



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
DOMAINE : SCIENCES ET TECHNOLOGIE
ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT
SPECIALITE : BIOTECHNOLOGIE

THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Adaptation des populations de *Magnaporthe oryzae* à une variété de riz pluvial (*Oryza sativa*) partiellement résistante et facteurs contribuant à l'initiation de la pyriculariose dans les Hautes Terres de Madagascar

Présenté par Harinjaka RAVELOSON

Soutenu publiquement le 28 septembre 2018

Devant les membres du Jury composés de :

Président :	Madame Bakolimalala RAKOUTH, Professeur
Directeur de Thèse :	Madame Isabelle RATSIMALA RAMONTA, Professeur titulaire
Co-directeur de Thèse :	Monsieur Didier THARREAU, Docteur HDR
Rapporteur interne :	Madame Lala Harivelo RAVAOMANARIVO RAVELOSON, Professeur
Rapporteur externe :	Monsieur Pascal FREY, Docteur HDR
Examineur :	Monsieur Rado RASOLOMAMPIANINA, Professeur
Membre invité (encadrante) :	Madame Mathilde SESTER, Docteur



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
DOMAINE : SCIENCES ET TECHNOLOGIE
ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT
SPECIALITE : BIOTECHNOLOGIE

THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

**Adaptation des populations de *Magnaporthe oryzae* à une
variété de riz pluvial (*Oryza sativa*) partiellement
résistante et facteurs contribuant à l'initiation de la
pyriculariose dans les Hautes Terres de Madagascar**

Présenté par Harinjaka RAVELOSON

Soutenu publiquement le 28 septembre 2018

Devant les membres du Jury composés de :

Président :	Madame Bakolimalala RAKOUTH, Professeur
Directeur de Thèse :	Madame Isabelle RATSIMALA RAMONTA, Professeur titulaire
Co-directeur de Thèse :	Monsieur Didier THARREAU, Docteur HDR
Rapporteur interne :	Madame Lala Harivelo RAVAOMANARIVO RAVELOSON, Professeur
Rapporteur externe :	Monsieur Pascal FREY, Docteur HDR
Examineur :	Monsieur Rado RASOLOMAMPIANINA, Professeur
Membre invité (encadrante) :	Madame Mathilde SESTER, Docteur

«N'aie pas peur maintenant, car Je suis avec toi. Ne lance pas ces regards inquiets, car ton Dieu, c'est moi. Je viens te rendre courage, J'arrive à ton secours et je te protège ma main droite tient sa promesse. Oui, honte et déshonneur à tous ceux qui t'en veulent !» ÉSAÏE 41, 10-11

Remerciements

Cette thèse n'aurait pu venir à terme sans le concours de plusieurs personnes, différentes institutions ainsi que l'action des bailleurs de fonds.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Madame Bakolimalala RAKOUTH, Professeur à l'Université d'Antananarivo d'avoir bien voulu présider cette soutenance de thèse.

Je remercie également Madame Isabelle RATSIMIALA RAMONTA, Professeur Titulaire à l'Université d'Antananarivo, mon Directeur de thèse, de m'avoir encadré, encouragé et soutenu dès le début jusqu'à la réalisation de cette thèse.

J'adresse mes vifs remerciements particulièrement à Monsieur Didier THARREAU, Chercheur au Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement UMR BGPI de Montpellier, mon Co-directeur de thèse pour son soutien, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils au cours de la rédaction de mes articles, mon manuscrit de thèse, la recherche de financements qui m'ont permis de réaliser cette thèse et surtout de m'avoir accueilli chaleureusement au sein du laboratoire de l'UMR BGPI.

Tous mes remerciements, à Madame Lala Harivelo RAVAOMANARIVO RAVELOSON, Professeur à l'Université d'Antananarivo et à Monsieur Pascal FREY, Directeur de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique UMR IAM de Lorraine pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse.

Je désire aussi remercier Monsieur Rado RASOLOMAMPIANINA, Professeur au Centre National de Recherches sur l'Environnement d'Antananarivo, pour avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Un grand merci à Madame Mathilde SESTER, Chercheur à l'UR AÏDA CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) Montpellier, mon encadrante de thèse, pour son aide et ses conseils sur la conception des dispositifs expérimentaux, sur l'analyse et sur la valorisation des résultats. J'ai eu beaucoup de chance d'avoir travaillé et réalisé cette thèse avec toi. *Misaotra indrindra.*

Je suis très reconnaissant envers les membres de mon comité de thèse : Christian LANNOU, Christian CILAS, Alain RAMANANTSOANIRINA et François-Régis GOEBEL. Merci vivement de votre disponibilité, vos instructions et de vos critiques constructives.

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans l'appui des personnes suivantes : Natolotra RAKOTONANAHARY (FOFIFA CRR, Antsirabe), Henri ADREIT, Joëlle MILLAZO et Christophe TERTOIS (CIRAD UMR BGPI, Montpellier). Merci beaucoup pour votre aide qui m'a été précieuse. Un grand merci aux Chefs *Fokontany*, aux techniciens de CSA et à tous les paysans des six villages suivis pour leur collaboration et facilitation face à mes travaux de terrain.

J'aimerais également remercier tous mes collègues au FOFIFA (en particulier au CRR Antsirabe), l'équipe de l'UMR BGPI (en particulier l'équipe 5) et l'équipe Carabe de l'UR AÏDA à Montpellier, l'équipe de l'école doctorale SVE et d'accueil (Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo) et tous mes collègues au dP/SPAD (en particulier les thésards) de Madagascar.

Merci à toutes les personnes qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de ce travail que je n'arriverais pas à citer ici : de m'avoir fourni d'importantes informations, et pour leur accueil chaleureux durant mes déplacements à l'étranger (préparation de séjour et accommodation).

Je remercie profondément ma famille et mes amis pour leurs appuis surtout dans les moments rudes.

Ma reconnaissance va également aux institutions et aux bailleurs de fonds, en me fournissant des biens matériels et financiers : Fondation Internationale pour la Science (IFS), la bourse m'a permis d'obtenir des équipements indispensables à l'isolement de l'agent pathogène et de faire le suivi de la maladie sur terrain. La bourse du Gouvernement Français (BGF SCAC Coopération Franco-Malgache) a assuré mes deux voyages et mes séjours à Montpellier pour l'analyse moléculaire. Le Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement via l'Action Incitative N°1 pour les doctorants du Sud a beaucoup contribué dans la réalisation de ce travail (logiciel, voyage aux Philippines : 7th International Rice Blast Conference et fonctionnement). Je n'oublie pas non plus l'appui du dP/SPAD et des différents projets (GARP, CRP-RICE etc.).

Enfin, je dédie cette thèse à ma femme, Tojo et à mes deux filles, Valisoa et Fanilo pour leur amour, leur sacrifice et surtout leur compréhension.

Table de matières

	Pages
Table de matières	i
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des annexes	vii
Acronymes	viii
Glossaire	x
Introduction générale	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique et positionnement de la thèse	
I.1. Les résistances des plantes aux maladies	3
I.1.1. Différentes formes de résistance.....	3
I.1.2. Bases moléculaires de résistances des plantes.....	6
I.2. Contournement des résistances des plantes.....	8
I.2.1. Définition et exemples	8
I.2.2. Facteurs expliquant le contournement des résistances.....	9
I.2.3. Durabilité de la résistance quantitative	11
I.3. Gestion des résistances.....	12
I.3.1. Combinaison de résistances qualitative et quantitative.....	12
I.3.2. Rotation de gènes de résistance dans le temps	13
I.3.3. Pyramidage de gènes de résistance	13
I.3.4. Mélanges de variétés et multi-lignées.....	14
I.3.5. Déploiement de gènes de résistance à l'échelle du paysage	15
I.4. Description du pathosystème <i>Oryza sativa-Magnaporthe oryzae</i>	15
I.4.1. Le riz, une plante d'intérêt agronomique majeur	15
I.4.2. La pyriculariose du riz	16
I.4.3. Résistance du riz à la pyriculariose.....	22
I.5. Positionnement de la thèse et problématique de la recherche	28
I.5.1. Le riz à Madagascar	28

I.5.2.	La pyriculariose du riz à Madagascar	33
I.5.3.	Justification de la thèse	36
I.5.4.	Objectifs de la thèse	36
Chapitre II.	Evolution des épidémies de pyriculariose sur le riz pluvial des Hautes Terres.	
II.1.	Introduction	38
II.2.	Matériels et Méthodes	39
II.2.1.	Présentation du lieu d'étude	39
II.2.2.	Suivis des épidémies de pyriculariose	41
II.3.	Résultats	43
II.3.1.	Enquêtes de groupe	43
II.3.2.	Enquêtes individuelles	44
II.3.3.	Evolution d'attaque et de présence de la pyriculariose.....	46
II.4.	Discussion	48
II.5.	Conclusion partielle de la partie II.....	51
Chapitre III.	Effet de la résistance quantitative d'une variété de riz sur les populations de <i>Magnaporthe oryzae</i>	
III.1.	Introduction	52
III.2.	Matériel et méthodes.....	53
III.2.1.	Echantillonnage, isolement et conservation des populations de <i>Magnaporthe oryzae</i>	53
III.2.2.	Analyse moléculaire des souches de <i>Magnaporthe oryzae</i>	56
III.2.3.	Test phénotypique par inoculation artificielle.....	58
III.2.4.	Analyse statistique	60
III.3.	Résultats	61
III.3.1.	Populations de <i>Magnaporthe oryzae</i> échantillonnées.....	61
III.3.2.	Structure et diversité des populations de <i>Magnaporthe oryzae</i>	61
III.3.3.	Pouvoir pathogène des souches de <i>Magnaporthe oryzae</i>	67
III.4.	Discussion	73
III.5.	Conclusion partielle de la partie III	76

Chapitre IV. Caractérisation des sources d'inoculum	
IV.1. Survie à long terme de l'agent pathogène de la pyriculariose dans les résidus de riz infectés constituant la principale source d'inoculum primaire pour la riziculture pluviale d'altitude (<i>Article publié</i>)	78
IV.2. Importance relative des sources potentielles d'inoculum de <i>Magnaporthe oryzae</i> en riziculture pluviale de haute altitude à Madagascar (<i>Article soumis</i>)	88
IV.3. Le riz irrigué constitue-t-il une source d'inoculum pour le riz pluvial ?	110
IV.3.1. Introduction	110
IV.3.2. Matériels et méthodes	111
IV.3.3. Résultats	113
IV.3.4. Discussion	116
IV.4. Conclusion partielle de la partie IV	117
Chapitre V. Discussion générale	
V.1. Durabilité de la résistance de Chhomrong Dhan.	118
V.1.1. Comment se passe l'érosion de la résistance partielle d'une variété déployée massivement dans le temps et dans l'espace ?	118
V.1.2. Est-ce que des populations de <i>Magnaporthe oryzae</i> existantes sur les Hautes Terres sont déjà adaptées à la résistance quantitative de la variété Chhomrong Dhan ?	119
V.1.3. Intensification en engrais azoté et efficacité de la résistance de Chhomrong Dhan	121
V.2. Caractérisation des sources potentielles d'inoculum en riziculture pluviale	122
V.3. Recommandation pour les agriculteurs pratiquant la riziculture pluviale	124
Conclusion générale et perspectives	121
Références bibliographiques	123
Annexes	141
Abstract et Résumé	

Liste des figures

Figure1 : Exemple d'interaction compatible et incompatible entre le riz et <i>Magnaporthe oryzae</i>	4
Figure2 : Trois catégories de réponses des variétés d'orge face à une souche de <i>Puccinia hordei</i>	5
Figure3 : Vue générale des étapes de l'interaction plante-agent pathogène	7
Figure 4 : Symptômes de pyriculariose provoqués par <i>Magnaporthe oryzae</i>	17
Figure 5 : Processus d'infection de <i>Magnaporthe oryzae</i>	19
Figure 6 : Cycle épidémique de la pyriculariose au champ	20
Figure 7 : Localisation des effecteurs de <i>Magnaporthe oryzae</i> durant l'infection de la plante ...	26
Figure 8 : Classification des variétés de riz de Madagascar en trois groupes génétiques : <i>indica</i> , <i>japonica</i> et <i>atypique</i>	29
Figure 9 : Paysage de colline ou « <i>Tanety</i> », dominé par la pratique du riz pluvial à Mananetivohitra, Région du Vakinankaratra	31
Figure 10 : Distribution géographique des groupes génétiques de <i>Magnaporthe oryzae</i> : les populations de Madagascar appartiennent au groupe C, en bleu	34
Figure 11: Carte du relief et des zones climatiques de la région du Vakinankaratra	40
Figure 12: Parcelles témoin dans le site de Fiantsonana pour la campagne 2016	42
Figure 13 : Distribution géographique et présence des symptômes de pyriculariose sur Chhomrong Dhan dans les 6 sites suivis	48
Figure 14 : Etapes de traitement des souches de <i>Magnaporthe oryzae</i> durant l'analyse moléculaire et le test phénotypique	54
Figure 15 : Souches de <i>Magnaporthe oryzae</i> colonisant le papier filtre Whatmann	55
Figure 16 : Exemple d'électrophorégrammes des allèles de <i>Magnaporthe oryzae</i> différant par leur taille	57
Figure 17 : Bacs avec des plants de riz à tester	59
Figure 18 : Modèle d'échelle pour l'estimation de la surface des lésions	60
Figure 19 : Distribution en génotypes multilocus et en groupes clonaux de souches échantillonnées en riziculture pluviale sur les Hautes Terres	62
Figure 20 : Distribution en groupe clonaux (GC) des souches échantillonnées sur la variété Chhomrong Dhan sur les trois sites : Mananetivohitra, Fiantsonana et Andranomanelatra	66
Figure 21 : Distribution en groupe clonaux (GC) de souches échantillonnées sur la variété Chhomrong Dhan entre deux campagnes : 2015 et 2016	67

Figure 22 : Boîte à moustache pour les 4 composantes d'agressivité représentant la comparaison des populations de <i>Magnaporthe oryzae</i> échantillonnées sur Chhomrong Dhan et sur d'autres variétés	70
Figure 23 : Boîte à moustache représentant l'agressivité de 10 souches de <i>Magnaporthe oryzae</i> de la campagne 2015 et 10 souches de la campagne 2016 venant de Chhomrong Dhan sur le site de Fiantsonana inoculées sur deux variétés (ChD et Fofifa 154)	72
Figure 24 : Trois sites présentant des parcelles irriguées et pluviales proches	111
Figure 25 : Représentation de la mise en place de la variété Kasalath sur les 4 positions	112
Figure 26 : Distribution des groupes clonaux de <i>Magnaporthe oryzae</i> sur les trois sites en fonction de positions de collecte	115

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gènes clonés avec des effets partiels contribuant à la résistance quantitative chez les plantes	8
Tableau 2 : Gènes de résistance clonés et cartographiés et gènes d'avirulence du champignon pathogène correspondant	23
Tableau 3 : Récapitulatif des variétés de riz pluvial diffusées par FOFIFA-CIRAD pour les Hautes Terres	32
Tableau 4 : Informations sur les pratiques culturales pour la campagne 2014-2015.....	45
Tableau 5 : Fréquence des variétés de riz et de la rotation culturale sur les 20 parcelles par village	46
Tableau 6 : Nombre des parcelles présentant des symptômes de pyriculariose dans les six sites	47
Tableau 7 : Attaque de pyriculariose foliaire et paniculaire sur la variété ChD et F154	48
Tableau 8 : Description des populations de <i>Magnaporthe oryzae</i> isolées pour les campagnes 2015 et 2016	56
Tableau 9 : Distribution des populations de <i>Magnaporthe oryzae</i> en groupes clonaux avec les souches échantillonnées sur la variété Chhomrong Dhan et sur d'autres variétés	64
Tableau 10 : Analyse de variance des composantes d'agressivité avec 20 souches échantillonnées sur Chhomrong Dhan et 20 souches échantillonnées sur d'autres variétés en 2015	68
Tableau 11 : Description des populations de <i>Magnaporthe oryzae</i> utilisées dans la présente étude et niveau d'attaque de pyriculariose sur ces parcelles	114

Liste des annexes

Annexe 1 : Fiche variétale de Chhomrong Dhan

Annexe 2 : Etapes d'analyse moléculaire des souches de *Magnaporthe oryzae*

Annexe 3 : Résumé communication orale au 7th International Rice Blast Conference :
IRBC, Manille, Philippines du 09 au 13 Octobre 2016

Annexe 4 : Communication par poster 2^{ème} Edition des Doctoriales, Toliara, Madagascar du
13 au 17 Décembre 2016.

Acronymes

AA : Acide aminé
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AP : Appressorium
AVR : Avirulence
avr : Virulence
BAS : Biotrophy-associated secreted
BIC : Biotrophic Interface Complex
BS : Bare soil
ChD : Variété de riz Chhomrong Dhan
CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CRR : Centre Régional de Recherche
DEG : Diseased empty grains
DITER : Decreasing Inoculum Trial Evaluation of Rice
DP SPAD : Dispositif de recherche et d'enseignement en Partenariat sur les Systèmes de Production d'Altitude et Durabilité
DR : Diseased rice residues
DS : Diseased seeds
DSB : Diseased stem bases
DSF : Diseased seeds treated with fungicide azoxystrobin
DSS : Diseased seeds disinfected with sodium hypochlorite
EIHM : Extra-Invasive Hyphal Membrane
ETI : Effecteur-Triggered Immunity
f. sp. : Forma specialis
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture ou « Food and Agriculture Organization »
FOFIFA : Foibem-pirenena ho an'ny Fikarohana ampiarina ho Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra ou Centre national de la recherche appliqué au développement rural
GC : Groupe clonal
GFP : Green Fluorescent Protein
GI : Grains infectés
GWAS : Genome Wide Association Studies
HMA : Heavy Metal Associated
Kas: Kasalath
LARC : Lumle Regional Agriculture Research Centre
LRR : Leucine Rich Repeat
MAMP : Microbe Associated Molecular Patterns
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases
Mat : Mating type
MLG : Genotype multilocus
nbP : Nombre de panicules
nbPI : Nombre de panicules infectées

NBS : Nucleotide-Binding Site
nbT : Nombre de talles par poquet
nbTI : Nombre de talles infectés
ND : Non déterminé
NIS : « Nitrogen Induced Susceptibility »
PADR : Plan d'Action pour le Développement Rural
PAMP : « Pathogen Associated Molecular Patterns »
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PI : Parcelle irriguée
PIB : Produit Intérieur Brut
PM : Parcelle intermédiaire
pop : Population
PP: Parcelle pluviale
PR : Parcelle à proximité du pluvial
PRR : « Pattern Recognition Receptor »
PTI : « PAMP-Triggered Immunity »
PVY : Virus Y de la pomme de terre ou « Potato Virus Y »
QRL : « Quantitative resistance loci »
QTL : « Quantitative Trait Loci »
R : Résistance
RKS : « Resistance related Kinase »
ROS : Formes réactives de l'oxygène ou « Reactive Oxygen Species »
RYMV : « Rice Yellow Mottle Virus »
s : Sensible
SCV : Système de culture à couvert végétal
SDR : « Soil with diseased residues »
SFI : Surface foliaire infecté
SFP : Sévérité foliaire au niveau du poquet
SPD : « Suppressor of Plant cell Death »
SPP : Sévérité paniculaire au niveau poquet
SSR : « Simple Sequence Repeats »
SUR : « Soil with uninfected residues »
UMR BGPI : Unité mixte de recherche Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite
UPDR : Unité Politique de Développement Rural
US : « Uninfected seeds »

Glossaire

Agressivité : Composante quantitative non spécifique du pouvoir pathogène d'un parasite (cette notion d'agressivité est sous jacente à la notion de virulence et sa mesure se fait sur l'efficacité d'un agent pathogène à infecter, à coloniser son hôte et à se multiplier).

Avirulent : Incapacité d'un agent pathogène à infecter une certaine variété de plante ayant de gène de résistance majeur. Lorsque ce dernier reconnaisse les produits de gène d'avirulence, aucune maladie ne se développe c'est l'interaction incompatible.

Base de tige : Partie des plants de riz restant sur les parcelles après la récolte

Composantes d'agressivité : Paramètres du pouvoir pathogène de l'agent pathogène qui sont mesurés face à une résistance quantitative (nombre de lésions, surface de lésions et spores produites, etc.).

Conidie : Une spore asexuée d'un champignon qui est produite à partir d'une structure (conidiophore).

Contournement : C'est un phénomène observé sur la résistance qualitative dans lequel le gène de résistance est devenu inefficace vis-à-vis de certaines populations de l'agent pathogène.

Effecteurs : Ils sont des protéines sécrétées par les agents pathogènes qui leur permettent de manipuler des processus cellulaires de leur hôte tels que les défenses ou le métabolisme, et ainsi de promouvoir leur développement et celui de la maladie.

Erosion : Perte progressive de l'efficacité d'une résistance quantitative due à l'apparition des populations d'agent pathogène plus agressives.

Génotype : Ensemble des caractéristiques génétiques d'un individu

Génotype multilocus : Génotype déduit de la combinaison des allèles à différents loci.

Graines vides : Grains de riz non rempli durant la fructification à cause de la pyriculariose ou d'autres facteurs

Groupe clonal : Ensemble de génotypes différents par un petit nombre de mutations et supposés dériver d'un même génotype multilocus ancestral.

Inoculum : Formes d'agent pathogène qui arrivent au contact de leur hôte végétal et peut initier l'épidémie (pour le champignon : conidie, spore, mycélium etc.).

Pathotype : Phénotype de l'agent pathogène relatif à la virulence qualitative qui est déterminé à partir des variétés différentielles ayant des gènes de résistance différents.

Phénotype : Ensemble des caractères observables, apparents, d'un individu, d'un organisme dus aux facteurs héréditaires et aux modifications apportées par le milieu environnant.

Population : Ensemble des souches qui est échantillonné à partir d'une parcelle, d'une variété et d'un stade de développement (foliaire ou paniculaire).

Pouvoir pathogène : Aptitude à causer une maladie et peut être séparé en terme qualitative (virulence) et en terme quantitative (agressivité).

Pseudothecia : Ascocarpe (appareil fructifère chez les Ascomycètes) uninucléé qui ressemble à un périthèce.

Quantitative trait locus : Portion de chromosome incluant des gènes contribuant à l'expression d'un trait quantitative.

Résistance qualitative : Résistance qui a la capacité de bloquer entièrement certaines populations d'agent pathogène ayant de gène d'avirulence.

Résistance quantitative : Résistance qui ne bloque pas entièrement l'attaque d'agent pathogène mais elle a la capacité de réduire et de retarder le développement de la maladie.

Semences : Grains utilisés lors du semis

Sévérité de la maladie : Quantité et proportion de tissus végétaux infectés (feuilles, tiges, grains) sur une plante ou dans une parcelle

Souche : Individu de champignon obtenu à partir d'un isolement monospore (descendant d'une spore).

Tavelure : maladie fongique causée par *Venturia inaequalis* touchant les feuilles et les fruits des pommiers.

Transposon : Petit segment d'ADN capable de se déplacer d'une région de la molécule d'ADN à une autre région.

Virulence : Capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte.

Introduction générale

Le secteur agricole constitue une composante essentielle de l'économie malgache, en particulier dans la région des Hautes Terres centrales. Cependant, à cause de la diminution de la fertilité des sols, des attaques des bioagresseurs et des contraintes socio-économiques, la production agricole reste encore insuffisante. Dans les régions d'altitude, le dispositif en Partenariat Systèmes de Production d'Altitude et Durabilité à Madagascar (dP SPAD) développe un programme de recherches afin de permettre une augmentation de la production agricole dans les exploitations familiales des Hautes Terres malgaches, tout en préservant les ressources naturelles.

Dans les Hautes Terres de Madagascar, la riziculture pluviale a connu un développement extrêmement rapide grâce aux travaux de recherche menés par le Centre national malgache de recherche appliquée au développement rural (FOFIFA) et le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) depuis les années 1980. Ces travaux ont permis la création de variétés de riz pluvial tolérantes au froid adaptées aux conditions d'altitude (au-dessus de 1 300 m). Désormais, le riz pluvial fait partie intégrante du paysage et devient même par endroits dominant dans les systèmes de culture pluviaux (Raboin *et al.*, 2013). Cependant, la durabilité de cette riziculture pratiquée souvent par les agriculteurs sur des pentes fragiles, sans engrais ni pesticides, n'est pas assurée. Elle fait face à de nombreuses contraintes, notamment les maladies, les insectes, les mauvaises herbes, l'érosion et la baisse de la fertilité des sols.

La pyriculariose, causée par *Magnaporthe oryzae*, est une des contraintes majeures pour le riz pluvial. Cette maladie a contourné la résistance de la plupart des premières variétés de riz pluvial d'altitude diffusées dans les Hautes Terres. Pour faire face à l'importance croissante du problème de la pyriculariose. La création et la sélection des variétés se font désormais sous contraintes de pyriculariose pour sélectionner des variétés résistantes. Les mélanges de variétés ont été testés, ils réduisent la sévérité de la pyriculariose sur des variétés sensibles par rapport à leur culture pure (Raboin *et al.*, 2012 ; Raveloson *et al.*, 2016). La comparaison des attaques de pyriculariose sur des systèmes de culture montre que les parcelles avec de labour conventionnel sont plus attaquées par rapport aux parcelles en agriculture de conservation (Sester *et al.*, 2014 ; Dusserre *et al.*, 2017).

Depuis 2006, une seule variété, Chhomrong Dhan (ChD) domine le paysage de la riziculture pluviale sur les Hautes Terres. Le succès de ChD est expliqué par sa productivité même sur des sols peu fertiles (Raboin *et al.*, 2014). ChD est reconnue comme une variété ayant une bonne résistance quantitative à la pyriculariose. Généralement, la résistance d'une variété de riz devient inefficace lorsque cette variété est déployée à une grande échelle.

Même si l'érosion d'une résistance quantitative sur le terrain est peu documentée, des études ont montré des cas d'adaptation des populations de l'agent pathogène devenues plus agressives sur ce type de résistance (Delmotte *et al.*, 2014 ; Caffier *et al.*, 2016 ; Gent *et al.*, 2017). De ce fait, le déploiement massif de ChD et son homogénéité dans le paysage des Hautes Terres pourraient augmenter les risques d'apparition de populations de *M. oryzae* plus agressives et leur propagation rapide ce qui aurait de graves conséquences sur la production de riz pluvial et la sécurité alimentaire des paysans dans cette région.

Après un état de l'art basé sur une étude bibliographique, le manuscrit de thèse traite trois volets complémentaires. Tout d'abord, la surveillance de l'épidémie de pyriculariose sur ChD a été réalisée. Ensuite, l'évolution des populations de *M. oryzae* de la région avant et après le déploiement a été évaluée en conduisant de tests phénotypiques et d'analyse moléculaire. Et enfin, les sources potentielles d'inoculum qui devraient être gérées en cas d'adaptation de *M. oryzae* sur ChD, ont été caractérisées.

