

Deslandes Thomas

Promotion 2006-2007

MASTER II : Bioressources en régions tropicales et méditerranéennes

Université Paris XII – Val de Marne – Créteil

Sélection du riz pluvial à Madagascar pour la résistance à la pyriculariose :



***Magnaporthe grisea* (Heb.)**



Encadrement :

Louis Marie Raboin

Alain Ramanosoanirina

URP SCRiD – CIRAD/FOFIFA

Antsirabe – Madagascar

Superviseur :

Maria H. Cruz de Carvalho

Lab. Ecophysiologie Moléculaire, FST

Université Paris XII - Val de Marne

Créteil – France



Deslandes Thomas

Master II Bioressources en régions tropicales et méditerranéennes – Université Paris XII, Val de Marne – Créteil.

Résumé

Sélection du riz pluvial à Madagascar pour la résistance à la pyriculariose : *Magnaporthe grisea* (Heb.)

La riziculture, principale production agricole à Madagascar doit faire face à une pression démographique et foncière grandissante. Cela a entraîné sur les hauts plateaux de l'île la culture du riz en condition pluviale, mais cette méthode de production est fortement contrainte par de fréquentes et importantes épidémies de pyriculariose causée par le champignon : *Magnaporthe grisea*. Les résistances acquises dans les programmes de sélection précédents ont été contournées par le pathogène. Le programme de sélection a été relancé dans le but d'introduire de nouvelles sources génétiques de résistance et ainsi de pérenniser la culture du riz pluvial. Des tests d'inoculations contrôlés en serre ainsi que des tests de résistance au champ ont été réalisés, afin de caractériser la résistance de variétés récemment introduites et également de variétés en fin de sélection. En parallèle certaines variétés présentant un intérêt pour leur résistance, ont été conduites dans différents systèmes de cultures afin d'évaluer leur réponse à la maladie. Les variétés Exp304 et Exp411 (Fofifa172) présentent de très bons niveaux de résistance, ainsi que les variétés Exp206 et Fofifa161. Dans une autre mesure, WAB878, Sebota330 et Sucupira, présente des résistances utilisables en tant que géniteurs pour le programme de sélection généalogique.

Mots clés : riz pluvial ; pyriculariose ; *Magnaporthe grisea* ; sélection ; résistance

Abstract

Selection of rain rice in Madagascar for resistance to the pyriculariose: *Magnaporthe grisea* (Heb.)

Rice growing, principal agricultural production in Madagascar must face a demographic and land pressure increase. That involved on the highlands of the island the culture of rice in rain condition, but this method of production is strongly forced by frequent and important epidemic of pyriculariose caused by the fungus : *Magnaporthe grisea*. The acquired resistance in the preceding programs of selection were busted by the pathogen. The program of selection was started again to introducing new genetic sources of resistance and perennializing the culture of rain rice. Tests of inoculations controlled in greenhouse as of the tests of resistance to the field were carried out, in order to characterize the resistance of recently introduced varieties and also of varieties at the end of the selection. In parallel varieties being of an interest for their resistance, were grown in various farming systems in order to evaluate their response to the disease. The varieties Exp304 and Exp411 (Fofifa172) have very good levels of resistance, as well as the varieties Exp206 and Fofifa161. In another measurement, WAB878, Sebota330 and Sucupira, have resistances usable as parents for the genealogical program of breeding.

Keywords: rain rice; pyriculariose; *Magnaporthe grisea*; breeding ; resistance

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Louis Marie Raboin et Alain Ramanosoanirina, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe sélection de l'URP SCRiD, merci pour leurs aides, leurs conseils tant sur le terrain qu'en mission. Alain, merci pour tes histoires et anecdotes malgaches, mais également pour ta grande connaissance du riz. Je remercie particulièrement Louis Marie pour m'avoir aiguillé et soutenu pour la correction du mémoire, je suis sûr que ces conseils me seront d'une grande utilité pour l'avenir.

Un grand remerciement à toute l'équipe du SCRiD.

Merci à Sambatra, Patrick et Victor, les techniciens sélection, sans qui une grande partie du travail ne pourrait se faire. Merci à Dodelys Andriantsimalona, Navalona et Dieudonné pour leur aide dans la réalisation des inoculations contrôlées.

Pour la partie biologie moléculaire, je remercie Mr Pascal Danthu pour nous avoir ouvert les portes du laboratoire de l'URP "Foret et Biodiversité", mais également Jean Michel et Ony pour m'avoir aidé dans la réalisation de cette partie du stage, partie qui n'aurait pas vue de résultats sans l'aide de Julien Frouin basé à Montpellier.

De vifs remerciements en direction du Bivouac qui a hébergé tout les stagiaires du CIRAD à Antsirabe, merci à Lalà, notre maman à tous. Longue vie à Aro, ton bébé encore en cours de route lorsque j'écris ces lignes, et une poignée de main virile au papa : Christian.

Merci à vous qui avez croisé mon chemin lors de mon passage sur la grande île, Elena Cruz de la Frontera, Yano, Nico et son Pid'j, Aurélia & Vaza, Ane à ailes, Nico le roi du fromage et des apéros crevettes, Mathilde, Jean Marie, Mr Payet, Manouxm, Maafaka, Clovis, Hélène, Mélanie, Toky, Julien, les filles du lac : Maud & Delph.....Merci pour les soirées, les randonnées, les marchés.

Pour conclure, je tiens à remercier Maria H. Cruz de Carvalho, pour avoir supervisé mon travail, merci pour sa disponibilité et sa gentillesse mais également pour son aide en anglais.

Un grand merci à Pierre.

*Je dédie l'intégralité de ce mémoire à Laurent Brient ; dit Roland
à toi qui a décidé de nous quitter.*

Amitiés

Sommaire

Sommaire.....	i
Tables des illustrations	v
Figures.....	v
Tableaux	vii
<u>Sélection du riz pluvial à Madagascar pour la résistance à la pyriculariose : <i>Magnaporthe grisea</i> (Heb.)</u>	1
INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I - Présentation du pathosystème	4
I.1. Le riz	4
I.1.1. Systématique et origine du riz	4
I.1.2. Organes et système de reproduction.....	6
I.2. La pyriculariose	8
I.2.1. Symptômes	8
I.2.2. Taxonomie	9
I.2.3. Epidémiologie.....	11
II - Sélection du riz	13
II.1. Création de variabilité.....	13
II.1.1. L'hybridation contrôlée	13
II.1.2. La sélection récurrente à l'aide d'un gène de stérilité	13
II.1.3. La mutagenèse induite	14
II.2. Méthodes de fixation des lignées	16
II.2.1. La sélection généalogique.....	16
II.2.2. Le rétrocroisement (backcross)	18
II.2.3. Méthode BULK.....	18
II.2.4. La sélection par filiation monograine	19
II.2.5. L'haplométhode.....	19
II.3. Nouvelles voies de sélection pour le riz.....	20
II.3.1. Création de variétés hybrides.....	20
II.3.2. La sélection assistée par marqueurs (SAM)	20
II.3.3. Méthodes transgéniques appliquées au riz	21

II.3.4.	Le riz plante modèle.....	21
III -	Création de variétés résistantes.....	22
III.1.	La résistance verticale	23
III.1.1.	Concept	23
III.1.2.	Sélection pour la résistance verticale.....	23
a.	Accumulation de gènes	23
b.	Les variétés composites ou "multilignées"	24
III.2.	La résistance horizontale.....	24
III.2.1.	Concept	24
III.2.2.	Sélection pour la résistance horizontale.....	25
a.	Tests en serre.....	25
b.	Tests au champ.....	25
III.2.3.	Méthodes de sélection de la résistance horizontale	26
a.	Choix des géniteurs.....	27
b.	Sélection généalogique	27
MATERIELS ET METHODES	29	
I -	Caracterisation de la résistance des géniteurs.....	29
I.1.	Inoculations controlées en serre.....	29
I.1.1.	Matériel végétal évalué	29
I.1.2.	Production de l'inoculum	29
I.1.3.	Méthode d'inoculation	31
I.1.4.	Lecture des symptômes.....	33
I.2.	Caractérisation de la résistance au champ	35
I.2.1.	Présentation du dispositif d'évaluation	35
I.2.2.	Observations réalisées	37
a.	Au stade végétatif / pyriculariose foliaire :.....	37
b.	Au stade reproductif / pyriculariose paniculaire :.....	37
c.	Autres observations :.....	37
II -	Evaluation pour la résistance au cours du schéma de sélection	
généalogique	39	
II.1.	Dispositif.....	39
II.2.	Matériel végétal en cours de selection	39
II.3.	Notations effectuées	40
III -	Evaluation pour la résistance dans l'essai variétal.....	42
III.1.	Matériel végétal.....	42
III.2.	Dispositif expérimental	42
III.3.	Evaluations	43

RESULTATS ET DISCUSSION	45
I - Caractérisation de la résistance des géniteurs	45
I.1. Inoculations contrôlées en serre (Tableau 8).....	45
I.1.1. Résultats obtenus à Madagascar	45
I.1.2. Résultats obtenus à Montpellier	45
I.1.3. Bilan des évaluations en serre	46
I.2. Caractérisation de la résistance au champ.....	49
I.2.1. Résultats	49
I.2.2. Effet de la pyriculariose sur le taux de stérilité.....	51
I.3. Comparaison entre les deux méthodes d'évaluation et bilan général	52
II - Sélection généalogique	54
II.1. Résultats de la sélection en quatrième génération (F4).....	54
II.2. Résultats de la sélection en cinquième génération (F5)	56
III - Essai comparatif variétal – "matrice"	59
III.1. Evaluation des variétés pour la résistance	59
III.1.1. Comportement des variétés face à la pyriculariose foliaire	59
III.1.2. Comportement des variétés face à la pyriculariose paniculaire	59
III.1.3. Rendement et taux de stérilité des variétés	60
III.2. Influence des conditions agronomiques sur la pyriculariose	62
IV - Bilan.....	63
V - Perspectives.....	64
<u>Test de conformité des croisements (hybrides F1) à l'aide des</u>	
<u>marqueurs microsatellites.....</u>	<u>67</u>
I - Objectif	67
II - Matériels et méthodes	67
II.1. Croisements réalisés	67
II.2. Echantillonnage végétal réalisé.....	68
II.3. Amplification microsatellite	68
II.4. Génotypage par séquenceur.....	69
III - Résultats et discussion	70
IV - Conclusion et perspectives.....	76

BIBLIOGRAPHIE	A
ANNEXES	B
ANNEXE I - croisements en cours de F4 pour 2006/2007	B
ANNEXE II - croisements en cours de F5 pour 2006/2007	D
ANNEXE III - plan essai comparatif "matrice"	E
ANNEXE IV - Croisements F1 réalisés pour la campagne 2005/2006 ...	F
ANNEXE V – Protocole extraction ADN riz (URP SCRiD)	G

Tables des illustrations

Figures

Figure 1 : Panicule du riz (Baudoin, Louant <i>et al.</i> , 2002)	5
Figure 2 : Epillet du riz (Baudoin, Louant <i>et al.</i> , 2002)	5
Figure 3 : coupe transversale du paddy d'après (Baudoin, Louant <i>et al.</i> , 2002).....	7
Figure 4: Dégâts de <i>Magnaporthe grisea</i> sur panicule.	7
Figure 5 : Région de l'Uttar Pradesh en Inde (encadrée) (<i>source : http://fr.wikipedia.org</i>).....	8
Figure 6 : Cycle de développement de <i>Magnaporthe grisea</i> (Berruyer, 2003)	10
Figure 7 : schéma général de l'hybridation suivie de sélection.	12
Figure 8 : schéma de sélection récurrente.....	12
Figure 9 : a - panicule mâle stérile (à gauche) ; b - fleur mâle stérile (à gauche)	14
Figure 10 : schéma général de sélection généalogique d'après (Baudoin, Louant <i>et al.</i> , 2002)	15
Figure 11 : principe du rétrocroisement d'après (Servin, 2003).....	17
Figure 12 : Principe de la méthode de sélection généalogique différée (BULK) (<i>source http://www.cetiom.fr</i>)	17
Figure 13 : principe de la sélection par filiation monograine (<i>source : http://www.cetiom.fr</i>).....	19
Figure 14 : schéma de la cellule de Malassez	30
Figure 15 : conidie et hyphes de <i>M.grisea</i> (<i>source : http://fr.wikipedia.com</i>)	30
Figure 16 : Echelle de lecture des symptômes de la pyriculariose.....	32
Figure 17 : Illustration du dispositif d'évaluation au champ	34
Figure 18 : dégâts de <i>M.grisea</i> sur cou et panicule	36
Figure 19 : schéma et évolution du dispositif d'infection dans un des blocs de sélection généalogique.....	38
Figure 20 : évaluation de pyriculariose foliaire en fonction de la notation pyriculariose paniculaire	48
Figure 21 : pluviométrie et température moyennes pour la campagne 2006-2007, données URP SCRiD	50
Figure 22 : pluviométrie et température moyenne sur 5 ans, données URP SCRiD	50
Figure 23 : distribution des lignées sélectionnées F4 en fonction du pourcentage d'attaque de pyriculariose foliaire.....	53
Figure 24 : distribution des lignées sélectionnées F4 en fonction de la note de pyriculariose paniculaire	53

Figure 25 : distribution des lignées sélectionnées F5 en fonction du pourcentage d'attaque de pyriculariose foliaire.....	55
Figure 26 : distribution des lignées sélectionnées F5 en fonction de la note de pyriculariose paniculaire.....	55
Figure 27 : effet fumure sur l'intensité moyenne de pyriculariose paniculaire tout systèmes confondus	61
Figure 28 : effet du système sur l'intensité de pyriculariose paniculaire toutes fumures confondues	61

Tableaux

Tableau 1 : diversité des espèces du complexe <i>Sativa</i> d'après (Causse, 1989)	3
Tableau 2 : liste des variétés évaluées et leur adaptation aux conditions pédoclimatiques	28
Tableau 3 : milieu de culture pour <i>M.grisea</i>	30
Tableau 4 : convention d'évaluation de la résistance pour les inoculations contrôlées	32
Tableau 5 : quantité d'intrants apportés au dispositif d'évaluation au champ.	36
Tableau 6 : plan de répartition en "split-split-plot"	41
Tableau 7 : observations pour la caractérisation des variétés en sélection (<i>la note la plus élevée étant la plus mauvaise</i>).	43
Tableau 8 : bilan comparé des inoculations contrôlées en serre	44
Tableau 9 : bilan général des essais de caractérisation de la résistance.	47
Tableau 10 : résultat de l'ANOVA sur le dispositif de caractérisation de la résistance au champ pour l'effet variété	48
Tableau 11 : résultat de l'analyse de variance sur le dispositif "matrice"	58
Tableau 12 : résultat de conformité pour les croisements n°1 et n°2	70
Tableau 13 : résultat de conformité pour le croisement n°4	71
Tableau 14 : résultat de conformité pour les croisements n°8 et n°9	72
Tableau 15 : résultat de conformité des croisements n°11 et n°12	73
Tableau 16 : résultat de conformité des croisements n°13, n°26 et n°33	74
Tableau 17 : résultat de conformité des croisements n°37 et n°39	75

Sélection du riz pluvial à Madagascar pour la résistance à la pyriculariose : *Magnaporthe grisea* (Heb.)

INTRODUCTION

Suite à l'évolution démographique et aux modifications des traditions alimentaires, le riz a pris une place de plus en plus grande dans l'agriculture et dans l'alimentation de nombreux pays. La production locale souvent déficitaire doit alors être compensée par des importations coûteuses (Bouharmont, 1995). Parmi les céréales, le riz est celle dont la production nécessite le plus de surface. Sur les 147,5 millions d'hectares de terre consacrée à la riziculture en 1994 dans le monde, les pays en développement en comptaient 141,4 millions, soit 96% (FAO, 1994). On distingue deux grands types d'écosystèmes rizicoles en fonction du régime hydrique. Les écosystèmes aquatiques, caractérisés par la présence d'une lame d'eau, même temporaire, représentent 88% des superficies de culture de riz. Le deuxième type d'écosystème rizicole représente 12% des surfaces cultivées, il s'agit de la riziculture pluviale où la culture est alimentée en eau par les pluies ou par la nappe phréatique (Ahmadi *et al.*, 2002).

A Madagascar, le riz occupe incontestablement une place prépondérante. En effet, il constitue l'aliment de base de la majorité de la population qui en consomme en moyenne 130kg par an et par personne. La riziculture est une activité majeure dans presque toutes les régions, elle contribue à hauteur de 12% du PIB avec une production de 2,8 millions de tonnes en 1999 répartie sur 1 450 000 ha. De cette surface de production, le riz pluvial ne représente que 9%, le riz de *tavy* (défriche brûlis) en occupe 10% et la grande majorité (81%) en riziculture aquatique (FAO, 2000).

La région des Hauts plateaux, située entre 1000 et 2000 mètres d'altitude, est la principale zone de production du pays en terme de surfaces (318 000 ha), mais également la plus dense en terme de population (Déchanet *et al.*, 1996; FAO, 2000). Face à l'augmentation démographique et à la pression foncière croissante, le développement de la riziculture pluviale semble indispensable pour répondre à la demande croissante en riz. Le programme « Riz d'altitude à Madagascar », fruit d'un partenariat entre le CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) et le FOFIFA (Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural), a débuté en 1983. L'objectif est de permettre le développement de la riziculture d'altitude, notamment de la riziculture pluviale. Ce programme de recherche a déjà permis la création des premières variétés pluviales au monde adaptées à une altitude supérieure à 1500m (Déchanet, Razafindrakoto *et al.*, 1996). Aujourd'hui, les paysans disposent d'une dizaine de ces variétés avec différents types de grain et différentes longueurs de cycle.

L'augmentation de la production de riz pluvial dans les zones d'altitude est fortement limitée par de fréquentes et importantes épidémies de pyriculariose, qui sont liées aux conditions édaphiques et climatiques (Ahn et Mukelar, 1986). Ainsi les variétés les plus diffusées et considérées comme plus ou moins tolérantes à la pyriculariose sont devenues sensibles avec le temps. Ces variétés ont presque toutes un parent commun, issu du groupe local Latsika (sensible à la pyriculariose), seule variété cultivée à 1 800 m d'altitude dans des conditions aquatiques. Dès 2003, de nouvelles ressources génétiques ont été mobilisées afin d'assurer la pérennité de la culture du riz pluvial dans les zones d'altitude (URP-SCRiD, 2003). C'est dans ce cadre que s'inscrit ce stage : évaluer la résistance des géniteurs en vue de leur intégration dans le programme d'hybridations contrôlées, évaluer la résistance des lignées en cours de sélection, et comparer le potentiel de certaines variétés en fonction de différents systèmes de culture.

Tableau 1 : diversité des espèces du complexe *Sativa* d'après (Causse, 1989)

ESPECES CULTIVEES		ORIGINE	AIRE DE CULTURE	CONDITIONS DE CULTURE	TYPE BIOLOGIQUE	REGIME DE REPRODUCTION
<i>O.sativa</i> L.	<i>indica</i>	Asie du Sud-Est	Monde entier	Très variable : pluvial strict à flottant	I	U
	<i>japonica</i>	Chine				
<i>O.glaberrima</i> Steud.		Afrique	Afrique de l'Ouest	Pluvial ou flottant	A	U

A : annuelle ; U : autogame prédominant ; I : intermédiaire

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I - PRESENTATION DU PATHOSYSTEME

I.1. LE RIZ

I.1.1. Systématique et origine du riz

Le genre botanique *Oryza* appartient à l'embranchement des monocotylédones, dans la famille des Poacées, ordre des Cypéales et classe des Lilioposidés. Ce genre comprend 24 espèces, dont on considère que deux seulement sont largement cultivées de part le monde : *Oryza sativa* (L.) et *Oryza glaberrima* (Steud.). Des études tant morphologiques que moléculaires ont permis de répartir les espèces en complexes (Berruyer, 2003). Sur des critères moléculaires, 4 complexes ont été définis (*sativa*, *officinalis*, *ridleyi*, *meyeriana*) (Ge *et al.*, 2001). C'est dans le complexe *sativa* que se trouvent les deux espèces cultivées (Tableau 1). Toutes les espèces de ce groupe sont diploïdes ($2n= 24$) et autogames (Berruyer, 2003).

Selon Ahmadi (2002), *Oryza sativa* L. est l'espèce la plus cultivée dans le monde. Elle présente une très grande diversité de formes avec plus de 100 000 cultivars répertoriés dans la collection mondiale, dont 65 000 sont gérés par l'International Rice Research Institute (IRRI) aux Philippines. Comme le montre le Tableau 1 ; il y aurait eu trois domestications indépendantes en Afrique (*O.glaberrima*), en Asie du Sud-Est (type *indica* d'*O.sativa*) et en Chine (type *japonica* d'*O.sativa*). Cette domestication en Inde et en Chine, remonterait à plus de 8000 ans. L'introduction d'*O.sativa* par des navigateurs malais, s'est faite vers le IV^e siècle à Madagascar (Causse, 1989; Ahmadi, Chantereau *et al.*, 2002).

L'espèce *O. sativa* est subdivisée en deux sous-espèces *japonica* et *indica* (Tableau 1). La variété type du groupe *indica* se caractérise par un fort tallage, des feuilles étroites et des grains longs et minces. Les variétés de cette sous-espèce sont cultivées en aquatique. Les graines présentent une période de dormance et les plantes sont sensibles à la photopériode. Le groupe *japonica* possède deux types morphologiques :

- le type tempéré, *japonica* au sens strict, possède un tallage moyen, des feuilles fines, des grains arrondis et courts.
- Le type tropical, appelé parfois *javanica*, se distingue par un tallage réduit, des feuilles larges et des grains longs et larges. Ce type comprend les variétés de type pluviales.

Les graines ne manifestent pas de dormance et les plantes ne sont pas sensibles à la photopériode (Jacquot et Clément, 1995 ; Ahmadi, Chantereau *et al.*, 2002 ; Baudoin *et al.*, 2002).

