

# RAPPORT FINAL PROJET DE RECHERCHE EN PARTENARIAT (PARRUR)

## Contrôle intégré de la bactériose (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre dans les petites exploitations agricoles de la Région Vakinankaratra



Septembre 2013



## REMERCIEMENTS

Le présent ouvrage résume le déroulement de l'action de recherche intitulée « Contrôle intégré de la bactériose (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre dans les petites exploitations agricoles de la Région Vakinankaratra » qui a été retenue par le Projet « Promotion de la recherche en partenariat à Madagascar dans le secteur du développement rural » (PARRUR), dans le cadre de son deuxième appel à propositions.

Cette action a reçu un financement de 20 000 euros du Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France à Madagascar (SCAC), destiné à couvrir une période de mise en œuvre de 12 mois prolongée de 3 mois allant du 19 Juin 2012 à 30 Septembre 2013 (Convention de Subvention N°29/20605)

L'action est portée par FIFAMANOR (Centre de Développement Rural et de Recherche Appliquée) sous la coordination scientifique de Madame Volatsara B. RAHETLAH et en collaboration avec deux Départements de l'Université d'Antananarivo (Département d'Entomologie, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée), le Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE) et l'Unité Mixte de Recherche « Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical » de la Pôle Protection des Plantes du Cirad-La Réunion.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements et toute notre reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ce que cette action ait lieu, en particulier :

- Le Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France à Madagascar et la Cellule de Coordination du Projet PARRUR
- Madame Vololoniaina Lalatia RAMALANJAONA, Directeur de FIFAMANOR
- Madame Félicitée FIENENA REJO, Directeur du CNRE
- Madame Danielle A. Doll RAKOTO RANOROMALALA, Chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée
- Madame Lala Harivelo RAVAOMANARIVO RAVELOSON, Chef du Département d'Entomologie
- Madame Blandine ANDRIANARISOA, Chef de Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie et Parrain Scientifique

## CONTEXTE

Le secteur agricole est au centre des moyens de subsistance de plus de 70% de la population de Madagascar. Ce secteur contribue à environ 27% du PIB et de 40% des recettes d'exportation (INSTAT/EPM, 2005).

La pomme de terre occupe une place stratégique dans la politique de sécurité alimentaire à Madagascar, arrivant en quatrième position au niveau national en termes de production après le riz, le manioc et la patate douce (MAEP/UPDR, 2004). Elle contribue au niveau urbain à la diversification alimentaire et assure au niveau rural le rôle de complément ou de substitut du riz notamment en période de soudure. La Région Vakinankaratra est la première zone de production où la filière pomme de terre a été identifiée comme « porteuse » et réellement exportée (Rabezandrina, 2007).

Malgré les potentialités agricoles de cette région, l'incidence des maladies dont la bactériose due à la bactérie phytopathogène dénommée *Ralstonia solanacearum* constitue une contrainte majeure à la production de pomme de terre (MAEP/UPDR, 2002). Cette maladie est quasiment présente dans toutes les zones de production et sévit surtout pendant la principale saison de culture de la pomme de terre (saison chaude et pluvieuse). Elle diminue fortement le rendement aussi bien par le flétrissement suivi de la mort des jeunes plants, que par la détérioration d'une bonne partie de la production, destinée à l'exportation, par le pourrissement des tubercules.

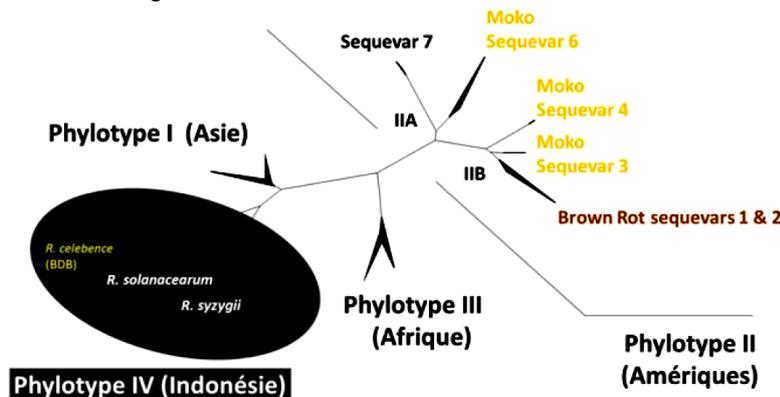
Il est à rappeler que la maladie de flétrissure causée par les différents sous-groupes de *Ralstonia solanacearum* est une principale maladie de cultures d'importance économique (tomate, pomme de terre, aubergine, géranium...) dans les pays tropicaux, subtropicaux et quelques pays tempérés chauds. *Ralstonia solanacearum* constitue un complexe d'espèce qui, est génétiquement structuré en 4 phylotypes, correspondant aux souches originaires de l'Asie (phylotype I), du continent américain (phylotype II), de l'Afrique incluant Madagascar et la Réunion (phylotype III) et de l'Indonésie, Japon et Australie (IV) (Guidot *et al*, 2007, Fegan et Prior, 2003).

*Ralstonia solanacearum* présente un large spectre de plantes hôtes comprenant plus de 200 espèces cultivées ou spontanées appartenant à plus de 50 familles botaniques. Sur la base de la spécificité d'hôtes, les souches de *R. solanacearum* sont subdivisées en 5 races et sur la base de leurs caractéristiques biochimiques, en 6 biovars.

Les souches de *R. solanacearum* reportées à Madagascar appartiennent au phylotype III, biovar 1 (Rakotondramanana, 1988; Lallmahomed *et al*, 1988; Randriamampianina, 1997; Randrianangaly, 2003; Rahetlah, 2008).

Espèce	<i>Ralstonia solanacearum</i>														
Phylotype	I			II			III			IV					
				A	B										
Origine	Division 1 Asie et Océanie			Division 2 Amérique			Afrique			Indonésie et Asie					
Biovar	3	4	5	2T	1	2	2T	1	2T	1	2	2T	BDB	R svz	
Race	1	4	5	1	2	3									
Sequevar	12-18			1-7, 38	28, 46	24, 25	26, 27, 34	29-31, 33, 26-37, 39	19-23			11	8	10	9

**Figure 1** : Correspondance entre les différents systèmes de classification utilisés pour typer les souches de *R. solanacearum* avec un éclairage sur le récent schéma de classification hiérarchique en phylotype qui a pour intérêt de rendre compte du passé évolutif de l'ensemble du génome.



**Figure 2**: Arbre phylogénétique schématisé du complexe d'espèce *R. solanacearum*

Le flétrissement bactérien de la pomme de terre se transmet principalement par la semence, le sol, le plant infecté, les blessures naturelles ou artificielles, les matériels et outillages agricoles contaminés, l'eau de ruissellement et l'eau d'irrigation.

La lutte chimique étant absente, les mesures de contrôle généralement recourues à Madagascar à titre préventif portent notamment sur l'utilisation de variétés supposées « résistantes » et la rotation culturale (French, 1982). Toutefois, la propriété de résistance des variétés de pomme de terre sont spécifiques des souches de *R. solanacearum* et sont sous l'influence des conditions agro-pédo-climatiques. En outre, la rotation culturale est peu efficace d'autant que les souches de *R. solanacearum* pouvant se conserver longtemps dans les profondeurs des sols ou sur les systèmes racinaires de nombreuses mauvaises herbes.

Actuellement, les voies de recherche s'orientent en partie vers les procédés de lutte visant à préserver et/ou renforcer les propriétés de résistance des plantes hôtes et à réduire le potentiel infectieux dans le sol (Prior et Bérakis, 1990 ; FIFAMANOR, 2001 ; Gorissen et al, 2004). Des résultats promoteurs ont notamment été observés aussi bien pour les traitements

de sol à base d'amendement organique à haute teneur en azote tels que les engrais verts et les composts que pour l'exploitation des potentialités des microorganismes antagonistes (Rhoades et Forbes, 1986 ; Rodriguez-Kabana et al, 1992 ; Shekhawat et al, 1993 ; Lemaga et al, 2001 ; Cardoso et al, 2006 ; Nguyen & Ranamukhaarachchi, 2010).

La mise au point d'une méthode intégrée de contrôle associant la lutte génétique ou la sélection variétale orientée vers une résistance spécifique aux souches de *R solanacearum* avec des pratiques culturales raisonnées semble ainsi être impérative pour lutter efficacement contre la bactériose de la pomme de terre à Madagascar.

## **OBJECTIFS**

L'objectif général du présent projet consiste à contribuer à la sécurité alimentaire et au développement durable dans les petites exploitations agricoles de la Région du Vakinankaratra à travers le contrôle plus efficace, intégré de la bactériose de la pomme de terre due à *Ralstonia solanacearum*.

Les objectifs spécifiques sont notamment :

- identifier le(s) groupe(s) au(x) quel(s) appartient(ent) les souches de *R solanacearum* présentes dans le bassin de production de la région Vakinankaratra
- identifier des microorganismes antagonistes à ces souches de *R solanacearum*
- mettre au point des itinéraires techniques innovants de contrôle de l'incidence de la bactériose de la pomme de terre

## **MATERIELS ET METHODES**

Pour répondre aux objectifs spécifiques sus-énumérés, les méthodes suivantes ont été mises en œuvre :

- isoler et caractériser les souches de *R solanacearum* présentes dans les zones de production de la pomme de terre
- conduire une enquête épidémiologique en vue de l'étude des interactions plante-sol-environnement
- sélectionner et tester des microorganismes antagonistes aux souches de *R solanacearum*
- étudier l'impact de la diversité entomofaunique dans la transmission de *R solanacearum*
- tester les effets de l'amendement organique du sol contre l'incidence de la bactériose de la pomme de terre
- détecter les infections latentes de *R solanacearum* sur tubercule semence de pomme de terre

## **I. Isolement et caractérisation partielle des souches de *Ralstonia solanacearum* présentes dans différentes zones de production de la pomme de terre de la région Vakinankaratra**

L'étude a contribué à la réalisation d'une thèse de doctorat de Mme Santatra H. RAVELOMANANTSOA intitulée « Diversité des souches de *Ralstonia solanacearum*, pathogène de la pomme de terre à Madagascar et résistance de la pomme de terre pour le contrôle intégré du flétrissement bactérien » (Université de la Réunion) et d'un mémoire de D.E.A de Mr Berthin A A Andrianarisoa intitulé « Lutte biologique contre la bactériose de la pomme de terre de la région Vakinankaratra : Actinomycètes et *Pseudomonas* fluorescents antagonistes de *Ralstonia solanacearum* » (Faculté des Sciences d'Antananarivo).

### **I.1 Objectifs de recherche**

L'objectif principal est d'identifier le(s) groupe(s) au(x)quel(s) appartient(ent) les souches de *R.solanacearum* présentes à Madagascar, notamment dans le bassin de production de pomme de terre de la Région Vakinankaratra. Dans cette étude, il s'agit en premier lieu d'isoler des souches de *R.solanacearum*, et ensuite de les caractériser partiellement.

### **I.2 Méthodologie**

Après une recherche bibliographique et des observations de maladies aux champs, la première partie de la composante « **Isoler les souches de *Ralstonia solanacearum*** » a débuté vers mi-octobre 2012 au cours de la culture en contre-saison de la pomme de terre. Deux périodes d'échantillonnage ont été choisies: la culture de contre saison sur rizière et la culture de saison intermédiaire sur tanety et terrain irrigué.

L'isolement des souches a été réalisé à partir d'échantillons de plants de pomme de terre présentant des symptômes de flétrissement bactérien ou d'échantillons de sol de la rhizosphère de plants de pomme de terre infectés ou non.

Pour la deuxième partie « **Caractériser partiellement les souches** », les tests de caractérisation morphologique, culturale, biochimique ont été effectués à partir de culture pure de colonies virulentes caractéristiques. La caractérisation moléculaire des souches de *R. solanacearum* collectées a été réalisée au sein du laboratoire UMR-PVBMT Pôle de Protection des Plantes (3P) du CIRAD - La Réunion.

#### **I.2.1 Références**

Les principaux documents de référence technique utilisés dans l'élaboration des protocoles de prélèvement et d'isolement sont :

- Directive 2006/63/CE modifiant annexes directive 98/57/CE : lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*
- E R French L Gutarra, P. Aley and Elphinstone : Methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato crops (CIP)
- USDA/APHIS/PPQ. 2003. Pest Data Sheet *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2.

- Diagnostic protocols for regulated pests : *Ralstonia solanacearum*. Bulletin EPPO PM7/21
- **Belén Álvarez, Elena G. Biosca, and María M. López.**2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen.

Les principaux documents de référence technique utilisés pour la caractérisation partielle des souches de *Ralstonia solanacearum* sont :

- **Fegan, M., and P. Prior.** 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex,” p. 449–462. In C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (ed.), Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, Madison, WI
- **Prior, P., and M. Fegan.** 2005. Diversity and molecular detection of *Ralstonia solanacearum* race 2 strains by multiplex PCR, p. 405–414. In C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (ed.), Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, Madison, WI.
- **Prior, P., and M. Fegan.** 2005. Recent development in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*, p. 127–136. In T. Momol, P. Ji, and J. B. Jones (ed.), Proceedings of the First International Symposium on tomato diseases, vol. 695. International Society for Horticultural Science, Brugge, Belgium.
- **Opina, N., F. Tavner, G. Hollway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. C. Hayward, V. Krishnapillai, W. F. Hong, B. W. Holloway, and J. Timmis.** 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum*(formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. **5**:19–30.
- **Singleton P.** (1999). Bactériologie 2ecycle. 4<sup>e</sup> ed. Paris: Dunod. 414p.
- **Yabuuchi E.,** Kosako Y., Yano I., Hotta H. and Nishiuchi Y. (1996). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol*,39: 897-904.

### I.2.2 Echantillonnage

L'échantillonnage sur culture de pomme de terre a concerné les 5 districts de la Région Vakinankaratra et les principales zones de production de la pomme de terre (échantillonnage de type stratifié). Les sites d'échantillonnage sont historiquement reconnus pour présenter des foyers de maladie, ils sont géoréférencés et représentatifs de chaque zone de production (échantillonnage par quotas) (photo 1). 20 échantillons de portions de tige (environ 10cm à partir du collet) ou éventuellement de tubercules infectés sont prélevés par site, au hasard, et sur des plants de pomme de terre présentant des symptômes de flétrissement bactérien.