Chapitre I. Synthèse bibliographique et positionnement de la thèse

I.1. Les résistances des plantes aux maladies

I.1.1. Différentes formes de résistance

Les plantes vivent et interagissent avec un grand nombre d'autres espèces (incluant virus, bactéries et champignons) au sein de leurs écosystèmes. Ces interactions peuvent présenter des bénéfices (cas des rhizobactéries et des mycorhizes) ou des coûts (cas des agents pathogènes). Les plantes ont développé des stratégies pour favoriser les interactions bénéfiques et pour se défendre contre les agents pathogènes.

a. *Les résistances non hôte et hôte*

Les différences et les similarités entre résistances non hôtes et hôtes ont été développées par Gill *et al.* (2015). La résistance non hôte des plantes est définie par le fait que tous les individus de l'espèce sont résistants à toutes les populations de l'agent pathogène (Heath, 2000).

La résistance hôte est la capacité de la plante hôte à se défendre face à une partie des individus d'une espèce d'agent pathogène. Deux catégories de résistances hôte sont classiquement décrites chez les plantes : qualitative et quantitative.

b. *La résistance qualitative*

La résistance qualitative est définie sur la base du phénotype : c'est une résistance tout ou rien. Elle est généralement spécifique, c'est-à-dire efficace vis-à-vis d'une partie de la population de l'agent pathogène. C'est généralement à partir de résistances qualitatives que des interactions gène pour gène sont identifiées entre l'agent pathogène et sa plante hôte (Flor, 1971 ; Dodds et Thrall, 2011). La présence d'un gène majeur de résistance (R) dans la plante et d'un gène dit d'avirulence (AVR) dans l'agent pathogène entraîne une interaction dite incompatible et un phénotype de résistance de la plante. Par contre, l'absence de gène R ou de gène AVR ou des deux provoque une interaction dite compatible et la plante est alors sensible (figure 1).

La résistance qualitative est complète, avec un phénotype simple à détecter (absence de maladie), intéressante économiquement et fortement héritable (en général monogénique et dominante). Pour ces raisons, la sélection de variétés ayant ce type de résistance et le transfert de gènes R dans des variétés sensibles sont privilégiés dans les programmes d'amélioration variétale. Les exemples d'utilisation des résistances qualitatives pour contrôler les maladies

des plantes sont nombreux dans différents pathosystèmes. Bien que ces résistances qualitatives soient localement et transitoirement très efficaces (McDonald et Linde, 2002a), elles présentent des limites dans la protection des cultures : elles sont peu durables dans certains pathosystèmes, surtout avec les agents pathogènes ayant un fort potentiel d'évolution, et non disponibles pour certains pathosystèmes (Poland *et al.*, 2009).

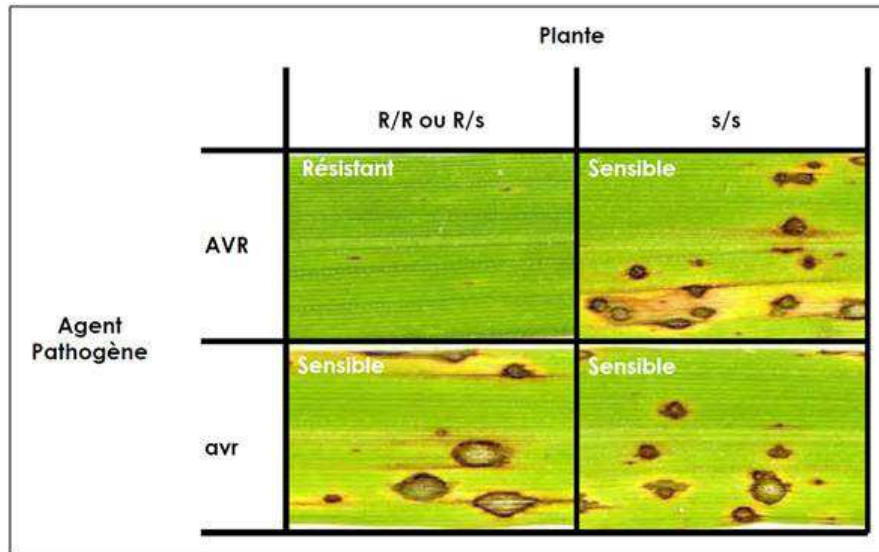


Figure 1 : Exemple d'interaction compatible et incompatible entre le riz et *Magnaporthe oryzae* :

L'expression concomitante des allèles dominants du gène de résistance (R) chez la plante et de la protéine d'avirulence (AVR) chez le pathogène entraîne une interaction incompatible, et un phénotype de résistance de la plante. Toute autre combinaison allélique donne lieu à une interaction compatible (marquée par la présence des lésions) permettant le développement de la maladie. (Ballini, 2007).
 AVR : avirulent ; avr : virulent ; R : résistant et s : sensible.

c. *La résistance quantitative*

La résistance quantitative, ou partielle, ne permet pas de bloquer entièrement l'infection par des agents pathogènes mais elle peut provoquer une réduction de la sévérité des symptômes, de la vitesse de colonisation de la plante et de la multiplication des agents pathogènes (figure 2). Ce type de résistance entraîne alors un ralentissement de l'épidémie. L'expression de la résistance quantitative est influencée par des conditions environnementales (Lannou, 2012). Elle est dans la grande majorité des cas gouvernée par plusieurs gènes dont les effets sont cumulatifs (Schiff *et al.*, 2001). Ces gènes sont associés à des régions génomiques ou « quantitative trait loci » (QTLs), également nommées « quantitative resistance loci » (QRLs) (Young, 1996 ; St.Clair, 2010). La résistance quantitative est considérée comme ayant un large spectre d'action vis-à-vis de plusieurs isolats d'un agent pathogène. Cependant, des exemples existent de résistance quantitative qui

sont efficaces vis-à-vis de plusieurs espèces de champignons pathogènes (Ellis *et al.*, 2014). Par ailleurs, certains QTLs présentent une interaction spécifique avec certains isolats d'un même agent pathogène (Calenge *et al.*, 2004 ; Marcel *et al.*, 2008).

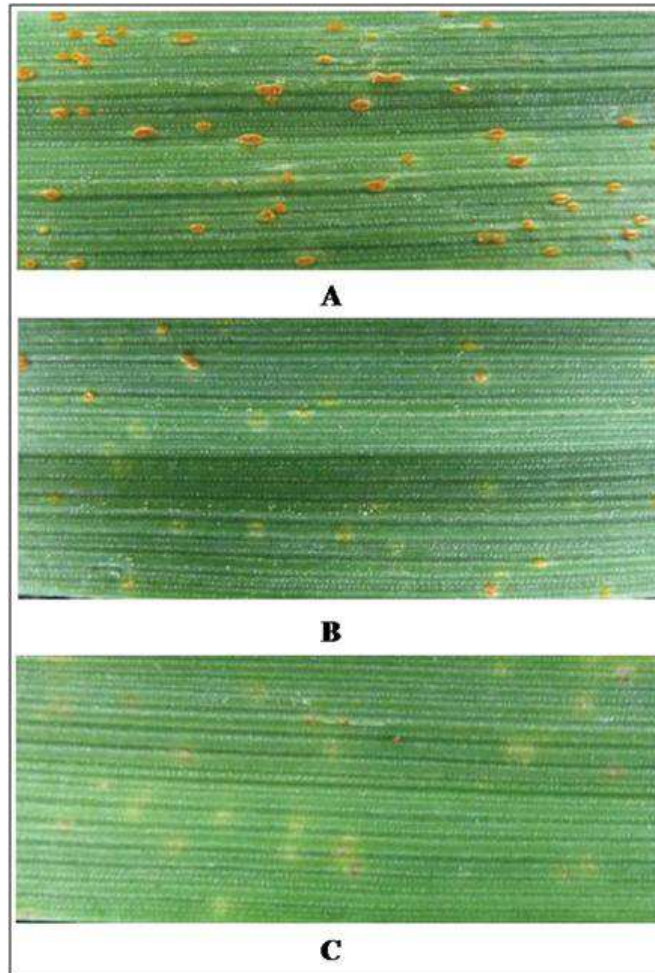


Figure 2 : Trois catégories de réponses des variétés d'orge face à une souche de *Puccinia hordei* :

A : variété L94 avec une réponse sensible, B : variété Vada ayant un niveau élevé de résistance quantitative avec une réduction du nombre d'infections et diminution du développement de l'agent pathogène et C : variété Cebada Capa montrant une résistance qualitative assurée par un gène majeur, Rph7g. Adapté de Niks *et al.* (2015).

La résistance quantitative n'a pas été autant utilisée volontairement en amélioration variétale que la résistance qualitative car la sélection de ce type de résistance s'avère difficile. Contrairement à la résistance qualitative qui confère seulement deux phénotypes (résistant ou sensible), l'observation phénotypique de la résistance quantitative est plus complexe et varie selon le pathosystème étudié. Les composantes de la résistance quantitative qui sont les plus mesurées sont : l'efficacité d'infection, la période de latence, le taux de production de spores, la période infectieuse, la taille des lésions et la production de toxines (pour certains agents

pathogènes). En général, ces composantes permettent de voir l'effet de la résistance quantitative sur une étape du développement de l'agent pathogène.

I.1.2. Bases moléculaires de résistances des plantes

a. *Interactions plante-agent pathogène*

De nombreuses études ont contribué à la description des processus impliqués dans les interactions entre plantes et agents pathogènes. Les étapes de ces processus sont diverses et complexes (Zhang *et al.*, 2013 ; Kushalappa *et al.*, 2016). Globalement, la résistance est déclenchée par la reconnaissance de molécules produites par les agents pathogènes à l'aide de différents récepteurs (perception des signaux), puis ces récepteurs induisent des modifications en cascade de transducteurs de signaux qui activent les gènes de défense pour produire des métabolites et des protéines de résistance, lesquels réduisent la progression de l'agent pathogène (figure 3).

➤ Reconnaissance des agents pathogènes

La reconnaissance des agents pathogènes par la plante est basée sur la perception de leurs molécules et conduit à deux niveaux de réponse immunitaire (Jones et Dangl, 2006). Le premier niveau concerne la reconnaissance des éliciteurs nommés « *pathogen/microbe-associated molecular patterns* » (PAMP/MAMP) par des récepteurs majoritairement membranaires « *Pattern Recognition Receptor* » (PRR). Les éliciteurs sont des molécules ou des fragments de molécules, caractéristiques des microorganismes, tels que la flagelline bactérienne ou la chitine des champignons. Boutrot et Zipfel (2017) donnent les différents types et les caractéristiques de ces éliciteurs et des récepteurs connus actuellement. Comme ces éliciteurs sont souvent des molécules hautement conservées avec des signatures caractéristiques de classes de microorganismes, leur reconnaissance n'est pas spécifique. La réponse immunitaire induite par ce type de reconnaissance est appelée « *PAMP-triggered Immunity* » (PTI) ou résistance basale. Cette dernière est considérée comme difficile à contourner par les agents pathogènes. Par contre, certains agents pathogènes ont la capacité de produire des effecteurs qui suppriment la résistance basale et permettent le développement de l'infection. Le rôle, les caractéristiques et la localisation cellulaire de ces effecteurs ont été le sujet de nombreuses études (Bent et Mackey, 2007 ; Stergiopoulos et de Wit, 2009 ; Cesari, 2012). La reconnaissance de ces effecteurs par des protéines de résistance spécifique (R) codées par les gènes dits « majeurs » constitue le deuxième niveau du système immunitaire de la plante. Cette reconnaissance est cette fois spécifique et peut se faire de

manière directe (Jia *et al.*, 2000) ou indirecte (Van der Hoorn et Kamoun, 2008). La réponse immunitaire induite par ce type de reconnaissance est nommée « *Effecteur-Triggered Immunity* » (ETI) et est associée à la résistance qualitative. L'ETI peut supprimer complètement l'avancement de l'agent pathogène dans la plante. Les gènes codant pour les effecteurs reconnus par les gènes R sont nommés gènes d'avirulence.

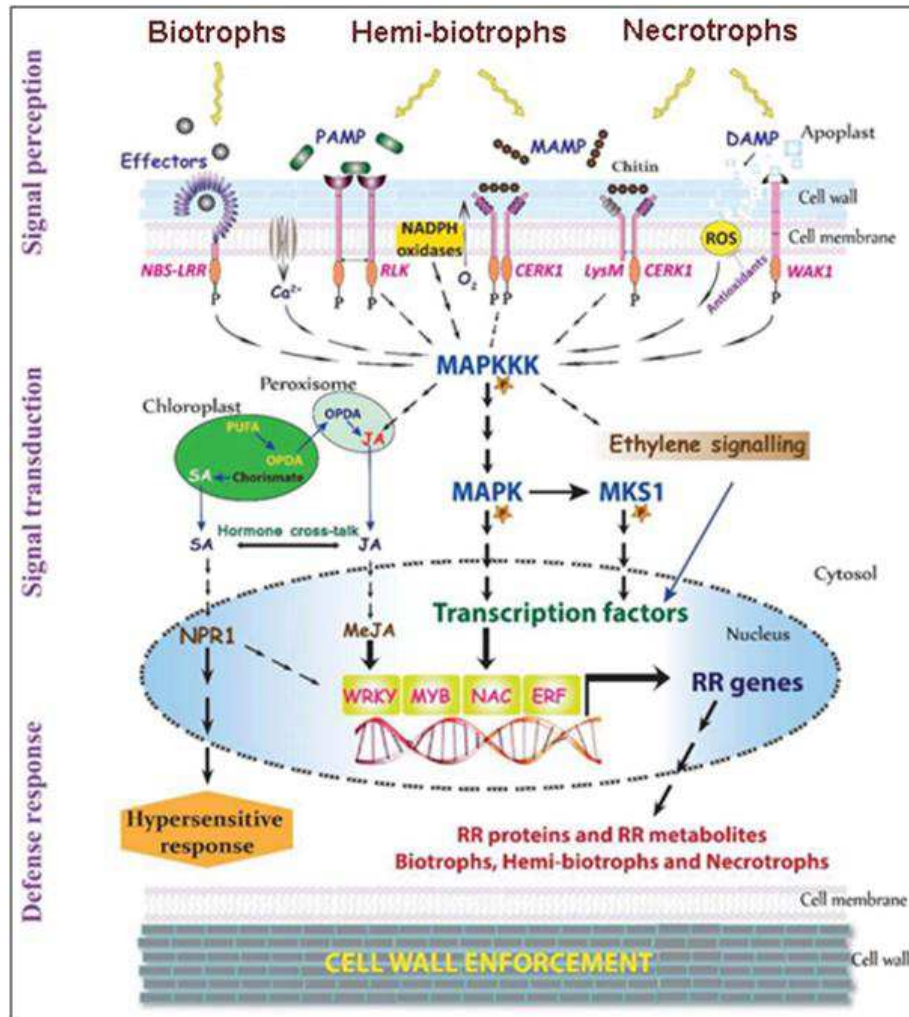


Figure 3 : Vue générale des étapes de l'interaction plante-agent pathogène (Kushalappa *et al.*, 2016)

➤ Transduction des signaux et production des molécules de défense.

Que la reconnaissance soit spécifique ou non, elle aboutit à l'activation de différentes voies de transduction des signaux. Plusieurs voies de signalisation de la résistance ont été décrites, incluant : la production de formes réactives de l'oxygène (ROS), la modification des flux ioniques, l'activation de cascades de signalisation via des « *Mitogen-Activated Protein Kinases* » (MAPK), l'intervention de phytohormones et l'implication des facteurs de

transcription (figure 3). Chaque voie de signalisation a sa spécificité pour déclencher la défense mise en place par la plante (pour revue : Kushalappa *et al.*, 2016). Les mécanismes impliqués peuvent varier selon le mode de vie des agents pathogènes (Zhang *et al.*, 2013). D'une manière générale, toutes ces voies de signalisation permettent la synthèse de métabolites et de protéines de résistances.

b. *Particularités de la résistance quantitative*

Très peu de données existent sur les bases moléculaires de la résistance quantitative. En 2017, selon le recensement fait par Pilet-Nayel *et al.*, 15 gènes avec des effets partiels sous-jacents à la résistance quantitative avaient été clonés chez les plantes (tableau 1). Plusieurs fonctions possibles des gènes impliqués dans la résistance quantitative ont été proposées (pour revue : Poland *et al.*, 2009 ; French *et al.*, 2016). La plupart des gènes de la résistance quantitative ne sont pas des récepteurs typiques du système immunitaire de la plante et codent une large gamme de fonctions moléculaires. Par exemple, les gènes *pi21* (un gène récessif), *Lr34* et *RKS1* codent différentes protéines (tableau 1).

Tableau 1 : Gènes clonés avec des effets partiels contribuant à la résistance quantitative chez les plantes

Plant/pathogène pathosystem	Locus	Protein domains	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Xanthomonas campestris</i>	<i>RKS1</i> *	Atypical kinase	Huard-Chauveau <i>et al.</i> , 2013
	<i>RRS1/RPS4</i>	NB-LRR pair	Debieu <i>et al.</i> , 2016
<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>RFO1</i> *	Wall-associated receptor- like kinase	Diener and Ausubel, 2005
Maize/ <i>Setosphaeria turcica</i>	<i>Htn1</i> *	Wall-associated receptor- like kinase	Hurni <i>et al.</i> , 2015
Maize/ <i>Setosphaeria turcica</i> ,	<i>qMdr</i> _{9,02}	Caffeoyl-CoA <i>O</i> -methyltransferase	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> ,			
<i>Cercospora zeae-maydis</i>			
Maize/ <i>Sporisorium reilianum</i>	<i>qHSR1</i>	Wall-associated receptor- like kinase	Zuo <i>et al.</i> , 2015
Rice/ <i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Pi21</i> *	Heavy metal-transport detoxification	Fukuoka <i>et al.</i> , 2009
Rice/ <i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Pi35</i>	NB-LRR	Fukuoka <i>et al.</i> , 2014
Rice/ <i>Tenuivirus</i>	<i>STV11</i>	Sulfotransferase	Wang <i>et al.</i> , 2014
Soybean/ <i>Heterodera glycines</i>	<i>Rhg1</i>	Amino acid transporter- α -SNAP protein-wound inducible protein	Cook <i>et al.</i> , 2012; Liu <i>et al.</i> , 2017
Wheat/ <i>Puccinia triticina</i> , <i>P. striiformis</i> , <i>Blumeria graminis</i>	<i>Lr34</i> *	ABC (Adenosine triphosphate-Binding Cassette) transporter	Krattinger <i>et al.</i> , 2009
Wheat/ <i>Puccinia striiformis</i>	<i>Yr36</i> *	Kinase-START	Fu <i>et al.</i> , 2009
Wheat/ <i>Puccinia triticina</i> , <i>P. striiformis</i> , <i>Blumeria graminis</i>	<i>Lr67</i> *	Hexose transporter	Moore <i>et al.</i> , 2015
Wheat/ <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fhb1</i> *	Pore-forming toxin-like	Rawat <i>et al.</i> , 2016

(*) : QTL cloné signalé comme ayant une résistance à large spectre vis-à-vis de plusieurs isolats d'un agent pathogène (Pilet-Nayel *et al.*, 2017).

I.2. Contournement des résistances des plantes

I.2.1. Définition et exemples

Le « contournement » d'une résistance est défini comme le phénomène par lequel des populations d'un agent pathogène deviennent virulentes face à une variété qui était au départ

résistante (Poland *et al.*, 2009). Le terme contournement (« *resistance breakdown* ») est principalement associé à la résistance qualitative. McDonald et Linde (2002b) expliquent que la perte d'efficacité de la résistance n'est pas due à la mutation des gènes de résistance de la plante, mais à l'évolution locale des populations de l'agent pathogène par la sélection des souches mutantes, recombinantes ou migrantes mieux adaptées à la variété résistante. Des exemples de contournement de résistance ont été décrits pour plusieurs pathosystèmes. Le temps entre la diffusion d'une variété résistante et le contournement de cette résistance dépend essentiellement du pathosystème étudié, mais aussi de la fréquence du pathogène dans l'environnement et de la fréquence de la variété. Ce temps a été estimé à trois ans pour le riz/*Magnaporthe oryzae* (Kiyosawa, 1982) et pour le colza/*Leptosphaeria maculans* (Brun *et al.*, 2000), et à 6 ans pour le pommier/*Podosphaera leucotricha* (Caffier et Laurens, 2005). Le cycle de contournement d'une résistance qualitative basée sur l'interaction gène pour gène a été qualifié de « boom and bust ». Le « boom » consiste au déploiement d'un gène majeur de résistance sur une grande surface dû à son efficacité contre une grande fraction des populations de l'agent pathogène. Le « bust » correspond à l'abandon progressif de ce gène et à la diminution de sa fréquence suite à l'apparition de populations de l'agent pathogène adaptées et capables de surmonter ce gène majeur. Le suivi de longue durée de certains pathosystèmes a permis de mieux comprendre ce cycle de « boom and bust » surtout lorsque les gènes dans les variétés déployées et les facteurs d'avirulence des populations sont connus (de Vallavieille-pope *et al.*, 2012).

Des expérimentations conduites par des inoculations successives des populations d'agent pathogène sur des variétés avec des résistances quantitatives (Lehman et Shaner, 1997 ; Montarry *et al.*, 2012) et des analyses de la variabilité phénotypique et génotypique des populations de l'agent pathogène (Delmotte *et al.*, 2014 ; Caffier *et al.*, 2014) montrent qu'elles évoluent et surmontent aussi la résistance quantitative dans les agroécosystèmes. Le phénomène d'adaptation sur la résistance quantitative est considéré comme étant plus lent, progressif et difficile à détecter. Il a été caractérisé comme un processus d'érosion plutôt qu'un processus de contournement (McDonald et Linde 2002 a).

I.2.2. Facteurs expliquant le contournement des résistances

a. Evolution des populations d'agent pathogène

La capacité d'un agent pathogène à s'adapter à la résistance des plantes dépend largement de son potentiel évolutif. La variabilité génétique joue un rôle crucial sur

l'évolution de la virulence de l'agent pathogène (McDonald et Linde 2002 a et b). La mutation, la recombinaison et la migration augmentent la variabilité soit en générant de nouvelles séquences d'ADN, en modifiant les associations des allèles existants ou en introduisant des nouveaux matériels génétiques venant d'autres populations. La dérive génétique et les effets de fondation diminuent la variabilité génétique des populations d'agent pathogène. La sélection, quant à elle, peut augmenter ou diminuer cette variabilité génétique selon le type de sélection. L'occurrence de contournement ou d'érosion de la résistance est expliquée par l'effet combiné de ces forces évolutives qui dépend de la structure génétique de l'agent pathogène.

Le type de résistance conditionne l'évolution de l'agent pathogène. La résistance qualitative exerce une forte pression sur les populations de l'agent pathogène et sélectionne des mutants virulents qui augmentent en fréquence entraînant le contournement de cette résistance. La résistance quantitative quant à elle est supposée maintenir des populations diversifiées de l'agent pathogène. Selon des études de l'évolution des populations des agents pathogènes sur des résistances quantitatives, deux types de populations pourraient apparaître. Les populations dites spécialistes sont constituées de souches qui sont mieux adaptées à la résistance quantitative et présentent une réduction du niveau d'agressivité sur des variétés sensibles et sur d'autres variétés partiellement résistantes. Ce cas a été observé pour la rouille foliaire de blé causée par *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (Lehman et Shaner, 1997), pour le mildiou de la pomme de terre causée par *Phytophthora infestans* (Andrivon *et al.*, 2007) et pour le mildiou de la vigne causée par *Plasmopora viticola* (Delmas *et al.*, 2016). Par contre, les populations dites généralistes sont composées de souches qui sont capables de se développer à la fois sur des variétés à résistance quantitative et sur des variétés sensibles mais dont la multiplication est réduite par rapport à des populations spécialistes. Ces populations d'agents pathogènes sont agressives sur toutes les variétés testées. L'étude faite sur la tavelure (maladie fongique) du pommier causée par *Venturia inaequalis* (Caffier *et al.*, 2014) est une illustration de ces populations généralistes.

b. *Coûts de fitness*

Le concept de coût de « fitness » discuté par Leach *et al.* (2001) aide beaucoup à la compréhension des phénomènes de contournement de résistance. La fitness d'un agent pathogène est sa capacité combinée à infecter, à survivre et à se reproduire. Le gain et l'accumulation de virulence ou d'agressivité permettent à une souche ou une population d'attaquer des variétés résistantes, mais en même temps réduisent sa compétitivité vis-à-vis

d'autres populations du même agent pathogène ou des microorganismes lorsque la résistance correspondante est absente. Ce phénomène s'explique en particulier par l'accumulation de mutations dans des effecteurs et par la perte associée de fonctions importantes pour le cycle de vie de l'agent pathogène dans la plante. Pour *Leptosphaeria maculans*, les souches possédant des allèles avirulents produisent des lésions plus nombreuses et plus grandes par rapport aux souches possédant des allèles virulents sur des variétés de colza sensibles (sans les gènes de résistance correspondants). Ces observations en conditions expérimentales, ainsi que l'augmentation en fréquence des souches possédant des allèles avirulents sur le champ durant deux saisons, indiquent que les souches possédant des allèles virulents ont un coût de fitness (Huang *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2010). Des études de la dynamique des populations des agents pathogènes illustrent la réduction de fréquence des populations virulentes lorsque la variété résistante correspondante n'est plus cultivée (Jenner *et al.*, 2002 ; de Vallavieille-pope *et al.*, 2012). Mais, il faut noter que dans certains cas, la mutation des allèles virulents n'influence pas nécessairement la fitness des souches possédant ces allèles (Bai *et al.*, 2000 ; Zhan *et al.*, 2002).

c. **Réduction de la diversité de l'hôte**

La réduction de la diversité de l'hôte influence le potentiel évolutif de l'agent pathogène. En écosystèmes naturels, les populations des plantes sont constituées d'une grande diversité de génotypes au sein d'une même espèce et d'une grande diversité interspécifique. Cette diversité permet de limiter la capacité des populations de l'agent pathogène à survivre et à se disperser (Zhan *et al.*, 2015). Par contre, les systèmes agricoles modernes sont généralement caractérisés par l'uniformité génétique des variétés cultivées, la mécanisation et l'intensification en intrants. Une seule espèce et une seule variété (monoculture) sont utilisées pour assurer la production, ce qui favorise les fortes épidémies et une rapide évolution des populations de pathogène virulentes (Stukenbrock et McDonald, 2008).

1.2.3. **Durabilité de la résistance quantitative**

Théoriquement les résistances quantitatives sont supposées plus durables que les résistances qualitatives (Parlevliet, 2002). La durabilité de la résistance quantitative est généralement expliquée par plusieurs arguments (Palloix *et al.*, 2009 ; Mundt, 2014). Ces arguments peuvent être regroupés en deux principes. La faible pression de sélection exercée par la résistance quantitative ne permet pas l'émergence de populations de l'agent pathogène

plus virulentes et l'effet combiné de différents mécanismes de résistance (à différents étapes de cycle de vie de l'agent pathogène ou tout au long du développement de la plante) nécessiterait de nombreuses mutations pour surmonter ces différentes défenses, ce qui diminue la probabilité de contournement. Cependant, des études de l'évolution des populations d'agents pathogènes confrontés à des résistances quantitatives (Andrivon *et al.* 2007; Montarry *et al.*, 2012; Delmotte *et al.*, 2014) remettent en question cette hypothèse de durabilité de la résistance quantitative. Ces études suggèrent que des populations d'agent pathogène ont la capacité de s'adapter sur ce type de résistance. L'étude d'adaptation des populations pathogènes sur des résistances quantitatives devra être conduite au cas par cas sur un pathosystème donné et effectué à grande échelle dans le temps et dans l'espace.

