNA pris deux à deux.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
B	76														
C	87	78													
D	88	85	76												
E	91	74	91	77											
F	90	76	90	76	99										
G	90	78	95	73	91	90									
H	86	75	91	73	87	86	96								
I	92	77	88	79	97	96	88	85							
J	95	76	92	81	91	90	92	89	94						
K	90	76	85	78	94	92	85	81	96	90					
L	87	81	77	94	78	77	74	73	81	82	79				
M	88	77	85	74	86	85	88	84	89	88	85	75			
N	85	75	83	72	84	83	85	82	86	85	83	73	98		
O	91	80	89	73	90	89	91	88	92	91	89	78	96	94	
P	84	73	81	70	82	81	84	80	85	84	81	71	96	94	93

a. Méthode du Neighbor-joining.



b Méthode de Fitch et Margoliash.

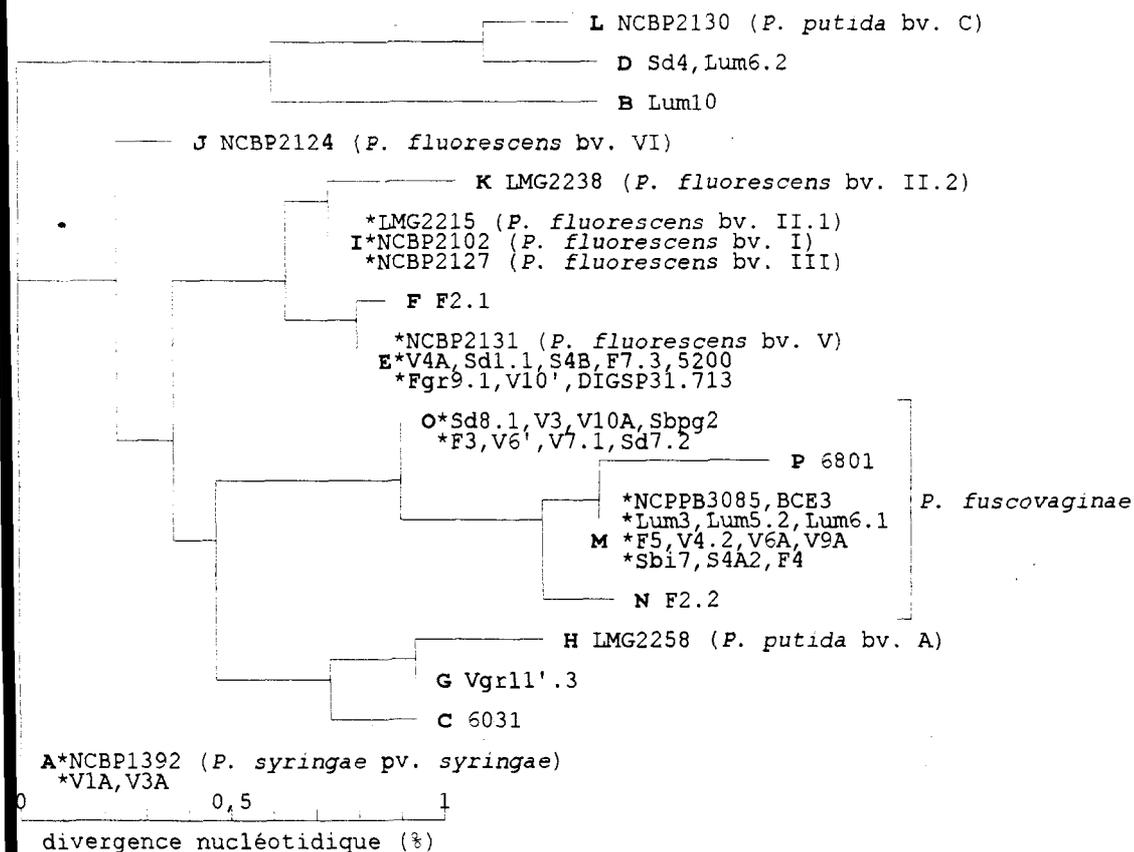


Figure 9. Arbres reconstruits selon la méthode de neighbor-joining (a) et de Fitch et Margoliash (b) à partir de la divergence nucléotique. Pour la seconde méthode, 1445 topologies ont été examinées.

respectivement. De plus certaines souches de référence partagent des génotypes avec des isolats de *Pseudomonas* fluorescents isolés de riz. Les souches CFBP2129 (*P. fluorescens* bv. IV) et CFBP1392 (*P. syringae* pv *syringae*) sont caractérisés par le génotype A comme les groupes 11 et 12, et la souche CFPB2131 (*P. fluorescens* bv. V) partage le génotype E avec les groupes 3, 6 et 7.

La divergence nucléotidique est calculée à partir de la matrice de similarité (tableau 12). Les arbres phylogénétiques reconstruits avec les méthodes de Nei et Saitou (Neighbor-Joining) et de Fitch et Margoliash sont présentés figure 9. Les 2 arbres reconstruits ne diffèrent pas globalement dans leur topologie. Seuls les embranchements des génotypes A et J apparaissent modifiés. Cette modification peut être expliquée par le fait que ces 2 génotypes ne sont ni fortement associés ni fortement éloignés des autres génotypes. La distribution des génotypes de *P. fuscovaginae* (M, N, O et P) sur les 2 arbres phylogénétiques montre clairement que les isolats de *P. fuscovaginae* représentent un groupe phylogénétique se différenciant des autres isolats et des souches de référence. De plus, cet embranchement comprenant tous les isolats de *P. fuscovaginae* est clairement divisé en plusieurs branches confirmant la présence d'une variabilité génétique au sein de l'espèce *fuscovaginae*. Les génotypes O et P sont les génotypes les plus distants de cette espèce avec une divergence nucléotidique de 0,7%. La souche 6801, une sous-culture de la souche type NCPPB3085 présente le génotype P et diffère des 2 autres sous-cultures BCE3 et LMG2258 (génotype M) avec une divergence nucléotidique de 0,3%. P. Rott rapporte des variations sérologiques et morphologiques parmi des sous-cultures de la souche type NCPPB 3085 (Rott *et al.*, 1989b) et suppose que ces variations sont imputables à des changements de propriétés durant la culture. Etant donné le faible taux de mutation du gène de l'ARNr 16s, on peut supposer que la divergence nucléotidique parmi les sous-cultures de la souche type pourrait être due à un mélange de différents isolats. Le génotype le plus proche des génotypes de *P. fuscovaginae* est le génotype I correspondant à *P. fluorescens* bv. I, II.1 et III avec une divergence nucléotidique comprise entre 0,7% (génotype O) et 1,4% (génotype P). Le génotype le plus éloigné est le génotype D correspondant aux isolats Sd4 et Lum6.2 avec une divergence nucléotidique de 2,2% à 3,1%.

3.4.3 pouvoir pathogène des différents génotypes

Les gaines paniculaires des talles au stade gonflement ont été inoculées avec un échantillon de chaque génotype. L'analyse des résultats révèle que les isolats de *P. fuscovaginae* sont

Tableau 13. Pouvoir pathogène des isolats et des souches standards de *Pseudomonas* fluorescent sur riz inoculé dans la gaine paniculaire au stade gonflement.

Génotype	Groupe biochimique	Isolats et souches testés ^a	Nombre de gaines malades pour les inoculums :		Taille moyenne des symptômes (cm) pour les inoculums :	
			10 ⁴ ufc/gaine	10 ⁸ ufc/gaine	10 ⁴ ufc/gaine	10 ⁸ ufc/gaine
A	12	V3A	3 ^c	5	7	9.8
	11	V1A	5	5	9.6	15.2
	nd ^c	CFBP1392	0	0		
B	10	Lum10	4	4	2	1.5
C	9	6031	2	5	6.5	6.4
D	2	Sd4	0	0		
	8	Lum6.2	0	0		
E	7	V4A	0	3		0.67
	7	S4B	0	4		2.2
	7	Sd1.1	0	4		1.5
	7	31.713	0	0		
	6	Fgr9.1	0	0		
	nd	CFBP2131	0	0		
F	5	F2.1	0	0		
G	4	Vgr11'3	0	0		
H	nd	LMG2257	0	0		
I	nd	LMG2215	0	0		
	nd	CFBP2102	0	0		
J	nd	CFBP2124	nd ^d	nd		
K	nd	CFBP2238	0	0		
L	nd	CFBP2131	0	0		
M*	1	LMG2158	1	5	1	9.2
N*	1	F2.2	5	5	10.2	16.8
O*	1	Sd8.1	4	5	9	16.6
	1	Sd7.2	3	5	8.5	15.9
P*	1	6801	5	5	1.6	3.2

^a les isolats et les souches standard testés ont été choisis pour être représentatifs des génotypes composites de l'ADNr 16S et des groupes biochimiques

^c nombre de gaines malades pour 5 gaines inoculées.

^d non déterminé

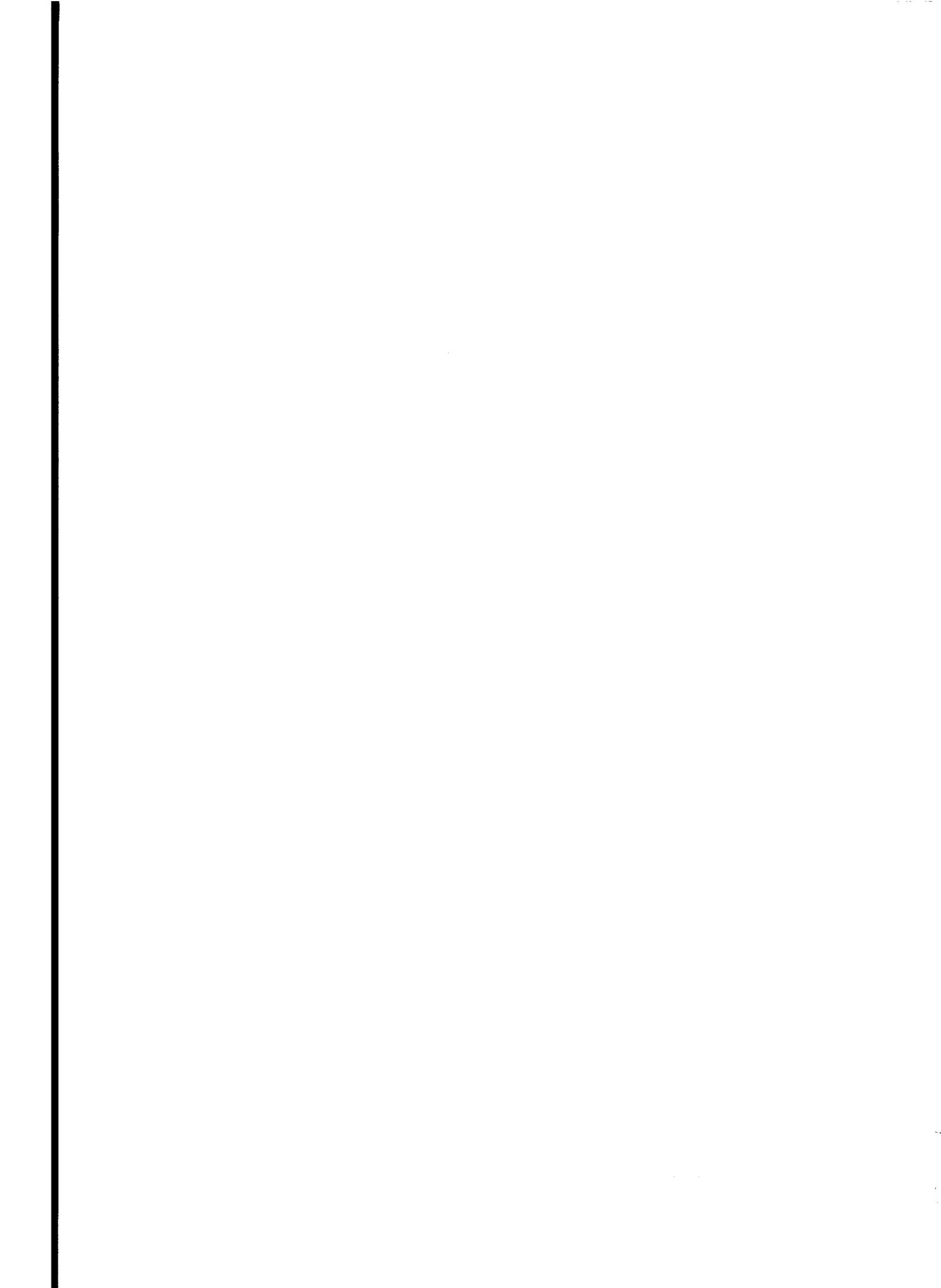
* génotype de *P. fuscovaginae*

pathogènes aux 2 concentrations d'inoculum 10^4 ufc/gaine et 10^8 ufc/gaine (tableau 13). Parmi les isolats isolés de riz, ceux caractérisés par les génotypes A, B et C sont, eux aussi, pathogènes sur riz même à la concentration la plus faible alors que les isolats V4A et Sd1.1 (génotype E) ne sont pathogènes qu'à la concentration de 10^8 ufc/ml. Tous les autres isolats testés (génotypes D, E, F et G) ne sont pas pathogènes sur riz au stade gonflement. De même, aucune des souches de référence de *Pseudomonas* fluorescents n'est pathogène.

4 DISCUSSION

La caractérisation établie par P. Rott (1991) basée sur 8 critères biochimiques et sur le pouvoir pathogène sur jeunes plants de riz permet de mettre en évidence que *P. fuscovaginae* représente 29% de la flore fluorescente isolée sur le milieu King B sélectif. Tous les isolats de *P. fuscovaginae* sont pathogènes. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude dans laquelle P. Rott a mis en évidence que *P. fuscovaginae* ne représentait que 26% des isolats de *Pseudomonas* fluorescents issus de pourriture de gaine de différents pays (Rott *et al.*, 1991). L'inoculation sur plantule des 71% de la flore restante permet de montrer que 35% des isolats sont non pathogènes, 26% sont faiblement pathogènes et 10% sont pathogènes. La caractérisation biochimique des isolats peu ou très pathogènes met en évidence une diversité phénotypique des espèces présentes. En effet, les 56 isolats de Madagascar et du Népal se distribuent dans 11 groupes biochimiques différents avec 36% des isolats dans le groupe 7. Cette diversité apparaît plus importantes pour les isolats faiblement pathogènes (8 groupes biochimiques) que pour les isolats pathogènes (4 groupes biochimiques). Les deux groupes biochimiques 7 et 11 regroupent des isolats faiblement pathogènes et pathogènes. Les isolats du Népal n'appartenant pas à l'espèce *fuscovaginae* présentent des profils biochimiques typiques. On peut émettre l'hypothèse que la flore isolée de pourritures de gaine varie en fonction des régions de culture comme cela a été montré pour la flore épiphyte (Hayward, 1974).

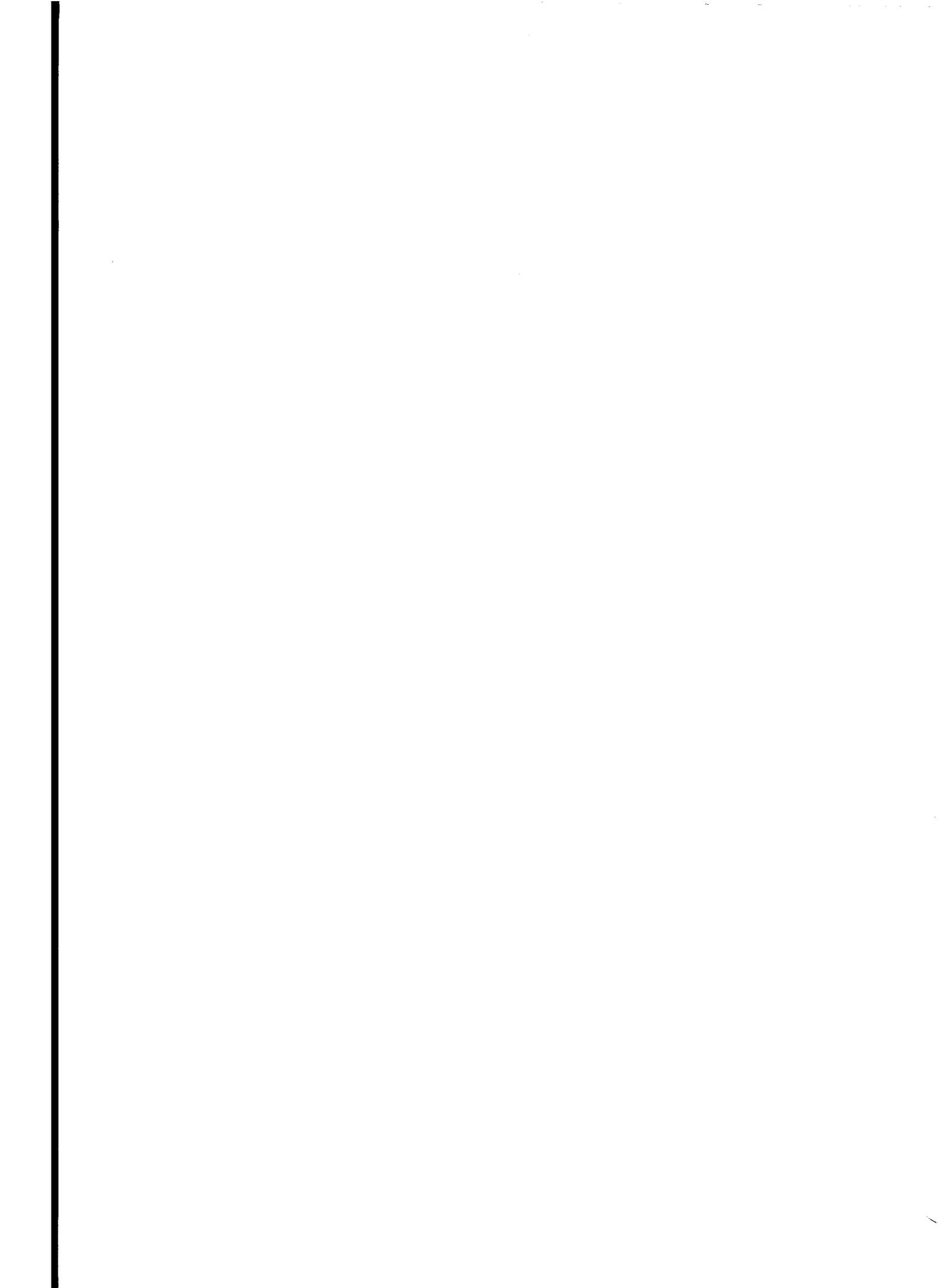
Notre étude confirme donc les précédentes études menées au Burundi et en Colombie mettant en évidence la présence d'autres *Pseudomonas* fluorescents responsables de pourritures de gaines (Duveillier *et al.*, 1988 ; Zeigler & Alvarez, 1990). Les caractères physiologiques analysés ne



représentent cependant qu'une très faible partie de la physiologie des espèces étudiées et leur importance dans la spéciation reste difficile à déterminer (Young *et al.*, 1992). Même si les tests biochimiques et la pathogénie sur jeune plante permettent de caractériser *Pseudomonas fuscovaginae*, ils n'apparaissent pas adaptée pour évaluer la différenciation entre *P. fuscovaginae* et les autres isolats pathogènes (Brygoo, 1991). Leur utilisation apparaît donc devoir être restreinte à établir un test de détermination de *P. fuscovaginae*.

L'étude sérologique a été entreprise pour permettre de clairement différencier *P. fuscovaginae* des autres isolats pathogènes sur riz. Cette étude des *Pseudomonas* spp. pathogènes ou faiblement pathogènes sur jeune plant de riz met en évidence que les 2 antisérums fabriqués contre les souches GR2 et 6801 de *P. fuscovaginae* détectent spécifiquement les isolats de *P. fuscovaginae*. Trois sérogroupes peuvent être définis en fonction des réponses aux 2 antisérums des isolats de *P. fuscovaginae* étudiés : le séro groupe 1 qui réagit avec l'antiserum GR2, le séro groupe 2 qui est majoritaire et qui est détecté par l'antiserum 6801 et le séro groupe 3 non détecté par les 2 antisérums. Une précédente étude avec l'antiserum GR2 testé en agglutination avait mis en évidence que par cette méthode seulement 70% des souches de *P. fuscovaginae* était détectées avec 2% de réaction croisée (Rott *et al.*, 1991). De même un antiserum contre la souche de référence NCPPB3085 de *P. fuscovaginae* ne permet de détecter par agglutination que 75% des souches de l'agent pathogène isolées en Colombie (Zeigler & Alvarez, 1990). L'utilisation de 2 antisérums dans un test immuno-enzymatique permet donc d'améliorer de façon notable la détection de *P. fuscovaginae*. Néanmoins même si les sérogroupes 1 et 2 représentent 92% des isolats de *P. fuscovaginae*, les isolats du séro groupe 3, non reconnu par les 2 antisérums, ne sont pas différenciés des autres isolats pathogènes de *Pseudomonas* fluorescents, ce qui posent des limites à l'utilisation de ces antisérums pour le diagnostic.

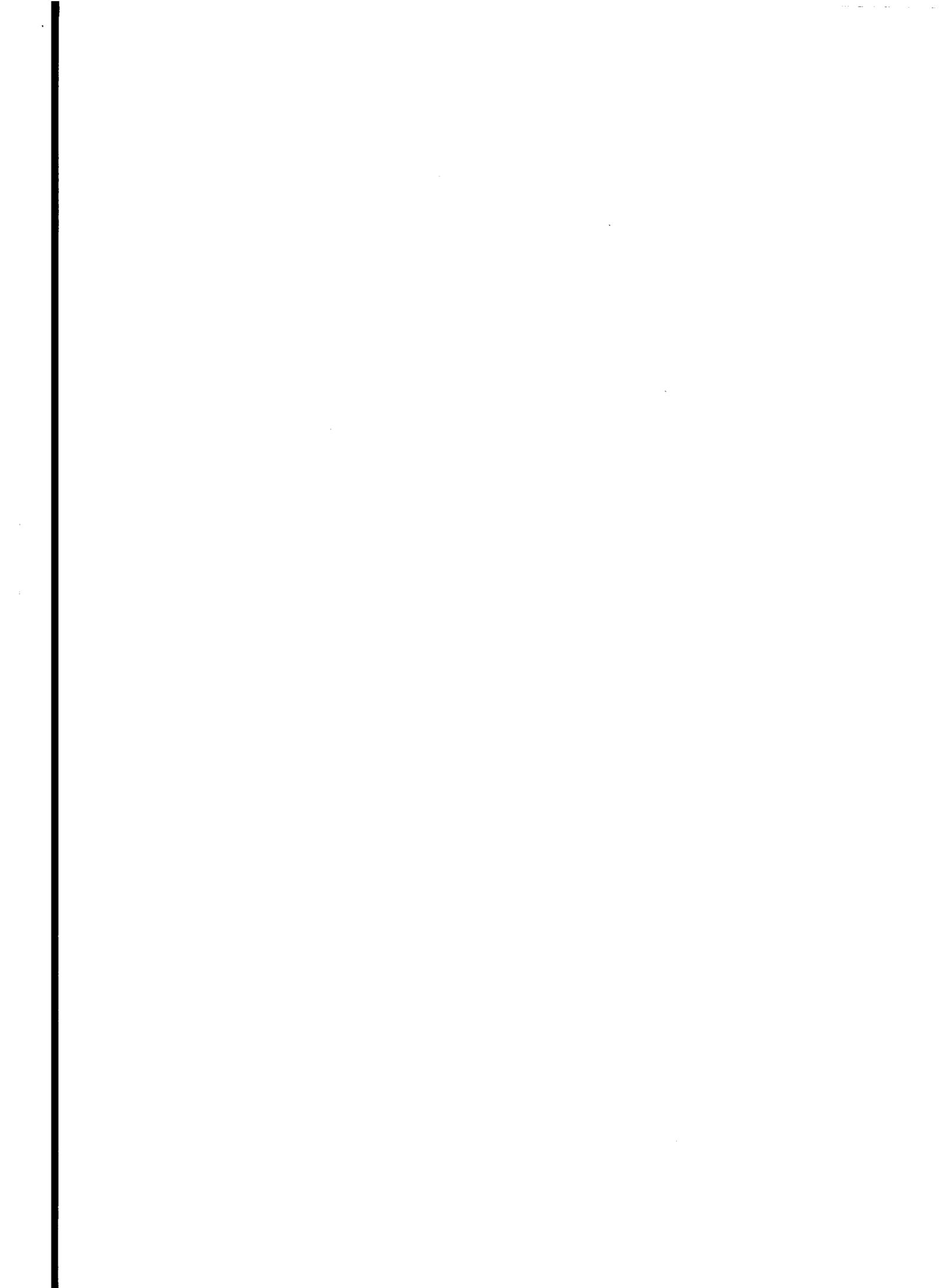
Des études portant sur les molécules impliquées dans les réactions sérologiques ont montré que ces molécules sont essentiellement des composants de la paroi bactérienne : lipo-poly-saccharides (Benedict *et al.*, 1989 ; Grondeau *et al.*, 1992 ; Mazarei *et al.*, 1992), glycoprotéines (Dristig & Dianese, 1990), flagelline (Mazarei *et al.*, 1992). Les conditions de culture peuvent modifier la production de certaines de ces molécules et donc la réponse sérologique (Benedict *et al.*, 1989). De même, cette réponse sérologique peut varier avec des changements de conformation moléculaire (Mazarei *et al.*, 1992). La variabilité mise en évidence par la sérologie



peut donc être imputable à une variabilité physiologique et/ou génétique. Les phénomènes sous-tendant cette variabilité sérologique apparaissent trop diverses et complexes pour permettre l'utilisation de cet outil dans une analyse du degré de différenciation au sein de l'espèce *P. fuscovaginae* et entre cette espèce et les autres isolats pathogènes.

La forte probabilité de l'ajustement linéaire du probit de la fréquence de gaines malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum pour les 5 isolats de *P. fuscovaginae* étudiés sur les 2 variétés Dourado précoce et Latsidahy permet de mettre en évidence que l'interaction *P. fuscovaginae*/riz peut être expliquée par l'hypothèse de l'action indépendante. Cette hypothèse postule que chaque cellule bactérienne est indépendante des autres et donc que la probabilité pour une cellule bactérienne de se multiplier *in planta*, donc d'être virulente, est indépendante de la dose d'inoculum. Cette indépendance implique que la fréquence de gaines malades à une dose donnée d'inoculum suit une distribution binômiale. Le logarithme des doses d'inoculum suivant distribution normale, la fréquence de gaines malades se distribue donc selon une loi normale en fonction du logarithmique de la dose (Finney, 1952). La fréquence de gaines malades évolue, alors, selon une fonction normale cumulée (sigmoïde) avec l'augmentation du logarithme de la dose.

La comparaison de la virulence sur les deux variétés étudiées des 5 isolats de *P. fuscovaginae* permet de distinguer 3 groupes d'isolats avec la variété Dourado précoce et 2 groupes avec la variété Latsidahy. Des études menées sur les interactions *P. solanacearum*/tomate et pomme de terre (Bowman & Sequiera, 1981 ; Lum & Kelman, 1981), *X. campestris* pv. *pruni*/pêcher (Civerolo, 1975) et *X. campestris* pv. *oryzae*/riz (Mew *et al.*, 1982) ont permis de mettre en évidence une variabilité de la virulence au sein des espèces bactériennes. Pour les isolats de *P. fuscovaginae*, des différences existent aussi au niveau du taux d'augmentation de la fréquence de malades en fonction de la dose d'inoculum. Nous avons mis en évidence que la diminution du taux d'augmentation est associée à une diminution de la quantité de bactéries nécessaires pour obtenir 20% et 50% de gaines malades. En revanche, les isolats ne sont pas différenciés par les doses nécessaires pour obtenir 90% de gaines malades. Il apparaît donc que l'augmentation de la virulence sur la variété Dourado précoce se caractérise essentiellement par une plus grande efficacité aux faibles doses d'inoculum. Les études menées sur l'interaction *P. solanacearum*/tomate ont mis en évidence des variations entre souches de l'agent pathogène pour les doses d'inoculum efficaces et le taux d'augmentation de la fréquence de malades en

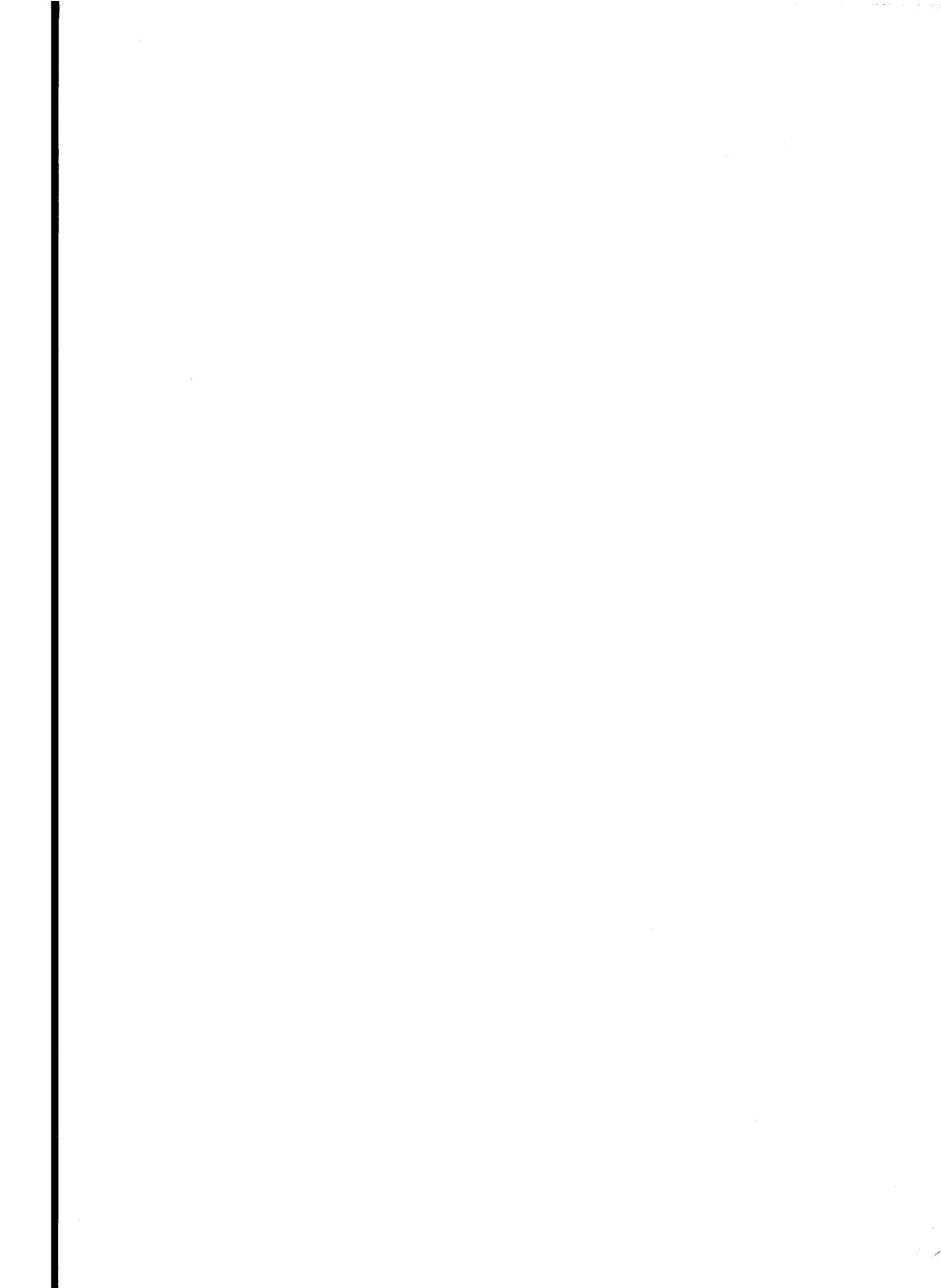


fonction de la dose d'inoculum (Lum & Kelman, 1981). Néanmoins et contrairement à *P. fuscovaginae*, une plus forte virulence de *P. solanacearum* se traduit par un taux d'augmentation plus élevé de la fréquence de plants malades en fonction de la dose d'inoculum. Pour cet agent pathogène l'augmentation de la virulence est donc caractérisée par une plus grande efficacité à toutes les doses d'inoculum.

Le classement des isolats de *P. fuscovaginae* pour la virulence est identique sur les 2 variétés Dourado précoce et Latsidahy. De plus, pour les isolats les plus virulents la virulence est la même sur les deux variétés. En revanche, les isolats les moins virulents sont plus virulents sur la variété Dourado précoce que sur la variété Latsidahy. Des interactions isolat/variété ont été mise en évidence pour différentes interactions : *P. solanacearum*/tomate (Lum & Kelman, 1981) et pomme de terre (Bowman & Sequiera, 1981), *Clavibacter michiganense*/*Lycopersicon* spp. (Forster & Echanti, 1973), *X. campestris* pv. *oryzae*/riz (Mew *et al.*, 1982). L'analyse détaillée de l'interaction *P. fuscovaginae*/riz et des facteurs la modifiant sont abordés dans le chapitre II. Il apparaîtrait nécessaire de comparer un plus grand nombre d'isolats et de variétés afin d'approfondir la variabilité de la virulence de *P. fuscovaginae* et de déterminer s'il existe chez cet agent pathogène des groupes de virulence.

L'étude de la dynamique de la fréquence de gaines malades en fonction de la dose d'inoculum pour différents isolats de *Pseudomonas* fluorescents met en évidence que la virulence de ces isolats sur la variété Dourado précoce peut être expliquée par l'hypothèse d'action indépendante. En effet, pour les 5 isolats le probit de la fréquence de gaines malades augmente linéairement en fonction du logarithme de la dose. L'interaction entre ces isolats et la variété Dourado précoce est donc une interaction compatible. Mais la probabilité de se multiplier *in planta* demeure très faibles (DE20% de 10^6 bactéries par gaines) pour ces isolats par rapport à celle des isolats de *P. fuscovaginae*. Même si les isolats de *Pseudomonas* fluorescents étudiés peuvent être considérés comme des agents pathogènes du riz, les doses nécessaires à l'expression de leur pouvoir pathogène permet de les distinguer clairement des isolats de *P. fuscovaginae*. Leur rôle éventuel comme agents primaires dans les épidémies naturelles de pourritures de gaines reste à déterminer.

Les résultats de la caractérisation moléculaire des *Pseudomonas* fluorescents isolés de pourritures de la gaine de riz démontrent que plusieurs espèces sont associées avec la pourriture des gaines. L'analyse phylogénétique réalisée à partir du polymorphisme de longueur des fragments de



restriction de l'ADNr 16S amplifié révèle un regroupement de ces différents isolats. Les arbres phylogénétiques reconstruits sont en accord avec celui décrit dans l'étude de Laguerre sur le groupe RNA I des *Pseudomonas* (Laguerre *et al.*, 1994). Bien que les isolats de *P. fuscovaginae* soient proches des différentes espèces de *Pseudomonas* fluorescents, ils forment un groupe phylogénétique distinct. De plus la mise en évidence d'une amplification spécifique chez tous les isolats de *P. fuscovaginae* de la séquence pfl de 598 pb confirment ce regroupement phylogénétique.

Mais cette séquence pfl n'étant pas spécifique du pathogène, son utilisation comme outil diagnostique apparaît difficile. Par contre notre étude valide la caractérisation proposée par P. Rott (1991) puisque tous les isolats présentant le profil biochimique 1 de *P. fuscovaginae* sont regroupés sur une branche phylogénétique commune.

La classification selon les caractéristiques biochimiques regroupe *P. fuscovaginae* avec le biovar V de *P. fluorescens* (Rott *et al.*, 1989). Des études menées sur le groupe des *Pseudomonas* fluorescents par hybridation ADN-ADN a mis en évidence 3 groupes dont 2 comprennent des espèces phytopathogènes : le premier est caractérisé par *P. marginalis* (*P. fluorescens* bv. II) et le second par *P. syringae* (Young *et al.*, 1992). *P. fuscovaginae* est inclus dans le premier groupe. Notre étude met clairement en évidence que *P. fuscovaginae* se distingue du groupe des *P. fluorescens* et qu'il ne peut être assimilé ni au biovar V de *P. fluorescens* ni à *P. marginalis*.

Notre étude permet de mettre en évidence que l'espèce *P. fuscovaginae* présente une diversité génétique. La séquence codante pour l'ADNr 16S représentative pour la détection de la variabilité au niveau des espèces est assimilable à une horloge moléculaire (Hillis & Dixon, 1991 ; Woese, 1987). La variabilité détectée dans *P. fuscovaginae* pourrait donc être représentative d'une diversité génétique intra-spécifique suggérant que la branche regroupant les isolats de *P. fuscovaginae* pourrait être une espèce qui se serait diversifiée à partir d'un ancêtre commun. Cette diversité n'apparaît pas liée aux localités géographiques pour les isolats de Madagascar. Il serait important d'approfondir l'étude de la diversité en Asie et en Amérique du Sud afin de déterminer si les groupes phylogénétiques mis en évidence à Madagascar sont présents dans ces différentes régions. Cette étude permettrait d'émettre des hypothèses quant aux phénomènes évolutifs impliqués dans la variabilité de *P. fuscovaginae*.

Nous avons mis en évidence précédemment une diversité sérologique des isolats de *P. fuscovaginae*. Les groupes sérologiques et les génotypes présents dans cette espèce

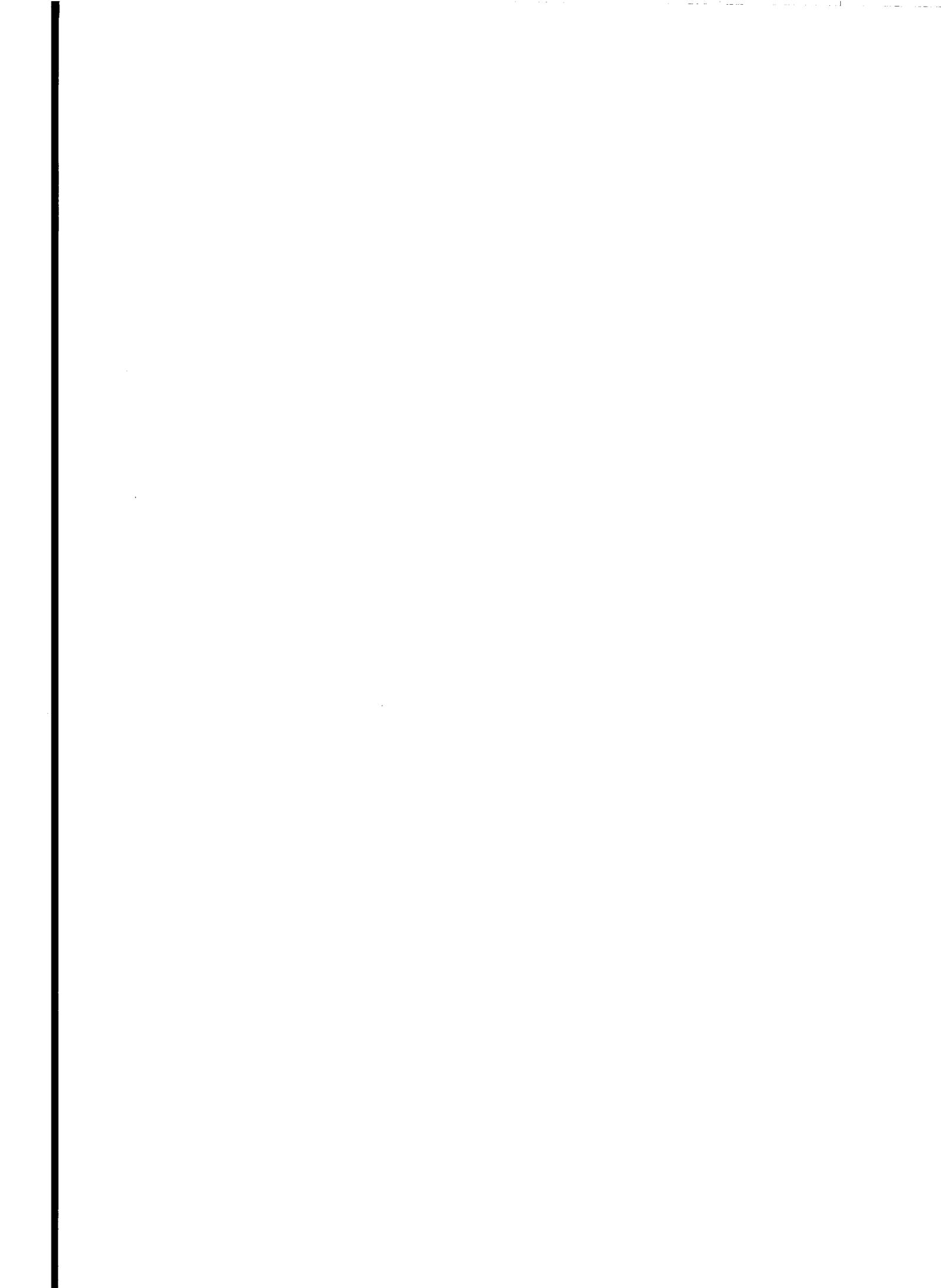
Tableau 14. Comparaison des géotypes et des groupes sérologiques pour les isolats de *P. fuscovaginae*.