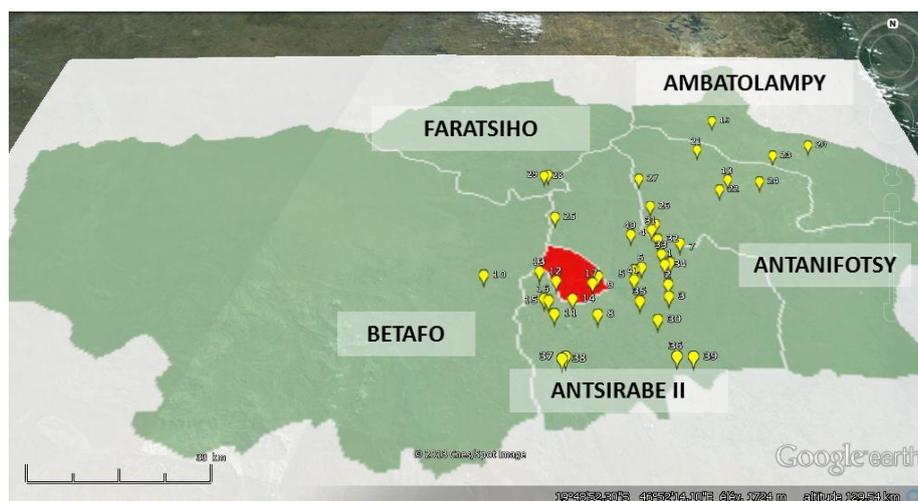


Photo 1 : Sites d'échantillonnage dans la Région Vakinankaratra

Les échantillons de sol ont été collectés dans la rhizosphère de pomme de terre dans deux périodes différentes (contre saison et saison intermédiaire) et dans trois districts de la région de Vakinankaratra. Pour la contre-saison, les échantillons de sol ont été prélevés dans deux districts (Ambatolampy et Antsirabe II) dont 22 dans le district d'Antsirabe II, 12 dans le district d'Ambatolampy. Pour la saison intermédiaire, au total 10 échantillons de sol ont été prélevés dans cinq sites différents du district de Betafo. Chaque échantillon a été prélevé à une profondeur située entre 10cm et 20cm. Cette zone correspond à la zone d'hyperactivité biologique au niveau du sol. Pour chaque échantillon, environ 500g de sol ont été prélevés (cf : Tableau 1 : échantillons de sol prélevés) et conditionnés dans des sachets de prélèvement. Les échantillons ont été gardés à +4°C du point de prélèvement jusqu'à l'analyse au laboratoire du CNRE.

**Tableau 1** : Liste d'échantillons de sols rhizosphériques prélevés sous les variétés de pomme de terre dans trois districts (Ambatolampy, Antsirabe II et Betafo)

Saison de culture	Terrain	Districts	Zones productrices	Code des échantillons
<b>Contre-saison</b>	Rizière	Antsirabe II	Antanetibe	Ms1, Ms2, Ms3, Ms4, Ms5, Ms6, Mm1, Mm2 Mm3, Mm4
			Ankotrabe ambony	Ds1, Ds2, Ds3, Dm1 Dm2, Dm3, Dm4, Dm5 Dm6, MNs1, MNs2, MNs3
		Ambatolampy	Tsarafandry ambony	Ss1, Ss2, Ss3, Sm1, Sm2, Sm3
			Tsarafandry ambony	Ss4 Ss5 Ss6 Sm4 Sm5, Sm6
<b>Saison intermédiaire</b>	Tanety	Betafo	Ampamelomana	MHs1, MHm1
			Antsoatany	DMs1, DMm1, SPs1, SPm1
			Ankabahaba	Bs1, Bm1
			Betafo	MVs1, MVm1

**Ms, Ss, MHs, DMs, Ds, SPs, Bs** et **MVs**: échantillons collectés sous plants de pomme de terre sains  
**Mm, Sm, MHm, DMm, Dm, SPm, Bm** et **MVm** : échantillons collectés sous plants de pomme de terre flétris  
**M** : variété Meva (contre-saison) ; **S** : variété Spunta (contre saison) ; **MH** : variété Maharevo (saison intermédiaire) ;  
**DM** : variété Diamondra (saison intermédiaire) ; **D** : variété Diamondra (contre-saison) ; **SP** : variété Spunta (saison intermédiaire) ;  
**B** : variété Bandy akama (saison intermédiaire) ; **MV** : variété Meva (saison intermédiaire)

### **I.2.3 Enquête épidémiologique**

La fiche d'enquête renseigne les caractéristiques liées à la culture, à la production et à la maladie. Pour chaque site, une fiche d'enquête est rempli au fur et à mesure par le biais d'une discussion, de questions ouvertes et semi-ouvertes, d'observations des faits et des facteurs qui sous-tendent l'épidémie (Annexe).

### **I.2.4 Isolement des souches de *Ralstonia solanacearum***

Chaque échantillon de tige ou de tubercule de pomme de terre est lavé à l'eau du robinet, séché, décontaminé en surface. L'exsudat bactérien est récupéré à partir de portions de tiges ou de tissu de l'anneau vasculaire dilacérées et immergées dans un milieu Tris. L'ensemencement-culture se fait par épuisement en trois secteurs sur milieux Sequeira. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 48 h. Sur le milieu tetrazolium, les colonies caractéristiques et virulentes sont muqueuses et de couleur blanc laiteux, plates, de forme irrégulière et fluide. Après 3 jours d'incubation, les colonies prennent une coloration rouge sang au centre, présentant des stries internes ou des verticilles. Les variantes spontanées non virulentes forment de petites colonies arrondies non fluides, butyreuses, de couleur uniforme rouge sombre. Les colonies muqueuses obtenues sont ensuite réensemencées sur milieu Kelman pour obtenir des cultures pures.

L'isolement des bactéries à partir d'échantillon de sol de la rhizosphère des différentes variétés de pomme de terre a été réalisé selon la méthode de microbiologie classique utilisant les techniques de dilution en cascade et d'étalement en surface sur milieu spécifique validé. Le milieu SMSA additionné d'antibiotique a été adopté.

### **I.2.5 Etudes des caractères morphologiques, cultureux et biochimiques des souches bactérienne isolées à partir de sols rhizosphériques**

#### ***Aspect macroscopique***

L'aspect macroscopique des isolats de *R. solanacearum* est déterminé sur milieu tétrazolium (Yabuuchi et al., 1996). L'aspect macroscopique (couleur, forme, consistance, ect.) des colonies est observé après 48 heures d'incubation à 30°C.

#### ***Aspect microscopique***

##### ***Coloration de Gram***

Elle est effectuée selon la méthode colorimétrique (Marchal, 1985 ; Singleton, 1999). Des frottis de colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques des *R. solanacearum* sont préparés, colorés puis observés sous microscope optique (grossissement  $\times 100$ ).

##### ***Test KOH***

Une goutte de solution de KOH à 3% est déposée sur une lame et des colonies âgées de 48 heures de *R. solanacearum* sont prélevées, le tout est mélangé pendant 10 secondes puis

élevé de 1 à 2cm. Une formation de filaments différencie les bactéries Gram négatif des bactéries Gram positif.

### ***Production des pigments fluorescents***

Les boîtes de Pétri contenant du milieu King B sont inoculées avec des cultures pures de *R. solanacearum* et les boîtes sont incubées pendant 48h à 28°C. Elles sont ensuite placées sous lumière ultraviolette à 204nm et 365nm, et la présence ou non des pigments fluorescence est notée.

### ***Recherche de la catalase***

Une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame stérile sur laquelle quelques jeunes colonies bactériennes sont réparties. Un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles d'air traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase.

### ***Recherche de l'oxydase***

Ce test permet de mettre en évidence l'enzyme phénylène diamine oxydase. Un morceau de papier filtre est découpé puis imprégné du réactif (N diméthyl paraphénylène diamine). Une colonie bactérienne prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur est ensuite écrasée sur le morceau de papier. Après 30 secondes, si la colonie prend une teinte rose, violette, le germe possède une oxydase.

### **Détermination du type de biovar**

Ce test est réalisé en deux étapes :

#### ***\*Préparation des hydrates de carbone***

Dix millilitre (10ml) de solution d'hydrates de carbone à 1% composée de : lactose, maltose, cellobiose, mannitol, sorbitol, dulcitol est préparée puis versée dans des tubes à vis stériles. Les solutions sont chauffées à 100°C pendant 20 minutes, puis mélangées avec 90ml de milieu de base refroidi à 60°C. Cinq (5ml) du mélange sont alors versés dans des tubes stériles prévus pour le test et refroidis à température ambiante. Un mélange composé de milieu de base et d'eau stérile est réalisé et utilisé en tant que témoin négatif.

#### ***\*Inoculation de la suspension d'inoculum***

Une suspension de culture bactérienne âgée de 48heures est préparée dans de l'eau distillée stérile à raison de  $10^8$  UFC/ml ou 4 ml de suspension avec une densité optique égale à 0,1 à 600nm. Deux gouttes de l'inoculum sont ensuite ajoutées dans chaque tube test (2 répétitions sont réalisées pour chaque traitement). Les tubes sont incubés à 30°C et observées après 2, 7 et 14 jours. Un changement de couleur du vert olive au jaune peut être observé à la surface dans les 72 heures, ce qui indique un résultat de test positif.

### **I.2.6 Test de pathogénicité**

Ce test a pour but de mettre en évidence le pouvoir pathogène des souches bactériennes. Il s'agit de vérifier si les colonies virulentes inoculées à des plantes hôtes saines (tomate) placées dans des conditions favorables provoquent bien le flétrissement.

### **\*Préparation d'inocula bactériens**

Des tubes contenant le milieu SMSA liquide sont ensemencés par des jeunes cultures de *R. solanacearum* puis incubés à 30°C pendant 48 h. Pour chaque souche, l'inoculum est préparé de manière à obtenir une densité optique égale à 0,1 à 660nm correspondant à 10<sup>5</sup> UFC/ml.

### **\*Stérilisation des graines de tomate**

Des graines de tomate (*Solanum lycopersicum*) ont été stérilisées superficiellement avec de l'alcool éthylique à 95% pendant une minute puis rincées 5 fois à l'eau distillée stérilisée. Les graines sont ensuite trempées dans l'hypochlorite de sodium dilué à 30 % pendant 5 minutes, puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile afin d'en éliminer les traces de fongicides de conservation. Les graines sont séchées sur compresse de gaze stérilisée préalablement à l'autoclave à la température 121°C pendant 20 minutes.

### **\*Inoculation artificielle des bactéries**

Le sol de semis (tourbe), préalablement stérilisé, est distribué dans des pots de 1 litre et arrosé à l'eau de robinet. Des graines de tomate sont ensuite semées à raison de trois plantules par pot et cinq pots par traitement. L'inoculation a été effectuée après l'apparition de la troisième vraie feuille en injectant 100µl de l'inoculum dans les tiges de la plantes juste au-dessus des cotylédons. Les cultures ont été placées sous serre et arrosées deux à trois fois par semaine jusqu'à l'expression maximale de la maladie.

### **I.2.7 Caractérisation moléculaire des souches de *R solanacearum***

La caractérisation moléculaire des souches présumées *R. solanacearum* est réalisée par la méthode d'amplification en chaîne par polymérase de type multiplexe ou « PCR multiplexe ». Le protocole permet d'amplifier plusieurs amplicons à la fois, par l'utilisation de couples d'amorces oligonucleotidiques spécifiques à l'espèce, au phylotype (Tableau 2). Des marqueurs de poids moléculaire (DNA-Ladder) de 1 kb et de 100 pb permettent d'estimer la taille des fragments d'ADN amplifiés (Photo 2). Ces derniers sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. La coloration au bromure d'éthidium suivi d'une révélation du profil électrophorétique sous une lumière UV permet de différencier les fragments d'ADN par la taille des bandes. Le gel est ensuite photographié.