I.3. Gestion des résistances.

I.3.1. Combinaison de résistances qualitative et quantitative

La durabilité de certains gènes de résistance qualitative est influencée par le « fond » génétique dans lequel ils se trouvent. Palloix *et al.* (2009) ont conduit en conditions contrôlées une comparaison de la durabilité relative des résistances qualitative et quantitative sur l'interaction entre le poivron et le virus Y de pomme de terre (PVY). Leur étude a permis de montrer que la fréquence de contournement d'une résistance gouvernée par un gène majeur est plus élevée lorsque ce gène est introgressé dans une variété avec un fond génétique sensible. Par contre, le contournement n'apparaît pas quand ce même gène est introduit dans une variété ayant des résistances partielles dans son fond génétique. La suppression de l'émergence de mutants virulents dans ce dernier fond génétique résulte à la fois d'un effet de sélection directionnelle et de la nécessité pour le virus de générer plusieurs mutations. Des résultats similaires ont été obtenus par Brun *et al.* (2010) sur le pathosystème colza/*Leptosphaeria maculans* en introduisant le gène majeur (*Rlm6*) dans deux variétés de *Brassica napus* qui se différencient par leur résistance quantitative. L'expérimentation conduite montre que la combinaison de la résistance quantitative et de *Rlm6* dans une variété a permis un contrôle efficace du chancre du collet du colza au moins pendant 5 ans. Par contre, le contournement de *Rlm6* apparaît en troisième année lorsque ce gène est introduit dans une variété sensible. Le bénéfice de cette combinaison de résistances qualitative et quantitative peut avoir impliqué la réduction de la concentration de l'inoculum dans l'air car la résistance quantitative limite le nombre de pseudothécia formés, et *Rlm6* réduit le nombre de lésions. Brun *et al.* (2010) suggèrent aussi que la résistance quantitative n'affecte pas la composition

et la fréquence des allèles virulent et avirulent dans les populations de *L. maculans*. Cette conclusion est déduite de l'observation de la fréquence relative des allèles avirulent et virulent des souches collectées sur les résidus de cette variété qui n'a pas changé durant les cinq ans d'expérience. Ces cas d'études soutiennent que la stratégie de combinaison de gènes de résistance qualitative et quantitative améliore la durabilité de la résistance et le moyen de contrôle des maladies des plantes.

1.3.2. Rotation de gènes de résistance dans le temps

Les stratégies de rotation de gènes de résistance qualitative visent à stopper l'augmentation en fréquence des populations virulentes. La rotation de gènes de résistance peut être efficace si la fréquence des populations virulentes diminue dès que la variété avec le gène de résistance correspondant n'est plus cultivée, c'est-à-dire si ces populations sont moins compétitives sur la nouvelle variété. Par contre cette stratégie de rotation de gènes n'est pas efficace, et est donc risquée, dans le cas où les populations virulentes ont la capacité de se maintenir même en absence du gène de résistance correspondant. Une augmentation rapide en fréquence d'autres populations virulentes sur le nouveau gène utilisé peut se produire aussi. Le coût de fitness lié au contournement des résistances (Leach *et al.*, 2001) peut permettre d'expliquer le maintien ou non des populations virulentes et devrait être pris en compte pour élaborer une stratégie de rotation des gènes de résistance.

1.3.3. Pyramidage de gènes de résistance

Les gènes de résistance spécifique sont faciles à détecter et à utiliser en sélection. L'accumulation dans une variété de plusieurs gènes de résistance caractérisés (pyramidage) est utilisée pour améliorer l'efficacité et la durabilité de ces gènes de résistance. L'augmentation d'efficacité des combinaisons de gènes est basée sur l'élargissement du spectre de résistance et l'augmentation de la durabilité sur la nécessité pour les agents pathogènes de passer par plusieurs étapes de mutation pour pouvoir contourner les différentes résistances. La probabilité qu'un agent pathogène subisse plusieurs mutations pour surmonter les gènes de résistance pyramidés est faible (McDonald et Linde, 2002 b ; Mundt, 2014). Cependant, des souches qui portent des combinaisons de virulences existent. C'est le cas de la souche Ug99 de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, détectée en Uganda en 1998, qui possède une combinaison de virulences vis-à-vis de nombreux gènes de résistance du blé (Singh *et al.*, 2015), dans une situation où des populations virulentes vis-à-vis de chaque gène de résistance existent. Les modèles de comparaison de déploiements de résistances indiquent que le

pyramidage de gènes ne constitue pas la meilleure solution pour assurer la durabilité des résistances par rapport à l'utilisation de chaque gène dans l'espace (Djidjou-Demasse *et al.*, 2017 ; Lof et van der Werf, 2017).

Le cumul de plusieurs QTL de résistance (QRL) semble être une stratégie intéressante pour la sélection de résistances efficaces et potentiellement durables surtout si ces QRLs ont des modes d'action complémentaires (Pilet-Nayel *et al.*, 2017). Laloï (2016) a étudié la combinaison dans un même génotype de plusieurs facteurs de résistance (QRLs T1, F11 et F17) dans le pathosystème pommier/*Venturia inaequalis*. Les résultats obtenus montrent que le pyramidage des 3 QRLs apporte une meilleure résistance vis-à-vis des souches testées par rapport à un seul QRL. Cette étude a permis également de mettre en évidence que les QRLs étudiés agissent différemment sur l'agent pathogène. L'action du QRL T1 se manifeste dès la pénétration du champignon alors que l'effet cumulé des QRLs F11 et F17 s'observe plus tardivement, mais avant la production de spores.

1.3.4. Mélanges de variétés et multi-lignées

La pratique des mélanges variétaux et des variétés multi-lignées a des effets sur le développement des maladies des plantes et sur l'évolution des populations d'agents pathogènes (Mundt, 2002). Les mélanges variétaux désignent l'utilisation simultanée de plusieurs variétés dans une même parcelle. Les variétés multi-lignées sont des groupes de lignées qui ne diffèrent que par leurs gènes de résistance. Les principaux mécanismes impliqués dans la réduction de la sévérité des épidémies dans les mélanges variétaux et les variétés multi-lignées sont : l'effet de dilution, l'effet de barrière et la résistance induite (Finckh *et al.*, 2000 ; Koizumi *et al.*, 2004). Un gène de résistance déployé dans un mélange est considéré moins exposé à la population virulente d'un agent pathogène qu'un gène déployé dans une culture pure (Mundt, 2002). Plusieurs études ont observé l'efficacité des mélanges variétaux et des variétés multi-lignées sur la réduction du développement des épidémies dans différents pathosystèmes. Cette efficacité dépend de nombreux facteurs : la taille des plantes, le caractère foliaire versus tellurique de la maladie, le fait que l'agent pathogène est spécialiste versus généraliste etc. (Mundt, 2002). Les études indiquent que plusieurs facteurs influencent l'évolution des populations pathogènes dans les mélanges variétaux (Mundt, 2002 ; Lannou *et al.*, 2005). Il est essentiel de savoir si la pratique des mélanges variétaux amène à sélectionner des populations accumulant des virulences plus larges sur tous les gènes de résistance présents dans le mélange pour pouvoir évaluer la durabilité de l'efficacité d'un mélange (Mundt, 2014).

I.3.5. Déploiement de gènes de résistance à l'échelle du paysage

Le déploiement de gènes de résistance dans l'espace constitue une des stratégies pour maintenir la durabilité de ces gènes. L'étude conduite par Papaix *et al.* (2011) montre que la distribution variétale dans le paysage influence le niveau de résistance des variétés de blé par altération de la structure des populations de l'agent pathogène. Le choix des stratégies de gestion dépend en partie des capacités de dispersion de l'agent pathogène. Bien que le suivi d'une telle stratégie ne soit pas évident en expérimentation, des modèles de simulation ont été développés pour évaluer l'impact de la diversité spatiale sur l'évolution des populations de pathogène (Sester *et al.*, 2016).

I.4. Description du pathosystème *Oryza sativa*-*Magnaporthe oryzae*.

I.4.1. Le riz, une plante d'intérêt agronomique majeur

Le riz est une céréale diploïde autogame appartenant à la famille des *Poaceae* et au genre *Oryza* qui comprend 23 espèces (Ge *et al.*, 1999) dont deux sont cultivées : *Oryza sativa* L., originaire d'Asie, et *Oryza glaberrima* Steud., originaire d'Afrique. La structure et la diversité génétiques au sein de l'espèce *O. sativa* ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études. En général, *O. sativa* est classé en cinq groupes génétiques comprenant deux sous-espèces majeures, *indica* et *japonica*.

Le riz est l'une des principales cultures vivrières de la planète. Il joue un rôle important en matière de sécurité alimentaire. Avec une production estimée à 490 millions de tonnes usinées sur 161 millions d'hectares en 2015 (FAO, 2016 b), le riz constitue l'aliment de base de la majorité de la population mondiale (Khush, 2005). Il peut être cultivé de manière irriguée ou de manière pluviale. Les cultures de riz sont localisées entre 40° de latitude sud et 53° de latitude nord ; dans des milieux très divers en fonction de la topographie, du type de sol, du régime hydrique et des facteurs climatiques.

Les enjeux économiques et humains qui pèsent sur la riziculture sont considérables et la demande en riz devrait continuer à augmenter dans les années à venir, avec l'augmentation de la population mondiale. Une augmentation de la production de riz sera donc nécessaire mais elle devra être menée avec un minimum d'extension possible des surfaces cultivées, dans un contexte de réduction des ressources en eau disponibles en raison de l'explosion démographique, de l'urbanisation, de la progression de l'industrialisation, et avec moins de main d'œuvre et de produits chimiques (engrais et pesticides). Pour faire face à ces enjeux, il

est indispensable d'utiliser ou de créer de nouvelles variétés de riz possédant non seulement un potentiel de rendement plus élevé et stable mais également des résistances durables aux stress biotiques (Khush, 2005).

I.4.2. La pyriculariose du riz

a. Généralités et impact de la maladie

La pyriculariose, causée par le champignon *Magnaporthe oryzae*, est la maladie fongique la plus destructive du riz dans le monde (Pennisi, 2010). La première attaque recensée de la pyriculariose du riz aurait été observée en Chine en 1637, rapportée par Soong Ying-Shin dans son livre intitulé «Utilisation des ressources naturelles» (Ou, 1985). Actuellement, cette maladie fongique du riz est présente dans toutes les zones rizicoles (Kato, 2001). Les études des populations mondiales de *M. oryzae* illustrent comment la pyriculariose est entrée en Europe, en Amérique et en Afrique à partir de son centre d'origine, l'Asie (Saleh *et al.*, 2014; Odjo *et al.*, communication personnelle). Ces migrations intercontinentales de la pyriculariose sont probablement liées à des transports de matériels infectés par les mouvements humains (Tharreau *et al.*, 2009 ; Saleh *et al.*, 2014).

L'utilisation de quantités élevées d'intrants azotés durant la culture du riz favorise le développement de la maladie et la rend particulièrement destructrice. Cette maladie semble plus préjudiciable en riziculture pluviale (Mackill et Bomann, 1991 ; Lai *et al.*, 1999).

L'impact de la pyriculariose du riz est variable sur le plan économique (Nalley *et al.*, 2016) selon la zone de culture de riz. Les pertes de récolte peuvent atteindre 100% pour des variétés très sensibles. Il a été estimé que les pertes mondiales directement dues à cette maladie correspondent à l'équivalent de la consommation annuelle de 60 millions d'habitants (Pennisi, 2010). Les fongicides développés contre la pyriculariose représentent un des plus gros marchés de fongicides et cette maladie fait partie des cibles des grandes sociétés phytosanitaires. D'après Nalley *et al.* (2016), pour un hectare de riz, le coût de l'application de fongicides pour contrôler la pyriculariose du riz peut atteindre 70 dollars américains. L'utilisation des fongicides augmente le coût de production et suscite de plus en plus d'inquiétudes en raison de son impact sur l'environnement et la santé humaine. La recherche de moyens de lutte alternatifs était, est et sera un grand enjeu pour la gestion de la pyriculariose du riz.

Par ailleurs, ce pathosystème est considéré comme un modèle d'étude des interactions entre plantes et champignons phytopathogènes (Valent 1990 ; Dean *et al.*, 2012).

b. *Symptômes de la pyriculariose*

Magnaporthe oryzae est capable d'infecter et de produire des lésions sur toutes les parties aériennes des plantes : feuilles, tiges et panicules (Figure 4). En conditions de laboratoire, le champignon attaque aussi les racines (Sesma et Osbourn, 2004).

L'attaque au niveau foliaire se manifeste par la réduction de la surface foliaire verte par la présence des lésions et de l'activité photosynthétique des feuilles non infectées durant le stage végétatif, laquelle résulte en une réduction du tallage, du nombre de panicules et du nombre de grains par panicule des plantes (Bastiaans, 1991). L'attaque au niveau paniculaire entraîne le dessèchement de la panicule et empêche le remplissage des grains, entraînant des pertes de rendement qui peuvent être considérables (Ou, 1985).

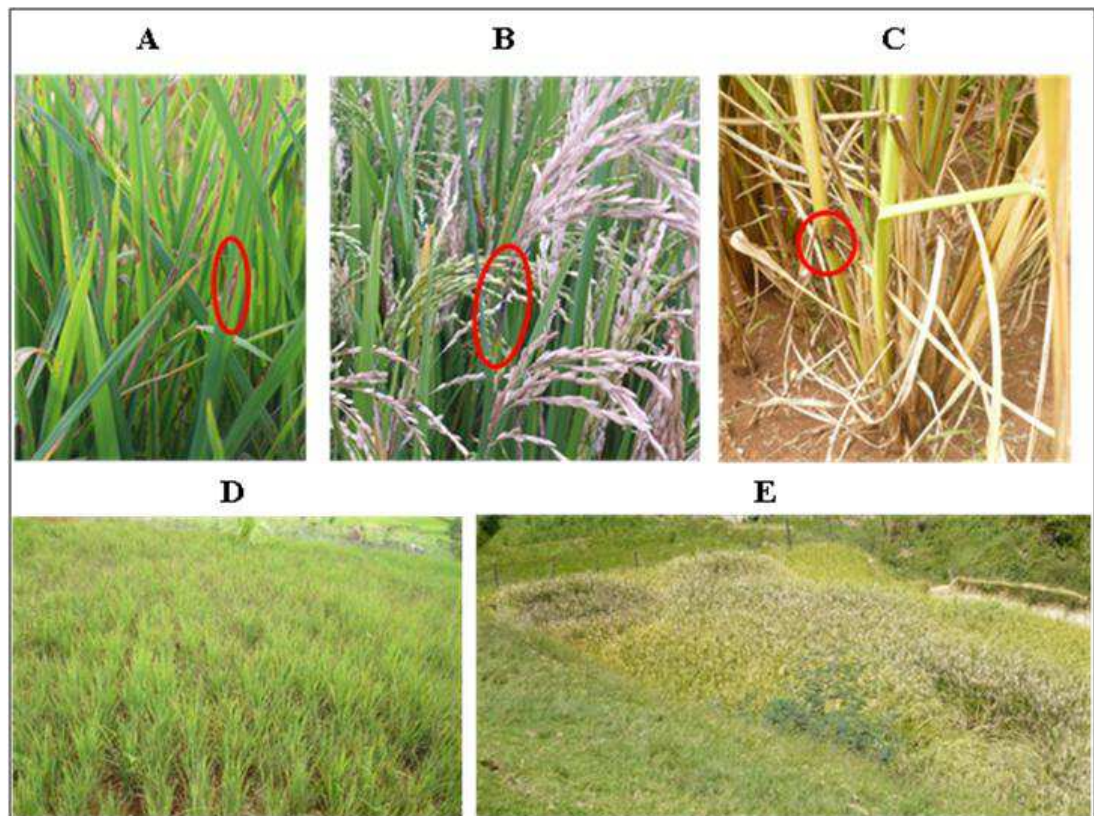


Figure 4 : Symptômes de pyriculariose provoqués par *Magnaporthe oryzae* :

A : symptômes foliaires

B : symptômes paniculaires (au niveau du nœud paniculaire, appelé cou)

C : symptômes sur la base de tige (au niveau du nœud)

D : dégâts provoqués par la pyriculariose foliaire au champ dans une parcelle paysanne

E : dégâts provoqués par la pyriculariose paniculaire au champ dans une parcelle paysanne.

(Photos. H. Raveloson, FOFIFA)

c. *L'agent pathogène : Magnaporthe oryzae*

L'agent pathogène responsable de la pyriculariose du riz a été référencé sous plusieurs noms dans la littérature. Des études ont essayé de clarifier le choix du nom utilisé pour ce champignon filamenteux ascomycète (Rossmann *et al.*, 1990 ; Couch and Kohn 2002 ; Zhang *et al.*, 2016). *Pyricularia oryzae* Cavara (la forme asexuée ou anamorphe) et *Magnaporthe oryzae* Couch et Kohn (la forme sexuée ou téléomorphe) sont les noms les plus largement utilisés pour cet agent pathogène. Aujourd'hui, la recommandation est d'utiliser en priorité *Pyricularia oryzae* mais son synonyme *Magnaporthe oryzae* peut être utilisé (Zhang *et al.*, 2016). Dans ce manuscrit, *Magnaporthe oryzae* sera le nom employé. *M. oryzae* est un champignon haploïde, hémibiotrophe et hétérothallique. Ce champignon est classé comme ayant un fort potentiel d'adaptation (McDonald et Linde, 2002 b). L'espèce *M. oryzae* comprend différents groupes génétiques capables d'infecter plus ou moins spécifiquement d'autres céréales comme le blé, l'orge, l'éleusine, les sétaires. Le génome de *M. oryzae* a été séquencé entièrement pour la première fois en 2005 à partir d'une souche pathogène sur le riz (Dean *et al.*, 2005). Aujourd'hui, les génomes de plusieurs centaines de souches ont été séquencés (Chiapello *et al.*, 2015 ; Gladieux *et al.*, 2018 b).

d. *Cycle de vie du champignon*

Au champ, le cycle de vie de *M. oryzae* est assuré principalement par la forme asexuée de l'agent pathogène. Le processus d'infection de *M. oryzae* sur les organes du riz est l'un des plus étudiés chez les champignons phytopathogènes. La compréhension de chaque étape de l'infection à partir de l'attachement des conidies sur la surface des organes du riz jusqu'à la libération de nouvelles conidies ne cesse de s'améliorer (Xu et Hamer, 1996 ; Kankanala *et al.*, 2007 ; Ribot *et al.*, 2008 ; Giraldo *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2014 ; Ryder et Talbot, 2015 ; Yan et Talbot, 2016), notamment grâce au suivi, par des techniques comme l'imagerie par fluorescence, des cellules vivantes de l'agent pathogène et de l'hôte durant l'infection (Jones *et al.*, 2016 ; Martin-urdiroz *et al.*, 2016 ; Jenkinson *et al.*, 2017). Le processus d'infection est représenté en figure 5. Les conidies sont transportées par l'air et se déposent sur le riz. La pointe de la conidie se fixe à l'aide d'un mucilage sur les surfaces hydrophobes, comme la cuticule foliaire (étape 1). Ensuite, en présence d'eau libre, la germination de la conidie se produit avec allongement du tube germinatif (étape 2) qui va former une nouvelle cellule spécialisée, l'appressorium (étape 3). Cet appressorium assure la pénétration du champignon à l'intérieur des tissus de la plante hôte par un hyphes de

pénétration grâce à la forte pression de turgescence exercée par ce dernier (étape 4). Dans les tissus de la plante, le champignon développe un réseau d'hyphes bulbeux et colonise les cellules voisines en passant par les plasmodesmes. Ces premières phases d'infection se font de manière biotrophe. Ensuite, *M. oryzae* supprime les défenses de la plante et tue les cellules de celle-ci. Les hyphes continuent à coloniser les tissus vivants de la plante pour prélever des éléments nutritifs. Cette phase nécrotrophe ne débute que vers le cinquième jour, de façon concomitante avec l'apparition des premiers symptômes (étape 5). Le cycle d'infection se termine avec la production des spores sur des lésions (étape 6) et ces nouvelles spores sont ensuite dispersées par la pluie et le vent pour infecter d'autres organes, d'autres plantes au sein de la parcelle et des parcelles voisines (infection secondaire).

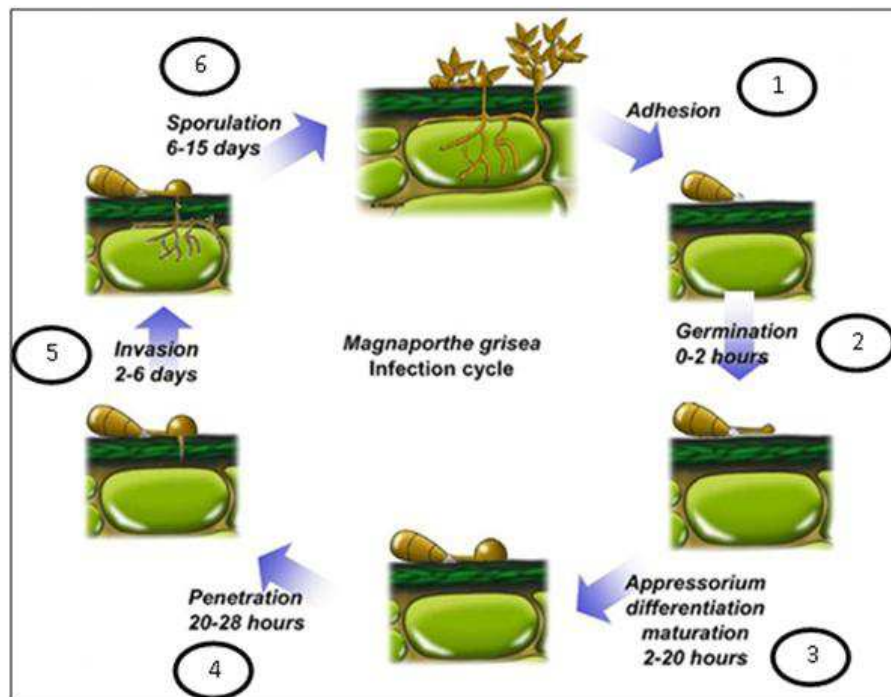


Figure 5 : Processus d'infection de *Magnaporthe oryzae* (Ribot et al., 2008)

e. Développement épidémique de la pyriculariose au champ

La pyriculariose est une maladie polycyclique. Dans les régions tropicales où le riz est cultivé en permanence, les conidies de *M. oryzae* présentes dans l'air sont présumées servir d'inoculum tout au long de l'année. Par contre, dans les régions tempérées et tropicales d'altitude où le riz est absent durant quelques mois, l'initiation des épidémies de la pyriculariose reste obscure. Le cycle de développement de la pyriculariose au champ est représenté en figure 6. Pendant l'intersaison où le riz n'est pas cultivé, l'agent pathogène semble survivre sous forme de mycélium sur des graines, des résidus de riz ou des hôtes

secondaires (graminées ; Ou, 1985). Lorsque les conditions environnementales sont favorables c'est-à-dire que la température et l'humidité augmentent, la sporulation de l'agent pathogène a lieu, conduisant à la libération des spores. Les spores sont transportées par le vent, l'eau et les éclaboussures sur des plantes saines entraînant l'initiation de la maladie quand l'interaction est compatible entre la variété et les populations présentes sur le champ. Plusieurs cycles d'infection se succèdent durant la saison culturale assurant la dispersion de la maladie entre les plantes d'une parcelle et des parcelles avoisinantes.

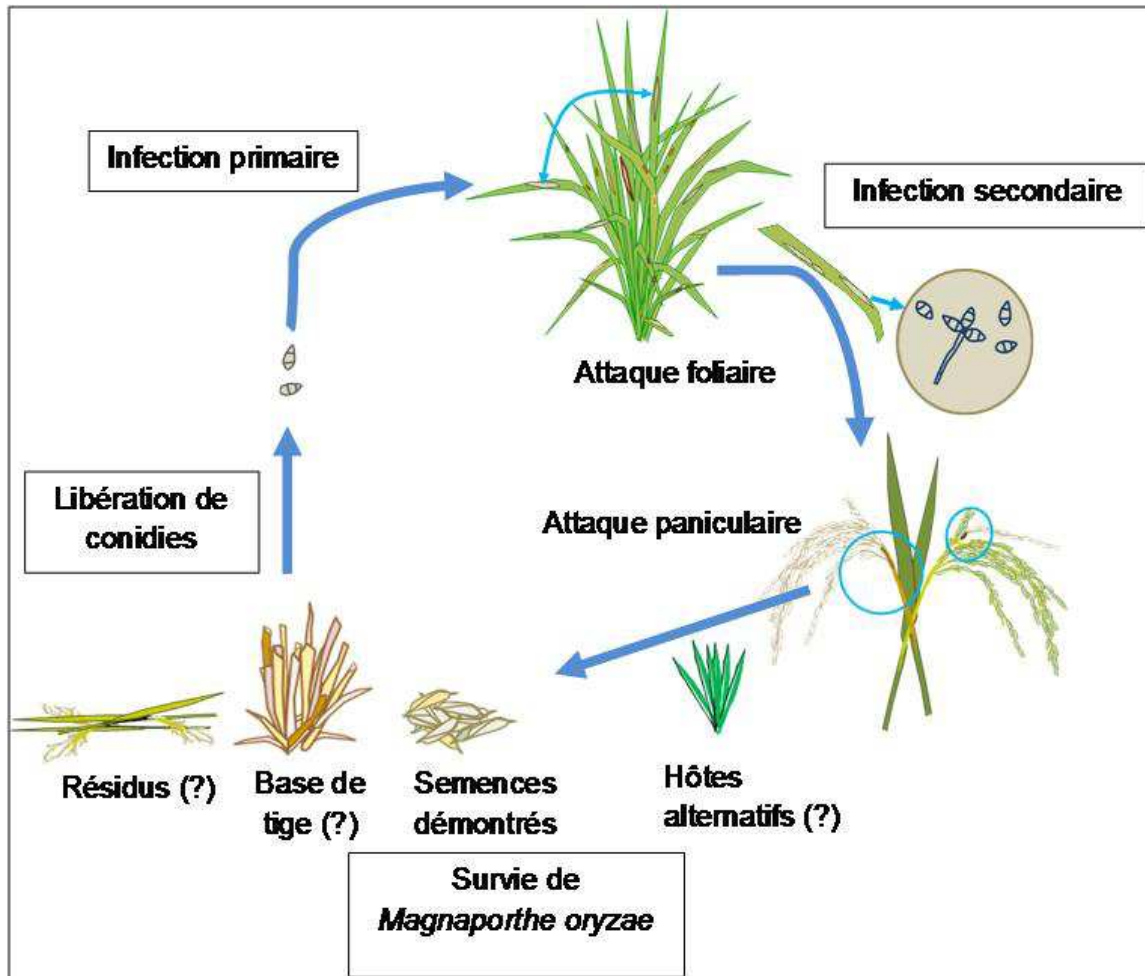


Figure 6 : Cycle épidémique de la pyriculariose au champ (M. Sester, CIRAD)

Des études ont démontré que l'agent pathogène est présent sur les semences infectées de riz (Chadha et Gopalakrishna, 2006 ; Manandhar *et al.*, 1998) et que *M. oryzae* survit sur les semences (Puri *et al.*, 2007). De même les semences infectées jouent un rôle dans l'initiation de l'épidémie de pyriculariose au champ (Long *et al.*, 2001 ; Guerber et TeBeest 2006 ; Faivre-Rampant *et al.*, 2013). Par contre, il y a peu de démonstration convaincante de l'implication des résidus et des bases de tige du riz sur la survie de *M. oryzae* et de leur rôle

dans l'initiation des épidémies de pyriculariose. L'analyse de la structure génétique et du pouvoir pathogène des populations de *M. oryzae* démontre que les souches attaquant le riz sont différentes de celles qui attaquent d'autres *Poaceae* (Yoshida *et al.*, 2016). Pourtant, l'implication des hôtes alternatifs comme réservoir des souches de *M. oryzae* capables d'infecter le riz ne peut pas complètement être écarté et reste à tester dans beaucoup de zones rizicoles.

f. Influence des conditions environnementales et des pratiques culturales

Les conditions environnementales constituent des facteurs très importants influençant le développement des épidémies de maladies fongiques. En général, une longue période d'humectation, une humidité relative élevée, et des températures entre 17 et 28 °C favorisent le développement de la pyriculariose (Greer et Webster, 2001). Les processus importants du cycle infectieux (sporulation, germination des conidies et infection) sont affectés par ces trois paramètres environnementaux. Ainsi, des modèles d'impact de facteurs environnementaux sur le développement de la pyriculariose ont été développés (Kim *et al.*, 1988 ; Luo *et al.*, 1997 ; Kaundal *et al.*, 2006). La prévision des conditions climatiques propices au développement d'épidémies constitue alors un outil essentiel de prédiction des zones à risques pour la maladie.