Isolat	Géotype	Groupe sérologique
LMG2158	M	nd ^a
BCE3	M	nd
Sbi7	M	S1
S4A2	M	S3
F4	M	S2
F5	M	S2
V4.2	M	S2
V6A	M	S2
V9A	M	S2
Lum3	M	S1
Lum5.2	M	S3
Lum6.1	M	S1
F2.2	N	S2
Sd8.1	O	S2
Sd7.2	O	S2
V3	O	S1
V6'	O	S1
V7.1	O	S2
V10A	O	S2
Sbpg2	O	S2
F3	O	S2
6801	P	S2

^a non déterminé dans notre étude.

n'apparaissent pas liés (tableau 14) puisque les différents génotypes sont présents dans les 3 groupes sérologiques. Cette absence de concordance entre les variabilités sérologique et génétique a aussi été mise en évidence pour *X. albilineans* (Rott *et al.*, 1994). Des études sur les caractéristiques physiologiques de *P. fuscovaginae* ont permis de mettre en évidence que la physiologie de l'agent pathogène était variable. En effet, d'une part Rott *et al.* (1991) ont montré que les réponses ne sont pas homogènes pour 11,5% de 87 tests biochimiques utilisés (Rott *et al.*, 1989b) et, d'autre part, Zeigler et Alvarez (1990) ont mis en évidence que l'espèce *fuscovaginae* se divisait en 2 groupes physiologiques. Nos résultats confirment donc que *P. fuscovaginae* représente un groupe phylogénétique diversifié.

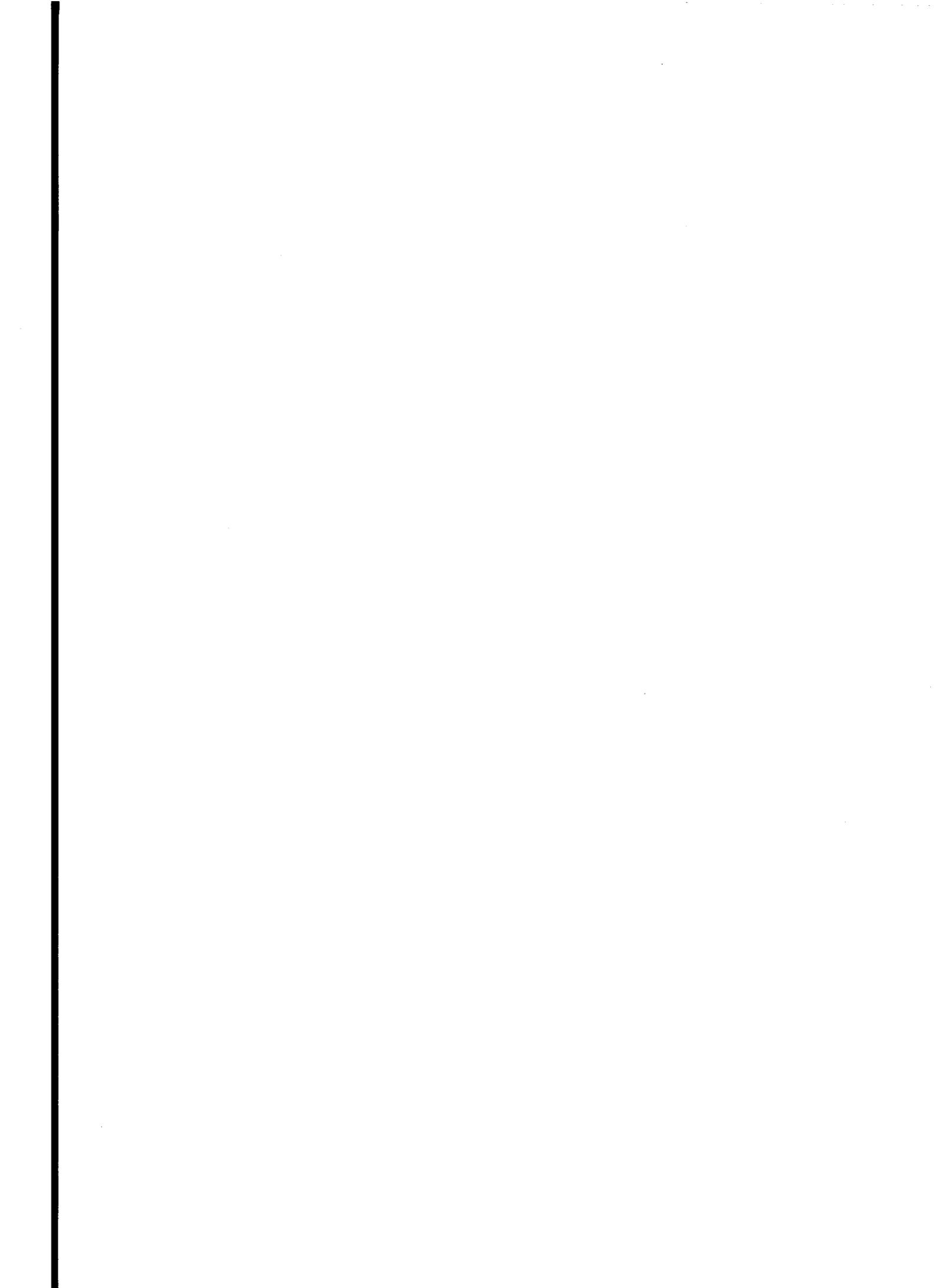
Les espèces de *Pseudomonas* fluorescents isolées de pourritures de gaine de riz sont distribuées en deux groupes selon leur capacité à être pathogènes sans blessure au stade gonflement. Les isolats non pathogènes à ce stade mais pathogènes sur jeunes plantes peuvent être considérés comme des espèces opportunistes plutôt que comme des bactéries pathogènes. Ces espèces de *Pseudomonas* fluorescents de basse et haute altitude correspondent essentiellement au génotype E caractérisé par le génotype de *P. fluorescens* bv. V. Néanmoins parmi les trente isolats étudiés quatre ne correspondent à aucune espèce de référence décrite. Les isolats pathogènes sur riz au stade gonflement sans blessure peuvent être considérés comme de vraies espèces pathogènes puisque l'inoculation en conditions contrôlées permet de reproduire les symptômes observés au champ. Ces isolats pathogènes de Madagascar et du Népal appartiennent principalement au groupe biochimique et génotypique de *P. fuscovaginae*. Les autres isolats pathogènes de Madagascar présentent le même génotype que *P. syringae* pv. *syringae* alors que l'isolat Lum10 du Népal correspondant au génotype B n'est proche d'aucune espèce de référence décrite. Parmi les isolats de basse altitude, l'isolat 6031 des Philippines, proche de *P. putida* bv. A et de *P. fluorescens* bv. VI, peut être considéré comme un agent pathogène vrai. Ce dernier résultat confirme de récentes études en Indonésie (Nieves Mortensen *et al.*, 1992) et aux Philippines (Van Outryve *et al.*, 1992) relatif à la présence de *Pseudomonas* fluorescents causant des pourritures de gaine. De plus, nous avons mis en évidence que les espèces pathogènes sont dispersées dans tout le phylum des *Pseudomonas* fluorescents ce qui contredit en partie de précédentes études décrivant *P. syringae* pv. *syringae* et *P. fuscovaginae* comme les seules espèces de *Pseudomonas* fluorescents agents causaux de pourritures des gaines du riz (Ou, 1985 ; Ziegler & Alvarez, 1990).



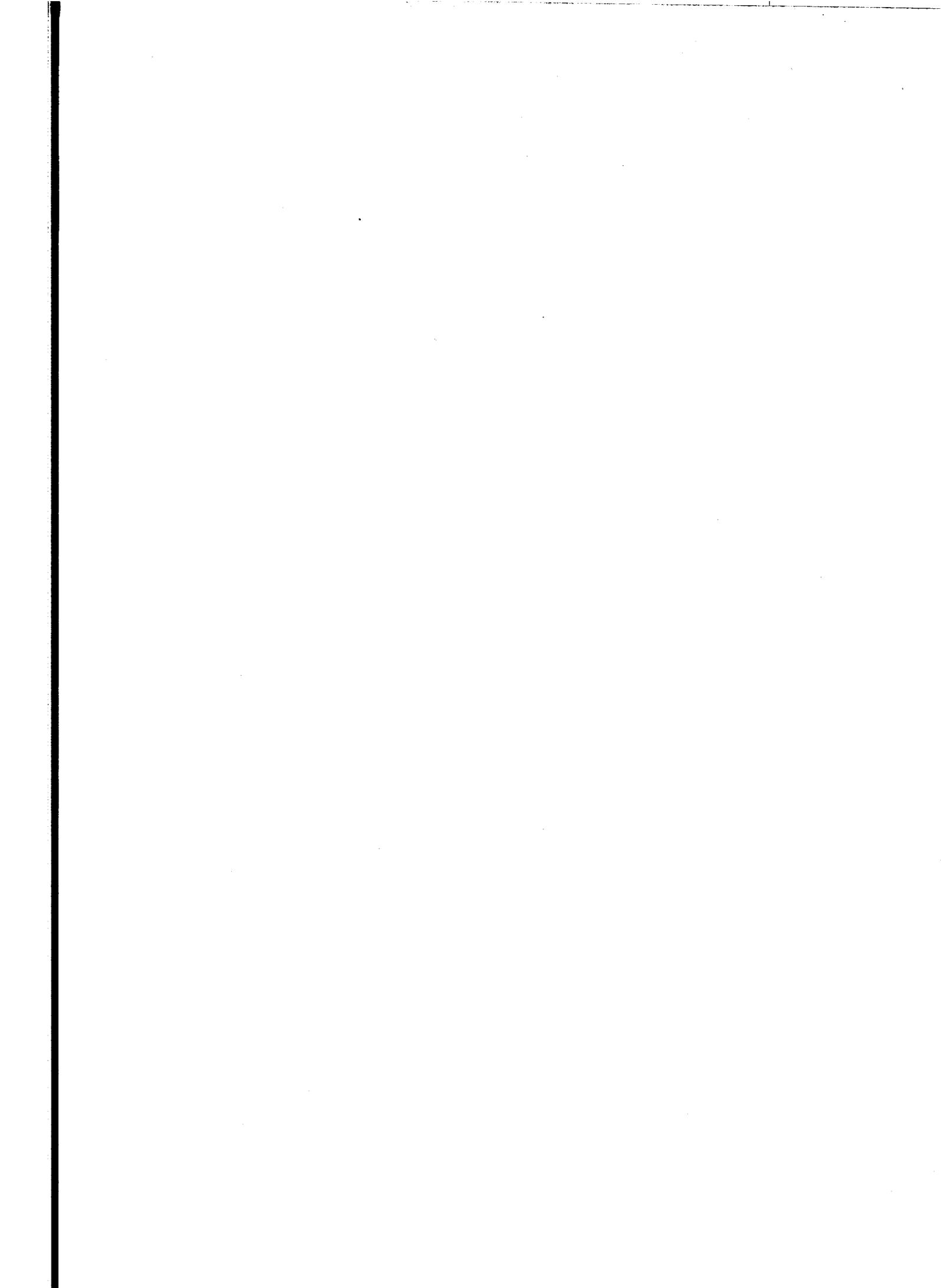
Pseudomonas fuscovaginae présente un large spectre d'hôte et a été isolé de pourriture de gaine du maïs, et du sorgho au Burundi et du blé au Mexique (Duveiller *et al.*, 1989 ; Duveiller & Maraïte, 1990) et de pourriture d'ail à l'Île de la Réunion (Girard *et al.*, 1992). Les structures génétiques des populations de bactéries phytopathogènes sont liées au spectre d'hôte et à l'agressivité pour *X. campestris* pv. *citri* (Gabriel *et al.*, 1988 ; Graham *et al.*, 1990), ou à l'avirulence pour *X. oryzae* pv. *oryzae* (Leach *et al.*, 1992), ou à l'origine géographique pour *P. solanacearum* (Cook *et al.*, 1989). Une étude des relations phylogénétiques et du pouvoir pathogène entre les différents isolats *P. fuscovaginae* permettrait de déterminer si le spectre d'hôte et/ou l'origine géographique sont liés à la structure des populations de l'agent pathogène.

Toutes les approches de caractérisation utilisées dans cette étude : physiologique, sérologique, pathogénique et génétique montrent que *P. fuscovaginae* constitue une espèce polymorphe se distinguant clairement des autres *Pseudomonas* fluorescents pathogènes ou non pathogènes du riz. En se basant sur les analyses sérologique, phylogénétique et de la virulence il est clairement démontré qu'il existe une variabilité au sein de *P. fuscovaginae*. Cette première étude ne permet pas de lier les différents groupes phylogéniques mis en évidence avec l'origine géographique et la variabilité sérologique ou pathogénique. Il apparaîtrait donc nécessaire d'approfondir cet aspect.

D'autres espèces isolées de pourritures de gaine ont été caractérisées dans cette étude. Bien qu'elles apparaissent moins virulentes que *P. fuscovaginae*, leur rôle dans l'épidémiologie des pourritures de gaines reste à déterminer.

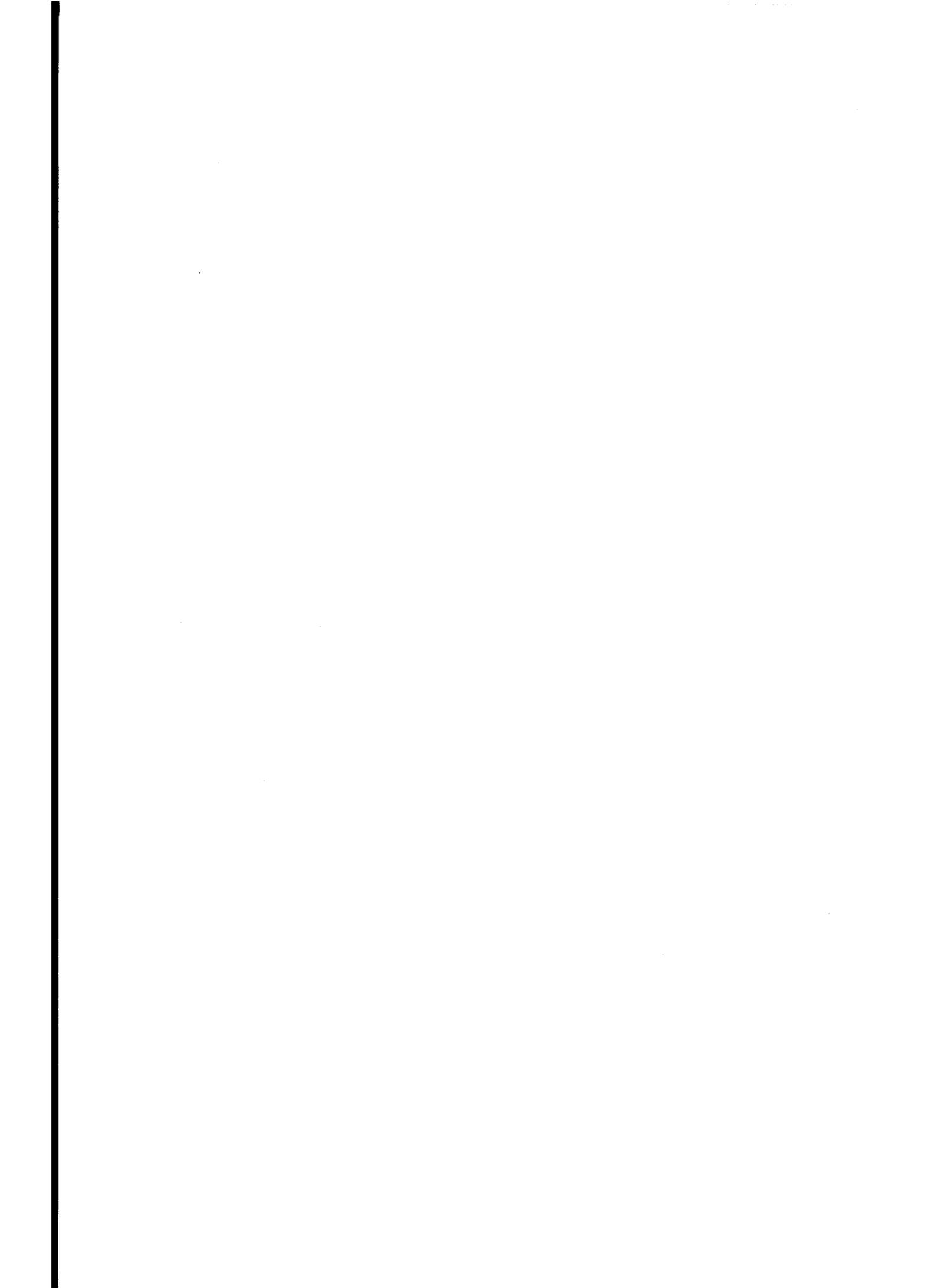


CHAPITRE II
ETUDE DE L'EXPRESSION DU POUVOIR PATHOGENE



1 INTRODUCTION

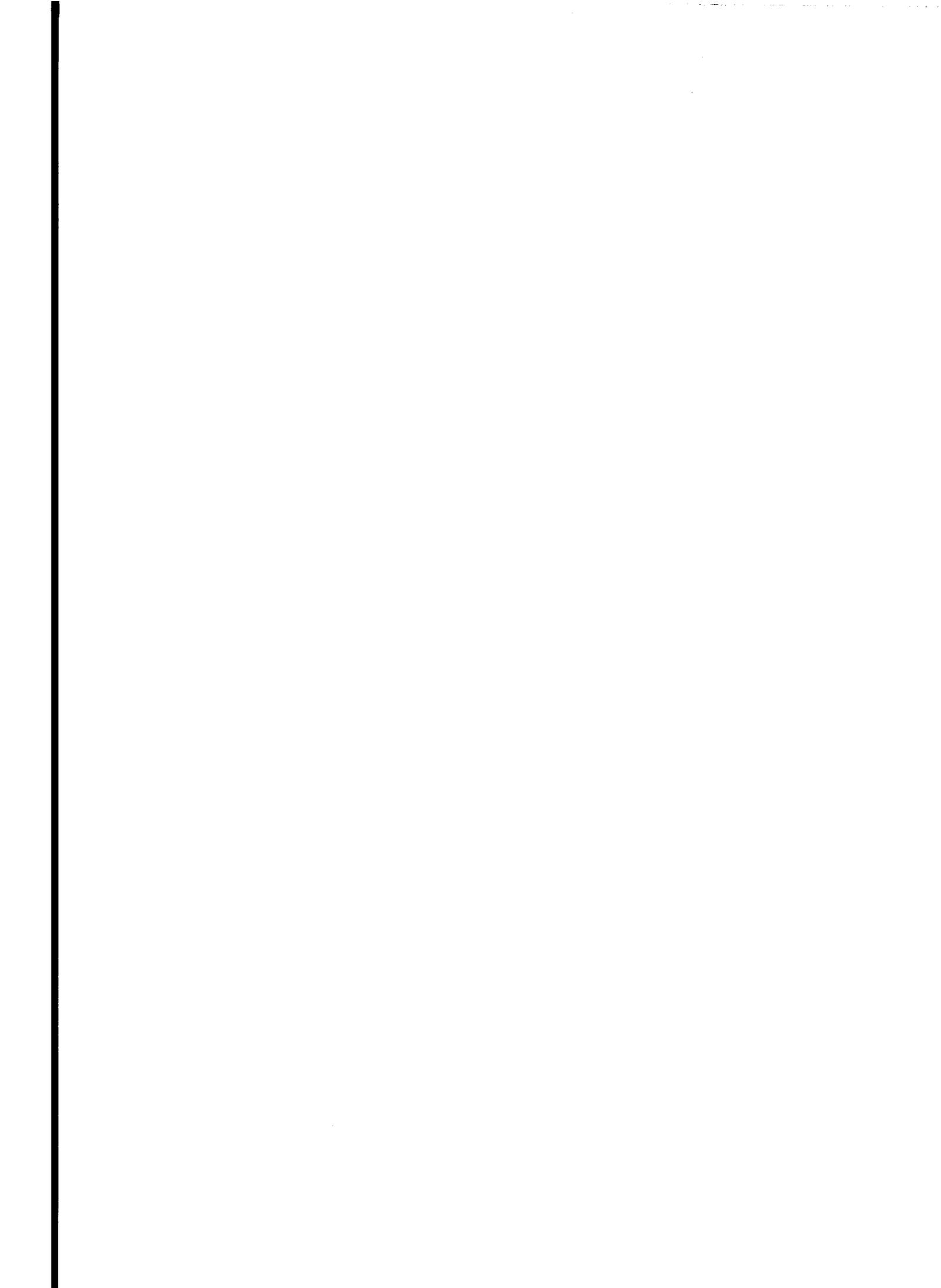
Nous avons mis en évidence dans le chapitre précédent que le processus infectieux de la maladie au niveau de la gaine paniculaire du riz peut être décrit par l'hypothèse de l'action indépendante, c'est-à-dire, que la probabilité de *P. fuscovaginae* de se multiplier dans l'hôte est indépendante de la quantité de cellules bactériennes présentes dans l'inoculum. Deux principaux modèles ont été élaborés afin de donner une explication biologique à cette probabilité de multiplication (Ercolani, 1984). Ils se différencient par les facteurs limitants intervenant dans l'évolution des populations de l'agent pathogène sur l'hôte. Dans le premier modèle le facteur limitant est l'installation de l'agent pathogène sur l'hôte. Il assimile la probabilité d'être pathogène à la proportion sur l'hôte de sites réceptifs à l'agent pathogène. Dans ce modèle, appelé modèle à deux étapes, l'infection débute par une première étape d'accrochage sur l'hôte. La seconde étape consiste en la seule multiplication des bactéries présentes sur les sites réceptifs. Ce modèle suppose que la multiplication sur les sites réceptifs n'est soumise à aucun facteur limitant. Au contraire, dans le second modèle (modèle de croissance) l'accrochage est supposé non spécifique et la probabilité d'être pathogène correspond à la probabilité de croître sur l'hôte, cette croissance étant sous la dépendance d'événements aléatoires successifs. Des études menées sur la vie épiphyte des bactéries pathogènes ont permis de valider ces modèles en mettant en évidence que les deux principaux facteurs limitants à cette vie sont l'installation sur la surface foliaire et l'accessibilité aux nutriments (Blakeman, 1992). Les paramètres environnementaux peuvent modifier ces facteurs. L'installation est gouvernée par différents mécanismes moléculaires d'accrochage aspécifiques (liaisons électro-statiques, hydrophobes, hydrogènes) et spécifiques (adhésines) (Romantschuk, 1992). Chez *P. syringae* pv. *phaseolicola*, la production des molécules impliquées dans l'accrochage spécifique est un facteur conditionnant la virulence, cet accrochage se faisant préférentiellement sur les stomates. Il a été montré d'autre part que l'infection des feuilles de haricot par cet agent pathogène suit le modèle à deux étapes lors d'inoculation à fortes concentrations (Ercolani, 1984). Cette phase d'installation sur la surface foliaire de l'hôte est suivie d'une phase de croissance de la population durant laquelle l'accessibilité aux nutriments et essentiellement aux acides aminés (Blakeman, 1992) apparaît le principal facteur limitant (Lindow, 1991). Les conditions environnementales peuvent modifier ces différentes phases : l'eau libre pour le mouvement des bactéries vers les sites de colonisation



et la libération des nutriments par la plante (Hirano & Upper, 1983 ; O'brien & Lindow, 1989), la température pour la croissance (Smitley & McCarter, 1982).

Dans les processus de production de symptômes des molécules phytotoxiques ont été mises en évidence chez de nombreuses bactéries phytopathogènes (Bashan, 1987). Il a été démontré que *P. fuscovaginae* produit *in vitro* un métabolite secondaire phytotoxique, la syringotoxine, produite également par *P. syringae* pv. *syringae* (Pelsser *et al.*, 1992). L'injection dans les gaines de riz de la toxine purifiée occasionne des symptômes identiques à ceux produits par l'agent pathogène. De nombreuses études ont été menées sur les différentes toxines (syringomycine, syringotoxine et syringostatine) produites par le pathovar *syringae* de *P. syringae* (Gross, 1991). Ces lipopeptides cycliques s'insèrent dans les membranes lipidiques et provoquent la mort cellulaire par l'altération de la respiration et la sortie du potassium. L'expression de la syringomycine chez *P. syringae* pv. *syringae* n'est pas constitutive. Elle est régulée positivement par le fer, par différents composés phénoliques et surtout par le sucrose et le D-fructose. Cette production est réprimée par le phosphate (Gross, 1991). Le rôle joué par la toxine dans le pouvoir pathogène reste mal défini. Mais il semble que son action toxique contribuerait à la croissance de l'agent pathogène par l'augmentation du pH du plasmalemme et la libération de sucrose et d'acides aminés. En effet, dans l'interaction *P. syringae* pv. *syringae*/maïs le symptôme croît uniquement durant la phase exponentielle de la croissance des populations bactériennes (Gross & De Vay, 1977). De plus il a été montré que les gènes du système enzymatique de synthèse de la syringomycine sont exprimés dès la pénétration de l'agent pathogène (Gross, 1991). Mais bien que la toxine intervienne dans le pouvoir pathogène, elle n'apparaît pas être le seul facteur permettant l'établissement des interactions compatibles. En effet, aucune différence n'a été mise en évidence dans la croissance *in planta* entre des souches sauvages et leurs mutants ne produisant plus de toxine. D'autre part, il apparaît également que les souches non pathogènes n'atteignent pas des populations suffisantes pour produire les quantités de toxine nécessaires au développement des symptômes (Gross & De Vay, 1977). Il existe donc une inter-dépendance entre la multiplication du parasite et la production de toxine dans le développement de l'agent pathogène dans l'hôte.

Pseudomonas fuscovaginae est décrit dans les zones géographiques où les basses températures en fin de cycle du riz sont limitantes pour la riziculture. L'interaction



P. syringae pv. *tomato*/tomate est aussi dépendante des basses températures (Smitley & McCarter, 1982). Des études menées au champ et en conditions contrôlées sur cette interaction ont permis de mettre en évidence une augmentation de la survie épiphyte de l'agent pathogène sur l'hôte avec l'abaissement des températures. au cours de notre travail, nous avons étudié l'évolution des populations *in planta* de *P. fuscovaginae* à différentes températures afin de déterminer si les différentes phases de l'infection (épiphyte et pathogène) de la gaine paniculaire du riz par *P. fuscovaginae* étaient affectées par la température.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Matériel

2.1.1 isolat

La souche Sd8.1 isolée de symptôme de pourriture de gaine en 1992 provient de la localité de Soanindrariny (1850 mètres d'altitudes) à Madagascar.

2.1.2 variétés

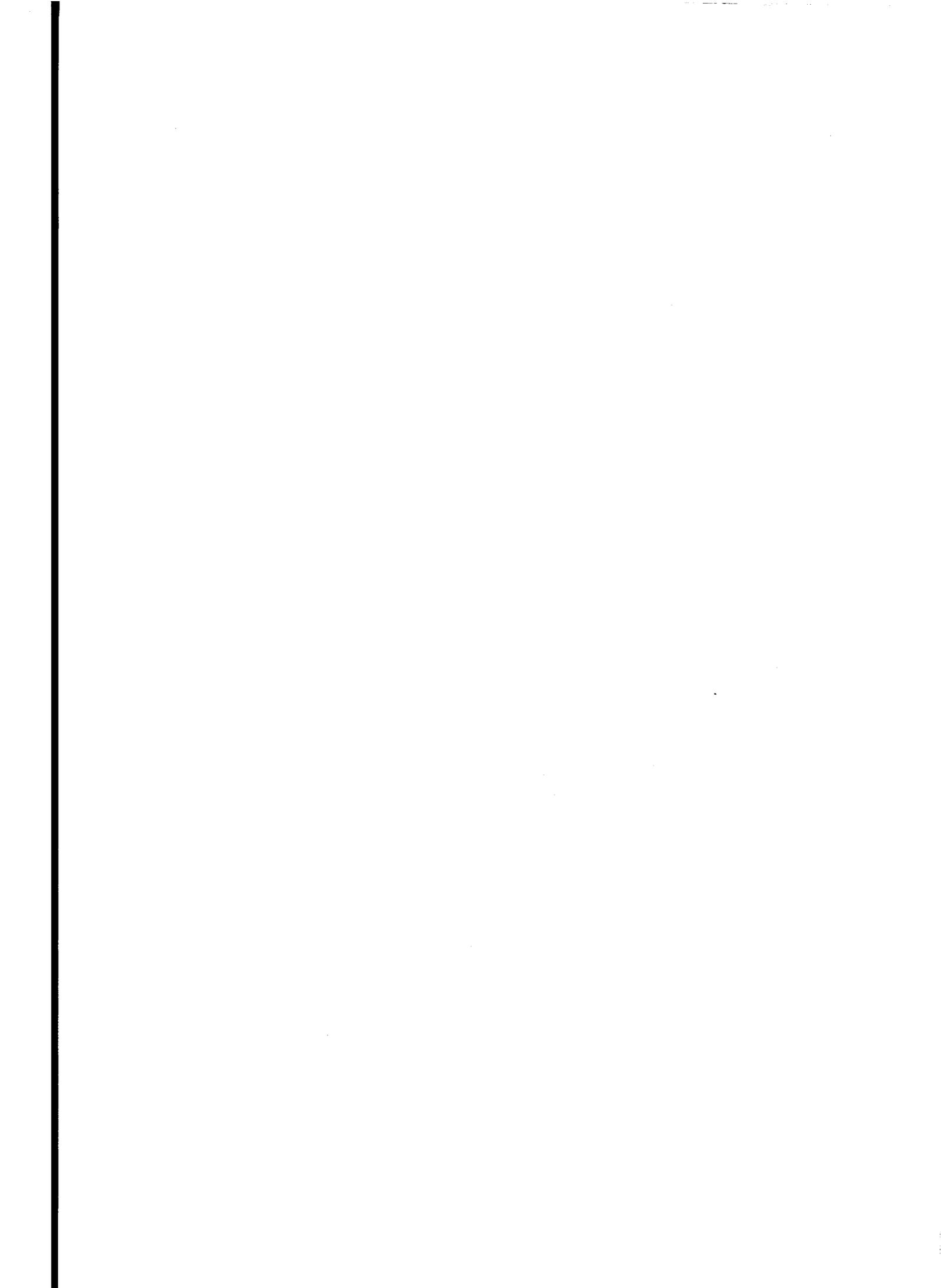
Les variétés étudiées dans ce chapitre sont Latsidahy et Dourado précoce qui ont été décrites précédemment (cf Chapitre I, 2.4.1).

2.2 Méthode

Les méthodes de culture du riz et d'inoculation sont identiques à celles décrites dans le chapitre I (2.4.4).

2.2.1 effet du stade et du type de gaine sur la réceptivité

Des plants de la variété Dourado précoce sont cultivés en serre jusqu'aux stades montaison (17 plants), gonflement (58 plants), épiaison (50 plants) et exertion (51 plants). Pour les plants aux



stades gonflement, épiaison et exsertion, la gaine de la feuille paniculaire (gaine p) et les gaines p-1 de l'avant dernière feuille et p-2 de l'avant avant dernière feuille sont inoculées avec une suspension bactérienne dosée à la concentration de 10^8 ufc/ml. Pour les plants au stade montaison, seules les gaines p-1 et p-2 sont inoculées. Le nombre de gaines malades et la taille des symptômes sont mesurés 7 jours après l'inoculation.

2.2.2 effet de la température et de la dose sur la pathogénie de *P. fuscovaginae*

2.2.2.1 sur la virulence

Pour chacune des températures suivantes, 13°C, 18°C et 23°C, des lots de trente gaines de la variété Dourado précoce et de la variété Latsidahy sont inoculés avec des suspensions bactériennes calibrées aux concentrations de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , et 10^9 ufc/ml. Le nombre de plants présentant des pourritures de gaine est compté 14 jours après l'inoculation. Le probit empirique des fréquences de plants malades est calculé (cf Chapitre I 2.4.4). La corrélation linéaire entre ce probit et le logarithme décimal de la dose (en quantité de bactéries par gaine) est testée par la version 4.6 du programme DL50 du CIRAD-CA. La dose efficace 50% (DE50) est estimée à partir de la droite de régression.

2.2.2.2 sur la multiplication bactérienne

in vitro : 3 tubes de 5 ml milieu King B liquide sont ensemencés avec une suspension bactérienne à 50 ufc/ml puis sont placés à 23°C, 18°C ou 13°C. La quantité de bactéries par tube est mesurée par la méthode dilution-étalement après 0, 1, 2, 3, 5 et 6 jours de croissance.

in vivo : les gaines de la variété Dourado précoce sont inoculées à 13, 18 et 23°C avec une suspension bactérienne aux concentrations de 10^3 , 10^5 ou 10^7 ufc/ml. Pour les températures de 13°C et 18°C, 5 talles sont prélevées au hasard à 2, 4, 6, 8, et 10 jours après l'inoculation et pour la température de 23°C à 2, 4 et 8 jours. Pour chaque talle prélevée, la gaine paniculaire est pesée et pour les gaines malades la taille du symptôme est mesurée. La gaine est broyée dans 1 ml d'eau distillée stérile pour 0,1 gramme de matière fraîche. La méthode de broyage est identique à celle décrite dans le chapitre I (2.1). Après une macération de 30 minutes, le jus de broyage est dilué et 50 µl des dilutions sont étalés sur 2 boîtes de milieu King B semi-sélectif. Le nombre de bactéries est compté après 2 à 3 jours de croissance à 28°C.

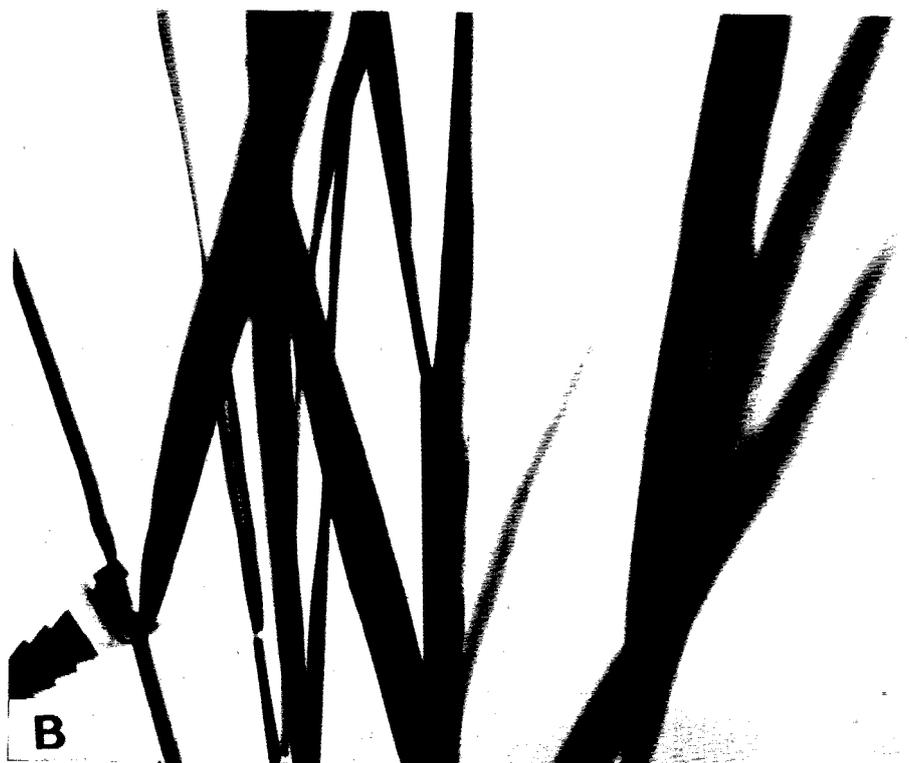
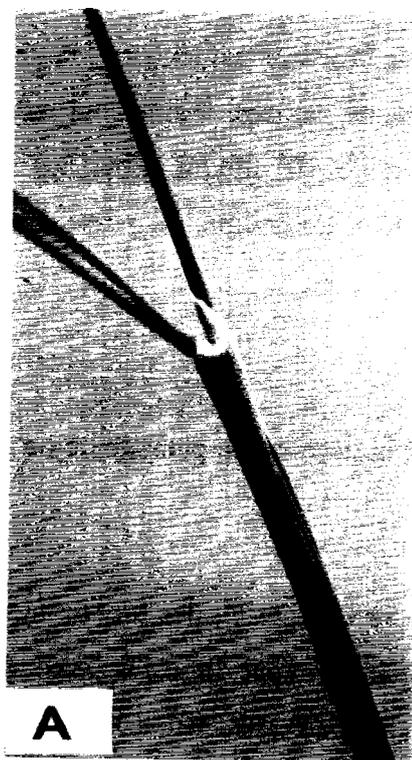


Planche 1 : symptôme sur gaine p-1 inoculée au stade montaison (A) et sur gaine paniculaire inoculée au stade gonflement (B) et épiaison (C).

2.2.2.3 sur le temps d'incubation et le développement dans le temps des symptômes.

A 13, 18 et 23°C, des lots de 30 gaines paniculaires sont inoculés à chacune des concentrations suivantes 10^2 , 10^3 , 10^4 et 10^5 ufc/ml. Chaque jour, les plants malades sont dénombrés et la taille des symptômes est mesurée.

3 RESULTATS

3.1 Effet du stade et du numéro d'ordre de la gaine sur la réceptivité

Fréquence de malades : il n'y a pas de différence significative entre les stades pour chacune des gaines (tableau 1). Le stade de la talle au moment de l'inoculation n'a donc pas d'effet sur la probabilité d'une gaine d'être malade. La proportion de gaines malades diminue de la gaine paniculaire à la gaine p-2 aux 4 stades étudiés, exertion, épiaison, gonflement et montaison. Cette probabilité varie donc avec le numéro d'ordre de la gaine. Elle est de 99% pour la gaine paniculaire, 84% pour la gaine p-1 et 36% pour la gaine p-2.

Symptômes : pour tous les stades d'inoculation, les gaines p-1 et p-2 présentent des symptômes de lésions angulaires, peu étendues et rarement coalescentes (planche 1A). Sur les gaines paniculaires les symptômes sont diffus et nécrosés aux stades étudiés, du gonflement à l'exertion (planche 1B et 1C). Pour cette gaine, la taille moyenne des symptômes varie en fonction du stade d'inoculation (tableau 2). Les symptômes des gaines paniculaires inoculées au stade gonflement ont une taille supérieure à ceux des gaines paniculaires inoculées aux stades ultérieurs (épiaison et exertion). La taille moyenne des symptômes varie aussi en fonction du numéro d'ordre de la gaine. Les gaines p-1 et les gaines p-2 présentent des symptômes de taille inférieure à ceux de la gaine paniculaire. La taille moyenne des symptômes sur les gaines est indépendante du stade végétatif au moment de l'inoculation. Il apparaît donc que la gaine paniculaire est plus réceptive à *P. fuscovaginae* que les gaines inférieures d'une part et que l'expression de cette réceptivité est maximum au stade gonflement d'autre part.

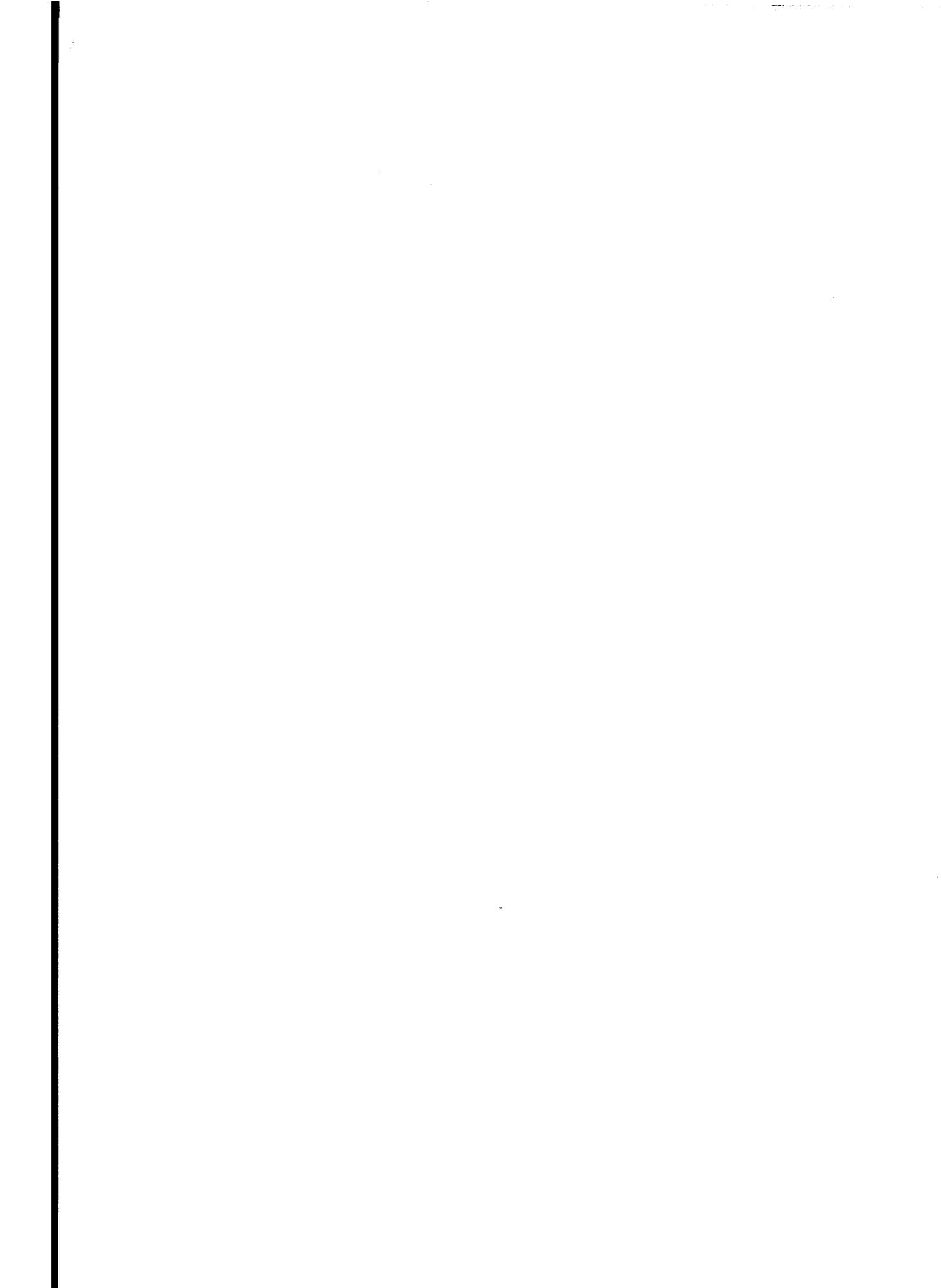


Tableau 1. Test du χ^2 de Pearson pour la fréquence de gaines malades de la variété Dourado précoce inoculées à différents stades avec l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae*.