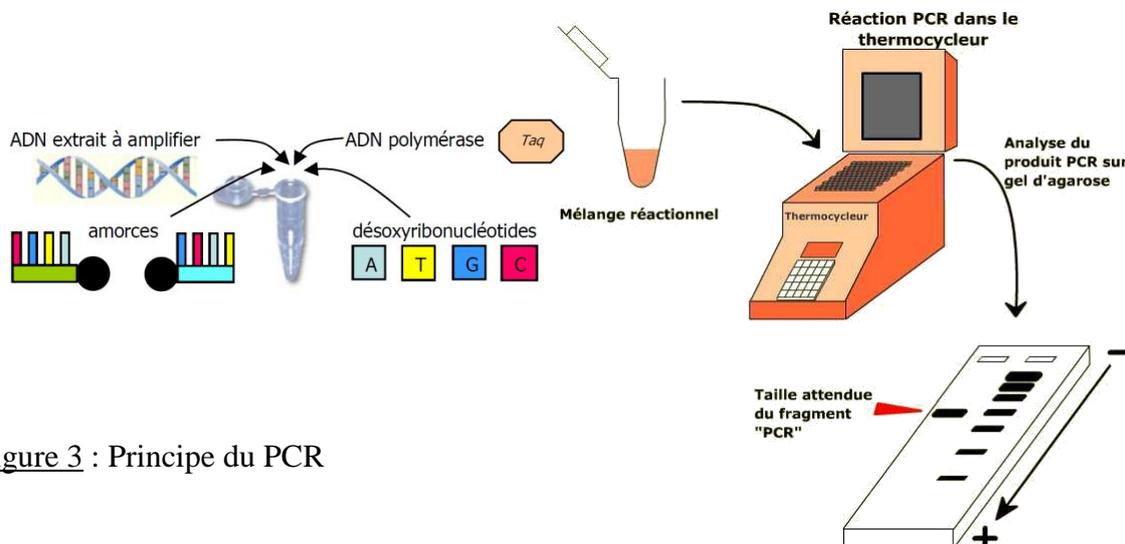


Figure 3 : Principe du PCR

Tableau 2 : Caractéristique du PCR pour le diagnostic et le phylotypage

Réactifs			Primer Mix 10x	[Cid] pmol		Taille du fragment	Programme PCR	
Eau							Dénaturation	96°C 6min
Buffer	1	x	Nmult:21:1F (I)	6	Phylotype I	144 bp	Hybridation	94°C 15s
MgCl2	1,5	mM	Nmult:21:2F (II)	6	Phylotype II	372 bp		59°C 30s
dNTPs	0,2	mM	Nmult:22:InF (IV)	6	Phylotype IV	91 bp		72°C 30s
Primer Mix	1	x	Nmult:23:AF (III)	18	Phylotype III	213 bp	Elongation	72°C 10min
GoTaq Flexi	0,625	U	Nmult:22:RR (reverse)	6				Pause
ADN	2	µl	759R	4	<i>Ralstonia solanacearum</i>	280 bp		
			760F	4				

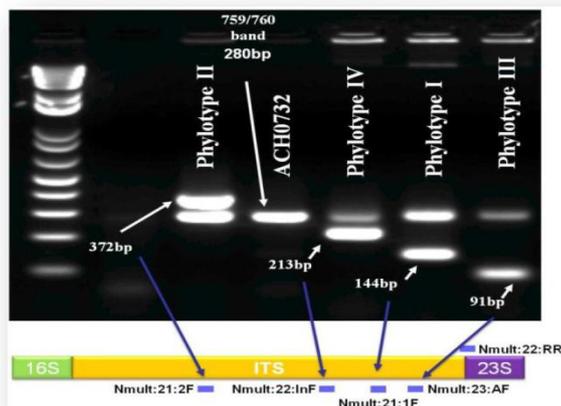


Photo 2 : Profil électrophorétique de la PCR multiplexe pour diagnostic et phylotypage

### I.3 RESULTATS

#### I.3.1 Données sur l'échantillonnage

Deux prospections-prélèvements, en période de culture de contre saison et en saison intermédiaire, sont réalisées dans les zones de production de pomme de terre de la région Vakinankaratra. Les échantillonnages sont effectués dans 53 sites de cultures situés en moyenne et haute altitude (1350m - 2217m), sur différentes variétés de pomme de terre cultivées sur tanety, rizière et terrain irriguées. Egalement, des prélèvements sont faits sur d'autres plantes (haricot, tomate), différentes catégories de semences (vitroplants, souches, pré-base, de culture G1) et de l'eau d'irrigation dans la zone de production de semences d'Andraokavato. Un total de 918 prélèvements a été effectué.



Photo 3 : Symptômes du flétrissement bactérien

**Tableau 3** : Tableau récapitulatif des données d'échantillonnage

Période	23, 24 Octobre 2012	04 au 13 Avril 2013
Zone d'échantillonnage	Antsirabe II	Zone de production (5 Districts)
Altitude	1350 m – 1750 m	1350 m – 2217 m
Site	12	41
Echantillons prélevés par site	6	20
Nature de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• différentes variétés cultivées de pomme de terre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• différentes variétés cultivées de pomme de terre</li> <li>• plante adventice : <i>bidens pilosa</i>(anantsipolitra)</li> <li>• tomate, haricot</li> <li>• eau d'irrigation</li> <li>• vitroplants</li> <li>• semences souches</li> <li>• semences de pré-base</li> <li>• semences de culture (G1)</li> </ul>
Variétés	Meva, Diamondra1, Diamondra2, Bandy akama, Bemanga, Chair jaune, Jengy, Maharevo, Mangamaso, Marotia, Mevarena, Spunta, Menamaso, Maneva, Marevaka	
Parties prélevées	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tige</li> <li>• tubercule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tige</li> <li>• tubercule</li> </ul>
Strate écologique	rizière, terrain en terrasse irriguée	tanety (colline), baiboho, terrain en terrasse irriguée
Saison de culture	Contre saison	Saison intermédiaire
Nombre d'échantillons	42	876
Nombre d'isolats	91	763

### I.3.2 Renseignements recueillis lors de l'enquête épidémiologique

L'enquête épidémiologique a permis de connaître l'historique de la maladie, les pratiques culturales des paysans, les variétés de pomme de terre supposées tolérantes au flétrissement bactérien, les caractéristiques observés du flétrissement bactérien.

Le flétrissement bactérien existe depuis longtemps causant de pertes tolérables de rendement surtout en cultivant les variétés résistantes ou tolérantes au flétrissement développées par FIFAMANOR. Le flétrissement bactérien se manifestait surtout en période chaude et humide, sur des cultures en saison et en saison intermédiaire, cultivées sur tanety. Le début d'infection est en général observé avant la floraison. Concernant les pratiques culturales, la majorité des parcelles de cultures sont fertilisés avec du compost ou du fumier de ferme, des engrais chimiques comme le NPK et l'Urée et chaulées avec la dolomie. Les semences sont soit utilisées en



**Photo 4** : Enquête sur terrain

entier, soit tranchées selon le nombre de germe. Au cours de leur cycle végétatif, les plants de pomme de terre sont également traités avec des insecticides à base de pyréthrinoïdes, et de fongicide comme le Dithane (mancozèbe) pour contrôler le mildiou.

Par contre, depuis ces cinq dernières années, le flétrissement bactérien s'est sévèrement développé même sur des cultures de pomme de terre de contre saison sur rizière avec d'importante perte de rendement, allant de 60 à 80%. L'infection commence même au début de la phase de croissance et jusqu'à la tubérisation. Certains paysans ont également constaté que les variétés estimées autrefois résistantes ou tolérantes au flétrissement bactérien comme Bandy akama, Diamondra 1, Meva, Maneva, Bemanga, Jengy deviennent sensible à la maladie. De même, ils ont pu remarquer que les cultures de haricots sont atteintes par le flétrissement. Par ailleurs, au cours de ces observations, le sélectionneur en pomme de terre de FIFAMANOR a entre autres observé que le *Bidens pilosa* à proximité d'un plant de pomme de terre flétri est, lui aussi, atteint du flétrissement bactérien.

### **I.3.3 Résultats de l'isolement**

#### ***\*Isolement des souches de R. solanacearum à partir d'échantillon infecté de pomme de terre***

Nous avons pu recueillir 854 isolats à partir des 918 échantillons que nous avons ramenés au laboratoire. Du point de vue morphologie et couleur des colonies, 785 isolats sont supposés être comme des souches de *R. solanacearum* : les colonies sont en majorité des colonies fluides, irrégulières, présentant une couleur allant de rose à rouge sang au centre, entouré de couleur blanc. Entre autres, nous avons pu obtenir deux isolats sur l'échantillon de tige de haricot, un isolat sur le *Bidens pilosa*, trois isolats sur la tomate.

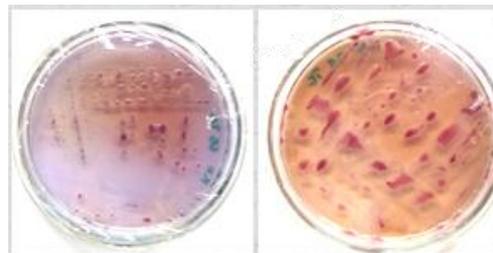


Photo 5 : Colonie de *R.solanacearum* sur milieu Sequeira

#### ***\*Isolement des souches de Ralstonia solanacearum à partir de sols rhizosphériques prélevés dans les deux districts Ambatolampy et Antsirabe II (contre-saison)***

Soixante-sept souches bactériennes sont isolées à partir des 12 échantillons de sol rhizosphérique de plants infectés de pomme de terre collectés dans les deux districts (Ambatolampy et Antsirabe II). Ces souches sont numérotées de 1 à 67 et dont :

- ◆ 34 souches isolées à partir de la variété Diamondra ;
- ◆ 27 souches isolées à partir de la variété Meva
- ◆ 06 souches isolées à partir de la variété Spunta

Le nombre de souches isolées à partir de chaque variété de pomme de terre dans les 2 districts est présenté dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Nombre de souches de *Ralstonia solanacearum* isolées des sols rhizosphériques de plant infecté de pomme de terre

Souches	Echantillons de sol	Lieu de prélèvement	District
R1,R2,R3 ,R4 ,R5 ,R6 ,R7 ,R8 ,R9 ,R10, R11, R12,R13, R14	Mm1	Antanetibe	Antsirabe II
R15, R16, R17, R18, R19	Dm1	Ankotrabe ambony	
R20,R21,R22,R23,R24,R25,R26,RR27,R28 R29,R30, R31,R32,R33,RR34,R35,R36, R37, R38, R39	Dm2		
R40, R 41, R42, R43, R44, R45, R46	Dm3		
R47, R48, R49, R50	Sm1	Tsarafandry	Ambatolampy
R51, R52	Sm2		
R53	Dm3	Ankotrabe ambony	Antsirabe II
R54	Dm4		
R55, R56, R57, R58 R59 ; R60	Mm2	Antanetibe	
R61 ; R62 ; R63 ; R64 ; R65 ; R66 ; R67	Mm3		

***\*Isolement des souches de *Ralstonia solanacearum* à partir de sols rhizosphériques prélevés dans le district de Betafo (saison intermédiaire)***

Quinze souches bactériennes ont été isolées à partir des 5 échantillons de sol rhizosphérique de plants infectés de pommes de terre collectés dans le district d'Antsirabe II. Ces souches sont numérotées de R'1 à R'15 et sur les 15 souches:

- ◆ 04 souches ont été isolées à partir de la variété Diamondra;
- ◆ 02 souches ont été isolées à partir de la variété Maharevo.
- ◆ 01 souches ont été isolées à partir de la variété Meva.
- ◆ 03 souches ont été isolées à partir de la variété Spunta.
- ◆ 05 souches ont été isolées à partir de la variété Bandy Akama.

Le nombre de souches isolées à partir de chaque variété de pomme de terre est présenté dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** Nombre de souches de *Ralstonia solanacearum* isolées des sols rhizosphériques de plant infecté de pomme de terre

Souches	Echantillons de sol	Lieu de prélèvement	District
R'1, R'2, R'3, R'4	DMm1	Antsoatany	Betafo
R'5, R'6	MHm1	Ampamelomana	
R'7	MVm1	Betafo	
R'8, R'9, R'10	SPm1	Antsoatany	
R'11, R'12, R'13, R'14, R'15	Bm1	Ankabahaba	

**I.3.4 Caractéristiques morphologiques, culturelles et biochimiques des souches bactériennes isolées à partir de sols rhizosphériques**

Pour toutes les souches isolées à partir de sols rhizosphériques, les colonies caractéristiques commencent à apparaître au bout de 24 heures d'incubation. Toutes les souches isolées sont Gram négatif et forment des filaments visqueux. Parmi les 61 souches, 24 sont non fluorescents et produisent un pigment brun diffusible (tableau 6). Les tests biochimiques conduits sur ces 24 souches révèlent la présence de catalase et d'oxydase et l'appartenance au biovar 2 (tableau 7). Ces diagnostics morphologiques et biochimiques des souches de *R solanacearum* doivent être confirmés par le diagnostic moléculaire.

**Tableau 6 :** Aspect microscopique, test KOH et production de pigment fluorescent des isolats de *Ralstonia solanacearum*

Souches	Coloration de Gram	Test KOH	Production de pigment fluorescent
R10-R11-R16-R17-R18-R19-R20-R21-R22-R24-R25-R26-R27-R28-R31-R32-R35-R41-R42-R43-R44-R45-R46-R47-R48-R50-R51-R52-R53-R54-R55-R56-R57-R58-R59-R60-R61	-	+	Fluorescent
R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8-R9-R12-R13-R14-R15-R23-R29-R30-R33-R34-R36-R37-R38-R39-R40-R49	-	+	Non fluorescent Pigments brun diffusible

- : négatif ; + : formation d'un filament (mélange visqueux)

**Tableau 7:** Caractéristiques biochimiques de 24 souches de *Ralstoniasolanacearum* isolées

Mise en évidence des enzymes respiratoires		Détermination du biovar					
Catalase	Oxydase	Utilisation des disaccharides			Oxydation des alcools		
		Maltose	Lactose	Cellobiose	Dulcitol	Mannitol	Sorbitol
+	+	+	+	+	-	-	-

- : négatif ; + : positif

### I.3.5 Résultats du test de pathogénicité

Les colonies virulentes testées ont provoqué le flétrissement systématique de tous les plants de tomate inoculés au bout de 24 jours.

### I.3.6 Caractéristiques moléculaires des souches de *Ralstonia solanacearum*

Après amplification par PCR-multiplexe, le profil électrophorétique montre que 735 isolats bactériens sont assignés comme étant bien *R. solanacearum*, dont 604 souches tombant dans le Phylotype II et 131 dans le phylotype III.