Outre l'utilisation de fongicides, certains itinéraires techniques sont capables de modifier le microclimat et l'état physiologique des plantes et peuvent permettre de réduire la sévérité de la pyriculariose. L'amélioration de la nutrition de la plante influence le niveau d'attaque de la pyriculariose (Datnoff *et al.*, 2007). L'excès d'azote dans le sol favorise cette maladie ; l'apport fractionné de cet élément est recommandé pour réduire son effet sur le développement de la pyriculariose (Kürschner *et al.*, 1992 ; Bregaglio *et al.*, 2017). La silice est un élément constitutif des espaces intercellulaires et des parois cellulaires des racines et des feuilles de riz. L'apport de silice dans les sols ou en application foliaire permet d'augmenter la résistance du riz à la pyriculariose, et le nombre de lésions diminue proportionnellement à la concentration de silice dans les feuilles (Seebold *et al.*, 2004). Ainsi, il a été observé qu'une variété sensible cultivée sur un sol volcanique bien équilibré en éléments nutritifs est moins attaquée par la pyriculariose que sur un sol ferrallitique (Sester *et al.*, 2019). Le choix de la date de semis peut affecter aussi le développement de la pyriculariose par un phénomène d'esquive : le moment propice de l'installation de la maladie et la présence de matériel sensible sont décalés (Pooja et Katoch, 2014). La faible densité des

plantes peut freiner l'épidémie en augmentant la distance entre les plantes et donc en limitant le processus de dispersion des spores. La liaison entre le stress hydrique et la sensibilité des variétés à la pyriculariose a été observée au champ (Lai *et al.*, 1999) et au laboratoire (Bidzinski *et al.*, 2016). Spence *et al.* (2014) ont testé l'effet des microorganismes échantillonnés naturellement dans la rhizosphère du riz sur le niveau d'attaque de la pyriculariose. Leurs résultats montrent que certains de ces microorganismes ont la capacité de réduire la sévérité de la pyriculariose.

1.4.3. Résistance du riz à la pyriculariose

L'utilisation de variétés résistantes à la pyriculariose est la meilleure stratégie pour contrôler cette maladie. Cependant, le phénomène de contournement de résistance est très fréquent pour le pathosystème riz/*M. oryzae* (Kiyosawa, 1982 ; Ballini *et al.*, 2008). Il est dû à l'apparition de populations de *M. oryzae* virulentes c'est-à-dire capables de surmonter les résistances (Vasudevan *et al.*, 2015). Le temps nécessaire au contournement de résistance peut varier selon le type de résistance utilisée, la structure et la diversité des populations de l'agent pathogène dans une zone rizicole. Pour comprendre ce phénomène de contournement, de nombreuses études ont été conduites sur la résistance du riz et le pouvoir pathogène de *M. oryzae* et sur les stratégies permettant de le retarder.

a. Déterminisme génétique de la résistance du riz à la pyriculariose

L'étude de la résistance à la pyriculariose chez le riz est ancienne. En conditions contrôlées en laboratoire, les études sur la résistance du riz à la pyriculariose sont nombreuses. Elles consistent à caractériser des gènes de résistance, à comprendre les fonctions pour lesquelles ils codent et les mécanismes en jeu dans le phénomène de résistance. Les méthodes utilisées ne cessent de s'améliorer comme la cartographie génétique et le clonage, la génétique d'association (« *genome wide association studies* : GWAS »), la sélection assistée par marqueurs etc. (Liu *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2015 ; Tanweer *et al.*, 2015 ; Raboin *et al.*, 2016 ; Aglawe *et al.*, 2017).

Actuellement, environ 100 gènes de résistance avec un effet qualitatif (dits gènes majeurs) et autour de 350 loci de résistance quantitative (QTL) à la pyriculariose ont été identifiés (Ballini *et al.*, 2008 ; Sharma *et al.*, 2012). Parmi les gènes majeurs, une vingtaine d'entre eux a été clonée et caractérisée en détail (Roychowdhury *et al.*, 2012 ; Kang *et al.*, 2016) (tableau 2). La majorité de ces gènes codent pour des protéines NBS-LRR (*Nucleotide-Binding Site - Leucine Rich Repeat*) à l'exception de *Pid-2* qui code une Sérine/Thréonine

Tableau 2 : Gènes de résistance clonés et cartographiés et gènes d'avirulence du champignon pathogène correspondant

Gène de Résistance	Type de protéine	Gène d'Avirulence	Type de protéine
Pib	NB-LRR	AvrPib	protéine sécrétée (75 AA)
Pita	NB-LRR	AvrPita	protéine sécrétée (244 AA)
Pi54 (ou Pi-kh)	NB-LRR	ND	Inconnu
Pi9	NB-LRR	AvrPi9	Protéine sécrétée (91 AA)
Pi2	NB-LRR	ND	Inconnu
Piz-t	NB-LRR	AvrPiz-t	Protéine sécrétée (108AA)
Pid-2	Récepteur de type Ser/Thr kinase avec un domaine B lectin	ND	Inconnu
Pi36	NB-LRR	ND	Inconnu
Pi37	NB-LRR	ND	Inconnu
Pi-a ^{a,b}	NB-LRR	AvrPia	Protéine sécrétée (85 AA)
Pi5 ^a	NB-LRR	ND	Inconnu
Pik	NB-LRR	AvrPik/km/kp	Protéine sécrétée (113 AA), 5 allèles (A-E)
Pikp	NB-LRR	AvrPik/km/kp	Protéine sécrétée (113 AA), 5 allèles (A-E)
Pikm	NB-LRR	AvrPik/km/kp	Protéine sécrétée (113 AA), 5 allèles (A-E)
pi21	une protéine riche en prolines comportant un domaine HMA	ND	Inconnu
Pb1	NB-LRR	ND	Inconnu
Pit	NB-LRR	ND	Inconnu
Pis-h	NB-LRR	ND	Inconnu
Pid3	NB-LRR	ND	Inconnu
Pi-CO39 ^{a,b}	NB-LRR	Avr1-CO39	Protéine sécrétée (89 AA)
Pi25	NB-LRR	ND	Inconnu
Pi1	NB-LRR	ND	Inconnu
Pi33 ^c	inconnu	ACE1	Polycétide et peptide synthase
Pii ^c	inconnu	AvrPii	Protéine sécrétée (70 AA)
Pi64	NB-LRR	ND	Inconnu

Adapté de Cesari (2012) et Liu *et al.* (2014).

AA, acide aminé ; NB-LRR, nucleotide-binding leucine-rich repeat ; ND, non déterminé.

^a La fonction de ces trois gènes de résistances nécessite deux NB-LRR.

^b Les deux gènes de résistance partagent le même locus de gène NB-LRR.

^c Ces gènes de résistance n'ont pas encore été clonés

Kinase (Cesari, 2012). Parmi les QTLs identifiés, deux seulement ont été clonés. *pi2* est un gène récessif qui confère une résistance quantitative dont l'allèle sensible code pour une petite protéine riche en proline possédant un domaine HMA (*Heavy Metal Associated*) (Fukuoka *et al.*, 2009). *Pbl* code pour une protéine avec un domaine NBS-LRR (Hayashi *et al.*, 2010).

Au champ, des variétés portant chacune un gène de résistance majeur différent (dites variétés différentielles) ont été cultivées dans plusieurs pays rizicoles (Fukuta *et al.*, 2009) pour identifier les gènes efficaces localement. Cette méthode fournit des informations aux sélectionneurs pour choisir les gènes de résistance à utiliser dans une zone donnée.

Malgré des informations nombreuses obtenues sur la résistance de riz à la pyriculariose, l'obtention d'une résistance à spectre large et durable au niveau du terrain reste encore un grand défi. Le pyramidage de gènes majeurs (Xiao *et al.*, 2016) ou de QTLs (Fukuoka *et al.*, 2015 ; Yasuda *et al.*, 2015) confère un spectre de résistance plus large des variétés à la pyriculariose par rapport à des variétés ayant un seul gène de résistance.

En outre, les mélanges de variétés avec des gènes de résistance différents réduisent la sévérité de la pyriculariose sur des variétés sensibles par rapport à leur culture en condition pure (Zhu *et al.*, 2000 ; Castilla *et al.*, 2010 ; Raboin *et al.*, 2012 ; Raveloson *et al.*, 2016). Les résultats de ce type de déploiement de résistance sont très prometteurs pour le contrôle de la pyriculariose, mais nécessitent un choix réfléchi des variétés pour que les agriculteurs puissent facilement les cultiver simultanément, ce qui dépend de la disponibilité des génotypes résistants (Vasudevan *et al.*, 2014). L'étude conduite sur les terrasses du Yuanyang, en Chine, montre une spécialisation de *M. oryzae* en fonction des sous-espèces de riz *indica* et *japonica* liée au type de résistance prédominant dans ces deux sous-espèces de riz (Liao *et al.*, 2016).

b. Interactions moléculaires entre le riz et *Magnaporthe oryzae*

De nombreuses études ont été menées pour mieux comprendre les interactions moléculaires entre le riz et *M. oryzae* grâce à des approches de génétique, de génomique, de protéomique, de biologie moléculaire et de bioinformatique (Liu *et al.*, 2010).

Les molécules impliquées dans le déclenchement ou la suppression des réactions de défense des plantes sont très diverses. Les plus connues sont les effecteurs : il s'agit de petites protéines qui permettent de manipuler des processus cellulaires de la plante hôte afin de promouvoir la prolifération des agents pathogènes. Pour *M. oryzae*, ces effecteurs facilitent le développement de la maladie, mais certains effecteurs déclenchent également la réponse

hypersensible par l'intermédiaire d'un gène de résistance de l'hôte et bloquent le développement de la maladie (pour revue : Valent et Khang, 2010). Les gènes qui codent pour ces effecteurs reconnus par la plante sont appelés gènes d'avirulence. Les effecteurs de *M. oryzae* peuvent être divisés en deux types distincts selon leur localisation dans les cellules de la plante (figure 7). Les effecteurs cytoplasmiques, comme AVR-Pita, PWL1, PWL2, BAS2, et AVR-Piz-t, sont préférentiellement accumulés dans une structure appelée « *biotrophic interface complex* » (BIC) localisée à l'interface entre l'hyphes invasif et la membrane plasmique de l'hôte (Khang *et al.*, 2010 ; Zhang et Xu, 2014). A l'inverse, les effecteurs apoplastiques comme BAS4, AVR1-CO39, et Slp1 ne sont pas associés avec le BIC, après sécrétion, ils sont dispersés dans l'espace extracellulaire entre la paroi cellulaire du champignon et la membrane extra-invasive des hyphes (« *Extra-Invasive Hyphal Membrane* » : EIHM) produite par les cellules de la plante (Zhang et Xu, 2014). Les effecteurs cytoplasmiques PWL2 et BAS1, mais pas l'effecteur apoplastique BAS4, se déplacent dans les cellules avoisinantes de la plante avant les hyphes invasifs (Khang *et al.*, 2010). Les effecteurs fongiques entrant dans les cellules de la plante non colonisées peuvent être capables de supprimer les réactions de défense de l'hôte ou de stimuler la sensibilité de ces cellules. Ainsi, il a été proposé que ce phénomène de déplacement d'effecteurs puisse préparer les cellules voisines à être infectées par le champignon (Valent et Khang, 2010). L'implication des effecteurs dans la virulence de *M. oryzae* a été montrée par Mosquera *et al.* (2009) et par Sharpee *et al.* (2017). Ces derniers nomment les 11 effecteurs identifiés des suppresseurs de la mort cellulaire (« *suppressor of plant cell death* » : SPD). Différentes fonctions de ces effecteurs sur le pouvoir pathogène de *M. oryzae* ont été proposées. La liaison d'une protéine lysM (Slp1) avec la chitine supprime la reconnaissance de l'agent pathogène par la cellule hôte (Mentlak *et al.*, 2012). La protéine MC69, elle, est impliquée dans la pénétration de l'appressorium dans la cellule hôte (Saitoh *et al.*, 2012).

La reconnaissance spécifique entre un gène de résistance et le gène d'avirulence correspondant stimule le déclenchement de la résistance de type ETI (« *Effecteur-Triggered Immunity* »). Comme les gènes R du riz, plusieurs gènes AVR ont été identifiés et clonés chez le champignon (tableau 2). Parmi ces gènes AVR, tous codent pour de petites protéines qui sont sécrétées pendant l'infection, à part ACE1 qui code pour une enzyme (polycétide synthase couplée à une peptide synthétase non ribosomale) impliquée dans la synthèse de métabolites secondaires (Fudal *et al.*, 2007).

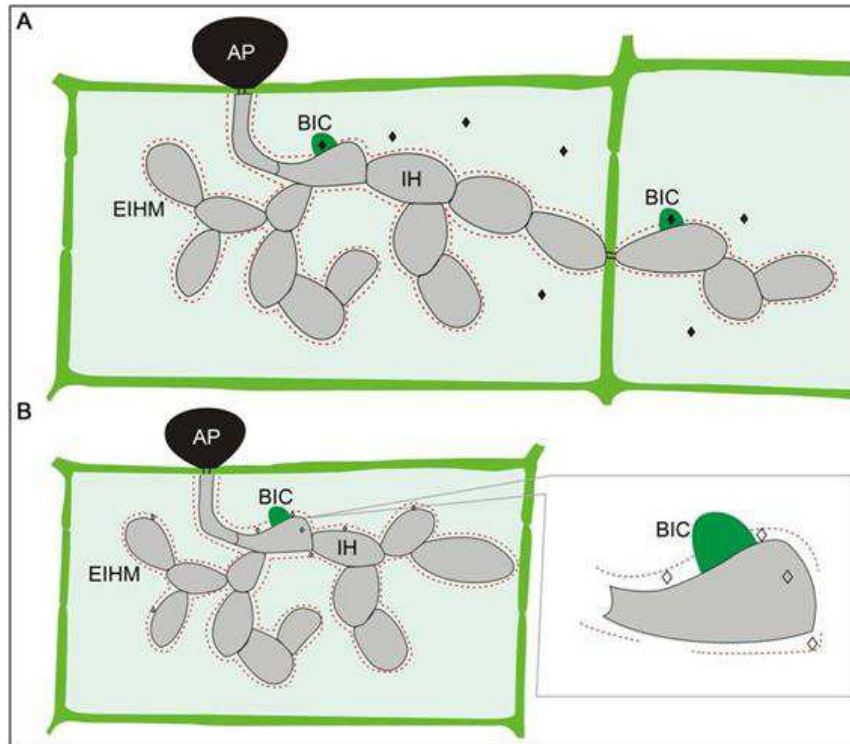


Figure 7 : Localisation des effecteurs de *Magnaporthe oryzae* durant l'infection de la plante (Zhang et Xu, 2014)

Biotrophic interfacial complex : BIC, extra-invasive-hyphal membrane : EIHM, hyphes invasifs : IH, appressorium : AP.

Pour la résistance quantitative, caractérisée par une réduction du développement de l'agent pathogène lors de l'infection, les mécanismes moléculaires d'interaction entre le riz et l'agent pathogène sont peu documentés. Les gènes de résistance quantitative pourraient conférer une résistance durable parce que la pression de sélection sur les populations de *M. oryzae* est faible en raison de l'effet partiel de ces gènes (Miah *et al.*, 2013). De nombreuses études s'intéressent à l'identification des QTLs responsables de la résistance quantitative chez le riz. La comparaison des réponses des deux sous-espèces de riz vis-à-vis des différents souches de *M. oryzae* (Gallet *et al.*, 2016 ; Liao *et al.*, 2016) et la caractérisation de la présence de QTLs (Raboin *et al.*, 2016) suggèrent que les variétés de riz *japonica* contiennent plus de résistance quantitative que les variétés de riz *indica*. Selon Vergne *et al.* (2010), ce type de résistance peut contribuer au renforcement du système de défense préformé incluant les barrières physiques et des molécules microbiennes. Ainsi, la résistance quantitative agit sur différentes étapes de l'infection de *M. oryzae* comme sa pénétration et son développement dans les cellules hôtes (Fukuoka *et al.*, 2015). L'implication de certains QTLs de résistance durant l'attaque paniculaire a été aussi suggérée par d'autres études (Ishihara *et al.*, 2014 ; Aglawe *et al.*, 2017).

c. Dynamique des populations de *Magnaporthe oryzae* et adaptation aux résistances

La connaissance sur la dynamique des populations de l'agent pathogène dans le temps et dans l'espace permet d'évaluer leur potentiel évolutif. Ce dernier peut être reflété par la structure génétique des populations et ses changements, influencés par le système de reproduction. Pour *M. oryzae*, la grande diversité génotypique, la présence des types sexuels *Mat-1* et *Mat-2* et la présence de souches femelle-fertiles dans la région sud-est de l'Asie (Saleh *et al.*, 2012) et dans la partie nord-est de l'Inde (Kumar *et al.*, 1999) amènent à envisager que la reproduction sexuée est possible dans ces régions. L'existence de la reproduction sexuée dans des populations contemporaines de *M. oryzae* a même été mise en évidence (Saleh *et al.*, 2012). Par contre, dans la plupart de pays rizicoles, la reproduction de *M. oryzae* se fait asexuellement (Park *et al.*, 2008 ; Correll *et al.*, 2000 ; Saleh *et al.*, 2014). Cette constatation peut expliquer le petit nombre (4-17) de groupes clonaux majeurs ou lignées (« *lineage* ») pour les régions en dehors du centre d'origine de la pyriculariose (Saleh *et al.*, 2014). En absence de recombinaison, d'autres facteurs expliquant les changements de la structure et de la diversité génétique des populations de *M. oryzae* doivent être recherchés. La caractérisation des populations de *M. oryzae* sur 5 ans dans la région de Séville en Espagne (Lara-Alvarez *et al.*, 2010), sur une vingtaine d'années en Corée (Park *et al.*, 2003) et en Californie (Pagliaccia *et al.*, 2017), et sur une soixantaine d'années aux USA (Wang *et al.*, 2017) mettent en évidence une certaine stabilité des lignées mais aussi des changements importants de la structure et de la diversité génétiques des populations de *M. oryzae* au cours du temps liés au renouvellement des variétés (Wang *et al.*, 2017).

La capacité de certaines souches à infecter des variétés de riz initialement résistantes est expliquée par la variabilité des gènes AVR de *M. oryzae*. Les variations des gènes AVR sont causées par différents événements de mutation, incluant délétions et translocations des gènes (Orbach *et al.*, 2000), insertions de transposons dans le gène ou dans la séquence promotrice (Kang *et al.*, 2001 ; Fudal *et al.*, 2005) ou mutations ponctuelles (Orbach *et al.*, 2000). Quelques études mettent en relation les connaissances sur l'évolution des gènes d'avirulence et la dynamique des populations de *M. oryzae* sur le terrain (Chen *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2015). Il a été observé, par exemple, que la variation de séquence des gènes AVR subit une sélection positive. Pour le gène *Avr Pib*, en interaction avec le gène R *Pib*, Zhang *et al.* (2015) ont trouvé que la fréquence des souches virulentes et la diversité de séquence d'*Avr Pib* sont plus élevées dans la partie Sud de la Chine par rapport

au Nord-Est. Cette différence de fréquence et de diversité a été reliée à l'histoire de l'amélioration variétale dans ces zones : la majorité des variétés *indica* utilisées dans le Sud porte la résistance *Pib*, alors que les variétés *japonica* sans *Pib* dominent la zone de Nord-Est. La résistance *Pib* influence donc la fréquence et la diversité de séquence d'*Avr Pib* dans les populations de *M. oryzae* (Zhang *et al.*, 2015).

I.5. Positionnement de la thèse et problématique de la recherche

I.5.1. Le riz à Madagascar

a. *Introductions multiples du riz à Madagascar*

La première introduction du riz à Madagascar date de l'arrivée des peuples parlant la langue Austronésienne, venant d'Inde et d'Indonésie. L'entrée des deux sous-espèces de riz asiatiques indépendamment cultivées *indica* et *japonica*, correspond à deux grandes vagues de migrations à Madagascar (Crowther *et al.*, 2016 ; Mather *et al.*, 2010). Les variétés *japonica* auraient été introduites dans l'île entre le 5^{ème} et le 6^{ème} siècle par les migrants Malais venant d'Indonésie. Les variétés *indica* auraient été introduites lors des migrations venant d'Inde dont la période n'est pas bien déterminée (Khush, 1997).

L'analyse de la diversité morpho-physiologique, enzymatique (Ahmadi *et al.*, 1988 ; Rabary *et al.*, 1989) et génétique (Mather *et al.*, 2010 ; Radanielina, 2010) des variétés de riz de Madagascar a conduit à identifier, à côté des groupes *indica* et *japonica*, un groupe atypique, spécifique à l'île (figure 8), préférentiellement présent en zone d'altitude. Deux hypothèses ont été émises sur l'origine de ce groupe génétique atypique : soit un effet de fondation d'un groupe de variétés venant du sous-continent indien (Ahmadi *et al.*, 1991 ; Radanielina *et al.*, 2013), soit une recombinaison inter-sous-espèces c'est-à-dire entre *indica* et *japonica* (Ahmadi *et al.*, 1991 ; Mather *et al.*, 2010).

b. *Contexte socio-économique du riz à Madagascar*

A Madagascar, le riz est l'aliment de base de la population. La consommation annuelle moyenne est de 110 kg par habitant. La place du riz dans l'agriculture et dans l'économie malgache est indéniable, la filière riz représentant 12% du produit intérieur brut (PIB) national et 43% du PIB agricole (UPDR/FAO, 2001). Madagascar occupe la troisième place des producteurs de riz en Afrique (FAO, 2016 a). Même si le riz est une denrée de très grande importance économique, sociale et politique dans le pays (Dabat *et al.*, 2004), la

production nationale n'arrive pas à satisfaire les besoins de la population malgache. Entre 2013 et 2016, la production de riz à Madagascar avoisine les 4 millions de tonnes de paddy par an (FAO, 2016 a) conduisant à l'importation en moyenne de 310 000 tonnes de riz par an (PADR, 2017).

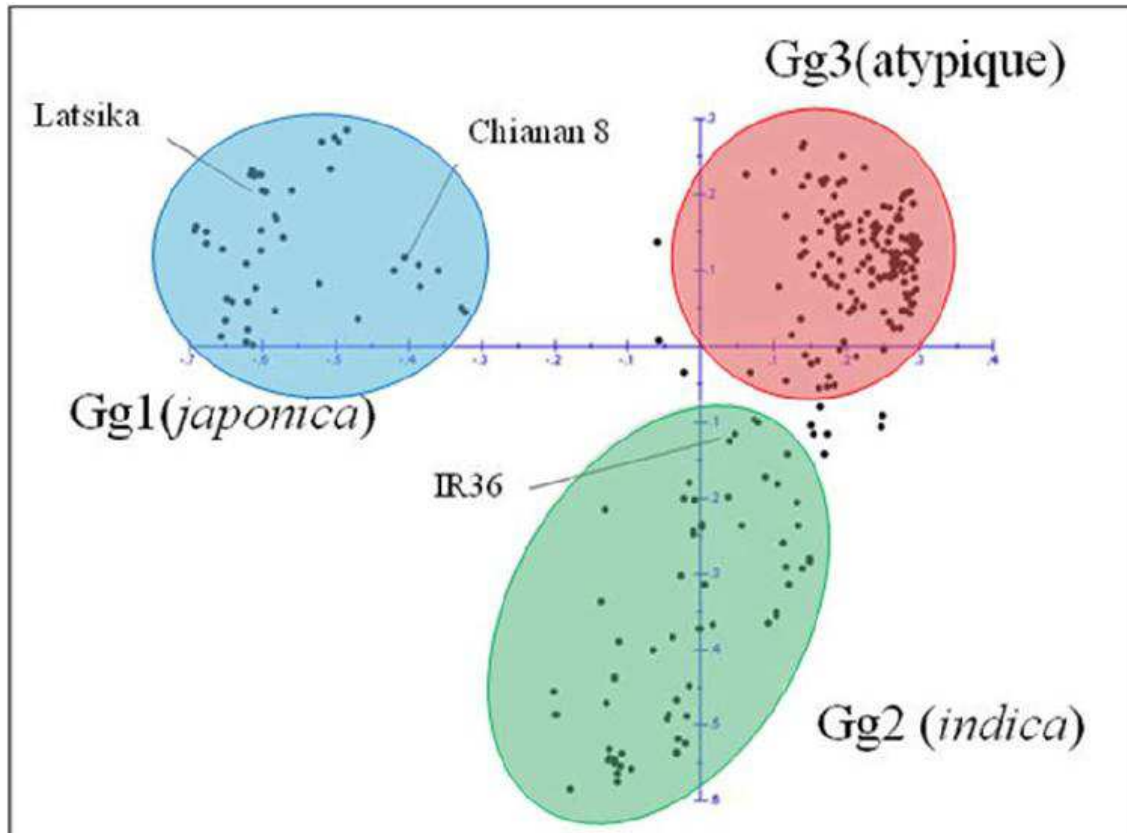


Figure 8 : Classification des variétés de riz de Madagascar en trois groupes génétiques : *indica*, *japonica* et *atypique* (Radanielina, 2010)

Pour réduire la quantité de riz importée, plusieurs stratégies nationales ont été mises en place : améliorer les conditions d'accès et les infrastructures d'irrigation, renforcer l'appui technique aux producteurs, préserver les ressources naturelles, développer les échanges et promouvoir la contractualisation entre producteurs et opérateurs, promouvoir la monétarisation des échanges et intensifier et moderniser la production. Cette dernière stratégie préconise notamment l'application de cinq piliers que sont la maîtrise d'eau, l'utilisation judicieuse d'engrais, l'utilisation de semences améliorées, l'adoption de techniques appropriées et l'utilisation de matériels agricoles, tout en prévoyant des leviers susceptibles de favoriser l'accès aux conseils agricoles, l'accès au financement, l'augmentation de superficies exploitées, l'accroissement de la valeur ajoutée.

c. *Les types de riziculture à Madagascar*

Plusieurs types de riziculture sont définis en fonction de la position des parcelles dans la toposéquence, de la hauteur de la lame d'eau et d'autres critères agronomiques. A Madagascar, essentiellement 3 types de riziculture sont décrits :

- la riziculture irriguée, qui englobe toute culture de riz qui se pratique sous une lame d'eau (riziculture irriguée à parfaite maîtrise d'eau et riziculture sans maîtrise d'eau),
- la riziculture pluviale, qui désigne une culture de riz pratiquée sur sol exondé d'un versant ou de la partie sommitale des collines et dont l'alimentation hydrique est totalement assurée par la pluie,
- la riziculture de *tavy* qui se pratique également sur les collines avec une alimentation hydrique assurée par la pluie mais après défriche et brûlis de la végétation existante (Rakotoarisoa, 2004).