Panicule du riz

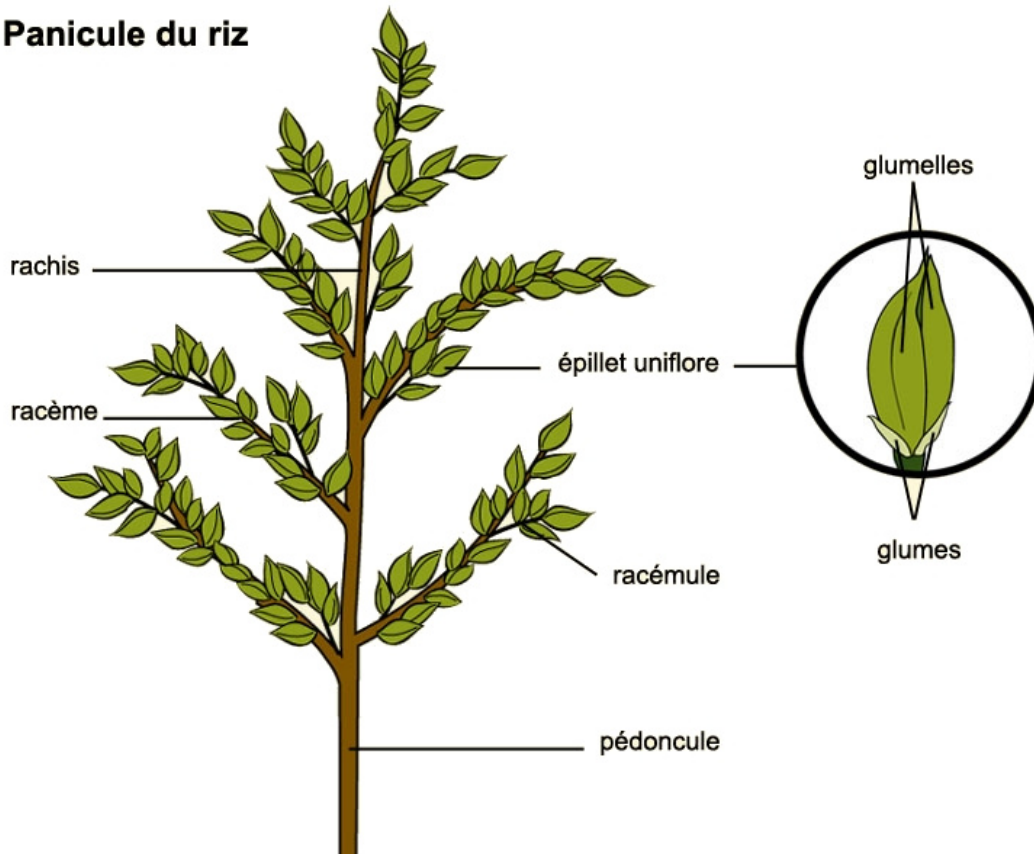


Figure 1 : Panicule du riz (Baudoin, Louant *et al.*, 2002)

Epillet du riz

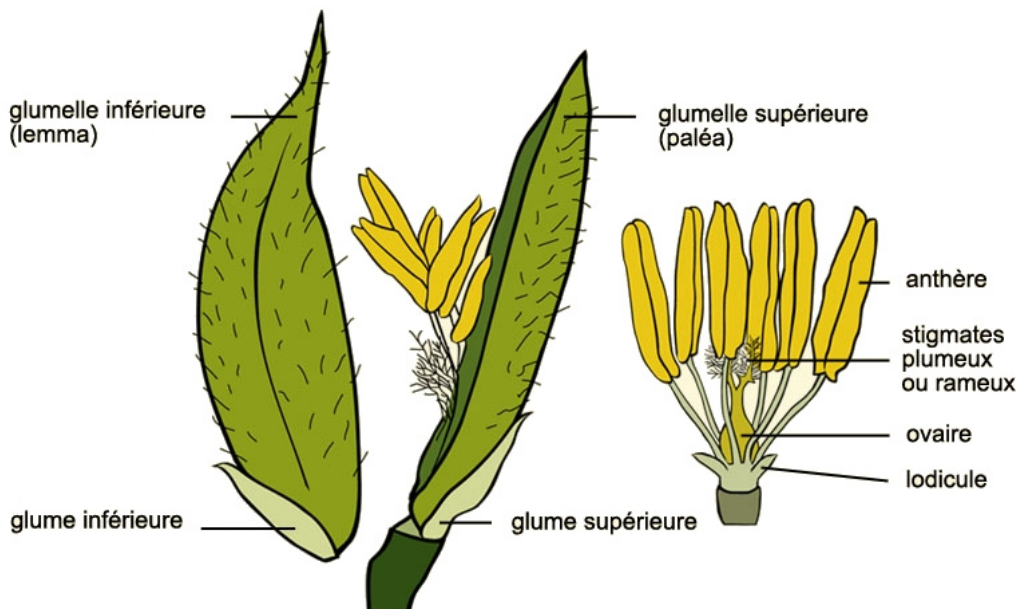


Figure 2 : Epillet du riz (Baudoin, Louant *et al.*, 2002)

I.1.2. Organes et système de reproduction

L'inflorescence du riz, se présente sous la forme d'une panicule racémeuse. Longue de 20 à 30 cm, elle porte 100 à 125 épillets uniflores. L'axe principal compte un nombre variable de ramifications. L'épillet est attaché aux ramifications de la panicule par un pédicelle. À sa partie inférieure, l'épillet porte deux glumes ne dépassant pas 2 à 3 mm (Figure 1). La fleur elle-même est enveloppée par deux glumelles, la glumelle inférieure (lemma) et la glumelle supérieure (paléa) (Figure 2). La réunion des deux glumelles à l'extrémité supérieure de l'épillet forme le bec ou apex. La barbe ou arête est le prolongement de la nervure centrale de la glumelle inférieure. Les variétés barbues sont dites aristées, les variétés sans barbe sont dites mutiques. La fleur du riz est autogame. Les organes mâles et femelles sont présents sur la même fleur. Les organes mâles comprennent six étamines (sur deux verticilles) portant chacune une anthère très développée. Les organes femelles sont constitués d'un ovaire surmonté de deux stigmates plumeux (Figure 2).

Les plantes autogames peuvent malgré tout être croisées, et il est possible d'obtenir des hybrides entre lignées pures, ce qui permet la création de formes nouvelles après recombinaison. L'autogamie modère la structure génétique au cours des générations de ces espèces vers un haut niveau d'homozygotie. Les populations de riz sont donc constituées d'une juxtaposition d'individus homozygotes auxquels se mêlent une proportion plus ou moins importante de formes hétérozygotes issues de fécondations croisées parfois accidentelles et presque toujours limitées (Baudoin, Louant *et al.*, 2002).

La longueur du cycle végétatif peut varier de quatre-vingt à plus de deux cent cinquante jours selon les variétés. La phase de reproduction, qui va de l'épiaison à la maturité du grain, est en revanche peu variable. Cette phase de trente cinq à quarante cinq jours, dépend principalement des conditions de culture (Ahmadi, Chantereau *et al.*, 2002). En ce qui concerne la floraison, elle s'étend sur 5 à 9 jours pour une panicule. Elle est dite basipète, c'est-à-dire qu'elle commence au sommet de la panicule et progresse vers le bas. Les fleurs sont cléistogames, c'est-à-dire qu'elles sont fermées au moment de la fécondation. Ainsi tout apport de pollen étranger est pratiquement impossible, c'est une autogamie "stricte". Le fruit issu de la fécondation est un caryopse, qui est comprimé latéralement et inclus dans les deux glumelles étroitement emboîtées. Sur la partie externe du caryopse, on trouve le tégument ou péricarpe qui est glabre ou pubescent et de coloration généralement blanche jaunâtre. Il peut cependant être noir en passant par toute la gamme de rouge, brun et violet (Figure 3) (Baudoin, Louant *et al.*, 2002).

Coupe transversale du paddy

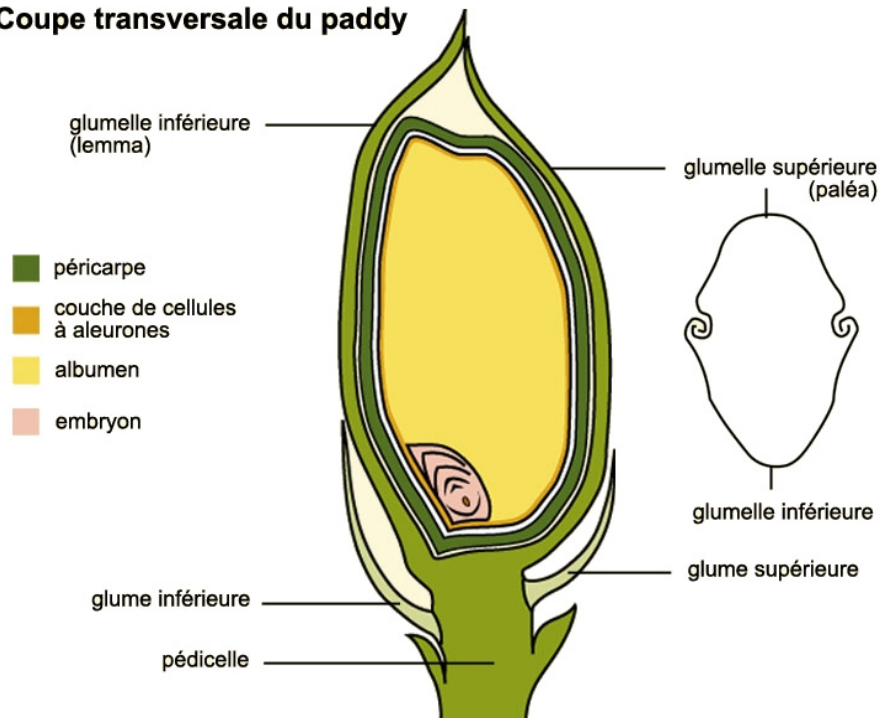


Figure 3 : coupe transversale du paddy d'après (Baudoin, Louant *et al.*, 2002)



- a. symptôme de la "panicule blanche"
- b. symptômes sur panicule et attaque nodale
- c. symptômes sur le rachis de la panicule.

Figure 4: Dégâts de *Magnaporthe grisea* sur panicule.

I.2. LA PYRICULARIOSE

La pyriculariose, principale maladie du riz, est provoquée par le champignon ; *Magnaporthe grisea* (Heb.) (anamorphe = *Pyricularia oryzae* Cavara). Cette maladie est présente sur tous les continents et bien qu'il existe des fongicides efficaces, la résistance variétale reste la composante principale de toutes les stratégies de lutte contre cette maladie (Ahmadi, Chantereau *et al.*, 2002).

Selon Notteghem (1989), *M.grisea* s'attaque à tous les organes du riz. Deux principaux dégâts sont à noter :

- attaques foliaires en début de cycle ;
- attaques sur les tiges lors de l'épiaison ce qui provoque la stérilité partielle ou totale des panicules.

Le centre d'origine de la maladie proposé par Ebbole (2007), serait situé dans les collines de la région de l'Uttar Pradesh qui se trouve dans la partie Himalayenne de l'Inde (Figure 5).



Figure 5 : Région de l'Uttar Pradesh en Inde (encadrée) (source : <http://fr.wikipedia.org>)

I.2.1. Symptômes

La forme la plus courante de la maladie est la pyriculariose foliaire. Les symptômes commencent par l'apparition de tâches blanchâtres sur les feuilles. Ces lésions évoluent ensuite pour prendre l'aspect de losanges dont le centre est grisâtre et les bords bruns. Dans le cas d'attaques sévères sur des individus très sensibles, les lésions peuvent fusionner et provoquer la mort de la feuille. L'infection du dernier nœud avant la panicule provoque la mort de cette dernière. On nomme ce type de symptômes « pyriculariose paniculaire » ou « pyriculariose du cou » (Figure 4). La pyriculariose du cou est un anglicisme qui vient de l'expression "neck blast". Pour Notteghem (1980) le "cou" définit la portion de tige située entre le nœud d'insertion de la feuille paniculaire et le bas de la panicule mais aussi par le quart inférieur du rachis de la panicule. C'est sur cet ensemble que les attaques sont les plus graves car elles aboutissent à la perte de la panicule.

La panicule devient blanche et les grains sont vides. Cette maladie peut être particulièrement destructrice dans certaines conditions :

- culture en conditions pluviales
- systèmes intensifiés avec de forts intrants azotés.

Il existe une forte relation entre les doses d'azote et les dommages causés par la pyriculariose. Par exemple, il a été montré au Brésil que durant une sécheresse prolongée, une application supérieure à 15Kg d'azote causait une forte épidémie de pyriculariose (Ahn et Mukelar, 1986).

I.2.2. Taxonomie

L'agent responsable de la pyriculariose est un champignon filamenteux Ascomycète appartenant au groupe des pyrénomycètes. C'est sous sa forme asexuée (*Pyricularia oryzae* Cavara) qu'il a été décrit pour la première fois en 1891. Dans la littérature, le champignon responsable de la maladie peut être apparenté à plusieurs noms. *Pyricularia oryzae* est utilisé pour se référer à la phase asexuelle (anamorphe) du champignon, c'est le nom qui prédomine dans le domaine. Morphologiquement le pathogène du riz est indistinguable des pathogènes des autres hôtes. Ainsi, le groupe entier est défini sous le nom de *Pyricularia grisea*. La phase téléomorphe (forme sexuée) de la maladie est décrite sous le nom *Magnaporthe grisea* (Heb.) (Ebbole, 2007). Pour des raisons de clarté de lecture et de convention taxonomique, nous nommerons l'ensemble des symptômes observés au champ *M.grisea*, même si la phase sexuée n'a jamais été observée dans la nature (Notteghem, 1989).

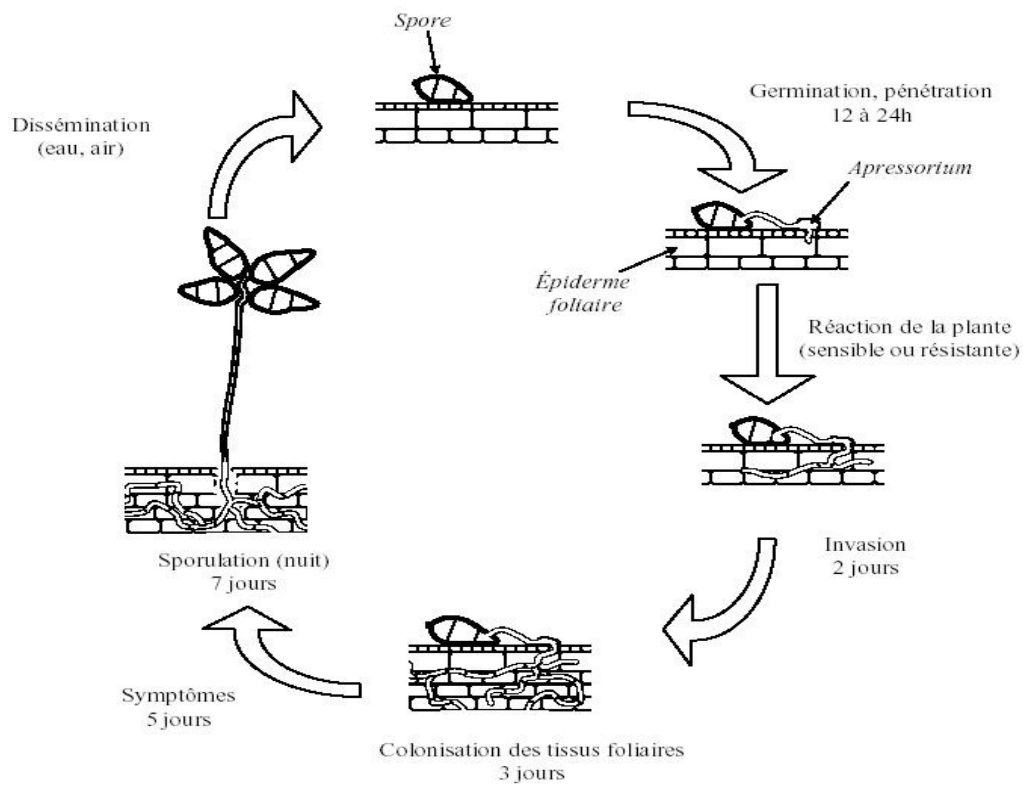


Figure 6 : Cycle de développement de *Magnaporthe grisea* (Berruyer, 2003)

I.2.3. Epidémiologie

La reproduction de la maladie se fait uniquement par voie végétative. Sur la surface des lésions il y a production d'une grande quantité de conidies. Leur dispersion se fait par le vent et la pluie. La sporulation a lieu en 5 à 7 jours et une vingtaine de cycle de production sont théoriquement possible au cours d'une culture de riz (Figure 6). C'est ce grand nombre de cycle qui peut expliquer qu'une souche rare à l'époque de semis puisse faire des dégâts importants au moment de la floraison (Notteghem, 1989; Berruyer, 2003).

Selon Notteghem (1989), le fait que le stade parfait de *P.oryzae* n'a jamais été observé sur le riz rend peu probable l'intervention fréquente de la reproduction sexuée de *M.grisea* dans la diversification des races du parasite. Cela fait donc intervenir les mutations naturelles comme cause essentielle de la variabilité du pouvoir pathogène. La fréquence des mutations de virulence est faible, du même ordre que les mutations observées pour d'autres caractères (10^{-6} à 10^{-7}) (Notteghem, 1989).

Sélection du riz

L'amélioration des plantes correspond à l'ensemble des opérations qui permet de passer d'un groupe d'individus n'ayant pas certaines caractéristiques à un nouveau groupe, apportant un progrès (Gallais, 2002). Les sélectionneurs ont cherché à reproduire artificiellement les sources naturelles de variabilité. L'hybridation contrôlée et à un degré moindre la mutagenèse induite, constituent toujours à ce jour les méthodes de création de variabilité les plus utilisées (Clément *et al.*, 2002).

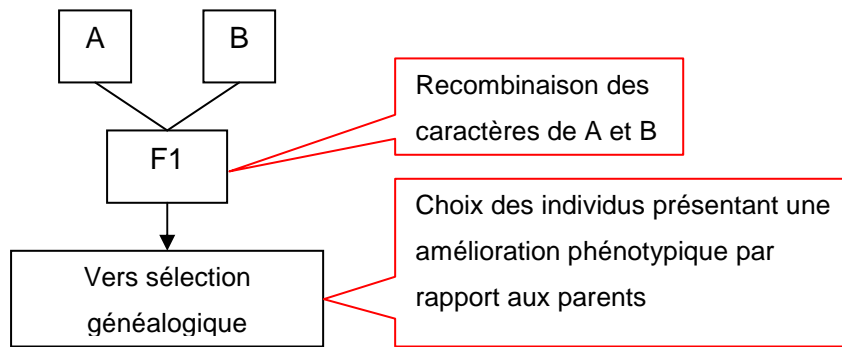


Figure 7 : schéma général de l'hybridation suivie de sélection.

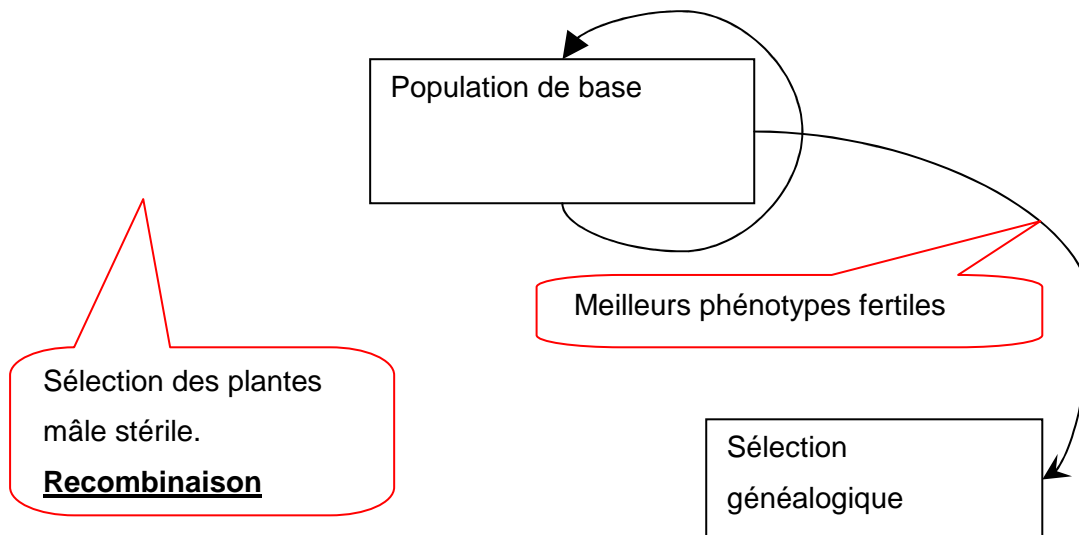


Figure 8 : schéma de sélection récurrente

II - SELECTION DU RIZ

II.1. CREATION DE VARIABILITE

II.1.1. L'hybridation contrôlée

Cette technique repose sur le fait que deux variétés d'aptitudes complémentaires peuvent fournir, par croisement, des descendants améliorés par rapport aux parents, ceci après recombinaison (Figure 7).

Dans le cas de l'espèce *Oryza sativa*, plusieurs types de croisements sont en tout ou partie envisageables : intragroupes et intergroupes (majoritairement *indica* x *japonica*). Ainsi les croisements intragroupes sont réalisés à des fins d'obtention variétale directe, tandis que les croisements intergroupes permettent l'obtention de géniteurs relais.

Si les hybrides F1 [première génération issue d'un croisement] résultant de croisements intra sous-spécifiques sont habituellement fertiles, un taux de stérilité paniculaire plus ou moins important caractérise les hybrides F1 obtenus par croisements inter sous-spécifiques. Quelle que soit la fertilité initiale de la F1, la conduite des descendances reste toujours très particulière et les résultats attendus très aléatoires en matière de recombinants réussis. Les étapes de la sélection généalogique sont conditionnées par le type du croisement travaillé (Clément, Châtel *et al.*, 2002).

II.1.2. La sélection récurrente à l'aide d'un gène de stérilité

La sélection récurrente a pour objectif d'améliorer la valeur moyenne d'une population grâce à l'alternance de cycles de sélection et de cycles de recombinaisons à partir des plantes sélectionnées. Cela permet l'apparition progressive de groupes polygéniques favorables. Périodiquement, ces populations récurrentes fournissent à la création variétale des lignées qui font l'objet d'une sélection généalogique (Figure 8).

Le progrès génétique est lent mais constant. De ce fait, la sélection récurrente est particulièrement adaptée à la sélection des caractères polygéniques puisqu'elle permet une concentration graduelle des gènes favorables. C'est une voie d'amélioration exigeante en temps et en moyens, mais souple d'utilisation (Vales et Razafindrakoto, 1996; Clément, Châtel *et al.*, 2002).

Chez les plantes autogames comme le riz, la nécessité d'une phase de recombinaison est généralement un obstacle à l'utilisation de la sélection récurrente. Il est en effet difficile d'intercroiser manuellement un grand nombre de plantes. Cet obstacle peut être levé si l'on introduit dans la population un gène de stérilité mâle. De ce fait un intercroisement total au sein de la population est assuré en récoltant uniquement les semences portées par les plantes mâles stériles.

Le gène d'androstérilité le plus utilisé est issu d'un mutant de la variété *indica* irriguée IR36. Ce mutant possède un gène nucléaire récessif dénommé "ms" qui provoque, quand il est homozygote (ms/ms), la stérilité des grains de pollen alors que les panicules sont normalement constituées (Figure 9) (Jacquemard *et al.*, 1993; Clément, Châtel *et al.*, 2002).

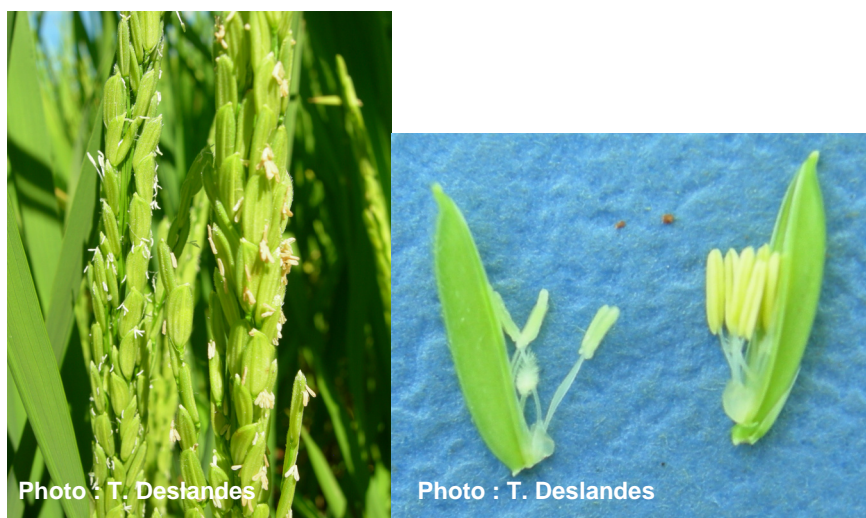


Figure 9 : a - panicule mâle stérile (à gauche) ; b - fleur mâle stérile (à gauche)

II.1.3. La mutagenèse induite

Cette technique de création de variabilité est basée sur la production artificielle de mutations au moyen de substances chimiques ou de rayonnements ionisants. Cependant la quantité de traitement est à prendre en compte ; en effet, un excès de traitement peut affecter drastiquement la viabilité des semences et/ou la fertilité des plantes survivantes (Clément, Châtel *et al.*, 2002).

D'après la définition de Dubois (1989), nous pouvons considérer que la variation proto/somaclonale fait partie des phénomènes de mutagenèse induite. En effet pour Bouharmont (1991) les mutations ne diffèrent pas des mutations induites par des traitements mutagènes. Les variations somaclonales sont induites par une culture plus ou moins longue des cellules en conditions artificielles. Elles sont bien connue chez les plantes et particulièrement fréquente chez le riz. La variation somaclonale est une source de diversité complémentaire, parfois utilisable en sélection.

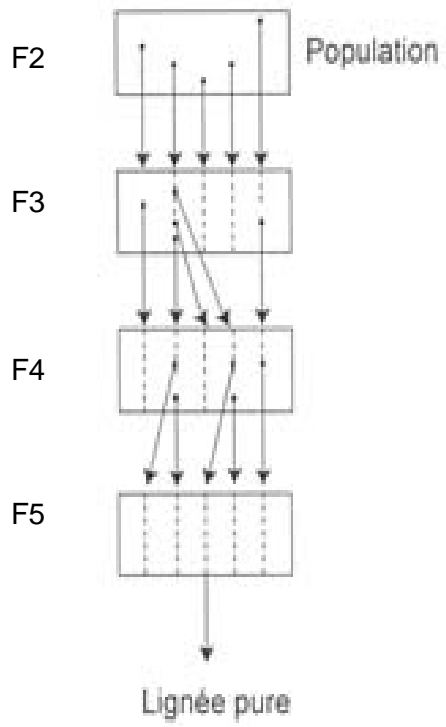


Figure 10 : schéma général de sélection généalogique d'après (Baudoin, Louant *et al.*, 2002)

Son utilisation se justifie surtout lorsque le caractère recherché peut être sélectionné par des pressions appliquées aux cultures cellulaires elles-mêmes (Bouharmont, 1991).

Ces variations se sont révélées stables sur plusieurs générations d'autofécondations. Elles peuvent être simples (un trait morphologique) ou complexes (touchant des caractères polygéniques comme la tolérance aux maladies et parasites ou même le rendement) (Clément, Châtel *et al.*, 2002).