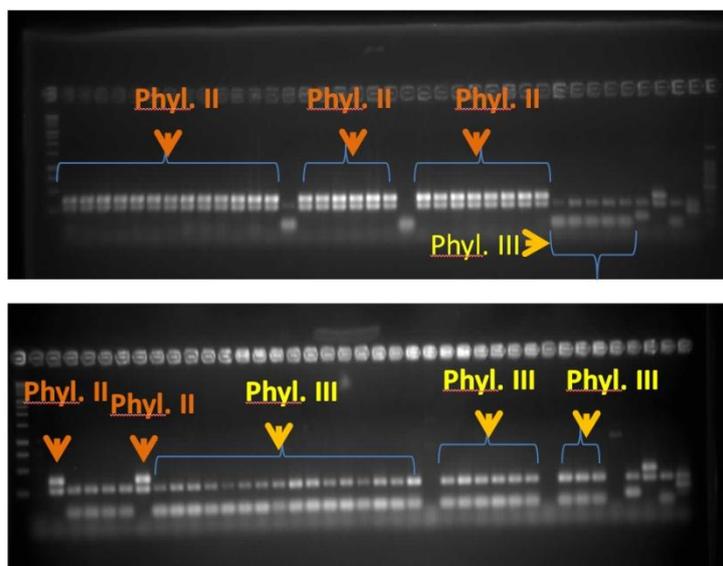


Photo 6 : Profil des bandes d'ADN amplifiées sur gel d'agarose 1,5%

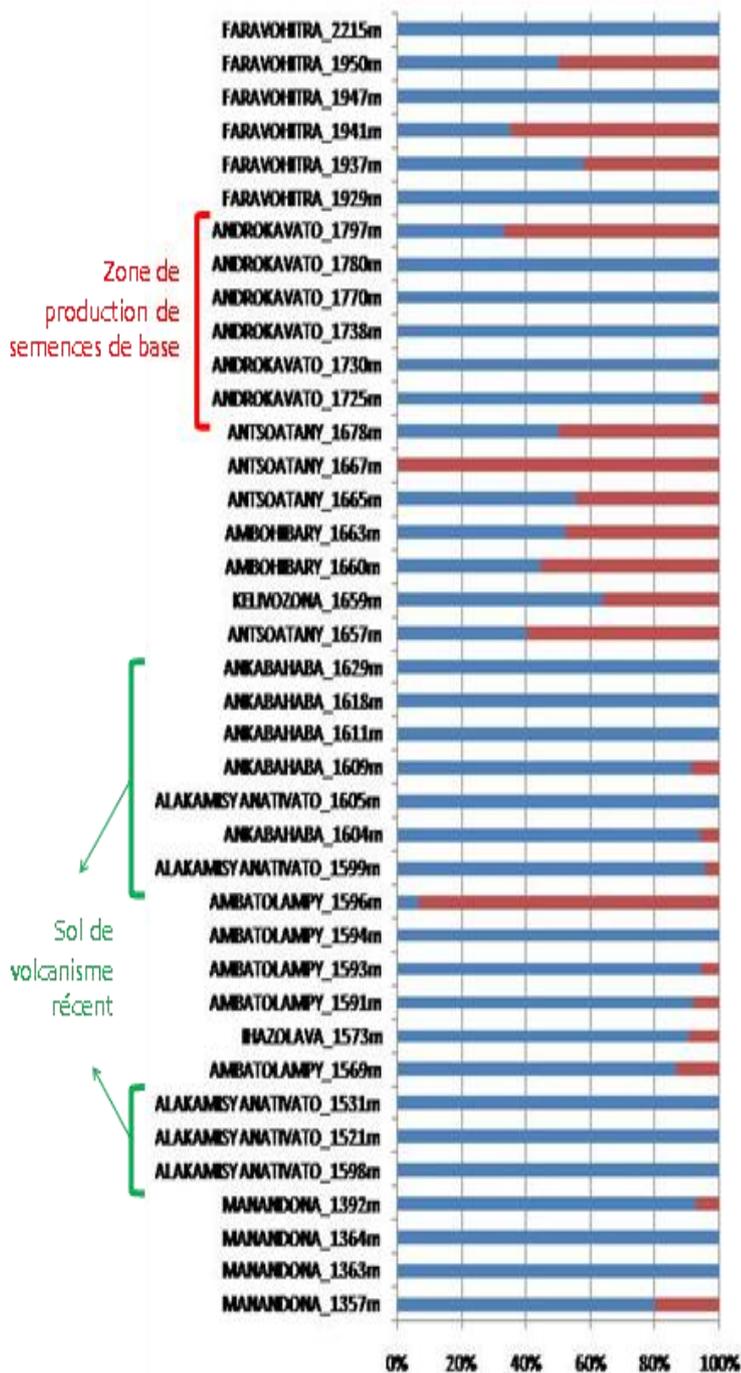


Figure 4 : Relation « site x phylotype

#### I.4 DISCUSSIONS

Les informations collectées à partir de l'enquête épidémiologique nous permettent de conclure à une situation phytosanitaire nouvelle concernant le flétrissement bactérien dans le bassin de production de la Région de Vakinankaratra.

Aujourd'hui, nos résultats montrent clairement que le phylotype III et le phylotype II sont présents à Madagascar (Photo 6, figures 4 et 5), notamment dans la région du Vakinankaratra.

Avec la description de souches historiques de phylotype I (I-18, I-46) et phylotype III (III-19) à Madagascar, le résultat du phylotypage des souches de *R.solanacearum* collectées démontre la présence effective du phylotype II (Figure 6).

Nous savons que les souches de phylotype III sont endémiques (Lallmahomed *et al.*, 1988). En revanche, les souches de phylotype II n'ont jamais été décrites à Madagascar et il est fort probable qu'il s'agit d'une introduction.

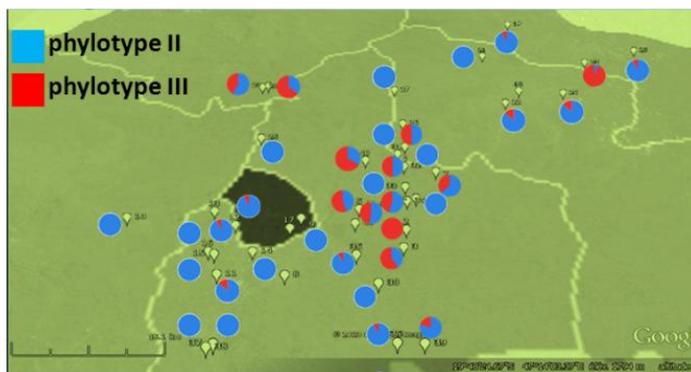
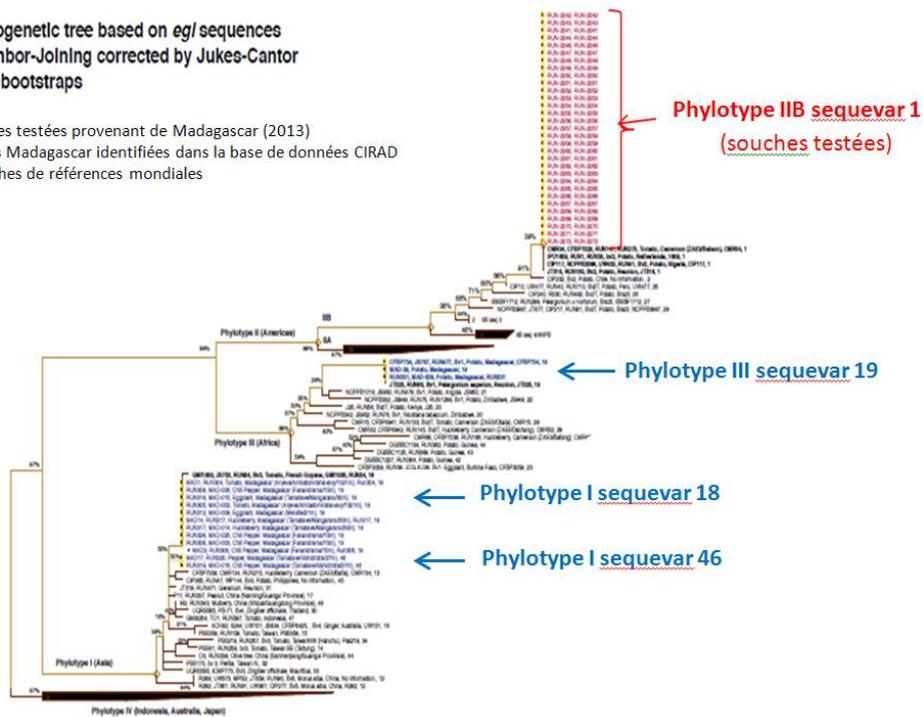


Figure 5 : Répartition géographique du phylotype II et III dans la région Vakinankaratra

Figure 6 : Phylogenetic tree based on *egl* sequences  
Neighbor-Joining corrected by Jukes-Cantor  
2000 bootstraps

En rouge : souches testées provenant de Madagascar (2013)  
En bleu : souches Madagascar identifiées dans la base de données CIRAD  
En noir : les souches de références mondiales



Par ailleurs, le graphe représentant la relation entre la «variétéxphylotype» montre vraisemblablement que les variétés développées ou locales estimées auparavant comme résistantes au flétrissement bactérien apparaissent désormais sensibles et fortement infectées par les souches de *R.solanacearum* phylotype II (Figure 7).

L'eau d'irrigation qui a été prélevée à Androkavato, la zone de production de semences de base, est contaminée à la fois par *Ralstonia solanacearum* phylotype II et phylotype III.

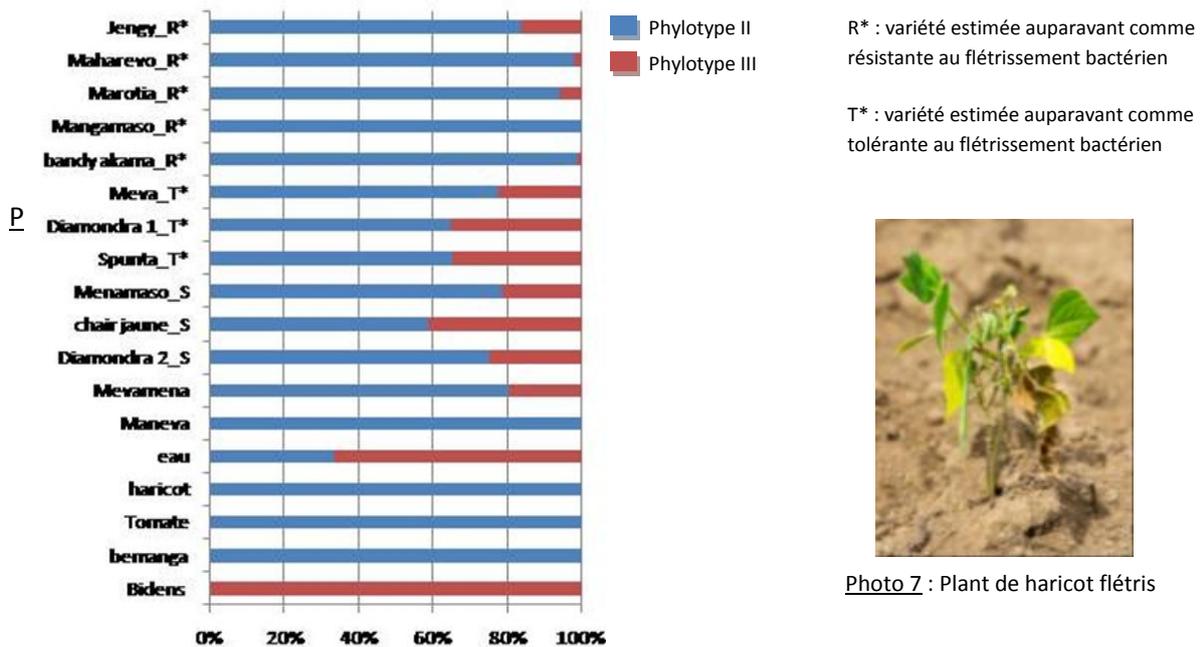


Photo 7 : Plant de haricot flétri

Figure 7 : Relation « variété x phylotype »

*R.solanacearum* phylotype II infecte également la culture de haricot et de tomate. Cette situation est une menace pour ces deux cultures, notamment pour le haricot qui auparavant, selon certains paysans agriculteurs, ne présentait jamais de syndrome de flétrissement.

Enfin, à partir des observations faites par le sélectionneur en pomme de terre, *Bidens pilosa* qui est une plante adventice, peut effectivement être attaquée par le flétrissement bactérien. Ici, l'espèce est infectée par *R.solanacearum* phylotype III. *Bidens pilosa*, étant une plante adventice prolifique et cosmopolite pourrait servir d'indicateur de flétrissure bactérienne sur une parcelle contaminée par *R.solanacearum*.



Photo 8 : Photo de groupe de l'équipe Fifamanor-PARRUR et l'équipe Cirad-Anses

*Premier rang, de gauche à droite* : **Seheno RALISOA** (Ingénieur agronome/Chef de section Vulgarisation agricole FIFAMANOR/Responsable de la composante « Essais de lutte intégrée de la bactériose de la pomme de terre due à *Ralstonia solanacearum* ») – **Vololona L. RAMALANJAONA** (Directeur de FIFAMANOR) – **Dr. Volatsara B. Rahetlah** (Chercheur/Animateur scientifique du projet PARRUR) – **Harena T. RAZAFINDRAZAKA** (Responsable des Contrôles de Semences FIFAMANOR) ; **Santatra H. RAVELOMANANTSOA** (Chercheur/Doctorante UMR-PVBMT CIRAD/Responsable de la composante « *Isolement et caractérisation des souches de R. solanacearum* présentes dans différentes zones de production de la pomme de terre de la région Vakinankaratra » PARRUR) – **Jean Marc RANDRIANAIVOARIVONY** (Chef de département Recherche et Développement FIFAMANOR)

*Deuxième rang, de gauche à droite* : **Sandrine ARRIBAT** (Ingénieur VSC UMR-PVBMT CIRAD) – **Dr. Philippe PRIOR**(Chercheur/Bactériologiste- INRA/UMR-PVBMT CIRAD) - **Dr. Gilles CELLIER** (Chercheur/Bactériologiste au Laboratoire de la Santé des Végétaux ANSES) – **Rodin RANDRIATSALAMA** (Ingénieur agronome/Sélectionneur/Chef de section de Recherche Plantes à tubercules FIFAMANOR)

## II. Test d'antagonisme *in-vitro* des *Pseudomonas* et des Actinomycètes vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*

Ce test a pour objectif de sélectionner le ou les isolats d'Actinomycètes et de *Pseudomonas* capables d'inhiber la croissance des isolats de *R solanacearum* selon la méthode de diffusion sur gélose.

### II.1 Méthodologie

Le test est précédé par l'isolement des souches d'Actinomycètes et de *Pseudomonas* fluorescents à partir d'échantillons de sol rhizosphérique prélevés sur culture de pomme de terre de contre-saison et de saison intermédiaire ainsi que des souches d'Actinomycètes endophytes isolées à partir d'échantillons de tige, feuille et racine de pomme de terre.