La riziculture irriguée est la plus ancienne et reste dominante en superficie cultivée. L'extension en surface pour ce type de riziculture est quasiment impossible car les bas-fonds sont d'ores et déjà cultivés, même dans les zones les plus reculées du pays. Selon la disponibilité en eau d'irrigation et les conditions climatiques, la pratique de deux saisons de riz est parfois possible sur les sols de rizière, ou une saison de riz suivie d'une culture maraichère de contre-saison.

d. *La riziculture pluviale*

Concernant la riziculture pluviale, une seule saison de riz peut être conduite par manque d'eau. La culture du riz pluvial est récente par rapport au riz irrigué. Les surfaces des collines cultivées en riz pluvial (figure 9) ne cessent d'augmenter ces dernières années dans certaines régions de Madagascar comme dans les régions d'altitude du Vakinankaratra et de l'Itasy.

Sur les Hautes Terres de la région du Vakinankaratra, très peuplées, la culture du riz pluvial a connu un développement extrêmement rapide. Le riz pluvial fait désormais partie intégrante du paysage et devient même, par endroit, la culture principale.

Ce développement a été possible grâce à un programme de création variétale initié en partenariat entre le Centre national de recherche appliquée au développement rural (*FOibem-pirenena ho an'ny Fikarohana ampiarina ho Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra* : FOFIFA) et le Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) au milieu des années 1980. Ce programme a permis de créer des

séries de variétés de riz pluvial tolérantes au froid pouvant être cultivées à des altitudes allant jusqu'à 2000 m. Ces nouvelles variétés ont été soumises à un programme d'évaluation participative, pluriannuelle et multilocale et un appui initial à la production de semences grâce auxquels les premières variétés ont été adoptées par les paysans à la fin des années 1990 (Dzido *et al.*, 2004). De plus, plusieurs études ont été menées pour accompagner la diffusion du riz pluvial sur les Hautes Terres comme la compréhension de nutrition azotée sur ce type de riziculture (Rakotoarisoa *et al.*, 2010), l'effet du froid sur les variétés destinées au riz pluvial d'altitude (Shrestha *et al.*, 2012), l'analyse de l'impact de développement rapide de la riziculture pluviale sur les Hautes Terres (Breumier *et al.*, 2018).



Figure 9 : Paysage de colline ou « *Tanety* », dominé par la pratique du riz pluvial à Mananetivohitra, Région du Vakinankaratra

L'expansion du riz pluvial a été évaluée par deux enquêtes réalisées à 6 ans d'intervalle dans cette région: en 2006, seulement 32 % des paysans pratiquaient la riziculture pluviale alors qu'ils étaient 71 % en 2012 (Raboin *et al.*, 2014). Le paysage des variétés utilisées par les paysans a aussi été complètement bouleversé entre 2005 et 2011 (tableau 1). En 2006, les variétés les plus cultivées étaient FOFIFA 154 (F154 ; 53% des agriculteurs), FOFIFA 133 (F133 ; 21% des agriculteurs), FOFIFA 134 (F134 ; 10% des agriculteurs) et FOFIFA 152 (F152 ; 7% des agriculteurs). En 2012, la variété Chhomrong Dhan (ChD) était

Tableau 3 : Récapitulatif des variétés de riz pluvial diffusées par FOFIFA-CIRAD pour les Hautes Terres

Nom	Diffusion	Réponse à la pyriculariose	Parent femelle	Parent mâle	Enquête 2005-2006	Enquête 2011-2012	
					% des paysans	% des paysans	% de surface
FOFIFA 133/F133	1994	TS	Latsidahy	FOFIFA 62	21	2,6	1,9
FOFIFA 134/F134	1994	TS	Latsidahy	FOFIFA 62	10	0,3	0,5
FOFIFA 151/F151	1995	To	Latsidahy	Shin Ei	0	0	0
FOFIFA 152/F152	1995	TS	Latsidahy	FOFIFA 62	7	15,4	8,5
FOFIFA 153/F153	1995	TS	Latsibavy	Daniela	0	0	0
FOFIFA 154/F154	1995	TS	Latsibavy	FOFIFA 62	53	7,6	3,7
FOFIFA 157/F157	2000	S	Latsidahy	FOFIFA 62	0	0	0
FOFIFA 158/F158	2000	TS	FOFIFA 62	Shin Ei	0	0	0
FOFIFA 159/F159	2000	S	IRAT 114	FOFIFA 133	0	1,5	0,5
FOFIFA 161/F161	2003	S	IRAT 114	FOFIFA 133	0	2,6	1,2
FOFIFA 167/F167	2005	To	CA 148	Shin Ei	-	0	0
FOFIFA 168/F168	2005	S	Latsidahy	FOFIFA 62	-	0	0
FOFIFA 169/F169	2005	TS	Pratao	Daniela	-	0	0
			Precoce				
FOFIFA 171/F171	2006	To	ChD	SLIP 48-M-1	-	0	0
FOFIFA 172/F172	2006	R	IRAT 265	Jumli Marshi	-	0,3	0,1
Chhomrong Dhan/ChD	2006	To	Variété Népalaise		-	88,4	82,5
FOFIFA 173/F173	2012	To	ChD	?	-	-	-
SCRID 6-2-4-2-3	Elite	To	ChD	?	-	-	-
SCRID 186-32-2	Elite	To	FOFIFA 172	ChD	-	-	-
SCRID 198-15-2	Elite	To	ChD	FOFIFA 172	-	-	-

Campagne 2005-2006 (Radanielina, 2010) et 2011-2012 (Raboin *et al.*, 2014)

R : résistante ; S : sensible ; To : tolérante et TS : très sensible.

de loin la plus cultivée avec 88,4% des agriculteurs et 82,5% des surfaces consacrées à la riziculture pluviale. Les premières variétés F152, F154, F133 et F134 n'étaient plus utilisées que par 15,4%, 7,6%, 2,6% et 0,3% des utilisateurs, respectivement (Raboin *et al.*, 2014), principalement à cause de leur sensibilité à la pyriculariose. Le renouvellement variétal s'est donc fait au profit presque exclusif de la variété ChD qui devient hégémonique dans le paysage. ChD appartient au groupe morphologique d'*Oryza sativa L. ssp. japonica*. Il s'agit d'une lignée pure sélectionnée au Centre de recherche agricole de Lumleau Népal (LARC), à partir d'une variété irriguée locale et qui a été diffusée en 1991 pour des zones d'altitude au Népal. Dans son pays d'origine, ChD est connue pour sa tolérance au froid durant la phase reproductive, sa résistance à la pyriculariose et à la pourriture brune des gaines « *Sheath brown rot* », causée par *Pseudomonas fuscovaginae* (Sthapit *et al.*, 1995 ; Sthapit et

Witcombe, 1998 ; Steele *et al.*, 2009). Aucune forte attaque de pyriculariose sur la variété ChD n'a été signalée pour le moment au Népal (Sthapit, communication personnelle). A Madagascar, ChD s'adapte bien aux conditions de riziculture pluviale d'altitude. L'adoption massive de cette variété est liée à son potentiel productif même cultivée avec de faibles niveaux d'intrants (Raboin *et al.*, 2014).

Les suivis d'épidémie de pyriculariose effectués durant les campagnes 2011 à 2013 montrent que des symptômes de cette maladie sont observés sur la variété ChD mais le niveau d'attaque reste faible (avec une sévérité de pyriculariose paniculaire maximale de 7%). En d'autres termes, ChD ne bloque pas entièrement la maladie mais elle a la capacité de ralentir le développement de cette maladie. De plus, ChD présente de taille de lésions plus petite et des réponses intermédiaires par rapport aux variétés de riz pluvial sensibles d'après des tests d'inoculation artificielle par des souches de *M. oryzae* collectées en 2013 et 2014 à Madagascar (Raveloson *et al.*, 2016). En se basant sur les caractéristiques de la résistance quantitative mentionnée en début du manuscrit, ces observations suggèrent que ChD ait une résistance quantitative vis-à-vis des populations de *M. oryzae* collectées sur les Hautes Terres de Madagascar.

1.5.2. La pyriculariose du riz à Madagascar

La culture du riz à Madagascar fait face à de nombreuses contraintes abiotiques (carences en éléments nutritifs, toxicités, conditions climatiques extrêmes etc.) et biotiques (agents pathogènes, ravageurs et adventices). La prospection des maladies du riz dans quelques zones rizicoles de Madagascar faite par Buddenhagen (1985) a révélé la présence de maladies fongiques (comme la pyriculariose, la pourriture de la gaine, le bakanae ou gigantisme, l'helminthosporiose, etc.), de maladies bactériennes et de maladies causées par des nématodes. La présence des stries bactériennes du riz causée par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, a été confirmée par l'observation des symptômes et par l'analyse moléculaire (Poulin *et al.*, 2014). Pour les maladies virales du riz, l'étude conduite par Rakotomalala *et al.* (2013) montre la présence de la panachure jaune du riz (*Rice yellow mottle virus* : RYMV) à Madagascar.

Les paysans malgaches appellent la pyriculariose du cou « *Matifotsy* » qui signifie en français « *mort blanche* » à cause du dessèchement de la panicule qui fait apparaître les panicules attaquées blanches avec des grains vides alors que les panicules saines sont encore vertes en cours de remplissage des grains. La sévérité de l'attaque de cette maladie varie selon les conditions climatiques des régions suivies, les types de riziculture, les variétés

utilisées et les pratiques culturales (comme la quantité d'engrais azoté apportée). Des pertes importantes dues à la pyriculariose ont déjà été rapportées à Madagascar comme sur Makalioka 34 (Nottéghem, 1983) et sur Fofifa154 (Raboin *et al.*, 2013).

L'utilisation des produits chimiques pour lutter contre la pyriculariose n'est ni rentable ni faisable pour les paysans malgaches. Pour réduire l'impact de la pyriculariose, plusieurs études ont été menées en ciblant la plante, l'agent pathogène, les pratiques culturales et les systèmes de culture et en prenant compte des moyens de lutte praticables dans la situation de la riziculture à Madagascar (Sester *et al.*, 2008).

L'analyse des populations de *M. oryzae* de 15 pays, conduite par Saleh *et al.* (2014), montre que les populations de *M. oryzae* de Madagascar appartiennent à un groupe génétique unique et commun avec une population de Chine et les populations d'Indonésie (figure 10). Des génotypes multilocus communs ont été détectés entre Madagascar et l'Indonésie ce qui suggère que :

- soit les populations indonésiennes et malgaches proviennent du même pool génétique indépendamment,
- soit les populations malgaches viennent des populations d'Indonésie par migration.



Figure 10 : Distribution géographique des groupes génétiques de *Magnaporthe oryzae* : les populations de Madagascar appartiennent au groupe C, en bleu (Saleh *et al.*, 2014).

Les auteurs favorisent la deuxième hypothèse car la diversité des populations observée à Madagascar est faible par rapport à celles d'Indonésie et elle est cohérente avec l'histoire des migrations humaines à Madagascar (Hurles *et al.*, 2005).

La comparaison des populations de *M. oryzae* échantillonnées à Madagascar sur le riz irrigué et riz pluvial par des tests phénotypiques et par analyse moléculaire a révélé que les populations collectées sur du riz pluvial diffèrent génétiquement et sont plus agressives que celles collectées sur du riz irrigué (Andriantsimialona et Tharreau, 2008).

L'utilisation des variétés résistantes à la pyriculariose est un des moyens les plus efficaces, les moins coûteux et les plus adaptables à la condition de paysans malgaches. Le criblage et la sélection des variétés résistantes ont été conduits depuis longtemps à Madagascar sur le terrain en utilisant un test d'évaluation de la résistance sous inoculum décroissant « *Decreasing Inoculum Trial Evaluation of Rice : DITER* » (Nottéghem, 1977). Pour l'amélioration de variété pluviale d'altitude, le programme prend en compte deux contraintes majeures (le froid et la pyriculariose). Raboin *et al.* (2016) ont caractérisé la résistance des panels de variétés de riz pluvial de Madagascar et étudié leur base génétique par génétique d'association (*Genome Wide Association Studies, GWAS*). Les pratiques culturales et les systèmes de culture peuvent aussi influencer l'attaque de pyriculariose. L'exploitation des mélanges variétaux au sein de la parcelle de riz pluvial a donné des résultats intéressants. Les variétés cultivées en mélange présentent moins d'attaque de la pyriculariose par rapport aux variétés en culture pure (Raboin *et al.*, 2012 ; Raveloson *et al.* 2016). L'effet de la densité de semis, des caractéristiques de sols et des associations de culture sur le niveau d'attaque de pyriculariose a aussi été étudié. La réduction des attaques de pyriculariose a été observée sur le riz cultivé sur le sol volcanique de Betafo par rapport au sol ferrallitique d'Andranomanelatra (Sester *et al.*, 2010).

L'agriculture de conservation (système de culture sous couverture végétale), a été recommandée à Madagascar pour limiter l'érosion du sol et la baisse de fertilité sur les parcelles de collines. Ces systèmes de culture complexes permettent, grâce à l'absence de travail du sol, d'améliorer la vie biologique du sol et devraient favoriser la tolérance du riz aux maladies. Des études ont montré que la sévérité de la pyriculariose est effectivement plus faible dans les systèmes de culture en agriculture de conservation que dans le système conventionnel avec labour (Sester *et al.*, 2014). La diminution de la sévérité de la pyriculariose observée en agriculture de conservation est expliquée par la réduction du développement de la plante mais aussi par l'assimilation plus progressive de l'azote dans ce système de culture (Sester *et al.*, 2014 ; Dusserre *et al.* 2017).

1.5.3. Justification de la thèse

Chhomrong Dhan (ChD) est une variété de riz partiellement résistante à la pyriculariose. Elle est largement utilisée par les paysans et occupe 82% de la surface destinée à la riziculture pluviale sur les Hautes Terres malgaches. Le déploiement massif de ChD est un cas exceptionnel pour étudier l'évolution de la durabilité d'une résistance quantitative dans un contexte de quasi homogénéité variétale et culturale. *M. oryzae* est généralement considéré comme ayant un fort potentiel d'adaptation et ses souches sont très diversifiées.

En cas d'érosion de la résistance quantitative de la variété ChD, des populations de *M. oryzae* plus agressives apparaîtraient dans les Hautes Terres, ce qui entraînerait des épidémies de pyriculariose et des pertes de récolte avec des conséquences sur la sécurité alimentaire. Ce risque d'adaptation doit être évalué, l'évolution des populations doit être suivie et les facteurs favorisant l'initiation de l'épidémie de pyriculariose doivent être connus afin de pouvoir envisager des moyens de lutte pour pouvoir rapidement réagir en cas d'adaptation de populations de *M. oryzae* sur cette variété dominante.

1.5.4. Objectifs de la thèse

Cette thèse a pour objectif principal d'évaluer le risque d'érosion de la résistance quantitative de la variété prédominante (ChD) par l'agent pathogène de la pyriculariose et de quantifier l'ensemble des sources d'inoculum qui peuvent contribuer à la propagation des épidémies.

Les travaux conduits dans cette thèse répondront à trois questions majeures :

- Comment se passe l'érosion de la résistance partielle d'une variété déployée massivement dans le temps et dans l'espace ?

Cette étude s'appuie sur des suivis de l'évolution des épidémies de pyriculariose sur la variété ChD et sur d'autres variétés. Six villages en milieu réel et un site expérimental sur les Hautes Terres dans la région du Vakinankaratra ont été suivis pour observer l'évolution des attaques de la pyriculariose foliaire et paniculaire durant trois campagnes culturales (2014 à 2017) (chapitre II).

- Est-ce que des populations de *M. oryzae* existantes sur les Hautes Terres sont déjà adaptées à la résistance partielle de la variété ChD ?

Des collectes des souches de l'agent pathogène ont été effectuées sur la variété ChD et sur d'autres variétés pluviales durant deux campagnes (2014-2016) afin de déterminer si des souches spécifiques se développent sur la variété massivement déployée. Grâce aux banques

génétiques constituées pendant les années 2000, les populations avant et après le déploiement de ChD ont pu être comparées (chapitre III).

- Quels sont les facteurs favorisant la dispersion de la maladie en cas d'adaptation de l'agent pathogène sur une variété ?

Des tests sur le terrain ont été conduits pour caractériser les sources potentielles d'inoculum de la pyriculariose en riziculture pluviale. Ces tests consistent à évaluer la durée de survie de mycélium de *M. oryzae* sur des résidus de riz infectés par la maladie et de caractériser le rôle joué par différents organes de riz (semences, graines vides, bases de tige et pailles de riz) et par le riz irrigué dans le développement précoce d'épidémies de pyriculariose en riziculture pluviale. (Chapitre IV).

**Chapitre II. Evolution des épidémies
de pyriculariose sur le riz pluvial des
Hautes Terres**

II.1. Introduction

Selon Johnson (1984), une résistance est dite durable lorsqu'elle est effective sur une longue période même lorsqu'elle est utilisée à grande échelle dans une région où la pression de la maladie est forte. Les résistances quantitatives, qui sont supposées non spécifiques et plus durables, sont de plus en plus intégrées aux stratégies d'amélioration variétale des plantes cultivées. Cette hypothèse de durabilité est liée aux caractéristiques de la résistance quantitative contrôlé en général par plusieurs gènes (Quantitative trait loci : QTL). D'une part, l'agent pathogène a besoin de plusieurs mutations et ou recombinaisons pour pouvoir surmonter les différents mécanismes contrôlés par ces QTLs de résistance, d'autre part, la résistance quantitative n'étant pas par définition complète, elle permet la multiplication de l'agent pathogène et la pression de sélection qu'elle exerce est plus faible. Ceci entraîne une réduction du risque d'émergence des populations virulentes de l'agent pathogène (Poland *et al.*, 2009). Cependant, des tests d'inoculation en conditions contrôlées et des analyses des populations des agents pathogènes, montrent que des cas d'adaptation à la résistance quantitative peuvent avoir lieu (Montarry *et al.*, 2012 ; Delmotte *et al.*, 2014). Cette adaptation peut mener à l'érosion de la résistance quantitative. Des réponses spécifiques de certains QTLs de résistance ont été recensées et favorisent la sélection des populations d'agent pathogène plus agressives sur ces QTLs (Lê Van *et al.*, 2013 ; Gent *et al.*, 2017). D'après Caffier *et al.* (2016), la présence dans un verger de populations de *Venturia inaequalis* plus agressives aux QTLs de résistance ne se traduit pas forcément par l'érosion de la résistance quantitative sur le terrain. Les auteurs concluent que d'autres facteurs pourraient être impliqués dans le processus.

Sur les Hautes Terres malgaches, pour répondre à une forte demande en riz et face à la saturation des terres inondées permettant la riziculture irriguée, la culture du riz pluvial s'est développée sur les versants des collines. Depuis 2006, une variété de riz pluvial originaire du Népal, Chhomrong Dhan (ChD), domine très largement le paysage agricole dans les zones d'altitude. L'appréciation de cette variété par les paysans est basée sur son potentiel productif et sa capacité à bien se développer même sur des sols peu fertiles (Raboin *et al.*, 2014).

M. oryzae est généralement considéré comme ayant un fort potentiel d'adaptation (McDonald et Linde 2002 b). La pression de pyriculariose peut être forte dans les Hautes Terres de la région du Vakinankaratra. Les pertes de récolte peuvent atteindre 100% pour des variétés très sensibles. La variété ChD s'avère tolérante à la pyriculariose pour le moment car

la sévérité paniculaire maximale recensée en milieu paysan est de 7% de grains infectés durant la campagne 2012-2013 (Raveloson *et al.*, 2016).

Dans ce chapitre, des suivis de pyriculariose sur ChD et sur d'autres variétés de riz pluvial ont été conduits dans différents sites (milieu réel et dispositif expérimental) des Hautes Terres durant les campagnes 2014-2015, 2015-2016 et 2016-2017. Ces suivis ont pour objectif de vérifier si le déploiement massif à grande échelle d'une variété avec une résistance quantitative conduit à l'érosion de la résistance de cette variété ou au contraire sa durabilité pour le pathosystème riz/*M. oryzae*.

II.2. Matériels et Méthodes

II.2.1. Présentation du lieu d'étude

a. *La région du Vakinankaratra*

Dans la région du Vakinankaratra, l'agriculture est la principale activité de la population. Les activités agricoles sont très diversifiées mais le riz occupe une place importante. Radanielina (2010) a mis en évidence quatre systèmes de culture de riz dans la région : trois systèmes de riziculture irriguée se différenciant essentiellement par leur calendrier par rapport à la saison des pluies, et un système de riziculture pluviale.

Selon Razafimbelo (2005), les sols ferrallitiques rouges couvrent la plus grande partie de la région. Le climat se caractérise par deux saisons bien distinctes : une saison pluvieuse et plus chaude, d'octobre à avril ; une saison plus fraîche et sèche de mai à septembre. La région peut être subdivisée en quatre microrégions climatiques (figure 11). La zone climatique A est une zone relativement plate, à massifs isolés, caractérisée par un climat tropical chaud ; la zone climatique B est une zone de massifs montagneux, caractérisée par un climat tropical chaud, elle est relativement plus sèche que la zone climatique A ; la zone climatique C est caractérisée par un climat tropical froid d'altitude et la zone climatique D est caractérisée par un climat tropical froid d'altitude avec une influence plus accentuée du massif de l'Ankaratra. Les suivis conduits dans la région se focalisent sur le système de riziculture pluviale et en particulier dans la zone climatique C avec une altitude entre 1500 et 1750 m, choisie principalement à cause du récent développement de la riziculture pluviale d'altitude, de la disponibilité des données d'autres études (agronomiques, économiques, sociales...) et de la situation de déploiement massif d'une variété partiellement résistante.

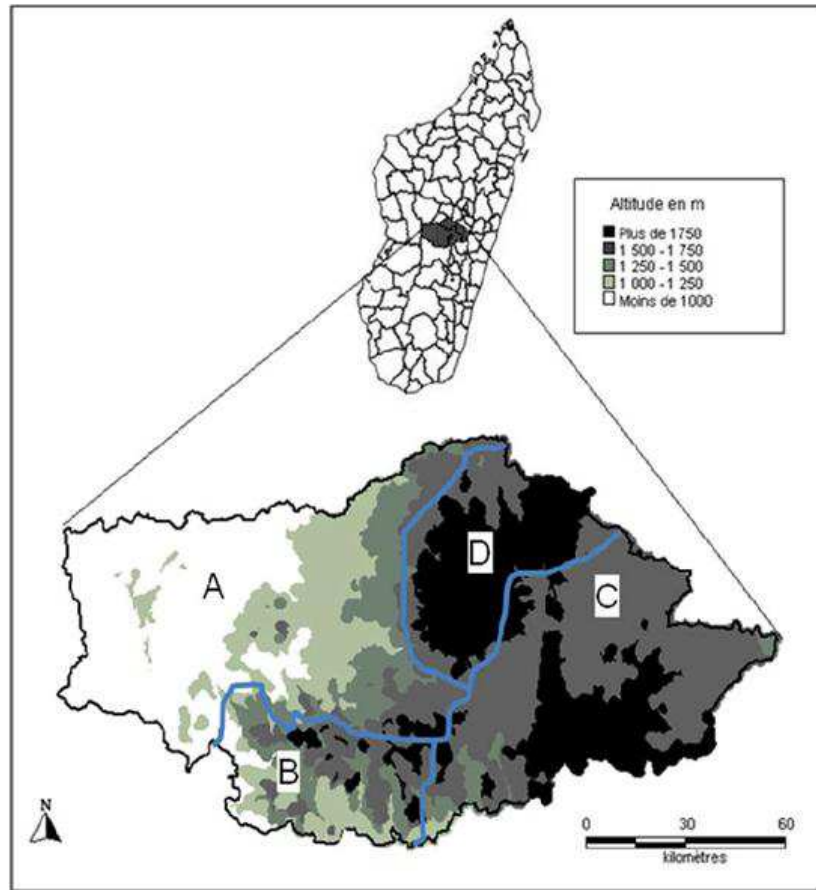


Figure 11: Carte du relief et des zones climatiques de la région du Vakinankaratra (Razafimandimby, 2005)

b. *Sites d'études*

Le choix des sites pour suivre l'évolution des épidémies de pyriculariose dans la région du Vakinankaratra a été fait principalement pour correspondre à une étendue suffisamment vaste, dans plusieurs directions et accessibles. La présence des contacts sur le site et la disponibilité d'informations sur la pratique de la riziculture pluviale constituent la première étape de sélection des sites. Puis, nous avons demandé aux techniciens des centres de service agricole de nous faire des propositions en fonction de l'accessibilité dans la commune, la coopération des paysans et la présence de la pratique du riz pluvial. Au total 6 villages en milieu réel et un site expérimental ont été retenus pour suivre l'évolution des épidémies de pyriculariose. Les 6 villages suivis en milieu réel sont : Ambatomainty, Antsapanimahazo, Fiantsonana, Mananetivohitra, Morarano et Tongarivo. Le site expérimental se trouve à Andranomanelatra où les dispositifs expérimentaux de l'équipe du

dispositif de recherche et d'enseignement en Partenariat sur les Systèmes de Production d'Altitude et Durabilité (DP SPAD) sont menés depuis plus de vingt ans.

c. *Démarche*

Pour mieux coopérer avec les paysans sur les sites et pour éviter les malentendus (sur les problèmes fonciers et l'insécurité), les suivis d'épidémies sur les parcelles ont été précédés de discussions avec le Chef du *Fokontany* (entité administrative subsidiaire), de l'organisation d'une réunion avec les paysans afin d'expliquer les objectifs de l'étude et les activités à conduire et d'une demande d'accord pour les suivis de leurs parcelles.