II.2. METHODES DE FIXATION DES LIGNEES

II.2.1. La sélection généalogique

Dans les croisements intra groupes, la sélection est effectuée traditionnellement sur la valeur plante en seconde génération (F2), la valeur plante dans la lignée en troisième génération (F3) puis la valeur lignée dans la famille pour les générations ultérieures. On considère les caractères comme fixés à la F9 ou F10. Il faut compter environ 12 cycles de la F1 à l'inscription au Catalogue (Figure 10).

L'évaluation de la valeur plante en F2 tient compte, pour les caractères considérés, du niveau d'héritabilité et/ou de la nature dominante ou récessive du contrôle génétique en déterminant l'expression recherchée. En général 5 à 10% des plantes sont retenues à la seconde génération.

Par rapport à ce même schéma, la méthode généalogique appliquée aux croisements inter-groupes se traduit par une phase de fixation généralement plus longue. Cette différence est due principalement à la forte variabilité engendrée par ce type de croisement et à son maintien au cours des premières générations d'autofécondation. De ce fait, la sélection sur la valeur plante est effectuée, selon des critères très empiriques, jusqu'à la quatrième ou cinquième génération. Par rapport aux croisements intragroupes, le taux de plantes retenu en F2 est faible, généralement inférieur à 1% (Clément, Châtel *et al.*, 2002).

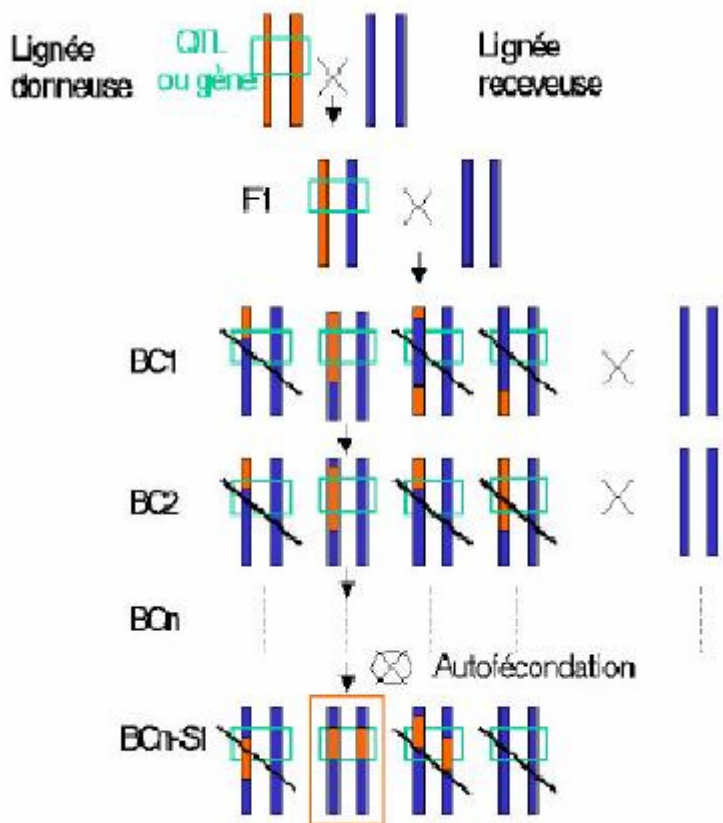


Figure 11 : principe du rétrocroisement d'après (Servin, 2003)

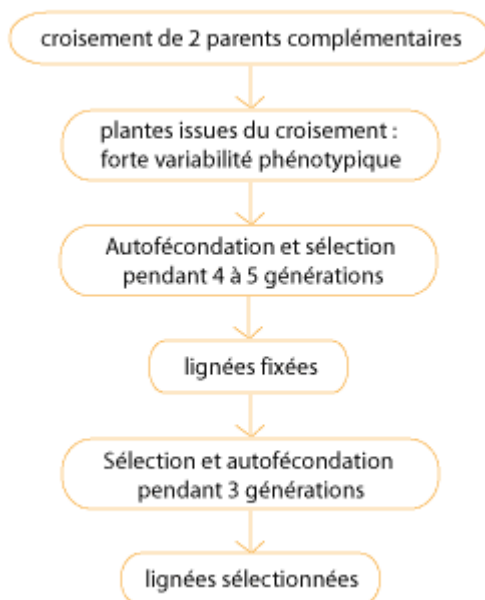


Figure 12 : Principe de la méthode de sélection généalogique différée (BULK) (source <http://www.cetiom.fr>)

II.2.2. Le rétrocroisement (backcross)

Le rétrocroisement, ou backcross, est utilisé pour introduire un caractère intéressant, la résistance à une maladie par exemple, dans une lignée de bonne valeur agronomique (Figure 11). Le principe du backcross est de croiser un parent donneur du gène cible avec un parent receveur de ce gène. L'hybride ainsi produit est recroisé avec le parent receveur pour produire une population en ségrégation nommée BC1. Parmi les individus de la population BC1, seuls ceux porteurs du gène cible sont sélectionnés et recroisés avec le parent receveur pour produire une nouvelle population (BC2). Ce cycle de sélection / recroisement est poursuivi pendant quelques générations (BC3, BC4, etc.) de manière à obtenir un individu ne présentant qu'un allèle donneur au niveau du gène cible. En général, l'introgression est achevée par une autofécondation pour obtenir un individu homozygote, y compris au niveau du gène cible (Servin, 2003).

Aujourd'hui l'utilisation du backcross est très généralement pilotée par l'utilisation de marqueurs moléculaires. Le marqueur étant lié physiquement aux allèles du caractère d'intérêt ciblé, cela permet d'accumuler beaucoup plus rapidement dans un même génome les gènes favorables. Dans le cas de l'introgression d'un gène de résistance « marqué », des tests précoces peuvent être effectués et ainsi éviter de recourir à des infections artificielles (Gallais, 1994).

II.2.3. Méthode BULK

Cette méthode peut être appelée sélection généalogique différée, car dans cette méthode, la sélection a lieu après fixation des lignées, et non au cours de la fixation (Figure 12). A partir de la variabilité phénotypique issue d'un croisement de deux parents complémentaires, le sélectionneur retient un nombre de graines aléatoirement pendant 4 à 5 générations sans qu'aucune sélection ne soit réalisée, les lignées sont alors fixées. La sélection n'intervient qu'ensuite, selon un processus analogue à celui utilisé en sélection généalogique si ce n'est qu'il est appliqué à des lignées fixées.

La méthode est facile et peu coûteuse à mettre en œuvre, elle permet également d'étudier un grand nombre de croisements. Au cours des générations de fixation on effectue une sélection massale en appliquant des pressions de sélection pour des caractères d'importance économique (Doussinault, 1995).

II.2.4. La sélection par filiation monograine

La méthode aussi appelée Single Seed Descent (SSD), ressemble à la méthode bulk dans la mesure où la sélection des lignées intervient après leur fixation. La différence avec la méthode BULK réside dans le fait que l'on étudie ici la descendance de graines prises individuellement à chaque étape d'autofécondation (Figure 13).

Cette technique a pour objectif de diminuer le principal inconvénient de la sélection généalogique qui, étant très efficace sur les caractères à forte héritabilité, a pour conséquence de réduire la variabilité disponible pour sélectionner les caractères à faible héritabilité (Doussinault, 1995).

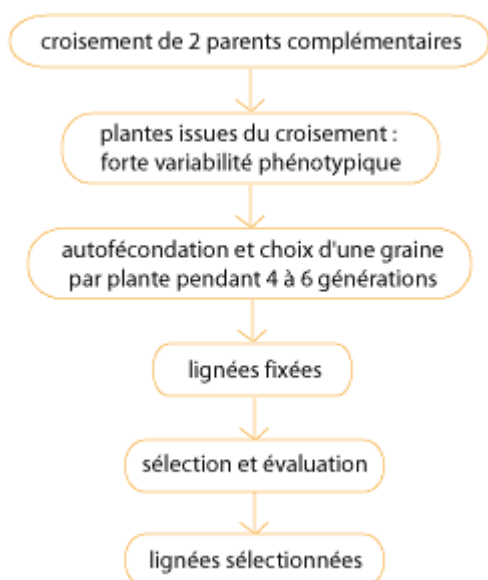


Figure 13 : principe de la sélection par filiation monograine (source : <http://www.cetiom.fr>)

II.2.5. L'haplométhode

Cette technique permet l'obtention de plantes par doublement du stock chromosomique. Cette régénération peut se faire à partir de cellules haploïdes (grains de pollen) ou d'organes (ovaires) : on parle d'androgenèse ou de gynogenèse (Dubois, 1989). Le retour du matériel à l'état diploïde fertile se fait soit naturellement ou artificiellement le plus souvent à l'aide d'un agent chimique comme la colchicine. La technique d'haplodiploïdisation est un moyen mis à la disposition de la création variétale pour accélérer la phase de fixation des lignées. Elle conduit, en une durée de douze à dix huit mois, à l'obtention de plantes fertiles et parfaitement homozygotes (Clément, Châtel *et al.*, 2002).

II.3. NOUVELLES VOIES DE SELECTION POUR LE RIZ

Pour Baudoin (2002), il est indispensable pour la "civilisation du riz" de voir augmenter la productivité de la plante avec peu d'eau, moins de travail et moins de terres. La technologie génique, comprenant l'analyse du génome, l'amélioration assistée par marqueur, le génie génétique, peut y contribuer (Baudoin, Louant *et al.*, 2002).

II.3.1. Création de variétés hybrides

La sélection de variétés hybrides F1 tient une place de plus en plus importante dans les programmes d'amélioration du riz. D'abord développé en Chine, où la moitié des surfaces sont cultivées en riz hybrides, plusieurs pays se sont lancés dans la sélection des riz hybrides avec l'appui de l'IRRI qui a fourni le matériel végétal de base.

La sélection des riz hybrides repose sur l'utilisation d'une stérilité génocyttoplasmique. Une production de semences hybrides utilisant ce type de stérilité nécessite de disposer de trois lignées différentes :

- A, lignée mâle stérile et B, lignée mainteneuse, de même génotype que A mais mâle fertile, AxB constituant le parent femelle de l'hybride
- R, lignée restauratrice constituant le parent mâle de l'hybride et dont les allèles dominants annulent l'effet du cytoplasme A.

Il est également possible d'utiliser des substances chimiques castratrices, mais les essais ne se sont pas révélés satisfaisants (Clément, Châtel *et al.*, 2002).

II.3.2. La sélection assistée par marqueurs (SAM)

Une application concrète de la génomique dans le schéma de création variétale et de sélection se situe au niveau de l'utilisation des marqueurs moléculaires et va permettre de passer dans certain cas du tri phénotypique au tri sur le génotype.

Les marqueurs sont surtout utiles pour :

- remplacer des tests phénotypiques lourds comme la qualité d'un produit ou bien certaines résistances aux maladies
- réaliser des tests précoces des caractères à contrôle génétique récessif (Pitrat et Causse, 2002).

Gallais (1994) définit la sélection assistée par marqueurs comme toute forme possible d'utilisation des marqueurs dans le processus d'amélioration. Les principales applications pour le sélectionneur sont : l'identification du matériel, la gestion des ressources génétiques, la conduite des rétrocroisements, la construction de génotypes, la prédiction de l'hétérosis, la prédiction des valeurs génotypiques et la conduite de la sélection récurrente (Gallais, 1994).

II.3.3. Méthodes transgéniques appliquées au riz

Le génie génétique est rapidement apparu comme un moyen d'obtenir plus simplement et plus précisément des variétés nouvelles et plus diverses que ce que peut faire la sélection classique. La transgénèse permet, en théorie, d'engendrer très rapidement des variétés présentant des caractères avantageux n'imposant pas de modifications des techniques de culture. Le cas le plus emblématique est sans doute le riz doré enrichi en vitamine A qui est susceptible d'apporter une proportion significative de cette molécule à des dizaines de millions de personnes qui peuvent tomber aveugles, voire mourir de cette carence (Houdebine, 2006). Il existe également, des travaux importants se rapportent à l'augmentation de la production, d'autres s'attaquent à la lutte contre les maladies bactériennes, fongiques et virales (Baudoin, Louant *et al.*, 2002).

II.3.4. Le riz plante modèle

Le riz est actuellement la plante modèle des monocotylédones. En effet, le riz est à la fois une plante à petit génome, ce qui a facilité son séquençage complet, une plante diploïde et autogame, ce qui simplifie son étude génétique, une plante relativement facile à transformer génétiquement, et une plante de grande culture, ce qui permet d'espérer des applications directes des découvertes réalisées sur cette plante (Berruyer, 2003).

La panoplie des outils à la disposition du sélectionneur s'est enrichie, mais il n'y a pas eu jusqu'à aujourd'hui de remise en cause des schémas établis il y a maintenant plus d'un siècle pour la sélection généalogique chez les autogames, et bientôt un siècle pour la sélection des hybrides (Gallais, 2002).

III - CREATION DE VARIETES RESISTANTES

Le choix d'une méthode de création de variétés résistantes dépend de la biologie de l'hôte, notamment de la nature de la résistance disponible et de la biologie du parasite, et en particulier de la variabilité de son pouvoir pathogène (Notteghem, 1989). Les croisements choisis par les sélectionneurs sont souvent réalisés entre deux parents résistants ou entre un parent résistant et un parent moyennement résistant, mais ils ne permettent pas toujours d'obtenir des indications sur le déterminisme génétique de la résistance (Notteghem *et al.*, 1980; Notteghem, 1989). Mais, que l'on désire connaître le niveau de résistance de variétés pour les utiliser en sélection ou évaluer des variétés nouvellement créées, c'est le même phénomène qui est observé : l'absence ou la présence de lésions, sur les plantes soumises à une contamination.

Les connaissances acquises sur la domestication du riz et sur la répartition mondiale de la pyriculariose prouvent une longue co-évolution. Et l'utilisation de variétés résistantes à la maladie est très généralement reconnue comme la méthode de contrôle la plus pratique et la plus économique ; c'est vers l'obtention de telles variétés que s'orientent les efforts des chercheurs et sélectionneurs (Jeanguyot, 1982).

Pour Jeanguyot (1982), la résistance des plantes aux maladies met en jeu des mécanismes nombreux et complexes, qui orientent les stratégies de sélection. Le schéma de Van der Plank, distingue deux formes de résistance nommées "résistance verticale" et "résistance horizontale". On distingue ainsi la résistance monogénique (verticale) qui est gouvernée par un seul gène dit "majeur" et la résistance polygénique (horizontale), conférée par un certain nombre de gènes dits "mineurs". A cela on peut ajouter un type intermédiaire, la résistance pyramidale, où un petit nombre de gènes sont associés pour donner à la plante une résistance dite "oligogénique".

III.1. LA RESISTANCE VERTICALE

III.1.1. Concept

Une variété possédant une résistance verticale est protégée totalement contre certaines races du parasite, mais est sensible aux autres. Dans le système de résistance verticale, au gène qui confère au riz sa résistance, correspond son homologue le gène d'avirulence dans le génotype du champignon, responsable du pouvoir pathogène chez *M.grisea*. C'est la théorie "gène pour gène" élaborée par Flor (Jeanguyot, 1982).

III.1.2. Sélection pour la résistance verticale

La première sélection pour des variétés de riz à haut niveau de résistance a commencé au Japon en 1943. Ce type de résistance facilement transmissible et facile à sélectionner, s'est révélé être le plus souvent oligogénique (Jeanguyot, 1982; Vales, 1983). Ces variétés, capables de s'opposer aux races de champignons identifiées localement, sont croisées avec des variétés possédant de bonnes caractéristiques agronomiques. Des tests de résistance permettent par la suite de sélectionner les meilleures obtentions. Malheureusement, ce type de résistance à la pyriculariose n'est pas un caractère durable, et de nombreuses variétés ont vu leur résistance, contournée par le pathogène, s'effondrer. Cette perte de la résistance est liée à l'apparition de nouvelles races de *M.grisea*. Diverses stratégies de lutte utilisant ce type de résistance ont été mises au point (Jeanguyot, 1982).

a. Accumulation de gènes

Cette technique, consiste à cultiver une variété possédant tout d'abord un seul gène de résistance et à lui incorporer, chaque fois qu'elle redevient sensible, un nouveau gène la protégeant contre les nouvelles races. Ce processus répété de nombreuses fois, abouti à une accumulation de gènes de résistance dans la même variété. Mais la technique implique une véritable compétition entre le parasite et le sélectionneur. Il serait difficile de fonder sur cette stratégie l'ensemble des chances d'amélioration de la résistance à *M.grisea* de pays en développement qui ne disposent pas des structures d'avertissement nécessaire (Jeanguyot, 1982; Vales, 1983).

Proche de l'accumulation séquentielle de gènes, le "pyramidage" (*pyramiding* en anglais), consiste à incorporer plusieurs gènes majeurs de résistance dans une même variété. L'hypothèse est que le pathogène ne subira pas l'ensemble des mutations correspondant à chaque gène de résistance, rendant durable ce type de résistance (McDonald et Linde, 2002).

b. Les variétés composites ou "multilignées"

Vales (1983) définit le "multiligne" comme, un mélange de plusieurs lignées si possible isogéniques ou ayant au moins les mêmes caractéristiques agronomiques, et ne différant que par un ou plusieurs gènes de résistance.

Chaque lignée exerce une pression de sélection directionnelle qui favorise les races du parasite ne possédant pas les gènes d'avirulence correspondant, l'hypothèse implicite étant que cette collection de variétés se comporterait de la même façon que si on se trouvait en présence d'une résistance horizontale. Ainsi le défaut des variétés à résistance verticale monogénique qui exercent une pression unique en faveur des mêmes races, est évité. Cependant, il y a un risque potentiel d'apparition d'une souche du pathogène virulente à l'égard de toutes les lignées du "multiligne". De plus la fabrication de séries de lignées quasi isogéniques n'est pas aisée (Jeanguyot, 1982).

III.2. LA RESISTANCE HORIZONTALE

III.2.1. Concept

A l'opposé de la résistance verticale, la résistance horizontale est polygénique, cette résistance ne préserve pas entièrement la plante de la maladie mais freine le développement de celle-ci quelle que soit la race du champignon.

Le modèle de la résistance horizontale proposé par Van der Plank, met en avant que la relation entre l'hôte et le parasite ne fait plus intervenir de liens génétiques spécifiques : une variété se comporte identiquement face à toutes les souches du parasite. Cette forme de résistance est gouvernée chez la plante par un nombre indéterminé de gènes, d'où le nom de résistance partielle polygénique (ou quantitative). La résistance partielle est définie, par la capacité relative du génotype de l'hôte à limiter la proportion d'une attaque à tout les stades de la plante (Jeanguyot, 1982; Ahn, 1994).

III.2.2. Sélection pour la résistance horizontale

La sélection d'une résistance partielle polygénique se heurte à deux difficultés :

- le caractère polygénique de la résistance est plus difficile à utiliser
- l'interaction au champ des effets des résistances mono et polygéniques (Notteghem, Andriatampo *et al.*, 1980; Notteghem, 1989).

Il est essentiel qu'aucune confusion ne subsiste et qu'on ne prenne pas une résistance verticale pour une résistance horizontale de bon niveau car les réactions de la plante et les symptômes observables sont souvent les mêmes pour les deux types de résistance. La résistance polygénique étant un phénomène quantitatif, il convient de disposer de méthodes permettant d'évaluer rapidement son niveau chez les variétés. Les expérimentations ont lieu selon les cas en pépinières de plein champ ou en condition artificielles contrôlées (Jeanguyot, 1982).

a. Tests en serre

L'inoculation par pulvérisation d'une souche de *M.grisea* virulente est utilisée sur des plantules au stade septième feuille. On classe les variétés pour leur résistance soit en comptant le nombre de lésions de type sensible; soit en établissant le rapport, nombre de lésions sensibles sur nombre total de lésions. Malgré une certaine corrélation avec les résultats obtenus au champ, ces méthodes ne donnent pas une représentation suffisante de la résistance dans les conditions réelles de culture.

Une technique d'inoculation par contact, plus précise a été mise au point par l'IRAT (ex. CIRAD) pour mesurer le niveau de résistance des variétés dans des conditions standardisées. La méthode de lecture tient compte à la fois du nombre de lésions par unité de surface foliaire et de la dimension des lésions.

Mais ces méthodes concernent surtout la pyriculariose foliaire, qui n'est qu'une composante de la résistance à la pyriculariose, la relation avec la pyriculariose paniculaire n'étant pas prouvée. Quelques essais d'inoculation en serre par pulvérisation sur panicule ont été réalisés, le pourcentage de cou malade étant mesuré 8 jours après inoculation et à maturité (Jeanguyot, 1982; Vales, 1983).

b. Tests au champ

La méthode des pépinières IBN (International Blast Nursery), qui a été très utilisée de part le monde, permettait surtout de détecter les résistances verticales. Mais cette technique a pour inconvénient de ne pas mettre en valeur des formes de résistance qui s'exprimeraient par l'allongement du temps de latence ou par une réduction de la production de spores (Notteghem, Andriatampo *et al.*, 1980; Notteghem, 1985; Notteghem, 1989). Pour palier à cet inconvénient majeur, l'IRAT a mis au point un test d'évaluation de la résistance au champ dit "test d'évaluation de la résistance avec inoculum décroissant", ou test DITER (Jeanguyot, 1982).

Les variétés à tester sont semées sur des parcelles allongées et perpendiculaires à une bande de variétés infestantes. Ces variétés infestantes sont inoculées par une souche de *M.grisea* multipliée par culture *in vitro* après clonage monospore. Les variétés infestantes produisent des conidies qui atteignent (allo infection) l'extrémité proche des parcelles plantées en variétés testées. A l'autre extrémité de ces parcelles on peut par contre suivre le résultat de l'auto inoculation.

Chaque variété testée est séparée de sa voisine par une variété résistante. Les variétés infestantes sont choisies pour leurs cycles différents, ce qui assure une distribution de spores pendant toute la saison de culture (Notteghem, Andriatampo *et al.*, 1980; Notteghem, 1985; Notteghem, 1989).

Le dispositif DITER constitue un bon outil pour la détermination du niveau de résistance horizontale des lignées en cours de sélection et des variétés. Il peut être utilisé aussi bien pour l'évaluation de la pyriculariose foliaire que paniculaire. Toutefois, la corrélation entre la pyriculariose de la feuille et celle du cou n'a pas été démontrée selon Jeanguyot (1982).

III.2.3. Méthodes de sélection de la résistance horizontale

Les méthodes de sélection de la résistance visent à vérifier si la résistance observée satisfait aux critères de la résistance horizontale :

- résistance stable durant un grand nombre d'années
- résistance efficace vis-à-vis de toutes les souches du parasite
- résistance dont l'héritabilité est oligogénique ou polygénique.

Par ailleurs le taux d'élimination d'individus présentant une trop grande sensibilité à la pyriculariose est comparable à ceux que l'on constate pour n'importe quel autre caractère tel que la hauteur de la plante, la sensibilité à l'égrenage, etc. Ce qui rend les deux objectifs de sélection tout a fait compatible. Dans ces schémas de sélection, le phytopathologiste interviendra sur le choix des géniteurs et en cours de sélection (Notteghem, Andriatampo *et al.*, 1980; Notteghem, 1989).

a. Choix des géniteurs

Du choix des géniteurs dépend naturellement tout le succès du programme de sélection. Les variétés connues pour être résistantes depuis une longue période, sont contrôlées de façon approfondie avant leur adoption pour la création de nouvelles variétés résistantes. Sont également étudiées les variétés de bonnes caractéristiques agronomiques susceptibles d'être utilisées comme géniteurs.

Au champ le test DITER permet de comparer la résistance des variétés à tester avec la résistance d'une gamme de variétés connues utilisées comme témoin. En condition contrôlée, on testera les parents par inoculation, à l'aide d'une collection de souches d'origine locale (Notteghem, Andriatampo *et al.*, 1980; Jeanguyot, 1982).

b. Sélection généalogique

Les variétés choisies pour leur résistance sont croisées avec des variétés agronomiquement intéressantes, afin qu'elles incorporent le système de résistance polygénique. Les générations successives sont testées selon un dispositif adapté à chaque étape de la sélection (Jeanguyot, 1982).

Pour les générations précoces, dans le cas de sélection généalogique classique, il est intéressant de noter la sensibilité du matériel végétal. Les champs du sélectionneur sont découpés en bandes sur lesquelles sont plantées les lignées en cours de sélection ainsi que les parents issus du croisement. Il convient d'installer entre ces bandes, perpendiculairement aux lignées, un mélange de variétés sensibles à cycles différents, elles auront pour but d'assurer une répartition homogène de l'épidémie sur tout le champ.

Des variétés témoins, disposées à intervalles réguliers entre les lignées, permettent de juger du niveau de notes décidant de l'élimination des lignées sensibles (Jeanguyot, 1982; Notteghem, 1989).

En fin de sélection, dès que les familles sont suffisamment homogènes (F6 à F8) et ramené à un effectif réduit par le jeu de la sélection, les descendances sont placées en test DITER, pour connaître avec plus de précision le niveau de résistance obtenu (Jeanguyot, 1982).