#### II.1.1 Revivification et rajeunissement des souches

Chaque souche de *R solanacearum* est revivifiée dans 9ml de bouillon nutritif puis incubée à 30°C pendant 24h. Une anse de cette culture est ensuiteensemencée en stries sur une boîte de Pétri contenant du milieu YPGA et incubée à 30°C pendant 24h.

#### II.1.2 Préparation de l'inoculum

A partir des jeunes colonies de *R solanacearum*, une ou deux colonies sont prélevées à l'aide d'une anse stérile et diluées dans 10ml d'eau distillée stérile. La turbidité est ensuite mesurée au spectrophotomètre de manière à obtenir une densité optique égale à 2 à 550nm correspondant à 10<sup>6</sup>UFC/ml.

#### II.1.3 Ensemencement et lecture

La technique par inondation ou culture en nappe est appliquée pour l'ensemencement. La surface entière du milieu YPGA additionné de chlorure 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) est inondée par 10ml de l'inoculum à 10<sup>8</sup>UFC/ml de *R. solanacearum*. La culture est incubée à 30°C pendant 15mn afin que les souches puissent adhérer sur le milieu. L'excès de liquide est aspiré à l'aide d'une pipette pasteur stérile et le milieu est séché pendant 15mn à 30°C. Les souches d'Actinomycètes et de *Pseudomonas* fluorescents sont ensemencées en spots à la surface des boîtes de Pétri. Après d'incubation à 30°C pendant 72h, la présence de zone d'inhibition (zone claire sans coloration rosâtre autour des isolats testés) est observée et le diamètre d'inhibition est mesuré à l'aide d'une règle graduée millimétrée. Les résultats sont exprimés suivant les normes ci-après.

**Tableau 8:** Normes utilisées dans la méthode de diffusion sur gélose (Adesina et al., 2007)

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Sensibilité du germe	Résultat
X<10mm	Assez sensible	+
X>10mm	Sensible	++

Les principaux documents de référence technique utilisés pour la sélection d'antagonistes et le test d'antagonisme *in vitro* sont :

**Adesina M.F.**, Lembke A., Costa R., Speksnijder A. and Smalla K. (2007). Screening of bacterial isolates from various European soils for *in vitro* antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biol Biochem*,39: 2818–2828.

**Benhamou N. and Chet I.** (1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol*, 63: 2095–2099.

**Marchal M.** (1985). Initiation à la microbiologie. Paris : *Bordas* : 192p.

**Singleton P.** (1999). Bactériologie 2ecycle. 4<sup>e</sup> ed. Paris: Dunod. 414p.

**Yabuuchi E.**, Kosako Y., Yano I., Hotta H. and Nishiuchi Y. (1996). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol*,39: 897-904.

## II.2 RESULTATS ET DISCUSSIONS

### II.2.1 Isolement des souches de *Pseudomonas* fluorescents à partir de culture de pomme de terre de contre-saison

Dix-huit échantillons de sol rhizosphérique ont été, respectivement, collectés dans les districts d'Ambatolampy et d'Antsirabe II. Douze souches de *Pseudomonas* fluorescents ont été isolées à partir d'échantillons prélevés dans le district d'Antsirabe II sur des plants de la variété Meva de pomme de terre d'apparence saine (tableau 9).

**Tableau 9** : Nombre de souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées à partir des sols rhizosphériques de plants de pomme de terre d'apparence saine

Souches	Echantillons de sol	Lieu de prélèvement	District
P1, P2, P3, P4, P5	Ms3	Antanetibe	Antsirabe II
P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12	Ms5		

### II.2.2 Isolement des souches d'Actinomycètes à partir de culture de pomme de terre de contre-saison

#### \*Isolement des souches d'Actinomycètes telluriques

Quatre-vingt-treize souches d'Actinomycètes ont été isolées à partir des 10 échantillons de sol rhizosphérique collectés dans le district d'Antsirabe II (tableau 10). Ces souches sont numérotées de 1 à 93 dont :

- ◆ 22 souches isolées à partir de la variété Diamondra
- ◆ 7 souches isolées à partir de la variété Menamaso
- ◆ 29 souches isolées à partir de la variété Meva
- ◆ 35 souches isolées à partir de la variété Spunta

**Tableau 10:** Nombre de souches d'Actinomycètes telluriques isolées à partir des sols rhizosphériques de plants de pomme de terre d'apparence saine

Souches	Echantillons de sol	Lieu de prélèvement	District
S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7	MN1	Antanetibe	Antsirabe II
S8,S9,S10,S11,S12,S13,S14,S15,SS16,S17, S18,S19	Ds1	Ankotrabeambony	
S20,S21, S22, S23,S24 ,S25 ; S26 ; S27,S28, S29	Ds2		
S30, S31, S32, S33, S34, S35	Ms1	Antanetibe	
S36, S37, S38, S39, S40, S41	Ms2		
S42,S43,S44,S45,S46,S47,S48,S49,S50,S51,S5S2,S53, S54,S55,S56,S57,S58	Ms3		
S59,S60,S61,S62	Ss1	Tsarafandry ambony	Ambatolampy
S63,S64,S65,S66,S67	Ss2	Tsarafandryambany	
S68,S6S9, S70,S71,S72,S73,S74	Ss3		
S75,S76,S77,S78,S79,S80	Ss4		
S81,S82,S83,S84,S8S5, S86,S87,S88	Ss5		
S89,S90,S91,S92,S93	Ss6		

Les 93 souches d'Actinomycètes isolées sont morphologiquement identiques c'est-à-dire les colonies sont opaques, de formes arrondies, à bords irréguliers et incrustées dans le milieu de culture. Les souches se différencient par la couleur du mycélium aérien et du mycélium végétatif ainsi que par la taille et la production de pigments.



Photo 9 : Colonies d'Actinomycètes

#### \*Isolement des souches d'Actinomycètes endophytes

En plus de ces 93 souches d'Actinomycètes telluriques, 25 souches d'Actinomycètes issues des feuilles, tiges et racines ont été isolées à partir des 2 variétés (Diamondra et Meva) de pommes de terre d'apparence saine. Ces souches sont numérotées de E1 à E25 dont :

- ❖ 3 isolées à partir de la variété Diamondra
- ❖ 4 isolées à partir de la variété Meva
- ❖ 3 isolées à partir de la variété Menamaso
- ❖ 15 isolées à partir de la variété Spunta

**Tableau 11 :** Souches d'Actinomycètes endophytes

Souches	Appareil végétatif	Lieu de prélèvement	District
E1, E2, E3	MN1	Ankotrabe ambony	Antsirabe II
E4, E5	Ds1		
E6	Ds2		
E7	Ms1	Antanetibe	
E8, E9	Ms2		
E10	Ms3		
E11, E12	Ss1	Tsarafandry ambony	Ambatolampy
E15, E16, E17	Ss2	Tsarafandry ambony	
E18, E19, E20	Ss3		
E21, E22	Ss4		
E23, E24, E25	Ss5		

### II.2.3 Isolement des souches de *Pseudomonas* fluorescents et d'Actinomycètes telluriques à partir de culture de pomme de terre de saison intermédiaire

#### \* Isolement des souches de *Pseudomonas* fluorescents

Quatre souches de *Pseudomonas* fluorescents ont été isolées à partir des 5 échantillons de sol rhizosphérique collectés sur une seule variété de pomme de terre (Maharevo) dans le district de Betafo (tableau 12). Ces souches sont codées et numérotées de P'1 à P'4.

**Tableau 12 :** Souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées à partir des sols rhizosphériques de plant de pomme de terre d'apparence saine

Souches	Echantillons de sol	Lieu de prélèvement	District
P1, P2, P3, P4	MHs1	Maharevo	Betafo

#### \*Isolement des souches d'Actinomycètes telluriques

Quarante-six souches d'Actinomycète ont été isolées à partir des 5 échantillons de sol rhizosphérique de plants de pomme de terre d'apparence saine collectés dans le district d'Antsirabe II. Ces souches sont numérotées de S'1 à S'46 dont:

- ◆ 09 souches isolées à partir de la variété Diamondra.
- ◆ 08 souches isolées à partir de la variété Maharevo.
- ◆ 06 souches isolées à partir de la variété Meva.
- ◆ 17 souches isolées à partir de la variété Spunta.
- ◆ 06 souches isolées à partir de la variété BandyAkama.

**Tableau 13:** Nombre de souches d'Actinomycètes telluriques isolées des sols rhizosphériques de plants de pomme de terre d'apparence saine

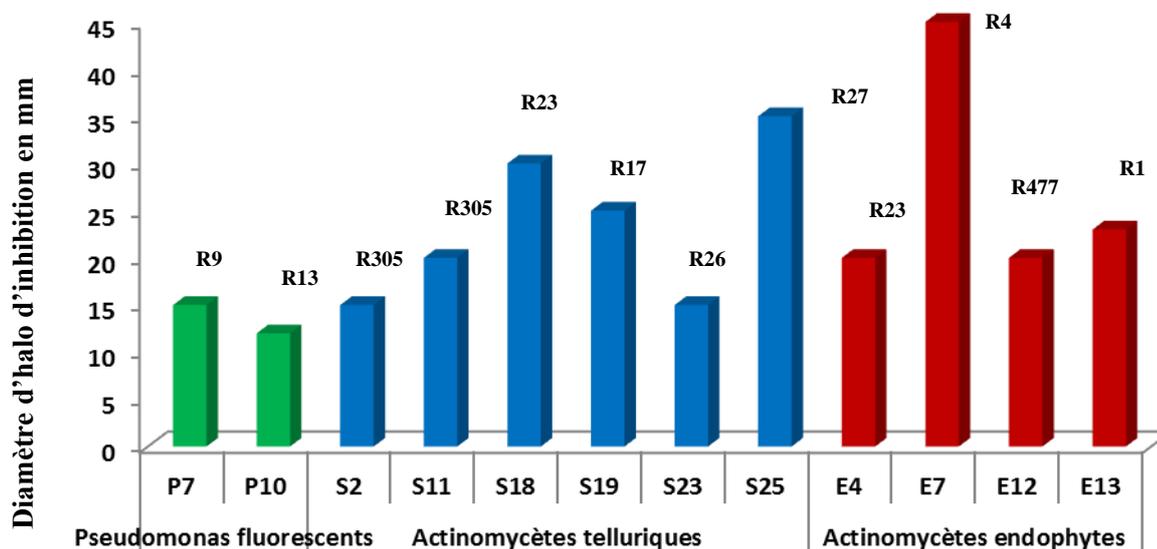
Souches	Variété	Lieu de prélèvement	District
S'1-S'2-S'3-S'4-S'5-S'6-S'7-S'8-S'9-S'10-S'11-S'12-S'13-S'14-S'15- S'16-S'17	SPs1	Antsoatany	Betafo
S'18-S'19-S'20- S'21-S'22-S'23- S'24-S'25	MHs1	Ampamelomana	
S'26-S'27-S'28- S'29-S'30-S'31-	Bs1	Ankabahaba	
S'32-S'33-S'34- S'35-S'36-S'37- S'38-S'39-S'40	DMs1	Antsoatany	
S'41-S'42-S'43- S'44-S'45-S'46-	MVs1	Betafo	

### II.2.4 Test d'antagonisme *in vitro*

Les résultats obtenus ont révélé que 4 souches d'Actinomycètes endophytes, six souches d'Actinomycètes telluriques et deux souches de *Pseudomonas* fluorescents isolés sur les cultures de pomme de terre en contre-saison sont actives sur 24 isolats de *R. solanacearum* (tableau 14, figure 8).

**Tableau 13:** Diamètre d'halo d'inhibition (mm) des souches antagonistes sur les isolats de *Ralstonia solanacearum*

Souches	Isolats antagonistes	Isolats de <i>Ralstonia solanacearum</i>	Diamètre d'halo d'inhibition (mm)
<i>Pseudomonas</i> fluorescents	P7	R2- R9- R18	10 ; 15 ; 10
	P10	R13- R22	12 ; 10
Actinomycètes telluriques	S2	R3- R8- R305	10 ; 10 ; 15
	S11	R15- R305	15 ; 20
	S18	R4- R23	20 ; 30
	S19	R15- R17- R21	20 ; 25 ; 20
	S23	R4- R7- R26	10 ; 10 ; 15
	S25	R5- R12- R27- R30- R305	10 ; 20 ; 35 ; 30 ; 30
Actinomycètes endophytes	E4	R23- R25	20 ; 15
	E7	R4- R14	45 ; 35
	E12	R20- R477	15 ; 20
	E13	R1- R3- R6- R19- R28	23 ; 12 ; 15 ; 15 ; 20



#### Souches antagonistes

**Figure 8:** Diamètre d'inhibition (mm) des souches d'Actinomycètes endophytes/telluriques et de *Pseudomonas* fluorescents actives sur 12 isolats de *Ralstonia solanacearum*.

Certaines souches sont plus actives que d'autres comme le cas de :

- S25 sur *R. solanacearum* R27 (35mm); R30 et R305 (30mm)
- E7 sur *R. solanacearum* R4 (45mm) ; sur R14 (35mm)
- E13 sur *R. solanacearum* R1 (23mm)
- P7 sur *R. solanacearum* R9 (15mm)

Par ailleurs, 10 isolats d'Actinomycètes telluriques isolées à partir de culture de pomme de terre de saison intermédiaire présentent également des effets antagonistes contre 09 isolats de *R. solanacearum* (tableau 15).

**Tableau 15:** Diamètre d'halo d'inhibition (mm) des souches antagonistes sur les isolats de *Ralstonia solanacearum*

Souches	Isolats antagonistes	Isolats de <i>Ralstonia solanacearum</i>	Diamètre d'halo d'inhibition (mm)
Actinomycètes telluriques	S'6	R'6	15
	S'7	R'12	20
	S'8	R'5	10
	S'11	R'6	20
	S'24	R'7; R'1	20 ; 20
	S'25	R'3	20
	S'36	R'10	20
	S'39	R'9	20
	S'44	R'4 ; R'5	20 ; 20

### III Etude de l'impact de la diversité entomofaunique dans la transmission de *R solanacearum*

Cette étude avait comme principal objectif l'identification des implications éventuelles et des rôles des insectes évoluant dans les écosystèmes dans la transmission de la bactériose de la pomme de terre.