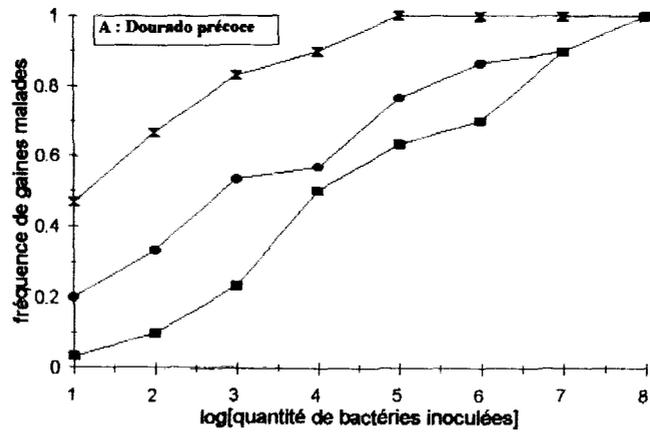
n° d'ordre des gaines	fréquence de gaines malades aux stades d'inoculation :				χ^2
	exertion	épiaison	gonflement	montaison	
paniculaire	0,98	0,98	1,00	/	1,16 (56,5%) ¹
p-1	0,86	0,78	0,86	0,82	1,71 (63,9%)
p-2	0,33	0,30	0,40	0,47	2,18 (53,9%)

¹ : probabilité du χ^2 .

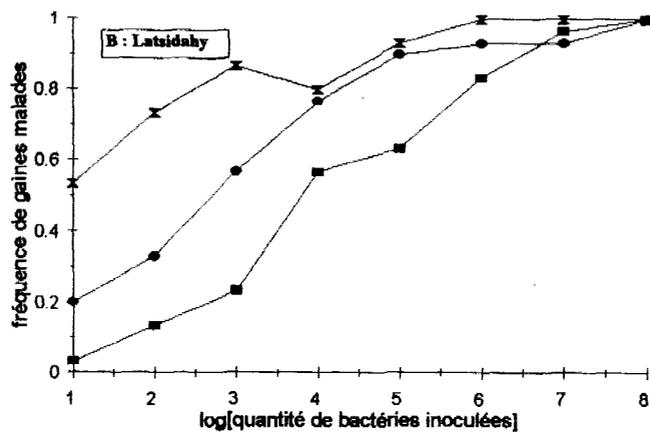
Tableau 2. Taille moyenne des symptômes (en cm) sur les gaines de la variété Dourado précoce inoculées à différents stades avec l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae*.

n° d'ordre des gaines	stade d'inoculation :				moyenne
	exertion	épiaison	gonflement	montaison	
paniculaire	4,9 +/- 0,9 ¹	5,7 +/- 1,5	15,0 +/- 1,5	/	8,9
p-1	3,1 +/- 0,6	2,6 +/- 0,8	2,5 +/- 1,3	1,9 +/- 0,5	2,3
p-2	4,7 +/- 3,2	2,7 +/- 1,1	2,2 +/- 0,9	1,0 +/- 0,6	2,8
moyenne	4,2	4,1	6,6	1,7	4,7

¹ : intervalle de confiance à 95% de la moyenne.

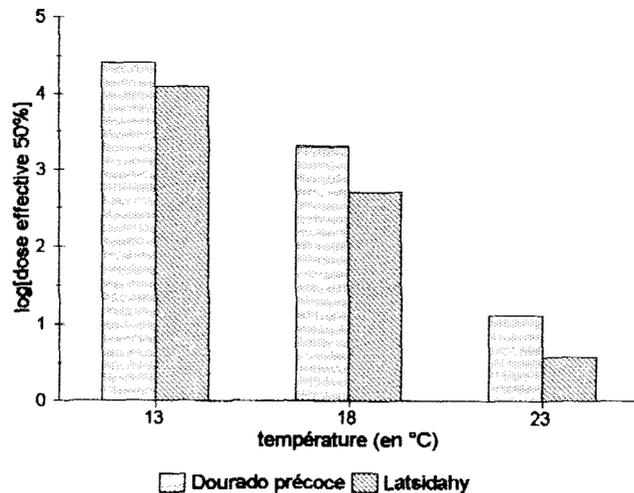


■ 13°C ● 18°C × 23°C



■ 13°C ● 18°C × 23°C

Figure 1 : fréquence de gaines paniculaires malades en fonction du log. de la quantité de bactéries inoculées à différentes températures sur les variétés Dourado précoce (A) et Latsidahy (B).



□ Dourado précoce ▨ Latsidahy

Figure 2 : log. de la quantité de bactéries nécessaire pour obtenir 50% de gaines paniculaires malades pour les variétés Dourado précoce et Latsidahy inoculées à différentes températures.

3.2 effet de la température

3.2.1 sur la virulence

Pour les 2 variétés Dourado précoce et Latsidahy et pour chaque température de culture la fréquence de gaines paniculaires malades augmente de façon sigmoïde avec le logarithme de la dose (quantité de bactéries inoculées) (figures 1). Le probit de la fréquence de gaines malades a été calculé à partir des fréquences de gaines malades. La forte probabilité du χ^2 de l'ajustement linéaire du probit en fonction du logarithme de la dose confirme l'augmentation normale sigmoïde de la fréquence de malades pour les 2 variétés aux 3 températures (tableaux 3). La comparaison de la pente du probit empirique montre qu'il n'y a pas de différence significative pour la fréquence de gaines malades en fonction de la dose entre les 3 températures pour chacune des variétés (tableau 4), et entre les variétés aux 3 températures (tableau 5). Donc la température et la variété n'ont pas d'effet sur le taux d'augmentation de la fréquence de gaines malades en fonction de la dose. Par contre l'ordonnée à l'origine décroît avec la diminution de la température.

Les doses d'inoculum efficaces pour 50% de gaines malades (DE50) ont été estimées à partir de l'ajustement linéaire du probit de la fréquence de gaines malades en fonction de la dose d'inoculum. Pour chacune des variétés la DE50 diminue avec l'augmentation de la température (figure 2). Pour la variété Dourado précoce, elle est de $2,5 \cdot 10^4$ bactéries par gaine à 13°C, $1,4 \cdot 10^3$ à 18°C et de $1,3 \cdot 10^1$ bactéries à 23°C et pour la variété Latsidahy de $1,2 \cdot 10^4$, $8,3 \cdot 10^2$ et 4 bactéries par gaine à respectivement 13, 18 et 23°C. Les intervalles de confiance du logarithme de la DE50 ne permettent pas de différencier les variétés aux différentes températures (tableau 5). Il apparaît donc que l'abaissement des températures diminue la probabilité de multiplication dans la gaine paniculaire de *P. fuscovaginae* pour les deux variétés étudiées.

3.2.2 sur la multiplication *in vitro* et *in vivo*

Evolution au cours du temps de la quantité de bactéries in vitro : le taux de croissance *in vitro* a été déterminé durant la phase exponentielle de la croissance (figure 3). La souche Sd8.1 de *P. fuscovaginae* est capable de se multiplier à basse température mais son taux de croissance diminue avec la température (tableaux 6), les temps de doublement étant de 2 heures à 23°C, 2,7 heures à 18°C et 3,8 heures à 13°C.

Tableau 3. Ajustement linéaire du probit de la fréquence de gaines paniculaires malades en fonction du logarithme de la quantité de bactéries inoculées de l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae* à différentes températures.

a. inoculation sur la variété Dourado précoce.

paramètres statistiques	température :		
	13°C	18°C	23°C
pente	0,52	0,40	0,47
constante	2,73	3,67	4,47
test de non linéarité :			
χ^2 calculé	3,57	2,18	0,17
degré de liberté	6	6	3
probabilité du khi ²	73,4%	90,3%	98,3
log[dose effective50]	4,4 +/- 0,4	3,3 +/- 0,5	1,1 +/- 0,8

b. inoculation sur la variété Latsidahy.

paramètres statistiques	température :		
	13°C	18°C	23°C
pente	0,57	0,46	0,36
constante	2,65	3,74	4,79
test de non linéarité :			
χ^2 calculé	2,57	3,60	4,28
degré de liberté	6	6	4
probabilité du khi ²	86,0%	73,1%	37,0%
log[dose effective50]	4,1 +/- 0,4	2,7 +/- 0,5	0,6 +/- 1,1

Tableau 4. Test t de Student de non parallélisme entre les droites de régression estimées du probit de la fréquence de gaines paniculaires malades en fonction du logarithme de la quantité de bactéries inoculées de l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae* à différentes températures.

a. inoculation sur la variété Dourado précoce.

température	température		
	13°C	18°C	23°C
13°C	/		
18°C	2,29 ¹	/	
23°C	0,59 ²	1,30 ¹	/

¹ : t de student théorique pour 12 degrés de liberté = 2,17 à 5% et 2,68 à 2,5%; ² : t de student théorique à 5% pour 9 degrés de liberté = 2,26.

b. inoculation sur la variété Latsidahy

température	température		
	13°C	18°C	23°C
13°C	/		
18°C	1,87 ¹	/	
23°C	2,71 ²	1,26 ³	/

¹ : t de student théorique à 5% pour 12 degrés de liberté = 2,17 ; ² : t de student théorique pour 11 degrés de liberté = 2,20 à 5% et 2,76 à 2,5% ; ³ : t de student théorique à 5% pour 10 degrés de liberté = 2,22.

Tableau 5. Comparaison entre Dourado précoce et Latsidahy à différentes températures pour la pente du probit de la fréquence de gaines paniculaires malades en fonction du logarithme de la quantité de bactéries inoculées de l'isolats Sd8.1 de *P. fuscovaginae*.

température	test t de student de non parallélisme	log[ED50] Latsidahy	log[ED50] Dourado
13°C	1,04 ¹	4,1 +/- 0,4	4,4 +/- 0,4
18°C	1,23 ¹	2,7 +/- 0,5	3,3 +/- 0,5
23°C	1,17 ²	0,6 +/- 1,1	1,1 +/- 0,8

¹ : t de student théorique à 5% pour 12 degrés de liberté = 2,17 ; ² : t de student théorique à 5% pour 7 degrés de liberté = 2,36.

Tableau 6. Corrélation entre le logarithme de la quantité de bactéries et le temps pour la croissance *in vitro* de l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae* à différentes températures.

paramètres statistiques	température :		
	13°C	18°C	23°C
coefficient de corrélation	0,98	0,99	0,99
pente	2,0	2,7	3,7
test t de signification	9,4 ¹	51,6	12,6
constante	1,1	1,2	0,7

¹ : t théorique à 5% pour 2 degrés de liberté : 4,30.

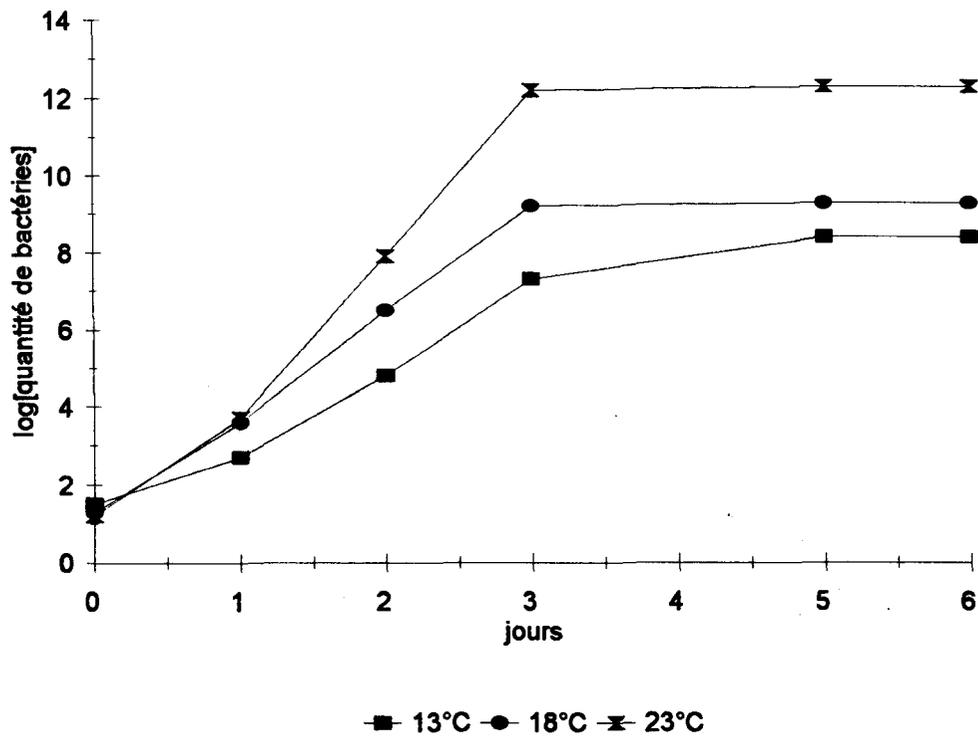


Figure 3. évolution *in vitro* au cours du temps de la quantité de bactéries à différentes températures.

Evolution au cours du temps de la quantité de bactéries in vivo : à 13°C et à 18°C, on ne met pas en évidence d'augmentation du nombre moyen de bactéries présentes dans les gaines paniculaires durant les 10 jours après l'inoculation (tableaux 7, figures 4). A 23°C, une augmentation du nombre moyen de bactéries est mise en évidence durant les 8 jours après l'inoculation (tableau 7, figure 4). Durant les 2 premiers jours après l'inoculation, cette augmentation est de 5, 4 et 2 unités log pour respectivement les inoculums de 10^2 , 10^4 et 10^6 bactéries par gaine. La quantité de bactéries moyenne dans les gaines est donc identique après le deuxième jour pour les inoculums de 10^4 et 10^6 bactéries par gaine et inférieure d'une unité logarithme pour l'inoculum de 10^2 . Au 8^{ème} jour, la quantité moyenne de bactéries par gaine est pour les 3 inoculums égale à $2 \cdot 10^9$. A 23°C, l'égalité de la quantité de bactéries à forte dose d'inoculum met en évidence que l'évolution des populations bactériennes dans les gaines est en partie indépendante de la dose d'inoculum.

La variabilité au sein des échantillons de gaine peut être mesurée par l'intervalle de confiance de la moyenne du logarithme de la quantité de bactéries par gaine. A 13°C et 18°C, la variabilité d'échantillonnage augmente au cours du temps pour les 3 inoculums (figures 5). L'analyse statistique met en évidence une forte corrélation linéaire entre la variabilité d'échantillonnage et le temps (tableaux 8). Cette augmentation de la variabilité de quantité de bactéries par gaine suggère que l'évolution au cours du temps des populations bactériennes diffère entre les gaines d'un même échantillon et donc que cette évolution est régie par des phénomènes aléatoires à 13°C et 18°C. Par contre, à 23°C, la variabilité d'échantillonnage est stable au cours du temps et reste inférieure à 1 unité logarithme (tableaux 8, figures 5). L'homogénéité des échantillons de gaines pour la quantité de bactéries met évidence que toutes les populations bactériennes évoluent de façon identique. A 23°C, ces populations sont, donc, soumises à un phénomène déterministe.

Relation symptôme-quantité de bactéries : la quantité de bactéries en fonction de la taille des symptômes est analysée pour les différentes températures sans distinguer les différentes doses d'inoculum à 13°C et 18°C car aux faibles doses le nombre de gaines malades est insuffisant. Le logarithme de la quantité de bactérie est, pour les 3 températures, linéairement corrélé au logarithme de la taille des symptômes (figures 6, tableaux 9). La comparaison des pentes ne met pas en évidence de différence significative à 5% pour l'effet température (F de Fisher de 1,76 pour 2 et 65 degrés de liberté). L'évolution de la quantité de bactéries en fonction de la taille des symptômes est donc identique aux 3 températures.

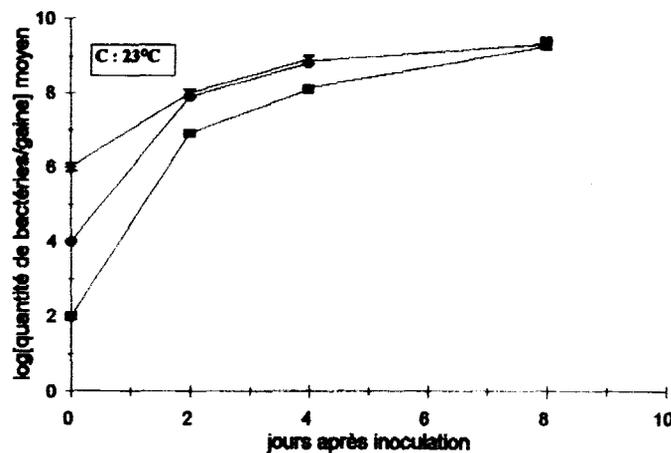
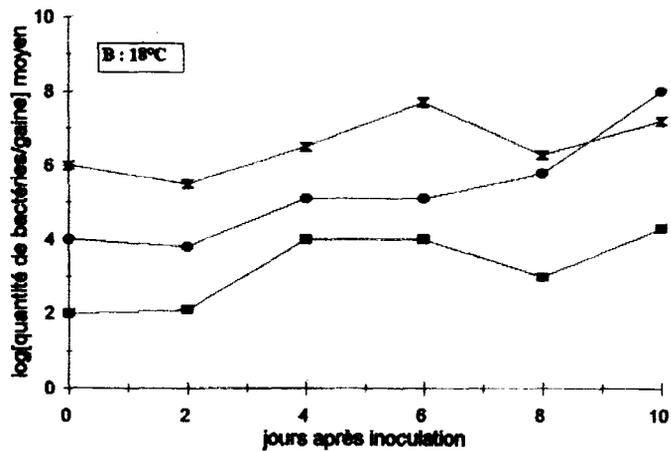
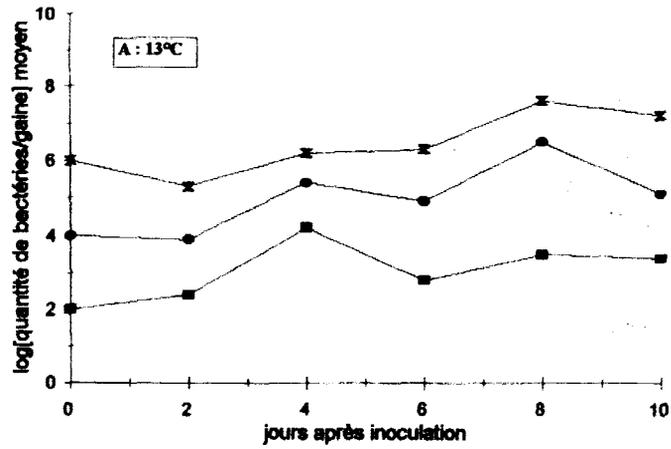


Figure 4 : évolution in vivo au cours du temps du logarithme moyen de la quantité de bactéries pour 5 gaines paniculaires inoculées à trois concentrations d'inoculum à 13°C (A), 18°C (B) et 23°C (C).

Tableau 7. Logarithme de la quantité de bactéries moyenne par gaine paniculaire après inoculation de la variété Dourado précoce à différentes concentrations d'inoculum.

a. inoculation à 13°C.

jour après inoculation	inoculum (ufc/ml) :		
	10 ³	10 ⁵	10 ⁷
0	2	4	6
2	2,4 +/- 1,4 ¹	3,9 +/- 0,8	5,3 +/- 0,8
4	4,2 +/- 2,2	5,4 +/- 1,3	6,2 +/- 1,5
6	2,8 +/- 2,2	4,9 +/- 1,3	6,3 +/- 1,7
8	3,5 +/- 2,4	6,5 +/- 1,6	7,6 +/- 2,0
10	3,4 +/- 2,5	5,1 +/- 1,8	7,2 +/- 2,2

¹ : intervalle de confiance à 95% de la moyenne.

b. inoculation à 18°C.

jour après inoculation	inoculum (ufc/ml) :		
	10 ³	10 ⁵	10 ⁷
0	2	4	6
2	2,1 +/- 1,1	3,8 +/- 0,5	5,5 +/- 0,8
4	4,0 +/- 2,0	5,1 +/- 0,9	6,5 +/- 0,5
6	4,0 +/- 2,2	5,1 +/- 1,1	7,7 +/- 1,2
8	3,0 +/- 2,3	5,8 +/- 1,3	6,3 +/- 1,4
10	4,3 +/- 2,5	8,0 +/- 1,9	7,2 +/- 1,8

c. inoculation à 23°C.

jour après inoculation	inoculum (ufc/ml) :		
	10 ³	10 ⁵	10 ⁷
0	2	4	6
2	6,9 +/- 0,5	7,9 +/- 0,6	8,0 +/- 1,3
4	8,1 +/- 0,9	8,8 +/- 0,2	8,9 +/- 0,7
8	9,4 +/- 0,1	9,3 +/- 0,5	9,3 +/- 0,4

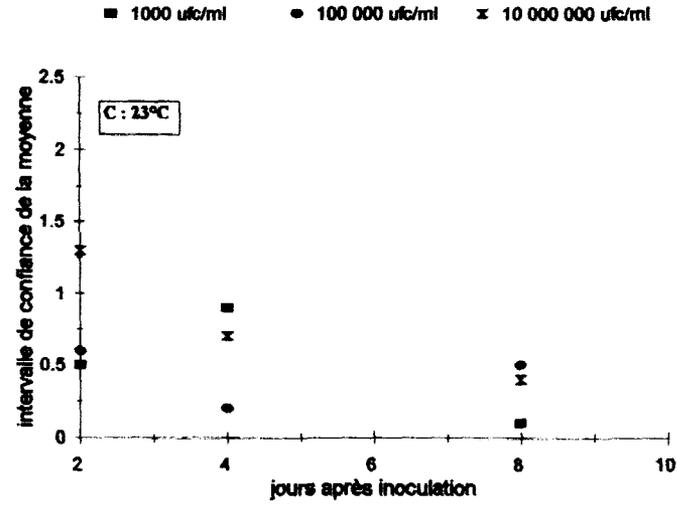
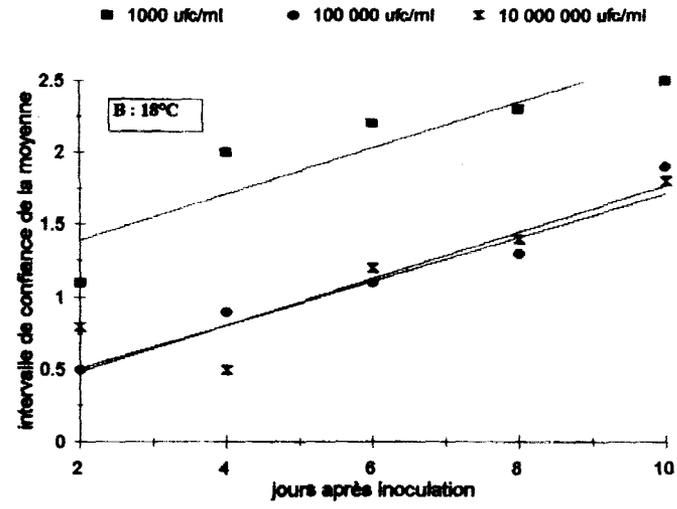
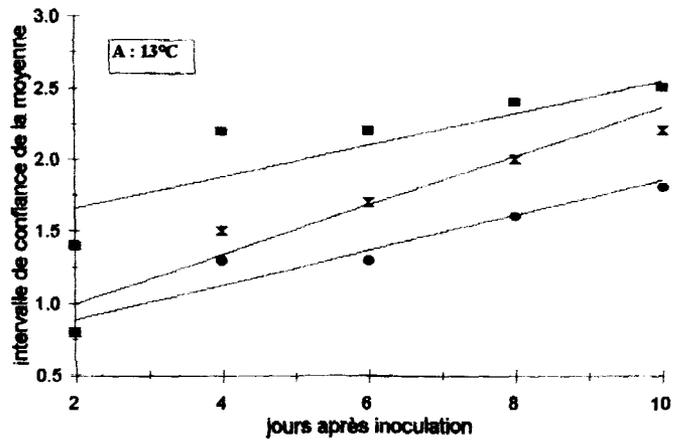


Figure 5 : évolution in vivo au cours du temps de l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne du logarithme de la quantité de bactéries pour 5 gaines paniculaires inoculées à trois concentrations d'inoculum à 13°C (A), 18°C (B) et 23°C (C). Pour 13°C et 18°C les droites de régression sont figurées en trait plein.

Tableau 8. Corrélation entre l'intervalle de confiance de la moyenne du logarithme de la quantité de bactéries par gaine et le temps à différentes concentrations d'inoculum.

a. inoculation à 13°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :		
	10 ²	10 ⁴	10 ⁶
coefficient de corrélation	0,89	0,97	0,97
pente	0,11	0,12	0,17
test t de signification	3,3 ¹	6,8	6,6
constante	1,44	0,65	0,66

¹ : t théorique à 5% pour 3 degrés de liberté : 3,1.

b. inoculation à 18°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :		
	10 ²	10 ⁴	10 ⁶
coefficient de corrélation	0,88	0,98	0,91
pente	0,16	0,16	0,15
test t de signification	3,3 ¹	10,7	3,7
constante	1,07	0,17	0,21

¹ : t théorique à 5% pour 3 degrés de liberté : 3,1.

c. inoculation à 23°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :		
	10 ²	10 ⁴	10 ⁶
coefficient de corrélation	0,61	0,22	0,95
pente	-0,07	-0,01	-0,14
test t de signification	0,8 ¹	0,2	3,2
constante	0,80	0,48	1,46

¹ : t théorique à 5% pour 1 degré de liberté : 12,7.

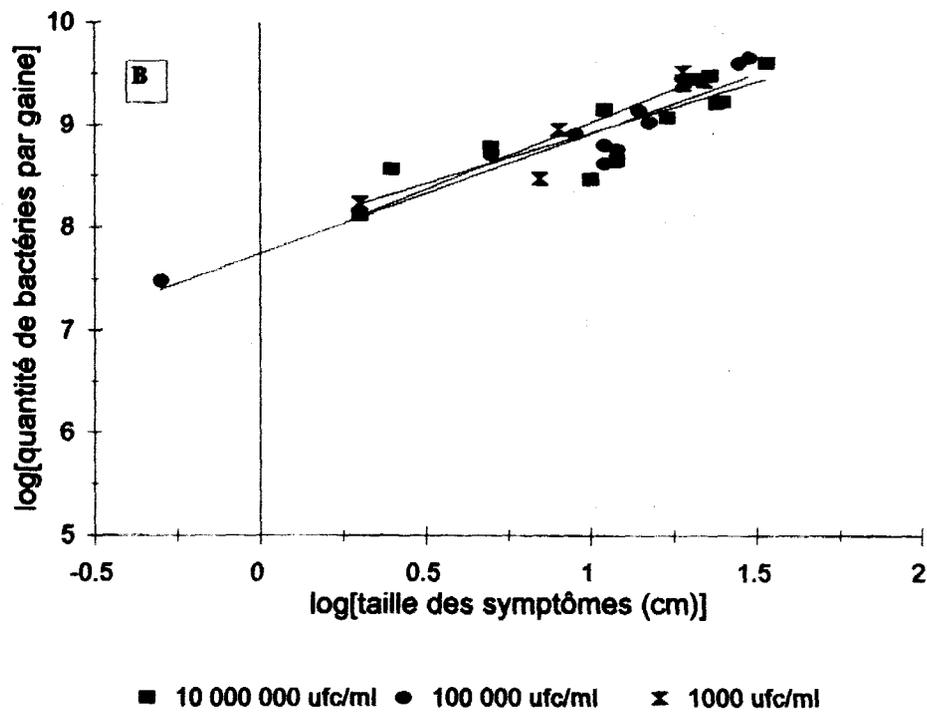
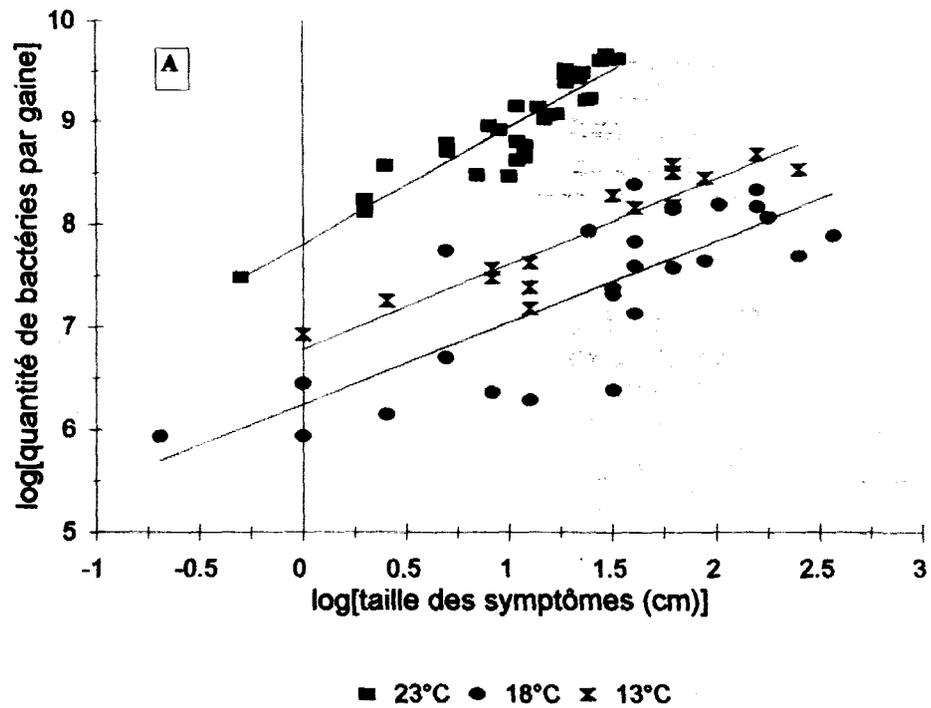


Figure 6 : logarithme de la quantité de bactéries par gaine paniculaire en fonction du logarithme de la taille des symptômes à différentes températures (A) et à différentes concentrations d'inoculum à 23°C (B). Les droites de régression sont figurées en trait plein.

Tableau 9. Corrélation entre le logarithme de la quantité de bactéries par gaine paniculaire en fonction du logarithme de la taille des symptômes après inoculation de la variété Dourado précoce à différentes températures.

paramètres statistiques	température :		
	13°C	18°C	23°C
coefficient de corrélation	0,93	0,80	0,92
pente	0,83	0,80	1,13
test t de signification	8,8 ¹	6,5 ²	12,1 ²
constante	6,78	6,25	7,81
log[quantité de bactéries dans un symptôme de 5 mm]	6,5 +/- 0,6	6,0 +/- 1,1	7,5 +/- 0,5

¹ : t théorique à 5% pour 13 degrés de liberté : 2,16 ; ² : t théorique à 5% pour 24 et 28 degrés de liberté : 2,05.

Tableau 10. Corrélation entre le logarithme de la quantité de bactéries par gaine paniculaire et le logarithme de la taille des symptômes après inoculation de la variété Dourado précoce à 23°C à différentes concentrations d'inoculum.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :		
	10 ³	10 ⁵	10 ⁷
coefficient de corrélation	0,95	0,84	0,86
pente	1,30	0,75	0,99
test t de signification	6,8 ¹	5,1 ²	6,2 ³
constante	7,72	8,23	7,93
log[quantité de bactéries dans un symptôme de 5 mm]	7,3 +/- 0,8	8,0 +/- 0,9	7,6 +/- 0,7

¹ : t de student théorique à 5% pour 5 degrés de liberté : 2,57 ; ² : t de student théorique à 5% pour 11 degrés de liberté : 2,20 ; ³ : t de student théorique à 5% pour 10 degrés de liberté : 2,23 .

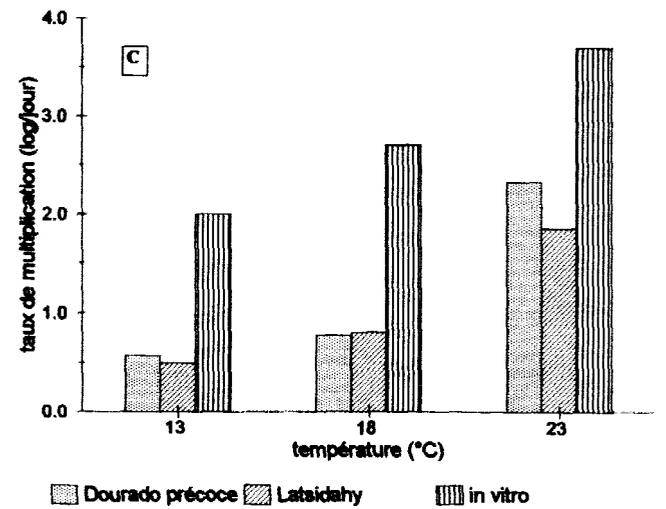
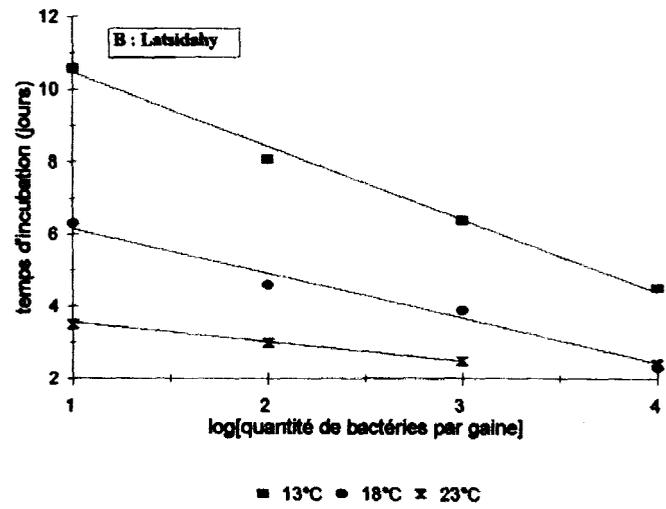
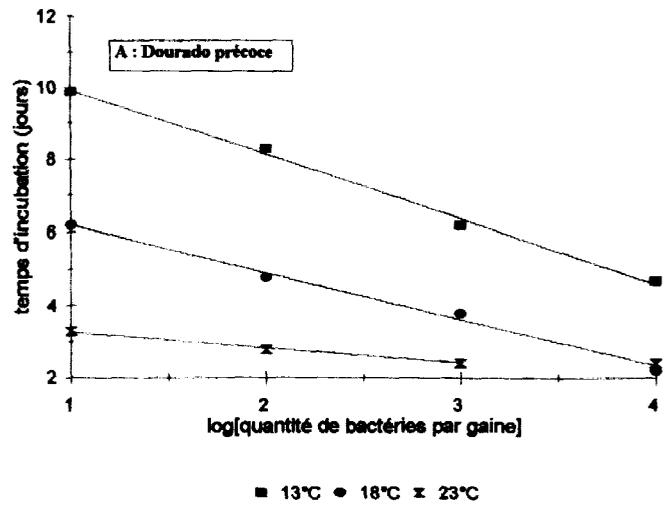


Figure 7 : temps d'incubation de l'isolat Sd8.1 en fonction du logarithme de la quantité de bactéries inoculées à différentes températures sur les variétés Dourado précoce (A) et Latsidahy (B) et taux de multiplication in planta durant le temps d'incubation estimé à partir de la pente des droites de régression et comparés au taux de multiplication in vitro (C).

La comparaison des différentes doses d'inoculum à 23°C (figure 6, tableaux 10) ne met pas en évidence de différence significative à 5% (F de Fisher de 1,65 pour 2 et 26 degrés de liberté) pour la pente du logarithme de la quantité de bactéries en fonction du logarithme de la taille des symptômes. La quantité de bactéries inoculées ne modifie pas la relation entre le logarithme de la quantité de bactérie et le logarithme de la taille des symptômes.

Cette relation met en évidence que chaque cellule bactérienne intervient dans la production de symptôme. On peut estimer que l'augmentation d'un centimètre de symptôme nécessite une augmentation de 10^7 bactéries de la population bactérienne.

Le seuil d'apparition de symptôme peut être estimé par le logarithme de la quantité de bactéries nécessaire pour produire un symptôme de 0,5 cm qui correspond à la plus petite taille de symptôme observée. Pour les températures de 13°C et 18°C la valeur de ce seuil est en moyenne de 2.10^6 bactéries par gaine et il ne semble pas que les 2 températures diffèrent pour cette valeur. Au contraire, à 23°C, la valeur de ce seuil est plus élevée : 3.10^7 bactéries par gaine. A cette dernière température, la quantité initiale de bactéries inoculées ne modifie pas la valeur du seuil.

3.2.3 sur le temps d'incubation

Le temps d'incubation est le temps moyen pour l'apparition d'un symptôme. Pour les 2 variétés Dourado précoce et Latsidahy, le temps d'incubation de la souche Sd8.1 diminue avec l'augmentation de la quantité de bactéries inoculées à 13°C et 18°C (tableaux 11, figures 7). A 23°, le temps d'incubation diminue jusqu'à l'inoculum de 10^3 bactéries, puis apparaît stable. Pour les 2 variétés Latsidahy et Dourado précoce, l'analyse statistique met en évidence que le temps d'incubation moyen est linéairement corrélé au logarithme de la quantité d'inoculum à 13°C et 18°C pour les 4 doses d'inoculum. A 23°C cette liaison n'est valable que pour les inoculums les plus faibles, c'est-à-dire, aux concentrations comprises entre 10 et 10^3 bactéries par gaine (tableaux 12). Le temps d'incubation est assimilable au temps nécessaire à une quantité de bactéries pour atteindre une population lui permettant d'exprimer son pouvoir pathogène. Cette population peut être estimée par la quantité de bactéries nécessaire à un temps d'incubation inférieur à 1 jour. Cette quantité seuil de bactéries est pour la variété Dourado précoce de 4.10^6 à 13°C, 6.10^5 à 18°C et 4.10^8 à 23°C, et pour la variété Latsidahy de 10^6 à 13°C, 9.10^5 à 18°C et de 4.10^7 à 23°C. Les 2 variétés ne se différencient donc pas pour ce seuil à 13°C et 18°C. A 23°C, la variété Latsidahy présente un seuil inférieur à celui de la variété

Tableau 11. Temps d'incubation moyen en jour de l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae* en fonction de la concentration d'inoculum à différentes températures.

a. inoculation sur la variété Dourado précoce.

inoculum (bactéries/gaine)	température :		
	13°C	18°C	23°C
10 ¹	9,9 +/- 0,7	6,2 +/- 0,7	3,3 +/- 0,3
10 ²	8,3 +/- 0,9	4,8 +/- 0,6	2,8 +/- 0,2
10 ³	6,2 +/- 0,5	3,8 +/- 0,7	2,4 +/- 0,3
10 ⁴	4,7 +/- 0,7	2,2 +/- 0,8	2,4 +/- 0,3

b. inoculation sur la variété Latsidahy.

inoculum (bactéries/gaine)	température :		
	13°C	18°C	23°C
10 ¹	10,6 +/- 0,8	6,3 +/- 1,3	3,5 +/- 0,5
10 ²	8,1 +/- 1,4	4,6 +/- 0,8	3,0 +/- 0,0
10 ³	6,4 +/- 0,7	3,9 +/- 0,4	2,5 +/- 0,3
10 ⁴	4,5 +/- 0,9	2,3 +/- 0,5	2,4 +/- 0,4

Tableau 12. Ajustement linéaire du temps d'incubation moyen en jour de l'isolat Sd8.1 en fonction de la quantité de bactéries inoculées à différentes températures.

a. inoculation sur la variété Dourado précoce.

paramètres statistiques	températures :		
	13°C	18°C	23°C
coefficient de corrélation	0,99	0,99	0,98
pente	-1,77	-1,29	-0,43
test t de signification	23,4 ¹	14,3 ¹	22,5 ²
constante	11,7	7,5	3,7

¹ : t théorique à 5% pour 2 degrés de liberté : 4,30, ² : t théorique pour 1 degré de liberté : 12,03.

b. inoculation sur la variété Latsidahy.

paramètres statistiques	températures :		
	13°C	18°C	23°C
coefficient de corrélation	0,99	0,98	0,99
pente	-2,03	-1,24	-0,54
test t de signification	17,8 ¹	9,1 ¹	354 ²
constante	12,5	7,4	4,1

¹ : t théorique à 5% pour 2 degrés de liberté : 4,30, ² : t théorique pour 1 degré de liberté : 12,03.

Dourado précoce. Pour la variété Dourado précoce, cette estimation du seuil est concordante à 13°C et 18°C avec la précédente estimation (cf section 3.2.2) mais non à 23°C.

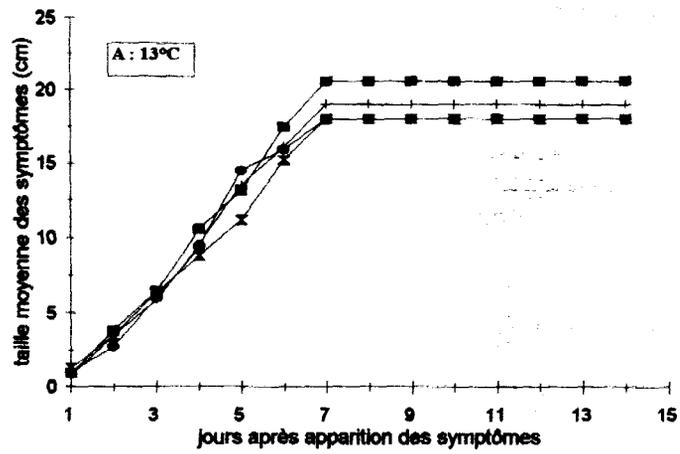
La relation linéaire mise en évidence entre le logarithme de la quantité de bactéries et le temps d'incubation permet de conclure d'une part que la multiplication bactérienne dans les gaines malades a été exponentielle durant le temps d'incubation et d'autre part que ce taux de multiplication est indépendant de la dose d'inoculum. Le taux de multiplication peut être estimée par l'inverse de la pente du temps d'incubation en fonction du logarithme de la quantité de bactéries inoculées. L'estimation de ce taux met en évidence qu'il diminue avec la température sur les 2 variétés (figure 7). De plus, les 2 variétés n'apparaissent pas se différencier pour le taux de multiplication *in planta*. Enfin la souche Sd8.1 présente *in planta* un taux de multiplication inférieur à celui trouvé *in vitro*, de 37% à 23°C et de 70% à 18°C et 13°C.