Tableau 2 : liste des variétés évaluées et leur adaptation aux conditions pédoclimatiques

Variétés évaluées	sélectionnés pour	Inoculations en serre	Test au champ Mada
B 22	Moyen ouest	Montp	X
Chhomrong Dhan	hauts plateaux	Montp/Mada	X
Co39	Témoin de sensibilité à la pyriculariose	Montp	X
Cuiabana	moyen ouest	Montp	X
Estrela	moyen ouest		X
Exp 006	hauts plateaux		X
Exp 007	hauts plateaux		X
Exp 202	hauts plateaux		X
Exp 204	hauts plateaux		X
Exp 206	hauts plateaux	Montp	X
Exp 302	hauts plateaux		X
Exp 304	hauts plateaux	Montp/Mada	X
Exp 401	hauts plateaux		X
Exp 407	hauts plateaux		X
Exp 409	hauts plateaux		X
Exp 502	hauts plateaux		X
Exp 910	hauts plateaux		X
Exp 918	hauts plateaux	Montp	X
Exp 924	hauts plateaux		X
Exp 929	hauts plateaux		X
FOFIFA 133	hauts plateaux	Mada	X
FOFIFA 151	hauts plateaux	Montp	X
FOFIFA 152	hauts plateaux		X
FOFIFA 154	hauts plateaux	Mada	X
FOFIFA 157	hauts plateaux	Montp	X
FOFIFA 158	hauts plateaux	Montp	
FOFIFA 159	hauts plateaux	Montp	X
FOFIFA 161	hauts plateaux	Montp	X
FOFIFA 167	hauts plateaux	Montp	X
FOFIFA 168	hauts plateaux	Montp	X
FOFIFA 169	hauts plateaux	Montp	X
FOFIFA 171 (Exp 208)	hauts plateaux	Montp	X
FOFIFA 172 (Exp 411)	hauts plateaux	Montp/Mada	X
Irat 13	moyen ouest - source de résistance durable	Mada	X
Jumli Marshi	variété irriguée d'altitude - source d'adaptation		X
Luluwini	moyen ouest	Mada	X
Maratelli	Témoin de sensibilité à la pyriculariose		
Moroberekan	inadaptée au moyen ouest - source de résistance durable	Mada	X
Nerica 3	moyen ouest	Montp	X
Nerica 4	moyen ouest	Montp	X
Nerica 6	(moyen ouest)		X
Primavera	moyen ouest	Mada	X
Sebota 281	moyen ouest	Mada	X
Sebota 330	moyen ouest	Montp/Mada	X
Shin Ei	hauts plateaux	Mada	X
Sucupira	moyen ouest	Montp/Mada	X
WAB 878	moyen ouest	Montp/Mada	X

Montp = Montpellier

Mada = Madagascar

MATERIELS ET METHODES

I - CARACTERISATION DE LA RESISTANCE DES GENITEURS

I.1. INOCULATIONS CONTROLEES EN SERRE

I.1.1. Matériel végétal évalué

Au total, 14 variétés de riz ont été inoculées, certaines variétés proviennent d'introductions récentes, d'autres sont en fin de sélection (EXP pour expérimentale) et certaines sont connues pour leur sensibilité (Fofifa154) ou leur résistance comme Moroberekan (Tableau 2). Les variétés sont semées par deux en bacs plastiques, ce qui fait 7 bacs au total qui sont placés avant l'inoculation dans une serre indemne de la maladie. Du semis jusqu'au jour de l'inoculation une trentaine de jours se sont écoulés.

Parallèlement le même travail d'inoculation a été réalisé à Montpellier dans les serres du CIRAD, où 24 variétés ont été testées.

I.1.2. Production de l'inoculum

Au cours des tests réalisés à Madagascar, quatre souches de *M.grisea* ont été utilisées (MD1098 ; MD909 ; MD971 ; MD979). Six souches ont été utilisées dans les tests menés à Montpellier, il s'agit également de souches d'origine Malgache (MD824 ; MD908 ; MD978 ; MD983 ; MD1032 ; MD1098). Elles ont été choisies pour leur large spectre de virulence. Une seule souche est commune entre les tests réalisés à Madagascar et à Montpellier (MD1098).

Les souches sous forme de mycélium sporulé, sont conservées en confettis (petits morceaux de papier filtre stérile colonisés par du mycélium) au congélateur à -20°C. La mise en culture se fait en déposant 4 confettis sur milieu gélosé dans des boîtes de pétri. La composition du milieu de culture est indiquée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : milieu de culture pour *M.grisea*

<p>Pour 1 litre de solution :</p> <ul style="list-style-type: none">- 20g de farine de riz- 15g d'agarose- 2,5g d'extrait de levure- 1 litre d'eau distillée
<p>La solution est autoclavée 20 minutes à 120°C, on a ajouté les antibiotiques : 2ml de solution de spéciline ou 1ml de Benzylpénicilline (500.000 U/L) 2ml de streptomycine (1g/mL)</p>

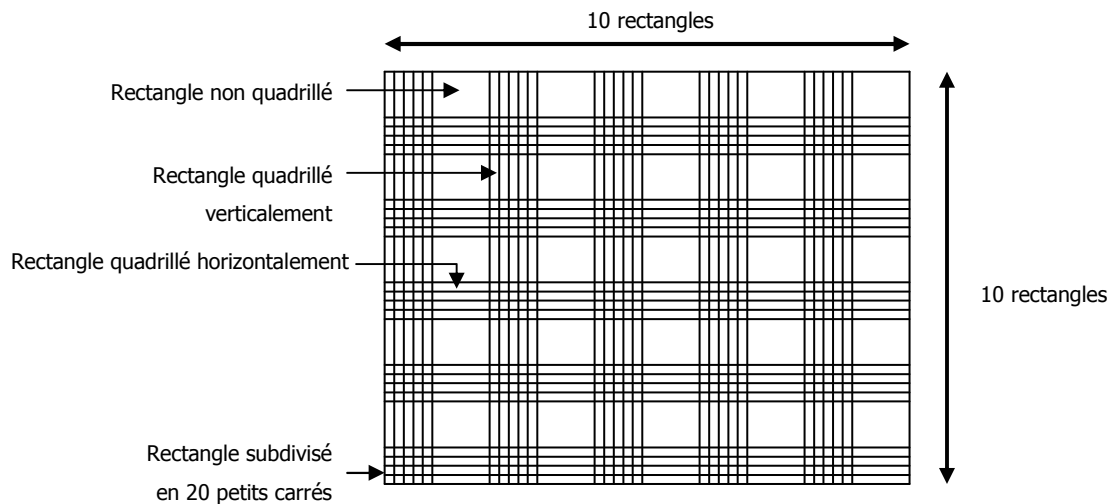


Figure 14 : schéma de la cellule de Malassez

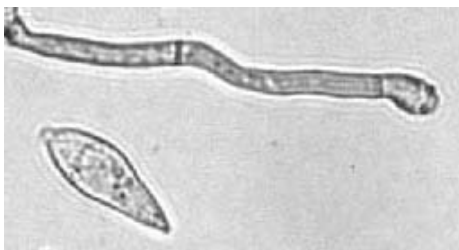


Figure 15 : conidie et hyphe de *M.grisea* (source : <http://fr.wikipedia.com>)

On utilise, 4 confettis par boîte et 10 boîtes par souche, afin d'avoir un nombre suffisant de boîtes non contaminées ayant sporulé. Afin de faire sporuler les souches, les boîtes sont placées dans le laboratoire à température ambiante avec une alternance de période de lumière et d'obscurité. La préparation de la solution de spores se fait 15 jours après la mise en culture.

I.1.3. Méthode d'inoculation

Pour la préparation de l'inoculum, 5 mL d'eau distillée sont ajoutés dans chacune des 5 boîtes non contaminées utilisées. Ensuite à l'aide d'une lame de microscope, on racle la surface du milieu gélosé afin de mettre les spores en suspension. La solution mère de spores d'un volume final de 25 mL de concentration inconnue doit être diluée pour la préparation d'une solution finale de 100 mL concentrée à 50000 spores par mL. Le calcul de la concentration initiale de spore dans la solution mère se fait à l'aide de la cellule de Malassez, qui est une cellule de numération.

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage (Figure 14). Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage. L'évaluation de la concentration se fait en comptant le nombre de conidies (Figure 15) présentes sur les 25 rectangles subdivisés en 20 petits carrés. Le nombre de conidies est multiplié par 4000 afin d'obtenir la concentration en spores/mL.

Les 100ml de suspension à 50000 spores/mL sont mélangés avec 100 ml d'une solution de gélatine à 1%. Cette solution va servir de "mouillant", c'est-à-dire qu'elle va permettre à la solution de spores de bien adhérer sur les feuilles. Au final la solution de 200 mL sera concentrée à 25000 spores/mL, et répartie sur les 7 bacs contenant les variétés.

A l'aide d'un pulvérisateur de jardin on répartit environ 25 mL de solution par bac en plusieurs passages. Les bacs sont ensuite recouverts d'une couverture humide et d'une bâche plastique pendant 2 jours afin de maintenir l'obscurité et une hygrométrie favorable pour la germination des conidies.

Tableau 4 : convention d'évaluation de la résistance pour les inoculations contrôlées

Notation	Evaluation de la résistance	
1-2	R	(résistant)
3-4	MR	(moyennement résistant)
5	MS	(moyennement sensible)
6	S	(sensible)



Figure 16 : Echelle de lecture des symptômes de la pyriculariose

1 2 3 4 5 6

Les symptômes 1 et 2 sont typiques des interactions incompatibles (résistant),
 Les symptômes 5 et 6 sont typiques des interactions compatibles (sensible),
 Les symptômes 3 et 4 correspondent à des résistances modérées.

I.1.4. Lecture des symptômes

La première lecture se fait 7 jours après l'inoculation, la seconde lecture a lieu 5 jours plus tard. L'évaluation de la résistance des variétés à la pyriculariose foliaire se fait selon une échelle de notation allant de 1 à 6 représentée par la Figure 16. Ce n'est pas tant la quantité de symptômes donc l'agressivité de la souche testée qui nous intéresse, mais la sévérité de l'attaque qui correspond à la virulence du pathogène.

Pour des raisons de clarté, une convention a été adoptée pour l'interprétation des résultats de l'évaluation de la résistance de chaque variété en fonction de chaque souche (Tableau 4).

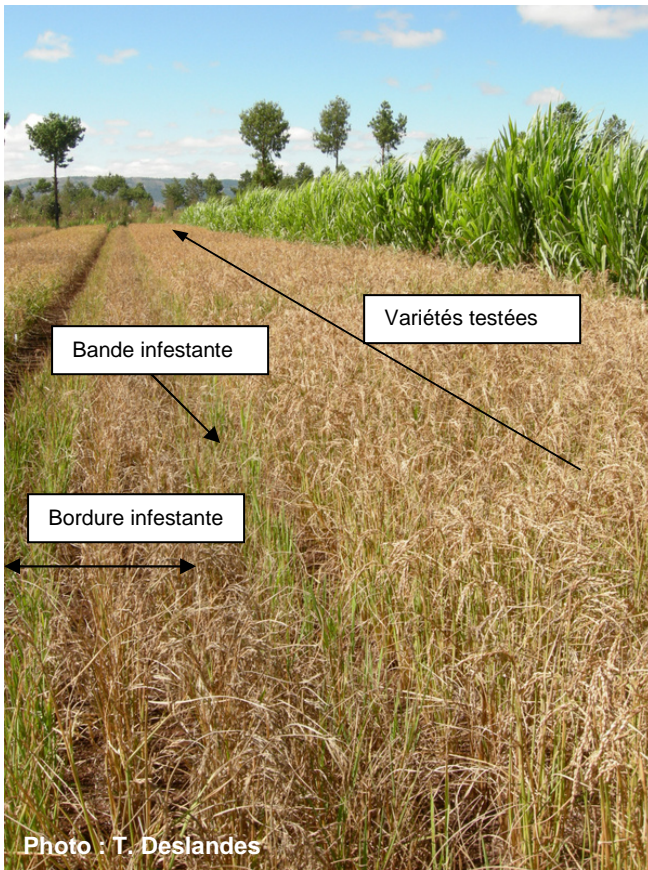
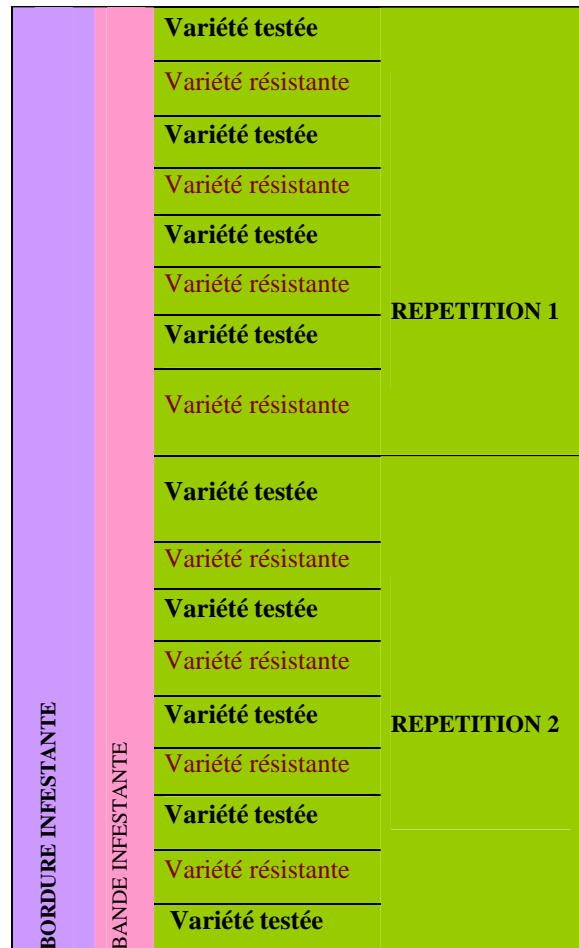


Figure 17 : Illustration du dispositif d'évaluation au champ



I.2. CARACTERISATION DE LA RESISTANCE AU CHAMP

I.2.1. Présentation du dispositif d'évaluation

Le dispositif se présente comme un DITER, et il a été préparé comme tel. Normalement, les bandes et bordures infestantes sont inoculées artificiellement à l'aide de souches de *M.grisea* multipliées au laboratoire. Cette inoculation n'a pu être possible pour la campagne 2006-2007, c'est donc à partir d'une épidémie naturelle de la maladie que l'évaluation des variétés a pu être réalisée. Il a donc été impossible d'évaluer la capacité des variétés à freiner la propagation de l'épidémie le long de la ligne à partir de la bordure infestante inoculée. Des informations intéressantes sur le niveau de résistance des variétés ont néanmoins pu être obtenues mais avec une moindre précision quant à la nature de ces résistances.

Pour la campagne 2006-2007 l'essai, regroupe 44 variétés (voir Tableau 2) semées chacune en deux répétitions. Entre chaque variété à tester, on intercale une variété résistante à la pyriculariose (FOFIFA 172 = Exp 411), l'ensemble est semé sur deux lignes espacées de 20 cm d'une longueur de 3,5 m perpendiculairement à une bande et une bordure infestante (Figure 17). La bordure infestante est composée de 4 lignes de variétés sensibles à la pyriculariose (Latsidahy, Latsibavy, FOFIFA 152, FOFIFA 154). Intercalée entre la bordure infestante et les variétés se trouve la bande infestante qui est composée par un mélange de trois variétés (Rojofotsy, Manga vava, Molotry madame)

Tableau 5 : quantité d'intrants apportés au dispositif d'évaluation au champ.

	Dose en kg/ha
Fumier	10.000
Dolomie	500
Engrais NPK (11-22-16)	300
Urée (en 2 fois)	80
Furandan (Carboferon) lutte contre <i>Heteronycus</i>	30
Stomp (herbicide post levée)	3



Figure 18 : dégâts de *M.grisea* sur cou et panicule

Les variétés ont été semées le 24 nov. 2006 sur un précédent *Bracharia*. Les intrants apportés sont indiqués dans le Tableau 5. Afin de faciliter l'apparition de la maladie, les doses de fumier et d'engrais azoté sont délibérément fortes par rapport à des conditions de cultures normales. De plus la quantité d'urée épandue sur les bandes infestantes est plus importante.

Une analyse de variance ou ANOVA (*ANalysis Of Variance*) a été réalisée sur les deux répétitions afin de déterminer si il y avait un effet significatif de la variété sur les variables observées pour caractériser la résistance à la pyriculariose (foliaire, paniculaire), la durée du cycle et la stérilité.

I.2.2. Observations réalisées

Sur la totalité du cycle cultural un certain nombre d'observation sont faites :

a. Au stade végétatif / pyriculariose foliaire :

- Note de sévérité maximale observée de 1 à 6 (selon l'échelle de la Figure 16, utilisée pour l'évaluation en serre)
- Pourcentage de surface foliaire attaquée sur les lignes,

La première notation a été effectuée le 1 février, la seconde un mois plus tard, le 2 mars.

b. Au stade reproductif / pyriculariose paniculaire :

Note intensité attaque de 1 à 9 (9 étant la plus mauvaise note). La note 1 correspondant à aucun symptôme visible sur le cou ou la panicule; contrairement à la note 9 où plus de 90% des panicules sont affectées de symptômes (Figure 18)

c. Autres observations :

- Date où la floraison atteint 50% de la ligne, et qui permet d'évaluer le cycle de la variété.
- Taux de stérilité (pourcentage) : 3 plantes sont choisies au hasard et on dénombre le nombre de grains pleins par rapport au grain vides sur les panicules de chaque plante.
- Autres maladies (ex. Brunissure de gaine ou pourriture de la gaine: *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksw.)



06/03/2007



26/03/2007

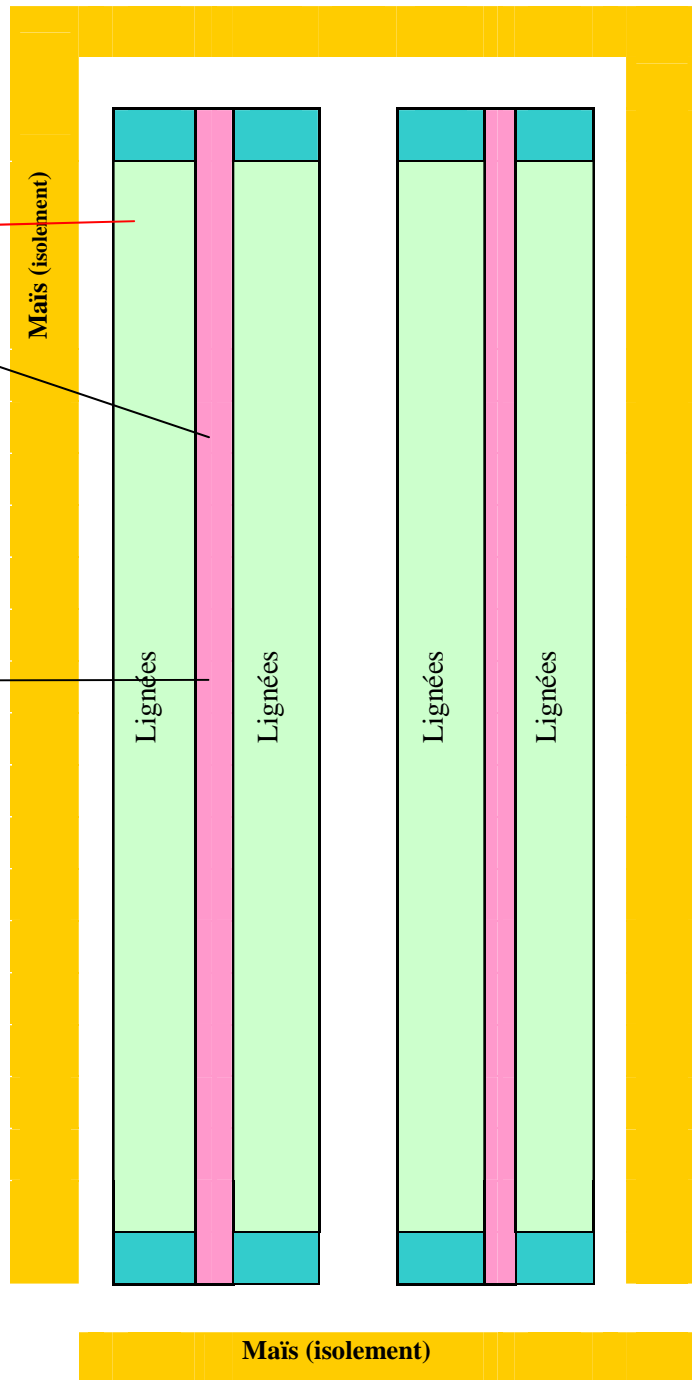


Figure 19 : schéma et évolution du dispositif d'infection dans un des blocs de sélection généalogique

II - EVALUATION POUR LA RESISTANCE AU COURS DU SCHEMA DE SELECTION GENEALOGIQUE

II.1. DISPOSITIF

Au cours des étapes de la sélection généalogique, à partir des populations F2 puis au cours des générations suivantes (F3, F4, F5, Fn). Les lignées sélectionnées sont semées perpendiculairement à des bandes infestantes (Figure 19). Les bandes infestantes sont composées de 3 variétés : Fofifa152; Rojofotsy; et Fofifa154. A l'extrémité de chaque parcelle sont semés des témoins de bordure : Fofifa161; Fofifa169; et Fofifa154.

Une famille représente l'ensemble des lignées issues d'une même lignée à la génération précédente. L'ensemble des familles de lignées issues d'un même croisement, est semé groupé sur les blocs de sélection. Les parents du croisement sont semés comme témoins afin d'évaluer pour chaque lignée ce qui a été gagné ou perdu.

Les lignées en cours de sélection sont également dupliquées dans un essai, que l'on appelle "collection de criblage pour la résistance à la pyriculariose". Le dispositif est identique à celui de la caractérisation de la résistance au champ (voir I.2). Comme pour celui ci, on réalise une inoculation artificielle de *M.grisea*, mais pour cette année cela n'a pas été possible. On fait les mêmes observations pour la pyriculariose foliaire (note et pourcentage d'attaque), avec également une note de pyriculariose paniculaire (1 à 9). Il est ainsi possible de croiser les observations obtenues dans les deux essais, parcelles de sélection et parcelles de criblage pour la pyriculariose.

II.2. MATERIEL VEGETAL EN COURS DE SELECTION

Pour la campagne 2006/2007, aucun matériel n'était en cours de sélection pour la troisième génération (F3). L'ensemble des évaluations a été effectué sur des lignées aux stades F4 et F5. En F4, 36 croisements étaient représentés (ANNEXE I) par un total de 432 lignées en cours de sélection. En F5, le nombre de lignées en sélection était de 183 issues de 17 croisements (ANNEXE II).

Pour chaque lignée sélectionnée, qui est semée sur 2 lignes sur le terrain, 5 plantes sont choisies et récoltées dans la lignée. Les semences récoltées sur chacune des 5 plantes seront semées sur deux lignes l'année suivante, ce qui constitue donc l'année n+1 une famille de 10 lignes pour chaque lignée sélectionnée l'année n.

II.3. NOTATIONS EFFECTUEES

Sur ces lignées, comme pour les évaluations précédentes, est évalué la pyriculariose foliaire, avec une note de 1 à 6 pour la sévérité maximale observée ainsi que le pourcentage de surface foliaire attaquée et la pyriculariose paniculaire (note de 1 à 9). La date de début d'épiaison et la date où l'épiaison est à 50% sont également notées. Les lignées qui sont retenues par les sélectionneurs seront reconduites pour la campagne suivante, cette sélection se fait en comparant les lignées avec les parents mais également en comparant les lignées entres-elles. Il faut donc que la lignée sélectionnée apparaisse comme meilleure sur l'ensemble de la parcelle, selon différents critères comme :

- La morphologie du grain
- Hauteur de la plante
- Vigueur
- Taille de la panicule/quantité de grains
- Résistance aux maladies
- "Stay-green"

Tableau 6 : plan de répartition en "split-split-plot"

Premier niveau (Grande parcelle) - Système -	Deuxième niveau (Parcelle intermédiaire) - Fumure -	Troisième niveau (Parcelle élémentaire) - Variétés -
Labour	Fumure minérale Fumure organique	Randomisation des 8 variétés Randomisation des 8 variétés
SCV	Fumure minérale Fumure organique	Randomisation des 8 variétés Randomisation des 8 variétés

III - EVALUATION POUR LA RESISTANCE DANS L'ESSAI VARIETAL

III.1. MATERIEL VEGETAL

Pour la campagne 2006-2007, 8 variétés ont été testées dans le dispositif, appelé "matrice". Ce dispositif vise à modéliser le comportement des variétés de riz pluvial en fonction de différents systèmes de cultures et itinéraires techniques.

Les variétés testées sont les suivantes : Exp.910 ; Exp.206 ; Exp.918 ; Exp.304 ; Exp.411= Fofifa172 ; Fofifa167 ; Fofifa161 ; Fofifa154T (traitement fongicide).