#### III.1 Méthodologie

##### \*Enquête auprès des exploitants agricoles

Une enquête auprès des paysans dans deux districts (Antsirabe II, Betafo) en vue de l'étude des interactions sol-plante-environnement a été menée en parallèle avec la prospection de plants de pomme de terre infectés par *R solanacearum*. Elle fut suivie d'observation directe d'insectes sur les plants de pomme de terre présentant ou non les symptômes du flétrissement bactérien.

##### \*Collecte des insectes épigés et endogés

Les insectes évoluant dans les plantations de différentes variétés de pomme de terre ont été collectés. Les différentes parties des plantes ont été scrutées, notamment les parties végétatives (feuilles, tiges) mais également la partie racinaire qui peut être en contact avec les insectes endogés. Les indications des paysans sur les interactions probables entre l'apparition de la maladie et la fluctuation de la densité des insectes vecteurs ou visiteurs furent notées et une estimation des niveaux d'infestation des plants de pomme de terre évaluée.

Les insectes dans les strates herbues environnantes sont collectés selon les méthodes de capture classiques et simples utilisées en entomologie dont l'utilisation de filet à papillon et fauchoir pour les insectes volants et la collecte avec des aspirateurs à bouche pour les insectes sessiles au niveau des feuilles et tiges. Après la collecte de renseignements auprès des exploitants, les insectes collectés furent placés dans des piluliers et ramenés au laboratoire pour identification.

Pour les insectes terricoles, des excavations dans le sol autour des pieds de pomme de terre présentant des symptômes de flétrissement dans un rayon de 20cm ont été effectuées pour permettre de déterrer les insectes endogés. Leur transport a été assuré par des bocaux

contenant du sol issu de leur milieu de récolte. Après leur récolte, les échantillons collectés ont été présentés aux paysans pour confirmation et ramenés au laboratoire pour élevage et identification directe.

### III.2 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Lors de la première descente sur terrain dans les plantations de pommes de terre, la présence de pucerons sur un bon nombre de pieds de pomme de terre fut observée. De larges groupes d'insectes évoluant dans les plantations de pommes de terre ont été en outre observés au cours de la descente subséquente dont les lépidoptères en tant que défoliateurs, des hémiptères en tant que piqueur-suceurs et de coléoptères comme foreurs (Tableau 16). Il y a lieu de signaler que l'identification de certains groupes capturés sur les tiges et feuilles des plants de pomme de terre se poursuit au laboratoire.

Par ailleurs, d'après les observations faites sur les niveaux d'infestation apparente, les variétés de pomme de terre présentant les plus fortes incidences de la bactériose sont Spunta, suivi par Bandy akama et Meva (figure 9). Ces variétés semblent présenter également le maximum de nombre de familles d'insectes dont notamment les coléoptères (figure 10). Ceci laisse supposer une action indirecte ou directe des insectes comme vecteurs de la maladie. Le rôle éventuel de ces insectes en tant que réservoir de *R. solanacearum* mérite d'être confirmé par des analyses microbiologiques.

**Tableau 16:** Groupes d'insectes collectés dans les écosystèmes de plants de pomme de terre

PLOT 1	Groupes	Familles	Genres especes	Stade de developpement	Types
<b>Maharavo</b>	COLEO	LAGRIIDAE	Lagria villosa	ADULTE	
	COLEO	CURCULIONIDAE		ADULTE	broyeur
	HEMI	-		N YMPHE	Suceur
	LEPIDO	GEOMETRIDAE		CHENILLE	defoliateur
	DIPTERE	-		ADULTE	lecheur
<b>PLOT 2</b>					
<b>Bandy akama</b>	COLEO	COCCINELIDAE	Cheilomenes sulphurea	ADULTE	Predateur
	COLEO	CARABIDAE	Scarites madagascariensis	ADULTE	Predateur
	COLEO	DYNASTIDAE	Heteronychus bituberculatus	LARVE	endogée
	COLEO	TENEBRIONIDAE	Gonocephalum simplex	ADULTE	terrestre
	COLEO	-		ADULTE	??
	COLEO	MELOLONTIDAE		LARVE	endogée
	COLEO	COCCINELIDAE		LARVE	endogée
	COLEO	-		LARVE	endogée
	HEMI	PENTATOMIDAE	Dysdercus	ADULTE	Suceur
	LEPIDO	GEOMETRIDAE	-	LARVE	defoliateur
	LEPIDO	-	-	LARVE	defoliateur
	LEPIDO	-	-	LARVE	defoliateur
	HYMENO	MYRMICINAE	Aphaenogaster swammeri	ADULTE	
<b>PLOT 3</b>					
<b>Meva</b>	COLEO	COCCINELIDAE	Cheilomenes sulphurea	ADULTE	Predateur
	COLEO	TENEBRIONIDAE	Gonocephalum simplex	ADULTE	terrestre
	COLEO	DYNASTIDAE	Heteronychus bituberculatus	LARVE	endogée
	COLEO	MELOLONTIDAE	-	LARVE	endogée
	COLEO	CURCULIONIDAE	Apoderus humeralis	ADULTE	broyeur
	HEMI	PENTATOMIDAE	Dysdercus	ADULTE	Suceur
<b>PLOT 4</b>					
<b>Diamondra</b>	COLEO	COCCINELIDAE	Cheilomenes sulphurea	ADULTE	Predateur
	COLEO	CETONIDAE	Celidota parvula	ADULTE	endogée
	COLEO	-	-	ADULTE	endogée
	ORTHO	GRYLIDAE	-	LARVE	broyeur endogée
	DIPTERE	-		ADULTE	lecheur
<b>PLOT 5</b>					
<b>Spunta</b>	HEMI	PENTATOMIDAE	Dysdercus	ADULTE	Suceur
	COLEO	TENEBRIONIDAE	Gonocephalum simplex	ADULTE	terrestre
	COLEO	CETONIDAE	Celidota parvula	LARVE	endogée
	COLEO	DYNASTIDAE	-	LARVE	endogée
	LEPIDO	-	-	CHRYSALEIDE	defoliateur
	ORTHO	GRYLIDAE	-	LARVE	broyeur endogée
	LEPIDO	GEOMETRIDAE	-	LARVE	defoliateur
	LEPIDO	-	-	LARVE	defoliateur

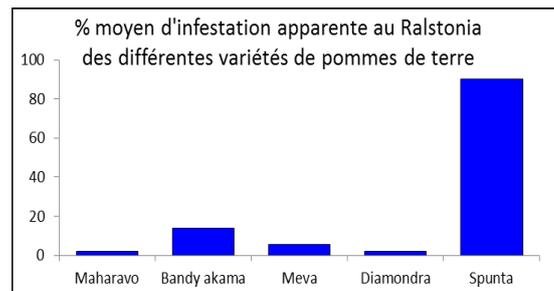


Figure 9 : Niveau d'infestation apparente du flétrissement bactérien sur variétés de pomme de terre

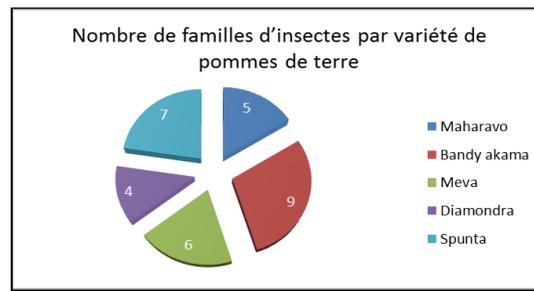


Figure 10 : Nombre de familles d'insectes par variété de pomme de terre

#### IV Test d'amendement organique des sols

L'objectif de cet essai était de tester les effets éventuels de l'utilisation du crotaliaire (*Crotalaria juncea*) et/ou du Pois cajan (*Cajanus cajan*) contre la bactériose de la pomme de terre.

##### IV 1 Méthodologie

Les principaux documents de référence technique utilisés pour le test d'amendement organique des sols sont :

- **Fontem D.A and N'tchorere B.M.J**, Impact of plant extracts and organic amendments on the growth of *Ralstonia solanacearum* and severity of potato bacterial wilt, 15<sup>th</sup> triennial ISTRC Symposium
- **G.B. Yadessa, A.H.C, Van Bruggen and F.L. Ocho**, Effects of different soil amendments on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and on the yield of tomato, Journal of Plant Pathology (2010), 92 (2), 439-450
- **Cardoso, S.C, Soares, A.C.F, Brito, A. dos S, Laranjeira, F.F, Ledo C.A.S and A.P. Santos**, Control of tomato bacterial wilt through the incorporation of aerial part of pigeon pea and crotalaria to soil. *Summa Phytopathologica*, v.32, p. 27-33, 2006.
- **Lemaga Berga, D. Siriri and P. Ebayant**, 2001, Effect of Soil Amendments on Bacterial Wilt Incidence and Yield of Potatoes in Southwestern Uganda. *African Crop Science Journal*, Vol 9, No 1, p. 267-276.

##### \*Sites d'essai

L'essai a été conduit au cours de la saison pluviale (novembre 2012 à mars 2013) et de la saison intermédiaire (janvier à mai 2013) dans deux sites de la commune rurale d'Antsoantany, district d'Antsirabe II où furent enregistrées auparavant de fortes incidences

de la bactériose de la pomme de terre. La zone d'Antsoantany est caractérisée par un climat tropical d'altitude (1700m) avec un type de sol ferrallitique.

### \*Matériel végétal

Deux variétés de pomme de terre, respectivement qualifiées de moyennement résistante (Diamondra) et sensible (Spunta) à la bactériose ont été utilisées. Les biomasses aériennes de crotalaire et de pois cajan ont servi d'engrais vert.

### \*Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est un split plot avec bloc aléatoire complet à trois répétitions. Les traitements principaux sont constitués par les variétés de pomme de terre et les traitements secondaires par le type et la quantité de matière organique utilisée. La parcelle élémentaire mesure 2,8m x 3m. Les traitements principaux et secondaires sont, respectivement, résumés dans les tableaux 17 et 18 pour les deux phases de l'essai.

La biomasse aérienne des légumineuses de couverture, hachée en gros morceaux a été incorporée au sol 20 jours avant la plantation de la pomme de terre. Le fumier de ferme, l'engrais NPK et la dolomie ont été apportés lors de la plantation de la pomme de terre. L'urée de couverture a été épandue au cours du premier buttage. Les cultures ont été traitées par des fongicides chimiques tous les 20 jours après la levée pour contrôler le mildiou. Des échantillons de sol représentatifs des traitements ont été prélevés à la fin de chaque essai.

**Tableau 17** : Traitements de sol (saison pluviale)

Traitements	Variété	Dolomie (kg/ha)	Engrais chimique (kg/ha)		Engrais organique (MV t/ha)		
			NPK (11-22-16)	urée	fumier	crotalaire	pois cajan
T0	Diamondra	0	0	0	0	0	0
T1	Diamondra	250	300	100	10	0	0
T2	Diamondra	250	300	100	4	6	0
T3	Diamondra	250	300	100	4	0	6
T4	Diamondra	250	300	100	0	10	0
T5	Diamondra	250	300	100	0	0	10
T6	Spunta	0	0	0	0	0	0
T7	Spunta	250	300	100	10	0	0
T8	Spunta	250	300	100	4	6	0
T9	Spunta	250	300	100	4	0	6
T10	Spunta	250	300	100	0	10	0
T11	Spunta	250	300	100	0	0	10

**Tableau 18** : Traitements de sol (saison intermédiaire)

Traitements	Variété	Dolomie (kg/ha)	Engrais chimique (kg/ha)		Engrais organique (kg/ha)	
			NPK (11-22-16)	urée	fumier	crotalaire
T0	Diam	0	0	0	0	0
T1	Diam	250	300	100	10	0
T2	Diam	250	300	100	4	6
T3	Diam	250	300	100	0	10
T4	Spunta	0	0	0	0	0
T5	Spunta	250	300	100	10	0
T6	Spunta	250	300	100	4	6
T7	Spunta	250	300	100	0	10

### \*Données collectées

Les données collectées pour chaque phase de l'essai sont : pourcentage de levée, taux de flétrissement des plants de pomme de terre après 20, 30, 45 et 60 jours de levée, rendement total en tubercule, pourcentage des tubercules de consommation et des écarts, nombre de population de *R solanacearum* du sol à la fin de l'essai.

## IV 2 Résultats et discussions

### \*Effets des amendements organiques sur le taux de flétrissement des plants de pomme de terre et le nombre de population de *R solanacearum* dans le sol

Pour la première phase de l'essai (saison pluviale 2012-2013), le taux moyen de flétrissement des deux variétés de pomme de terre au bout de 45 premiers jours du cycle végétatif est significativement bas pour le traitement à base d'engrais vert de 10t/ha de pois cajan et le traitement associé de fumier à 4t/ha avec engrais vert de pois cajan à 6t/ha (figure 11). Pour la seconde phase de l'essai (saison intermédiaire 2013), le taux de plants de pomme de terre flétris de la variété résistante (Diamondra) est significativement plus élevé dans les parcelles témoins par rapport aux parcelles traitées avec du fumier ou de l'engrais vert ou de leurs associations (figure 12). Concernant le nombre de population de *R solanacearum* dans le sol, aucun effet marqué des traitements n'a été décelé à la fin de chaque phase de l'essai.