3.2.4 sur le développement des symptômes

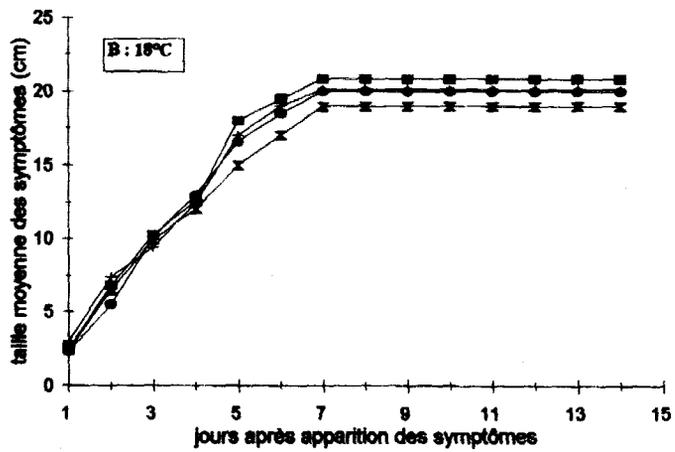
Pour les 2 variétés, la taille moyenne des symptômes croît au cours du temps (figures 8 et 9) et se stabilise lorsqu'elle représente toute la gaine paniculaire. L'analyse statistique met en évidence que cette croissance est linéaire sur la variété Dourado précoce (tableaux 13) ainsi que sur la variété Latsidahy (tableau 14). A chacune des températures, la vitesse de croissance des symptômes ne diffère pas statistiquement pour les différentes concentrations d'inoculum : 3,1 cm/jour, 3,0 et 6,9 à 13°C, 18°C et 23°C pour Dourado précoce et 3,4, 3,2 et 7,7 pour la variété Latsidahy. Pour ces 2 variétés, les vitesses de croissance des symptômes à 13°C et à 18°C ne se différencient pas statistiquement à 95% : F de fisher de 1,38 ($F_{\text{théorique}}$ de 2,25) pour la variété Dourado précoce et de 0,15 ($F_{\text{théorique}}$ de 2,25) pour la variété Latsidahy. Mais ces 2 vitesses diffèrent entre 18°C et 23°C : F de fisher de 47,05 ($F_{\text{théorique}}$ de 2,36) pour la variété Dourado précoce et de 40,46 ($F_{\text{théorique}}$ de 2,36) pour la variété Latsidahy.

Les symptômes ont une croissance linéaire en fonction du temps sur une durée de 4 jours à 23°C et de 9 jours à 18°C et 13°C. Leur vitesse de croissance est indépendante de la quantité de bactéries inoculées mais dépend de la température.

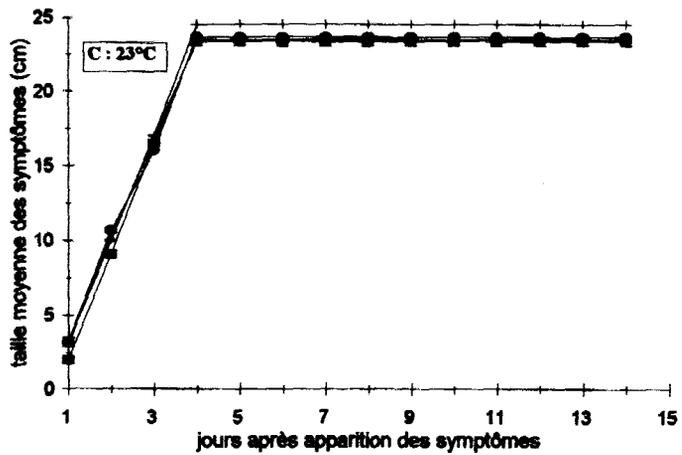
Pour la variété Dourado précoce, l'évolution de la quantité de bactérie au cours du temps dans les symptômes pour une température peut être estimée à partir de la relation entre la taille des symptômes T en fonction du temps t : $T = at+b$, et de la relation entre la quantité de bactéries Qb en fonction de la taille des symptômes : $\log(Qb) = A\log(T)+B$. Il apparaît que la croissance



■ 10 000 ufc/gaine ● 1000 ufc/gaine + 100 ufc/gaine × 10 ufc/gaine



■ 10 000 ufc/gaine ● 1000 ufc/gaine + 100 ufc/gaine × 10 ufc/gaine



■ 10 000 ufc/gaine ● 1000 ufc/gaine + 100 ufc/gaine × 10 ufc/gaine

Figure 8 : évolution au cours du temps de la taille moyenne des symptômes à différentes concentrations d'inoculum pour la variété Dourado précoce inoculée avec l'isolat Sd8.1 à 13°C (A), 18°C (B) et 23°C (C).

Tableau 13. Ajustement linéaire de la taille moyenne des symptômes et le temps sur la variété Dourado précoce inoculée avec l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae* à différentes concentrations d'inoculums.

a. inoculation à 13°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :			
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
coefficient de corrélation	0,99	0,99	0,99	0,99
pente	2,80 ^a	3,13 ^a	3,06 ^a	3,32 ^a
test t de signification	41 ^{2,7} ¹	47,8	15,9	36,5
constante	-1,98	-2,74	-2,59	-2,84

^a : F de fisher de 2,9 pour 3 et 20 degrés de liberté

¹ : t théorique à 5% pour 5 degrés de liberté : 2,57.

b. inoculation à 18°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :			
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
coefficient de corrélation	0,99	0,99	0,99	0,98
pente	2,71 ^a	2,93 ^a	3,05 ^a	3,15 ^a
test t de signification	17,5 ¹	15,2	14,9	15,5
constante	0,86	0,90	0,10	0,34

^a : F de fisher de 0,91 pour 3 et 20 degrés de liberté

¹ : t théorique à 5% pour 5 degrés de liberté : 2,57.

c. inoculation à 23°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :			
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
coefficient de corrélation	0,99	0,99	0,99	0,99
pente	6,70 ^a	7,12 ^a	6,68 ^a	7,19 ^a
test t de signification	83,0 ¹	62,0	20,4	138,4
constante	-3,34	-4,12	-3,30	-5,20

^a : F de fisher de 2,2 pour 3 et 8 degrés de liberté

¹ : t théorique à 5% pour 2 degrés de liberté : 4,30.

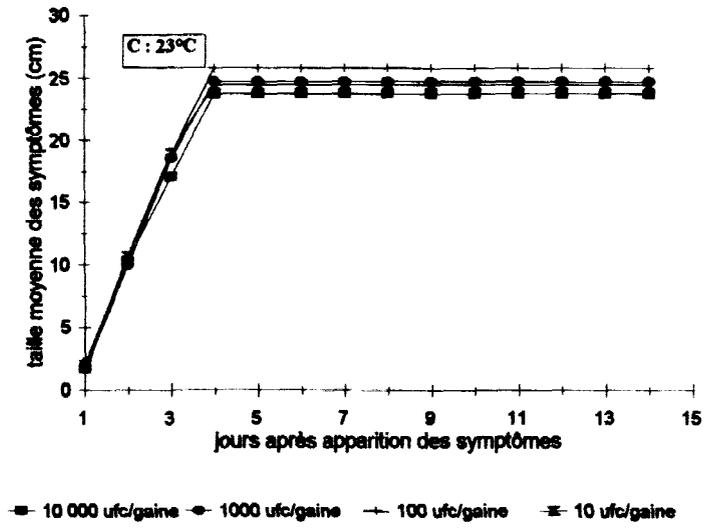
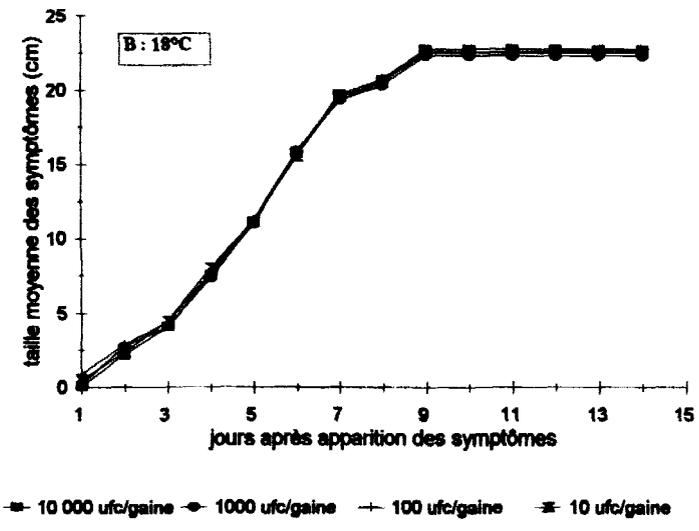
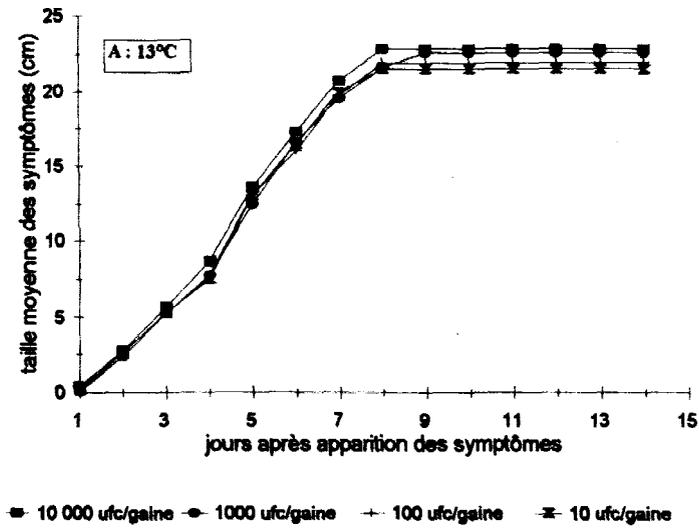


Figure 9 : évolution au cours du temps de la taille moyenne des symptômes à différentes concentrations d'inoculum pour la variété Latsidahy inoculée avec l'isolat Sd8..1 à 13°C (A), 18°C (B) et 23°C (C).

Tableau 14. Ajustement linéaire de la taille moyenne des symptômes et le temps sur la variété Latsidahy inoculée avec l'isolat Sd8.1 de *P. fuscovaginae* à différentes concentrations d'inoculum.

a. inoculation à 13°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :			
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
coefficient de corrélation	0,99	0,99	0,99	0,99
pente	3,38 ^a	3,35 ^a	3,36 ^a	3,49 ^a
test t de signification	17,8 ¹	19,8	20,7	22,6
constante	-4,23	-4,21	-4,29	-4,09

^a : F de fisher de 0,2 pour 3 et 20 degrés de liberté

¹ t théorique à 5% pour 5 degrés de liberté : 2,57.

b. inoculation à 18°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :			
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
coefficient de corrélation	0,99	0,99	0,98	0,99
pente	3,22 ^a	3,15 ^a	3,23 ^a	3,33 ^a
test t de signification	16,5 ¹	14,0	13,9	15,1
constante	-4,05	-3,15	-4,25	-4,63

^a : F de fisher de 0,1 pour 3 et 20 degrés de liberté

¹ t théorique à 5% pour 5 degrés de liberté : 2,57.

c. inoculation à 23°C.

paramètres statistiques	inoculum (ufc/ml) :			
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
coefficient de corrélation	0,99	0,99	0,99	0,99
pente	7,58 ^a	8,14 ^a	7,77 ^a	7,25 ^a
test t de signification	14,0 ¹	22,8	20,5	23,2
constante	-4,84	-6,15	-5,66	-4,88

^a : F de fisher de 0,8 pour 3 et 8 degrés de liberté

¹ : t théorique à 5% pour 2 degrés de liberté : 4,30.

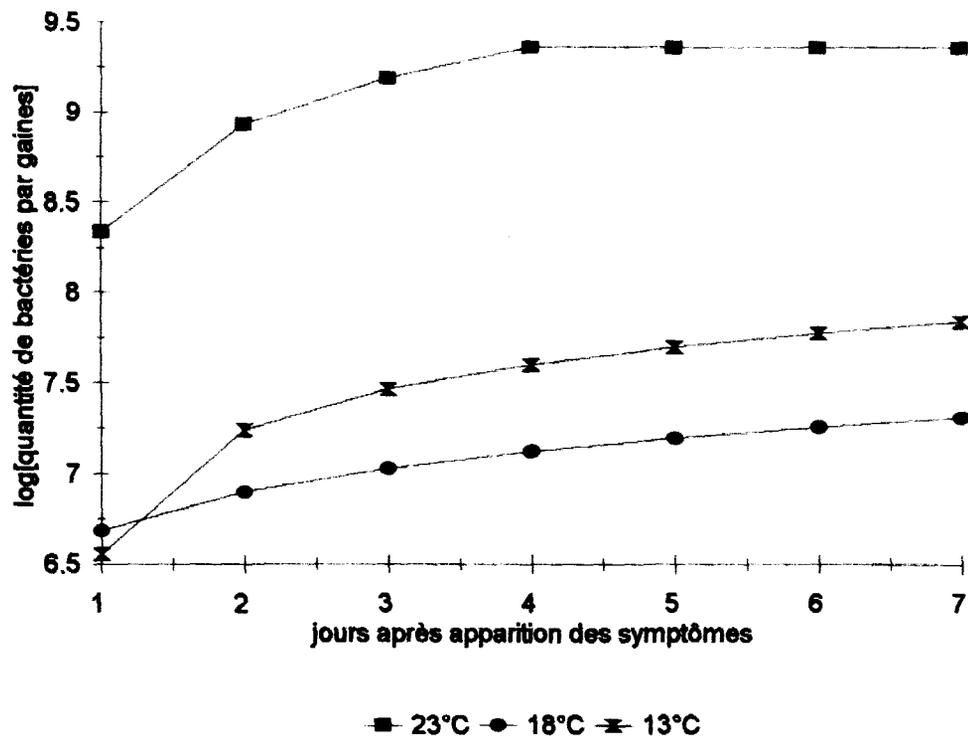


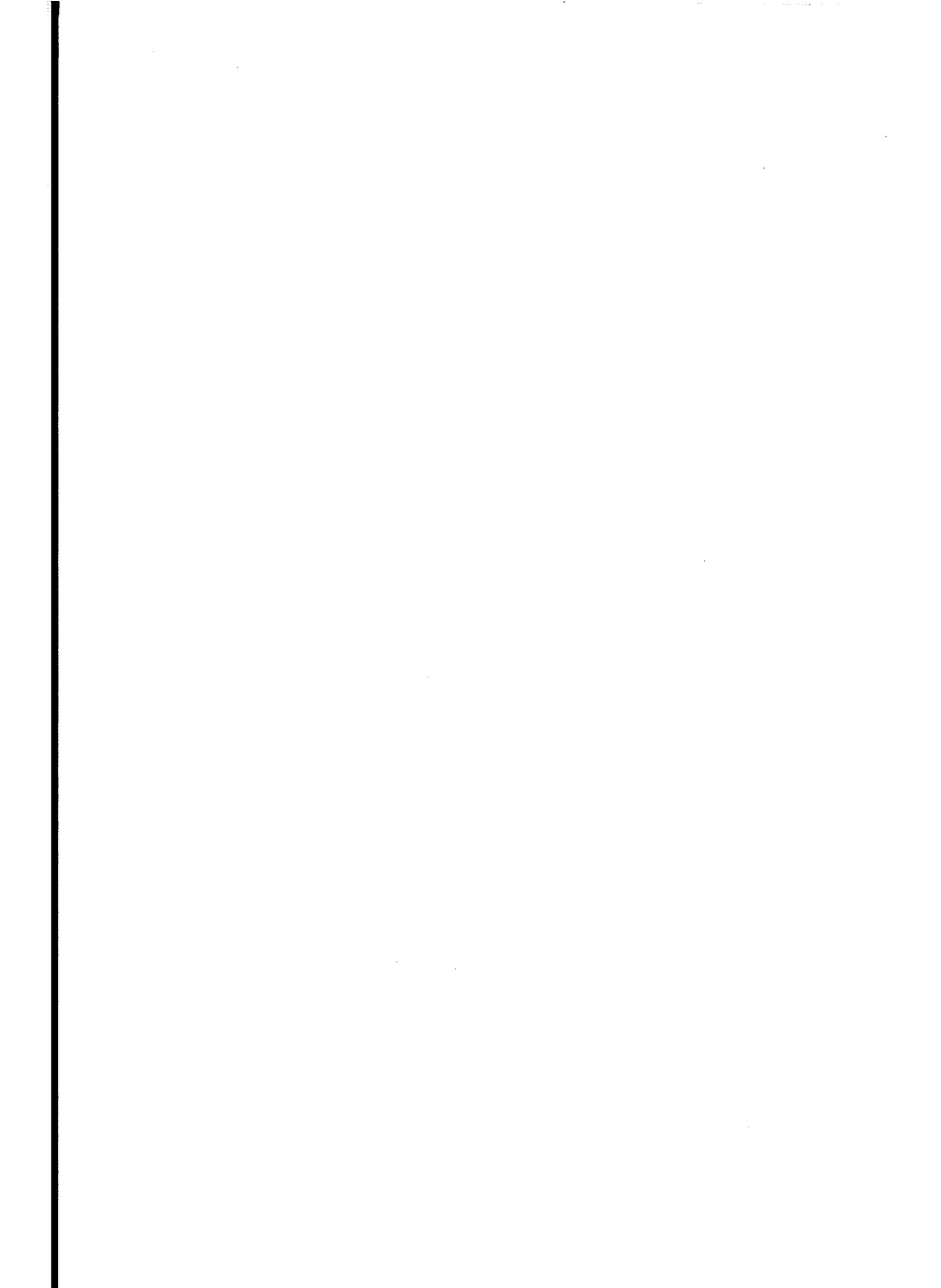
Figure 10 : évolution au cours du temps du logarithme de la quantité de bactéries dans un symptôme estimée pour la variété Dourado précoce à partir de l'évolution au cours du temps de la taille des symptômes et de la quantité de bactéries en fonction de la taille d'un symptôme à 13°C, 18°C, et 23°C

des populations bactériennes reste positive mais diminue au cours du temps après l'apparition des symptômes (figure 10).

4 DISCUSSION

La probabilité de *P. fuscovaginae* d'être pathogène sur riz au stade adulte est dépendante de facteurs liés à l'hôte (organes réceptifs, variétés) et de facteurs environnementaux (température). Nous avons montré dans le précédent chapitre que les processus de l'expression du pouvoir pathogène de *P. fuscovaginae* pouvaient être décrit par l'hypothèse de l'action indépendante à 18°C. Rappelons que cette hypothèse postule que chaque cellule bactérienne possède une probabilité de se multiplier *in planta* qui est indépendante de la quantité de bactéries inoculées. L'augmentation linéaire du probit de la fréquence de gaines malades en fonction du logarithme de la dose d'inoculum à 13°C et 23°C met en évidence que cette hypothèse permet de décrire le pouvoir pathogène de *P. fuscovaginae* quelle que soit la température. Par contre, une variation de la probabilité de se multiplier est mise évidence en fonction de la température. En effet, il apparaît pour les deux variétés Dourado précoce et Latsidahy que la dose d'inoculum nécessaire pour 50% de gaines malades augmente avec la diminution des températures.

Les résultats obtenus sur l'évolution *in planta* des populations de *P. fuscovaginae* mettent en évidence des dynamiques différant en fonction de la température. A 23°C, nous avons montré pour les doses d'inoculum supérieures à 10³ bactéries par gaine que la quantité de bactéries 2 jours après l'inoculation et le temps d'incubation sont constants. Il apparaît donc que l'augmentation de la quantité d'inoculum au-delà de 10³ bactéries ne modifie pas l'évolution des populations. Des facteurs agissent donc lors l'inoculation en limitant la quantité de bactéries capables de produire une population. La faible diminution du taux de croissance *in planta* par rapport au taux *in vitro* (37%) et l'homogénéité des échantillons de gaine pour la quantité de bactéries mettent en évidence qu'à cette température la multiplication *in planta* n'est pas un facteur limitant à l'évolution des populations bactériennes. On peut donc émettre l'hypothèse qu'à 23°C l'évolution des populations bactériennes *in planta* suit le modèle deux étapes qui postule une étape d'accrochage sur des sites réceptifs suivie d'une étape de multiplication. Cette

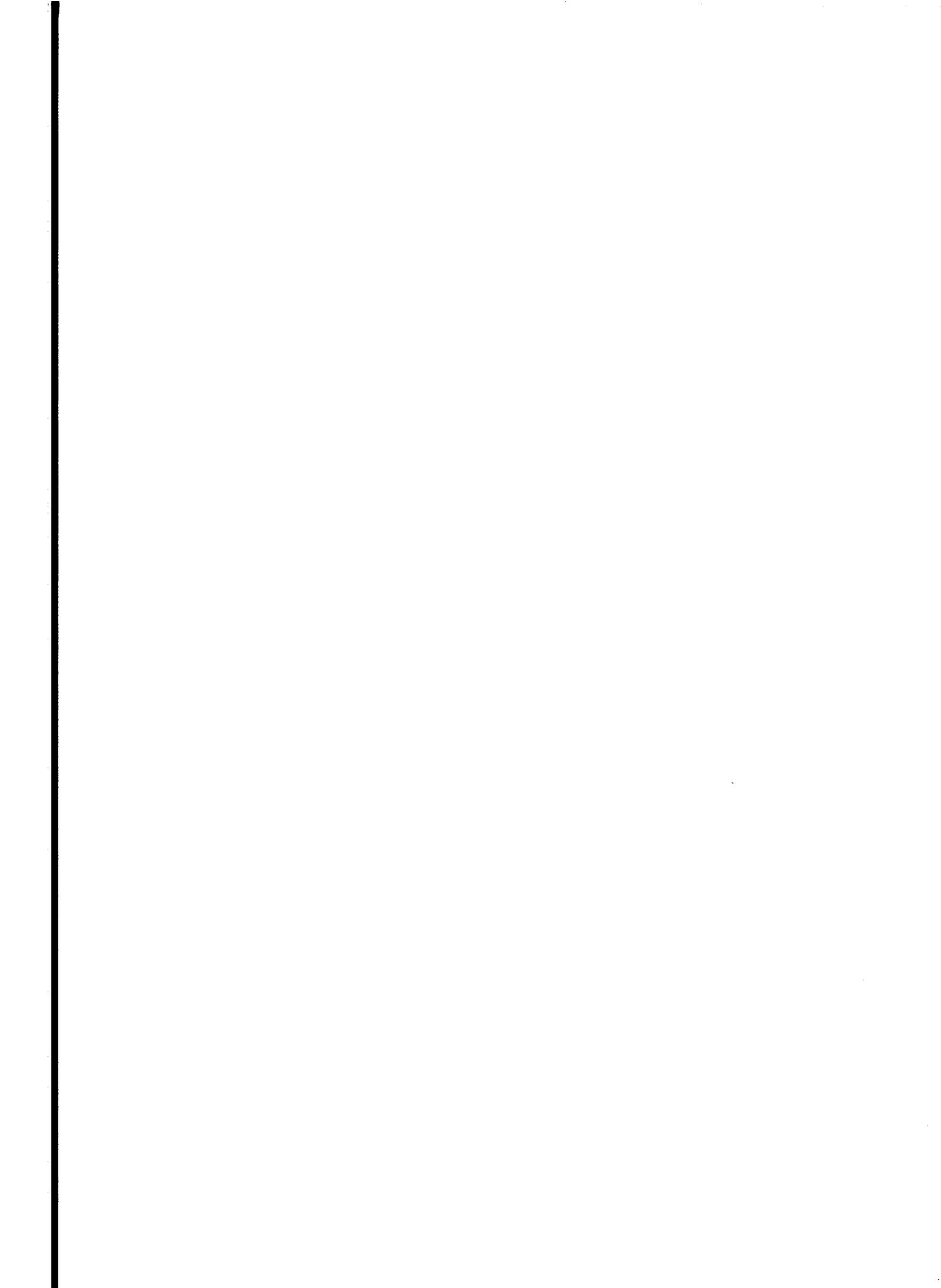


hypothèse implique qu'à cette température le nombre de site de colonisation est le principal facteur limitant. Cette hypothèse est confirmée par une stabilisation du temps d'incubation à partir de la dose d'inoculum de 10^3 bactéries par gaine.

A 18°C et 13°C nous avons mis en évidence une forte hétérogénéité de la quantité de bactéries pour les échantillons de gaine et une augmentation de cette variabilité d'échantillonnage au cours du temps. A ces températures, la croissance *in planta* est donc soumise à des facteurs limitants qui agissent constamment sur l'évolution des populations bactériennes. La dynamique de ces populations suit donc le modèle de croissance. Nous avons montré *in vitro* que la température est un facteur limitant de la croissance bactérienne. Mais alors que la diminution du taux de croissance est de 27% entre 23°C et 18°C et de 41% entre 23°C et 13°C *in vitro*, elle est de, respectivement, 60% et 74% *in vivo*. La multiplication *in planta* est donc limitée aussi à 13°C et 18°C par des facteurs autres que la température. Cette hypothèse est confirmée par une diminution linéaire du temps d'incubation en fonction de la dose d'inoculum.

Des études cytologiques de l'interaction *P. fuscovaginae*/riz ont permis de décrire les différentes étapes de la colonisation des tissus de l'hôte par le pathogène (Miyajima, 1983). Lors des premières phases de cette colonisation, des groupes de cellules bactériennes sont observés transitoirement sur l'épiderme de la face interne de la gaine paniculaire. Les bactéries pénètrent les tissus par les stomates ouverts pour ensuite se multiplier dans la chambre sous-stomatique. Lors de l'apparition des symptômes, les bactéries ont gagné les espaces inter-cellulaires du parenchyme sous-stomatique et de l'aerenchyme lysigène dans lesquels d'importantes populations bactériennes sont observées. Il existe donc deux sites de multiplication lors de l'installation du pathogène sur l'hôte : d'une part l'épiderme et d'autre part les chambres sous-stomatiques, ces derniers apparaissant nécessaire pour l'expression de la pathogénie. L'application de basses températures (entre 18°C et 12°C) au riz aux stades adultes induit des modifications de sa physiologie et une fermeture des stomates consécutive à l'arrêt de la respiration et de la photosynthèse (Kishitani & Tsunoda, 1974) alors qu'en température optimale les stomates de la face interne de la gaine paniculaire sont constamment ouverts (Miyajima, 1983).

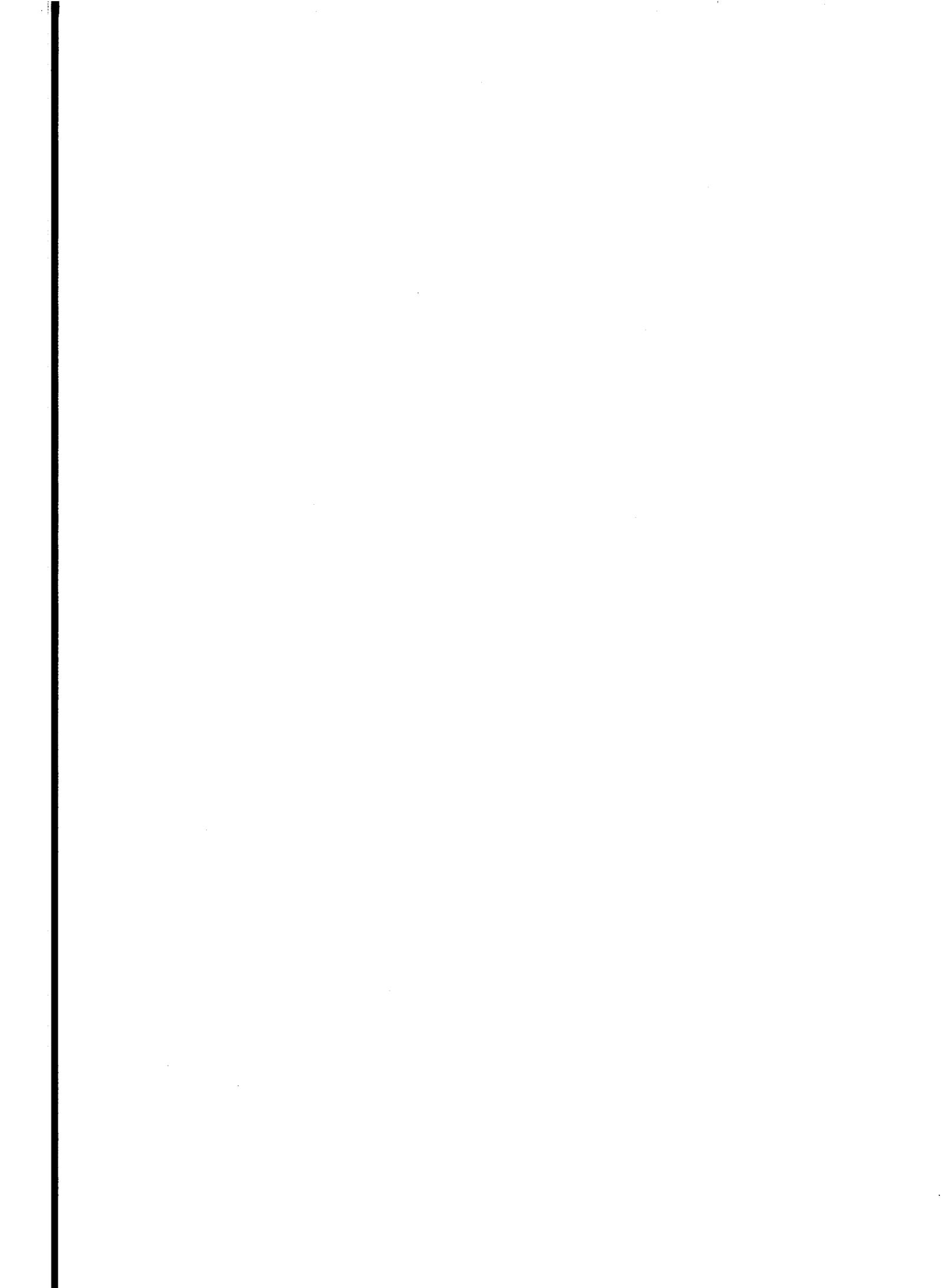
Le modèle deux étapes mis en évidence à 23°C peut être expliqué par le nombre limité de stomates sur la face interne de la gaine paniculaire. Cette densité stomatique permet aussi d'expliquer la plus grande réceptivité de cette gaine par rapport aux gaines inférieures sur lesquelles il a été montré que la densité stomatiques est inférieure (Miyajima, 1983). A 13°C et



18°C, deux phénomènes peuvent expliquer la dynamique des populations bactériennes *in planta* : d'une part la faible proportion de stomates ouverts conduit à un maintien des populations sur l'épiderme de la gaine et d'autre part les populations ayant colonisé les chambres sous-stomatiques présentent de faibles taux de multiplication imputables aux désordres physiologiques de l'hôte modifiant les nutriments disponibles pour le pathogène.

A l'issue du temps d'incubation, c'est au seuil de 10^6 bactéries par gaine à 13°C et 18°C et de 3.10^7 bactéries à 23°C que les populations bactériennes induisent l'apparition des symptômes de pourriture. L'existence d'un seuil de population pour l'induction de symptôme a été mise en évidence dans d'autres interactions compatibles en conditions contrôlées pour *X. campestris* pv. *campestris*, pv. *oryzae*, et pv. *poae* sur leurs hôtes respectifs à 10^6 bactéries par centimètre de feuille (Robinson & Callow, 1986) et *E. amylovora* sur arbre fruitier entre 10^5 et 10^6 bactéries par fleur, mais aussi au champ pour *P. syringae* pv. *syringae* sur haricot à 10^4 bactéries par gramme de feuille (Hirano & Upper, 1983). Dans la plupart des interactions entre des bactéries phytopathogènes et leur hôte des métabolites secondaires phytotoxique sont produits par le pathogène durant les processus d'infection (Bashan, 1987). Rappelons qu'il a été démontré que *Pseudomonas fuscovaginae* produit *in vitro* un métabolite secondaire phytotoxique, la syringotoxine, produite également par *P. syringae* pv. *syringae* (Pelsser *et al.*, 1992). L'injection dans les gaines de riz de la toxine purifiée occasionne des symptômes identiques à ceux produits par le pathogène. Dans l'interaction *P. fuscovaginae*/riz, nous avons mis en évidence que le seuil d'apparition des symptômes et la quantité de bactéries par symptôme étaient supérieurs à température moyenne (23°C) qu'à basse température (13°C et 18°C). Deux hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer la signification biologique de ce seuil. Il a été montré que les désordres physiologiques causés par les basses températures conduisent à une libération des sucres solubles par la plante (In-Keum & Tsunoda, 1979), l'augmentation de ces sucres pourrait activer la synthèse de toxine comme cela a été montré chez *P. syringae* pv. *syringae* (Gross, 1991). Mais ces désordres pourraient aussi augmenter la sensibilité de l'hôte à la toxine et donc diminuer le seuil de toxicité de la toxine. Cette augmentation de la sensibilité de l'hôte avec la diminution de la température pourrait être mesurée par injection du riz avec la toxine purifiée.

L'estimation de l'évolution de la quantité de bactéries au cours du temps dans une gaine malade met en évidence que la croissance du symptôme a lieu en fin de phase exponentielle à 23°C et



durant la phase stationnaire à 18°C et 13°C. Malgré l'identité de la toxine produite, il apparaîtrait donc des différences entre *P. fuscovaginae* et *P. syringae* pv. *syringae* quant à son rôle *in planta*. En effet, la syringotoxine serait produite en fin de phase de croissance des populations dans l'interaction entre *P. fuscovaginae* et le riz. Elle ne semblerait, donc, pas contribuer à la croissance du pathogène. L'hypothèse d'un délai entre la production de toxine et l'apparition des symptômes apparaît contradictoire avec la croissance linéaire des symptômes. En effet, l'existence d'un délai conduirait à une croissance des symptômes exponentielle en fonction du temps. Par contre, on peut émettre l'hypothèse que la production de la syringotoxine permettrait le maintien des populations du pathogène dans l'hôte d'une part par la libération de substrat issu des cellules de l'hôte et d'autre part par la protection contre d'autres pathogènes ou opportunistes conférée par l'activité anti-microbienne de la toxine (Gross, 1991). Une étude chez *P. fuscovaginae* des systèmes de régulation de la syringotoxine permettrait d'approfondir le rôle joué par cette toxine dans la pathogénie.

La comparaison de la variété Latsidahy avec la variété Dourado précoce ne met pas en évidence de différence pour les facteurs étudiés : fréquence de malades en fonction de la dose d'inoculum, temps d'incubation, seuil de quantité de bactéries pour la production de symptôme et vitesse de croissance des symptômes, et cela quelle que soit la température. Nous avons donc montré que les processus de l'expression de pouvoir pathogène sont identiques entre ces deux variétés. Parmi les interactions compatibles entre des bactéries phytopathogènes et leur hôte, la résistance de l'hôte s'exprime par une diminution de la multiplication *in planta*. Cette diminution a été mise en évidence pour *P. solanacearum* sur tomate et pomme de terre (Bowman & Sequeira, 1981 ; Lum & Kelmann, 1981), pour *X. campestris* pv. *oryzae* sur riz (Mew *et al.*, 1982), et pour *X. campestris* pv. *pruni* sur pêcher (Civerolo, 1975). De plus, la comparaison de l'évolution des populations bactériennes sur différentes variétés a mis en évidence dans les interactions *X. campestris* pv. *phaseoli*/haricot (Ishimaru *et al.*, 1991), *P. syringae* pv. *syringae*/cerisier et haricot, pv. *glycinea*/soja (Hirano & Upper, 1983) que la résistance variétale réside dans une diminution de la croissance du pathogène sur l'hôte. Nous avons mis en évidence dans le précédent chapitre des interactions spécifiques isolats/variétés à 18°C pour certains isolats de *P. fuscovaginae*. On pourrait donc émettre l'hypothèse qu'une partie de la tolérance de la variété Latsidahy s'expliquerait par une diminution du taux de multiplication *in planta* de ces isolats.

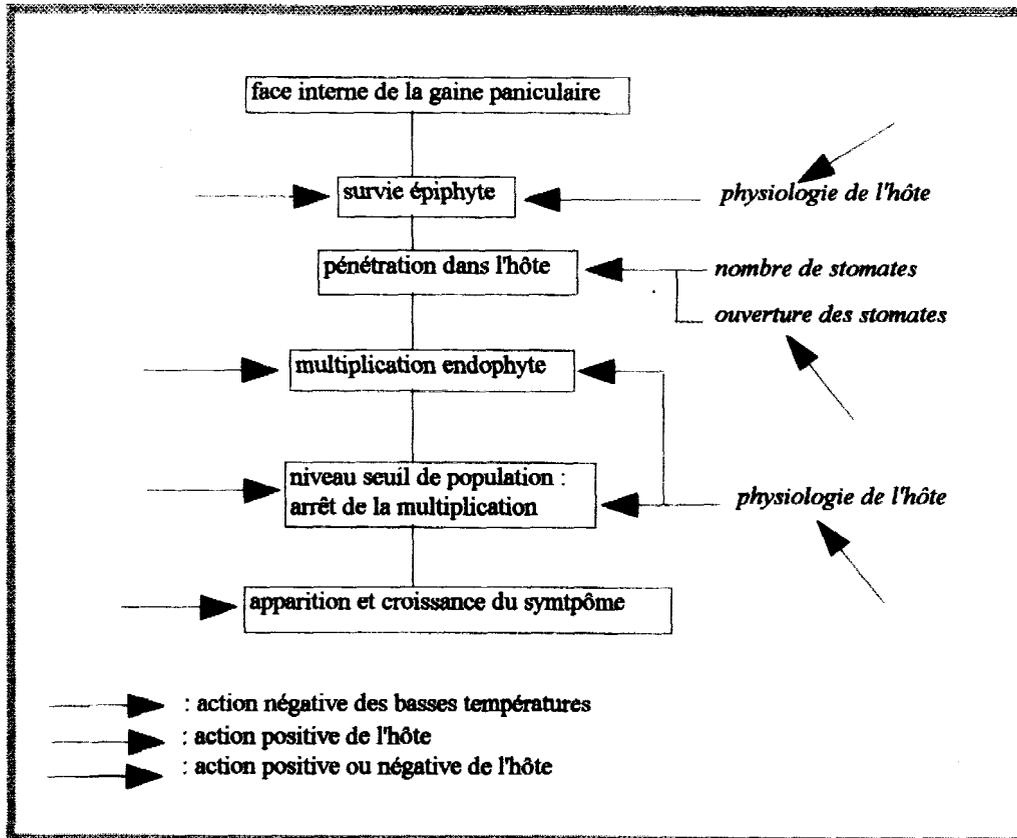
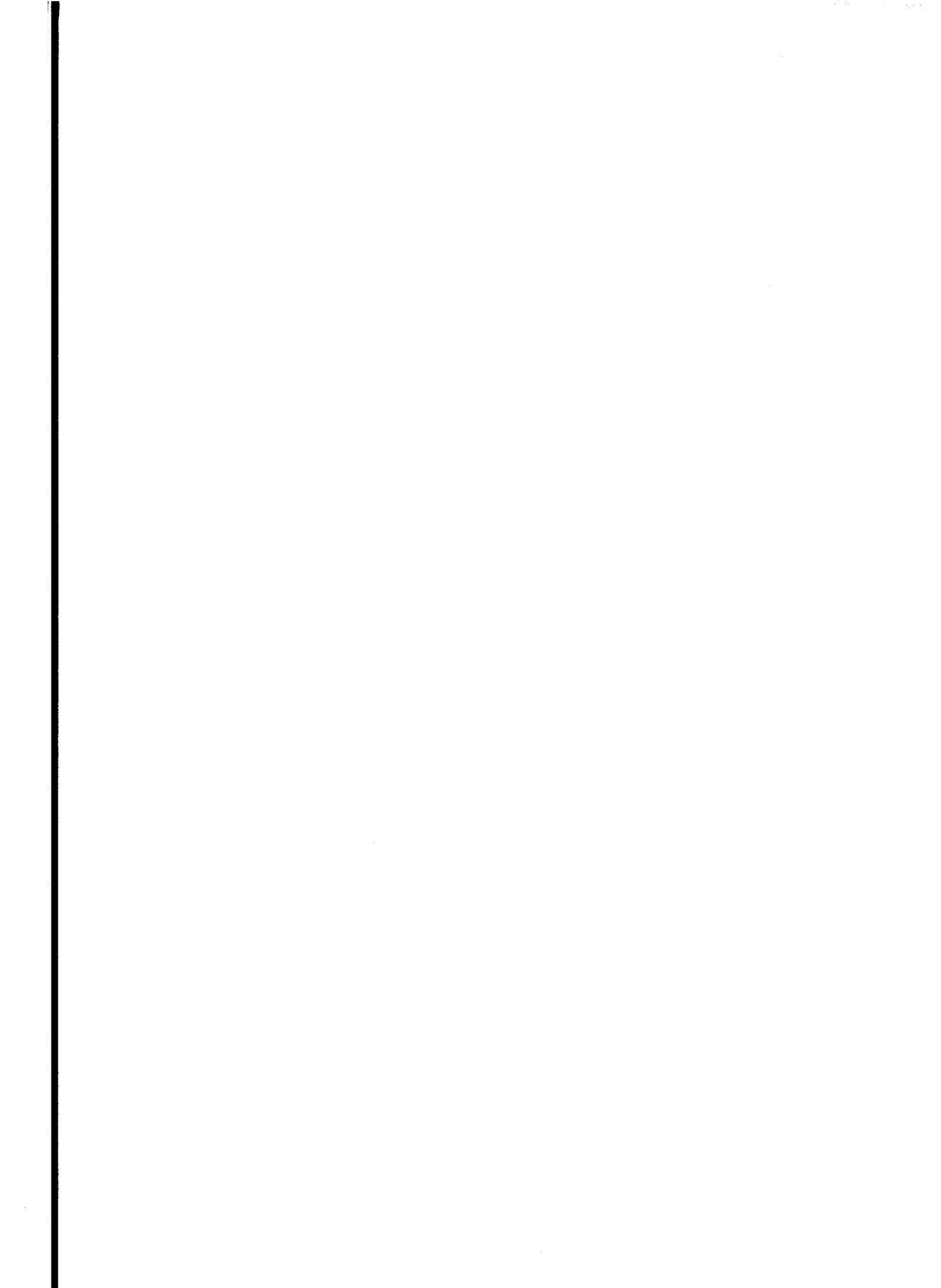


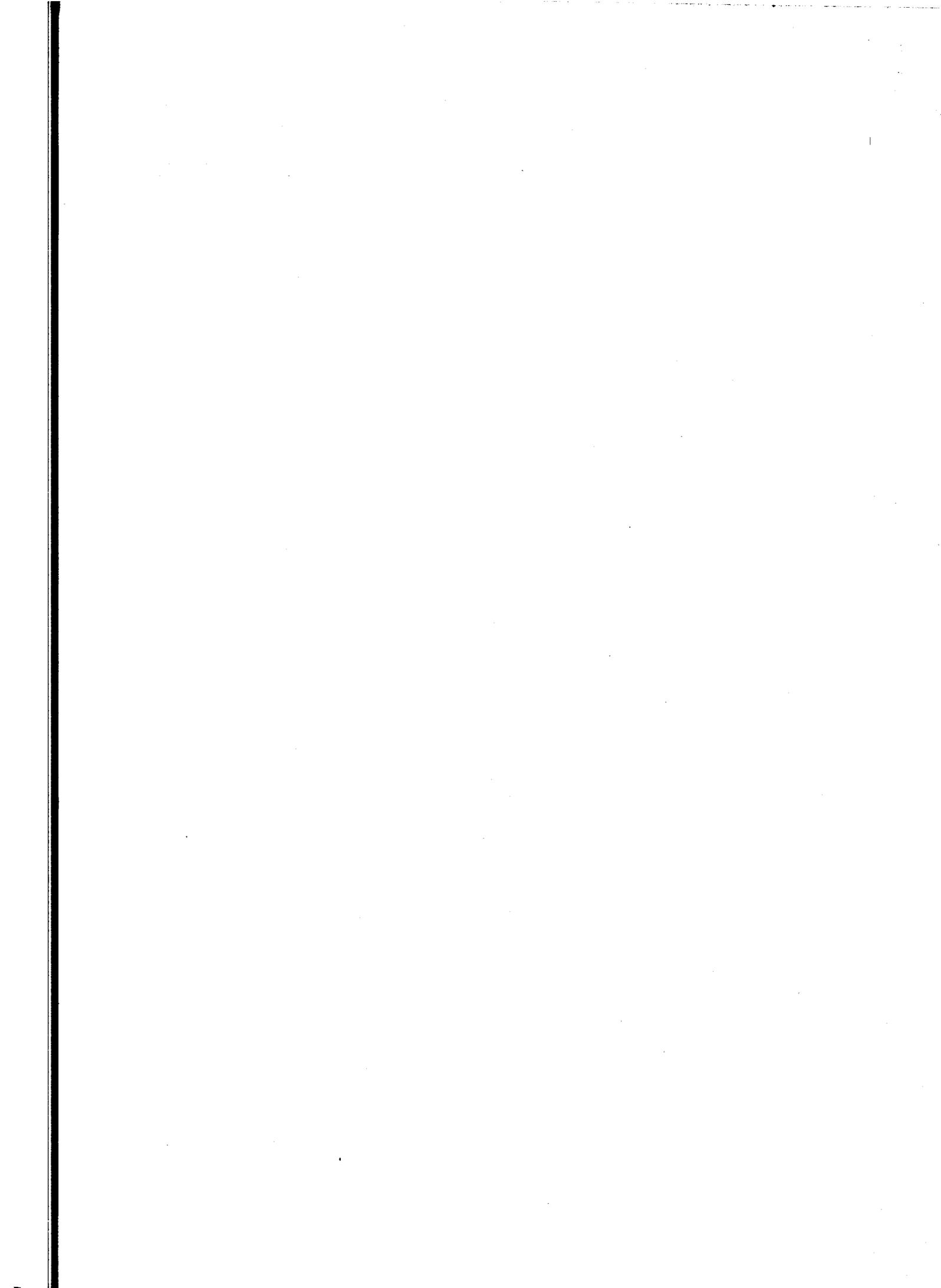
Schéma des processus d'expression du pouvoir pathogène de *P. fuscovaginae* et des facteurs les limitant.