Les variétés Fofifa161/167/172 servent de témoins car se sont des variétés déjà vulgarisées et dont on connaît le comportement face à la maladie. Elles sont comparées avec les variétés "Exp." qui sont en stade final d'évaluation. Pour les sélectionneurs, Fofifa154 est un idéotype en matière de riz pluvial. Malheureusement la résistance de cette variétés s'est éffindré ces dernières années et elle ne peut plus être vulgarisée désormais. Le traitement fongicide appliqué permet ainsi d'empêcher l'apparition de la maladie, et de voir le comportement des autres variétés vis-à-vis de cette référence. En conclusion, le dispositif vise à choisir les meilleures lignées parmi celles repérées en sélection ou en collections testées, en les comparant avec les lignées déjà vulgarisées. L'étape suivante est la validation de ces variétés en essais multilocaux ou dans le cadre d'essais participatifs en milieu paysan.

III.2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le dispositif expérimental est un "split-split-plots" à 4 répétitions. L'effet de 3 facteurs différents est analysé dans ce dispositif. Au premier niveau, sur les grandes parcelles, deux systèmes de culture sont comparés: Le labour et le semis direct après une rotation d'avoine. Au second niveau, sur parcelles intermédiaires, deux niveaux de fumure différents sont comparés : Fumure organique seule (fumier de parc) ou Fumier + fumure minérale. Enfin au niveau des petites parcelles élémentaires on compare les huit variétés entre elles (Tableau 6).

Ce type de dispositif a été retenu car il facilite la gestion des opérations agronomiques qui sont ainsi menées sur des parcelles de dimensions plus importantes. La randomisation des parcelles élémentaires « variétés » est faite à l'intérieur de chaque sous-traitement « fumure ». Les sous-traitements « fumures » sont ensuite randomisés à l'intérieur des traitements principaux « systèmes » qui sont eux-mêmes randomisés dans chacune des 4 répétitions (plan en ANNEXE III). L'analyse de variance teste la variation associée à chaque type de traitement avec une résiduelle différente. En effet dans ce type de dispositif l'erreur expérimentale est plus faible au niveau des parcelles élémentaires (il y a plus de répétitions et les effets des autres traitements sont sortis de la résiduelle) qu'au niveau des parcelles de plus grande taille. En d'autres termes, les variétés sont évaluées avec plus de précision que les fumures ou que les systèmes. Au final, le dispositif permet de voir si il y'a un effet du "système" ou de la "fumure" sur l'épidémie de pyriculariose en fonction des variétés. Cette analyse va nous permettre également de tester les interactions entre les différents facteurs étudiés.

III.3. EVALUATIONS

Les évaluations réalisées qui permettent de caractériser la résistance à la pyriculariose sont les suivantes :

- Note maximale de sévérité de la pyriculariose foliaire (1 à 6) et pourcentage de surface foliaire attaquée. Deux observations ont été réalisées : le 30 janvier et le 21 février.
- Date de floraison à 50%, afin d'évaluer la durée du cycle des variétés
- Note pyriculariose paniculaire (1 à 9), une seule observation : le 27 avril.
- Rendement.
- Le taux de stérilité est estimé en comparant le nombre de grains pleins avec le nombre de grains vides de 10 panicules.

D'autres observations sont également réalisées qui servent dans le programme de sélection à caractériser les variétés (Tableau 7).

Tableau 7 : observations pour la caractérisation des variétés en sélection (la note la plus élevée étant la plus mauvaise).

Observations sur la plante	Evaluation du grain
Exertion (1 à 9)	Longueur moyenne de la panicule
Egrainage (1 à 9)	Pilosité (1 à 9)
Hétérogénéité de la parcelle (1 à 9)	Aristation
Brunissure des gaines (1 à 9)	Couleur du caryopse
Vigueur (1 à 3)	Longueur/largeur moyenne du grain
Moyenne de talles fertiles pour 10 plantes	
Moyenne de hauteur pour 5 plantes	

Tableau 8 : bilan comparé des inoculations contrôlées en serre

VARIETE	Zone d'aptitude	Montpellier 2007						Madagascar 2007			
		MD824	MD908	MD978	MD983	MD1032	MD1098	MD1098	MD909	MD979	MD971
FOFIFA 133	HP							S	S	MR	MS
FOFIFA 154	HP							S	S	MS	S
Shin Ei	HP							S	MS	MS	S
Luluwini	MO							S	MS	MS	S
Primavera	MO							MR	MR	R	R
Sebota 281	MO							MR	R	R	R
IRAT 13	MO-SR							MS	MS	MR	S
Moroberekan	SR							MR	MR	R	MR
Chhomrong Dhan	HP	S	S	S	MS	R	S	MS	MR	MR	MS
Exp 304	HP	R	R	MR	R	R	MS	R	R	R	MR
FOFIFA 172 (EXP411)	HP	R	R	R	R	R	R	MR	R	R	R
Sebota 330	MO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sucupira	MO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
WAB 878	MO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Exp 206	HP	MS	MS	S	S	R	S				
Exp 910	HP	R	MR	MR	R	R	S				
Exp 918	HP	MS	MS	MR	S	R	S				
FOFIFA 151	HP	S	S	S	S	MS	S				
FOFIFA 157	HP	MS	MS	MS	MS	R	S				
FOFIFA 158	HP	S	S	S	S	R	S				
FOFIFA 159	HP	MS	MS	S	S	R	S				
FOFIFA 161	HP	MS	MS	S	S	R	S				
FOFIFA 167	HP	S	S	S	S	R	S				
FOFIFA 168	HP	R	R	MS	R	R	R				
FOFIFA 169	HP	S	S	S	S	R	S				
FOFIFA 171 (EXP 208)	HP	S	S	MS	S	R	S				
B 22	MO	R	MR	R	R	R	R				
Cuiabana	MO	MR	MR	MS	R	MS	MS				
NERICA 3	MO	MR	MS	MS	R	S	S				
NERICA 4	MO	MS	MS	MS	MS	S	S				
Co 39	TS	S	S	S	S	S	S				

MO = Moyen ouest
 HP = Hauts plateaux
 SR = Source de résistance
 TS = Témoin de sensibilité à la pyriculariose

Notation
 R (résistant)
 MR (moyennement résistant)
 MS (moyennement sensible)
 S (sensible)

RESULTATS ET DISCUSSION

I - CARACTERISATION DE LA RESISTANCE DES GENITEURS

I.1. INOCULATIONS CONTROLEES EN SERRE (TABLEAU 8)

I.1.1. Résultats obtenus à Madagascar

Sur les 14 variétés testées, on peut établir que 9 d'entre elles présentent une réelle résistance au spectre de souches inoculées. Pour 6 d'entre elles, la résistance semble totale (WAB878, Sebota330, Sucupira, Fofifa172, Exp.304 et Sebota281). Pour les variétés comme Moroberekan, Chhomrong Dhan et Primavera cette résistance semble plus moyenne. Tandis que les variétés Fofifa133, Shin Ei, Luluwini, IRAT13 et Fofifa154, présentent une sensibilité à la maladie. Pour Fofifa154, le test confirme l'effondrement de la résistance de celle-ci. Un doute important subsiste pour les résultats obtenus avec IRAT13, en effet la variété est connue pour être une source de résistance, mais elle apparaît sensible à la souche MD971 et moyennement sensible aux souches MD1098 et MD909. Il semble important de répéter l'inoculation sur IRAT13 lors de tests contrôlés ultérieurs.

I.1.2. Résultats obtenus à Montpellier

L'évaluation de Montpellier met en avant une résistance accrue de WAB878, Sebota330, Sucupira et Exp.411 (Fofifa172) et une résistance partielle pour B22, Fofifa168, Exp.304 et Exp.910. Pour ces deux dernières qui sont pourtant en cours de sélection, il apparaît une sensibilité à MD1098 qui peut mettre en péril la pérennité de la résistance dans le temps. Le même phénomène semble se produire pour les variétés Exp.918, Exp.206 et Exp.208 (Fofifa171), mais il est plus préoccupant car la sensibilité apparaît sur plus d'une souche. En outre les résultats montrent que l'ensemble des anciennes variétés Fofifa (161; 159; 167; 157; 151; 169; et 158) sont sensibles à plus d'une souche du spectre d'inoculation. Ce qui indique que le matériel n'est plus résistant et qu'il faut proposer de nouvelles variétés résistantes. L'évaluation de Co39 confirme bien sa sensibilité et donc son statut de témoin de sensibilité à la pyriculariose.

I.1.3. Bilan des évaluations en serre

Cependant il faut émettre un certain doute concernant Exp.304, car la sensibilité à MD1098 a été montrée à Montpellier mais pas à Madagascar, où elle a été notée résistante. Il faut donc garder la plus grande prudence sur l'interprétation de la résistance de cette variété, une nouvelle évaluation de la résistance pour MD1098 permettrait d'écarter ce doute. A part cette différence l'ensemble des résultats concorde entre Montpellier et Madagascar pour la souche MD1098, qui était la seule souche testée entre les deux pays. La variété Chhomrong Dhan qui semblait moyennement résistante à Madagascar, se révèle plutôt sensible sur les essais conduits à Montpellier

En tant que géniteurs, donneurs de résistance, il apparaît clairement que les variétés, WAB878, Sebota330, Sucupira semblent de bonnes candidates. Cependant ces variétés ne sont pas adaptées pour les hauts plateaux, elles sont intéressantes pour la qualité de leur grain et peuvent être cultivées dans le moyen ouest. Parmi les variétés en cours de sélection, Exp. 411 récemment nommée Fofifa172 (en cours de diffusion) semble montrer la résistance la plus importante. Il faut ajouter à ce panel, la résistance mise en avant à Montpellier pour B22, alors que cette variété présente une certaine sensibilité au champ dans le moyen ouest.

Malgré leurs bons résultats, on ne peut pas conclure à une résistance durable de ces variétés. En effet, ce type de résistance totale est peut être de nature monogénique et peut s'avérer facile à contourner. Par ailleurs, il est possible que le spectre de souches de *M.grisea* utilisé pour les inoculations contrôlées, n'a peut être pas été assez large pour mettre en évidence la sensibilité des variétés. Il apparaît donc primordial de continuer de tester les variétés qui semblent résistantes avec d'autres spectres de souches de *M.grisea* provenant d'autres biotopes mais également de mieux caractériser le type de résistance des variétés.

Tableau 9 : bilan général des essais de caractérisation de la résistance.

VARIETE	Zone d'aptitude	Essai au champ 2007					Inoculations contrôlées									
		Nb jour floraison 50%	Pyriculariose paniculaire (1 à 9)	Sterilité (%)	Surf. Foliaire attequée 1/2 (%)	Surf. attequée 2/3 (%)	Montpellier 2007					Madagascar 2007				
							MD824	MD908	MD978	MD983	MD1032	MD1098	MD1098	MD909	MD979	MD971
WAB 878	MO	109	1.5	82%	0.0%	0.1%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
FOFIFA 172 (EXP411)	HP	98	2	15%	0.0%	0.0%	R	R	R	R	R	R	MR	R	R	R
Sebota 330	MO	104	2	97%	0.0%	0.1%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sucupira	MO	119	2	97%	0.0%	0.1%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Exp 918	HP	109	3	60%	0.2%	2.0%	MS	MS	MR	S	R	S				
Exp 929	HP	118	3	71%	0.2%	5.0%										
FOFIFA 161	HP	106	3	17%	3.5%	12.5%	MS	MS	S	S	R	S				
FOFIFA 168	HP	94	3	45%	3.0%	17.5%	R	R	MS	R	R	R				
Exp 206	HP	106	3.5	39%	5.0%	15.0%	MS	MS	S	S	R	S				
Exp 409	HP	119	3.5	58%	0.8%	20.0%										
FOFIFA 159	HP	108	3.5	32%	2.8%	12.5%	MS	MS	S	S	R	S				
Chhomrong Dhan	HP	111	4	49%	0.1%	4.5%	S	S	S	MS	R	S	MS	MR	MR	MS
Exp 304	HP	108	4	60%	0.0%	0.6%	R	R	MR	R	R	MS	R	R	R	MR
FOFIFA 167	HP	119	4	65%	0.4%	3.5%	S	S	S	S	R	S				
Primavera	MO	111	4	99%	0.1%	1.1%							MR	MR	R	R
Exp 006	HP	95	4.5	33%	0.5%	17.5%										
Exp 202	HP	109	4.5	51%	1.0%	9.0%										
Exp 204	HP	104	4.5	46%	2.5%	20.0%										
Exp 502	HP	123	4.5	58%	0.6%	5.0%										
FOFIFA 157	HP	106	4.5	38%	1.6%	12.5%	MS	MS	MS	MS	R	S				
Exp 407	HP	116	5	60%	0.8%	15.0%										
NERICA 3	MO	102	5	62%	1.1%	4.0%	MR	MS	MS	R	S	S				
NERICA 4	MO	102	5	79%	1.5%	3.0%	MS	MS	MS	MS	S	S				
Exp 910	HP	102	5.5	32%	4.0%	22.5%	R	MR	MR	R	R	S				
Exp 924	HP	108	5.5	57%	0.8%	12.5%										
Exp 302	HP	106	6	45%	0.8%	12.5%										
NERICA 6	MO	116	6	81%	0.8%	12.5%										
FOFIFA 171 (EXP208)	HP	116	6.5	61%	0.3%	2.5%	S	S	MS	S	R	S				
B 22	MO	109	6.5	86%	1.0%	12.5%	R	MR	R	R	R	R				
Jumli Marshi	VIA	109	6.5	75%	2.8%	12.5%										
Exp 007	HP	129	7	88%	7.5%	30.0%										
Exp 401	HP	102	7	55%	17.5%	30.0%										
FOFIFA 151	HP	113	7.5	53%	1.3%	9.0%	S	S	S	S	MS	S				
FOFIFA 152	HP	95	8	52%	6.0%	20.0%										
FOFIFA 133	HP	94	9	85%	15.0%	30.0%							S	S	MR	MS
FOFIFA 154	HP	95	9	81%	10.0%	27.5%							S	S	MS	S
FOFIFA 169	HP	90	9	76%	6.5%	20.0%	S	S	S	S	R	S				
Shin Ei	HP	90	9	47%	0.1%	0.1%							S	MS	MS	S
Estrela	MO	109	9	90%	2.0%	12.5%										
FOFIFA 158	HP						S	S	S	S	R	S				
Cuiabana	MO				2.5%	12.5%	MR	MR	MS	R	MS	MS				
Luluwini	MO												S	MS	MS	S
Sebota 281	MO												MR	R	R	R
IRAT 13	MO-SR	129			0.1%	0.1%							MS	MS	MR	S
Moroberekan	SR												MR	MR	R	MR
Co 39	TS						S	S	S	S	S	S				

MO = Moyen ouest
 HP = Hauts plateaux
 SR = Source de résistance
 VIA = Variété irriguée d'altitude
 TS = Témoin de sensibilité à la pyriculariose

Notation
 R (résistant)
 MR (moyennement résistant)
 MS (moyennement sensible)
 S (sensible)

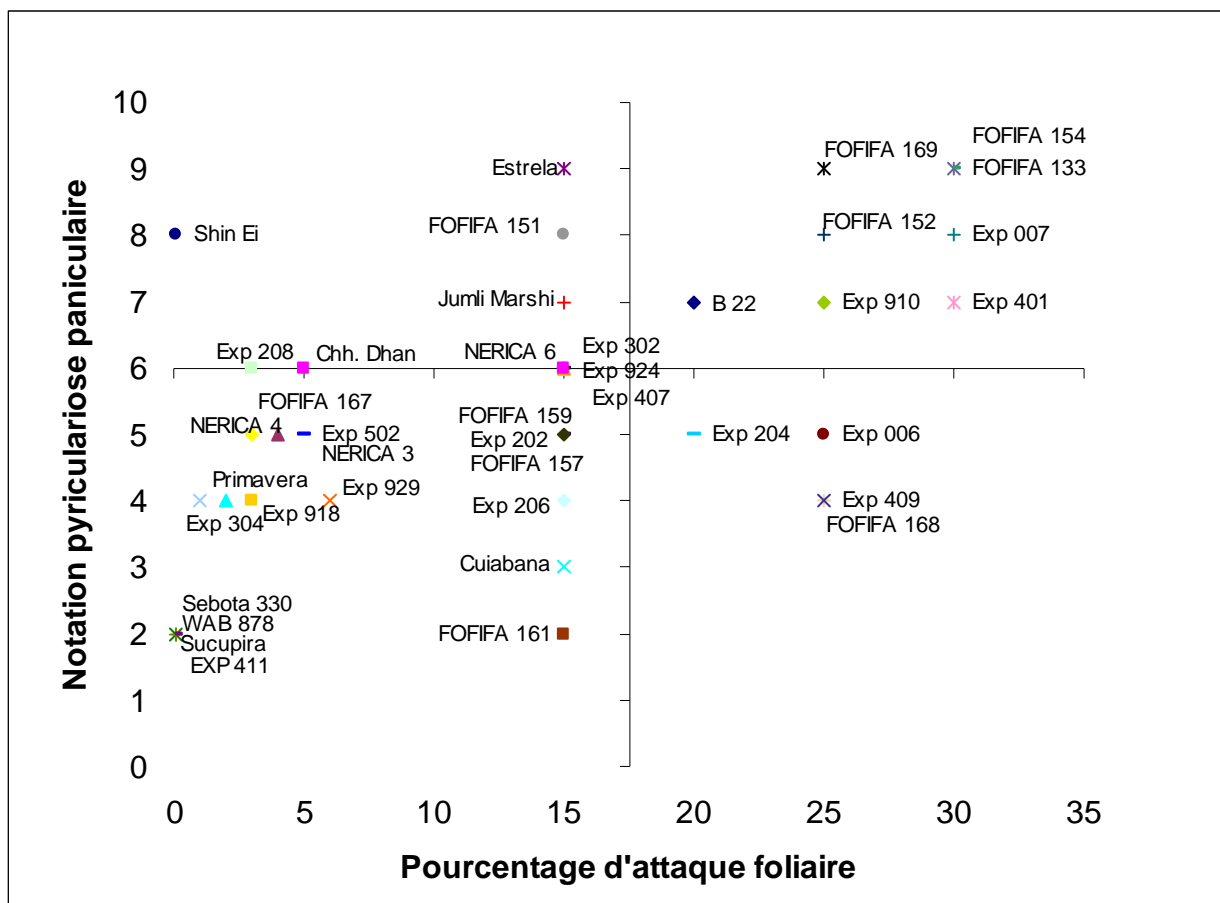


Figure 20 : évaluation de pyriculariose foliaire en fonction de la notation pyriculariose paniculaire

Tableau 10 : résultat de l'ANOVA sur le dispositif de caractérisation de la résistance au champ pour l'effet variété

	Effet variété		
	F	Probabilité	CV
Durée du cycle avant floraison	86.8	<0.0001	1.32
Pyriculariose paniculaire	8.07	<0.0001	21.009
Stérilité	15.6	<0.0001	12.76
Sévérité de l'attaque foliaire (1/2)	6.54	<0.0001	89.13
Sévérité de l'attaque foliaire (2/3)	9.36	<0.0001	39.82

I.2. CARACTERISATION DE LA RESISTANCE AU CHAMP

I.2.1. Résultats

Le dispositif d'évaluation ne présentait que deux répétitions, néanmoins l'analyse de variance (Tableau 10) montre que l'effet variété est très significatif pour l'ensemble des paramètres d'évaluation. Donc il n'y a pas d'effet des paramètres entre eux. Afin de mieux cerner la résistance au champ, les variétés ont été réparties selon leur note d'attaque paniculaire en fonction de la sévérité de l'attaque foliaire (Figure 20). Même si il y a une certaine tendance des variétés à se répartir selon une droite, cela n'est pas le cas pour l'ensemble des variétés ce qui conforte l'idée soutenue par Jeanguyot (1982), selon lequel rien ne démontre la corrélation entre la pyriculariose de la feuille et celle du cou.

A partir de la Figure 20, plusieurs comportements des variétés face à la pyriculariose sont identifiables. Des variétés présentant à la fois un bon niveau de résistance à la pyriculariose paniculaire et foliaire, il s'agit de Sebota330 ; Sucupira ; Exp.411 ; et WAB878. Un autre ensemble montre une bonne aptitude de résistance à la pyriculariose foliaire, alors que cette résistance semble plus modérée pour les panicules, les notes n'excédant pas 6. On trouve en particulier, les variétés Nerica, Primavera, ainsi que Fofifa167, Exp.304 et Exp.918 qui sont également en évaluation dans l'essai comparatif. Le comportement inverse de résistance est visible, les variétés Fofifa161, Cuiabana, et Exp.206, montre une résistance se produit également avec des variétés qui montrent une bonne résistance paniculaire, alors qu'au niveau foliaire la résistance semble plus modérée. Leur intérêt est important, car la résistance à la pyriculariose paniculaire est un facteur primordial pour garantir une stabilité du rendement.

Le cycle ne semble pas avoir d'effet sur l'intensité des attaques foliaire ou paniculaire, mais on peut mettre en avant l'hypothèse d'un phénomène d'évitement. Pour un groupe de 5 variétés dont le cycle est inférieur à 95 jours : FOFIFA 152, 133, 154 et 169 ; les notes de pyriculariose sont supérieures à 9. La précocité influencerait-elle la sévérité de l'attaque de pyriculariose paniculaire ?

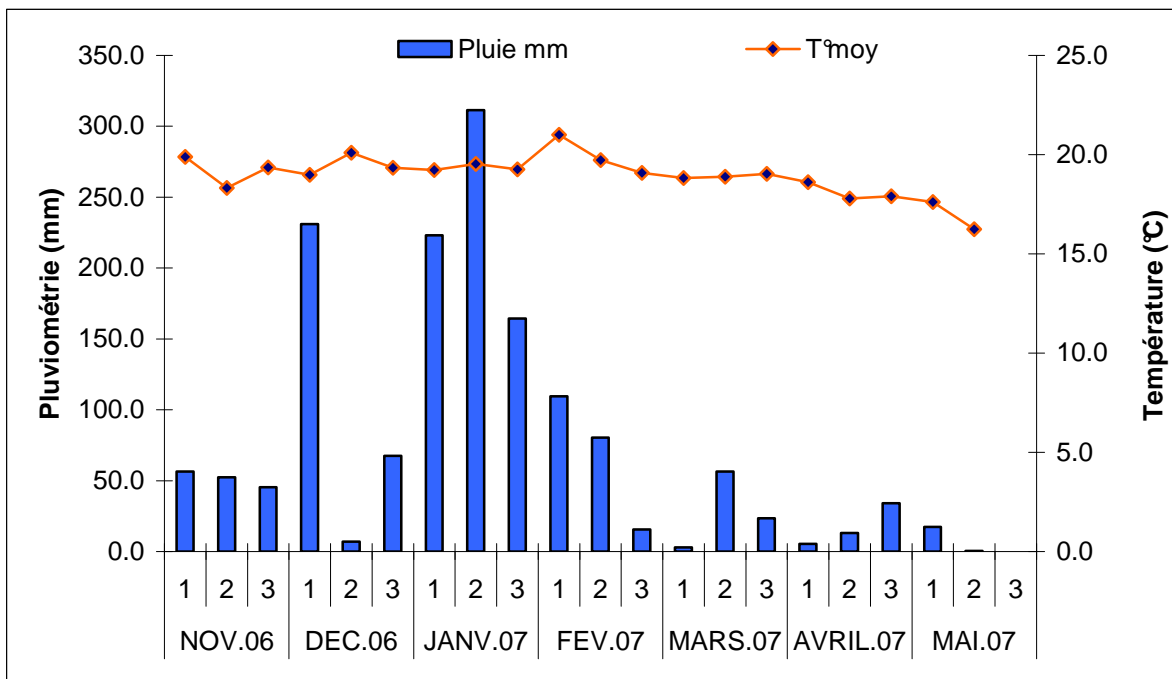


Figure 21 : pluviométrie et température moyennes pour la campagne 2006-2007, données URP SCRiD

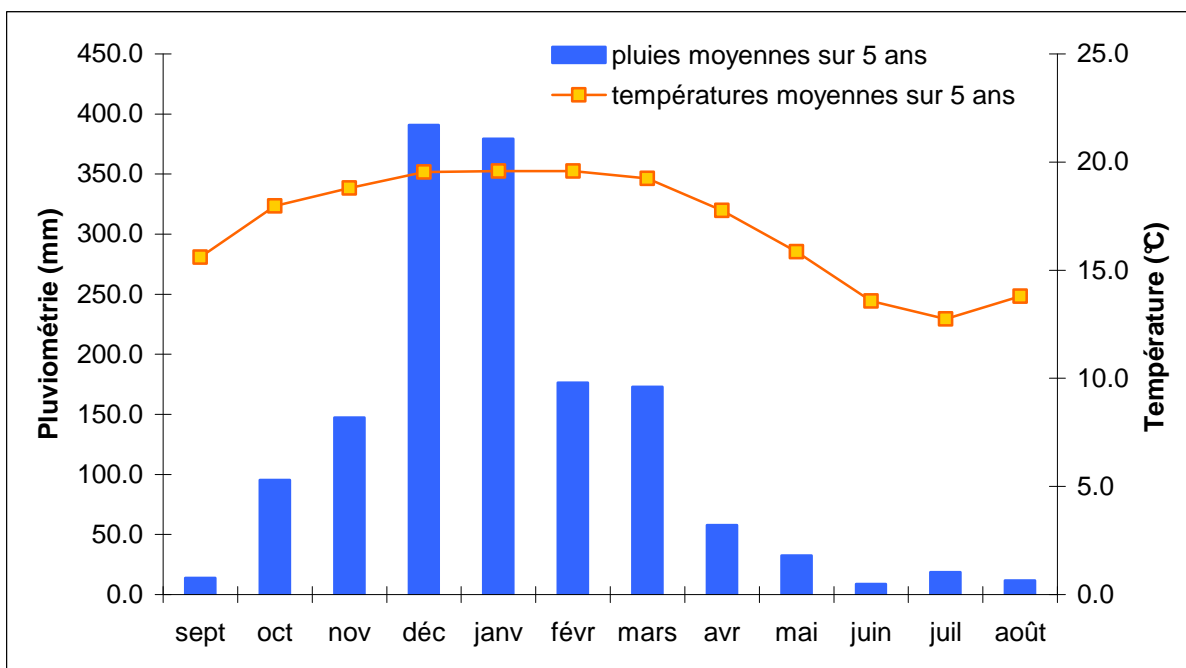


Figure 22 : pluviométrie et température moyenne sur 5 ans, données URP SCRiD

L'hypothèse qui peut être émise pour expliquer ce résultat, vient de la faible résistance de ces variétés combinée à une attaque de pyriculariose plutôt précoce pour cette année. En maîtrisant l'arrivée de l'inoculum sur la parcelle d'essai, et donc la période de pic épidémique, cet effet pourrait être gommé ou bien confirmé.