La collecte des informations reliées au développement des maladies a été conduite en deux étapes :

- une enquête par groupe (lors de la réunion) pour collecter les données suivantes : première année d'utilisation de la variété ChD ou « *Tsipolitra* » (nom donné par les paysans), problèmes rencontrés sur la culture du riz pluvial et du riz irrigué, les causes de ces problèmes d'après la connaissance des paysans.

- une enquête individuelle durant le suivi de la parcelle pour collecter les données suivantes : histoire de la parcelle, pratiques culturales (variété utilisée, origine des semences, traitements de semences, apport d'intrants, gestion des résidus de riz et travail du sol), problèmes rencontrés sur la parcelle et observation d'attaques de pyriculariose.

II.2.2. **Suivis des épidémies de pyriculariose**

a. *Parcelles paysannes*

Les suivis des épidémies de pyriculariose ont été effectués durant deux campagnes : 2014-2015 et 2015-2016, nommées ci-après 2015 et 2016. Dans chaque village, 20 parcelles ont été suivies donc au total 120 parcelles pour les 6 villages. Après avoir noté les coordonnées géographiques de chaque parcelle et obtenu les informations sur la parcelle, celle-ci est traversée pour rechercher des symptômes de pyriculariose. Deux observations ont été réalisées par saison dans chaque parcelle : la première a été effectuée durant la phase végétative pour l'évaluation de la pyriculariose foliaire (de janvier à mi-février) et la deuxième a été conduite après la floraison jusqu'à la maturation pour l'évaluation de la pyriculariose paniculaire (entre fin février et mars).

Pour la campagne 2016-2017 (nommée ci-après 2017), sur la base des résultats des années précédentes, un seul village (Fiantsonana) a été choisi pour vérifier l'évolution d'attaque de la pyriculariose en milieu réel.

b. *Parcelles témoins*

Durant la campagne 2016, deux parcelles témoins avec la variété ChD et la variété FOFIFA 154 (F154 : variété de riz pluvial d'altitude sensible à la pyriculariose) ont été mises en place dans les 6 sites en milieu réel (figure 12). Ces deux parcelles ont reçu la fertilisation recommandée pour la riziculture pluviale : fertilisation organique (fumier : 5 t.ha⁻¹), fertilisation minérale (NPK : 11% N, 22% P₂O₅, 16% K₂O à 300 kg.ha⁻¹), dolomie (CaMg(CO₃)₂ à 500 kg.ha⁻¹) et deux apports d'urée (46% N à 50 kg.ha⁻¹ par apport).



Figure 12 : Parcelles témoin dans le site de Fiantsonana pour la campagne 2016 : A gauche : la variété Chhomrong Dhan et à droite : la variété Fofifa 154.

c. *Notations de pyriculariose*

La mesure du niveau d'attaque de la pyriculariose dans chaque parcelle a été conduite comme suit :

- si aucun symptôme de pyriculariose n'est recensé, la parcelle est classée comme non infectée.

- Si des symptômes sont observés mais leur nombre est faible, ne permettant pas de conduire une notation du niveau d'attaque, cette parcelle est classée comme infectée avec une sévérité de la pyriculariose <1%.

- Si les symptômes sont nombreux, la notation de sévérité de la pyriculariose est conduite selon la méthode décrite par Sester *et al.* (2014) :

- la sévérité de pyriculariose foliaire a été évaluée sur 10 poquets choisis aléatoirement sur la diagonale de la parcelle attaquée. Le nombre de talles par poquet (nbT) et le nombre de talles présentant au moins un symptôme (nbTI) ont été comptés. Sur trois talles malades, le pourcentage de la surface foliaire couverte par des symptômes de pyriculariose (%SFI), a été estimé visuellement sur les quatre feuilles les plus hautes. La valeur de la sévérité foliaire au niveau de poquet (SFP) a été calculée selon la formule :

$$SFP = \%SFI \times nbTI/nbT.$$

La sévérité foliaire au niveau de la parcelle a été évaluée en faisant la moyenne des SFP des 10 poquets mesurés.

- la sévérité paniculaire a aussi été évaluée sur 10 poquets choisis aléatoirement sur la diagonale de la parcelle attaquée : le nombre de panicules par poquets (nbP) et nombre de panicules infectés (nbPI) ont été comptés, le pourcentage de grains malades (%GI) est estimé visuellement sur cinq panicules infectés. La valeur de la sévérité paniculaire (SPP) au niveau de poquet a été calculée suivant la formule :

$$SPP = \%GI \times nbPI/nbP.$$

La sévérité paniculaire au niveau de la parcelle a été évaluée en faisant la moyenne des SPP des 10 poquets mesurés.

Lorsque la parcelle présentait des symptômes de pyriculariose, des échantillons de feuilles ou de panicules malades ont été collectés pour isoler le champignon afin de conduire des analyses de la diversité et de la structure des populations de *M. oryzae*.

II.3. Résultats

II.3.1. Enquêtes de groupe

Les résultats des enquêtes en groupes permettent d'extraire les informations suivantes :

- l'arrivée de ChD dans les six villages se situe entre 2007 et 2010 ;
- les paysans interrogés n'ont pas trouvé de problème majeur en riziculture pluviale avant ou après l'utilisation de la variété ChD. En d'autres termes, cette information

peut indiquer qu'aucune forte épidémie de pyriculariose n'a pas été recensée dans ces 6 villages pour la riziculture pluviale selon la connaissance des paysans ;

- pour la riziculture irriguée de bas-fond, les gens remarquent des dégâts (panicules blanches) sur quelques parcelles à Ambatomainty mais les paysans n'arrivent pas à décrire la cause. A Antsapanimahazo et Morarano il semble s'agir de foreurs de tige car les paysans trouvent des larves dans la tige du riz portant des panicules blanches. A Fiantsonana, des panicules blanches sur plusieurs parcelles avec une variété irriguée locale « *Rojomena* » sont dues aux attaques de pyriculariose (des paysans connaissent la pyriculariose paniculaire dans ce village).

II.3.2. Enquêtes individuelles

Les réponses des paysans durant le suivi de la parcelle donnent un aperçu des pratiques culturales pour la campagne 2015 sur le riz pluvial dans les six villages (tableau 4).

- Les semences utilisées sur les 120 parcelles dans les six villages proviennent majoritairement de production des paysans mise à part lors de la récolte, soit par autoproduction (69%), soit par des échanges de semences entre les paysans (16%). Pour les 15% restants, les semences sont achetées chez des producteurs des semences. Toutes les parcelles suivies reçoivent des apports de fumier durant le semis (des doses différentes en fonction de la disponibilité pour chaque paysan). Par contre l'apport d'engrais minéral n'a été réalisé que sur 5 parcelles dans deux sites seulement à Antsapanimahazo et à Morarano (environ 40 kg de NPK par hectare). Concernant la gestion des résidus de riz, 67,5% des paysans enlèvent ces résidus pour pouvoir les vendre. Les autres paysans (32,5%) utilisent les résidus pour le fourrage du bétail. Ils les stockent en forme de piles sur leurs parcelles pluviales, à proximité de la maison. Concernant le travail du sol, le labour de 79% des parcelles suivies se fait juste avant le semis, 14% des parcelles sont labourées juste après la récolte et 7% ne sont pas labourées (en jachère). Aucun des paysans enquêtés n'a observé d'attaque de *M. oryzae* au niveau foliaire. Pour s'assurer que les paysans savaient bien reconnaître les symptômes, nous avons montré des feuilles présentant des symptômes de pyriculariose, et les paysans ont confirmé qu'ils n'ont jamais vu ce type de lésion. Cependant 6 paysans à Fiantsonana et 2 paysans à Manantivohitra connaissent la pyriculariose paniculaire et décrivent son mode de dispersion sur la parcelle. Les autres paysans ont vu des panicules blanches mais les associent à des attaques d'insectes ou des facteurs abiotiques.

Tableau 4 : Informations sur les pratiques culturales pour la campagne 2014-2015 : (exprimé en pourcentage des 20 parcelles de chaque site)

Villages	Ambatomainy	Antsapanimahazo	Fiantsonana	Mananetivohitra	Morarano	Tongarivo	Moyenne ^a
Origine des semences							
Autoproduction	75	75	55	60	70	80	69
Echange entre paysans	5	25	25	20	20	0	16
Achat	20	0	20	20	10	20	15
Fertilisation							
Fumier	100	100	100	100	100	100	100
Engrais minéraux	0	10	0	0	15	0	4
Gestion des résidus							
Stockage	25	25	55	40	30	20	32,5
Enlèvement	75	75	45	60	70	80	67,5
Gestion des parcelles							
Labour après récolte	20	10	40	15	0	0	14
Labour avant le semis	80	85	50	80	100	80	79
Jachère	0	5	10	5	0	20	7
Observation							
pyriculariose foliaire	0	0	0	0	0	0	0
pyriculariose paniculaire	0	0	30	10	0	0	7

^a moyenne pour les six sites suivis.

- La fréquence des variétés utilisées et la rotation de cultures sur les 20 parcelles de chaque site sont présentées dans le tableau 5. Pour la campagne 2015, la variété ChD occupait 104 parcelles (87% des parcelles suivies), les autres variétés de riz pluvial sont recensées sur 6 parcelles (9%) et les variétés non déterminées sur 5 parcelles (4%). Pour la campagne 2016, la variété ChD a été cultivée sur 113 parcelles (94%), les autres variétés de riz pluvial occupaient 6 parcelles (5%) et une parcelle est avec une variété non déterminée. Pendant la campagne 2017 dans le village de Fiantsonana, 17 parcelles sont cultivées avec ChD et 3 parcelles avec d'autres variétés de riz pluvial.

- La pratique des rotations culturales est majoritaire : 77 parcelles et 85 parcelles sont en riz la première année et cultivées avec d'autres cultures après pour les campagnes 2015 et 2016, respectivement. Le nombre de parcelles cultivées avec du riz deux années successives est de 43 pour la campagne 2015 et 35 pour la campagne 2016. Durant le suivi campagne 2017 à Fiantsonana, toutes les 20 parcelles en riz avaient été cultivées avec d'autres cultures l'année précédente.

Tableau 5 : Fréquence des variétés de riz et de la rotation culturale sur les 20 parcelles par village

Villages	Ambatomainy	Antsapanimahazo	Fiantsonana	Mananetivohitra	Morarano	Tongarivo	Total	(%)
Campagne 2014-2015								
Fréquence des variétés								
ChD	11	20	17	17	20	19	104	87
Autre riz pluvial	9	0	2	0	0	0	11	9
Variété ND	0	0	1	3	0	1	5	4
Rotation culturale								
riz//autre culture	15	12	17	16	5	12	77	64
riz//riz	5	8	3	4	15	8	43	36
Campagne 2015-2016								
Fréquence des variétés								
ChD	19	20	15	20	20	19	113	94
Autre riz pluvial	1	0	5	0	0	0	6	5
Variété ND	0	0	0	0	0	1	1	1
Rotation culturale								
riz//autre culture	19	11	19	17	7	12	85	71
riz//riz	1	9	1	3	13	8	35	29

ChD : Chhomrong Dhan ; ND : non déterminée.

II.3.3. Evolution d'attaque et de présence de la pyriculariose

a. Parcelles en milieu réel et en dispositif expérimental

Les suivis de pyriculariose en milieu réel (tableau 6), montrent que 2 parcelles sur les 120 suivies présentent des symptômes de pyriculariose foliaire durant la campagne 2015 dont une parcelle de ChD (sévérité <1%) et une parcelle de variété non déterminée (sévérité de 20%). Pour la pyriculariose paniculaire, 13 parcelles de ChD présentent des symptômes au niveau des panicules avec des sévérités paniculaires <1% et 2 parcelles de variétés non déterminées avec 5% et 60% de sévérités paniculaires. Pour la campagne 2016, une parcelle de ChD sur les 120 suivies présente des symptômes de pyriculariose foliaire et paniculaire avec une sévérité <1%. Le suivi effectué à Fiantsonana pour la campagne 2017 montre que les symptômes de pyriculariose sont absents sur les 20 parcelles suivies. L'attaque de pyriculariose au niveau des feuilles et panicules a été observée sur les parcelles de ChD en dispositif expérimental d'Andranomanelatra pour les campagnes 2015 et 2016 avec des sévérités <1%.

Tableau 6 : Nombre de parcelles présentant des symptômes de pyriculariose dans les six sites

Villages	Ambatomainy	Antsapanimahazo	Fiantsonana	Mananetivohitra	Morarano	Tongarivo	Total	Sévérité maximale
Campagne 2014-2015								
Pyriculariose foliaire								
ChD	0	0	0	0	1	0	1	<1%
Autre riz pluvial	0	0	0	0	0	0	0	
Variété ND	0	0	0	1	0	0	1	20%
Pyriculariose paniculaire								
ChD	0	0	7	6	0	0	13	<1%
Autre riz pluvial	1	0	0	0	0	0	1	<1%
Variété ND	0	0	0	2	0	0	2	60%
Campagne 2015-2016								
Pyriculariose foliaire								
ChD	0	0	1	0	0	0	1	<1%
Autre riz pluvial	0	0	0	0	0	0	0	
Variété ND	0	0	0	0	0	0	0	
Rotation culturale								
ChD	0	0	1	0	0	0	1	<1%
Autre riz pluvial	0	0	0	0	0	0	0	
Variété ND	0	0	0	0	0	0	0	

En résumé, sur les 6 villages et sur le site d'Andranomanelatra, les symptômes de pyriculariose foliaire et paniculaire sur la variété dominante ChD ont été observés à Fiantsonana et à Andranomanelatra durant les campagnes 2015 et 2016, à Mananetivohitra et Morarano pour la campagne 2015. Aucun symptôme n'a été recensé sur cette variété dans les trois autres villages (Ambatomainy, Antsapanimahazo et Tongarivo ; figure 13).

b. Parcelles témoins

La présence et la sévérité de la pyriculariose des parcelles témoins mises en place pour la campagne 2016 sont présentées dans le tableau 7. La variété sensible F154 a eu des attaques foliaires de 5% dans le village de Fiantsonana. Des symptômes au niveau de la panicule sur cette variété ont été observés dans trois villages : Tongarivo, Morarano et Fiantsonana avec une sévérité de pyriculariose paniculaire de <1%, 2,3% et 54,5%, respectivement. Des symptômes de pyriculariose sur la variété ChD ont été observés sur un seul site à Fiantsonana avec des notations de la sévérité de pyriculariose foliaire de 0,05% et une sévérité de pyriculariose paniculaire de 3,8%.

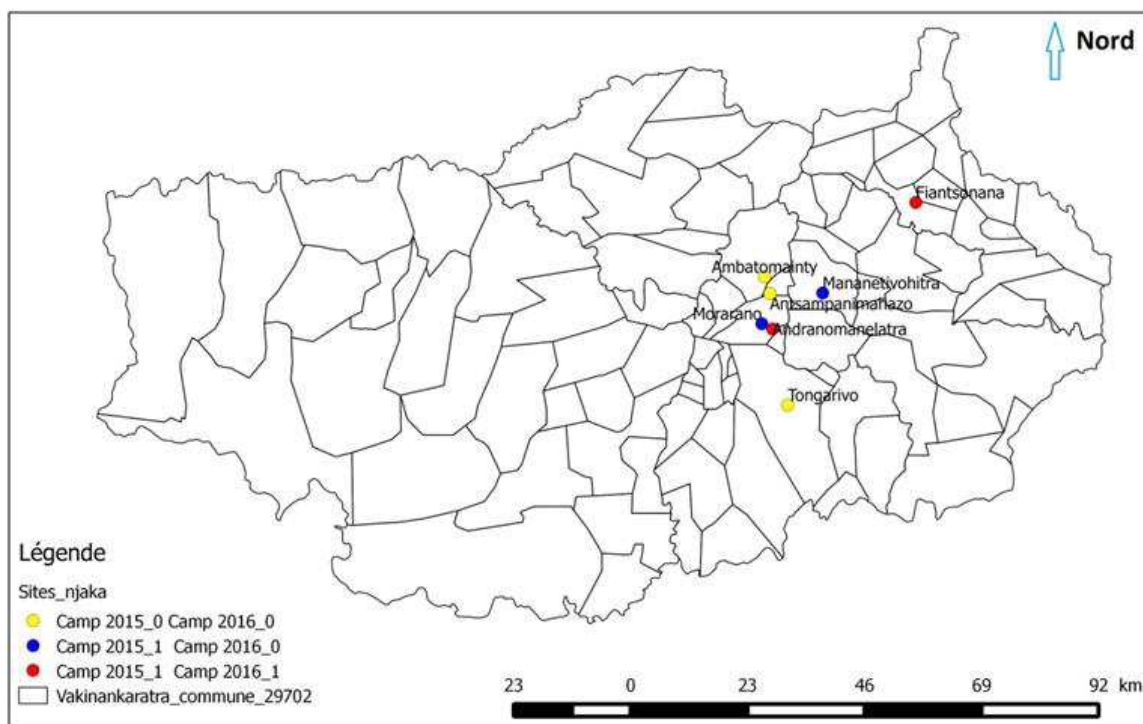


Figure 13 : Distribution géographique et présence des symptômes de pyriculariose sur Chhomrong Dhan dans les 6 sites suivis :

Point jaune : absence de symptômes sur la variété ChD pour les deux campagnes ; point bleu : symptômes sur la variété ChD campagne 2014-2015 mais absence de symptôme pour la campagne 2015-2016 et point rouge : présence de symptômes durant les deux campagnes.

Tableau 7 : Attaque de pyriculariose foliaire et paniculaire sur la variété ChD et la variété F154 dans les six sites pour la campagne 2016

Villages	Ambatomainty	Antsapanimahazo	Fiantsonana	Mananetivohitra	Morarano	Tongarivo
Sévérité de pyriculariose foliaire en (%)						
ChD	0	0	0,05	0	0	0
F154	0	0	5,0	0	0	0
Sévérité de pyriculariose paniculaire en (%)						
ChD	0	0	3,8	0	0	0
F154	0	0	54,5	0	2,3	< 1

II.4. Discussion

Durant l'enquête en 2015, 69% des parcelles ont été semées avec des graines issues des parcelles des paysans (autoproduction de semences). Le risque de développement de la pyriculariose est élevé en autoproduction de semences car elle augmente la possibilité d'utiliser des semences malades. Or, l'implication de semences infectées sur l'initiation de la pyriculariose au champ est soutenue par plusieurs études (Long *et al.*, 2001 ; Guerber et

TeBeest, 2006). L'échange de semences (16% des parcelles suivies) entre les paysans pourrait favoriser la dispersion de la pyriculariose entre les parcelles, villages, communes ou régions. En effet, la migration de *M. oryzae* à longue distance par le mouvement des matériels infectés d'un lieu à l'autre est suspectée (Saleh *et al.*, 2014).

La pratique de la culture de riz deux années consécutives n'est pas recommandée pour le riz pluvial. Pour la pyriculariose, *M. oryzae* peut survivre sur les résidus de riz restant sur la parcelle (voir chapitre IV, Raveloson *et al.*, 2018). En conditions favorables, le champignon sporule, se disperse et initie de nouvelles épidémies sur le riz de la saison suivante. Le risque d'attaque est d'autant plus grand lorsque la variété utilisée est la même pour les deux années. Cette pratique n'est pas majoritaire (43 parcelles sur 120 en 2015 et 35 parcelles sur 120 en 2016).

Le stockage des résidus sur des parcelles en riz pluvial est pratiqué sur environ un tiers des parcelles et constitue une des pratiques culturales qui peuvent augmenter l'initiation de l'attaque de pyriculariose. En effet, les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse montrent que *M. oryzae* survit sur les résidus infectés au moins entre 2 campagnes et ces résidus infectés sont des sources potentielles d'inoculum primaire pour la campagne suivante (Raveloson *et al.*, 2018).

Certaines pratiques culturales utilisées par les paysans dans ces six sites pourraient réduire les épidémies de pyriculariose. La rotation culturale (avec haricot, patate douce et d'autres cultures) est effectuée sur 77 parcelles pour la campagne 2015 et 85 parcelles pour la campagne 2016. La conduite de rotations pourrait créer des conditions peu favorables pour la survie de *M. oryzae* dans ces parcelles.

Le fait que ChD soit majoritaire et très tolérante entraîne une très faible pression de pyriculariose. Dans ces conditions, l'implication des pratiques culturales sur le niveau de maladie est impossible à mesurer.

La majorité des paysans utilise le fumier pour la fertilisation de leur parcelle. Les 5 parcelles sur les 120 parcelles suivies qui sont fertilisées reçoivent une quantité faible d'azote. La fertilisation utilisée peut donc être considérée comme faible dans les parcelles de ces six villages et peu favorable au développement des épidémies (Long *et al.*, 2000). Pour la variété ChD, nous n'avons pas observée plus de symptômes sur les parcelles fertilisées en milieu paysan. D'après Ballini *et al.* (2013), il y a des rapports contradictoires sur l'effet de « Nitrogen Induced Susceptibility » (NIS) avec la résistance quantitative. Par conséquent, la vérification de l'interaction du métabolisme azoté et de la résistance quantitative de ChD sera intéressante à conduire par des expérimentations en conditions contrôlées.

Les résultats des suivis de l'épidémie de pyriculariose effectués sur la variété ChD et sur d'autres variétés de riz pluvial durant trois campagnes (2015, 2016 et 2017) montrent que le niveau d'attaque de cette maladie reste faible. Aucun symptôme de pyriculariose n'a été observé sur la variété dominante ChD dans trois des villages suivis. Des symptômes sur les feuilles et les panicules ont été observés dans les autres villages avec des sévérités inférieures à 1%. La très forte différence de niveau d'attaque paniculaire entre ChD (3.8%) et la variété sensible F154 (54.5%) observée dans le village de Fiantsonana, suggère que la pyriculariose n'a pas disparu, mais que la résistance quantitative de ChD reste encore très efficace vis-à-vis des populations existantes dans ce village et qu'elle est responsable du faible niveau de maladie.

Ces suivis d'évolution épidémique de la pyriculariose durant trois campagnes semblent soutenir l'hypothèse de la durabilité de l'utilisation de la résistance quantitative (Parlevliet, 2002). Cette efficacité durable d'une résistance quantitative a été observée sur une variété de blé, Apache, partiellement résistante à la rouille brune de blé, maladie provoquée par *Puccinia triticina*, pendant plus d'une dizaine d'année (Papaïx *et al.*, 2011 ; Azzimonti *et al.*, 2013). Cette durabilité de la variété Apache a été expliquée par l'absence de pathotype spécifique de l'agent pathogène sur cette variété.

Le faible niveau d'attaque recensé sur la variété dominante ChD indique l'absence de l'érosion de sa résistance quantitative durant une longue période (une dizaine d'année) même dans des conditions d'homogénéité variétale. Dans d'autres études, le contournement de résistance apparaît en quelques années dans une telle situation surtout avec une variété ayant une résistance qualitative (McDonald and Linde, 2002 a).

Dans le pathosystème houblon/*Podosphaera macularis*, en revanche, Gent *et al.* (2017) ont montré une érosion graduelle de la résistance quantitative de la variété « Cascade » après 15 ans de déploiement. Cette érosion s'est manifestée par l'augmentation de la sévérité de l'oïdium et l'apparition de populations de *P. macularis* plus agressives et plus spécifiques sur cette variété. La variété ChD est diffusée depuis 12 ans à Madagascar et il est possible que la situation du riz pluvial des Hautes Terres soit similaire avec une érosion très progressive et lente, qui nécessitera de poursuivre les suivis en milieu paysan pendant plusieurs années encore pour pouvoir réagir très rapidement en cas d'adaptation du pathogène.

II.5. Conclusion partielle de la partie II

Les pratiques culturales recensées d'après l'enquête conduite dans les six sites suivies ne peuvent pas être reliées aux attaques de pyriculariose observées dans ces sites.

Les suivis de l'évolution des attaques de pyriculariose en milieu réel et en dispositif expérimental montrent que le niveau de la maladie sur ChD reste faible avec des sévérités foliaire et paniculaire inférieures à 1% sur les parcelles présentant des symptômes. Même sur les parcelles témoins avec des apports d'intrants recommandés pour le riz pluvial, l'attaque de pyriculariose sur ChD n'a été observée que dans un seul site des six sites suivis, Fiantsonana. Nos observations suggèrent que la résistance quantitative de ChD reste efficace contre la pyriculariose. Pour avoir des informations complémentaires, la structure et la diversité de populations de *M. oryzae* sur les Hautes Terres ont été analysées.

**Chapitre III. Effet de la résistance
quantitative d'une variété de riz sur les
populations de *Magnaporthe oryzae***

III.1.Introduction

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer la capacité d'adaptation des populations d'un agent pathogène à la résistance quantitative. Selon Lannou (2012), les composantes d'agressivité qui sont le plus couramment mesurées dans un pathosystème sont l'efficacité de l'infection, la période de latence, le taux de production de spores, la taille des lésions et, pour certains pathogènes, la production de toxines. Les marqueurs moléculaires neutres sont aussi souvent utilisés pour l'étude de la diversité et de la structure des populations et de leur adaptation aux résistances quantitatives.

L'adaptation locale de populations d'un agent pathogène à une résistance peut être suivie de deux manières : la première consiste à comparer la performance d'une population pathogène sur l'hôte avec lequel elle a été échantillonnée (sympatrique) et sur d'autres hôtes (allopatrique) et est considérée comme le critère « *home vs. away* » d'après Kawecki et Ebert (2004) et la deuxième consiste à comparer la performance d'une population pathogène sur son hôte sympatrique avec celle d'autres populations pathogènes provenant d'hôtes allopatriques et est considérée comme le critère « *local vs. foreign* » d'après Kawecki et Ebert (2004). Ces deux manières apportent des informations différentes. L'une met en évidence un coût d'adaptation et l'autre révèle des différences dans la pression de sélection imposée par les différents hôtes. Dans le cas d'étude sur la résistance quantitative, la comparaison est effectuée par des tests d'inoculation croisée entre les différentes populations de l'agent pathogène et les variétés testées (Delmotte *et al.*, 2014 ; Delmas *et al.*, 2016).

Pour le pathosystème riz/*Magnaporthe oryzae*, les données sur les résistances quantitatives et l'adaptation de l'agent pathogène à ces résistances sont peu nombreuses. Bonman *et al.* (1989) ont trouvé des différences d'agressivité des souches de *M. oryzae* en fonction de leur pays d'origine (Philippines versus Corée) sur des variétés *japonica* tempérées ayant de la résistance quantitative. Des expériences pour comparer la durabilité de la résistance quantitative et de la résistance qualitative ont été conduites en Colombie dans un site avec une forte pression de maladie (Correa-Victoria et Zeigler, 1995). Les résultats montrent que les lignées qui ont un niveau de résistance élevé gardent leur efficacité vis-à-vis des populations de *M. oryzae* après trois campagnes d'évaluation. La caractérisation des gènes responsables de la résistance quantitative est importante pour la compréhension de leurs fonctions. En 2008, Ballini *et al.* ont recensé 350 QTLs du génome du riz associés à la résistance quantitative à la pyriculariose dont certains ont été cartographiés. La

compréhension du mode d'action de la résistance quantitative sur les étapes de l'infection par *M. oryzae* commence ainsi à être élucidée. Cependant, l'effet du déploiement d'une résistance quantitative à grande échelle sur l'évolution des populations de *M. oryzae* reste peu documenté.