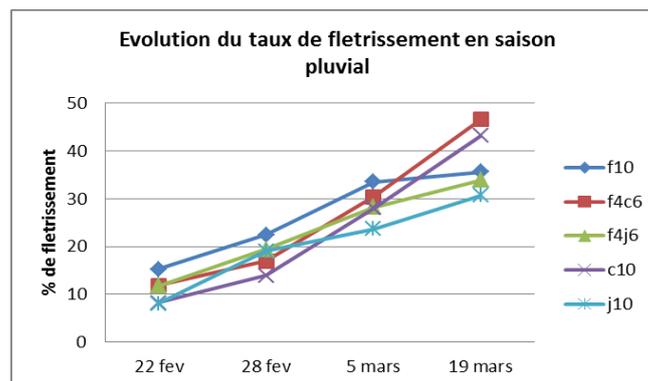


Figure 11 : Taux de flétrissement des plants de pomme de terre au cours de 45 premiers jours (saison pluviale)

(f10 : fumier 10t/ha, f4C6 : fumier 4t/ha + cortalaire 6t/ha, f4j6 : fumier 4t/ha + pois cajan 6t/ha, c10 : crotalaire 10t/ha, j10 : pois cajan 10t/ha)

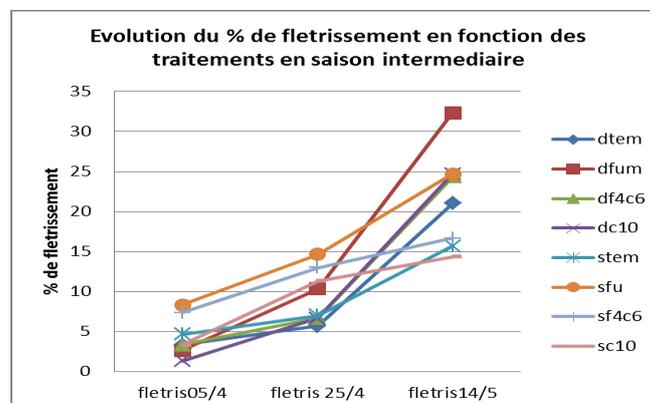


Figure 12 : Taux de flétrissement des plants de pomme de terre au cours de 45 premiers jours (saison intermédiaire)

(d/stem : témoin de la variété Diamondra/Spunta, d/sfum : fumier 10t/ha sur variété Diamondra/Spunta, d/sf4c6 : fumier 4t/ha + cortalaire 6t/ha sur variété Diamondra/Spunta, d/sc10 : crotalaire 10t/ha sur variété Diamondra/Spunta)

### \*Effets des amendements organiques sur le rendement en tubercule de pomme de terre d'apparence saine

Pour les deux phases de l'essai, le rendement moyen en tubercule d'apparence saine pour les deux variétés de pomme de terre est significativement plus élevé dans les parcelles traitées par les amendements organiques et ceci par rapport au témoin (tableaux 19 et 20).

**Tableau 19** : Rendement en tubercule de pomme de terre d'apparence saine (saison pluviale)

Traitements	Rendement en tubercules d'apparence saine (t/ha) (saison pluviale)
témoin	1,514 <sup>b</sup>
f10	9,172 <sup>a</sup>
f4c6	7,275 <sup>a</sup>
f4j6	7,915 <sup>a</sup>
c10	4,565 <sup>ab</sup>
j10	7,673 <sup>a</sup>
LSD (p<0,05)	3,29
CV (%)	32,9

f10 : fumier 10t/ha, f4C6 : fumier 4t/ha + cortalaire 6t/ha, f4j6 : fumier 4t/ha + pois cajan 6t/ha, c10: crotalaire 10t/ha, j10 : pois cajan 10t/ha

**Tableau 20** : Rendement en tubercule de pomme de terre d'apparence saine (saison intermédiaire)

Traitements	Rendement en tubercules d'apparence saine (t/ha) (intermédiaire)
témoin	1,317 <sup>b</sup>
f10	1,519 <sup>ab</sup>
f4c6	2,459 <sup>ab</sup>
c10	2,489 <sup>a</sup>
LSD (p<0,05)	0,84
CV (%)	34,3

f10 : fumier 10t/ha, f4C6 : fumier 4t/ha + cortalaire 6t/ha, c10: crotalaire 10t/ha

### V Détection d'infection latente de *Ralstonia solanacearum* sur tubercule semence de pomme de terre

L'objectif de cette étude étant de vérifier si les semences de pomme de terre d'apparence saine sont indemnes ou non d'infection latente de souches de *R solanacearum*.

#### V 1 Méthodologie

Des échantillons de tubercule semence de variétés développées ou locales de pomme de terre ont été prélevés dans trois principales zones de production (Betafo, Faratsiho, Manandona). La détection d'infection latente de souches de *R solanacearum* a été réalisée au moyen de kits NCM-ELISA développé par le Centre International de Pomme de terre (CIP).

## V 2 Résultats et discussions

Les résultats du test NCM-ELISA a révélé la présence d'infection latente de souche *de R solanacearum* sur les échantillons de tubercule semence de variétés (Spunta, Bandy akama manga, Maharevo, Meva, Diamondra, Maneva et Bandy akama mena) de pomme de terre prélevés dans les trois zones de production. Sur l'ensemble des échantillons de tubercule-semence testés (n=63), environ 44,5% ont donné des résultats positifs mis en évidence par la présence de coloration violette sur la membrane NCM. Une infection latente plus concentrée traduite par une coloration violette plus accentuée est observée pour les tubercule-semence de la variété développée Spunta et la variété locale Bandy akama manga. Les deux zones de prélèvement, Faratsiho (Faravohitra) et Betafo ont présenté le maximum d'échantillons infectés (60%).

## VI ATELIER DE RESTITUTION FINALE

Un atelier de restitution finale de l'action de recherche a été organisé le Vendredi 27 Septembre 2013, à la Salle de réunion de l'hotel Lavilla, Antsirabe. Cet atelier a vu la participation des représentants de la Cellule de Coordination de PARRUR, de la Direction Régionale du Développement Rural (DRDR) du Vakinankaratra, de l'Université d'Antananarivo, des autres partenaires techniques et financiers locaux (FOFIFA, CEFFEL, CITE, FRDA), de la Plateforme pomme de terre ainsi que de la radio locale Haja du Vakinankaratra. La fiche de présence est présentée en annexe.

Cet atelier a notamment permis de faire une pré-diffusion des acquis de l'action de recherche, de recueillir des recommandations techniques et d'effectuer des échanges.



Photo 10 : Photo de groupe de quelques participants à l'atelier de restitution finale

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude de la diversité génétique des souches de *Ralstonia solanacearum* présentes dans les zones de production de la pomme de terre de la région Vakinankaratra a démontré la présence à la fois du phylotype III et du phylotype II. Nous retenons l'attention sur les souches du phylotype II qui sont phylogénétiquement associées aux souches Brown-rot (IIB-1) certainement introduites dans le contexte malgache. Comme cela l'a été au niveau planétaire.

Cette situation est particulièrement alarmante et elle nécessite une prise de décision rapide quant aux différentes mesures de contrôle et de prévention à mettre en œuvre pour contrôler la maladie du Brown-rot, car ces souches font partie d'un groupe génétique qui est l'un des neuf agents désignés dans la loi américaine sur le bioterrorisme agricole de 2002, et est un organisme de quarantaine en Europe. Il s'agit d'un ennemi des cultures réglementé à déclaration obligatoire.

Pour compléter ces données dans le but d'effectuer une étude plus approfondie sur la situation phytosanitaire prévalente à Madagascar, il s'avère indispensable de prévoir d'autres missions de prospection, en particulier dans des zones de production de pomme de terre qui pourraient être encore indemnes de souches de phylotype IIB-1. En particulier pour compléter l'étude épidémiologique et pour connaître la distribution de la maladie dans l'espace. Enfin, l'étude de diversité implique de réaliser une prospection dans le reste des bassins de production de pomme de terre à Madagascar (Région Itasy, Andramasina, Manjakandriana...) afin d'établir, au final, une cartographie sur la biodiversité des souches de *R. solanacearum* présentes.

Dans le dessein de construire une cartographie diversifiée de la distribution des différents phylotype/sequevars, il est indispensable de disposer de souches isolées d'autres Solanées maraîchères et d'autres hôtes (adventices, haricot, tabac, géranium...), qui viendront enrichir la collection. Ces ressources vont servir les futures études d'évolution bactérienne, de génomique comparative, de résistance dans la lutte intégrée du flétrissement bactérien.

Par ailleurs, l'étude sur la sélection d'antagonistes a révélé que 16 souches Actinomycètes telluriques, 4 souches d'Actinomycètes endophytes et 2 souches bactériennes de *Pseudomonas* fluorescents présentent des effets antagonistes contre 33 souches de *R solanacearum* du phylotype II. Pour compléter cette étude préliminaire, l'évaluation *in-vivo* des effets antagonistes contre *R solanacearum* du phylotype II de ces souches s'avère indispensable en vue de la mise au point d'agent de lutte biologique.

Sur l'aspect capitalisation-valorisation, outre la thèse de doctorat et les deux mémoires de DEA, une publication scientifique de rang A sur l'étude de la diversité génétique des souches de *R solanacearum* et 2 articles originaux se rapportant à la recherche d'antagonistes à *R solanacearum* et à l'étude de l'impact de la diversité entomofaunique dans la transmission de *R solanacearum* seront prochainement soumis : [(i) Telluric and endophytic actinomycete isolation from healthy potatoes and antimicrobial activity against *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of potato bacterial wilt in the Vakinankaratra region, Madagascar (African

Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development] ; (ii) Effects of insect diversity on the transmission of *Ralstonia solanacearum* to potatoes in the region of Vakinankaratra, Madagascar (Journal of Crop Protection).

## BILAN TECHNIQUE

Indicateurs	Unité	Prévision	Début projet au 30 Septembre 13	Réalisation au 30 Septembre 13 (%)	Observation
<b>1 : Diversité génétique et phylotypique des souches de <i>Ralstonia solanacearum</i></b>					
Prélèvement échantillons de plants et de sol	nb	140	918	655,71	
Isolement et caractérisation biochimique (test catalase, KOH, test de fluorescence, test biovar)	nb	450	854	189,78	
Analyse Multiplex-PCR	nb	200	854	427,00	
Formations sur PCR	nb	1	1	100,00	
<b>2 : <u>Essais de lutte intégrée de la bactériose de la pomme de terre</u></b>					
Test d'amendement organique du sol	nb	8	2	25,00	limité par la disponibilité de biomasse de légumineuse de couverture
Test NCM ELISA sur sous-échantillons tubercule semence	nb	600	600	100,00	
Test DAS- ELISA sur sous-échantillons de sol	nb	500	500	100,00	
Test d'antagonisme contre les souches de <i>R. solanacearum</i>	%	4	22	50,00	test in-vitro
<b>3- <u>Indicateurs d'effets directs</u></b>					
Agriculteurs participants aux expérimentations	Nb	4	5	125,00	test en milieu réel et échantillonnage tubercule-semence
Etudiants formés (act. 1)	Nb	2	4	200,00	
Thèse de doctorat	Nb	1	1	100,00	en première année
Mémoire de DEA	Nb	2	2	100,00	soutenance prévue en octobre 2013 et février 2014
Publications scientifiques à comité de lecture	Nb	1	3	300,00	01 article prévu de soumission en novembre 2013

## BILAN FINANCIER

### Récapitulatif dépenses selon budget

Désignation	Budget (Ar)	Dépenses (Ar) au 26/04/2013	Dépenses (Ar) du 27/04 au 30/09/2013	TOTAL (Ar)	% par rapport à la prévision
Personnel non permanent					
Missions, mobilité des équipes	15 405 405,41	8 432 528,00	6 063 600,00	14 496 128,00	94,10
Stages	540 540,54	189 162,00	377 300,00	566 462,00	104,80
Formation courte et sous-traitance extérieure	14 054 054,05	13 226 099,80	1 885 500,00	15 111 599,80	107,52
Equipements	11 351 351,35	0,00	11 588 000,00	11 588 000,00	102,08
Fonctionnement	10 270 270,27	8 835 219,95	471 450,00	9 306 669,95	90,62
Frais de gestion	2 432 432,43		2 432 432,43	2 432 432,43	100,00
<b>TOTAL</b>	<b>54 054 054,06</b>	<b>30 683 009,75</b>	<b>22 818 282,43</b>	<b>53 501 292,18</b>	<b>98,98</b>

### Facturier dépenses

N° Pièces	Dates	Imputation	Désignation	Montant
1	17/10/2012	Missions, mobilité des équipes	Per diem	260 000,00
2	17/12/2010		Carburant	260 160,00
3	27/03/2013		Mission prélèvement à Vakinankaratra	493 000,00
4	22/04/2013		Participation aux réunions	487 500,00
5	27/09/2012		Carburant	100 000,00
6	29/09/2012		Per diem	520 000,00
7	05/11/2012		Carburant	100 000,00
8	09/11/2012		Per diem	565 000,00
9	14/03/2013		Achat essence	100 000,00
10	22/04/2013		Achat essence	100 000,00
11	13/03/2013		Indemnité	460 000,00
12	22/04/2013		Indemnité	460 000,00
13	15/11/2012		Carburant	100 000,00
14	19/04/2013		Dépenses suivi à A/be	470 000,00
15	23/11/2012		OM n°3735	26 250,00
16	23/11/2012		OM n°3736	22 500,00
17	30/11/2012		OM n°3738	22 500,00
18	12/12/2012		Achat gas oil 9941 TAC	54 600,00
19	14/12/2012		OM n°4032	2 750,00
20	14/12/2012		OM n°4034	3 250,00
21			OM n°2234	18 750,00
22	17/12/2012		OM n° 2233	26 250,00
23	17/10/2012-16/11/2012		Gas oil sur divers OM (N°1791, 4282, 3958, 3707, 3709)	386 568,00