I.2.2. Effet de la pyriculariose sur le taux de stérilité

Pour cette campagne le taux moyen de stérilité sur le dispositif a été de 61% ce qui est très important, mais l'explication pourrait venir du stress hydrique survenu au mois de mars. Pour ce mois il n'y a eu que 83mm de pluies pour une moyenne sur 5 ans de 172mm, et lors de la première décade de ce même mois seulement 3 mm de pluies sont tombées, alors que c'est la période de floraison pour le riz pluvial (Figure 21 & Figure 22).

Dans le Tableau 2, si l'on s'intéresse au taux de stérilité, on se rend compte que des variétés qui semblent bien se comporter pour la résistance sont en fait inadaptées aux conditions pédoclimatiques des hauts plateaux ce qui explique leur taux de stérilité élevé. La limite d'adaptation des variétés Wab878, Sucupira et Sebota330 correspond au moyen ouest (900m d'altitude). A l'inverse les variétés développées pour les conditions des hauts plateaux, les variétés comme Exp.411 (Fofifa172), Fofifa161, Fofifa159, Exp.206 et Exp.006 avec des taux inférieurs à 40%. Les meilleurs résultats sont obtenus par Exp.411 et Fofifa161 avec respectivement 15 et 17% de stérilité. Ces deux variétés montrent donc de bonnes aptitudes de résistance à la pyriculariose mais aussi une rusticité qui leur permet de tolérer l'altitude et le déficit hydrique.

Il existe encore une singularité pour Shin Ei qui malgré une note de pyriculariose paniculaire de 9, obtient un taux de stérilité de 47%. La variété qui pourtant a souffert de la maladie, ce qui influence le taux de stérilité, ne semble pas avoir souffert du stress hydrique, cela pourrait être dû à la durée particulièrement courte de son cycle (90 jours à floraison 50%).

Les résultats en présence, ne nous permettent en rien de conclure à un effet de la pyriculariose sur le taux de stérilité concernant la campagne 2006/2007 car l'absence de pluies à un moment clé du cycle du riz à fortement interagit sur ce paramètre.

I.3. COMPARAISON ENTRE LES DEUX METHODES D'EVALUATION ET BILAN GENERAL

Si nous mettons en regard les résultats obtenus dans le cadre des deux évaluations, il apparaît que certains sont cohérents entre les deux méthodes alors que pour d'autres cela n'est pas le cas. Pour les variétés, WAB878, Exp.411 (Fofifa172), Sebota330, Sucupira et Fofifa168, les résultats d'évaluation entre "serre" et "champ" sont cohérents, mais les variétés les plus adaptées aux hauts plateaux pour leur résistance restent Exp.411 et Fofifa168. Malgré des taux de stérilité très importants, qui s'expliquent par leur zone d'adaptation, WAB878, Sebota330 et Sucupira doivent être utilisées comme géniteurs à la fois pour leur résistance avérée au champ et en serre mais également pour la qualité de leurs grains. Etant donné leur niveau de résistance, d'autres variétés ont un très bon potentiel à confirmer dans des régions moins contraignantes. C'est le cas d'Exp.304, et Primavera, qui est une variété plutôt adaptée au moyen ouest.

Pour les variétés : Exp.918, Exp.208 (Fofifa171), Nerica4, Fofifa167, Nerica3 et Chhomrong Dhan, les résultats sont incohérents; leur réponse à l'inoculation met en avant que ces variétés sont plutôt sensibles à la pyriculariose foliaire, alors que les résultats des observations au champ ne le montre pas. Le taux maximum de surface foliaire attaqué étant de 4.5% pour Chhomrong Dhan. L'hypothèse pour expliquer ce phénomène viendrait de la souche de *M.grisea* présente dans la nature au moment de l'épidémie. Si l'inoculation artificielle avait pu avoir lieu, cette incohérence des résultats ne serait peut être pas apparue. Avec d'autres variétés (B22, Fofifa168, Exp.910) c'est l'opposé qui se produit, elles semblent résistantes en serre alors que l'observation sur le dispositif au champ montre plutôt une certaine sensibilité de ces variétés. Le spectre de souches de *M.grisea* utilisé pour les inoculations contrôlées, n'a peut être pas été assez large pour mettre en évidence la sensibilité des variétés.

Le test en serre est donc loin de prédire le comportement au champ et inversement. En particulier, il n'informe pas sur la résistance paniculaire alors que c'est une composante très importante pour choisir une variété.

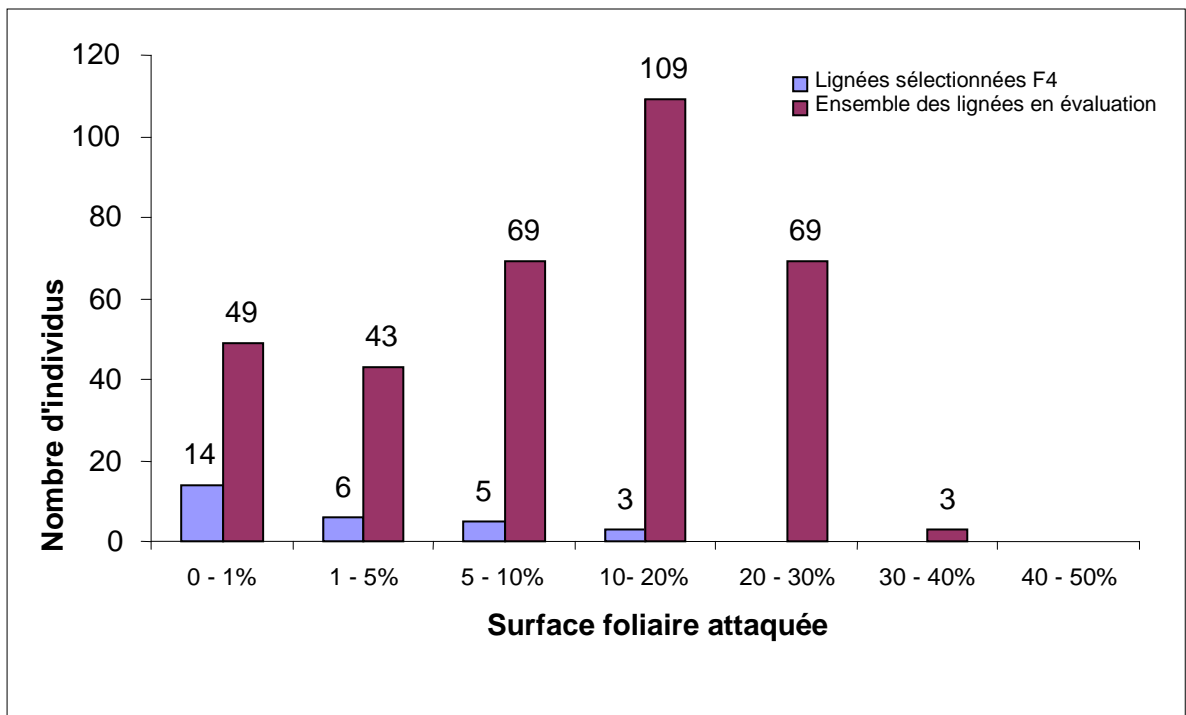


Figure 23 : distribution des lignées sélectionnées F4 en fonction du pourcentage d'attaque de pyriculariose foliaire

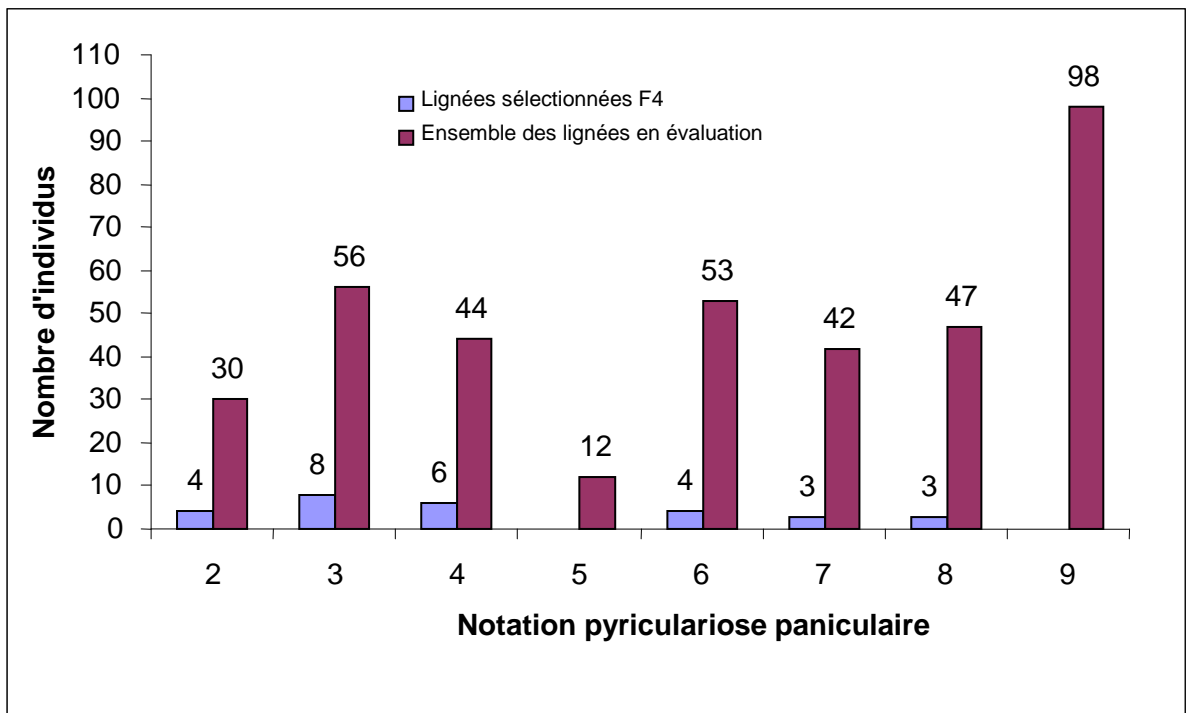


Figure 24 : distribution des lignées sélectionnées F4 en fonction de la note de pyriculariose paniculaire

II - SELECTION GENEALOGIQUE

La pyriculariose est une contrainte majeure de la culture pluviale du riz sur les hauts plateaux malgaches. La résistance des lignées au cours de la sélection généalogique est donc un élément primordial d'évaluation. Les critères d'évaluation sont :

- La proportion de surface foliaire attaquée par pyriculariose
- La sévérité de la pyriculariose paniculaire.

II.1. RESULTATS DE LA SELECTION EN QUATRIEME GENERATION (F4)

Les lignées en évaluation en F4 ont un comportement très variable vis-à-vis de la pyriculariose avec une répartition en cloche pour la proportion de surface foliaire attaquée (Figure 23) et une répartition en "L" pour la pyriculariose paniculaire car une proportion importante de lignées présente la note maximale de 9 (Figure 24). Sur l'ensemble du matériel végétal en cours de sélection en F4 seulement 8% a été conservé pour la campagne de l'année prochaine. Cela correspond à 28 lignées.

50% des lignées sélectionnées ont un indice d'attaque foliaire n'excédant pas 1%. Plus la proportion de surface foliaire attaquée augmente plus le taux de lignées sélectionnées décroît (Figure 23) :

- 29% de lignées sélectionnées ayant une proportion de surface foliaire attaquée inférieure à 1%
- 14% dans la classe 1 – 5%
- 7% dans celle de 5 à 10%
- 3% de 10 à 20%

Le taux de sélection des lignées en fonction de la pyriculariose paniculaire (Figure 24), suit la même tendance mais de façon beaucoup moins évidente. La majeure partie des plantes (63%) est caractérisée par une sévérité d'attaque paniculaire supérieure ou égale à 6.

Les 28 lignées sélectionnées se répartissent de la façon suivante (Figure 24) ; 4 ont la note 2, 8 la note 3, 6 la note de 4, 4 sont évaluées 6, 3 avec la note 7 et 3 ont 8.

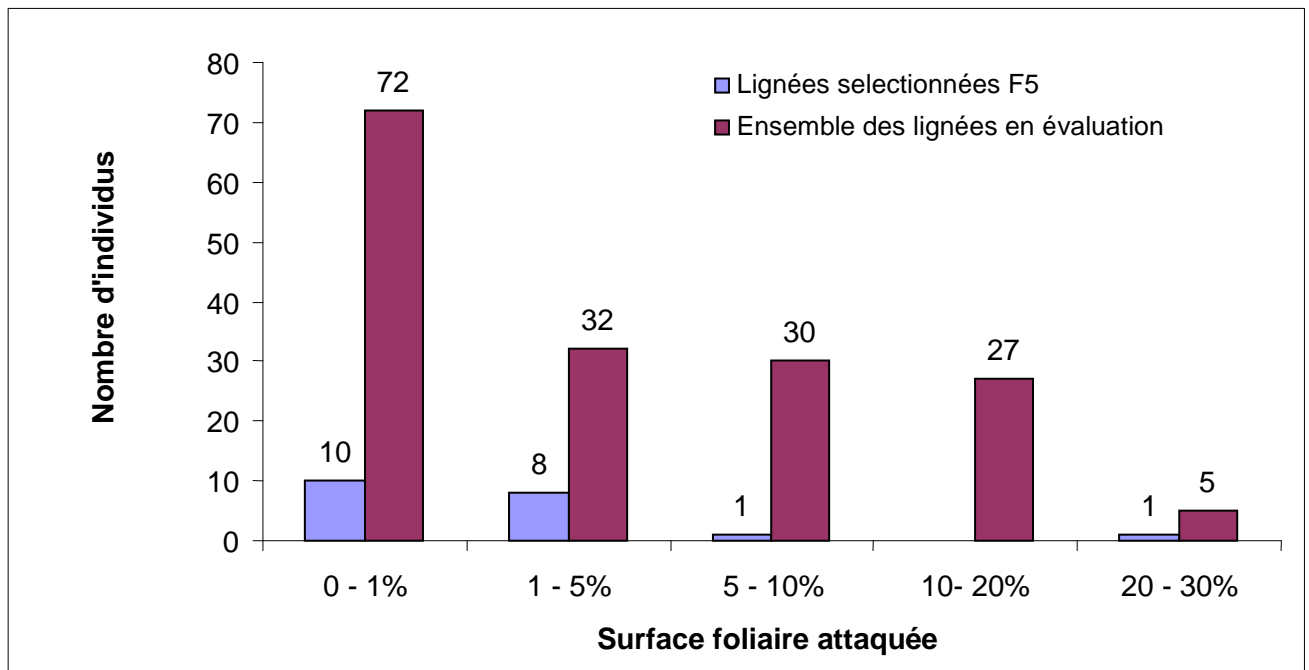


Figure 25 : distribution des lignées sélectionnées F5 en fonction du pourcentage d'attaque de pyriculariose foliaire

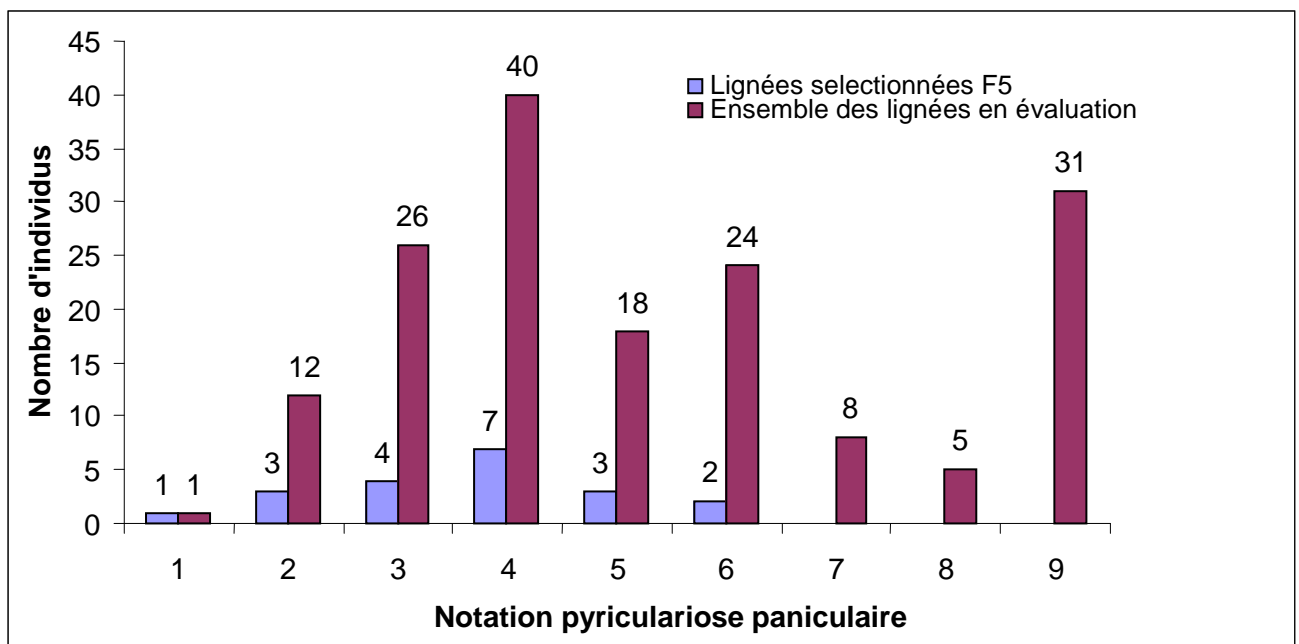


Figure 26 : distribution des lignées sélectionnées F5 en fonction de la note de pyriculariose paniculaire

Aucune lignée n'a été sélectionnée avec la note 9 qui correspond à 100% de perte. Néanmoins 6 des 28 lignées sélectionnées obtiennent des notes supérieures à 6, mais elles ont été retenues car elles présentent des caractéristiques agronomiques remarquables comme la morphologie du grain. Il semblerait que la précocité ait joué sur l'attaque de pyriculariose paniculaire et donc les notes de sévérité. En effet, les lignées ayant obtenues les notes les plus favorables pour la résistance paniculaire (inférieure ou égale à 4), sont dans la majorité des cas des plantes plutôt tardives, si on les compare aux autres. Cet effet peut être expliqué par l'hypothèse, que si l'épidémie de pyriculariose a été précoce, cela a diminué l'impact sur les lignées ayant une floraison tardive par un phénomène d'évitement. Ce facteur n'est donc pas forcément un gage de résistance au sens strict.

II.2. RESULTATS DE LA SELECTION EN CINQUIEME GENERATION (F5)

Sur l'ensemble des lignées en cours de sélection en F5, 81% présentent un taux d'attaque foliaire inférieur à 10% contre 47% en F4. De la même façon en F5, 43% des lignées ont des pourcentages d'attaque foliaire compris entre 0 et 1% contre seulement 14% en F4. Cette tendance illustre l'effet de la sélection sur le niveau de résistance du matériel au fil des générations.

A cette étape de la sélection, les lignées sélectionnées représentent 12% de la totalité du matériel en F5.

La classe 0 – 1% comprend 10 lignées, celle de 1 – 5% en contient 8, 1 lignée dans la classe 5 – 10% et 1 autre dans celle de 20 – 30%. Le matériel sélectionné présentant des caractéristiques de résistance faible possède par ailleurs des caractères agronomiquement intéressants.

En ce qui concerne la pyriculariose paniculaire, la distribution des lignées à un aspect en cloche autour de la valeur 4. Néanmoins une « queue de distribution importante » formée de 31 lignées présente la note maximale de 9. Ces lignées sensibles (en dehors de quelques unes présentant des caractéristiques de type de grain intéressantes) ont probablement échappées à l'infection et donc à la sélection à la génération précédente. 48% de l'ensemble des lignées en cours de sélection en F5 présentent une note inférieure ou égale à 4.

Au niveau des lignées sélectionnées, 35% ont été notées 4, 40% des lignées ont des notes inférieures à 4. Les cinq lignées restantes évaluées 5 et 6 pour la pyriculariose paniculaire, ont été conservées car l'une présente une très bonne qualité de grain et les autres vont être testées dans le moyen ouest, à une altitude inférieure (env. 900m), où la pression de pyriculariose est plus faible.

Tableau 11 : résultat de l'analyse de variance sur le dispositif "matrice"

Effets		Rendement (kg/ha)	Pyriculariose paniculaire (1 à 9)	Note max pyriculariose cou	Pyriculariose foliaire 1/2 (%)	Pyriculariose foliaire 2/3 (%)	Taux de stérilité (%)	
système Répétition	résiduelle a	0.385	0.28		0.85	0.66	1	
	résiduelle a	0.168	0.13		0.0033	0.026	0.78	
Fumure Fumure*système	résiduelle b	0.0168	0.0005		0.17	0.05	0.02	
	résiduelle b	0.92	0.72		0.19	0.18	0.98	
variété Système/variété Fumure/variété Système/fumure/variété	résiduelle c	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001	
	résiduelle c	0.27	0.89		0.99	0.99	0.15	
	résiduelle c	0.0085	0.0022		0.75	0.0277	0.006	
	résiduelle c	0.86	0.56		0.56	0.2	0.45	
Classements				FM	FU			
Variétés	Exp 206	2772 a	3.56 b	3.5	4	0.66 b	1.94 b	0.12 c
	Exp 411	2712 a	2.97 bc	5	4	0 b	0 c	0.07 c
	Exp 918	2551 a	3.37 bc	4.5	5	0.04 b	0.11 c	0.26 ab
	Exp 304	2511 ab	3.34 bc	4	4.5	0 b	0.01 c	0.32 a
	Fofifa 161	2493 ab	3.72 b	4.5	5	0.49 b	1.72 b	0.11 c
	Fofifa 167	2492 ab	3.69 b	5	4.5	0.17 b	0.45 c	0.26 ab
	Fofifa 154T	2068 b	2.78 c	4	3.5	0.05 b	0.09 c	0.24 b
	Exp 910	1620 c	5.2 a	8	6.5	1.19 a	2.75 a	0.22 b
	Fumure	Fumure Minérale "FM"	2637	3.9				
Fumure Organique "Fu"		2168	3.2					0.16
Variété/fumure	Exp 206	FM>Fu	FM>Fu					FM=Fu
	Exp 411	FM>Fu	FM=Fu					FM=Fu
	Exp 918	FM=Fu	FM=Fu					FM>Fu
	Exp 304	FM=Fu	FM=Fu					FM>Fu
	Fofifa 161	FM>Fu	FM>Fu					FM=Fu
	Fofifa 167	FM=Fu	FM=Fu					FM>Fu
	Fofifa 154T	FM>Fu	FM=Fu					FM>Fu
	Exp 910	FM=Fu	FM>Fu					FM>Fu
		= Valeur significative						

III - ESSAI COMPARATIF VARIETAL – "MATRICE"

III.1. EVALUATION DES VARIETES POUR LA RESISTANCE

III.1.1. Comportement des variétés face à la pyriculariose foliaire

L'effet variété est hautement significatif aux deux dates d'observation pour la variable «pourcentage de surface foliaire attaquée par la pyriculariose foliaire ». En revanche, il n'y a aucun effet statistiquement notable du système de culture ou du type de fumure sur cette variable. A la deuxième date d'observation, on met en évidence trois groupes statistiques de variétés. Le groupe c qui correspond au matériel le plus résistant comprend les variétés Exp.411, Exp.304, Exp.918 et Fofifa167. Le témoin Fofifa154T, traité avec des fongicides, apparaît également dans ce groupe malgré son extrême sensibilité à la pyriculariose. Les variétés Exp.206 et Fofifa161, qui sont des lignées sœurs, obtiennent des pourcentages de surface foliaire attaquée intermédiaires. Exp.910 apparaît comme la plus sensible des variétés en évaluation même si la moyenne du taux de surface foliaire attaqué de 2.75 % reste relativement limitée.