L'étude de l'évolution des populations *in planta* des isolats présentant des interactions spécifiques serait nécessaire afin de confirmer cette hypothèse.

Nos résultats nous permettent donc de conclure que les basses températures diminuent la probabilité de *P. fuscovaginae* se multiplier *in planta* en agissant négativement sur les différents paramètres du processus de pathogénie : pénétration dans les tissus de l'hôte, taux de multiplication épiphyte et endophyte, vitesse de croissance des symptômes (schéma ci-contre). Ces conclusions apparaissent en contradiction avec les données épidémiologiques qui mettent en évidence une augmentation de l'incidence de la maladie avec l'abaissement des températures. Il est donc nécessaire d'envisager que cette augmentation ne soit pas directement liée aux basses températures au champ. Le chapitre suivant permettra d'émettre des hypothèses quant au rôle joué par les basses températures dans l'épidémiologie de la pourriture des gaines.



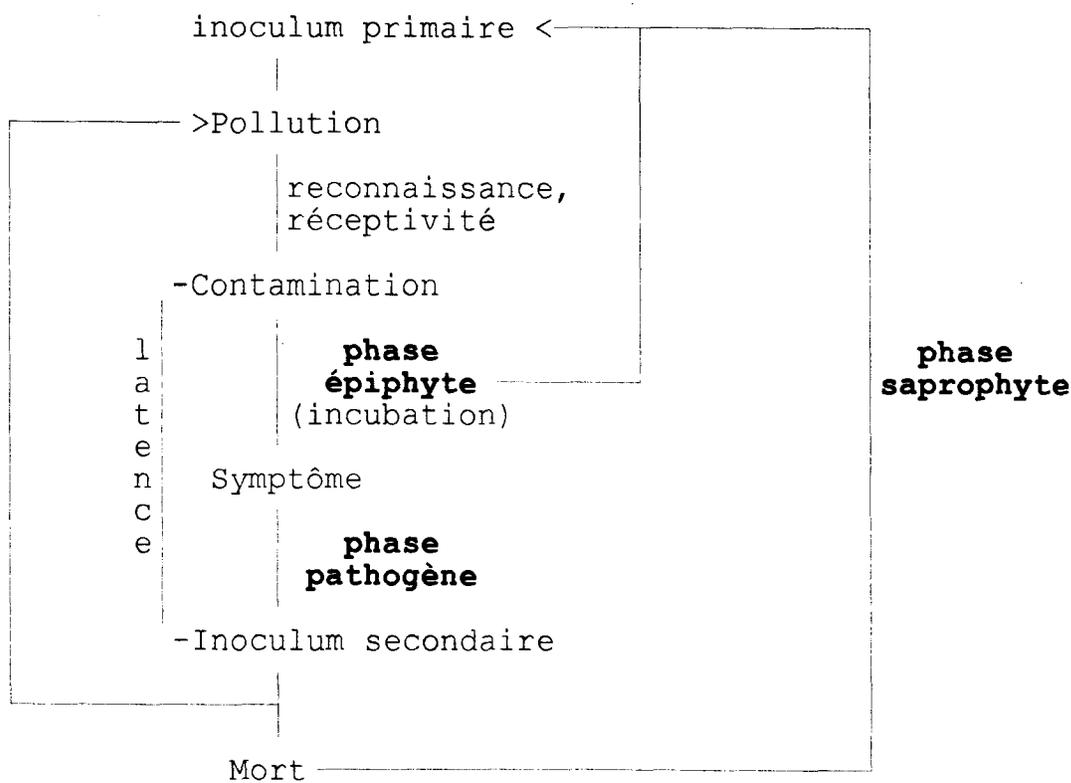
CHAPITRE III
EPIDEMIOLOGIE DE LA POURRITURE DES GAINES



1 INTRODUCTION

Les différentes études portant sur l'épidémiologie des pourritures de gaines dues à *Pseudomonas fuscovaginae* ont porté essentiellement sur les sources d'inoculum primaires : semences, résidus de récoltes, hôtes alternatifs (Détry, 1994 ; Ntibishimirwa, 1991 ; Goto *et al.*, 1988 ; Miyajima 1983). Mais pour l'interaction *Pseudomonas fuscovaginae/Oryza sativa*, les implications des différentes étapes du cycle de base (figure 1) sur la dynamique dans le temps et l'espace de la maladie demeurent en grande partie mal connues. Le chapitre précédent nous a permis d'analyser en conditions contrôlées les phases épiphyte et pathogène du cycle de base ainsi que les facteurs les modulant. La répétition au cours du temps du cycle de base constitue l'aspect essentiel de l'épidémie (Rapilly, 1991). Deux grandes classes d'épidémies sont distinguées en fonction de cette répétition : les épidémies monocycliques au cours desquelles le cycle de base ne se déroule qu'une fois durant le cycle de l'hôte et les épidémies polycycliques au cours desquelles le cycle de base se répète plusieurs fois (Van der Plank, 1963). La répétition du cycle de base est conditionnée par la potentialité d'action de l'inoculum secondaire produit à l'issue de l'infection primaire. Cette potentialité d'actions dépend de 2 facteurs principaux : la réceptivité de la population hôte et la dissémination de l'inoculum secondaire (Populer, 1978 ; Rapilly, 1991). La réceptivité de la population hôte peut déterminer la potentialité d'action de l'inoculum secondaire par la durée de cette réceptivité, c'est le cas du charbon nu des céréales causé par *Ustilago nuda* ou par son absence durant la production de l'inoculum secondaire cas de la carie du blé causée par *Tilletia carie* (Rapilly, 1991). La dissémination de l'inoculum est dépendante de facteurs climatiques mais aussi physiques notamment dans le cas des pathogènes du sol (Pfender, 1982). Il apparaît donc que pour le poids de chaque type d'inoculum diffère pour les deux classes d'épidémies : les épidémies monocycliques sont régies par l'inoculum primaire alors que les épidémies polycycliques dépendent essentiellement de l'inoculum secondaire. Si l'on postule une quantité constante de l'inoculum primaire durant le cycle de l'hôte, l'évolution au cours du temps de la quantité de maladie est décrite selon une loi à intérêt simple pour les épidémies monocycliques alors que pour les épidémies polycycliques, cette évolution est décrite selon une loi à intérêt composé par l'augmentation de la quantité de l'inoculum au cours du temps (Rapilly, 1991 ; Van der Plank, 1963).

Figure 1. Le cycle épidémique de base des bactéries phytopathogènes de la surface foliaire (phyllosphère) (adapté d'après Rappilly, 1992) :



Dans le cadre de notre étude sur la pourriture des gaines à Madagascar, nous tenterons de décrire l'épidémiologie de la maladie et d'évaluer le rôle des conditions climatiques et de réceptivité de l'hôte. L'analyse de ces différents facteurs a pour objet de comprendre la distribution de la pourriture brune des gaines causée *Pseudomonas fuscovaginae* dans les zones d'altitude malgré l'action défavorable des basses températures sur l'expression de son pouvoir pathogène (cf chapitre II).

2 MATERIEL ET METHODE

2.1 Matériel

Les 4 variétés utilisées dans cette étude sont originaires de Madagascar et cultivées en riziculture irriguée. Les variétés Latsidahy, Tokambana et Latsika B sont cultivées aux altitudes supérieures à 1600 mètres et la variété Rojofotsy 1285 en moyenne altitude (1000 mètres) (Déchanet *et al.*, 1990).

L'analyse génétique de ces variétés par une étude isozymique (Rabary *et al.*, 1989) permet de classer les 3 variétés cultivées en haute altitude dans la sous-espèce *japonica* d'*Oryza sativa*. Alors que la variété Rojofotsy 1285 se classe dans un groupe enzymatique typique des cultivars de Madagascar intermédiaire entre les sous-espèces *indica* et *japonica*, mais plus proche des *indica* (12% de divergence nucléotidique) que des *japonica* (40% de divergence nucléotidique). L'appartenance des variétés Latsidahy, Latsika B et Tokambana à la sous-espèce *japonica* des riz des zones tempérées est une nouvelle preuve de l'adaptation de ce groupe aux basses températures en haute altitude à Madagascar. Ces variétés sont utilisées dans notre étude comme témoins adaptés à la riziculture irriguée d'altitude. La variété Rojofotsy 1285 *indica* génétiquement intermédiaire et bien que cultivée jusqu'à 1200 mètres d'altitude n'apparaît pas adaptée pour les conditions de haute altitude (Déchanet *et al.*, 1990), nous l'avons utilisée dans notre étude comme témoin sensible aux basses températures.

Tableaux 1.

a. Caractéristiques des essais mis en place durant les campagnes rizicoles 1991/92, 1992/93 et 1993/94 à Madagascar.

Année	Localité	Variété	densité de repiquage ¹	nombre de parcelles	nombre de plants par parcelle
1992	Sambaina, Soanindrariny	Latsika B, traitement de semences	20 x 20	3	200
1993	Mahitsy, Sambaina, Vinaninony	Latsidahy, Rojofotsy	20 x 20	3	3000
1994	Sambaina	Latsidahy, Rojofotsy	10 x 20	3	1800
		Latsidahy, Rojofotsy	20 x 40	1	450
		Latsidahy, Rojofotsy, Tokambana	20 x 20	2	2000

¹ : densité de repiquage en centimètre.

b. Date de semis et de repiquage des différents essais mis en place à Sambaina durant la campagne rizicole 1993/1994.

densité de repiquage	date de semis	date de repiquage
10 x 20	22/09/93	15/11/93
10 x 20	02/10/93	25/11/93
10 x 20	13/10/93	06/12/93
20 x 40	22/09/93	15/11/93
20 x 20	14/10/93	06/12/93

2.2 Méthode

2.2.1 Méthodes culturales et essais mis en place

Méthodes culturales. Les parcelles sont labourées et affinées manuellement à sec, puis sont mises en eau et nivelée. Lorsque c'est utile, les semences sont traitées 24 heures à l'hypochlorite de calcium à 2,5 g/l par trempage. Le riz est semé en pépinière à la volée. Après croissance, les plantules sont repiquées individuellement et non en poquets. Les plants sont fertilisés en pépinière après semis à la dose de 60 Kg/ha d'azote sous forme d'urée, 60 Kg/ha de potasse sous forme de KCl et 60 Kg/ha de phosphate (Hyper Reno). Ils sont de nouveau fertilisés après repiquage aux doses de 45-60-60 de NPK. Durant la croissance du riz, les parcelles sont désherbées régulièrement.

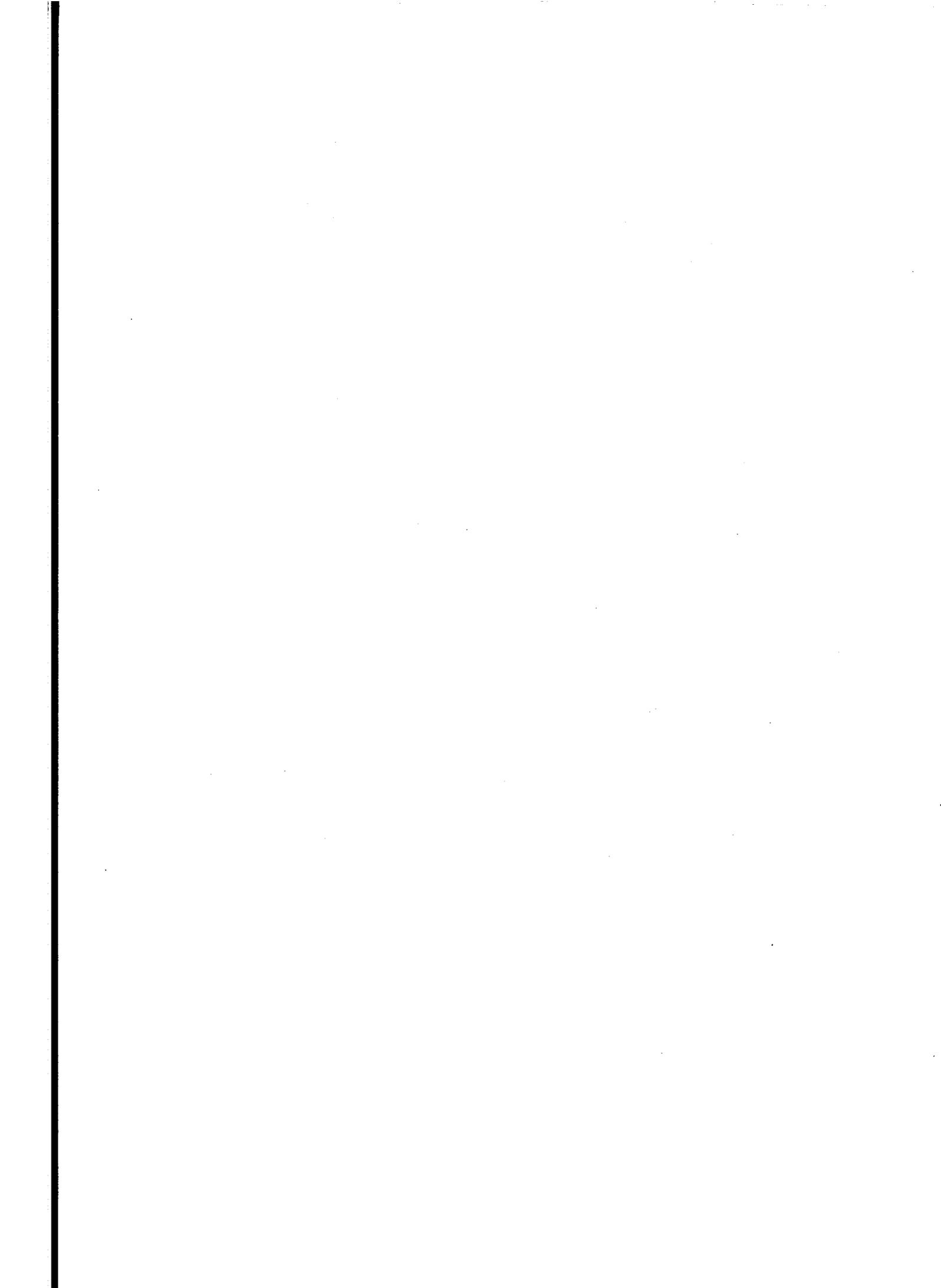
Mise en place des Essais. Les caractéristiques des essais sont décrites dans les tableaux 1. Durant la campagne rizicole 1992/1991, un traitement de semence est testé sur la variété Latsika B à 2 localités à Sambaina (1650 mètres) et Soanindrariny (1850 mètres).

Durant la campagne rizicole 1992/1993, les 2 variétés Latsidahy et Rojofotsy 1285 sont étudiées dans des rizières situées à 3 altitudes différentes : Mahitsy (1250 mètres), Sambaina (1650 mètres) et Vinaninony (1875 mètres).

Durant la campagne rizicole 1993/1994, les variétés Latsidahy, Rojofotsy 1285 et Tokambana ont été mises en place à Sambaina. Pour les variétés Latsidahy et Rojofotsy, 2 types d'essai ont été étudiés. Le premier a pour objet de faire varier dans le temps l'apparition des stades gonflement et épiaison. Le passage de la phase végétative à la phase reproductrice étant dépendante de la somme des degré-jours (cf Introduction Générale), l'échelonnement des dates de repiquage permet de faire varier l'apparition des stades réceptifs entre les plants. D'autre part, la densité de repiquage permet par son effet sur le tallage (cf Introduction Générale) de faire varier l'apparition des stades réceptifs au sein d'un plant. Le second type d'essai a pour objet d'étudier les variétés en culture normale. La variété Tokambana est étudiée uniquement dans le second type d'essai.

2.2.2 Modèle d'échantillonnage

Le modèle choisi est celui de l'échantillonnage aléatoire stratifié : toute la population d'une parcelle est divisée en secteurs ne se recouvrant pas, égaux et indépendants (Delp *et al.*,



1986a et b). Chaque secteur contient n unités d'échantillonnage choisies au hasard. La taille de l'échantillon n est égale à l'intensité de l'échantillon divisé par le nombre de secteurs.

Par ce modèle d'échantillonnage toutes les plantes de la parcelle ont la même probabilité d'être observées. Il a été montré que cette propriété permet de réduire les erreurs d'estimation de l'incidence et ceci particulièrement lorsqu'il existe une distribution agrégative de la maladie.

2.2.3 Mesure de l'incidence

L'incidence est la proportion de tiges présentant un symptôme de pourriture sur la gaine paniculaire (Seem, 1984).

2.2.4 Distribution spatiale de la maladie

Le but de cette mesure est de déterminer si les plants malades se distribuent aléatoirement ou non dans une parcelle. Cette mesure est basée sur la comparaison du nombre de plants malades de chaque secteur avec la moyenne de la parcelle (Delp *et al.*, 1986a). Pour cette comparaison la moyenne de la parcelle (m) et la variance de cette moyenne (s^2) sont calculées.

Le degré d'agrégation est estimé par l'indice de Lloyd (IL). La formule de cet indice est :

$$IL = [m + (s^2/m) - 1]/m .$$

Le type de distribution spatiale peut être déduite de la valeur de cet indice :

IL < 1 : distribution uniforme,

IL = 1 : distribution aléatoire,

IL > 1 : distribution agrégative.

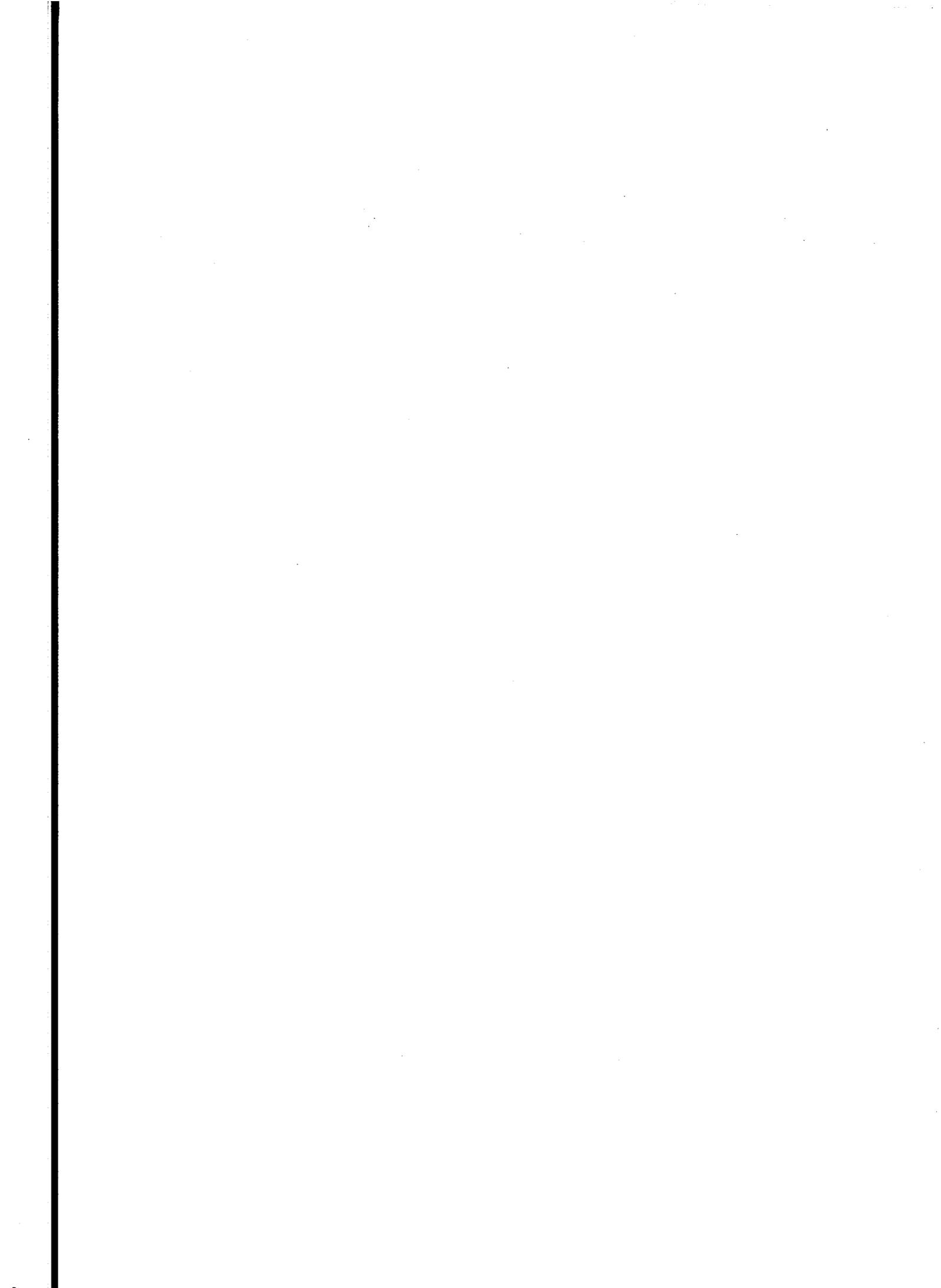
Cet indice implique que la distribution est aléatoire lorsque le ratio de la variance à la moyenne est égal à l'unité. Il suppose donc que la distribution aléatoire suit une loi de Poisson. Il est possible de tester statistiquement cette loi par un test du χ^2 de Cochran (Dagnèlie, 1975) avec :

$$\chi^2_{obs} = (n-1).s^2/m$$

avec n le nombre de secteurs. Ce χ^2_{obs} devant être compris entre $\chi^2_{\alpha/2}$ et $\chi^2_{1-\alpha/2}$.

2.2.5 Recherche de bactéries pathogènes dans le milieu

Durant la campagne rizicole 1993/1994, 15 échantillons d'eau, 15 de terres et 38 de gaines paniculaires saines au stade gonflement provenant de Sambaina sont analysés au laboratoire de phytopathologie de la station rizicole du FO.FI.FA.



La terre et l'eau de rizière sont prélevées dans des tubes stériles. L'eau (50 µl) est étalée directement sur 3 boîtes par échantillons de King B semi-sélectif. La terre est lavée dans 2 ml d'eau distillée stérile. Après décantation, 50 µl du surnageant sont étalés sur 3 boîtes par échantillons de King B semi-sélectif (Rott *et al.*, 1989a).

Les prélèvements sur gaines paniculaires saines sont pratiqués à l'aide d'un écouvillon de prélèvement stérile introduit à l'intérieur de la gaine des talles au stade gonflement. Les prélèvements sont étalés directement sur 3 boîtes par échantillons de King B semi-sélectif. Après 5 jours de croissance à température ambiante, les différents types de colonies bactériennes présentes sont isolées individuellement jusqu'à obtention de colonies pures.

Les différents isolats sont alors inoculés à 10^8 ufc/ml à la seringue sur des plantules de 1 mois de la variété Makalioka 34. Les isolats pathogènes sur riz au stade plantule ainsi que l'isolat Sd8.1 de *Pseudomonas fuscovaginae* sont inoculés selon le protocole décrit précédemment (chapitre I, 2.4.4) sur 5 plants adultes de la variété Dourado précoce au stade gonflement à 10^4 et 10^8 bactéries par gaines paniculaire. Les plants sont observés après une semaine à 18°C jour/nuit, 80% d'humidité relative et 12 heures de jour.

2.2.6 Traitement de semence

2.2.6.1 Au champ

Durant la campagne rizicole 1991/1992 la variété Latsika B est testée pour la transmission de *Pseudomonas fuscovaginae* par les semences. Des semences présentant des pourritures ont été récoltées en fin de campagne 1991 dans la localité de Vinaninony (1875 mètres). Ces semences sont traitées à l'hypochlorite de calcium à 10 g/l par trempage 24 heures avant le semis. Un lot de semences traitées et un lot témoin sont semés dans les localités de Sambaina (1650 mètres) et Soanindrariny (1850 mètres) en 3 répétitions. Les pépinières et les parcelles des semences traitées sont isolées de celles des semences non traitées.

2.2.6.2 Au laboratoire

La variété Latsika B est inoculée au stade épiaison par pulvérisation de la panicule avec une suspension bactérienne à 10^7 ufc/ml de la souche GR2. Après maturation, les grains tachés sont récoltés. Trois lots de 40 grains sont traités par trempage dans 8 ml d'une solution d'hypochlorite de calcium à 1, 2,5, 5, 7,5 et 10 g/l et dans de l'eau distillée stérile pour le

Tableaux 2. Recherches de bactéries pathogènes dans le milieu

a. Isolement sur milieu King B semi-sélectif à partir de 15 échantillons de terre, 15 échantillons d'eau d'irrigation et de 38 prélèvements à l'intérieur de la gaine paniculaire saine de talles au stade gonflement.

Type d'échantillon	Nombre d'échantillons avec colonies bactériennes	Nombre d'isolats différents ¹	Nombre d'isolats pathogènes ²
Terre	15	27	4
eau	15	22	8
gaines saines	11	11	0

¹ : isolats différant par le type de colonie.

² : pathogénie testée par injection à la seringue de 108 ufc/ml sur la variété Makalioka 34 âgée d'un mois.

b. Pathogénie d'isolats pathogènes au stade plantule de 3 échantillons de terre et de 6 échantillons d'eau d'irrigation et de l'isolat Sd8.1 de *Pseudomonas fuscovaginae* sur la variété Dourado précoce stade gonflement.

isolats	inoculum de 10 ⁴ bactéries par gaine :		inoculum de 10 ⁸ bactéries par gaine :	
	nombre de gaines malades	taille des symptômes	nombre de gaines malades	taille des symptômes
terre :				
T1	0		0	
T4	4	11,5	5	12,2
T5	0		0	
eau :				
E1	5	7,2	5	11,4
E4	0	0	0	
E5	0	0	0	
E7	4	6	5	6,6
E8	5	6	3	12,3
E10	5	8,2	5	9
Sd8.1	4	9	5	16,6

témoin non traité. Après 24 heures de trempage, 50 µl de la solution de trempage de chaque lot sont étalés sur une boîte de King B sélectif (Rott *et al.*, 1989a). Les grains d'un lot sont divisés en 10 grains déposés sur une boîte de King B sélectif et 30 grains sont mis à prégermer à 27°C.

3 RESULTATS

3.1 Description des paramètres de l'épidémiologie de la pourriture des gaines

Cette section décrit les différentes composantes intervenant dans l'épidémie de la pourriture de gaine : inoculum primaire, climat et relation incidence sévérité.

3.1.1 L'inoculum primaire

3.1.1.1 dans le milieu

Les isollements à partir de différents échantillons mettent en évidence la présence de bactéries fluorescentes pour 100% des échantillons de terre et d'eau d'irrigation et pour 26% des prélèvements à l'intérieur de la gaine paniculaire de talles au stade gonflement (tableau 2). Un seul type d'isolat est présent dans chaque prélèvement de gaine présentant des bactéries fluorescentes. Parmi tous ces isolats, aucun n'est pathogène par injection à la seringue sur plantule alors que 15% des isolats de terre et 36% des isolats d'eau d'irrigation produisent des symptômes de pourriture de gaine sur plantule. Parmi ces isolats pathogènes, 3 isolats provenant de la terre et 6 isolats provenant de l'eau d'irrigation sont testés pour leur pathogénie sur la gaine paniculaire de talles au stade gonflement. Les isolats pathogènes à ce stade, 1 de terre et 4 d'eau d'irrigation, produisent des pourritures sur la gaine paniculaire aux 2 doses d'inoculum de 10^4 et 10^8 bactéries par gaine. La taille moyenne des symptômes de pourriture 7 jours après l'inoculation varie de 6 à 11,5 cm à 10^4 bactéries par gaine et de 6,6 à 12,3 cm 10^8 bactéries par gaine (tableau 2). La comparaison de ces isolats avec l'isolat Sd8.1 de *Pseudomonas fuscovaginae* ne met pas en évidence de différences importantes.

Tableau 3. Incidence en pourcent de pourriture de gaine à 2 localités Sambaina (1650 mètres) et Soanindrariny (1850 mètres) sur 3 parcelles de semences traitées et non traitées par trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium à 10 g/l.

parcelle	Sambaina :		Soanindrariny :	
	traitées	non traitées	traitées	non traitées
1	2,7%	1,4%	10,2%	6,3%
2	0%	1,8%	5,0%	11,6%
3	2,6%	3,1%	12,3%	8,5%
moyenne	1,9%	2,1%	9,1%	8,8%
test de conformité ¹	$p_{khi^2}(1,4)=$	$p_{khi^2}(0,5)=$	$p_{khi^2}(1,9)=$	$p_{khi^2}(1,3)=$

¹ : si la probabilité du khi² est inférieure à 5% les 3 parcelles ne diffèrent pas.

Tableau 4. Température minimale et maximale moyenne du 1er Décembre au 15 Avril à 3 altitudes en 1993 et 1994.

Altitude ¹	température minimale :		température maximale :	
	1993	1994	1993	1994
1250	17,5 +/- 0,3	17,2 +/- 0,2	25,3 +/- 0,3	25,6 +/- 0,3
1650	/	14,9 +/- 0,3	/	24,4 +/- 0,5
1875	12,4 +/- 0,4	13,6 +/- 0,3	21,1 +/- 0,3	21,2 +/- 0,3

¹ : ces altitudes correspondent aux localités respectives de Mahitsy, Antsirabe et Vinaninony pourvues de stations climatiques.

Nous avons donc mis en évidence la présence dans l'eau d'irrigation et la terre de rizière de bactéries fluorescentes capables d'induire sans blessure des pourritures de gaine paniculaire sur riz. Au contraire en l'absence de symptôme, la face interne des gaines paniculaires apparaît peu colonisée par des bactéries pathogènes.

3.1.1.2 sur les semences

Les différentes doses d'hypochlorite de calcium testées sur des grains inoculés avec la souche GR2 de *Pseudomonas fuscovaginae* permettent de mettre en évidence que des colonies bactériennes sont isolées à partir de la solution de trempage et des grains non traités alors que pour les grains traités aucune colonie bactérienne n'est isolée dès la dose de 1 g/l d'hypochlorite de calcium. Le traitement de semence permet donc d'éliminer *Pseudomonas fuscovaginae* présent sur les grains.

Les 3 parcelles de semences traitées et non traitées mises en place à 2 altitudes sont homogènes pour l'incidence (tableau 3). La comparaison de l'incidence entre les parcelles de semences traitées par trempage dans une solution à 10% d'hypochlorite de calcium et les parcelles de semences non traitées ne met pas en évidence de différence significative à chacune des altitudes : l'incidence est de 2% à 1650 mètres (khi^2 de 0,02) et de 8,9% à 1875 mètres (khi^2 de 0,01). Si l'on prend en compte un autre facteur, on observe que l'incidence diffère statistiquement pour les 2 altitudes (khi^2 de 17,9).

Il apparaît donc que le traitement des semences n'a pas d'effet sur le développement de la maladie au stade adulte au champ. L'absence de différence mise en évidence au champ entre semences traitées et non traitées n'est pas imputable à une inefficacité du traitement de semences.

3.1.2 Relation maladie-altitude

Les essais sur les variétés Latsidahy et Rojofotsy en 1993 ont été mis en place dans 3 localités de différentes altitudes : Mahitsy 1250 mètres, Sambaina 1650 mètres et Vinaninony 1875 mètres. Ces localités peuvent être caractérisées pour leur climat par les températures minimales et maximales (tableau 4). La moyenne de ces températures sur la majeure partie du cycle du riz met en évidence une diminution des minima et maxima moyens liée à l'augmentation de l'altitude pour les 2 années 1993 et 1994. Cette diminution est de 0,6°C pour 100 mètres de dénivelé pour les températures minimales. Pour les températures maximales la diminution

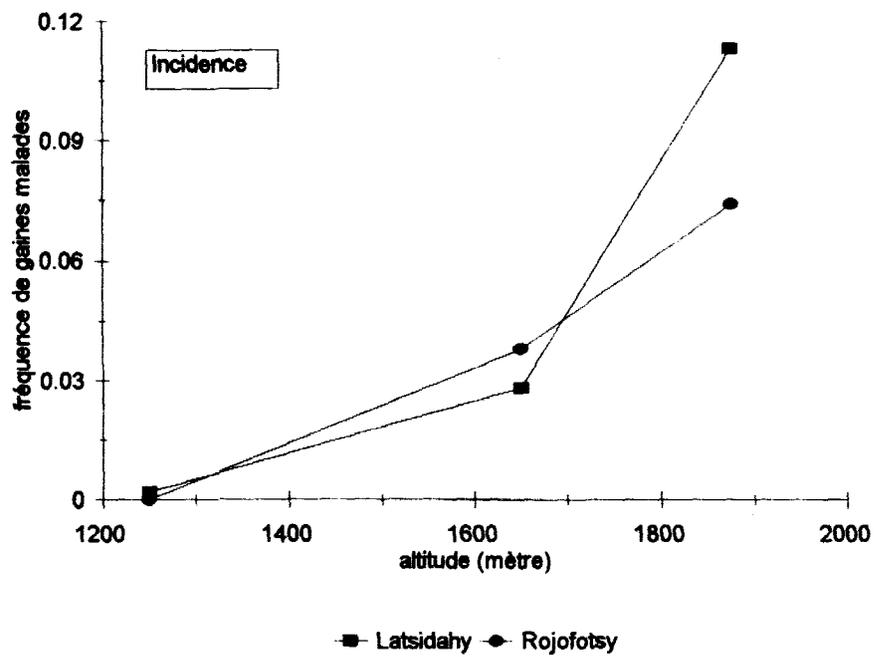
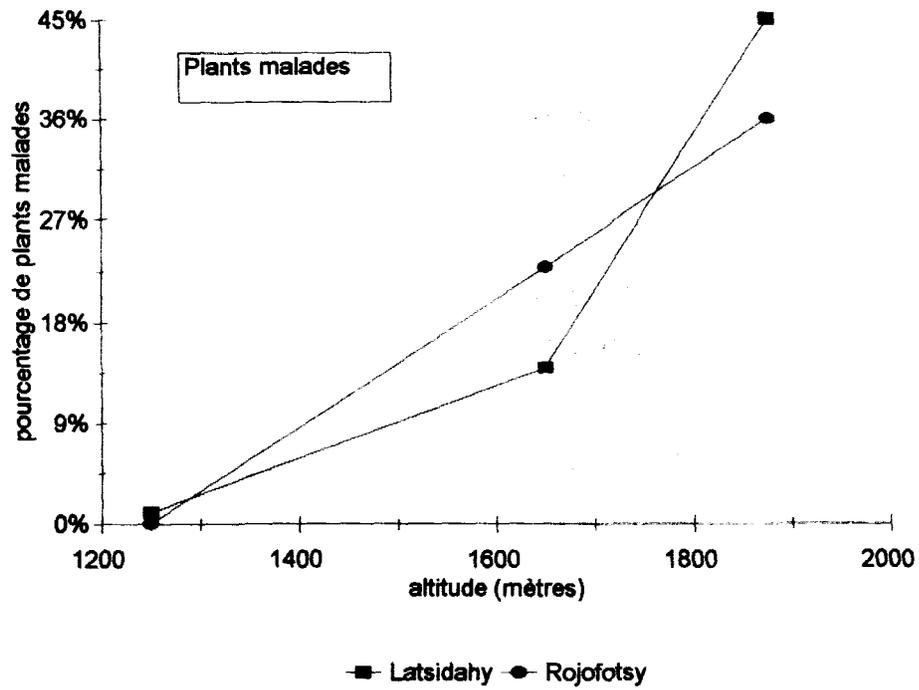


Figure 2 : Pourcentage de plants malades et incidence de pourriture de gaines à différentes altitudes.