Dans la présente étude, nous évaluerons l'effet du déploiement massif d'une variété, Chhomrong Dhan (ChD), sur les populations de *M. oryzae* sur les Hautes Terres. Cette étude exploitera des populations de *M. oryzae* échantillonnées entre 2001 et 2006 (Andriantsimalona *et al.*, données non publiées) et entre 2014 et 2016 en combinant des données génétiques et phénotypiques pour répondre aux questions suivantes :

- Y-a-t-il des différences génétiques entre les populations de *M. oryzae* échantillonnées sur la variété ChD et sur d'autres variétés de riz pluvial ?
- Y-a-t-il des différences génétiques entre les populations de *M. oryzae* échantillonnées avant et après le déploiement de la variété ChD ?
- Est-ce que les populations actuelles (campagne 2015) collectées sur ChD sont plus agressives que les populations collectées sur d'autres variétés la même campagne ?
- Y-a-t-il eu une évolution de l'agressivité des populations échantillonnées sur ChD entre les campagnes 2015 et 2016 ?

III.2. Matériel et méthodes

Différentes étapes de manipulation traitant les souches de *M. oryzae* et deux techniques (l'analyse moléculaire qui a été réalisé à l'unité mixte de recherche Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite : UMR BGPI du CIRAD, Montpellier et le test phénotypique qui a été fait au laboratoire de phytopathologie du Centre Régional de Recherche : CRR du FOFIFA, Antsirabe) sont conduites pour voir si le déploiement d'une variété ayant une résistance quantitative influence l'évolution des populations de *M. oryzae*. L'ensemble de ces étapes est présenté sur la figure 14.

III.2.1. Echantillonnage, isolement et conservation des populations de *Magnaporthe oryzae*

a. Collecte des échantillons

Des échantillons de feuilles et de panicules du riz malades ont été collectés durant les campagnes 2014-2015 et 2015-2016 (nommées 2015 et 2016). Les échantillonnages ont été réalisés sur les mêmes sites que ceux du chapitre II. Pour la campagne 2015, la collecte

d'échantillons était prévue sur des parcelles de ChD et d'autres variétés de riz pluvial qui sont proches dans chaque site. En cas de présence d'attaque de la pyriculariose sur ces parcelles, environ 30 échantillons ont été collectés par parcelle et par stade de développement (foliaire et paniculaire). Pour la campagne 2016, cet échantillonnage s'est focalisé sur les deux parcelles de ChD et de Fofifa 154 (F154) mises en place dans les six villages (chapitre II).

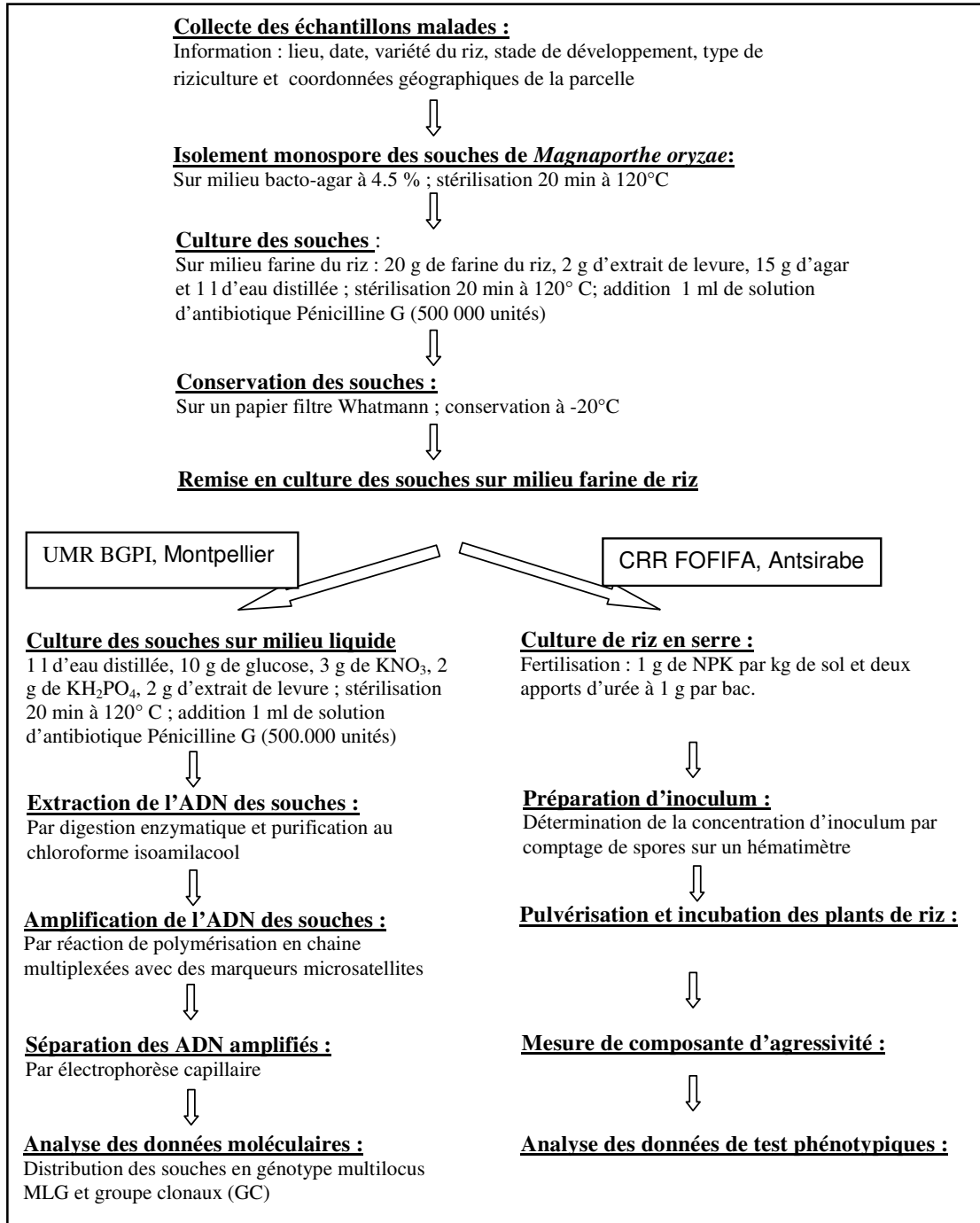


Figure 14 : Etapes de traitement des souches de *Magnaporthe oryzae* durant l'analyse moléculaire et le test phénotypique

b. *Populations de Magnaporthe oryzae*

L'isolement monospore de *M. oryzae* est réalisé à partir d'une seule feuille ou une panicule malade qui est placée dans une chambre humide pour stimuler la sporulation. Puis, une conidie est prélevée et cultivée dans une boîte de Pétri contenant d'un milieu farine de riz. Lorsque le mycélium s'est développé, un implant est prélevé et mis sur un papier filtre déposé sur le milieu (figure 15). Une fois colonisé par le champignon, ce papier filtre est séché, découpé en petit morceaux qui sont transférés dans une petite enveloppe stérile. Cette dernière est scellée sous vide dans une gaine en plastique avant la conservation à -20 °C.

Les souches échantillonnées dans une parcelle, sur une variété et à un même stade de développement ont été considérées comme faisant partie de la même population. Au total, 20 populations de *M. oryzae* échantillonnées ont été utilisées : 4 populations échantillonnées sur la variété ChD (62 souches au total), 3 populations sur la variété Fofifa 152 (51 souches), 1 population sur la variété Fofifa 161 (17 souches) et 3 populations sur des variétés non déterminées (48 souches) pour la campagne 2015 et 4 populations sur la variété ChD (76 souches) et 5 populations sur la variété Fofifa 154 (97 souches) pour la campagne 2016. Le tableau 8 résume les caractéristiques des populations isolées au laboratoire du centre régional de recherches du FOFIFA (Antsirabe).

Entre 2001 et 2006, au total 455 souches ont été génotypées par Andriantsimalona *et al.* (données non publiées). La majorité de ces souches a été échantillonnée sur les variétés de riz pluvial d'altitude Fofifa : F152 (37 souches), F154 (161 souches), F161 (184 souches) et sur d'autres variétés (73 souches). Elles seront considérées comme des témoins des populations de *Magnaporthe oryzae* dans la région avant le déploiement de ChD.

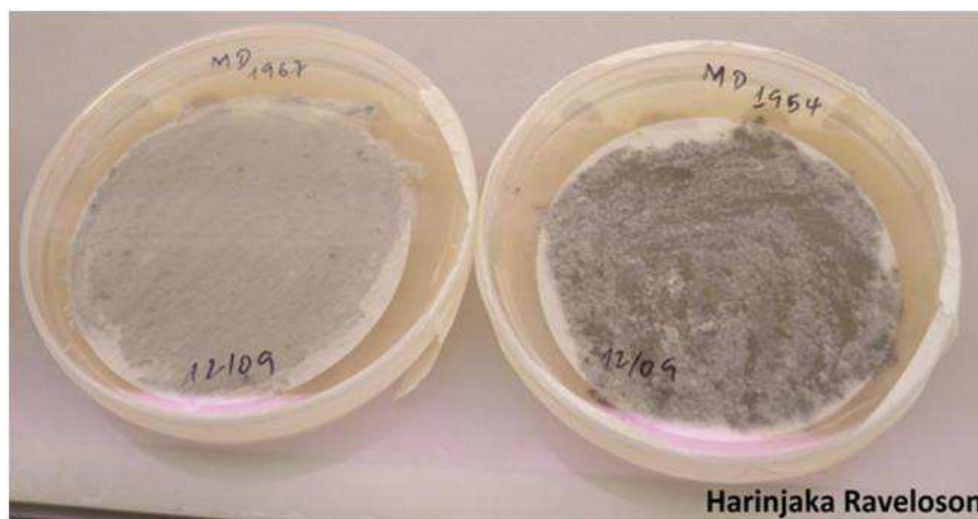


Figure 15 : Souches de *Magnaporthe oryzae* colonisant le papier filtre Whatmann

Tableau 8 : Description des populations de *Magnaporthe oryzae* isolées pour les campagnes 2015 et 2016

nom des populations	nombre de souches	nom des variétés*	stade de développement	lieu de collecte	Année	test phénotypique
pop1	10	ChD	P	Mananetivohitra	2015	oui ^a
pop2	15	nd	P	Mananetivohitra	2015	oui ^a
pop3	14	F152	F	Andranomanelatra	2015	-
pop5	19	ChD	P	Fiantsonana	2015	oui ^{a et b}
pop6	16	ChD	P	Andranomanelatra	2015	oui ^a
pop7	17	ChD	P	Mananetivohitra	2015	oui ^a
pop8	17	F161	P	Fiantsonana	2015	oui ^a
pop9	17	F152	P	Andranomanelatra	2015	oui ^a
pop10	12	nd	P	Morarano	2015	-
pop14	21	nd	P	Mananetivohitra	2015	oui ^a
pop15	20	F152	P	Andranomanelatra	2015	-
pop16	18	ChD	F	Fiantsonana	2016	-
pop17	17	ChD	F	Fiantsonana	2016	-
pop19	20	F154	F	Fiantsonana	2016	-
pop23	21	ChD	P	Fiantsonana	2016	oui ^b
pop27	20	F154	P	Fiantsonana	2016	-
pop28	20	ChD	P	Andranomanelatra	2016	-
pop29	20	F154	P	Andranomanelatra	2016	-
pop30	20	F154	P	Morarano	2016	-
pop31	17	F154	P	Tongarivo	2016	-

* : variété sur laquelle les souches ont été isolées ; nd : variété non déterminée ; ChD : Chhomrong Dhan, F152, F154 et F161 : séries de variété du Fofifa ; stade de développement : F : feuilles et P : panicules ; ^a : 5 souches de la population sont utilisées pour le premier test phénotypique et ^b : 10 souches de la population sont utilisées pour le deuxième test phénotypique.

III.2.2. Analyse moléculaire des souches de *Magnaporthe oryzae*

a. *Extraction et amplification d'ADN*

Les 351 souches échantillonnées durant les campagnes 2015 et 2016 sont remises en culture sur le milieu farine de riz. Après 4 jours, le mycélium de chaque souche est transféré et ensemencé dans 1.5 ml de milieu de culture liquide (fig.14). Le développement du champignon dans ce milieu liquide se fait pendant 4 jours à 25 °C dans l'obscurité. Puis, le mycélium est récupéré dans le puits à l'aide d'une spatule, il est séché avec du papier absorbant et est déposé dans un tube Eppendorf de 2 ml. La digestion des parois cellulaires est initiée en présence de 1.5 ml d'enzyme Vinoflow avec une incubation de 2 heures à la température ambiante. Après cette digestion enzymatique, l'extraction d'ADN de ces souches a été conduite selon le protocole décrit par Adreit *et al.* (2007) (annexe 2).

L'ADN obtenu est amplifié avec 12 couples d'amorces qui correspondent à des marqueurs microsatellites spécifiques pour *M. oryzae* (Kaye *et al.*, 2003 ; Adreit *et al.*, 2007). L'amplification a été réalisée selon les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) multiplexées (plusieurs loci microsatellites peuvent être amplifiés simultanément) en utilisant le kit QIAGEN et en suivant le cycle de la PCR (annexe 2).

Les produits amplifiés sont dilués à 1/70. Pour le génotypage, 1.5 µl de produit dilué est mélangé avec 12 µl de marqueur de taille Gene Scan-500 LIZ mélangé avec du tampon Formamide Hidi (Applied Biosystems). La séparation des produits obtenus se font par une électrophorèse capillaire réalisée sur un séquenceur automatique ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'identification des allèles se fait en jouant sur la taille des allèles (figure 16) et sur les différentes couleurs des marqueurs. Puis, le logiciel Gene Mapper est utilisé pour identifier les allèles à partir des électrophorégrammes.

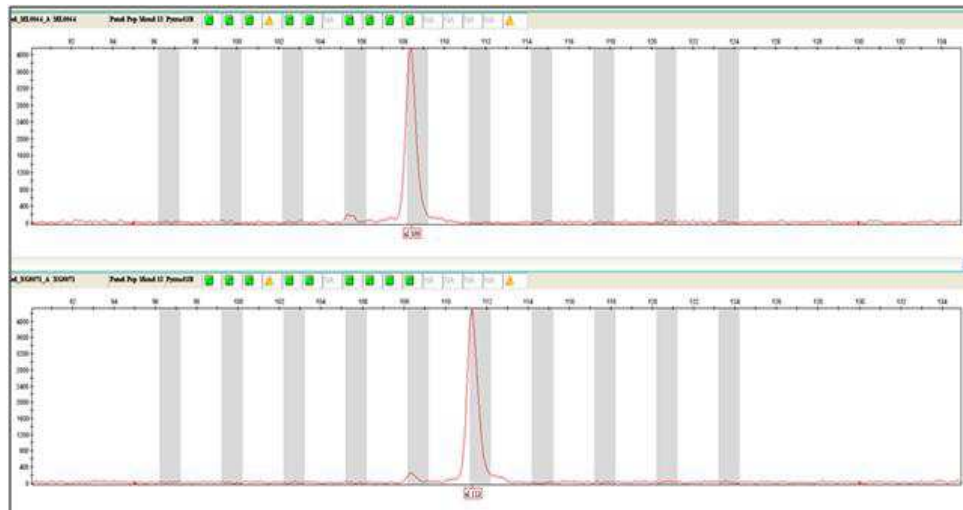


Figure 16 : Exemple d'électrophorégrammes des allèles de *Magnaporthe oryzae* différent par leur taille.

b. *Distribution en génotypes multilocus et groupes clonaux*

Les souches ayant les mêmes allèles aux 12 loci microsatellites sont regroupées dans un même génotype multilocus (MLG). Cette opération est réalisée à l'aide d'une macro Excel élaborée par Jean Peccoud de l'UMR Ecologie et Biologie des Interactions, Université de Poitiers. Ces MLGs ont été groupés en groupes clonaux (GC) en fonction de leur proximité génétique et du nombre de souches dans chaque MLG. Chaque MLG représenté par 5 souches ou plus a été considéré comme un GC. Chaque MLG représenté par moins de 5 souches a été rattaché au GC le plus proche génétiquement.

Le test exact de Fischer a été effectué pour déterminer si la distribution et la fréquence des souches dans des groupes clonaux sont indépendantes entre les variétés (ChD et autres variétés, par sites), entre les campagnes (2015 et 2016) et entre les périodes (avant et après le déploiement massif de la variété ChD) où ces souches ont été échantillonnées.

Pour les populations de *M. oryzae* échantillonnées sur la variété ChD et échantillonnées sur d'autres variétés de riz pluvial, l'indice de diversité génotypique a été mesuré selon la formule de Nei en 1978 :

$$h = 1 - \sum f_i^2$$

Où h est l'indice de diversité et f_i est la fréquence d'un groupe clonaux i.

III.2.3. Test phénotypique par inoculation artificielle

a. *Deux tests phénotypiques*

Le premier test phénotypique concerne la comparaison des populations de *M. oryzae* collectées sur la variété ChD et sur d'autres variétés, pour la campagne 2015, dans trois villages (Andranomanelatra, Fiantsonana et Mananetivohitra). Quarante souches ont été utilisées : 20 souches de ChD (5 souches de la population 1 (pop1), 5 de la pop5, 5 de la pop6 et 5 de la pop7) et 20 souches venant d'autres variétés (5 souches de la pop2, 5 de la pop8, 5 de la pop9 et 5 de la pop14). Chaque souche est pulvérisée sur 4 variétés ayant des niveaux différents de résistance à la pyriculariose (ChD, partiellement résistante ; F161, partiellement résistante ; F152, sensible et Kasalath, très sensible). L'ensemble de l'expérimentation est refait trois fois (3 répétitions).

Le second test phénotypique concerne la comparaison des populations de *M. oryzae* échantillonnées à partir de la variété ChD pendant les deux campagnes culturales 2015 versus 2016, dans le village de Fiantsonana. Vingt souches (10 souches de la pop5 de 2015 versus 10 souches de la pop23 de 2016) sont pulvérisées sur deux variétés (ChD, partiellement résistante et F154, sensible à la pyriculariose). L'ensemble de l'expérimentation a été conduite en 4 répétitions.

b. *Culture de riz dans la serre*

Cinq kg de sol sont mélangés avec une fertilisation minérale (NPK : 11% N, 22% P₂O₅, 16% K₂O) avec un ratio de 1 g.kg⁻¹ de sol et transférés dans un bac plastique. Les semences de 4 variétés (ChD, F152, F161 et Kasalath) pour le premier test phénotypique et de 2 variétés (ChD et F154) pour le deuxième test, sont semées dans un bac pour

l'inoculation avec une souche. Deux apports de 1 g d'urée (46% N) en solution par bac sont effectués 14 jours après la levée et un jour avant l'inoculation. Ces bacs sont laissés pendant 4 semaines dans la serre avant l'inoculation pour des plantules à un stade de 3 à 4 feuilles (figure 17).



Figure 17 : Bacs avec des plants de riz à tester

c. *Préparation de l'inoculum*

Chaque souche utilisée pour l'inoculation est cultivée pendant 10 jours sous une lumière blanche de 12 heures par jour sur le milieu farine de riz. Le mycélium est gratté avec un racloir et recouvert avec de l'eau distillée. La suspension est filtrée avec des linges fins pour récupérer des conidies sans mycélium. La concentration de l'inoculum est ajustée à 50.000 conidies par ml en utilisant un hématimètre et additionnée avec 1% de gélatine. Trente ml de cette suspension sont pulvérisés par bac de 64 plantules de riz. Les bacs sont placés dans des conditions de forte hygrométrie pour favoriser la germination des spores. Après 7 jours les symptômes sont examinés.

d. *Mesure des composantes d'agressivité*

La mesure des composantes d'agressivité est basée sur les méthodes utilisées par Gallet *et al.* (2014). Ces composantes d'agressivité comportent :

- l'efficacité d'infection (par le comptage du nombre de lésions),
- la colonisation à l'intérieur de la plante hôte (par l'estimation de la surface de lésions)

- la capacité de sporulation (par le comptage du nombre de spores produites).

Pour chaque variété testée, quatre plantes sont choisies pour évaluer ces composantes d'agressivité. Le nombre de lésions est compté sur une surface de 5 cm² au milieu de la deuxième feuille pour chaque plante. Puis la surface de chaque lésion observée est estimée en utilisant une échelle avec des gabarits dont la surface est connue (figure 18). Les quatre fragments de feuilles utilisées pour le comptage du nombre de lésions (5 cm²) sont mélangés dans un tube en verre contenant 1 ml de Tween à 0.02%. Les tubes sont placés à 25 °C pendant 48 h pour induire la sporulation. Puis ces tubes subissent une agitation à l'aide d'un vortex pour détacher les conidies. Les conidies en suspension sont ensuite dénombrées avec un hématimètre.

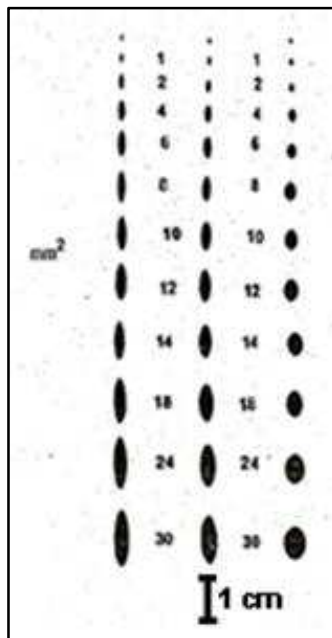


Figure 18 : Modèle d'échelle pour l'estimation de la surface des lésions : (de 0.5 à 30 mm²)

III.2.4. Analyse statistique

Les données obtenues des tests phénotypiques (nombre de lésions, taille des lésions, production de spores par lésion et production de spores par unité de surface de lésion) ont été explorées en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) avec la version R 3.2.5 (R Core Team, 2016). Pour la comparaison entre des souches venant de ChD et celles des autres variétés, l'équation du modèle est la suivante :

$$X = a + v_i + o_j + s_k + r_l + b_{ij} + c_{ik} + \epsilon$$

où X est la transformée de la variable quantitative ($X = \log(\text{var} + 1)$), a est la constante, v_i est l'effet de la variété inoculée i, o_j est l'effet de la variété d'origine des souches j, s_k est l'effet

de la souche testée k , r_l est l'effet de la répétition l , b_{ij} est l'interaction entre variété inoculée et variété d'origine, c_{ik} est l'interaction entre variété inoculée et souche testée et \mathcal{E} est l'erreur résiduelle.

Pour la comparaison des souches échantillonnées sur la variété ChD en 2015 et celles échantillonnées en 2016, l'équation du modèle est la suivante :

$$Y = a + v_i + u_m + s_k + r_l + b_{im} + c_{ik} + \mathcal{E}$$

Y est la transformée de la variable quantitative ($Y = \log(\text{var} + 1)$), a est la constante, v_i est l'effet de la variété inoculée i , u_m est l'effet de l'année d'échantillonnage m , s_k est l'effet de la souche testée k , r_l est l'effet de la répétition l , b_{im} est l'interaction entre variété inoculée et année d'échantillonnage, c_{ik} est l'interaction entre variété inoculée et souche testée et \mathcal{E} est l'erreur résiduelle.

Les données pour toutes ces comparaisons subissent une transformation logarithme de variable plus 1 pour normaliser et homogénéiser les résidus.

III.3. Résultats

III.3.1. Populations de *Magnaporthe oryzae* échantillonnées

Des suivis d'épidémie de la pyriculariose ont été réalisés sur des parcelles avec la variété ChD et d'autres variétés pendant les campagnes 2015 et 2016 dans six villages en milieu paysan et sur un site expérimental. Pour la campagne 2016, des parcelles avec ChD et F154 ont été mises en place dans les six villages. Durant les suivis de ces parcelles, aucune attaque de pyriculariose n'a été observée dans certains villages. Dans les autres villages, le niveau de la maladie recensé sur la variété ChD est resté faible, même sur des parcelles qui présentaient des symptômes (résultats chapitre II). Par conséquent, l'échantillonnage des populations de *M. oryzae* sur la variété ChD et sur d'autres variétés n'a été possible que dans 3 sites (Mananetivohitra, Fiantsonana et Andranomanelatra) pour la campagne 2015 et dans 2 sites (Fiantsonana et Andranomanelatra) pour la campagne 2016.

III.3.2. Structure et diversité des populations de *Magnaporthe oryzae*

a. *Structure génotypique des souches de Magnaporthe oryzae sur les Hautes Terres*

L'analyse de 806 souches à l'aide de 12 marqueurs microsatellites, a permis leur distribution en 110 génotypes multilocus (figure 19 A et B). A cause de données manquantes,

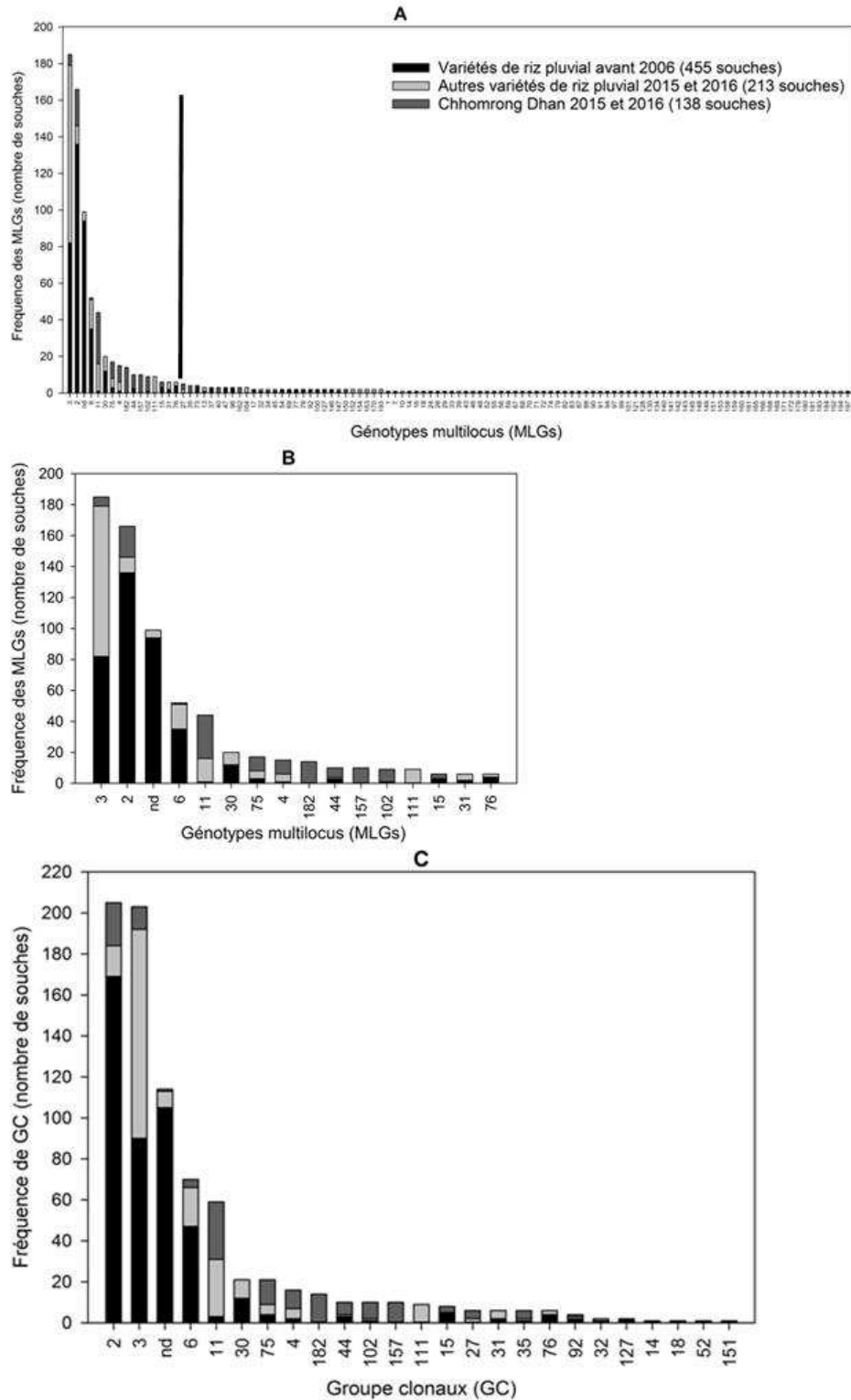


Figure 19 : Distribution en génotypes multilocus et en groupes clonaux de souches échantillonnées en riziculture pluviale sur les Hautes Terres : A : avec tous les MLGs, B : avec les MLGs représentés par plus de 6 souches (indiqué par la barre verticale en A), C avec tous les GC. nd : non déterminé.