III.1.2. Comportement des variétés face à la pyriculariose paniculaire

L'effet variété est hautement significatif sur la variable «note de sévérité d'attaque paniculaire de 1 à 9». Il existe dans une moindre mesure un effet significatif du type de fumure et une interaction significative entre variété et type de fumure sur cette variable. En revanche, il n'y a aucun effet statistiquement notable du système de culture sur cette variable. En dépit de l'interaction "variété x fumure", on peut par approximation classer les variétés les unes par rapport aux autres car l'effet variété est beaucoup plus fort que l'interaction. Deux variétés sortent du lot. Fofifa154T, traitée avec des fongicides, est la variété la moins atteinte par la pyriculariose paniculaire. La protection fongicide a donc bien fonctionné. Il est nécessaire de préciser toutefois que cette protection est économiquement non viable puisque deux passages étaient effectués chaque semaine. La variété Exp 910 est la plus sensible des variétés en essai vis-à-vis de la pyriculariose paniculaire. Cette variété a obtenu des notes maximales de 8 sur certaines parcelles expérimentales.

Ce niveau de sensibilité exclut sa diffusion. L'ensemble des autres variétés a un comportement correct vis-à-vis de la pyriculariose paniculaire.

III.1.3. Rendement et taux de stérilité des variétés

Le niveau de sensibilité à la pyriculariose des variétés peut avoir un impact très fort sur la stérilité des panicules et donc sur le rendement. Dans cet essai, la variété la plus sensible Exp910 est aussi celle qui a le rendement le plus faible mais il n'y pas nécessairement une relation de cause à effet car si l'on regarde le taux de stérilité, il est plus faible que celui des variétés Exp.304, Exp.918, Fofifa154T ou Fofifa167.

Les variétés les plus performantes en terme de rendement sont Exp.411 (Fofifa172) et Exp.206 avec plus de 2,7 T à l'hectare. Ces deux variétés sont aussi caractérisées par un faible niveau de stérilité, 7% et 12% respectivement. Les variétés Exp.918, Exp.304, Fofifa161 et Fofifa167 suivent avec des rendements proches de 2,5 T. Les variétés Exp.918, Exp.304 et Fofifa167 ont un taux de stérilité assez élevé et apparaissent moins rustiques que Fofifa161 et Exp.206 à cet égard. En revanche, elles ont certainement un potentiel de rendement plus élevé dans des années climatiques favorables. Cette année a été marquée par une période sécheresse longue au moment des floraisons. Les plus mauvais résultats sont obtenus par Exp.910 et Fofifa154 traité avec des fongicides. Le cas de Fofifa154T est particulier, car elle est utilisée comme témoin traité aux fongicides. L'idée était de comparer le potentiel de cet idéotype devenu sensible à la pyriculariose par rapport aux nouvelles variétés disponibles. L'action des fongicides a permis d'éviter aux plantes de présenter les symptômes (meilleure note moyenne de pyriculariose paniculaire et foliaire) mais le rendement est médiocre et le taux de stérilité élevé comparé aux autres variétés. La variété a donc souffert d'autre chose que la pyriculariose. Les plants étant très peu vigoureux, l'hypothèse avancée par les équipes sélection et agronomie du SCRiD est qu'au cours des campagnes successives d'essais sur la "matrice", Fofifa154 étant récemment très sensible à la pyriculariose, l'utilisation des semences provenant de plants "survivants" de la campagne précédente a entraîné une dépression de la qualité de la variété. Le problème sera résolu l'année prochaine en utilisant des semences provenant du moyen ouest, qui, elles, sont indemnes de pyriculariose. La conclusion principale de cet essai est l'élimination de Exp.910, qui a donné les plus mauvais résultats en terme de rendement et qui présente un niveau élevé de sensibilité à la maladie avec les plus mauvaises notes moyennes de l'essai pour la pyriculariose paniculaire et foliaire.

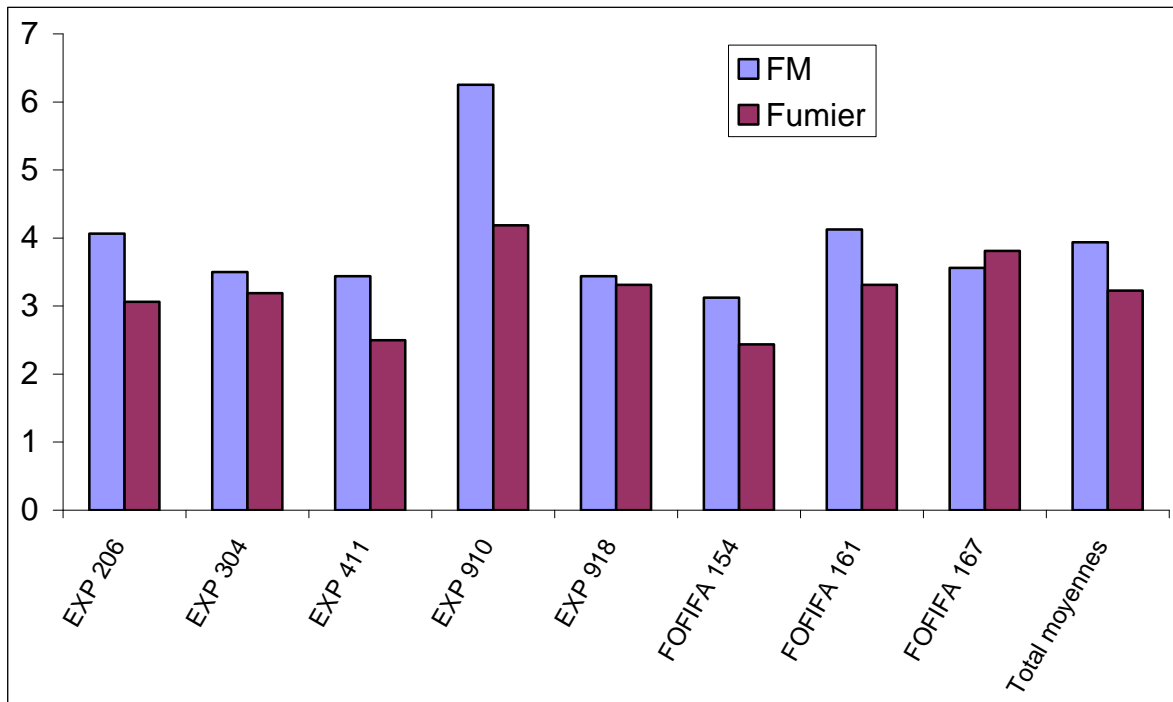


Figure 27 : effet fumure sur l'intensité moyenne de pyriculariose paniculaire tout systèmes confondus

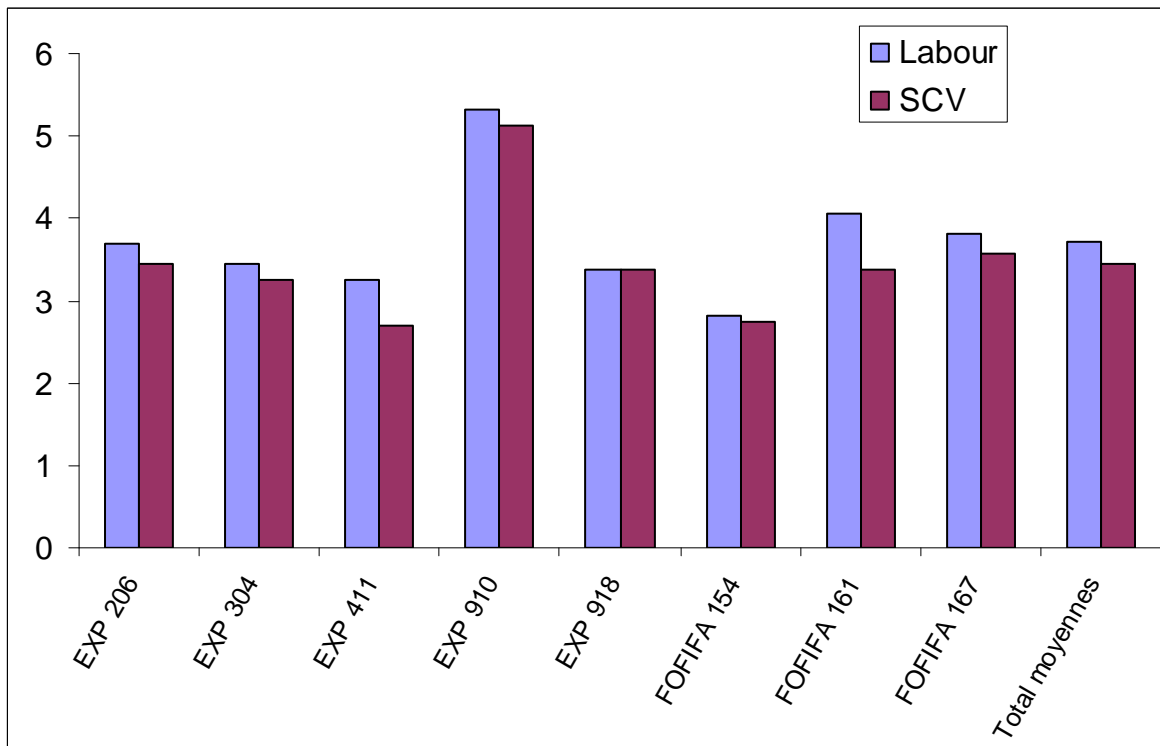


Figure 28 : effet du système sur l'intensité de pyriculariose paniculaire toutes fumures confondues

III.2. INFLUENCE DES CONDITIONS AGRONOMIQUES SUR LA PYRICULARIOSE

Cette année, aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les deux systèmes de culture, semis direct versus labour, pour l'ensemble des variables analysées (Tableau 11). L'année dernière de la même manière aucune différence statistique n'avait été notée pour les niveaux d'attaque de pyriculariose mais par contre le système semis direct avait un niveau de rendement statistiquement inférieur au système labour. Pour persister dans la vérification de l'hypothèse selon laquelle le semis direct sur couverture végétale permettrait d'obtenir un certain contrôle de la pyriculariose, il apparaît nécessaire de changer le système en place sur la matrice pour les essais variétaux. Il faudrait donc remplacer la rotation haricot-avoine-vesce qui précède les essais variétaux riz dans le dispositif actuel par une autre rotation plus efficace mais qui reste à identifier.

Le type de fumure apporté a un effet significatif sur le rendement, sur le niveau d'attaque de pyriculariose paniculaire ainsi que sur le niveau de stérilité. L'apport d'azote sous forme minérale a un effet favorable sur le rendement en dépit de l'augmentation de l'attaque de pyriculariose paniculaire qui va de paire avec l'augmentation de la stérilité qu'il induit (Figure 27). Ce résultat illustre le bon niveau général de résistance des variétés en évaluation à l'exception de la variété Exp 910. L'effet de l'apport d'azote minéral sur l'augmentation de la sévérité des attaques de pyriculariose est bien répertorié dans la littérature.

IV - BILAN

Les résultats obtenus dans l'essai variétal sont cohérents avec ceux obtenus dans les dispositifs de criblage. Exp910 présente un niveau de sensibilité à la pyriculariose trop élevé sur feuille comme sur panicule. Fofifa161 et Exp206 sont sensibles à de nombreuses souches de pyriculariose. Cette sensibilité se traduit au champ par un fort niveau d'attaque sur feuille. Mais ces deux lignées sœurs présentent un niveau de tolérance élevé à la pyriculariose paniculaire particulièrement intéressant. Fofifa167 et Exp918 sont sensibles à un certain nombre des souches testées mais leur niveau d'attaque foliaire et paniculaire au champ reste modéré et acceptable. Le comportement de ces variétés doit être surveillé de près car elles pourraient s'avérer sensible en cas d'évolution des populations de pyriculariose dans nos dispositifs ou chez les paysans. La variété Exp304 présente un haut niveau de résistance à la plupart des souches testées (une seule interaction de type moyennement sensible avec MD 1098 et deux interactions de type moyennement résistant pour 10 souches testées). Ce spectre de réponse est intéressant et pourrait correspondre à une résistance partielle forte. Sur le terrain cela se traduit par un haut niveau de résistance à la pyriculariose foliaire et par un niveau de tolérance élevé à la pyriculariose paniculaire. Exp411 (Fofifa172) présente un niveau de résistance total à la pyriculariose foliaire (les résultats d'inoculations artificielles sont concordants avec les résultats au champ sur ce plan) et un haut niveau de tolérance à la pyriculariose paniculaire. La nature de cette résistance reste à caractériser. Si il s'agit d'une résistance "verticale" le risque de contournement est grand.

A partir des résultats d'inoculation, la souche MD1098 pourrait être proposée pour réaliser des tests d'inoculation artificielle au champ, car elle a montré un spectre de virulence très large. Cette souche devrait aussi être réutilisée dans les prochains essais d'inoculations artificielles en serre.

V - PERSPECTIVES

Le sélectionneur a très longtemps orienté son travail sur la sélection de variétés contenant des résistances qui sont contournées plus ou moins rapidement. Une course s'installe entre les travaux de recherche de nouvelles résistances et la rapidité d'adaptation du pathogène aux résistances déployées sur le terrain. Ce sont les cycles "boom - bust" comme les nomment les anglo-saxons qui correspondent à la diffusion rapide de matériel résistant suivi de l'effondrement (contournement) de cette résistance. Pour une gestion durable de la résistance dans le cadre du couple *Oryza - Magnaporthe grisea*, c'est la voie de la résistance partielle polygénique qui devrait être privilégiée. Malheureusement, au champ, il est très difficile de bien différencier les types de résistance en présence. Des efforts doivent donc être faits pour caractériser le plus finement possible le matériel végétal (les géniteurs) qui est utilisé dans le programme de sélection : Tests DITER (avec inoculation artificielle programmée avant le démarrage des épidémies naturelles ce qui n'a malheureusement pas été possible cette année), inoculations artificielles contrôlées en serre d'une gamme élargie de souches du pathogène (notamment en complétant le panel de souches avec des souches du moyen ouest). Le pyramidage de gènes de résistance est aussi une stratégie de sélection qui est développée. L'introgession de 3 gènes de résistance (Pi1, Pi2, Pi33) dans les variétés pluviales Fofifa154 et Fofifa152 est en cours dans les laboratoires à Montpellier. Ce système sera déployé dans peu de temps sur le terrain à Madagascar pour en vérifier l'efficacité. Fofifa154 reste l'idéotype majeur du riz pluvial des hauts plateaux. A l'avenir il est même envisagé d'enrichir cette "pyramide" avec un quatrième gène de résistance. Il est à espérer qu'un certain nombre d'étapes de la sélection assistée par marqueurs puisse se faire un jour dans le laboratoire de biologie moléculaire de l'URP "Forêts et Biodiversité" situé à Antananarivo, mais il faudrait pour cela un apport financier conséquent dédié uniquement à cette partie du travail de sélection.

Des stratégies d'utilisation de la diversité génétique disponible, par développement des mélanges variétaux et multiligne sont également envisagées. Dans le cas des mélanges de variétés, la difficulté principale est d'identifier des variétés complémentaires en ce qui concerne leur sensibilité aux souches de *M.grisea* alors qu'elles doivent être le plus homogène possible pour leurs phénotypes. L'intérêt de bien caractériser la résistance des géniteurs prend ici tout son sens. Des mélanges de variétés isogéniques de Fofifa154 seront également construits et testés sur le terrain, lorsque l'introgression des 3 gènes de résistance sera terminée. On disposera alors d'un panel de variétés de phénotype Fofifa154 mais avec différentes combinaisons de gènes de résistances (les 3 gènes, les différentes combinaisons de 2 gènes ou un seul gène).

Suite à l'introduction récente de populations contenant le gène de stérilité mâle un schéma de sélection récurrente va être mis en œuvre. Ce type de sélection va permettre de valoriser la diversité génétique dont nous disposons en favorisant l'accumulation de facteurs de résistance par recombinaison. La sélection récurrente est une stratégie d'amélioration sur le long terme.

Dans une autre mesure, il importe de bien connaître l'évolution des populations de pathogène dans les zones de diffusion des variétés. Le travail de pathologie et d'épidémiologie de l'équipe SCRiD, s'oriente donc vers l'utilisation de sites de référence chez les paysans ou sur nos dispositifs, afin de pouvoir suivre l'évolution de la maladie sur un panel des variétés.

D'ailleurs les sites de références chez les paysans permettront également de voir comment se comportent les variétés en fin de sélection dans des systèmes de cultures traditionnels (qui sont loin des quantités d'intrants utilisés en cours de sélection), et également leur perception de ces variétés. En effet le choix paysan est une composante primordiale en sélection.

Les séquences microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats) sont constituées de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétranucléotidiques. Les plus courantes sont (A)_n, (AT)_n, (GA)_n, (GT)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, etc., la valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. De tels motifs sont très abondants dans le génome des organismes eucaryotes. Chez les végétaux supérieurs, les premières estimations indiquent qu'il y aurait en moyenne un microsatellite dinucléotidique tous les 30 à 100 kb. Une banque génomique de riz a été criblée par hybridation en utilisant comme sondes des motifs microsatellites. Les motifs poly (GA)_n et poly (GT)_n sont, par exemple, respectivement présents environ 1 360 et 1 230 fois dans le génome.

L'intérêt en génétique des microsatellites réside dans leur polymorphisme extrêmement élevé. Le polymorphisme concerne le nombre des unités de répétition qui constituent la séquence microsatellite. Celui-ci varie vraisemblablement surtout à cause des erreurs dues au « glissement » de la polymérase lors de la réplication des chromosomes (Santoni *et al.*, 2000).

Encadré 1 : les marqueurs microsatellites

Test de conformité des croisements (hybrides F1) à l'aide des marqueurs microsatellites

I - OBJECTIF

Suite à l'effondrement de la résistance à la pyriculariose de variétés largement vulgarisées et adoptées par les paysans, un programme de croisement par hybridation contrôlée a été relancé en 2003.

L'objectif de cette partie du stage était d'évaluer la qualité des travaux d'hybridation réalisés en serre et faire le point sur la qualité de la technique utilisée. Pour cela, des extractions d'ADN ont été réalisées, dans le cadre de ce stage, à Madagascar dans le laboratoire de "l'URP Forêt biodiversité". Les échantillons ont été envoyés à Montpellier pour être génotypés sur séquenceur LICOR à l'aide de marqueurs moléculaires microsatellites qui ont été choisis pour leur facilité d'utilisation et leur haut degré de polymorphisme (Encadré 1).

II - MATERIELS ET METHODES

II.1. CROISEMENTS REALISES

Au total, 40 croisements ont été réalisés à partir de 20 parents différents (ANNEXE IV). Les hybridations manuelles après castration ont été réalisées en serre. Les semences portées par les plantes femelles dites "semences F1" ont été à leur tour semées en serre pour obtenir des plants F1 qui portent les semences F2.

II.2. ÉCHANTILLONNAGE VEGETAL REALISE

165 plantes F1 issues de 10 croisements et chacun des parents de ces croisements ont été échantillonnées dans la serre d'Antsirabe. Le prélèvement s'est fait sur les feuilles les plus jeunes et vertes, pour chaque plante 5 à 6 sections d'environ 4 cm de feuilles sont prélevées, chaque échantillon est placé dans une glacière pour que le matériel reste le plus frais possible le temps d'être rapatrié au laboratoire de biologie moléculaire situé à Antananarivo où il sera placé au congélateur à -20°C en attendant l'extraction d'ADN. L'ADN des feuilles de riz est extrait selon le protocole présenté en (ANNEXE V) et envoyé à Montpellier pour le travail de génotypage.

II.3. AMPLIFICATION MICROSATELLITE

Le travail de génotypage a été réalisé dans les laboratoires de Montpellier, le but étant de trouver pour chaque croisement un marqueur microsatellite le plus polymorphe possible pour les deux parents du croisement. C'est-à-dire que la différence de taille de fragment d'amplification obtenu pour chaque parent d'un croisement soit la plus importante possible. L'objectif sous jacent est de pouvoir à l'avenir réaliser les travaux de génotypage à Madagascar en froid sur gel d'agarose dont la résolution est assez faible. Pour cela, l'ensemble des parents a été testé avec 8 marqueurs microsateellites, seuls quatre ont été retenus (RM21 ; RM224 ; RM474; RM514). Pour faire cela, l'ADN des plantes de chaque croisement, a été amplifié avec l'un des marqueurs microsatellite qui était le plus polymorphe pour le croisement analysé selon le protocole du **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Le programme d'amplification PCR est le suivant : 94°C pendant 4 min, 32 cycles (94°C_55 °C_72°C, 1 min/température), 72°C pendant 8 min. Deux amplifications sont réalisées, une pour obtenir un produit PCR lisible à 700nm et l'autre lisible à 800nm.

II.4. GENOTYPAGE PAR SEQUENCEUR

Le génotypage se fait à l'aide d'un séquenceur LICOR ® automatique sur gel (gamme 4300), avant la migration les produits PCR sont dilués de la façon suivante : 2µL de produit PCR 700, 2µL de produit PCR 800 et 6µL de bleu formamide. Le principe du séquenceur est le suivant, les fragments amplifiés à l'aide de l'amorce M13-microsatellite comporte la séquence anti-sens de la séquence M13 marqué, qui porte les fluorochromes. La séquence M13 marqué va donc se lier aux fragments amplifiés, ainsi le passage du fluorochrome devant une cellule laser va être détecté par un capteur sensible à l'une ou l'autre des longueurs d'ondes.

Au final, une image informatique va être générée avec la taille des différents fragments. La lecture a été faite ensuite à l'œil nu. Si pour le parent femelle la taille du fragment est A, et pour le parent male sa taille est B, alors si la plante obtenue est bien un hybride elle sera hétérozygote et présentera les deux tailles de fragments A et B.

Tableau 12 : résultat de conformité pour les croisements n°1 et n°2

ID Croisement	Parent femelle	Parent male	RM224	RM21	RM474	RM514
	EXP 302		172			
		CT 13432	150			
		Moroberekan	140			
1-1	EXP 302	CT 13432	172/150			
1-2	EXP 302	CT 13432	172/150			
1-3	EXP 302	CT 13432	172			
1-4	EXP 302	CT 13432	172/150			
1-5	EXP 302	CT 13432	172/150			
1-6	EXP 302	CT 13432	172/150			
1-7	EXP 302	CT 13432	172/150			
1-8	EXP 302	CT 13432	172/150			
1-9	EXP 302	CT 13432	172/150			
1-10	EXP 302	CT 13432	172/150			
2-1	EXP 302	Moroberekan	150			

III - RESULTATS ET DISCUSSION

Nous ne présenterons ici que les résultats obtenus sur un panel de 10 croisements qui sont le plus représentatifs de l'ensemble du test de conformité.

Les résultats obtenus pour le croisement 1, montre qu'une seule plante (1-3) n'est pas hétérozygote mais présente une taille de fragment correspondant au parent femelle, c'est donc une plante issue d'une autofécondation. Pour le croisement 2, le fragment obtenu ne correspond ni au parent femelle ni au parent male, car sa taille est trop éloignée de l'un ou l'autre (Tableau 12). Il s'agit donc d'un problème de mélange de matériel ou d'une mauvaise identification des parents semés.