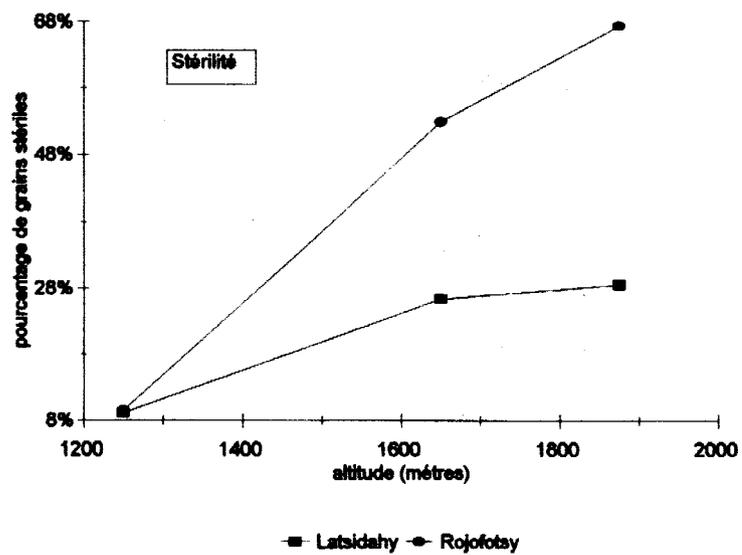
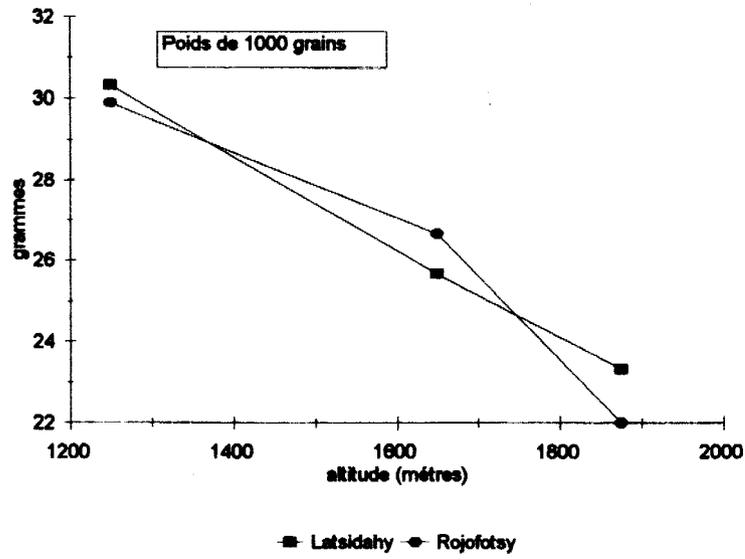
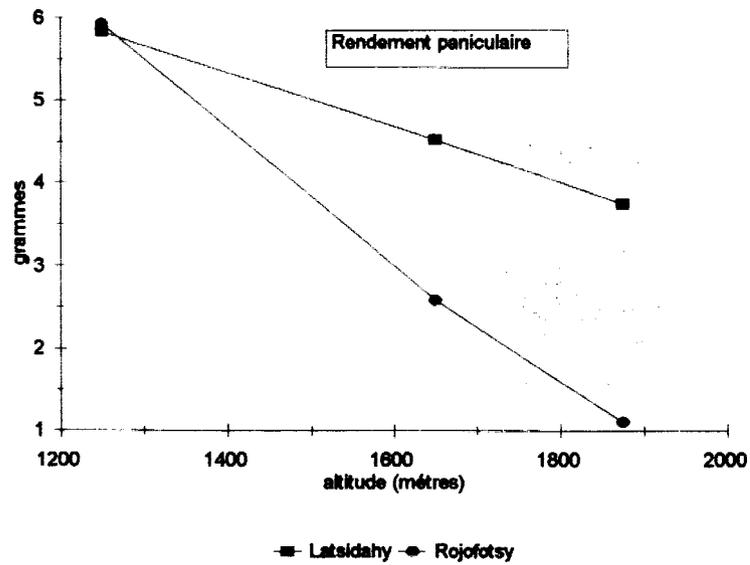


Figure 3 : Rendements paniculaires, poids de 1000 grains et pourcentage de stérilité pour les variétés Latsidahy et Rojofotsy en fonction de l'altitude.



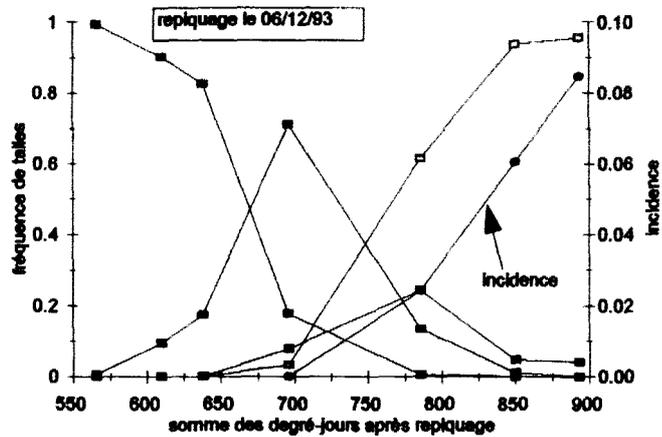
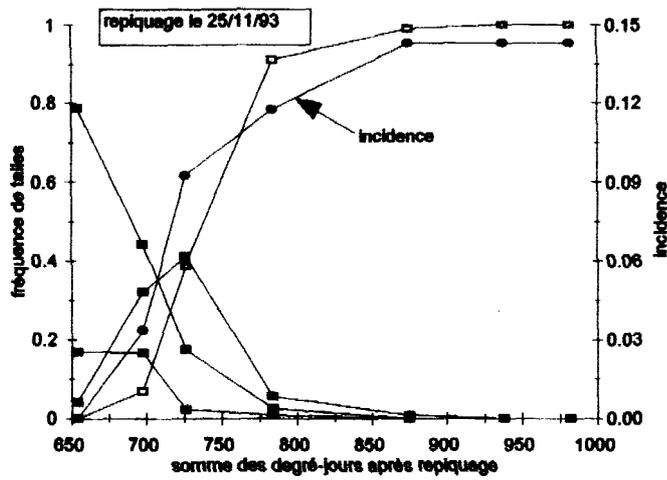
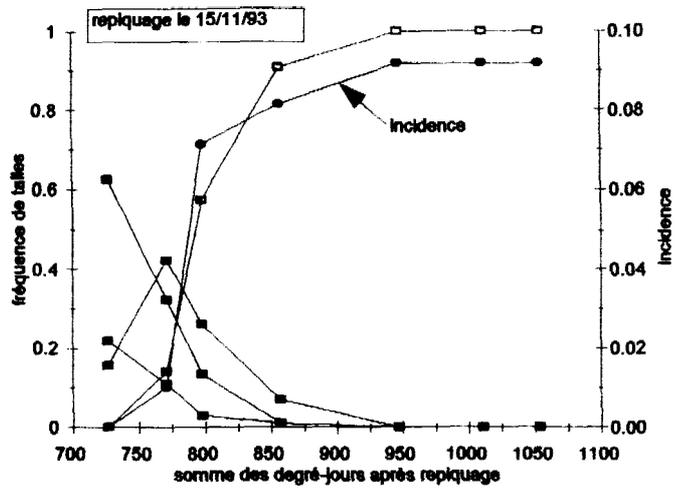
apparaît plus importante ($3,2^{\circ}\text{C}$) entre 1875 et 1650 mètres qu'entre 1250 et 1650 mètres ($1,2^{\circ}\text{C}$).

L'analyse des essais sur les variétés Latsidahy et Rojofotsy met en évidence que l'incidence (talles malades) et le pourcentage de plants malades augmentent avec l'altitude pour les 2 variétés Latsidahy et Rojofotsy 1285 (figure 2). A 1250 mètres d'altitude, la pourriture des gaines n'est présente que sur 1% de plants de la variété Latsidahy, la variété Rojofotsy n'étant pas touchée. Le pourcentage de plants malades atteint 45% et 36% à 1875 mètres pour respectivement les variétés Latsidahy et Rojofotsy.

Bien que les résultats ne nous permettent pas de distinguer les 2 variétés pour les pourritures de gaines en fonction de l'altitude, l'analyse du rendement permet de différencier leur comportement agronomique (figure 3). Alors que le rendement paniculaire est identique à 1250 mètres pour les 2 variétés Latsidahy et Rojofotsy 1285, il diminue de 50% entre 1250 et 1650 mètres et de 83% entre 1250 et 1875 mètres pour la variété Rojofotsy, contre respectivement 17% et 33%, pour la variété Latsidahy. Cette diminution du rendement paniculaire s'explique pour les 2 variétés par une augmentation du nombre de grains stériles accompagnée d'une diminution du poids de 1000 grains (figure 3). Les 2 variétés n'apparaissent pas être différentes pour la diminution du poids de 1000 grains. Mais alors que le nombre de grains stériles est de 53% et 67% à 1650 et 1875 mètres pour la variété Rojofotsy 1285, la variété Latsidahy présente 27% de grains stériles à ces 2 altitudes.

3.2 Etude de la dynamique de la pourriture des gaines

Dans cette section, nous étudierons l'évolution de la maladie au cours du cycle de l'hôte sur les essais de 1994 mis en place à Sambaina (1650 mètres d'altitude). La croissance du riz étant dépendante de la somme des degré-jours (Barbier, 1994), nos analyses se feront sur cette somme et non sur les dates. Nous calculerons la somme des degré-jours à partir des données climatiques de la station d'Antsirabe (1650 mètres d'altitude) avec un zéro de croissance de 13°C (Barbier, 1994).



■ Montaison ■ Gonfiement ■ Eplaison □ Exertion ● Incidence

Figure 4 : Evolution de 4 stades de développement du riz et de l'incidence en fonction de la somme des degré-jours après le repiquage pour la variété Latsidaly repiquée à la densité de 10 x 20 cm à trois dates différentes.

3.2.1 Dynamiques d'évolution de l'hôte et de la maladie

3.2.1.1 dans le temps

Dans cette étude, nous analyserons tout d'abord les résultats obtenus sur les différentes dates de repiquage de la variété Latsidahy repiquée à la densité de 10 cm x 20 cm. Puis nous confronterons nos conclusions aux autres essais.

Nous avons suivi l'évolution au cours du temps des différents stades phénologiques du riz (stades montaison, gonflement, épiaison et exsertion paniculaire totale ; cf Introduction Générale) et de l'incidence de la maladie (figure 4). La dynamique de l'exsertion paniculaire et la dynamique de l'incidence sont comparées après une transformation logit de l'incidence et de la fréquence de talles à l'exsertion paniculaire. Cette transformation permet de linéariser des courbes logistiques par la formule : $\text{logit}(y_i) = \ln[y_i/(y_m - y_i)]$, avec y la fréquence observée à la somme de degré-jours i et y_m la fréquence maximum observée. La comparaison des régressions linéaires du logit de l'incidence et du logit de la fréquence de talles à l'exsertion ne met pas en évidence de différence significative pour les 3 dates de repiquages (tableau 5). L'incidence augmente donc à la même vitesse que la fréquence de talles à l'exsertion paniculaire.

La somme de degré-jours nécessaire pour 50% de talles à l'exsertion et celle nécessaire pour 50% de l'incidence maximum est estimée à partir de la régression du logit en fonction de la somme des degré-jours (tableau 6). Les intervalles de confiance ne permettent pas de différencier ces 2 estimations pour les 3 essais. L'évolution de l'incidence prend place durant la même période que l'exsertion paniculaire.

La dynamique de l'incidence apparaît donc identique à celle de l'exsertion paniculaire.

L'analyse des autres essais portant sur les variétés Latsidahy, Rojofotsy 1285 et Tokambana met en évidence que pour 7 sur 10 d'entre eux la dynamique de l'incidence ne diffère pas significativement de la dynamique de l'exsertion paniculaire (Annexe 6). Il existe une différence pour la variété Rojofotsy 1285 repiquée à 20 cm x 40 cm pour laquelle l'incidence évolue plus rapidement que l'exsertion paniculaire et pour les 2 répétitions de la variété Latsidahy repiquée à 20 cm x 20 cm pour lesquelles l'incidence évolue plus lentement que l'exsertion paniculaire. Pour la répétition 2, il faut toutefois noter que le test t de student n'est plus significatif à 2,5%. Pour 7 essais sur les 10 analysés, la somme de degré-jours nécessaire pour 50% d'incidence ne diffère pas de la somme de degré-jours nécessaire pour 50% de talles à l'exsertion paniculaire. Toutefois il faut noter 3 exceptions pour lesquelles la somme des degré-jours de 50%

Tableau 5. Comparaison du logit de l'incidence et du logit de la fréquence de talles à l'exertion en fonction de la somme des degré-jours après le repiquage pour la variété Latsidahy repiquée à la densité de 20 cm x 10 cm à 3 dates différentes.

Date de repiquage	pente du logit ¹ pour :		test t de Student de non parallélisme ²
	l'incidence	l'exertion	
15/11/93	0,043 (0,96)	0,045 (0,97)	p(0,15) = 89%
25/11/93	0,044 (0,98)	0,040 (0,97)	p(0,37) = 73%
06/12/93	0,035 (0,98)	0,036 (0,99)	p(0,18) = 87%

¹ : la pente est exprimée en logit par degré-jour, le coefficient de corrélation de l'ajustement linéaire est noté entre parenthèses,

² : l'hypothèse de non parallélisme est rejetée si la probabilité du t calculé est supérieure à 5%.

Tableau 6. Comparaison de la somme des degré-jours nécessaire pour 50% de l'incidence et pour 50% de talles à l'exertion paniculaire pour la variété Latsidahy repiquée à la densité de 20 cm x 10 cm à 3 dates différentes.

Date de repiquage	somme des degré-jours pour :	
	l'incidence	l'exertion
15/11/93	799 +/- 69 ¹	803 +/- 106
25/11/93	726 +/- 52	746 +/- 48
06/12/93	819 +/- 107	783 +/- 29

¹ : intervalle de confiance à 95%.

d'incidence est inférieure à celle de 50% de talles à l'exertion. Ce sont les variétés Latsidahy et Rojofotsy repiquées à 20 cm x 40 cm ainsi que la répétition 1 de la variété Latsidahy repiquée à 20 cm x 20 cm pour lesquels on observe respectivement 48, 61 et 45 degré-jours de différence entre l'incidence et l'exertion paniculaire.

Globalement, il apparaît donc que l'incidence évolue suivant la dynamique de l'hôte. On peut avancer l'hypothèse que la maladie ne possède pas une dynamique propre mais une dynamique apparente liée à l'évolution dans le temps des stades phénologiques du riz.

3.2.1.2 dans l'espace

L'évolution dans le temps de la distribution spatiale des plants malades a été analysée pour les 3 variétés Latsidahy, Rojofotsy 1285 et Tokambana du 21 Mars au 21 Avril 1994. Pour la variété Tokambana l'indice de Lloyd et la probabilité du χ^2 mettent en évidence que les plants malades se distribuent aléatoirement dans les 2 parcelles étudiées quelle que soit la date (tableau 7). Une agrégation des plants malades est mise en évidence sur la parcelle 2 de la variété Latsidahy et la parcelle 1 de la variété Rojofotsy 1285. Mais cette agrégation est transitoire et n'est mise en évidence que le 6 Avril pour la variété Latsidahy et le 1er Avril pour la variété Rojofotsy 1285. A ces dates, la fréquence de plants malades pour chacune des 10 sous-parcelles a été comparée à la fréquence de talles à l'exertion (figure 5). Pour la variété Latsidahy, la plus forte proportion de plants malades sur les sous-parcelles 4 et 8 est associée à une fréquence de talles à l'exertion plus importante sur ces 2 sous-parcelles. De la même façon, pour la variété Rojofotsy 1285 les sous-parcelles 7 et 9 présentent des plus fortes proportions de plants malades associées à des fréquences de talles à l'exertion plus importantes. Nous avons mis en évidence précédemment que l'incidence et l'exertion paniculaire évoluent de façon identique, on peut donc émettre l'hypothèse que l'agrégation transitoire observée pour les variétés Latsidahy et Rojofotsy 1285 est imputable à une hétérogénéité intra-parcellaire de l'exertion paniculaire.

3.2.2 Détermination de la période de contamination

La détermination du stade de contamination passe par la détermination de la période d'incubation du pathogène et la détermination de l'évolution dans le temps des différents stades phénologiques de l'hôte.

Détermination de la période d'incubation : il a été démontré en conditions contrôlées que le temps d'incubation est variable en fonction de la température (cf chapitre II, 3.2.3). La

Tableau 7. Evolution dans le temps de la distribution spatiale des plants malades estimée par l'indice de Lloyd pour les 2 parcelles des 3 variétés étudiées en 1994.

a. variété Latsidahy

date	parcelle 1 :		parcelle 2 :	
	Indice de Lloyd	probabilité du χ^2	Indice de Lloyd	probabilité du χ^2
21/03/94	0,82	$p(5,2)^1 = 18,4\%$	1,00	$p(9,0) = 56,3\%$
01/04/94	1,22	$p(17,0) = 95,1\%$	1,93	$p(16,6) = 94,5\%$
06/04/94	1,19	$p(17,0) = 95,1\%$	2,13	$p(25,3) = 99,7\%$
12/04/94	1,19	$p(18,1) = 96,4\%$	1,40	$p(16,6) = 94,5\%$
21/04/94	1,15	$p(17,4) = 95,7\%$	1,10	$p(11,9) = 78,1\%$

¹ : l'hypothèse d'une distribution aléatoire est rejetée si $p(\chi^2) > 97,5\%$ (distribution agrégative) ou si $p(\chi^2) < 2,5\%$ (distribution uniforme).

b. variété Rojofotsy 1285

date	parcelle 1 :		parcelle 2 :	
	Indice de Lloyd	probabilité du χ^2	Indice de Lloyd	probabilité du χ^2
21/03/94	1,00	$p(9,0)^1 = 56,3\%$	/	/
01/04/94	4,33	$p(21,0) = 98,7\%$	0,72	$p(7,0) = 36,3\%$
06/04/94	1,06	$p(10,0) = 64,9\%$	1,50	$p(18,5) = 97,0\%$
12/04/94	1,14	$p(14,8) = 90,3\%$	1,25	$p(16,7) = 94,6\%$
21/04/94	1,10	$p(12,6) = 81,8\%$	1,15	$p(17,9) = 96,4\%$

¹ : l'hypothèse d'une distribution aléatoire est rejetée si $p(\chi^2) > 97,5\%$ (distribution agrégative) ou si $p(\chi^2) < 2,5\%$ (distribution uniforme).

c. variété Tokambana

date	parcelle 1 :		parcelle 2 :	
	Indice de Lloyd	probabilité du χ^2	Indice de Lloyd	probabilité du χ^2
21/03/94	0,69	$p(7,3)^1 = 39,4\%$	0,90	$p(7,8) = 44,6\%$
01/04/94	1,17	$p(15,4) = 91,9\%$	0,87	$p(4,2) = 10,2\%$
06/04/94	1,11	$p(14,9) = 90,6\%$	0,92	$p(4,5) = 12,5\%$
12/04/94	1,11	$p(15,2) = 91,4\%$	0,97	$p(6,7) = 33,2\%$
21/04/94	1,11	$p(15,2) = 91,4\%$	0,97	$p(6,7) = 33,2\%$

¹ : l'hypothèse d'une distribution aléatoire est rejetée si $p(\chi^2) > 97,5\%$ (distribution agrégative) ou si $p(\chi^2) < 2,5\%$ (distribution uniforme).

Tableau 8. Comparaison du logit de la fréquence de talle au stade montaison et du logit de la fréquence de talles à l'exertion paniculaire en fonction de la somme des degré-jours après le repiquage pour la variété Latsidahy repiquée à la densité de 20 cm x 10 cm à 3 dates différentes.

Date de repiquage	pente du logit ¹ pour :		test t de Student de non parallélisme ²
	la montaison	l'exertion	
15/11/93	0,027 (0,98)	0,045 (0,97)	p(2,12) = 12%
25/11/93	0,027 (0,93)	0,040 (0,97)	p(1,27) = 27%
06/12/93	0,046 (0,99)	0,036 (0,99)	p(2,43) = 6%

¹ : la pente est exprimée en logit par degré-jour, le coefficient de corrélation de l'ajustement linéaire est noté entre parenthèses,

² : l'hypothèse de non parallélisme est rejetée si la probabilité du t calculé est supérieure à 5%.

Tableau 9. Comparaison de la somme de degré-jour estimée et observée pour 50% de talles aux stades gonflement et épiaison pour la variété Latsidahy repiquée à la densité de 20 cm x 10 cm à 3 dates différentes.

Date de repiquage	stade gonflement :		stade épiaison :	
	estimée	observée	estimée	observée
15/11/93	722	727	762	771
25/11/93	654	654	700	726
06/12/93	707	696	745	786

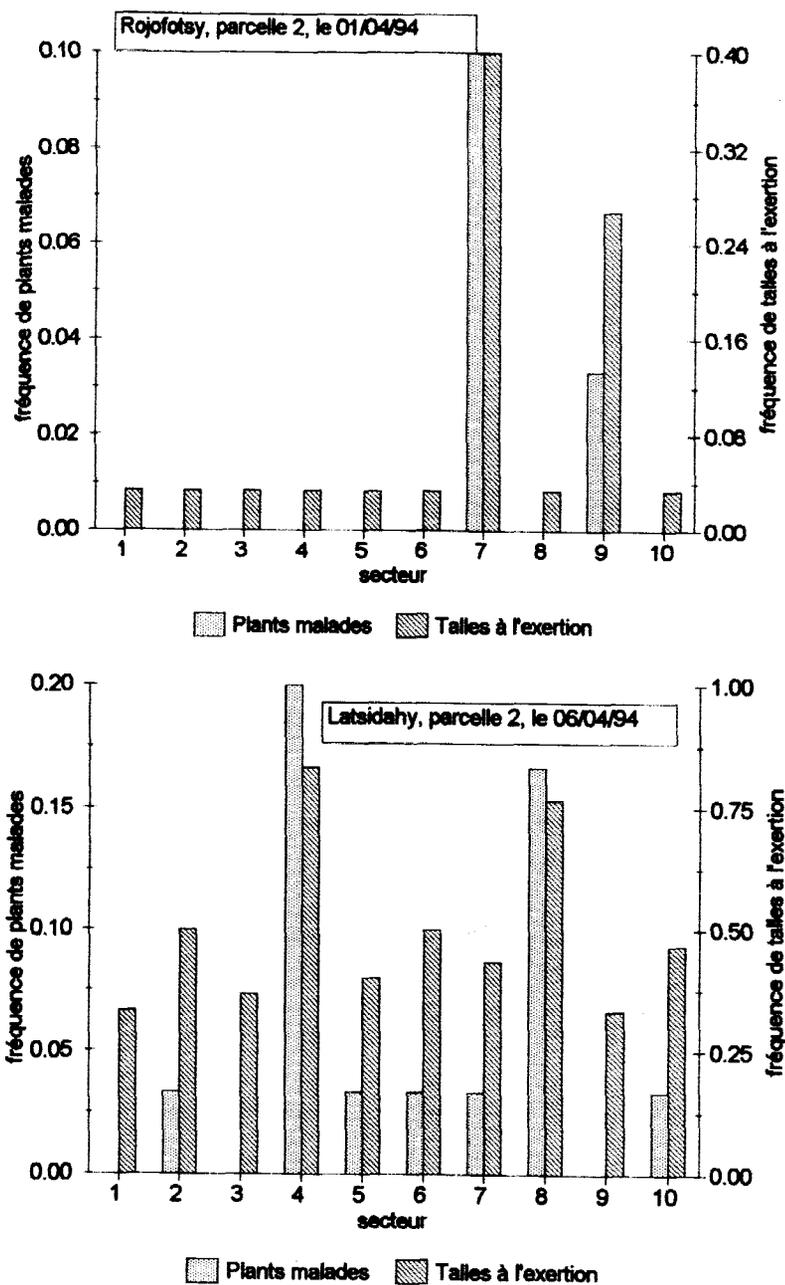


Figure 5 : Comparaison de la fréquence de plants malades et de talles à l'exertion paniculaire dans chacun des secteurs des parcelles pour lesquelles une agrégation de la maladie est mise en évidence.

température moyenne 30 jours avant la maladie étant de 19,2°C pour les différents essais, le temps d'incubation a été déterminé à partir des expérimentations menées à 18°C. De plus il a été démontré que le temps d'incubation variait en fonction de la dose d'inoculum (cf chapitre I et II). Afin de déterminer la quantité d'inoculum présente au champ, la dose pour 10% de gaine paniculaire malades a été estimée à partir des courbes dose-réponse de l'isolat Sd8.1 de *Pseudomonas fuscovaginae* étudié en conditions contrôlées. Cette dose est estimée à 1 bactérie par gaine sur les 2 variétés Latsidahy et Dourado précoce. Le temps d'incubation estimé pour 1 bactérie par gaine est de 7,4 +/- 1,6 jours pour la variété Latsidahy et 7,5 +/- 1,1 jours pour la variété Dourado précoce, soit en degré-jours 37 +/- 8 et 38 +/- 6 respectivement.

Détermination de l'évolution des différents stades : la détermination du stade de contamination demande de connaître l'évolution des différents stades susceptibles d'être contaminés. Les notations faites au champ pour les stades gonflement et épiaison ne permettent pas de déterminer précisément la vitesse d'apparition de ces stades ainsi que la somme des degré-jours nécessaire à leur apparition. Pour déterminer avec plus de précision ces deux paramètres nous avons comparé le stade antérieur (montaison) et le stade postérieur (exertion) aux stades gonflement et épiaison. Pour les variétés Latsidahy et Rojofotsy 1285, la comparaison des vitesses d'évolution des stades montaison et exertion paniculaire ne met pas en évidence de différence significative (tableau 8). Pour la variété Tokambana, les vitesses des deux stades diffèrent statistiquement bien que leurs intervalles de confiance se chevauchent (Annexe 6).

Si l'on suppose que la somme des degré-jours séparant les différents stades montaison-gonflement, gonflement-épiaison et épiaison-exertion paniculaire est constante, cette somme des degré-jours est égale au tiers de la somme de degré-jours séparant le stade montaison du stade exertion paniculaire. La différence entre la somme de degré-jours estimée et la somme de degré-jours observée pour les 3 variétés est pour 50% de talles au stade gonflement de 13 +/- 5 degré-jours et de 30 +/- 7 pour 50% de talles au stade épiaison. Les estimations de la somme de degré-jours pour 50% des talles au stade gonflement et 50% des talles au stade épiaison n'apparaissent, donc, pas en contradiction avec les observations faites au champ (tableau 9).

Détermination de la période de contamination : la comparaison des nombres de degré-jours moyens séparant les stades gonflement et épiaison du stade exertion paniculaire pour les 3 variétés étudiées et des temps d'incubation sur les variétés Latsidahy et Dourado précoce met en évidence que le temps d'incubation est égal au nombre de degré-jours séparant le stade

Tableau 10. Nombre de degré-jours moyen séparant les stades gonflement et épiaison du stade exertion paniculaire pour les 3 variétés Latsidahy, Rojofotsy 1285 et Tokambana et temps d'incubation d'une bactérie par gaine de l'isolat Sd8.1 de *Pseudomonas fuscovaginae* sur les variétés Latsidahy et Dourado précoce.

		variétés :		
		Latsidahy	Rojofotsy	Tokambana
nombre de degré-jours séparant les stades :	gonflement-exertion	78 +/- 7	65 +/- 17	67 +/- 35
	épiaison-exertion	39 +/- 4	32 +/- 8	33 +/- 16
période d'incubation pour 1 bactérie ¹ sur :	Latsidahy		37 +/- 8	
	Dourado précoce		38 +/- 6	

¹ : période d'incubation en degré-jours.

Tableau 11. Nombre de degré-jours séparant le stade épiaison du stade exertion paniculaire pour les différents essais sur les 3 variétés Latsidahy, Rojofotsy 1285 et Tokambana.

essais		variété		
densité de repiquage	date de repiquage	Latsidahy	Rojofotsy	Tokambana
10 cm x 20 cm	15/11/93	41	/	/
	25/11/93	46	44	/
	06/12/93	38	17	/
20 cm x 20 cm	06/12/93 :			
	répétition 1	34	30	34
	répétition 2	35	34	32
40 cm x 20 cm	15/11/93	37	38	/

épiaison du stade exsertion paniculaire pour chacune des 3 variétés (tableau 10). On peut donc émettre l'hypothèse que la contamination a lieu au champ durant le stade épiaison.

L'analyse pour chaque essai met en évidence que sur 13 essais analysés un seul présente un nombre de degré-jours entre le stade épiaison et le stade exsertion paniculaire trop faible pour être expliqué par une contamination au stade épiaison (tableau 11).

3.2.3 Rôle potentiel d'un inoculum secondaire

On peut supposer qu'une talle contaminée sera source d'inoculum secondaire à l'issue de sa période d'incubation mais que cette inoculum secondaire ne sera effectif que sur des talles réceptives (au stade épiaison). La période durant laquelle 95% des talles d'une population sont au stade épiaison peut être estimée comme suit :

$$[\text{LOGIT}(0,975)-\text{LOGIT}(0,025)]/\text{vitesse d'évolution.}$$

Cette période est en moyenne en degré-jours de 196 +/- 18 pour la variété Latsidahy, 167 +/- 46 pour la variété Rojofotsy 1285 et de 156 pour la variété Tokambana. Cette période de réceptivité est 4 à 6 fois supérieure à la période d'incubation qui est de 37 degré-jours. Au sein de la population, il existe donc durant une période donnée des talles malades et des talles réceptives.

La contamination des talles réceptives par les bactéries issues de talles malades pourrait avoir lieu entre talles d'un même plant et/ou entre talles de différents plants. Il apparaît, donc, important de déterminer quelles talles pourraient être contaminées par cet inoculum potentiel. Afin d'estimer la part de variation due au plant dans la période réceptive de la population, les variances totales, inter-plant et intra-plant pour la somme de degré-jours nécessaire à l'exsertion ont été calculées pour les variétés Latsidahy et Rojofotsy sur lesquelles des notations individuelles de talles ont été faites sur 10 plants par essai de la parcelle 1. Le rapport des variances inter sur intra-plant permet de mettre en évidence que 75% de la période réceptive de la population est imputable aux variations entre plants et 25% aux variations entre talles d'un même plant (tableau 12). Ceci permet de conclure qu'une contamination des talles réceptives par les bactéries issues de talles malades serait beaucoup plus probable entre plants qu'entre talles d'un même plant.

Une transmission de plant à plant de la maladie se caractérise par la présence de foyers dans la parcelle, ces foyers induisant une distribution spatiale agrégative de la maladie. Or nous avons mis en évidence précédemment que la maladie se distribue essentiellement aléatoirement au sein

Tableau 12. Part de variation due au plant dans l'évolution de la population de talles estimée par les variances totale, inter-plant et intra-plant pour la somme de degré-jours nécessaire à l'exertion pour les variétés Latsidahy et Rojofotsy

variété	variance :			V inter / V intra
	totale	inter-plant	intra-plant	
Latsidahy	4892	3678	1214	3
Rojofotsy	4022	3130	919	3,4

Tableau 13. Comparaison du logit de l'incidence et du logit de la fréquence de talles à l'exertion paniculaire en fonction de la somme des degré-jours pour les plants ayant moins de 4 talles et les plants ayant plus de 7 talles.

tallage	pente du logit ¹ pour :		test t de non parallélisme ²
	l'incidence	l'exertion	
inférieur à 4	0,023 (0,94)	0,027 (0,98)	p(1,42)= 17,1%
supérieur à 7	0,031 (0,91)	0,031 (0,97)	p(0,08)= 93,7%
test t de non parallélisme ²	p(1,81)= 9%	p(1,22)= 23,4%	

¹ : la pente est exprimée en logit par degré-jour, le coefficient de corrélation de l'ajustement linéaire est noté entre parenthèses,

² : l'hypothèse de non parallélisme est rejetée si la probabilité du t calculé est supérieure à 5%.

d'une parcelle et que les agrégations transitoires observées sont imputables à des hétérogénéités de l'hôte. On peut donc émettre l'hypothèse qu'il n'existe pas de transmission de plant à plant de la maladie.

La transmission intra-plant de la maladie peut être mise en évidence par l'intermédiaire du tallage. En effet, cette transmission devant être plus importante dans les plants à fort tallage le taux d'augmentation de la maladie devrait augmenter avec le tallage. La comparaison de la dynamique de l'incidence ne met pas en évidence de différence entre les plants à faible tallage (moins de 4 talles par plant) et les plants à fort tallage (plus de 7 talles par plant) (tableau 13). Pour ces 2 classes de plants la dynamique de l'incidence ne diffère pas de la dynamique de la fréquence de talles au stade exsertion paniculaire. Ce résultat permet d'émettre l'hypothèse qu'il n'existe pas de transmission intra-plant de la maladie.

Il apparaît donc que les bactéries issues des talles malades ne constituent pas un inoculum secondaire et n'interviennent pas dans le développement de l'épidémie au sein d'une parcelle.

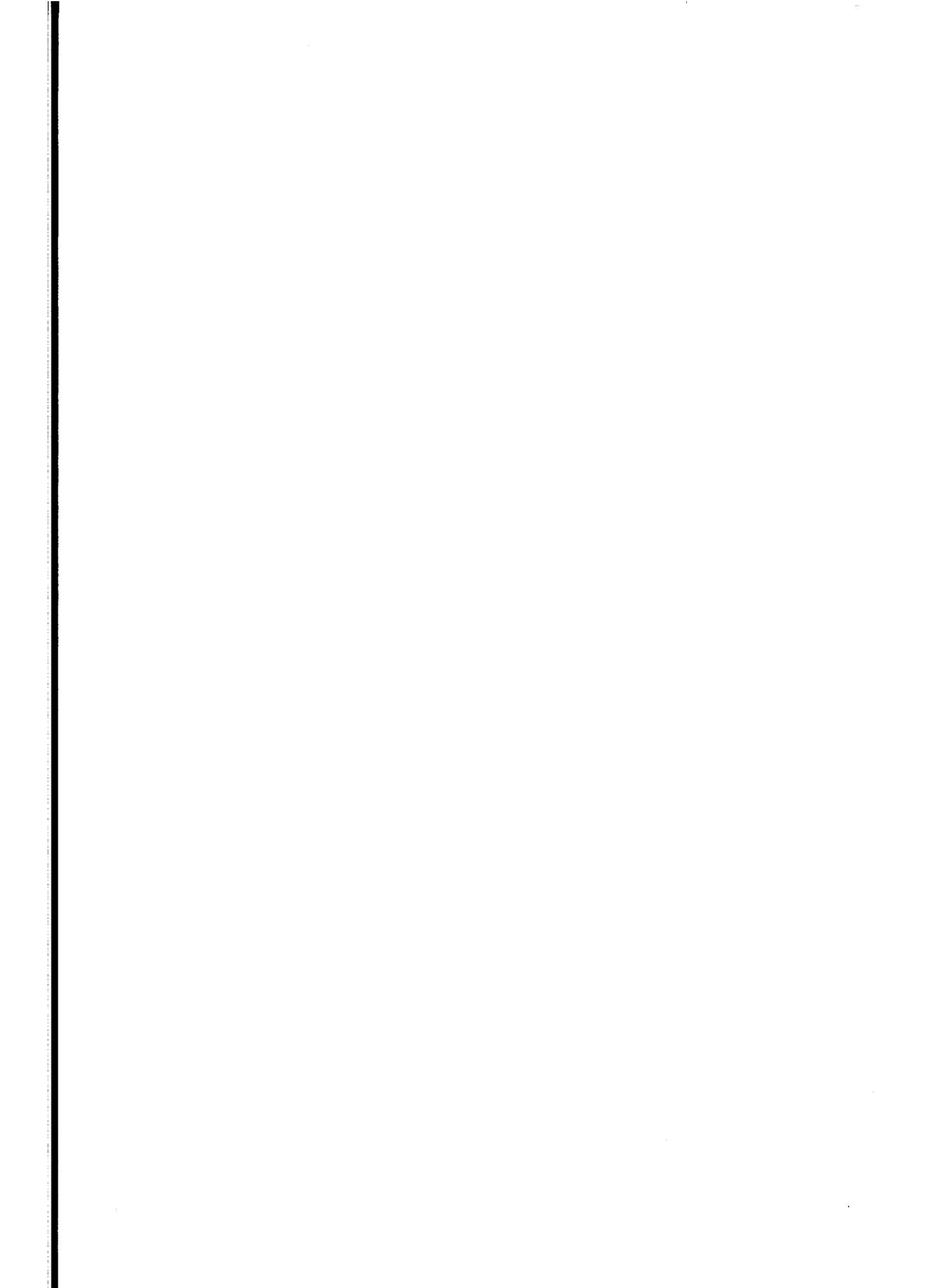
4 DISCUSSION GENERALE

L'étude de la dynamique au cours du temps de la pourriture des gaines met en évidence que le développement de la maladie au sein de la population hôte suit la dynamique du stade réceptif de l'hôte. La population hôte n'étant pas synchronisée du fait du tallage et de la variabilité inter-plant, l'apparition des stades réceptifs est, donc, échelonnée dans le temps. La maladie et l'hôte évoluant à la même vitesse, l'apparition de nouvelles gaines malades est indépendante de la quantité de gaines malades déjà présentes. L'épidémie mise en évidence au niveau parcellaire est du type monocyclique et dépend, donc, de l'inoculum primaire (Van Der Plank, 1963). L'absence de recontamination intra-plant et inter-plant confirme que les bactéries issues des talles malades n'interviennent pas dans l'épidémiologie de la pourriture des gaines. Plusieurs modèles épidémiologiques ont mis en évidence le rôle prépondérant de l'apparition d'un stade réceptif de l'hôte sur le développement des épidémies (Populer, 1978 ; Rappilly, 1991). Le nombre de cycles épidémiques dépend de trois paramètres : la durée du stade réceptif de l'hôte,

la récurrence de l'apparition de ce stade au cours du cycle de l'hôte, et le temps de latence du pathogène. Pour *Ustilago nuda* sur orge et sur blé, la brièveté et l'unicité du stade réceptif de l'hôte (l'ouverture des stigmates floraux) conduisent à des épidémies monocycliques. Au contraire, pour *Colletotrichum gloeosporioides* et *Microcyclus ulei* pathogènes des feuilles âgées de 4 à 9 jours d'hévéa, la récurrence de l'apparition des organes réceptifs causée par la défoliation des feuilles malades conduit à des épidémies polycycliques durant le cycle végétatif de l'hôte (Rivano, 1992 ; Sénéchal, 1987). Les caractéristiques épidémiologique de la pourriture des gaines permettent de la rapprocher des épidémies monocycliques des charbons des céréales : stade réceptif (stade épiaison) n'apparaît qu'une fois au cours du cycle de l'hôte. Un des principal facteur épidémiologique est donc l'inoculum primaire. Cinq facteurs principaux permettent de caractériser l'inoculum primaire : sa répartition spatiale, sa dissémination spatiale et temporelle, sa quantité et sa qualité. Cinq questions peuvent donc être posées : Où ? Quand et Comment ? Qui et Combien ? Les réponses à ces différentes questions permettront d'envisager des moyens de lutte.

Où (répartition spatiale de l'inoculum primaire). Les études menées sur les bactéries pathogènes des parties aériennes de plantes ont mis en évidence une grande diversité des sources d'inoculum primaire. Cette diversité est liée au moyen de conservation des bactéries. En effet, les principaux genres des espèces phytopathogènes (*Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Erwinia*) regroupent des bactéries non sporulantes (Schuster & Coyne, 1974). Il existe donc pour ces espèces une nécessité d'avoir des hôtes intermédiaires ou des moyens de survie alternatifs durant les inter-saisons. Plusieurs modes de survie ont été mis en évidence : épiphytisme sur les semences ou sur des hôtes alternatifs, saprophytisme sur des résidus de récoltes. Par contre, peu d'échanges ont été mis en évidence entre la flore du sol et la flore aérienne (Schuster & Coyne, 1974). Les moyens de survie ne sont pas exclusifs comme pour *X. campestris* pv. *malvacearum* ou *P. syringae* pv. *phaseolicola* qui associent une survie sur les semences, des hôtes alternatifs et les résidus (Blakeman, 1992 ; Hirano & Upper, 1983 ; Schuster & Coyne, 1974). La flore du sol peut transitoirement être épiphyte mais sa grande sensibilité à la dessiccation réduit ses capacités de colonisation (Lindow, 1991 ; O'Brien & Lindow, 1989).

Les réservoirs d'inoculum de *Pseudomonas fuscovaginae* apparaissent aussi très diversifiés. Des études sur la survie de *Pseudomonas fuscovaginae* sur les résidus de récoltes ont mis en évidence que le pathogène est réisolé de ces résidus jusqu'à 3 mois après la récolte au Japon



(Miyajima, 1983). Le suivie d'une souche marquée par résistance à différents antibiotiques a permis de montrer que la survie dans le sol est associée à la présence des résidus de récoltes enfouis. Mais la souche n'est plus détectable après décomposition de ces résidus (Ntibishimirwa, 1991). *Pseudomonas fuscovaginae* a été isolé de pourriture de gaine sur blé au Mexique, et sur maïs et sorgho au Burundi. Au Japon, le pathogène a, aussi, été détecté sur des adventices saines des rizières : *Dactylis glomerata*, *Agrostis clavata*, *Phleum pratense* (Miyajima 1983). De plus, par inoculation un grand nombre de mauvaises herbes sont sensibles à *P. fuscovaginae* : *Cyperus* spp., *Bracharia* spp., *Eleusine* spp., *Echinochloa* spp. (Zeigler *et al.*, 1986). La survie de *Pseudomonas fuscovaginae* sur les semences a été mise en évidence dans les différentes zones de distribution du pathogène : au Japon (Miyajima, 1983) en Colombie (Zeigler & Alvarez, 1987), au Burundi (Détry, 1994) et dans notre étude à Madagascar. Nous avons montré que des *Pseudomonas* fluorescents aussi pathogènes que *P. fuscovaginae* sont isolés de l'eau d'irrigation sur milieu King B semi-sélectif. Bien que ces isolats ne soient pas encore identifiés, nous avons mis en évidence dans le chapitre I que *Pseudomonas fuscovaginae* représentent 80% des isolats pathogènes au stade gonflement isolés de pourriture de gaine et de grains. Il existe donc de fortes présomptions pour les *Pseudomonas* isolés d'eau d'irrigation appartiennent à l'espèce *fuscovaginae*.

Malgré la diversité des sources potentielles d'inoculum primaire (eau d'irrigation, résidus de récolte, adventices et semences) il demeure important de déterminer lesquels contribuent à l'épidémiologie du pathogène.