24	11/01/2013	OM n°4969	3 250,00
25	03/01/2013	Frais taxe de visa de séjour Mme Santatra	287 000,00
26	11/01/2013	Plantation essai pomme de terre	6 000,00
27	29/01/2013	OM n°3590	18 750,00
28	29/01/2013	OM n°3589	22 500,00
29	12/02/2013	OM n°3592	2 750,00
30	12/02/2013	OM n°3593	2 750,00
31	22/02/2013	OM n°3600	2 750,00
32	22/02/2013	OM n°3599	3 250,00
33	28/02/2013	OM n°3898	2 750,00
34	28/02/2013	OM n°3897	3 250,00
35	05/03/2013	OM n°1946	3 000,00
36	04/03/2013	OM n°1942	6 000,00
37	04/03/2013	OM n°1943	6 000,00
38	01/03 au 05/03/2013	OM n°1936-1940-1945	13 000,00
39	06/03/2013	OM n°4703	82 500,00
40	19/03/2013	OM n°4409	3 000,00
41	20/03/2013	OM n°4417	2 750,00
42	22/03/2013	OM n°4419	5 500,00
43	22/03/2013	OM n°4421	6 000,00
44	22/03/2013	OM n°4420	6 000,00
45	26/03/2013	Location voiture n°110/13	1 387 200,00
46	27/03/2013	OM n°4425	3 000,00
47	01/02/2013	OM n°3714	22 500,00
48	05/04/2013	OM n°4432	3 000,00
49	05/04/2013	OM n°4433	3 000,00
50	12/04/2013	Location voiture n°161/13	430 800,00
51	08/04/2013	OM n°4436	3 000,00
52	11/04/2013	OM n°4450	3 000,00
53	10/04/2013	OM n°4447	6 000,00
54	09/04-10/04/2013	OM n°4445 et 4448	11 000,00
55	09/04/2013	OM n°4444	6 000,00
56	08/04/2013	OM n°4441	5 500,00
57	15/03 au 06/04/2013	OM n°4406 et 4424	5 500,00
58	06/04/2013	OM n°4437	3 000,00
59	15/03/2013	OM 4405	3 250,00
60	04/04/2013	Carburant pour 6918 TAL	6 800,00
61	17/04/2013	OM n°4540	3 000,00
62	24/04/2013	Location voiture n°204/13	805 200,00
63	05/04 au 17/04/2013	OM n°4431 et 4541	6 500,00
64	20/03/ au 09/04/2013	OM n°4446,4434,4416,1941	18 250,00

65	15/03/2013	Location voiture OM N°4405	169 200,00
66	27/06/2013	Location voiture N°663 (OM N°3275)	48 000,00
67	11/09/2013	OM N°3235	22 500,00
68	25/04/2013	OM N°3256	3 000,00
69	02/05/2013	OM N°1953	91 250,00
70	30/04/2013	OM N°3418	26 250,00
71	25/07/2013	OM N°4790	3 000,00
72	26/07/2013	OM N°4793	3 000,00
73	27/06/2013	Location voiture facture N°381 (OM N°4582)	660 000,00
74	03/04/2013	achat essence moto	12 000,00
75	11/09/2013	OM N°3234	26 250,00
76	07/05/2013	OM N°3426	26 250,00
77	03/07/2013	OM N°3076	22 500,00
78	25/07/2013	OM N°4792	2 250,00
79	13/06/2013	OM N°3277	3 000,00
80	14/08/2013	OM N°4799	22 500,00
81	13/06/2013	OM N°3276	3 000,00
82	01/08/2013	Location voiture N°499 (OM N°3075-4793-4790)	777 600,00
83	25/04/2013	OM N° 3257	3 000,00
84	25/04/2013	OM N° 3255	3 250,00
85	02/05/2013	OM N° 4459	2 750,00
86	14/08/2013	OM N° 4800	15 000,00
87	05/09/2013	Location voiture N°589 (OM N°4799)	432 000,00
88	02/05/2013	OM N° 1955	22 500,00
89	30/04/2013	OM N°3417	22 500,00
90	03/07/2013	OM N° 3074	33 750,00
91	07/05/2013	OM N° 3427	22 500,00
92	30/04/2013	OM N° 3419	22 500,00
93	02/05/2013	achat gasoil	136 500,00
94	11/09/2013	OM N° 3236	18 750,00
95	02/05/2013	OM N°1954	22 500,00
96	07/05/2013	OM N° 3428	18 750,00
97	02/05/2013	OM N° 4460	2 250,00
98	03/07/2013	OM N° 3075	15 000,00
99	13/06/2013	OM N° 3275	3 250,00
100	21/05/2013	Location voiture N°274 (OM N° 3255-3418-1955-1952-4458-3426)	2 436 000,00
101	02/05/2013	OM N° 4458	3 000,00
102	22/05/2013	OM N° 4582	15 000,00
103	30/04/2013	OM N° 3420	18 750,00
104	02/05/2013	OM N° 1956	18 750,00
105	02/05/2013	OM N° 1952	82 500,00

106	26/07/2013		OM N° 4794	3 000,00
107	20/06/2013		OM N°3056	22 500,00
108	10/07/2013		OM N°3085	15 000,00
109	04-05/04/2013		Suivi des activités (Parrain scientifique)	550 000,00
110	26/09/2013		carburant équipe CNRE atelier de restitution	200 000,00
111	26/09/2013		carburant équipe Biochimie atelier de restitution	150 000,00
112	12/04/2013	Stages	Indemnité stagiaire	81 162,00
113	27/11/2012		Indemnité stagiaire	108 000,00
114	27/09/2013		Indemnité stagiaire	90 800,00
115	24/07/2013		Indemnité stagiaire	143 250,00
116	23/09/2013		Indemnité stagiaire	143 250,00
117	09/10/2012		Achat boîtes de Pétri	1 313 400,00
118	10/01/2013		Achat petits matériels et consommables	128 080,00
119	12/04/2013		Achat milieux de culture	1 861 320,00
120	04/10/2012		Fourniture de bureau	404 600,00
121	04/12/2012		Communication	15 000,00
122	05/11/2012		Idemnité stage	20 000,00
123	11/2012-01/2013		Indemnité stage	119 998,00
124	14/03/2013		Achat recharge carte Airtel et orange	10 000,00
125	13/03/2013		Achat flacon	39 600,00
126	26/03/2013		Gaz 6kg	37 500,00
127	26/03/2013		Foruniture labo (papier alu, eau de javel	48 700,00
128	05/11/2012		Achat produits chimiques labo	676 400,00
129	05/11/2012		Achat produits chimiques labo	1 180 651,00
130	22/11/2012		Achat eau vive PM	9 600,00
131	19/11/2012		Feasuring tape	17 500,00
132	29/11/2012	Diverses fournitures pour labo	55 180,00	
133	22/03/2013	Honoraire stagiaires de travaux microbio	40 200,00	
134	03/04/2013	Achat semences pomme de terre	450 000,00	
135	12/04/2013	Fact Technique et Précision n°4727 et 4476	88 200,00	
136	10/04/2013	Facture CIP n°13/13 (Kits)	2 135 766,95	
137	25/04/2013	état de dépense pause café	23 324,00	
138	19/02/2013	Achat consommables labo	160 200,00	
139	14/08/2013	photocopies et scan	3 000,00	

140	07/05/2013		achat gaine plastique noir (20c et 25c)	16 000,00
141	07/05/2013		achat semences pomme de terre	9 750,00
142	30/09/2013		Encre noir/rame de papier A4 pour mémoire de DEA	112 000,00
143	30/09/2013		Achat petits matériels et consommables	195 700,00
144	25/09/2013		Rame papier A4	40 000,00
145	25/09/2013		Encre pour imprimante HP	40 000,00
146	25/09/2013		Crédit de communication	10 000,00
147	25/09/2013		Crédit de communication	45 000,00
148	04/2013	Formation courte et sous-traitance extérieure	analyse et formation sur la caractérisation moléculaire des souches	13 226 099,80
149	27/09/2013		Atelier de restitution finale	1 885 500,00
150	30/09/2013	Equipement	achat spectrophotomètre	9 243 000,00
151	27/09/2013		achat lampe UV pour hotte à flux laminaire	1 800 000,00
152	24/09/2013		achat imprimante multifonction Canon	280 000,00
153	25/09/2013		appareil photo numérique	265 000,00
154	30/09/2013	Frais de gestion	Frais administratif	2 432 432,43
TOTAL				<b>53 501 292,18</b>

# ANNEXES

FICHE D'INFORMATION		N°	
Date : /04/2013	1. Site de prélèvement		
	Type :	<input type="checkbox"/> Tanety <input type="checkbox"/> parcelle irriguée <input type="checkbox"/> rizière <input type="checkbox"/> baiboho	
Nom du collecteur :	Village :		
	Fokontany :		
Nom du paysan :	Commune :		
	District :		
	Coordonnées GPS :	E	S T°
2. Hôte	3. Etat sanitaire		
<input type="checkbox"/> pomme de terre	Surface parcelle :		
nom variété :	Incidence :	%	I Nb de plants infectés:
	Sévérité :		
	Distribution :	<input type="checkbox"/> ponctuel <input type="checkbox"/> dispersé <input type="checkbox"/> très répandu	
Stade de végétation :	Matériel prélevé :	4. Historique de la parcelle	
<input type="checkbox"/> Elongation	<input type="checkbox"/> Tige	Précédent cultural :	
<input type="checkbox"/> Floraison			
<input type="checkbox"/> Maturation	<input type="checkbox"/> Tubercule	Antécédent % au BW :	
<input type="checkbox"/> Récolte			
<input type="checkbox"/> autre hôte :	Matériel prélevé :	Ampleur de la maladie 2013 :	
5. Données sur la parcelle			
Culture sur parcelles voisines :	Ampleur % années précédentes :		
E :			
W :	6. Semences		
	Origine :	<input type="checkbox"/> marché <input type="checkbox"/> FIFAMANOR <input type="checkbox"/> own	
S :	<input type="checkbox"/> CMS <input type="checkbox"/> FERT <input type="checkbox"/> autre :		
O :	Nom variétés cultivées (diversité) et résistance respective au BW :		
	1.	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T	4. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T
	2.	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T	5. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T
	3.	<input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T	6. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T
7. Pratique culturale			
Adventices présentes (non malgache):	Semence :	<input type="checkbox"/> entier <input type="checkbox"/> tranchée	
1.	Technique :	<input type="checkbox"/> poquet <input type="checkbox"/> billon	
2.	Fertilisation :	<input type="checkbox"/> fumier <input type="checkbox"/> compost	
3.	<input type="checkbox"/> NPK	<input type="checkbox"/> Dolomie	
4.	Fertilité du sol : <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> MO moyen <input type="checkbox"/> MO	<input type="checkbox"/> Buttage <input type="checkbox"/> sarclage	
Type de sol :	<input type="checkbox"/> Défanage		
	traitements chimiques: <input type="checkbox"/> dithane <input type="checkbox"/> Autres		
Alimentation en eau :	<input type="checkbox"/> nématode <input type="checkbox"/> herbicide		
<input type="checkbox"/> irrigation <input type="checkbox"/> pluie <input type="checkbox"/> eau de capillarité	<input type="checkbox"/> monoculture <input type="checkbox"/> rotation .....		
8. ITINERAIRE CULTURAL (cycles sur 5 ans)			
1 :	2 :	3 :	4 :
6 :	7 :	8 :	9 :
			10 :
9. INFO SUPPLEMENTAIRES			
♦ Depuis quand le BW a été observée dans la parcelle/village? (moment exact d'apparition de la maladie)			
♦ A quel moment le flétrissement bactérien commence-t-il à être visible, est-il le plus important?			
stade de végétation :			
conditions climatiques :			
saison :			
pratique culturale/agronomique :			
♦ Exsite t-il des pratiques culturales pour contrôler le BW? Efficacité de contrôle?			
♦ Après rotation, est-ce que le BW réapparaît?			
♦ Après une rotation, reprenez-vous la même variété de pomme de terre?			
♦ Effets de la maladie (% de pertes) / évaluation des impacts socioéconomiques			
♦ Y a-t-il des effets du BW sur les cultures qui suivent dans le cadre des rotations?			
♦ Dynamique spatiale et temporelle du BW, appréciation des paysans par rapport au temps, espace (évolution)			
♦ Autres maladies dans la parcelle? (mildiou? Synergie?)			

FICHE DE PRESENCE (Atelier de restitution Projet Ralstonia) (27 Septembre 2013)

N°	Nom et Prénom	Institution/Organisme	Emargement
1	RAKOTOMAHINA	ACS Plate Forme Poussin de Terre	
2	RASOLONIRINA Lia Tina	Tsentsara Conseillers	Rasolonirina Lia
3	RANDRIANISALOM Radia	FIFANANOR	
4	RASOANADWO Zarahisa	COB MEVA Androka	
5	RADONIRIVONY Davidin Jaany	COF Femmanana Aha KO PERATON VMOVVO	
6	RANDRETSIVE Ry Alfred	PE Kooperative MEVA Famavulu Famulu	
7	RANDRIANKOLO Louis	PE Kooperative MEVA Famavulu Famulu	
8	RANDRINILIA Nivobona	Filoha cooptanambon Antakaraha Mandritana Befato	
9	Rasoamanairo Emilienne	KP amankitsoa Trasorankabaha	Emilienne
10	Razamachasa Clairette	FANIVEVA SOA Tredovikmanandora	Clairette
11	Ralamboharisoa Fabrice	CITE ADO	
12	RAZAFITSALANA Marie Blange	SADP / DSR Vakankabaha	
13	Ruchanfar Husei	Projet PATERUR	
14	RODRIGANIRIVONY Jean Marc	FIFANANOR	
15	ANDRIANARISOA Blaudin	Chf de Laboratoire Biotechnologie Parain scientifique	Andriana Fac Sciences
16	RANDRIANAO Philibert Zoharia	PE Ombon d'Acces Vadonana amandora	
17	RAVELOSON Haringaka	SRP du MOIPA Antarabe	
18	RAUTOARIMANGA N. Sima	CNRE Antananarivo	
19	RASOLOMANANTANINA Rado	CNRE Antananarivo	
20	ANDRIAMBELOSON Onja	CNRE Antananarivo	
21	RAZANANANPANOHA Vidiane	PE FIMPANA FANANTANINA	
22	RASOINANANA Nodinesterina	CEFFEL Antsirabe	
23	Andrin RAZAFINDRAWATO	CEFFEL	
24	RAMILITIANA Aina	FEDA Vak.	
25	RAVAOMANARIVO Lela	Univ. Tane	Ravaomanarivo
26	RAZAFINDRANINA H.A	Univ. Tane	

27. RASOBA Nodine  
28. RAHETUAH Voloban  
29. RAJAONERA Taha Ernest

FIFANANOR  
FIFANANOR  
Fac Sciences  
Dpt entomologie