Tableau 13 : résultat de conformité pour le croisement n°4

ID Croisement	Parent femelle	Parent male	RM224	RM21	RM474	RM514
	EXP 411				276	
		CT 13432			240	
4-1	EXP 411	CT 13432			240/276	
4-2	EXP 411	CT 13432			276	
4-3	EXP 411	CT 13432			240/276	
4-4	EXP 411	CT 13432			276	
4-5	EXP 411	CT 13432			240/276	
4-6	EXP 411	CT 13432			240	
4-7	EXP 411	CT 13432			240	
4-8	EXP 411	CT 13432			240	
4-8(2)	EXP 411	CT 13432			?	
4-9	EXP 411	CT 13432			240/276	
4-10	EXP 411	CT 13432			276	
4-11	EXP 411	CT 13432			240/276	
4-12	EXP 411	CT 13432			240	
4-13	EXP 411	CT 13432			276	
4-14	EXP 411	CT 13432			240	
4-15	EXP 411	CT 13432			x	
4-16	EXP 411	CT 13432			x	
4-17	EXP 411	CT 13432			x	
4-18	EXP 411	CT 13432			240/276	
4-19	EXP 411	CT 13432			244/276	
4-20	EXP 411	CT 13432			276	
4-21	EXP 411	CT 13432			244/276	
4-22	EXP 411	CT 13432			x	
4-23	EXP 411	CT 13432			276	
4-24	EXP 411	CT 13432			244/276	
4-25	EXP 411	CT 13432			x	
4-26	EXP 411	CT 13432			276	
4-27	EXP 411	CT 13432			276	
4-28	EXP 411	CT 13432			x	
4-29	EXP 411	CT 13432			x	

Pour le croisement 4 (Tableau 13), sur les 29 plantes F1 analysés, 9 sont hétérozygotes, 8 sont homozygotes par autofécondation ce qui est compréhensible, mais 5 plantes présentent des tailles de fragments attendu pour le parent mâle. Il semble donc que le sens du croisement (Exp411 femelle et CT 134/32 mâle) n'a pas toujours été respecté. Des croisements réciproques ont aussi été réalisés dont certains ont échoués se traduisant par l'autofécondation de CT134/32 (utilisé comme femelle)

Tableau 14 : résultat de conformité pour les croisements n°8 et n°9

ID Croisement	Parent femelle	Parent male	RM224	RM21	RM474	RM514
	Chhomrong Dhan		140			264
		Fofifa 154	172			
		EXP 411				260
8-1	Chhomrong Dhan	Fofifa 154	140/172			
8-2	Chhomrong Dhan	Fofifa 154	140/172			
9-1	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/264
9-2	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/264
9-3	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/264
9-4	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/262
9-5	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/264
9-6	Chhomrong Dhan	Exp 411				x
9-7	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/262
9-8	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/262
9-9	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/264
9-10	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/264
9-11	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/262
9-12	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/262
9-13	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/264
9-14	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/262
9-15	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/262
9-16	Chhomrong Dhan	Exp 411				x
9-17	Chhomrong Dhan	Exp 411				260/264
9-18	Chhomrong Dhan	Exp 411				x

Pour les croisements 8 et 9 (Tableau 14), c'est respectivement les microsatellites RM224 et RM514 qui ont été utilisés. A l'exception de 3 plantes pour lesquelles il n'y a pas eu d'amplification, le reste du matériel est hybride conforme.

Tableau 15 : résultat de conformité des croisements n°11 et n°12

ID Croisement	Parent femelle	Parent male	RM224	RM21	RM474	RM514
	Sebota 65		150			
		EXP 411	140			
		Chhomrong Dhan	140			
11-1	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-2	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-3	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-4	Sebota 65	Exp 411	150			
11-5	Sebota 65	Exp 411	150			
11-6	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-7	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-8	Sebota 65	Exp 411	172			
11-9	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-10	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-11	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-12	Sebota 65	Exp 411	150			
11-13	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-14	Sebota 65	Exp 411	140			
11-15	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-16	Sebota 65	Exp 411	140/150			
11-17	Sebota 65	Exp 411	150			
11-18	Sebota 65	Exp 411	170			
12-1	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140			
12-2	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140			
12-3	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140			
12-4	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-5	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-6	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-7	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-8	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-9	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140			
12-10	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-11	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-12	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-13	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-14	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-15	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-16	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-17	Sebota 65	Chhomrong Dhan	172			
12-18	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-19	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-20	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-21	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140/150			
12-22	Sebota 65	Chhomrong Dhan	140			

Pour le croisement 11 (Tableau 15), sur 16 plantes analysées 11 sont bien conformes, 4 sont issues d'autofécondation, 1 présente le fragment homozygote du parent mâle et 2 sont homozygotes avec une taille de fragment qui n'est pas attendue. Pour ces deux dernières plantes une confusion dans les pots à la serre ou un mélange dans les semences semble l'explication la plus plausible. Le même phénomène est visible pour une plante (12-17) dans le croisement 12 (Tableau 15), mais ce n'est pas la seule irrégularité, toutes les plantes homozygotes de ce croisement présente le fragment attendu pour le parent mâle. Dans ce cas l'hypothèse serait qu'il y'a eu inversion entre le parent mâle et le parent femelle, et donc que le sens d'hybridation n'a pas été respecté.

Tableau 16 : résultat de conformité des croisements n°13, n°26 et n°33

ID Croisement	Parent femelle	Parent male	RM224	RM21	RM474	RM514
	Sebota 41					284
		Chhomrong Dhan				264
13-1	Sebota 41	Chhomrong Dhan				264/284
13-2	Sebota 41	Chhomrong Dhan				x
13-3	Sebota 41	Chhomrong Dhan				284
13-4	Sebota 41	Chhomrong Dhan				284/262
13-5	Sebota 41	Chhomrong Dhan				284/264
13-6	Sebota 41	Chhomrong Dhan				x
13-7	Sebota 41	Chhomrong Dhan				262/284

	Fofifa 161			170		
		Kasalath		156		
26-2	Fofifa 161	Kasalath		150		

	Fofifa 133		172			
		Chhomrong Dhan	140			
33-1	Fofifa 133	Chhomrong Dhan	170			
33-2	Fofifa 133	Chhomrong Dhan	140/172			
33-3	Fofifa 133	Chhomrong Dhan	140/173			
33-4	Fofifa 133	Chhomrong Dhan	140/172			
33-5	Fofifa 133	Chhomrong Dhan	172			
33-6	Fofifa 133	Chhomrong Dhan	140/172			
33-7	Fofifa 133	Chhomrong Dhan	140/172			

Le croisement 13 (Tableau 16), présente une plante issue d'autofécondation du parent femelle. Concernant les plantes hétérozygotes il arrive que la taille du fragment diffère de quelques bases en fonction des individus, ce qui est normal la lecture se faisant à l'œil nu, elle est plus rapide mais les tailles indiquées sont approximatives (Frouin, communication personnelle). On considère donc ces variations comme artefactuelles et qu'elles représentent un même allèle parental. En ce qui concerne le croisement 33 (Tableau 16), seuls deux plants sont issus d'autofécondation sur un total de 7.

Tableau 17 : résultat de conformité des croisements n°37 et n°39

ID Croisement	Parent femelle	Parent male	RM224	RM21	RM474	RM514
	EXP 411		140			
		Sucupira	158			
37-1	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-2	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-3	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-4	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-5	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-6	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-7	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-8	EXP 411	Sucupira	x			
37-9	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-10	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-11	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-12	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-13	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-14	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-15	EXP 411	Sucupira	140/158			
37-16	EXP 411	Sucupira	140/158			

	Fofifa 133		172			
		Moroberekan	140			
39-1	Fofifa 133	Moroberekan	140/170			
39-2	Fofifa 133	Moroberekan	140/170			
39-3	Fofifa 133	Moroberekan	140/170			
39-4	Fofifa 133	Moroberekan	140/170			

L'ensemble des plantes des croisements 37 et 39 (Tableau 17) sont hétérozygotes et bien issues de l'hybridation des deux parents. Seul l'individu 37-8 est indéterminé.

IV - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Sur le total des 165 plantes analysées, 10% sont de l'autofécondation du parent femelle, 8% sont homozygotes avec le génotype du parent mâle traduisant une ambiguïté dans le sens du croisement réalisé. 2% ont un génotype qui ne provient d'aucun des parents.

En conclusion, la technique utilisée pour hybrider donne de bons résultats avec seulement 10% d'autofécondation, mais il paraît important d'apporter une attention particulière à la gestion des plantes et des semences, car les soupçons d'erreur de sens d'hybridation sont très importants, notamment pour le croisement 12. Par ailleurs un étiquetage et une gestion rigoureuse de toutes les plantes dans la serre devraient limiter l'apparition de génotypes hors type.

Comment seront utilisés les résultats du génotypage lors de la mise en place des plantes F2 sur le terrain au cours de la prochaine campagne?

Pour chaque croisement analysé les lots de semences F2 seront organisés sur le terrain en fonction du génotype de la plante F1 d'origine. Ainsi toutes les semences F2 issues de plantes conformes seront semées plante F1 par plante F1. Ensuite nous sèmerons les génotypes autofécondés et non-conformes (au cas où il existe des hybridations illégitimes, non détectées par le jeu d'amorce utilisé, mais pouvant générer une variabilité exploitable en sélection).

Par ailleurs les plantes F1 issues de l'hybridation ont été rabattues et transférées au champ afin de leur permettre de taller de nouveau dans le but de produire plus de semences F1, qui serviront à former les familles F2 pour les campagnes prochaines de sélection. C'est un moyen pour pérenniser les plantes F1. Seules les plantes conformes seront récoltées.

Néanmoins, même si la qualité des résultats obtenus à Montpellier est indiscutable, il est important de souligner que la logistique d'échange d'échantillons entre les deux pays est problématique. Il serait donc intéressant de pouvoir réaliser ces travaux de génotypage de routine à Madagascar.

Ainsi avec les résultats obtenus sur les parents (matrice de taille de fragment pour 8 marqueurs), il est tout à fait envisageable pour l'avenir d'essayer de mettre en place ce type de test au laboratoire à Madagascar sans génotypeur, mais directement sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. Toutefois il faut que les moyens financiers et humains soient mis en place pour la réussite de cette voie de la sélection assistée par biologie moléculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmadi, N., J. Chantereau, C. Hekimian Lethève, J.-L. Marchand et B. Ouendeba** (2002). Agriculture spéciale. Les plantes comestibles : les céréales. In : Mémento de l'agronome. - Montpellier : CIRAD: p.777-829.
- Ahn, S. W.** (1994). "International collaboration on breeding for resistance to rice blast" in: Rice Blast Disease. R. S. Zeigler, S. A. Leong et P. S. Teng. CAB International & International Rice Research Institute. 137-155.
- Ahn, S. W. et A. Mukelar** (1986). Rice blast management under upland conditions. Progress in Upland Rice Research. Manila, International Rice Research Institute: 363-374.
- Baudoin, J.-P., B.-P. Louant, R. Maréchal, G. Mergeai, E. Otoul et J. Demol** (2002). Amélioration des plantes : application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Gembloux, Presses agronomiques de Gembloux: 560 p.
- Berruyer, R.** (2003). Etude des interactions riz-*Magnaporthe grisea* : caractérisation et clonage du gène de résistance Pi33: 340 p.
- Bouharmont, J.** (1991). "Utilisation de la variation somaclonale et de la sélection in vitro à l'amélioration du riz" in: L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris: 1-8.
- Bouharmont, J.** (1995). "L'amélioration du riz en Afrique" in: Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris: 15-21.
- Causse, M.** (1989). Evolution de la diversité et de l'allogamie dans une population artificielle d'hybrides entre le riz cultivé *Oryza sativa* L. et l'espèce sauvage *O. longistaminata* A. Chev. et Roehr. Travaux et documents microfichés. Paris, ORSTOM: 242 p.
- Clément, G., M. Châtel et H. Feyt** (2002). La sélection du riz au Cirad. Le sélectionneur français. **53**: 157-169.
- Déchanet, R., J. Razafindrakoto et M. Vales** (1996). Résultats de l'amélioration variétale du riz d'altitude malgache. Séminaire riziculture d'altitude, Antananarivo - Madagascar, Colloques - CIRAD: 43-48.
- Doussinault, G.** (1995). "Cent ans de sélection du blé en France et en Belgique."
- Dubois, J.** (1989). "Biotechnologie et amélioration des plantes" in: Plantes vivrières tropicales. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris: 19-25.
- Ebbole, D. J.** (2007). "Magnaporthe as a Model for Understanding Host-Pathogen Interactions." Annual Review of Phytopathology **45**(1).
- FAO** (1994). Le riz dans la nutrition humaine. Rome, FAO - Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
- *O. J. Bienvenido*.
- FAO** (2000). Diagnostic et perspectives de la filière riz à Madagascar. Unité Politique de Développement Rural (UPDR) FAO
- Gallais, A.** (1994). "La sélection assistée par marqueurs" in: Quel avenir pour l'amélioration des plantes ? AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris: 387-397.
- Gallais, A.** (2002). Evolution des concepts, méthodes et outils de l'amélioration des plantes. Colloque "L'amélioration des plantes, continuités et ruptures". Montpellier, INRA.
- Ge, S., T. Sang, B. R. Lu et D. Y. Hong** (2001). Phylogeny of the genus Oryza as revealed by molecular approaches. Rice genetics IV. Proceedings of the fourth international rice genetics symposium, Los Baños, The Philippines, International Rice Research Institute: 89-106.
- Houdebine, L. M.** (2006). "Plantes génétiquement modifiées (PGM) et pays en développement." Cahiers d'études et de recherches francophones/Agricultures **15**(2): 227-231.
- Jacquemard, J. C., B. Kouamé et J. Meunter** (1993). "Un exemple de stratégie de sélection récurrente réciproque : le palmier à huile, *Elaeis guineensis* Jacq" in: Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ? AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris: 371-384.
- Jacquot, M. et G. Clément** (1995). "Génétique. Une richesse porteuse d'avenir" in: Du débouché à la culture : le riz. ITCF; CFR. Paris: 8-11.
- Jeanguyot, M.** (1982). Lutte contre la pyriculariose du riz. Mémoires de travaux de l'IRAT N°2, Institut de recherches agronomiques tropicales.

- McDonald, B. A. et C. Linde** (2002). "Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance." *Annu Rev Phytopathol* **40**: 349-79.
- Notteghem, J.-L.** (1985). "Définition d'une stratégie d'utilisation de la résistance par analyse génétique des relations hôte-parasite. Cas du couple riz-*Pyricularia oryzae*." *L'agronomie tropicale* **40**(2): 129-146.
- Notteghem, J.-L.** (1989). "La création de variétés résistantes : cas du riz et de la pyriculariose." *Actualités botaniques, Société botanique de France* **136**(3/4): 227-237.
- Notteghem, J.-L., G. M. Andriatampo, M. Chatel et R. Dechanet** (1980). "Techniques utilisées pour la sélection de variétés de riz possédant la résistance horizontale à la pyriculariose." *Ann. Phytopathol.* **12**(3): 199 - 226.
- Pitrat, M. et M. Causse** (2002). Utilisation d'outils génomiques dans les programmes d'amélioration des plantes. Quelques exemples chez les plantes maraîchères. *Colloque "L'amélioration des plantes, continuités et ruptures"*. Montpellier, INRA.
- Santoni, S., P. Faivre-Rampant, E. Prado et D. Prat** (2000). "Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes." *Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures* **9**(4).
- Servin, B.** (2003). Méthodes de construction de génotypes assistée par marqueurs. *UFR Scientifique d'Orsay, Université Paris XI*
- Docteur en Sciences de l'Université:** 242.
- URP-SCRiD** (2003). Rapport d'activités 2001-2003. Antsirabe - Madagascar, URP SCRiD - CIRAD/FOFIFA: 121.
- Vales, M.** (1983). Des Connaissances sur les relations hôte-parasite aux stratégies de lutte contre la pyriculariose du Riz. *Centre d'Orsay*. Paris, Université Paris-Sud. **Docteur de 3ème cycle:** 310.
- Vales, M. et J. Razafindrakoto** (1996). *La sélection récurrente pour le riz d'altitude malgache*. Séminaire riziculture d'altitude, Antananarivo - Madagascar, Colloques - CIRAD: 159-165.

ANNEXES

ANNEXE I – Croisements en cours de F4 pour 2006/2007

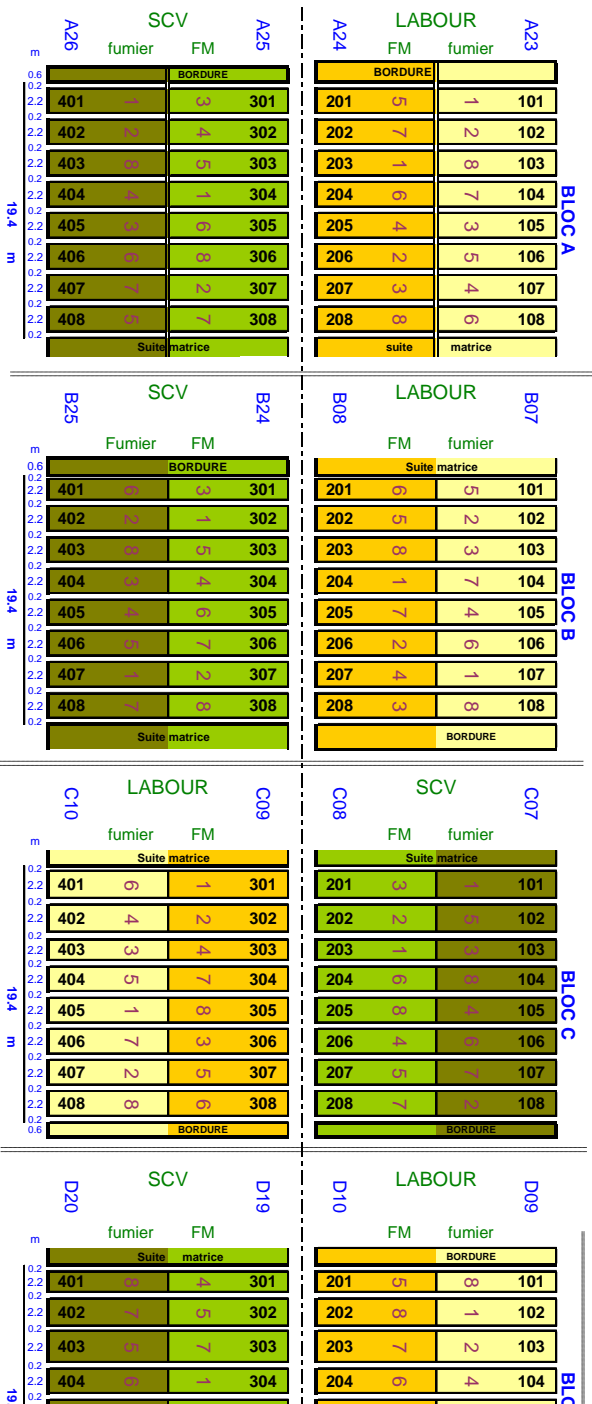
XSCRID	Parent1	Parent2	XSCRID	Parent1	Parent2
2	FOFIFA 154	C630-38	88	FOFIFA 169	Botramaintso
6	FOFIFA 169	C630-38	90	Nerica 3	FOFIFA 161
9	FOFIFA 157	C630-139	91	Nerica 4	FOFIFA 161
11	FOFIFA 159	C630-139	92	Sucupira	FOFIFA 152
13	FOFIFA 133	PCT 14	93	Sebota 182	FOFIFA 152
14	FOFIFA 151	PCT 14	94	Sebota 182	FOFIFA 169
15	FOFIFA 152	PCT 14	95	Sebota 239	FOFIFA 62
16	FOFIFA 154	PCT 14	96	Sebota 239	FOFIFA 152
17	FOFIFA 157	PCT 14	98	FOFIFA 154	FOFIFA 167
18	FOFIFA 158	PCT 14	99	FOFIFA 154	FOFIFA 161
19	FOFIFA 159	PCT 14	100	FOFIFA 169	FOFIFA 167
22	FOFIFA 167	PCT 14	112	FOFIFA 168	CT 1432 PL2
23	Chhomrong Dhan	PCT 14	113	Sucupira	FOFIFA 62
24	Jumli Marshi	PCT 14			
25	FOFIFA 169	PCT 14			
27	FOFIFA 151	PCT 17			
36	Chhomrong Dhan	PCT 17			

71	FOFIFA 169	CIRAD 141	
79	Jumli Marshi	Sebota 41	
NP	FOFIFA 62	Sebota 101	
63	Sucupira	FOFIFA 169	
84	Sebota 36	FOFIFA 62	

ANNEXE II – Croisements en cours de F5 pour 2006/2007

XSCRID	Parent1	Parent2
1	Fofifa 151	C630-38
2	Fofifa 154	C630-38
3	Fofifa 157	C630-38
4	Fofifa 158	C630-38
5	Fofifa 159	C630-38
7	Fofifa 151	C630-139
9	Fofifa 157	C630-139
16	Fofifa 154	PCT 14
17	Fofifa 157	PCT 14
18	Fofifa 158	PCT 14
19	Fofifa 159	PCT 14
20	Fofifa 161	PCT 14
22	Fofifa 167	PCT 14
25	Fofifa 169	PCT 14
29	Fofifa 154	PCT 17
31	Fofifa 158	PCT 17
36	Chhomrong Dhan	PCT 17

URP SCRID / PROGRAMME SELECTION / Campagne 2006-2007
 Plan essai comparatif variétal matrice Andranomanelatra (EVB)



Modes de culture :

- Labour fumier
- SCV fumier
- Labour FM
- SCV FM

Variétés:

- 1 Exp 910 5 Exp 411 = Fa 172
- 2 Exp 206 6 Fa 167
- 3 Exp 918 7 Fa 161
- 4 Exp 304 8 Fa 154 traitement fongicide

repère virtuel de la ligne de chemin de fer

ANNEXE III – Plan essai comparatif "matrice"

ANNEXE IV – Croisements F1 réalisés pour la campagne 2005/2006

CROISEMENT 2006

N°	Parent femelle	Parent male
1	EXP 302	CT 1432 (CT 134-32 2006-2007)
2	EXP 302	Moroberekan
3	EXP 411	CHH Dhan
4	EXP 411	CT 1432 (CT 134-32 2006-2007)
6	CHH Dhan	Sebota 281
7	CHH Dhan	Espadon
8	CHH Dhan	Fa 154
9	CHH Dhan	Exp 411
10	CHH Dhan	CT 1432
11	Sebota 65	Exp 411
12	Sebota 65	CHH Dhan
13	Sebota 41	CHH Dhan
15	Sebota 281	CHH Dhan
16	Fa 154	CHH Dhan
17	Fa 154	Exp 411
18	Fa 154	CHH Dhan
19	Fa 154	IRCC 12
21	Fa 154	IR 68144
22	Fa 167	Espadon
23	Fa 167	Phore
24	Fa 161	Espadon
25	Fa 161	IR 68144
26	Fa 161	Kasalath
27	Fa 161	Phore
29	Nerica 4	CHH Dhan
30	Nerica 4	Fa 167
32	Moroberekan	Exp 411
33	Fa 133	CHH Dhan
34	Fa 152	Moroberekan
36	CHH Dhan	Sebota 41
37	EXP 411	Sucupira
38	EXP 411	Moroberekan
39	Fa 133	Moroberekan
40	Fa 167	IR 68144

ANNEXE V – Protocole extraction ADN riz (URP SCRiD)

Modifié pour tubes 1,5mL

1. Broyage dans l'azote liquide de 4 sections de feuilles d'environ 4 cm.
2. Mise au froid à -20°C

Préchauffage tampon d'extraction : 74°C pendant 30 min

3. Ajouter 600 µL de tampon d'extraction à la poudre de feuilles. Vortexer
4. Mettre au bain marie 30 min à 74°C : **Inversion toutes les 5 min**
5. Refroidissement au frigo pendant 7 min
6. Ajouter 600 µL de CIAA (conservation au frigo)

Bien agiter les tubes avant de les placer dans la centri

7. Centrifuger 15 min à 6000 RPM (4°C)
8. Récupérer le surnageant (environ 600 µL)
9. Ajouter l'isopropanol en quantité identique que le surnageant (conservation de l'isopropanol à -20°C)
10. Inversion des tubes x10
11. Centrifuger 15 min à 12000 RPM
12. Jeter très doucement le surnageant
13. Séchage du culot à température ambiante pendant 20 min (tubes ouverts protection par papier)
14. Remettre l'ADN en suspension dans 200 µL d'eau distillée

Les culots d'ADN peuvent être repris en laissant les tubes 24 h sur la paillese.

Préparation tampon d'extraction TrisHCL (1M, pH 8) NaCl (5M) EDTA (0,5M) MATAB (2%) Sulfite de sodium (0,5%) PEG (1%)	CIAA (Chloroforme iso amylique) Ratio 24/1
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------

ANNEXE VI – Composition du milieu d'amplification PCR d'après Frouin (communication personnelle)

Produit	Concentration finale	Unité
Tampon	1	X
dNTP	200	µM
MgCl ₂	0,50	mM
Amorce1-M13	0,08	µM
Amorce2	0,10	µM
M13 marqué	0,10	µM
Taq polymérase	0,10	U/µL

M13 marqué correspond au dye (2 différents, longueur d'onde 700 et 800 nm), petite amorce GTGCTGCAACATTTTGCTG avec le fluorochrome

L'amorce1-M13 (forward) est composé d'une séquence CACGACGTTGTAAAACGAC+ séquence du microsatellite

Séquence microsatellite		
RM21 = (GA) ₁₈		
RM224 = (AAG) ₈ (AG) ₁₃		
RM474 = (AT) ₁₃		
RM514 = (AC) ₁₂		