Comment et Quand (dissémination spatiale et temporelle). Deux principaux mécanismes sont impliqués pour l'installation des bactéries phytopathogènes sur leur hôte : la transmission par les semences et la déposition par les aérosols (Hirano & Upper, 1983). Le transport des bactéries par les aérosols a été étudié de façon approfondie (Hirano & Upper, 1991 ; Hirano & Upper, 1983 ; Lindemann & Upper, 1985 ; Lindemann *et al.*, 1982). L'intensité d'émigration et d'immigration des bactéries de la surface foliaire vers l'atmosphère dépend essentiellement de la température et de l'humidité. En période sèche, le flux net est estimé à une émigration de $4,5 \cdot 10^{10}$ bactéries/hectares/jour au-dessus d'un champ de haricot, avec un maximum durant les périodes les plus chaudes de la journée (Lindemann & Upper, 1985). Le flux d'immigration est lié à la vitesse du vent et augmente fortement durant les pluies (Hirano & Upper, 1991 ; Lindemann & Upper, 1985). La pluie induit un lessivage de la surface foliaire : 10^5 bactéries

par feuille de haricot sont ôtées durant une pluie de 15 minutes (Lindemann & Upper, 1985). Mais ce lessivage est compensé par une recolonisation de la surface foliaire. Les migrants sont déposés sur la surface foliaire par l'effet "splash" dont l'intensité varie en fonction de la vitesse du vent (de 1,5 à 5 mètres) (Fitt *et al.*, 1989). Le lessivage préalable à la migration apparaît comme un avantage pour l'installation des bactéries migrantes (Hirano & Upper, 1991 ; Lindemann & Upper, 1985). Ces différents modes de pollution peuvent conduire pour certains pathogènes à l'installation sur l'hôte plusieurs mois avant l'apparition de la maladie, le déclenchement de l'épidémie dépendant de 3 facteurs : la taille de la population, les facteurs climatiques et la réceptivité de l'hôte (Blakeman, 1992 ; Hayward, 1972 ; Hirano & Upper, 1983 ; Ishimaru *et al.*, 1991 ; Lindemann *et al.*, 1984).

Pseudomonas fuscovaginae est présent sur les semences issues de talles malades (Détry, 1994 ; Jaunet 1991 ; Zeigler & Alvarez, 1987) et est isolé sur des plantules âgées de 16 jours issues de ces semences (Miyajima, 1983). Nous avons montré qu'un traitement à l'hypochlorite de calcium est efficace à faible concentration pour éliminer le pathogène des semences. Par contre ce traitement n'a pas d'effet sur l'incidence de la maladie au champ. Des résultats identiques ont été mis évidence au Burundi par un traitement des semences de 6 jours à 65°C (Détry, 1994). Un suivi de *P. syringae* pathogène du blé de printemps au stade adulte a permis de mettre en évidence que les bactéries présentes sur les semences ne colonisent pas la plante au-delà de la première feuille et que les bactéries responsables de l'épidémie au stade adulte ne proviennent pas des semences (Fryda & Otta, 1978). On peut donc émettre l'hypothèse que pour *Pseudomonas fuscovaginae* les bactéries présentes sur les semences ne sont pas une source d'inoculum primaire dans l'épidémie de la pourriture de gaines à Madagascar malgré une survie transitoire sur la plantule.

Au stade adulte, Miyajima a mis en évidence la présence de *Pseudomonas fuscovaginae* dans la gaine paniculaire 8 jours avant le début de l'épidémie (Miyajima, 1983). Par contre, des pulvérisations à différents stades sur feuilles et gaines avant gonflement ont montré qu'une survie épiphyte transitoire du pathogène est possible mais très variable, le pathogène disparaissant bien avant le stade gonflement (Miyajima, 1983 ; Ntibishimirwa, 1991). Il n'y a donc pas de démonstration d'une installation du pathogène durant les stades antérieurs au stade réceptif. Les résultats présentés dans le chapitre II sur les temps d'incubation permettent d'avancer que les populations mises en évidence par Miyajima 8 jours avant l'épidémie ne témoignent pas d'une installation précoce du pathogène.

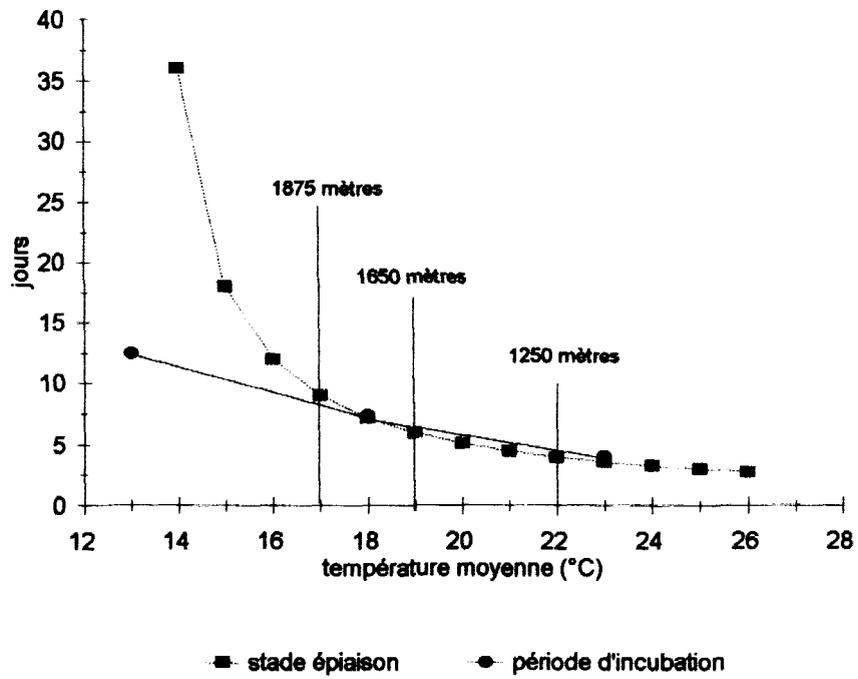


Figure 6 Durée estimée du stade épiaison et durée mesurée de la période d'incubation en fonction de la température moyenne.

En conditions contrôlées le stade le plus sensible de la gaine paniculaire à *Pseudomonas fuscovaginae* est le stade gonflement par dépôt sur la face interne de la gaine paniculaire (cf chapitre II). Nous n'avons pas mis en évidence d'isolats pathogènes dans les prélèvements de gaines paniculaires saines au stade gonflement. De plus, le stade réceptif mis en évidence au champ est le stade épiaison correspondant à l'ouverture de la gaine paniculaire lors de l'exertion de la panicule. Il existe donc une discordance entre le maximum de sensibilité de la gaine paniculaire en conditions contrôlées et sa réceptivité au champ. Des études menées par pulvérisation du pathogène sur des gaines de talles à différents stades ont montré que seules les pulvérisations au stade épiaison permettaient l'expression de la maladie (Jaunet, 1989 ; Miyajima, 1983). Ces différents résultats permettent donc d'émettre l'hypothèse que l'installation de la bactérie dans la gaine paniculaire lors du stade épiaison se réalise par des phénomènes de pulvérisation du type "splash". La conséquence principale de cette hypothèse est donc que la probabilité de l'installation du pathogène est dépendante de la durée du stade réceptif.

Le cycle de développement des variétés du type japonica est en grande partie dépendant de la somme des températures (Barbier, 1994). La durée du stade réceptif en jour varie donc en fonction de la température. Sachant que pour la variété Latsidahy la somme des degré-jours durant laquelle une talle est au stade épiaison est de 36 degré-jours avec une base de 13°C, la durée en jour en fonction de la température moyenne peut être estimée. La figure 6 permet de mettre en évidence l'augmentation de la durée du stade réceptif de la variété Latsidahy avec la diminution de la température moyenne : à 25°C une talle est réceptive durant 3 jours alors qu'à 15°C elle l'est pendant 18 jours. Cette estimation implique donc que la durée du stade réceptif augmente avec l'altitude. Cette estimation permet aussi de mettre en évidence qu'aux températures inférieures à 17°C, la durée du stade réceptif est supérieure à la durée du temps l'incubation du pathogène : à ces températures les symptômes de pourritures brunes apparaîtraient, donc, durant l'exertion de la panicule. Cette hypothèse pourrait expliquer l'augmentation de blocage paniculaire avec l'altitude observée à Madagascar et au Burundi (Déchanet *et al.*, 1990 ; Détry, 1994). Afin de confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'analyser la dynamique de l'hôte et de la maladie en haute altitude.

Nous avons mis en évidence dans le chapitre II que l'expression du pouvoir pathogène de *Pseudomonas fuscovaginae* est défavorisée par les basses températures. Cette conclusion apparaît en contradiction avec les résultats épidémiologiques mettant en évidence une augmentation de l'incidence avec l'altitude. Cette contradiction est basée sur l'hypothèse d'un effet positif de la

température sur le pathogène au champ. Par contre, cette contradiction disparaît si l'on émet l'hypothèse que la température agit indirectement sur la maladie en augmentant la durée du stade réceptif, donc la probabilité de contamination.

Qui et Combien (qualité et quantité de l'inoculum primaire). Notre étude sur la caractérisation de *Pseudomonas fuscovaginae* permet de conclure qu'à Madagascar quelle que soit la localité, les talles au stade réceptif peuvent être contaminées par des isolats génétiquement différents. A Vinaninony (1875 mètres), nous avons mis en évidence 2 génotypes de *P. fuscovaginae* et 3 d'autres *Pseudomonas* fluorescents, et à Faratsiho, 3 génotypes de *P. fuscovaginae* et 2 d'autres *Pseudomonas* fluorescents. Mais, l'étude de la virulence des différents isolats permet de distinguer les espèces pathogènes (majoritairement *P. fuscovaginae*) des espèces opportunistes et de mettre en évidence une variabilité chez *P. fuscovaginae*. Il apparaît donc que l'inoculum primaire potentielle est génétiquement et pathogéniquement diversifié. Une étude de plusieurs souches de *X. campestris* isolées de citrus et diverses plantes ornementales a permis de mettre en évidence une importante diversité génétique et du pouvoir pathogène sur citrus (Graham *et al.*, 1990). Les auteurs supposent que les souches les plus pathogènes constituent la source principale d'inoculum primaire des épidémies du chancre bactérien sur citrus.

On peut donc émettre l'hypothèse que *P. fuscovaginae* représente l'espèce principale de l'inoculum primaire efficace. Mais il demeure important de poursuivre la détermination précise de la part de chacune des espèces dans l'inoculum primaire.

La quantité d'inoculum primaire présent au champ est difficile à estimer étant donné la diversité des sources potentielles (Rapilly, 1991). Mais cette diversité de sources et l'isolement de bactéries pathogènes à partir d'un faible nombre d'échantillons d'eau d'irrigation permet de supposer que la quantité d'inoculum primaire présent dans le milieu n'est pas un facteur limitant au développement des épidémies en altitude. Par contre, il apparaîtrait d'un grand intérêt de pouvoir quantifier *Pseudomonas fuscovaginae* en moyenne et basse altitude afin de déterminer si l'absence d'épidémie dans ces régions peut aussi être expliquée par une faible quantité ou une absence d'inoculum.

Moyens de lutte. Les deux facteurs principaux de l'épidémiologie de la pourriture des gaines sont donc l'inoculum primaire et la durée du stade réceptif. Les stratégies de lutte doivent donc

être envisagées en fonction de ces deux facteurs. Dans le cas des épidémies monocycliques, les méthodes de lutte se portent essentiellement sur la réduction de l'inoculum primaire (Rapilly, 1991). Cette réduction est possible d'une part lorsque les sources d'inoculum sont identifiées et d'autre part lorsque ces sources sont limitées. Lorsqu'une transmission par les semences est clairement établie, un traitement de semences permet de contrôler ou d'éradiquer la maladie (Rapilly, 1991 ; Zadocks & Schein, 1979). Dans le cas de *Pseudomonas fuscovaginae*, il apparaît difficile d'envisager une réduction importante de l'inoculum étant donné l'ubiquité du parasite. Des expérimentations menées au Burundi sur la destruction des résidus de récolte n'ont pas permis de diminuer l'incidence de la pourriture des gaines (Ntibishimirwa, 1991). Le second point sur lequel peut s'appuyer une stratégie de lutte est la réduction des contaminations. Au Japon des essais de traitements au stade gonflement-épiaison par pulvérisation d'un mélange de streptomycine (15%) et d'oxytétracycline (1,5%) ont permis de réduire l'incidence (Miyajima, 1983). Mais le coût d'un tel traitement et la forte probabilité d'apparition rapide de résistance aux antibiotiques rendent l'intérêt de ce type de lutte assez limité. La résistance variétale reste la dernière stratégie envisageable. Dans notre étude, nous avons analysé le comportement de différentes variétés issues ou non de hautes altitudes. Pour les variétés Latsidahy et Rojofotsy 1285 l'augmentation d'altitude affecte le remplissage des grains ainsi que leur fécondité. Mais la variété Latsidahy malgré une incidence identique ou supérieure à la variété Rojofotsy 1285 présente des rendements supérieurs en altitude. Des études menées au Burundi et au Japon ont mis en évidence que les attaques sur panicules sont corrélées aux attaques sur gaines (Détry, 1994 ; Miyajima, 1983). L'incidence sur gaine peut donc être considérée comme un critère de mesure de l'incidence sur panicule. Le type de résistance mis en évidence pour la variété Latsidahy peut être comparé à la tolérance définie par Schafer comme la capacité d'une variété comparée à une autre de présenter une perte de rendement plus faible malgré une multiplication identique du pathogène (Schafer, 1971). Cette hypothèse est confirmée par les résultats du chapitre II mettant en évidence que la variété Latsidahy ne diffère pas pour la dynamique du pathogène *in planta* de la variété de moyenne altitude Dourado précoce. Le concept de tolérance demeure imprécis et controversé (Gaunt, 1981 ; Jeger *et al.*, 1985 ; Nelson, 1973). La tolérance est généralement dissociée de la résistance quantitative et s'apparente à un mécanisme de compensation. Gaunt (1981) émet l'hypothèse que la tolérance à une maladie est un caractère fortement polygénique, non spécifique qui est inhérent à un contexte de culture (agronomiques, climatiques) et qui n'a pas de relation directe avec la maladie. On peut donc émettre l'hypothèse

que la tolérance à *Pseudomonas fuscovaginae* de la variété Latsidahy serait l'expression d'une tolérance aux basses températures. Une tolérance aux fontes de semis dues aux champignons du sol (*Fusarium* spp, *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp.) est associé à une tolérance aux basses températures chez le haricot et le coton (Nelson, 1973).

Les programmes d'amélioration variétale basé sur des géniteurs du type Latsidahy n'ont pas permis d'améliorer la résistance aux pourritures de gaines des descendances à Madagascar. Cela peut s'expliquer par le caractère non spécifique des mécanismes de tolérance. Les variétés du groupe Latsika n'apparaissent donc pas être des géniteurs potentiels pour la résistance à *Pseudomonas fuscovaginae* de part leur faible variabilité génotypique (Déchanet *et al.*, 1990) imputable à leur adaptation aux conditions limites de la riziculture. Dans le cadre d'une recherche de résistance au parasite, il serait, donc, nécessaire d'élargir la base génétique des géniteurs. L'étude ces variétés devrait être initiée en conditions contrôlées à température moyenne afin de pouvoir dissocier l'action du parasite de celle du froid. De plus, nous avons montré qu'à ces températures les processus d'expression du pouvoir pathogène de *P. fuscovaginae* sont favorisés.

Une première stratégie variétale pour la résistance à *Pseudomonas fuscovaginae* pourrait être l'esquive qui est définie comme une réduction de la pénétration ou du contact du pathogène sur l'hôte (Nelson, 1973 ; Rاپilly, 1991). Ce type de résistance est non spécifique et passive. Cette stratégie pourrait être basée sur la recherche de caractères limitants la pénétration du pathogène dans les tissus de la gaine paniculaire. Cette limitation de la pénétration pourrait reposer sur une diminution du nombre de stomates sur la face abaxial de la gaine paniculaire (Tsunoda, 1984) ou sur une diminution des mouvements de pathogène sur l'hôte par une augmentation de l'hydrophobicité de la cuticule (Juniper, 1991).

Une esquive par réduction de contact entre l'hôte et le parasite s'est montré efficace pour la lutte contre *Ustilago nuda* sur orge (Nelson, 1973). Dans cette interaction, l'esquive est basée sur une auto-pollinisation à l'intérieur de la gaine paniculaire permettant à l'hôte de ne plus être réceptif lors de l'épiaison. Dans le cas de la pourriture des gaines, une esquive pourrait être basée sur une réduction de la période réceptive par une augmentation de la vitesse d'épiaison ou une absence d'épiaison. Des travaux menés en Inde sur l'exertion paniculaire de variétés de riz tolérantes au froid ont mis en évidence que le caractère de l'exertion est sous le contrôle d'un gène dont l'allèle dominante permet une exertion complète de la panicule en condition de basses températures (Mahishi *et al.*, 1990). Au sud-ouest du Népal, la variété Gamadi est caractérisée

par une absence d'épiaison et un maintien de la panicule dans la gaine paniculaire jusqu'à la fin du cycle végétatif du riz (Heu & Shrestha, 1986). L'analyse génétique met en évidence que ce caractère est contrôlé par 2 gènes dominants complémentaires. Bien que les qualités agronomiques d'une telle variété restent à vérifier, des croisements entre cette variété et les variétés d'altitude de Madagascar permettraient d'étudier l'efficacité d'un tel caractère pour la lutte contre les pourritures des gaines.

Une seconde stratégie pourrait s'appuyer sur la recherche de résistances actives, s'exprimant durant la phase pathogène du cycle du parasite. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la production de la syringotoxine et de leur régulation par des facteurs de l'hôte dans l'interaction *Pseudomonas fuscovaginae*/riz permettrait d'orienter la recherche des géniteurs potentiels.

Mais il apparaît que quelle que soit la stratégie envisagée, le nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de résistance doit être limité pour permettre leur gestion avec les mécanismes polygéniques de tolérance au froid des types Latsika.

CONCLUSION GENERALE

La pourriture brune des gaines du riz est une maladie connue depuis 1970 dans les régions d'altitude de Madagascar (Notteghem, communication personnelle). Mais l'agent causal de cette maladie, *P. fuscovaginae*, ne fut déterminé qu'en 1989, 13 ans après sa première description au Japon. Les études récentes menées en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud ont montré que la distribution géographique de la pourriture brune des gaines est associée aux basses températures en fin de cycle de culture du riz. La faiblesse relative des surfaces concernées par la maladie et la récente détermination de l'agent pathogène furent des facteurs qui limitèrent le nombre des recherches entreprises sur la pourriture brune des gaines. Dans le cadre d'un projet financé par la Communauté Européenne sur la riziculture d'altitude, un programme de création variétale a été initié à Madagascar en 1983. Un des principaux aspects de ce programme est l'élaboration de variétés résistantes à la pourriture brune des gaines. Mais les connaissances sur la maladie n'ont pas permis de créer des variétés améliorées pour la résistance par rapport aux variétés locales. Il est donc apparu nécessaire d'approfondir les connaissances sur *P. fuscovaginae* et sur ses relations avec le riz afin d'orienter les programmes d'amélioration variétale.

Les études précédentes menées sur la caractérisation de *P. fuscovaginae* faisaient état de la présence d'autres espèces bactériennes isolées de pourriture de gaines et proches physiologiquement de *P. fuscovaginae*. Il semblait donc essentiel de déterminer la diversité phénotypique et génétique des espèces présentes afin d'évaluer la singularité de *P. fuscovaginae*. Une analyse phylogénétique de ces espèces basée sur l'ADNr 16S nous a permis de montrer que l'agent pathogène constitue un groupe phylogénétique différencié des autres espèces opportunistes ou pathogènes isolées de pourriture de gaines du riz de hautes et basses altitudes. Cette différenciation est confirmée par les caractérisations sérologique et pathogénique de *P. fuscovaginae*. Nous avons aussi pu mettre en évidence par ces méthodes une variabilité au sein de cette espèce. Mais cette première étude ne permet pas de relier la diversité génétique à l'origine géographique des isolats ou à leur variabilité sérologique ou pathologique. Il apparaît nécessaire d'approfondir la structure génétique des populations de *P. fuscovaginae* à l'aide de marqueur moléculaire plus adapté à l'analyse de la diversité intra-spécifique. L'agent pathogène

a été décrit dans des régions de riziculture traditionnelle (Madagascar, Népal, Japon) mais aussi dans des zones géographiques où l'implantation de la riziculture est récente (Afrique Centrale, Amérique du Sud). L'analyse de la structure des populations de *P. fuscovaginae* pourrait permettre d'émettre des hypothèses sur l'origine et l'évolution des populations présentes dans ces différentes régions.

Dans le cadre d'une étude des relations entre *P. fuscovaginae* et le riz, il apparaissait fondamental de comprendre l'influence de la température sur les processus d'expression du pouvoir pathogène. Notre étude sur les conditions d'expression du pouvoir pathogène de *P. fuscovaginae* montre que les basses températures agissent négativement sur les différents paramètres du processus de pathogénie : pénétration dans les tissus l'hôte, taux de multiplication *in planta* et croissance des symptômes. Au contraire l'analyse épidémiologique réalisée à Madagascar met en évidence une augmentation de l'incidence de la pourriture des gaines avec l'altitude. Afin de comprendre la distribution de la maladie en haute altitude, nous avons étudié, à 1650 mètres d'altitude, la dynamique au cours du temps de la pourriture des gaines au sein de la population hôte. Cette étude permet de conclure que l'épidémie de pourriture de gaine est monocyclique et dépendante de l'évolution du stade réceptif de l'hôte. La durée du stade réceptif étant négativement corrélée à la température, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la distribution de la pourriture des gaines s'explique par l'augmentation de la durée du stade réceptif de l'hôte. Bien que cette hypothèse suffit à expliquer la relation entre la maladie et l'altitude, il apparaît nécessaire de déterminer si la quantité d'inoculum primaire peut aussi être un facteur limitant de l'épidémie.

Les conclusions de notre étude sur la pourriture brune des gaines du riz permettent d'envisager une orientation générale pour l'amélioration du riz d'altitude pour la lutte contre la pourriture des gaines. De part la nature des épidémies, le contrôle de la maladie pourrait être basée sur une réduction de la durée de la période réceptive de l'hôte ; néanmoins, à plus long terme, la recherche de sources de résistance devrait être envisagée. Notre étude devra aussi être élargie aux autres pourritures de gaines bactériennes mises en évidence en basse altitude. Il faudra tout d'abord d'approfondir la caractérisation des différentes espèces mises en jeu. L'étude de l'évolution de la maladie provoquée par ces espèces et du développement de l'hôte dans ces régions permettrait de comparer les paramètres de ces épidémies à ceux mis en évidence en hautes altitudes.

BIBLIOGRAPHIE

- Alvarez, A.M., and Lou, K., 1985.** Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. *Plant Dis.* **69** : 1082-1086.
- Avrameas, S., 1969.** Coupling of enzyme with glutaraldehyde. Use of the conjugate for detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* **6** : 43-52.
- Barbier, J.M., 1994.** Elaboration du rendement chez le riz. In: *Elaboration du Rendement des Principales Cultures Annuelles*, Combe & Picard (ed.). INRA, Paris, 53-72.
- Barrett, E.L., Solanes, R.E., Tang, J.S., and Palleroni, N.J., 1986.** *Pseudomonas fluorescens* biovar V : its resolution into distinct component groups and the relationships of these groups to other *P. fluorescens* biovars, to *P. putida*, and to psychrotrophic Pseudomonads associated with food spoilage. *J. Gen. Microbiol.* **132** : 2709-2721.
- Bashan, Y., 1987.** Mechanisms of symptoms production by foliar bacterial pathogens. *Phytoparasitica* **3** : 197-223.
- Benedict, A.A., Alvarez, A.M., Berstecky, J., Imanaka, W., Mizumoto, C.Y., Pollard, L.W., Mew, T.W., and Gonzalez, C.F., 1989.** Pathovar-specific monoclonal antibodies for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*. *Phytopathology* **79** : 322-328.
- Blakeman, J.P., 1992.** Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathol.* **42** : 479-493.
- Boccara, M., Vedel, R., Lalo, D., Lebrun, M.H., and Lafay, J.F., 1991.** Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4** : 293-299.
- Bowman, J., and Sequiera, L., 1981.** Evaluation of resistance in potato to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **71** : 204.
- Brygoo, Y., 1991.** Vers une nouvelle définition de l'espèce chez les champignons ? *Phytoma* **430** : 27-30.
- Chabanne, A., et Rollin, D., 1990.** L'environnement et la riziculture d'altitude à Madagascar. In : *Contraintes Liées à la Riziculture d'Altitude et Amélioration variétale*, Bouharmont & Tilquin (ed.), CTA, Bujumbura, Burundi, 29-48.
- Chen, J., Chang, C.J., Jarret, R.L., and Gawel, N., 1992.** Genetic variation among *Xyllela fastidiosa* strains. *Phytopathology* **82** : 973-977.
- Civerolo, E.L., 1975.** Quantitative aspects of pathogenesis of *Xanthomonas pruni* in peach leaves. *Phytopathology* **65** : 258-264.
- Clark, M.F., 1981.** Immunosorbent assay in plant pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* **19** : 83-106.

- Cook, D., Barlow, E., and Sequeira, L., 1989.** Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* : detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Molec. Plant-Microbe Interact.* **2** : 113-121.
- Dagnelie, 1975.** Théorie et méthodes statistiques. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgique, 463 p.
- Déchanet, R., Ravatomanga, J., et Rakotonirainy, 1990.** L'amélioration variétale du riz d'altitude à Madagascar. In : Contraintes Liées à la Riziculture d'Altitude et Amélioration Variétale, Bouharmont & Tilquin (ed.), CTA, Bujumbura, Burundi, 49-53.
- Delp, B.R., Stowell, L.J., and Marois, J.J., 1986a.** Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. *Phytopathology* **76** : 1299-1305.
- Delp, B.R., Stowell, L.J., and Marois, J.J., 1986b.** Field runner : a disease incidence, severity, and spatial pattern assessment system. *Plant Dis.* **70** : 954-957.
- DeParasis, J., and Roth, D.A., 1990.** Nucleic acid probes for identification of phyto-bacteria : identification of genus-specific 16S rRNA sequences. *Phytopathology* **80** : 618-621.
- Detry, J.F., 1994.** Protection intégrée contre la pyriculariose et la pourriture brune des gaines foliaires du riz en moyenne altitude au Burundi. Doctorat en Sciences Agronomiques, Université Catholique de Louvain (Belgique), 212 p.
- Dristig, M.C.G., and Dianese, J.C., 1990.** Characterisation of *Pseudomonas solanacearum* biovars based on membrane protein patterns. *Phytopathology* **80** : 641-646.
- Duveiller, E., and Maraite, H., 1990.** Bacterial sheath rot of wheat caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the highlands of Mexico. *Plant Dis.* **74** : 932-935.
- Duveiller, E., Miyajima, K., Snacken, F., Autrique, A., and Maraite, H., 1988.** Characterization of *Pseudomonas fuscovaginae* and differentiation from other fluorescent Pseudomonad occurring on rice in Burundi. *J. Phytopathol.* **122** : 42-45.
- Duveiller, E., Snacken, F., Maraite, H., 1989.** First detection of *Pseudomonas fuscovaginae* on maize and sorghum in Burundi. *Plant Dis.* **73** : 514-517.
- Ercolani, G.L., 1984.** Infectivity titration with bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22** : 35-52.
- FAO, 1982.** Quaterly Bulletin of Statistics. **6** : 19-22.
- Felsenstein, 1990.** PHYLIP version 3.42, University of Washington.
- Finney, 1952.** PROBIT Analysis. The University Press, Cambridge, 318 p.
- Fitch, W.M., and Margoliasch, E., 1967.** Construction of phylogenetic trees. *Science* **155** : 279-284.

Fitt, B.D.L., McCartney, H.A., and Walklate, P.J., 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27** : 241-270.

Forster, R.L., and Echanti, E., 1973. Relation of age of plants, temperature, and inoculum concentration to bacterial canker development in resistant and susceptible *Lycopersicon* spp. *Phytopathology* **63** : 773-777.

Fryda, S.J., and Otta, J.D., 1978. Epiphytic movement and survival of *Pseudomonas syringae* on spring weath. *Phytopathology* **68** : 1064-1067.

Gabriel, D.W., Hunter, J.E., Kingsley, M.T., Miller, J.W., and Lazo, G.R., 1988. Clonal population structure of *Xanthomonas campestris* and genetic diversity among citrus canker strains. *Molec. Plant-Microbe Interact.* **1** : 59-65.

Gaunt, R.E., 1981. Disease tolerance-an indicator of thresholds ? *Phytopathology* **71** : 15-16.

Girard, J.C., Nicole, J.F., and Cheron, J.J., 1992. A disease of garlic caused by a fluorescent Pseudomonads closely related to *Pseudomonas fuscovaginae*. International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Versailles, France.

Goto, M., Zeigler, R.S., and John, V.T., 1988. Progress in seed health research on seedborn and contaminant bacteria, viruses, and nematodes. In : Proceedings of the International Workshop on Rice Seed Health, IRRI (ed.), IRRI, Manila (Philippines), 131-142.

Graham, J.H., Hartung, J.S., Stall, R.E, and Chase, A.R., 1990. Pathological, restriction length polymorphism, and fatty acids profil relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts. *Phytopathology* **80** : 829-836.

Grimond, F., and Grimond, P.A.D., 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **137B** : 165-175.

Grondeau, C., Saunier, M., Poutier, F., and Samson, R., 1992. Evaluation of physiological and serological profiles of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* for pea blight identification. *Plant Pathol.* **41** : 495-505.

Gross, D.C., 1991. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **29** : 247-278.

Gross, D.C., and DeVay, J.E., 1977. Population dynamics and pathogenesis of *Pseudomonas syringae* in maize and cowpea in relation to the in vitro production of syringomycin. *Phytopathology* **67** : 475-483.

Hardie, G., and Van Regenmortel, M.H.V., 1977. Isolation of specific antibody under conditions of low ionic strength. *J. Immunological Methods* **15** : 305-314.

Hayward, A.C., 1974. Latent infection by bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **12** : 87-97.

- Heu, M.H., and Shrestha, G.,** 1986. Genetic analysis of sheathed panicle in a nepalese rice cultivar gamadi. In : Proceedings of the International Rice Genetics Symposium, IRRI (ed.), IRRI, Manila (Philippines), 317-322.
- Hillis, D.M., and Dixon, M.T.,** 1991. Ribosomal DNA : molecular evolution and phylogenic inference. The quaterly review of biology **66** : 411-446.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D.,** 1991. Bacterial community dynamics. In: Microbial Ecology of Leaves, Andrews & Hirano (ed.), Springer-Verlag, New York, 271-294.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D.,** 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. Annu. Rev. Phytopathology **28** : 155-177.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D.,** 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. **21** : 243-269.
- In-Keum, P., and Tsunoda, S.,** 1979. Effect of low temperature on chloroplast structure in cultivars of rice. Plant and Cell Physiol. **20** : 1449-1453.
- Ishimaru, C., Eskridge, K.M., and Vidaver, A.K.,** 1991. Distribution analyses of naturally occuring epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* on dry beans. Phytopathology **81** : 262-268.
- Jaunet, T.,** 1991. Volet Phytopathologie. rapport annuel du projet CEE TSD2-0046B, IRAT/FO.FI.FA.
- Jaunet, T.,** 1990. Diagnostic et résistance variétale du riz (*Oryza sativa*) à *Pseudomonas fuscovaginae*, agent de la pourriture brune de la gaine. Rapport d'Activité, CIRAD, Montpellier, France.
- Jaunet, T.,** 1989. Relation entre le riz et *Pseudomonas fuscovaginae*, agent de la pourriture brune de la gaine. DEA de Phytopathologie, Université Paris XI, 19 p.
- Jeger, M.J., and Groth, J.V.,** 1985. Resistance and pathogenicity : epidemiological and ecological mechanisms. In : Mechanisms of Resistance to Plant Disease, S. Fraser (ed.). Nijhoff & Junk, Dordrecht (Neth.), 310-372.
- Juniper, B.E.,** 1991. The leaf from the inside and the outside : a microbe's perspective. In : Microbial Ecology of Leaves, Andrews & Hirano (ed.). Springer-Verlag, New York, 21-42.
- Kishitani, S., and Tsunoda, S.,** 1974. Effect of low and high temperature pretreatment on leaf photosynthesis and transpiration in cultivars of *Oryza sativa*. Photosynthetica **8** : 161-167.
- Laguerre, G., Riggotier-gois, L., and Lemanceau, P.,** 1994. Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/restriction fragment analysis of 16S rDNA. Molec. Ecol. **3** : 479-487.

- Leach, J.E., Rhoads, M.L., Vera Cruz, C.M., White, F.F., Mew, T.W., and Leung, H.,** 1992. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 2188-2195.
- Leben, C.,** 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **3** : 209-230.
- Leung, H., Nelson, R.J., and Leach, J.E.,** 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Advances in Plant Pathol.* **10** : 157-205.
- Li, X., Dorsch, M. Del Dot, T., Sly, L.I., Stackebrandt, E., and Hayward, A.C.,** 1993. Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA sequences. *J. Appl. Bacteriol.* **74** : 324-329.
- Lindemann, J., Arny, D.C., and Upper, C.D.,** 1984. Use of an apparent infection threshold population of *Pseudomonas syringae* to predict incidence and severity of brown spot of bean. *Phytopathology* **74** : 1334-1339.
- Lindemann, J., Constantinidou, H.A., Berchet, W.R., and Upper, C.D.,** 1982. Plant as source of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** : 1059-1063.
- Lindemann, J., and Upper, C.D.,** 1985. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **50** : 1229-1232.
- Lindow, S.E.,** 1991. Determinants of epiphytic fitness in bacteria. In : *Microbial Ecology of Leaves*, Andrews & Hirano (ed.). Springer-Verlag, New York, 295-314.
- Lum, K.Y., and Kelman, A.,** 1981. Infectivity titrations of *Pseudomonas solanacearum* on tomato. *Phytopathology* **71** : 891.
- Maes, M.,** 1993. Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. *FEMS Microbiol. Lett.* **113** : 161-166.
- Mahishi, D.M., Mahadevappa, M., and Gopala Reddy, P.,** 1990. Inheritance of panicle exertion in *Oryza sativa* under low temperature. In : *Proceedings of the Second International Rice Genetics Symposium*, IRRI (ed.), IRRI, Manila, 175-178.
- Mazarei, M., Reza Hajimorad, M. and Kerr, A.,** 1992. Specificity to polyclonal antibodies to different antigenic preparations of *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* strain UQM551 and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain L. *Plant Pathol.* **41** : 437-443.
- McLaughlin, R.J., and Chen, T.A.,** 1990. ELISA methods for plant pathogenic prokaryotes. In : *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens*, Hampton & De Boer (ed.). APS Press, 197-204.
- Mew, T.W., Vera de Cruz, C.M., and Reyes, R.C.,** 1982. Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and resistant rice cultivar. *Phytopathology* **72** : 786-789.

- Miller, J.C.**, 1990. RESTSITE, programs for analyzing restriction sites or fragment data. 1.1. University of Wisconsin, Madison,
- Miyajima, K.**, 1983. Studies on the sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae*. Activity Report, Hokkaido Prefectural Agricultural Experimental Station.
- Miyajima, K., Tanii, A., Akita, T.**, 1983. *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov. rev. International J. System. Bacteriol. **33** : 656-657.
- Mogen, B.D., Olson, H.R., Sparks, R.B., Gudmestad, N.C., and Oleson, A.E.**, 1990. Genetic variation in strains of *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* : polymorphisms in restriction fragments containing a highly repeated sequence. Phytopathology **80** : 90-96.
- Nei, M.**, 1987. Molecular Evolutionary Genetics. University Press, Columbia, 512p.
- Nelson, R.R.**, 1973. Breeding Plant to Disease Resistance. The Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, 402 p.
- Nieves Mortensen, G., Manandhar, H.K., Cahyaniati, Haryanti, S.E.**, 1992. Pathogenic bacteria associated with rice seeds samples from Nepal and Indonesia. In: International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Versailles, France.
- Ntibishimirwa, M.**, 1991. Epidémiologie de la pourriture brune de la gaine foliaire du riz causée par *Pseudomonas fuscovaginae* au Burundi. Doctorat en Sciences Agronomiques, Université Catholique de Louvain (Belgique), 119 p.
- O'Brien, R.D., and Lindow, S.E.**, 1989. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. Phytopathology **79** : 619-627.
- Ou, S.H.**, 1985. Rice disease. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, 380 p.
- Palleroni, 1984.** *Pseudomonas*. In : Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, Krieg (ed.). Williams & Wilkins, Baltimore USA, 141-199.
- Pelsser, S., Ewbank, E., and Maraité, H.**, 1992. Production of syringotoxin by *Pseudomonas fuscovaginae*. In : International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Versailles, France.
- Pfender, W.F.**, 1982. Monocyclic or polycyclic root diseases : distinguishing between the nature of the disease cycle and the shape of the disease progress curve. Phytopathology **72** : 31-32.
- Populer, C.**, 1978. Changes in host susceptibility with time. In : Plant Disease, vol. II, Harsfall & Cowling (ed.). Academic Press, New York, 239-262.
- Quigley, N.B., and Gross, D.C.**, 1994. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* : conservation of the syrB and syrD genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. Molec. Plant-Microbe Interact. **7** : 78-90.

- Rabary, E., Noyer, J.L., Benayer, P., Arnaud, M., and Glaszmann, J.C., 1989.** Variabilité génétique du riz (*Oryza sativa* L.) à Madagascar ; origine de types nouveaux. *L'Agronomie Tropicale* **44** : 305-311.
- Rapilly, F., 1991.** L'épidémiologie en pathologie végétale : mycoses aériennes. INRA, Paris, 317 p.
- Rigottier-Gois, L., 1993.** Caractérisation spécifique et infraspécifique des *Pseudomonas* spp fluorescents par amplification enzymatique in vitro de l'ADN. DEA Ecologie Microbienne, Université Claude Bernard Lyon I, 31 p.
- Rivano, F., 1992.** La maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa. Etude, en conditions naturelles et contrôlées, des composants de la résistance partielle à *Microcyclus ulei* (P.Henn.) v.Ar. Doctorat en Sciences, Université Paris XI, 230 p.
- Robinson, J.N., and Callow, J.A., 1986.** Multiplication and spread of pathovar of *Xanthomonas campestris* in host and non-host plants. *Plant Pathol.* **35** : 169-177.
- Romantschuk, M., 1992.** Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30** : 225-243.
- Rott, P., Davis, M.J., and Baudin, P., 1994.** Serological variability in *Xanthomonas albilineans* causal agent of leaf scald disease of sugarcane. *Plant Pathol.* **43** : 344-349.
- Rott, P., Honnegger, J., and Notteghem, J.L., 1989.** Isolation of *Pseudomonas fuscovaginae* with a semi-selective medium. *IRRN* **14** : 29.
- Rott, P., Notteghem, J.L., and Frossard, P., 1989.** Identification and characterization of *Pseudomonas fuscovaginae*, the causal agent of bacterial sheath brown rot of rice, from Madagascar and other countries. *Plant Dis.* **73** : 133-137.
- Rott, P., Honnegger, J., Notteghem, J.L., and Ranomenjanahary, S., 1991.** Identification of *Pseudomonas fuscovaginae* with biochemical, serological and pathogenicity tests. *Plant Dis.* **75** : 843-846.
- Saitou, N., and Nei, M., 1987.** The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* **4** : 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989.** Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., 1977.** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 5463-5467.
- Satake, T., 1976.** Sterile-type cool injury in paddy rice plants. In: *Climate and Rice*, IRRI (ed.), Los Banos (Philippines), 281-300.
- Schafer, J., 1971.** Tolerance to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathology* **9** : 235-252.

- Schuster, M.L., and Coyne, D.P.**, 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **12** : 199-219.
- Second, G.**, 1986. Isozymes and Phylogenetic in *Oryza*. In : *Rice Genetics*, IRRI (ed.), Los Banos (Philippines), 27-40.
- Seem, R.C.**, 1984. Disease incidence and severity relationships. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22** : 133-150.
- Sénéchal, Y.**, 1987. L'antracnose de l'Hévéa, étude épidémiologique et recherche de moyens de lutte. Doctorat en Sciences, Université Paris XI, 241 p.
- Shahi, B.B., and Khush, G.S.**, 1986. Genetic analysis of cold tolerance in rice. In : *Rice Genetics*, IRRI (ed.), Los Banos (Philippines), 27-40.
- Shakya, D.D., and Manandhar, H.S.**, 1992. Bacterial sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Nepal. In : *International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Versailles, France.
- Shaner, G., Stromberg, E.L., Lacy, G.H., Barker, K.R., and Pirone, T.P.**, 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30** : 47-66.
- Smitley, D.R., and McCarter, S.M.**, 1982. Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and role of epiphytic populations and environmental conditions in disease development. *Plant Dis.* **66** : 713-717.
- Stackebrandt, E., Liesack, W., and Witt, D.**, 1992. Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene* **115** : 255-260.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., and Doudoroff, M.**, 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43** : 159-271.
- Tanii, A., Miyajima, K., and Akita, T.**, 1976. The sheath brown rot disease of rice and its causal bacterium *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov. *Annals of the phytopathological society of Japan* **42** : 540-548.
- Ternick, T., and Avrameas, S.**, 1987. *Techniques Immuno-Enzymatiques*. INSERM, Paris, 100p.
- Tsunoda, S.**, 1984. Adjustment of photosynthetic structures in three steps of rice evolution. In : *Biology of Rice*, Tsunoda & Takahashi (ed.). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 89-115.
- Van Der Plank, J.E.**, 1963. *Plant Diseases : Epidemics and Control*. APS, London, (UK), 349 p.
- Van Outryve, M.F., Cerez, M.T., De Cleene, M., Swings, J., and Mew, T.W.**, 1992. Pathogenic pseudomonads associated with sheath rot and grain discoloration. In : *International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Versailles, France.

Weisburg, W.G., Barns, M.S., Pelletier, D.A., and Lana, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. bacteriol.* **173** : 697-703.

Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51** : 221-271.

Young, J.M., Takikawa, Y., Gardan, L., and Stead, D.E., 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30** : 67-105.

Young, J.P.W., Downer, H.L., and Eardly, B.D., 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173** : 2271-2277.

Zadocks, J.C., and Schein, R.D., 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management.* Oxford University Press, Oxford, 427 p.

Zeigler, R.S., and Alavarez, E., 1990. Characteristics of *Pseudomonas* spp causing grain discoloration and sheath rot of rice, and associated Pseudomonad epiphytes. *Plant Dis.* **74** : 917-922.

Zeigler, R.S., and Alvarez, E., 1987. Bacterial sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America. *Plant Dis.* **71** : 592-597.

Zeigler, R.S., Hovos, E., and Aricapa, G., 1986. Nonrice hosts of the causal agent of bacterial sheath brown rot (BSBR) in Latin America. *IRRN* **5** : 19-20.

ANNEXES

ANNEXE 1

Milieu d'isolement et de caractérisation de *Pseudomonas fuscovaginae*

Milieu King B semi-sélectif :

Casamino acide (DIFCO)	20,0g
Glycérol	10,0g
K ₂ HPO ₄	1,5g
MgSO ₄	1,5g
Agar	15,0g
Eau distillée	1 litre

Ajuster le pH à 7,2 et autoclaver 15 mn à 121 °C.

Après autoclavage ajouter par litre :

Triméthoprim	20mg
Penicilline G	50mg
Bacitracine	20mg
Actidione (cycloheximide)	50mg
Cétrimide	100mg

Cytochrome C oxydase :

Après 24 heures de croissance sur milieu King B, faire une émulsion bactérienne avec une solution aqueuse à 1% de N,N-diméthyl-1,4-phénylènediamine dichlorhydrate. Frotter cette émulsion sur un papier filtre. Réaction positive si l'émulsion vire au rose-violet.

Milieu lévane :

Ajouter 5% poids/volume de sucrose au milieu nutrient agar (DIFCO). Faire un étalement par rayon. Réaction positive si la colonie présente un aspect bombé.

Milieu gluconate :

Tryptone	1,5g
Extrait de levure	1,0g
K ₂ HPO ₄	1,0g
Gluconate de sodium	40,0g
Eau distillée	1 litre

Ajuster le pH à 7 et autoclaver 15 mn à 121 °C.

Après 3 jours d'incubation à 28 °C, ajouter un volume de réactif de Benedict pour un volume de milieu. Chauffer 10 mn dans un bain marie à ébullition. Réaction positive si on observe un précipité brun orange.

Réactif de Benedict :

solution A :

citrate de sodium	173g
carbonate de sodium	100g
eau distillée	850ml

solution B :

sulfate de cuivre	18g
eau distillée	150ml

Ajouter la solution A à la solution B.

Milieu arginine :

Bactopeptone	1,0g
NaCl	5,0g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Rouge de phénol	10mg
L(+)-arginine	10,0g
Eau distillée	1 litre

Ajuster le pH à 7 et autoclaver 15 mn à 121°C. Après ensemencement recouvrir le milieu d'huile de paraffine. Réaction positive si entre 2 et 10 jours le milieu vire au rose.

Milieu minéral pour substrat carboné :

NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0g
KCl	0,2g
MgSO ₄	0,2g
Bleu de bromothymol	30mg
Agar	4,0g
Eau distillée	1 litre

Ajuster à pH 6,4-6,8 et autoclaver 15 mn à 121°C.

Préparation du substrat :

Faire une solution à 10% dans de l'eau distillée stérile,

Filtrer avec filtre à 0,2 µm (MILLIPORE) et déposer 2 gouttes sur le milieu.

Ensemencer avec une suspension bactérienne à 10⁸ ufc/ml.

Réaction positive si le milieu vire au jaune après 10 jours de croissance.

ANNEXE 2

Extraction des ImmunoGlobulines G par précipitation en condition de faible force ionique
(Hardie and Van Regenmortel, 1977).

Pour 1 ml de serum brut dont on ajuste le pH à 8 avec NaOH 0,1 M,

Elimination des Protéines de Hauts Poids Moléculaires autres que les IGg :

- Ajouter 3,5 ml de RIVANOL à 0,04% goutte à goutte sous agitation (14 mg de 2-éthoxy 6,9-diamino acridine lactate dans 3,5 ml d'eau, solution fraîche),
- Centrifuger 20-30 mn à 15000 rpm (sur SORVALL SS34) et récupérer le surnageant (S1),
- Reprendre le culot dans 3,5 ml d'eau,
- Centrifuger 20-30 mn à 15000 rpm et récupérer le surnageant (S2),
- Ajouter S1 et S2,
- Ajouter du Bromure de potassium saturé (>1g pour 1,5 ml) goutte à goutte jusqu'à précipitation du bromure de RIVANOL,
- Ajouter 15 gouttes du bromure de potassium après apparition du précipité,
- Centrifuger 30 mn à 15000 rpm et récupérer le surnageant,
- Ajuster le pH à 7 avec HCl 0,1M,

Précipitation des immuno globulines g :

- Ajouter 1 volume de sulfate d'ammonium 4M goutte à goutte sous agitation,
- Laisser reposer 30 mn à 4°C,
- Centrifuger 20 mn à 10000 rpm,
- Reprendre le culot dans 5 ml de sulfate d'ammonium 2M,
- Centrifuger 20 mn à 10000 rpm,
- reprendre le culot dans 5 ml de sulfate d'ammonium 2M,
- dialyser à 4°C contre du tampon phosphate salin (PBS) en changeant 3 fois le tampon,
- Faire le spectre entre 300 et 230 nm.

Préparation du conjugué à partir des IGg

Enzyme : phosphatase alcaline en solution (SIGMA), utiliser en poids 1,5 d'enzyme pour 1 d'IGg.

- Ajouter goutte à goutte l'enzyme aux IGg
- Ajouter le volume d'une solution de glutaraldéhyde à 1% pour obtenir une concentration finale de 0,06%
- Incuber 6 heures à 20°C
- Dialyser 24 heures à 4°C dans 500 ml de PBS
- Ajouter 10 mg/l de BSA (bovine séro albumine)
- Conserver à -20°C

Test ELISA DDAS

- 1) coating des IGg dans du tampon carbonate pH9.6 pendant une nuit à 37°C,
- 2) 4 lavages au Phosphate Buffer Saline à 0,5% de tween 20 (PBSt),
- 3) blocage à la Bovine Séro Albumine à 3% dans du tampon de coating pendant 2h à 37°C,
- 4) 4 lavages,
- 5) dépôt des échantillons dans du PBSt pendant 4h à 28°C sous agitation,
- 6) 4 lavages,
- 7) dépôt du conjugué dans du PBSt pendant une nuit à 4°C,
- 8) 4 lavages,
- 9) dépôt de p-nitrophényphosphate (SIGMA) dilué dans du tampon diéthanolamine ph 9,8 à raison de 250 µl par puits,
- 10) lecture de la densité optique à 405 nm.

Concentration d'IGg et dilution du conjugué :

Sérum	IGg (µg/ml)	Conjugué
GR2	1	1/500
6801	1	1/500

Tampon ELISA :

Carbonate :

Carbonate disodique	1,6g
Carbonate monosodique	3g
eau distillée	1l
ajuster le pH à 9,6	

PBS :

Phosphate disodique	2,9g
Phosphate monopotassique	0,2g
Chlorure de potassium	0,2g
Chlorure de sodium	8g
eau distillée	1l
ajuster le pH à 7,3	

Diéthanolamine :

98 ml de diéthanolamine dans 702 ml d'eau distillée
ajuster le pH à 9,8
compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

ANNEXE 3

Composition de la solution nutritive

Solution mère :

Eléments	Contrations
MgSO ₄	18,9 g/l
K ₂ SO ₄	11,7 g/l
KH ₂ SO ₄	13,4 g/l
NH ₄ NO ₃	0,8 g/l
Fer (chelonia)	40 ml/l
H ₂ SO ₄	60 ml/l

La solution mère est diluée à 2% pour obtenir la solution nutritive dont le pH est ajusté à 5,5.

ANNEXE 4

Clonage des produit de PCR dans *E. coli*

Les produits de PCR sont insérés dans le plasmide PGEMt (PROMEGA) selon le protocole du fournisseur.

Transformation de la souche DH5alpha d'*E. coli* :

- précultiver la souche une nuit en milieu SOB sous agitation à 37°C,
- ensemercer 35 ml de milieu SOB avec 250 µl de la préculture et incubé à 37°C jusqu'à obtention d'une DO de 0,5 à 600 nm,
- incubé la culture 15 mn dans la glace et centrifuger à 1000g pendant 10 mn à 4°C,
- reprendre la culot dans 2,4 ml de TFB froid avec 84 µl de DMSO et incubé 5 mn dans la glace,
- ajouter 84 µl de 2,mercapto-éthanol 0,7 M et incubé 10 mn dans la glace,
- ajouter 84 µl de DMSO et incubé 5 mn dans la glace,
- mélanger 200 µl de la culture avec 100 pg d'ADN et incubé 20 mn dans la glace, puis 5 mn à 37°C et enfin 10 mn dans la glace,
- étaler 100 µl de la solution sur boîte de Luria-Bertoni avec ampicilline, X-Gal et IPTG,
- incubé une nuit à 37°C et isoler les colonies blanches.

Milieu :

Milieu SOB :

Bactotryptone	20g
Extrait de levure	5g
NaCl	10mM
KCl	2,5mM
MgCl ₂	10mM
MgSO ₄	10mM
Eau distillée	qsp 1l

Milieu Luria-Bertoni :

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	10g
Eau distillée	1l

Séquençage de l'ADN cloné de l'isolat V10A

Méthode des didésoxynucléotides terminateurs de chaîne (Sanger, 1977) avec le kit Sequenase II (USB) :

- dénaturer l'ADN avec 40 µl de solution de dénaturation pendant 30 mn à 37°C,
- neutraliser avec 4 µl d tampon de neutralisation,
- précipiter l'ADN avec 120 µl d'éthanol absolu froid pendant 30 mn à -80°C,
- centrifuger 30 mn à 1000 g et rincer le culot avec de l'éthanol 70%,
- après séchage sous-vide, reprendre le culot dans 7 µl d'eau distillée stérile avec 2 µl de tampon 5x et 1 µl d'amorce (0,5 pmol/µl),
- hybrider à 65°C pendant 2 mn,
- refroidir à 35°C et ajouter 1 µl de DTT 1,1 M, 2 µl de solution de marquage (dCTP, dGTP

- et dTTP à 80 μmol), 0,5 μl de ^{35}S dATP, et 26 unités d'ADN polymérase du phage T7,
- incuber 3 à 5 mn à 37°C,
 - ajouter 2,5 μl de chaque ddNTP et incuber 3 mn à 37°C,
 - ajouter 4 μl de solution "stop",
 - dénaturer pendant 5 mn à 85°C,
 - déposer 3 μl de chaque solution sur gel polyacrylamide 6% à 8 M d'urée,
 - faire migrer 2 à 5 h à 1800 volts,
 - fixer le gel pendant 15 mn dans une solution d'acide acétique 10% et méthanol 10%,
 - sécher le gel sous-vide à 80°C et autoradiographier 1 nuit à température ambiante.

Maxipréparation de l'ADN plasmidique d'*E. coli*

- croissance une nuit à 37°C dans milieu Luria-Bertoni,

Lyse bactérienne :

- récupération des bactéries par centrifugation,
- lavage du culot dans 100 ml de tampon Tris EDTA (TE) et centrifugation
- reprendre le culot dans 37,5 ml de tampon saccharose Tris EDTA triton (STET) avec 10mg/ml de lysozyme et incuber 5 mn à température ambiante,
- placer la suspension 45 seconde dans de l'eau bouillante et la refroidir dans de la glace.

Récupération de l'ADN :

- centrifuger 20 mn à 1000 g et récupérer le surnageant dans un tube stérile,
- ajouter 2 volumes d'éthanol absolu froid et incuber 30 mn à -80°C,
- centrifuger 30 mn à 1000 g et rincer le culot avec de l'éthanol à 70%,
- après séchage du culot le reprendre dans 2,5 ml de tampon d'extraction avec 100 μl d'une solution de RNase à 10 mg/ml,
- incuber 30 min à 37°C,
- ajouter 500 μl de sarkosyl 20% et 300 μl de protéinase K à 10 mg/ml,
- incuber 4 heures à 55°C,

Purification de l'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de césium :

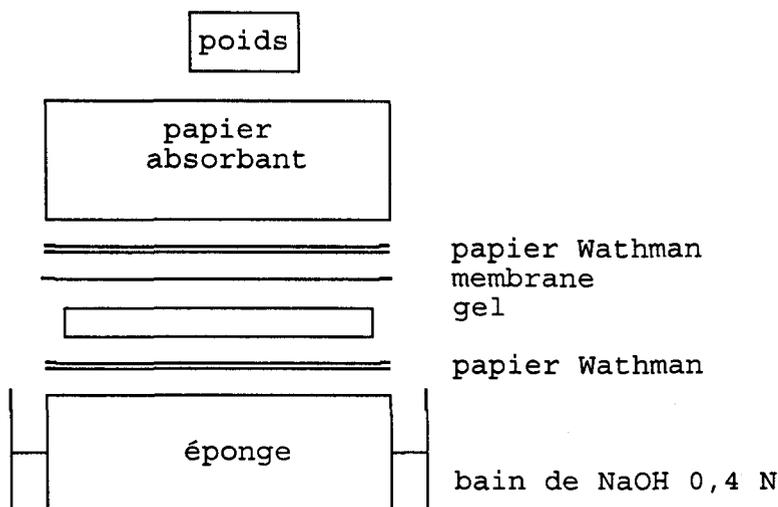
- pour chaque ml de solution d'ADN ajouter 100 μl de bromure d'éthyldium (BET) à 10mg/ml et 1,02 g de chlorure de césium,
- centrifuger à 290 000 g pendant 16 heures à 20°C sur un rotor vertical VTI65,
- récupérer la bande plasmidique,
- éliminer le BET par 5 lavages au butanol starué d'eau,
- éliminer le chlorure de césium par dialyse 48 h dans du tampon TE,
- après dialyse précipiter l'ADN avec 2 volumes d'éthanol absolu froid et incuber 30 mn à 80°C,
- centrifuger 30 mn à 1000 g et rincer le culot avec de l'éthanol à 70%,
- après séchage reprendre le culot dans de l'eau distillée stérile.

Tampons :

- TE : 50 mM TrisHCl, pH 7,9 ; 20 mM EDTA pH 7,9
- STET : 5% triton X-100 ; 20 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl pH 8 ; 235 mM saccharose
- Tampon d'extraction : 75 mM Tris-HCL ph 7,5 ; 90 mM EDTA ; 100 mM KCl

Transfert des produits de PCR sur membrane de nylon

- dépurifier l'ADN par incubation du gel dans un bain d'HCl 0,25 N pendant 10 mn ,
- rincer à l'eau distillée,
- dénaturer l'ADN par incubation du gel dans un bain de NaOH 0,4N pendant 30 mn,
- transférer sur membrane nylon HYBOND N⁺ (Amersham) selon le protocole suivant pendant une nuit :



- Après transfert, laver la membrane avec une solution de SSC 2x et sécher sur papier absorbant.

Hybridation

Ce protocole est adapté pour l'utilisation de tubes en verre de 250 ml et de four à hybridation avec rotation.

1. Préhybridation des membranes :

- Chaque membrane est roulée sur un intercalaire en nylon et introduite dans un tube.
- Ajouter 15 ml de tampon de préhybridation :

SSPE	2x
SDS	1%
Lait Gloria	1,5%

- Incuber 4 heures à 42°C.

2. Hybridation :

- Diluer la solution contenant la sonde marquée au dCT³²P dans 200 ml de TE.
- Incuber 5 minutes à 100°C, puis 5 minutes dans la glace.
- Mélanger la solution avec 10 ml de tampon d'hybridation :

SSPE	4x
Formamide	50%
SDS	1%
Lait Gloria	1,5%
Sperme de Hareng	25 ml

- Eliminer le tampon de préhybridation du tube et remplacer par la solution d'hybridation.

- Incuber pendant 16 heures à 42°C.

3. Lavages :

- Préchauffer toutes les solutions de lavage à 68°C.

- Eliminer le tampon d'hybridation du tube.

- Le lavage des membranes est réalisé à 68°C 2 fois 30 minutes dans du 2SSC, 30 minutes dans 2SSC, 0,1SDS et 30 minutes dans du 0,1SSC, 0,1SDS.

4. Déshybridation :

- Les membranes sont déshybridées par immersion dans du SDS 1% bouillant. Laisser refroidir à température ambiante avec agitation lente.

- Rincer les membranes dans du SSC 2x.

Tampons :

SSPE 20x :

NaCl 0,18M

EDTA 0,02M

NaH₂PO₄H₂O 0,01M

SSC 20x :

NaCl 0,150M

Citrate de sodium 0,015M

ANNEXE 5

Caractéristiques des différents isolats de pourritures de gaines
collectées à Madagascar et au Népal

Isolats de Madagascar

Localité	Année	Nom	Pouvoir pathogène	Profil biochimique
Vinaninony	1991	V1	+f	G7
		Vgr1.1	+f	G7
		Vgr1.3	-	/
		Vgr2	+f	G7
		V3	+	G1
		Vgr3	-	/
		V4.1	+f	G7
		V4.2	+	G1
		Vgr4.1	+f	G7
		Vgr4.2	-	/
		V5	+f	G7
		Vgr5.2	-	/
		V6	+f	G7
		V6'	+	G1
		Vgr6.1	-	/
		vgr6.2	+f	G7
		Vgr6.3	-	/
		Vgr6'.4	+f	G7
		Vgr6'.6	-	/
		V7.1	+	G1
		V7.2A	+f	G7
		V7.2B	+f	G7
		V7.3	+	G1
		V7.4A	+f	G11
		V7.4B	+f	G7
		V7.5	+f	G7
		V7.6	-	/
		V7.7	-	/
		V9	-	/
		Vgr9	-	/
		vgr9'	-	/
		V10	+f	G7
		V10'	+f	G3
		Vgr10.1	-	/
		Vgr10.2	+f	G7
		Vgr10'4A	-	/
		Vgr10'4B	-	/
		Vgr10'.5	+f	G7
		V11.1	-	/
		V11.2	-	/
V11'.3	+f	G4		
V11'.4	+f	G7		
V11'.5	-			
Vgr11.1	-			

Localité	Année	Nom	Pouvoir pathogène	Profil biochimique
Vinaninony	1992	V1A	+	G11
		V1B	+	G11
		V1C	+f	G7
		V2	+	G1
		V3A	+	G12
		V3B	+	G12
		V4A	+f	G7
		V4B	+	G7
		V5A	+	G7
		V5B	+	G7
		V6A	+	G1
		V6B	+	G1
		V7A	+f	G2
		V7B	+f	G2
		V8A	+f	G7
		V8B	+f	G7
		V9A	+	G1
		V9B	+	G7
		V9C	+	G1
		V10A	+	G1
V10B	+	G1		
Soanindrarinny	1992	Sd1.1	+	G7
		Sd1.2	-	/
		Sd2	-	/
		Sd2.1	-	/
		Sd2.2	-	/
		Sd3	-	/
		Sd4	+f	G2
		Sd4.1	-	/
		Sd4.2	-	/
		Sd5	-	/
		Sd6	-	/
		Sd6.1	+	G7
		Sd7.1	+f	G11
		Sd7.2	+	G1
		Sd7.3	+f	G11
		Sd7.4	+f	G2
		Sd8.1	+	G1
		Sd8.2	-	/
		Sd9.1	+	G7
		Sd9.2	+f	G11

Localité	Année	Nom	Pouvoir pathogène	Profil biochimique
Faratsiho	1991	Fgr1.1	-	/
		Fgr1.2	-	/
		Fgr2.1	+f	G5
		F2.2	+	G1
		F2.3	+f	G1
		Fgr2	+	G1
		F3	+	G1
		Fgr3	+	G1
		F4	+	G1
		Fgr4	+	G1
		F5	+	G1
		Fgr5	+	G1
		F6	-	/
		Fgr6	-	/
		F7.1	-	/
		F7.2	+	G1
		F7.3	+f	G7
		Fgr7.1	-	/
		Fgr7.2	+f	G7
		F8	-	/
Fgr8	-	/		
F9	+f	G7		
Fgr9.1	+f	G6		
Fgr9.2	+	G1		
F10	+f	G7		
Fgr10	-	/		
Sambaina	1991	Sbigr1	-	/
		Sbi2	-	/
		Sbigr2.1	-	/
		Sbigr2.2	-	/
		Sbi4	-	/
		Sbigr4	-	/
		Sbi5	-	/
		Sbigr5	-	/
		Sbi6	-	/
		Sbigr6	-	/
		Sbi7	+	G1
		Sbigr7	-	/
		Sbigr8	-	/
		Sbi9	+	G1
		Sbigr9.1	-	
		Sbigr9.2	-	
		Sbi10	-	
		Sbpgr1	-	
		Sbp2	+	G1
		Sbpgr2	+	G1
Sbp3.1	-			
Sbp3.2	+f	G7		
Sbp4	+f	G7		
Sbpgr4.1	+f	G7		
Sbpgr4.2	-			
Sbpgr5	-			

Localité	Année	Nom	Pouvoir pathogène	Profil biochimique
Sambaina	1992	S1A	-	/
		S1B	-	/
		S2A	+	G1
		S2B	-	/
		S3A1	+	G1
		S3A2	+	G1
		S3B	+	G1
		S4A1	+f	G7
		S4A2	+	G1
		S4B	+	G7
		S5A	+	G1
		S5B	+	G1
		S6A	+	G1
		S6B	+	G1
		S7A	+	G1
		S7B	+	G1
S9A	+	G1		
S9B	+	G1		
S10A1	+	G1		
S10A2	+f	G7		
S10B	+	G1		

Isolats du Népal

Localité	Année	Nom	Pouvoir pathogène	Profil biochimique
Lumle	1992	Lum1	+	G1
		Lum2	+	G1
		Lum3	+	G1
		Lum5.2	+	G1
		Lum6.1	+	G1
		Lum6.2	+f	G8
		Lum7	+	G1
		Lum10	+	G10

ANNEXE 6

Données de la campagne rizicole 1993/1994
Essai date et densité de repiquage

Variété Latsidahy :

repiquée la 15/11 à la densité de 10 x 20 cm :

	Date d'observation						
	24/02	03/03	08/03	18/03	01/04	12/04	21/04
Degréxjour après repiquage	727	771	798	857	947	1011	1054
Montaison	21,9%	11,1%	3,1%	1,0%	0%	0%	0%
Gonflement	62,5%	32,3%	13,5%	1,0%	0%	0%	0%
Epiaison	15,6%	42,4%	26,0%	7,1%	0%	0%	0%
Exertion	0%	14,1%	57,3%	90,8%	100%	100%	100%
Incidence	0%	1,02%	7,14%	8,16%	9,18%	9,18%	9,18%
Plants malades	0%	3,36%	16,67%	20,00%	23,33%	23,33%	23,3%

repiquée la 25/11 à la densité de 10 x 20 cm :

	Date d'observation						
	24/02	03/03	08/03	18/03	01/04	12/04	21/04
Degréxjour après repiquage	654	698	726	784	875	938	982
Montaison	16,9%	16,5%	2,3%	0,8%	0%	0%	0%
Gonflement	78,8%	44,4%	17,6%	2,4%	0%	0%	0%
Epiaison	4,2%	32,3%	41,2%	5,6%	0,8%	0%	0%
Exertion	0%	6,8%	38,9%	91,1%	99,2%	100%	100%
Incidence	0%	3,36%	9,24%	11,76%	14,3%	14,3%	14,3%
Plants malades	0%	10%	23,33%	26,67%	33,33%	33,33%	33,3%

repiquée la 06/12 à la densité de 10 x 20 cm :

	Date d'observation						
	24/02	03/03	08/03	18/03	01/04	12/04	21/04
Degréxjour après repiquage	566	610	638	696	786	850	893
Montaison	99,4%	90,4%	82,7%	17,8%	0,6%	0%	0%
Gonflement	0,6%	9,6%	17,3%	71,1%	13,5%	1,2%	0%
Epiaison	0%	0%	0%	7,9%	24,4%	4,8%	4,2%
Exertion	0%	0%	0%	3,3%	61,5%	93,9%	95,8%
Incidence	0%	0%	0%	0%	2,42%	6,06%	8,48%
Plants malades	0%	0%	0%	0%	13,33%	26,67%	30,0%

repiquée la 15/11 à la densité de 20 x 40 cm :

	Date d'observation						
	24/02	03/03	08/03	18/03	01/04	12/04	21/04
Degrésjour après repiquage	727	771	798	857	947	1011	1054
Montaison	57,6%	33,8%	22,4%	1,8%	0%	0%	0%
Gonflement	39,1%	48,4%	42,9%	15,9%	0%	0%	0%
Epiaison	3,3%	14,9%	24,3%	17,0%	4,3%	0%	0%
Exertion	0%	2,9%	10,4%	65,2%	95,7%	100%	100%
Incidence	0%	1,09%	2,17%	6,52%	6,88%	6,88%	6,88%
Plants malades	0%	10%	20%	43,33%	43,33%	43,33%	43,3%

Variété Rojofotsy 1285 :

repiquée la 15/11 à la densité de 10 x 20 cm :

	Date d'observation						
	24/02	03/03	08/03	18/03	01/04	12/04	21/04
Degrésjour après repiquage	727	771	798	857	947	1011	1054
Montaison	39,8%	32,9%	12,3%	4,7%	0%	0%	0%
Gonflement	59,4%	58,7%	51,4%	6,3%	0%	0%	0%
Epiaison	0,8%	8,4%	27,5%	14,2%	0%	0%	0%
Exertion	0%	0%	8,7%	74,8%	100%	100%	100%
Incidence	0%	0,78%	3,10%	6,20%	6,20%	6,20%	6,20%
Plants malades	0%	3,33%	20%	30%	30%	30%	30%

repiquée la 25/11 à la densité de 10 x 20 cm :

	Date d'observation						
	24/02	03/03	08/03	18/03	01/04	12/04	21/04
Degrésjour après repiquage	654	698	726	784	875	938	982
Montaison	59,6%	27,4%	5,6%	1,5%	0%	0%	0%
Gonflement	40,4%	71,2%	82,4%	13,2%	0,7%	0%	0%
Epiaison	0%	0,7%	10,6%	29,4%	1,4%	0%	0%
Exertion	0%	0,7%	1,4%	55,9%	97,9%	100%	100%
Incidence	0%	0%	0,68%	4,76%	5,48%	5,48%	5,48%
Plants malades	0%	0%	3,33%	10%	33,33%	33,33%	33,3%

repiquée la 06/12 à la densité de 10 x 20 cm :

	Date d'observation						
	24/02	03/03	08/03	18/03	01/04	12/04	21/04
Degrésjour après repiquage	566	610	638	696	786	850	893
Montaison	100%	97,4%	91,0%	32,1%	14,7%	0%	0%
Gonflement	0%	2,6%	9,0%	66,0%	16,3%	0%	0%
Epiaison	0%	0%	0%	1,9%	32,6%	3,2%	1,9%
Exertion	0%	0%	0%	0%	36,4%	96,8%	98,1%
Incidence	0%	0%	0%	0,65%	7,74%	10,32%	11,0%
Plants malades	0%	0%	0%	3,33%	36,67%	43,33%	50%

repiquée la 15/11 à la densité de 20 x 40 cm :

	Date d'observation						
	24/02	03/03	08/03	18/03	01/04	12/04	21/04
Degrésjour après repiquage	727	771	798	857	947	1011	1054
Montaison	82,7%	51,9%	34,8%	5,0%	0%	0%	0%
Gonflement	16,5%	44,2%	60,1%	42,4%	3,5%	0%	0%
Epiaison	0,8%	2,7%	2,4%	28,2%	5,4%	0%	0%
Exertion	0%	1,2%	2,8%	24,4%	91,1%	100%	100%
Incidence	0%	0,39%	1,16%	5,43%	6,59%	6,59%	6,59%
Plants malades	0%	3,33%	6,67%	36,67%	36,67%	36,67%	36,7%

Essai 3 variétés 2 répétitions

Variété Tokambana :

Répétition 1

	Date d'observation					
	10/03	21/03	01/04	06/04	12/04	21/04
Degrésjour après repiquage	650	717	786	815	850	893
Montaison	86,4%	35,9%	3,2%	4,5%	0%	0%
Gonflement	13,6%	56,3%	42,9%	25,8%	0%	0%
Epiaison	0%	6,3%	22,2%	12,1%	10,6%	0%
Exertion	0%	1,6%	31,7%	57,6%	89,4%	100%
Incidence	0%	0,3%	2,73%	4,49%	5,51%	5,51%
Plants malades	0%	2%	14,33%	21,33%	25,67%	25,67%

Répétition 2 :

	Date d'observation					
	10/03	21/03	01/04	06/04	12/04	21/04
Degrésjour après repiquage	650	717	786	815	850	893
Montaison	76,3%	30,7%	18,3%	12,5%	0%	0%
Gonflement	23,7%	53,3%	21,1%	8,3%	5,3%	0%
Epiaison	0%	13,3%	26,8%	16,7%	0%	0%
Exertion	0%	2,7%	33,8%	62,5%	94,7%	100%
Incidence	0%	0,75%	2,24%	3,42%	4,3%	4,3%
Plants malades	0%	5%	14%	20,67%	25%	25%

Variété Rojofotsy 1285 :

Répétition 1 :

	Date d'observation						
	10/03	21/03	01/04	06/04	12/04	21/04	29/04
Degréxjour après repiquage	650	717	786	815	850	893	1367
Montaison	100%	72,2%	21,7%	11,3%	1,4%	0%	0%
Gonflement	0%	27,8%	59,4%	53,5%	12,3%	4,1%	0%
Epiaison	0%	0%	17,4%	12,7%	20,5%	0%	0%
Exertion	0%	0%	1,4%	22,5%	65,8%	94,5%	100%
Incidence	0%	0,04%	0,27%	1,00%	2,51%	2,97%	2,97%
Plants malades	0%	0,33%	1,67%	6,67%	15%	17,33%	17,3%

Répétition 2 :

	Date d'observation						
	10/03	21/03	01/04	06/04	12/04	21/04	29/04
Degréxjour après repiquage	650	717	786	815	850	893	1367
Montaison	100%	77,3%	22,2%	14,7%	7,4%	5,3%	0%
Gonflement	0%	22,7%	66,7%	53,3%	17,6%	4,0%	0%
Epiaison	0%	0%	11,1%	17,3%	19,1%	6,7%	0%
Exertion	0%	0%	0%	14,7%	55,9%	84%	100%
Incidence	0%	0%	0,49%	1,33%	2,13%	2,97%	2,97%
Plants malades	0%	0%	2,67%	7,33%	12%	22,33%	22,3%

Variété Latsidahy :

Répétition 1 :

	Date d'observation						
	10/03	21/03	01/04	06/04	12/04	21/04	29/04
Degrésxjour après repiquage	650	717	786	815	850	893	1367
Montaison	66,7%	15,3%	0%	0%	0%	0%	0%
Gonflement	28,3%	49,2%	17,5%	5,1%	0%	0%	0%
Epiaison	5%	20,3%	24,6%	11,9%	6,7%	0%	0%
Exertion	0%	15,3%	57,9%	83,1%	93,3%	100%	100%
Incidence	0%	1,89%	2,89%	3,17%	3,50%	4,00%	4,00%
Plants malades	0%	9,33%	15%	16%	17,67%	20,33%	20,3%

Répétition 2 :

	Date d'observation						
	10/03	21/03	01/04	06/04	12/04	21/04	29/04
Degrésxjour après repiquage	650	717	786	815	850	893	1367
Montaison	77,5%	46,2%	7,5%	2,6%	2,5%	0%	0%
Gonflement	22,5%	38,5%	35,0%	20,5%	2,5%	2,5%	0%
Epiaison	0%	10,3%	25,0%	17,9%	12,5%	2,5%	0%
Exertion	0%	5,1%	32,5%	59,0%	82,5%	95,0%	100%
Incidence	0%	0,42%	0,83%	1,50%	2,00%	2,92%	3,17%
Plants malades	0%	1,67%	3%	5,33%	7%	10,33%	10,7%

Comparaison du logit de l'exertion avec celui de la fréquence de talles malades

Essai densité-date de répiquage

Variété Latsidahy

Comparaison des pentes :

date, densité	exertion	incidence	test t (ddl)
15/11, 10x20	0,045	0,043	0,146 ns (3)
25/11, 10x20	0,040	0,046	0,366 ns (4)
06/12, 10x20	0,036	0,035	0,182 ns (3)
15/11, 20x40	0,037	0,045	1,445 ns (4)

ns : pas de différence significative à 5%

Comparaison du nombre de degré-jour pour 50% d'exertion et d'incidence

date, densité	exertion	incidence
15/11, 10x20	803 +/- 106	799 +/- 69
25/11, 10x20	746 +/- 48	726 +/- 52
06/12, 10x20	783 +/- 29	819 +/- 107
15/11, 20x40	856 +/- 31	808 +/- 28

Variété Rojofotsy 1285 :
Comparaison des pentes :

date, densité	exertion	incidence	test t (ddl)
15/11, 10x20	/	/	/
25/11, 10x20	0,052	0,036	1,454 ns (4)
06/12, 10x20	0,031	0,086	2,345 ns (2)
15/11, 20x40	0,039 +/- 0,003	0,052 +/- 0,004	12,139 (4)

ns : pas de différence significative à 5%

Comparaison du nombre de degré-jour pour 50% d'exertion et d'incidence

date, densité	exertion	incidence
15/11, 10x20	/	/
25/11, 10x20	795 +/- 34	622 +/- 224
06/12, 10x20	762 +/- 191	814 +/- 80
15/11, 20x40	887 +/- 6	826 +/- 5

Essai 3 variétés 2 répétitions

Variété Latsidahy :
Comparaison des pentes :

répétition	exertion	incidence	test t (ddl)
1	0,033 +/- 0,007	0,015 +/- 0,002	10,232 (4)
2	0,034 +/- 0,002	0,024 +/- 0,015	2,52 (6)

ns : pas de différence significative à 5%

Comparaison du nombre de degré-jour pour 50% d'exertion et d'incidence

répétition	exertion	incidence
1	771 +/- 18	726 +/- 15
2	805 +/- 7	812 +/- 73

Variété Rojofotsy 1285 :

Comparaison des pentes :

répétition	exertion	incidence	test t (ddl)
1	0,075	0,043	2,29 ns (4)
2	0,043	0,050	0,454 ns (3)

ns : pas de différence significative à 5%

Comparaison du nombre de degré-jour pour 50% d'exertion et d'incidence

répétition	exertion	incidence
1	838 +/- 43	824 +/- 84
2	852 +/- 131	834 +/- 75

Variété Tokambana :

Comparaison des pentes :

répétition	exertion	incidence	test t (ddl)
1	0,047	0,044	1,10 ns (3)
2	0,047	0,029	2,85 ns (3)

ns : pas de différence significative à 5%

Comparaison du nombre de degré-jour pour 50% d'exertion et d'incidence

répétition	exertion	incidence
1	805 +/- 15	783 +/- 61
2	797 +/- 41	774 +/- 168

Comparaison des pentes des logits de l'exertion et de la montaison
Essai densité-date de repiquage

Variété Latsidahy :

date, densité	exertion	montaison	test t (ddl)
15/11, 10x20	0,045	0,027	2,12 ns (3)
25/11, 10x20	0,040	0,027	1,27 ns (4)
06/12, 10x20	0,036	0,046	2,43 ns (5)
15/11, 20x40	0,037	0,033	0,15 ns (4)

ns : pas de différence significative à 5%

Varéité Rojofotsy 1285 :

date, densité	exertion	montaison	test t (ddl)
15/11, 10x20	/	/	/
25/11, 10x20	0,052	0,036	1,94 ns (4)
06/12, 10x20	0,031	0,031	0,01 ns (3)
15/11, 20x40	0,039	0,034	0,11 ns (4)

ns : pas de différence significative à 5%

Essai 3 variétés 2 répétitions

Variété Latsidahy :

répétition	exertion	montaison	test t (ddl)
1	0,033	0,039	2,42 ns (3)
2	0,034	0,027	2,23 ns (6)

ns : pas de différence significative à 5%

Variété Rojofotsy 1285 :

répétition	exertion	montaison	test t (ddl)
1	0,075	0,037	2,97 ns2 (4)
2	0,043	0,024	0,68 ns1 (4)

ns1 : pas de différence significative à 5%

ns2 : pas de différence significative à 2,5%

Variété Tokambana :

répétition	exertion	montaison	test t (ddl)
1	0,047 +/- 0,006	0,033 +/- 0,011	4,28 (4)
2	0,047 +/-0,018	0,018 +/- 0,014	5,59 (4)

ns : pas de différence significative à 5%

Comparaison des sommes de degré-jour estimée et observée pour 50% des talles au gonflement et 50% des talles à l'épiaisonEssai densité-date de repiquage

Variété Latsidahy :

Stade gonflement :

date, densité	estimée	observée
15/11, 10x20	722	727
25/11, 10x20	654	654
06/12, 10x20	707	696
15/11, 20x40	782	771

Stade épiaison :

date, densité	estimée	observée
15/11, 10x20	762	771
25/11, 10x20	700	726
06/12, 10x20	745	786
15/11, 20x40	819	798

Variété Rojofotsy 1285 :

Stade gonflement :

date, densité	estimée	observée
15/11, 10x20	/	/
25/11, 10x20	707	726
06/12, 10x20	728	696
15/11, 20x40	781	798

Stade épiaison :

date, densité	estimée	observée
15/11, 10x20	/	/
25/11, 10x20	751	784
06/12, 10x20	745	786
15/11, 20x40	818	857

Essai 3 variétés 2 répétitions

Variété Latsidahy :

Stade gonflement :

répétition	estimée	observée
1	704	717
2	734	717

Stade épiaison :

répétition	estimée	observée
1	737	786
2	770	786

Variété Rojofotsy 1285 :

Stade gonflement :

répétition	estimée	observée
1	778	786
2	785	786

Stade épiaison :

répétition	estimée	observée
1	808	850
2	818	850

Variété Tokambana :

Stade gonflement :

répétition	estimée	observée
1	737	717
2	732	717

Stade épiaison :

répétition	estimée	observée
1	771	786
2	765	786

LA GOUTTE D'ENCRE

34 000 MONTPELLIER FRANCE
TEL : 67. 65. 30. 96.

Résumé

La pourriture brune des gaines du riz causée par *Pseudomonas fuscovaginae* est la principale contrainte pathologique de la riziculture des zones tropicales d'altitude en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud. L'apparition de la maladie au champ est associée aux basses températures en fin de cycle du riz durant les stades gonflement et épiaison. Dans les différentes régions où le pathogène a été décrit, d'autres espèces bactériennes pouvant induire des pourritures de gaines ont été mises en évidence.

L'étude de 72 échantillons de pourritures de gaine collectées à Madagascar et au Népal en 1991 et 1992 a permis d'isoler 162 isolats bactériens dont 65% induisent une pourriture de gaine après inoculation sur riz au stade plantule. La caractérisation physiologique basée sur 8 tests biochimiques permet de regrouper les 106 isolats pathogènes sur riz au stade plantule en 11 groupes biochimiques. Le groupe 1, caractéristique de *P. fuscovaginae*, représente 79% des isolats. Nous avons approfondi les relations génétiques entre ces différents groupes et les espèces de référence des *Pseudomonas* spp. fluorescents par l'analyse PCR/RFLP du gène codant pour l'ARN16S. *P. fuscovaginae* constitue un groupe phylogénétique polymorphe distinct des autres isolats de pourriture des gaines et des différents biovars de *P. fluorescens* et *P. putida* et de *P. syringae* pv. *syringae*. Les autres isolats de pourritures des gaines se distribuent dans tout le phylum des *Pseudomonas* spp. fluorescents. La comparaison de la pathogénie des différents isolats sur riz au stade gonflement permet de mettre en évidence que seuls isolats présentant les génotypes ADNr 16S A (*P. syringae* pv. *syringae*), B, C et les 4 génotypes M, N, O et P de *P. fuscovaginae* sont pathogènes à faible concentration d'inoculum. Les isolats appartenant aux autres génotypes sont non pathogènes ou faiblement pathogènes à forte dose d'inoculum sur riz au stade gonflement. Ces isolats peuvent être considérés comme des espèces opportunistes.

L'expression du pouvoir pathogène de *Pseudomonas fuscovaginae* sur riz au stade gonflement a été analysée aux températures de 13°C, 18°C et 23°C. A chaque température, la virulence du pathogène est expliquée par le modèle général de l'action indépendante. Mais la dose efficace pour obtenir 50% de gaines malades augmente avec la diminution de la température. L'analyse de l'évolution des populations du pathogène *in planta* met en évidence que les basses températures affectent la multiplication du pathogène dans l'hôte durant la période d'incubation et la croissance des symptômes. Nos résultats permettent donc de conclure que les basses températures agissent négativement sur les différents processus de pathogénie de *P. fuscovaginae*. La distribution de *P. fuscovaginae* dans les zones où les basses températures sont limitantes pour la riziculture ne peut donc pas être expliquée par une action directe des températures sur le pathogène.

L'épidémiologie de la pourriture des gaines a été étudiée dans différentes localités de Madagascar en 1991, 1992 et 1993. L'incidence de la maladie augmente avec l'altitude de 0,1% à 1250 mètres à 12% à 1875 mètres en 1992. L'analyse de l'évolution au cours du temps de la maladie et du développement de l'hôte met en évidence que la dynamique de l'épidémie de pourriture des gaines est directement liée à la dynamique d'apparition du stade épiaison, le stade réceptif de l'hôte. Aucune contamination secondaire n'est mise en évidence. L'épidémie de pourriture de gaine dépend donc de l'inoculum primaire et de la durée du stade réceptif de l'hôte. La croissance du riz étant dépendante de la température, l'augmentation de l'incidence avec l'altitude peut être expliquée par une augmentation de la durée du stade réceptif dues à la diminution des températures. Des bactéries pathogènes sur riz au stade gonflement sont isolées de la terre de rizière et de l'eau d'irrigation à 1650 mètres d'altitude. Ce résultat confirme l'ubiquité de *P. fuscovaginae*. Mais la distribution du pathogène dans le milieu à différentes altitudes reste à déterminer.

Mots clés : Pourriture des gaines du riz, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Pseudomonas* spp. fluorescents, *Oryza sativa*, caractérisation, pathogénie, épidémiologie.