98 souches n'ont pas pu être attribuées avec certitude à des MLGs définis et par conséquent ont été classées comme non déterminées (nd). Les 2 MLGs les plus fréquemment observés sont : MLG 3 avec 185 souches et MLG2 avec 166 souches occupant 43% du total des souches analysées. Les MLG 6 et 11 sont représentés par 52 et 44 souches, respectivement. Huit des MLGs sont représentés par 9 à 20 souches. Les MLG restant sont représentés par un faible nombre de souches entre 1 et 6. Cette distribution de toutes les souches en MLGs donne une vue générale de la structure génotypique, mais pour pouvoir comparer les souches échantillonnées sur différentes variétés, le regroupement des MLGs (en fonction de leur proximité génétique) en groupes clonaux a été réalisé. La figure 19 C représente la distribution des souches en 24 groupes clonaux (GC). Seize souches ne peuvent pas être assignées avec certitude à un GC. Par conséquent avec les 98 souches dont le MLG n'est pas défini, il y a au total 114 souches non assignées à des GC et occupant 14% du total des souches analysées. Les 2 GC les plus fréquemment observés sont : GC 2 avec 205 souches et GC 3 avec 203 souches représentant la moitié des souches analysées. Puis, 5 GC occupant 25 % de l'ensemble de souches sont représentés par 14 à 70 souches. Les GC restants sont représentés par inférieur ou égal à 10 souches (figure 19 C).

b. *Structure et diversité génotypique entre les variétés d'origine*

Pour caractériser la structure et la diversité génotypique entre les variétés, les populations de *M. oryzae* échantillonnées sur la variété ChD et échantillonnées sur d'autres variétés de riz pluvial ont été comparées dans trois sites en 2015 et dans deux sites en 2016 (tableau 9). A Manantivohitra en 2015, 3 GC et 3 GC sont spécifiques pour la variété ChD et les variétés non déterminées, respectivement. Trois GC sont communs entre les deux. A Fiantsonana en 2015, 2 GC et 2 GC sont spécifiques pour ChD et F161, respectivement. Un GC est commun entre ChD et F161. En 2016, dans ce même site, 2 GC sont partagés par ChD et F154, 4 GC sont observés sur ChD et 2 GC sont observés sur F154. A Andranomanelatra en 2015, 4 GC et 5 GC sont spécifiques pour ChD et F152, respectivement. Deux GC sont communs entre les deux variétés. En 2016, 4 GC et 4 GC sont spécifiques pour ChD et F154, respectivement.

Les résultats de cette comparaison effectuée pour chaque site et pour chaque campagne montrent que la distribution en GC des populations échantillonnées sur la variété ChD diffère significativement (test exact de Fischer) à celles des souches échantillonnées sur d'autres variétés de riz pluvial. Puis la comparaison de l'ensemble des souches échantillonnées sur ChD dans tous les sites et pour les deux campagnes à celles des souches

échantillonnées sur d'autres variétés révèle que 11 GC sont communs pour ChD et autres variétés. Cinq GC et 5 GC sont échantillonnés seulement sur ChD et seulement sur d'autres variétés, respectivement (tableau 9). L'analyse montre aussi que les proportions des souches dans chaque GC diffèrent entre elles (Test exact de Fischer, $P < 0.001$).

Tableau 9 : Distribution des populations de *Magnaporthe oryzae* en groupes clonaux avec les souches échantillonnées sur la variété Chhomrong Dhan et sur d'autres variétés de riz pluvial

Période	2015						2016				2015 et 2016				avant 2006	
	Mananetivohitra		Fiantsonana		Andranomanelatra		Fiantsonana		Andranomanelatra		tous		tous		tous	
Variété	ChD	Avnd	ChD	F161	ChD	F152	ChD	F154	ChD	F154	ChD		Autre variété de riz pluvial		variété de riz pluvial	
Groupe clonaux	nombre de souches		nombre de souches		nombre de souches		nombre de souches		nombre de souches		nombre de souches	en %	nombre de souches	en %	nombre de souches	en %
2	8	4			5	6	8				21	15,2	15	7,0	169	37,1
3	2	21			7	29	2	17		8	11	8,0	102	47,9	90	19,8
nd			1	1		1		3		2	1	0,7	8	3,8	105	23,1
6	3			7		12	1				4	2,9	19	8,9	47	10,3
11		3		9			28	15			28	20,3	28	13,1	3	0,7
30									9		9	4,2			12	2,6
75	9	4				1	3				12	8,7	5	2,3	4	0,9
4			8		1			5			9	6,5	5	2,3	2	0,4
182										14	14	10,1				
44						1			6		6	4,3	1	0,5	3	0,7
102					1				7		8	5,8	1	0,5	1	0,2
157			10								10	7,2				
111													9	4,2		
15									3		3	2,2			5	1,1
27	4										4	2,9	2	0,9		
31		3											4	1,9	2	0,4
35						1			4		4	2,9	1	0,5	1	0,2
76										1			2	0,9	4	0,9
92		1			1						1	0,7	1	0,5	2	0,4
32											1	0,5	1	0,5	1	0,2
127															2	0,4
14															1	0,2
18															1	0,2
52					1						1	0,7				
151	1										1	0,7				
Total	27	36	19	17	16	51	56	40	20	20	138	100	213	100	455	100
h	0.76	0.62	0.543	0.547	0.695	0.606	0.663	0.658	0.725	0.625	0.894		0.734		0.758	
Dif.	0,14		-0,004		0,089		0,005		0,1		0,16				0,136	(-0,024)

ChD : variété Chhomrong Dhan; Avnd : autres variétés non déterminées ; F152, F154 et F161 : série de variété de Fofifa ; nd : groupement des souches non distribuées dans un groupe clonal.

h : indice de diversité des populations de *M. oryzae*

Dif. : Différence entre l'indice de diversité des populations échantillonnées sur ChD et sur d'autres variétés de riz. La différence entre l'indice de diversité entre des populations des variétés de riz échantillons récents et avant 2006 est entre parenthèse.

En prenant en compte la comparaison dans chaque site et pour chaque campagne, l'indice de diversité se situe entre 0,54 à 0,76 pour les populations de *M. oryzae* échantillonnées sur ChD et entre 0,55 à 0,69 pour les populations échantillonnées sur d'autres variétés de riz pluvial. Ensuite, la différence de l'indice de diversité de ChD à celui d'autre variété ne dépassent pas 0.14 en valeur absolue. Pour tous les sites et les deux campagnes (2015 et 2016), les indices de diversité sont 0,89 et 0,73 pour ChD et pour les autres variétés, respectivement (tableau 9). Ces données obtenues indiquent que les populations de *M. oryzae*

échantillonnées sur la variété ChD ont à peu près la même diversité génotypique que celles des populations échantillonnées sur d'autres variétés.

c. *Structure et diversité génotypique entre les périodes*

L'étude de l'évolution des populations de *M. oryzae* dans le temps a été réalisée en comparant les échantillons sur ChD (138 souches), sur d'autres variétés de riz pluvial (213 souches) pour les campagnes (2015 et 2016) et sur des variétés de riz pluvial (455 souches) avant 2006. Quatre GC sont spécifiques pour les souches échantillonnées sur la variété ChD, 1 GC est spécifique pour les autres variétés de riz pluvial des campagnes 2015 et 2016 et 3 GC sont spécifiques pour les variétés de riz pluvial avant 2006. 16 GC concernent des souches de ChD et des autres variétés de riz pluvial avant ou après 2006 (tableau 9). La comparaison de la structure génétique des souches basée sur ces groupes clonaux montre qu'il y a une différence significative entre les souches échantillonnées sur la variété ChD, sur les autres variétés de riz en 2015 et 2016 et sur les variétés de riz avant 2006 (Test exact de Fischer, $P = 0,0005$). La majorité des GC sont détectés dans les échantillons prélevés avant 2006 et dans les échantillons récents mais cette différence est observée au niveau des proportions de souches dans chaque GC.

Les indices de diversité sont 0,89, 0,73 et 0,76 pour ChD, pour d'autres variétés de riz (échantillons récents) et variétés de riz (avant 2006), respectivement. Ces données indiquent que les populations de ChD sont légèrement plus diversifiées par rapport aux populations des variétés de riz avant 2006. Par contre, ces indices font apparaître une ressemblance en termes de diversité génotypique entre les populations des variétés de riz pluvial pour les échantillons récents (2015 et 2016) et échantillons avant déploiement de ChD (avant 2006).

d. *Structure génotypique entre des sites*

La distribution en GC des souches échantillonnées sur la variété ChD entre les sites a également été examinée. Pour la campagne 2015, les souches de la variété ChD se distribuent en 11 GC, dont 3 GC sont communs pour deux des trois sites, 4 GC spécifiques pour Mananetivohitra, 1 GC spécifique pour Fiantsonana et 3 GC spécifiques pour Andranomanelatra (figure 20). Pour la campagne 2016, les souches de la variété ChD se distribuent en 10 GC, dont 6 spécifiques de Fiantsonana et 4 spécifiques d'Andranomanelatra (figure 20). La structure génotypique des populations échantillonnées sur la variété ChD varie donc entre les trois sites pour la campagne 2015 et entre les deux sites pour la campagne 2016.

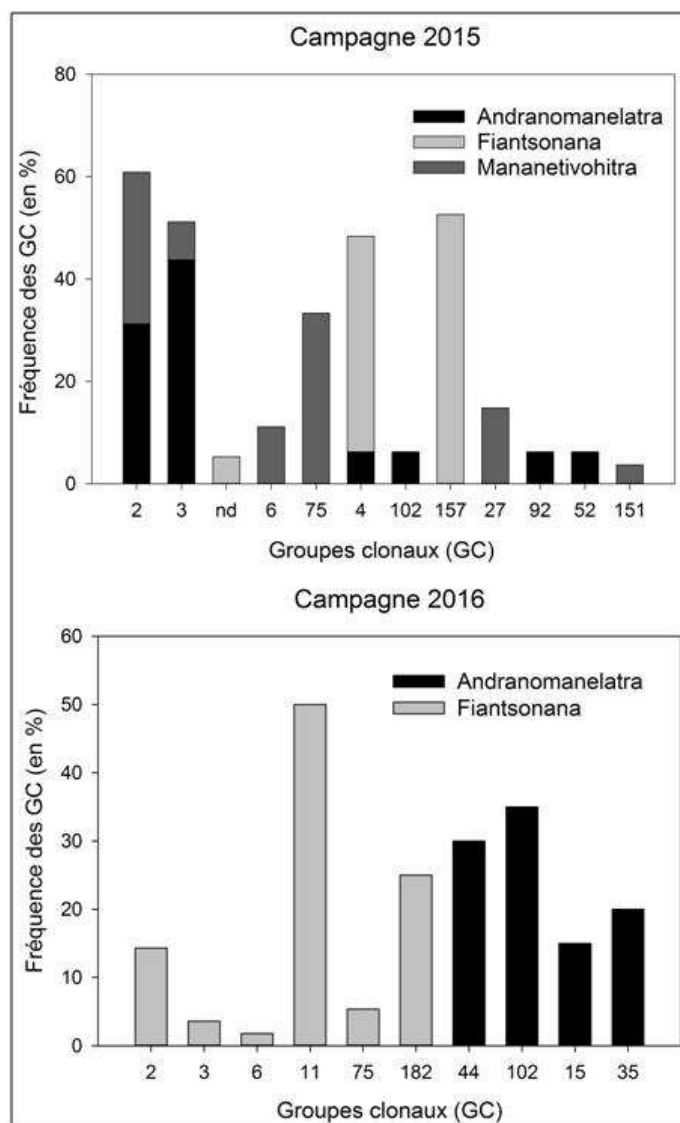


Figure 20 : Distribution en groupes clonaux (GC) des souches échantillonnées sur la variété Chhomrong Dhan sur les trois sites : Andranomanelatra, Fiantsonana et Mananetivohitra

e. Structure génotypique en fonction des années

Deux sites (Fiantsonana et Andranomanelatra) ont permis de comparer la structure génétique des souches échantillonnées sur la variété ChD en 2015 à celles de 2016. A Fiantsonana, les souches de la variété ChD se distribuent en 8 GC, dont 2 GC sont présents en 2015 et 6 GC sont présents en 2016. A Andranomanelatra, les souches de la variété ChD se distribuent en 9 GC, dont 5 GC sont présents en 2015, 3 GC sont présents en 2016 et 1 GC est présent pour les deux campagnes (figure 21). Les résultats révèlent que la distribution des souches en GC diffère entre les campagnes 2015 et 2016 à Fiantsonana (test exact de Fischer, $P < 0,001$) et à Andranomanelatra (test exact de Fischer, $P < 0,001$).

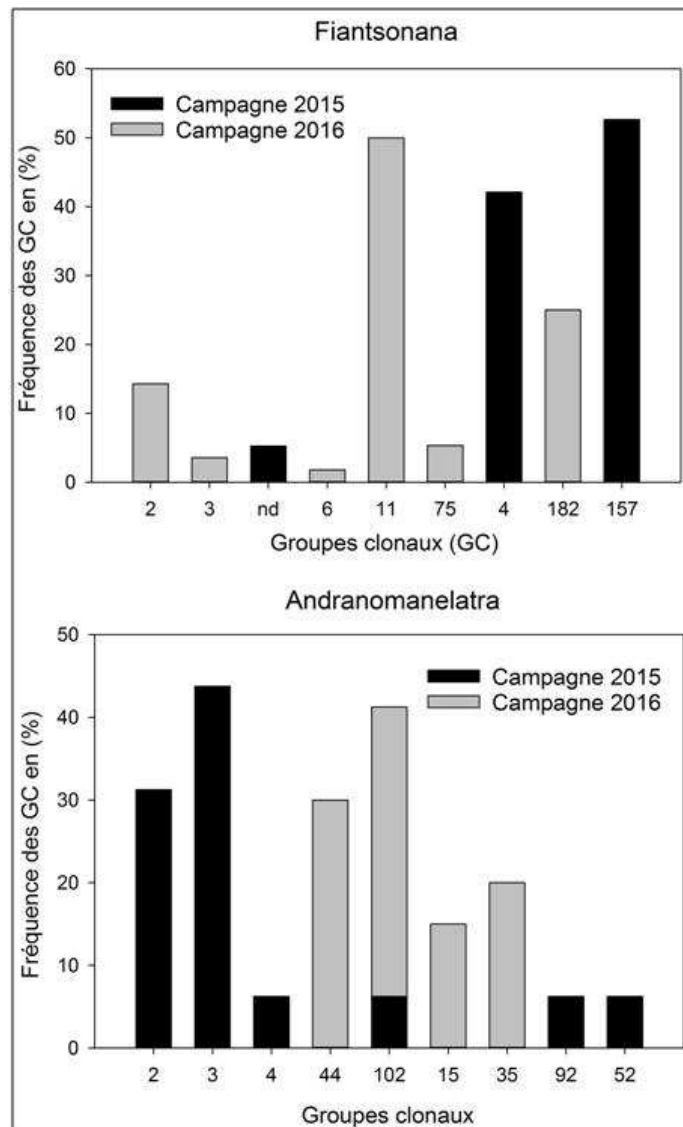


Figure 21 : Distribution en groupes clonaux (GC) de souches échantillonnées sur la variété Chhomrong Dhan entre deux campagnes : 2015 et 2016

III.3.3. Pouvoir pathogène des souches de *Magnaporthe oryzae*

a. *Comparaison des populations de Magnaporthe oryzae échantillonnées sur la variété ChD et sur d'autres variétés de riz pluvial.*

Pour tester l'adaptation potentielle des souches à la variété ChD, nous avons comparé le pouvoir pathogène des souches échantillonnées en 2015 sur ChD et celui des souches issues d'autres variétés. Vingt souches échantillonnées sur ChD (10 souches pour le site de Mananetivohitra, 5 souches pour Fiantsonana et 5 souches pour Andranomanelatra) et 20 souches échantillonnées sur d'autres variétés (10 souches sur deux variétés non déterminées

pour le site de Manantivohitra, 5 souches sur F161 pour Fiantsonana et 5 souches sur F152 pour Andranomanelatra) ont été inoculées sur quatre variétés (ChD, F161, F152 et Kasalath) et trois composantes d'agressivité ont été mesurées : l'efficacité d'infection (nombre de lésions), la colonisation des tissus de l'hôte (surface de lésions) et la capacité de sporulation (production de spores par lésion et production de spores par unité de surface de lésion). L'ANOVA (tableau 10) n'a pas mis en évidence d'effet significatif de la variété d'origine sur les composantes d'agressivité. Des effets significatifs de la répétition, de la variété inoculée (ChD, F161, F152 et Kasalath) et de la souche testée (40 souches) ont été recensés sur tous les paramètres mesurés (tableau 10).

Tableau 10 : Analyse de variance des composantes d'agressivité avec 20 souches échantillonnées sur Chhomrong Dhan et 20 souches échantillonnées sur d'autres variétés en 2015

Facteurs	DL	nombre de lésions		surface de lésions (mm ²)		spores par lésion		spores par mm ²	
		F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value
Réplication	2	26,6	<0,0001	39,34	<0,0001	9,54	<0,0001	10,33	<0,0001
Variétés d'origine	1	1,02	0,31	0,37	0,53	0,017	0,89	0,0031	0,95
Variétés inoculées	3	36,96	<0,0001	104,8	<0,0001	103,71	<0,0001	73,56	<0,0001
souches testées	38	4,92	<0,0001	5,83	<0,0001	3,73	<0,0001	3,5	<0,0001
variétés d'origine x variétés inoculées	3	1,39	0,24	1,36	0,25	0,93	0,43	0,82	0,47
souches testées x variétés inoculées	114	0,63	0,99	0,62	0,99	1,18	0,13	1,21	0,1

Pour prendre en compte les effets locaux sur les populations et pour tester d'avantage si l'agressivité des populations de *M. oryzae* échantillonnées sur ChD et sur d'autres variétés est différente, la comparaison par paires des populations échantillonnées sur des parcelles voisines a été réalisée pour chaque variété inoculée. Des paires de populations venant de trois sites sont donc comparées :

- Manantivohitra: population (pop1) venant de ChD versus pop14 venant d'une variété non déterminée et pop7 venant de ChD versus pop2 venant d'une autre variété non déterminée
- Fiantsonana: pop5 venant de ChD versus pop8 venant de F161
- Andranomanelatra : pop6 venant de ChD versus pop9 venant de F152

Les résultats de comparaison des populations venant de ces trois sites sont présentés dans la figure 22. La plupart des populations venant de ChD et des populations venant d'autres variétés a le même niveau d'agressivité sur les 4 variétés inoculées et pour toutes les composantes d'agressivité. Par contre, une différence entre certaines populations a été

observée. Les pop7 et pop2 diffèrent pour le nombre de lésions et la surface de lésion sur la variété ChD (avec pop7 venant de ChD plus agressive que pop2 figure 22 A), entre pop1 et pop14 pour la surface de lésion sur la variété Kasalath (avec pop1 venant de ChD plus agressive que pop14 figure 22 B) et entre pop6 et pop9 pour le nombre de lésions sur la variété F161 (avec pop9 venant de F152 plus agressive que pop6 figure 22 D). Des cas de différence presque significative (P-value entre 0,05 et 0,1) ont été recensés pour certaines populations : entre pop7 et pop2 pour les spores par lésion sur la variété ChD et pour les spores par unité de surface sur les variétés ChD et Kasalath (fig. 22 A) et entre pop6 et pop9 pour la surface de lésion sur les variétés F161 et Kasalath (fig. 22 D).

b. Comparaison du pouvoir pathogène des populations de *Magnaporthe oryzae* en 2015 et en 2016

Pour tester une évolution potentielle du pouvoir pathogène des souches échantillonnées sur la variété ChD dans le temps, une comparaison du pouvoir pathogène des souches échantillonnées en 2015 et en 2016 à Fiantsonana a été réalisée. Dix souches par année d'échantillonnage sont inoculées sur deux variétés (ChD et Fofifa 154). Les quatre paramètres d'agressivité ont été mesurés. Les résultats de cette comparaison sont présentés dans la figure 23. L'analyse de variance n'a pas mis en évidence d'effet significatif de l'année d'échantillonnage, ni d'interaction avec la variété inoculée sur les composantes d'agressivité. Pour la variété inoculée, aucune différence n'a été observée sur la surface de lésion, la production de spores par lésion et la production de spores par unité de surface de lésion. Par contre, l'analyse révèle un effet variété inoculée qui est observée sur le nombre de lésions (P = 0,02). Des effets significatifs de la répétition et des souches testées ont été observés sur tous les paramètres mesurés.

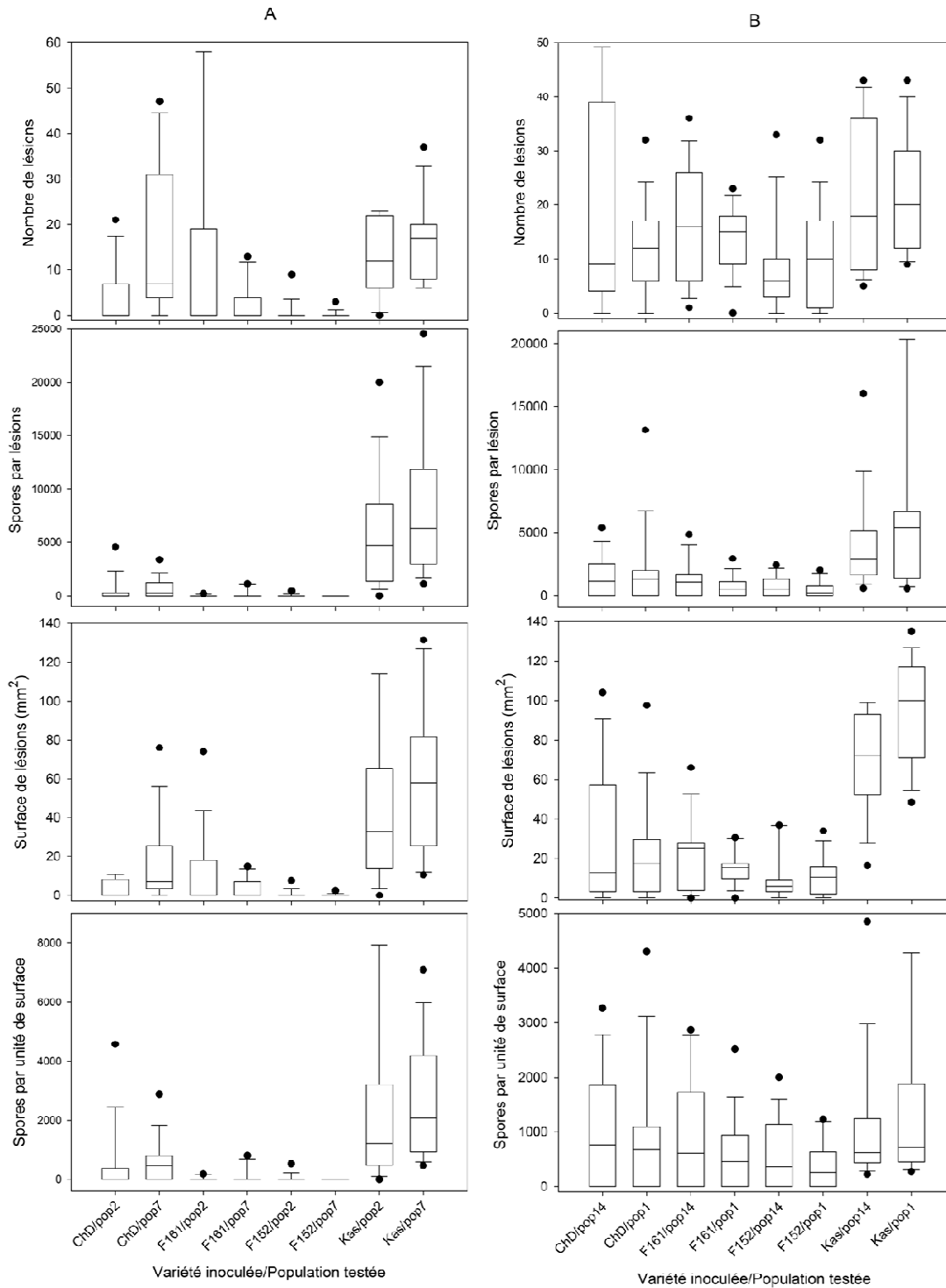


Figure 22 : Boîte à moustache pour les 4 composantes d’agressivité représentant la comparaison des populations de *Magnaporthe oryzae* échantillonnées sur Chhomrong Dhan et sur d’autres variétés :

A : population 2 vs population 7, B : population 14 vs population 1 (Mananetivohitra) ; les 4 variétés inoculées : Chhomrong Dhan (ChD), FOFIFA 161 (F161), FOFIFA 152 (F152) et Kasalath (Kas).

Les limites des boîtes représentent les quartiles supérieur et inférieur, la ligne représente la médiane, les moustaches représentent les valeurs minimale et maximale et les points en cercle noir représentent les valeurs extrêmes.

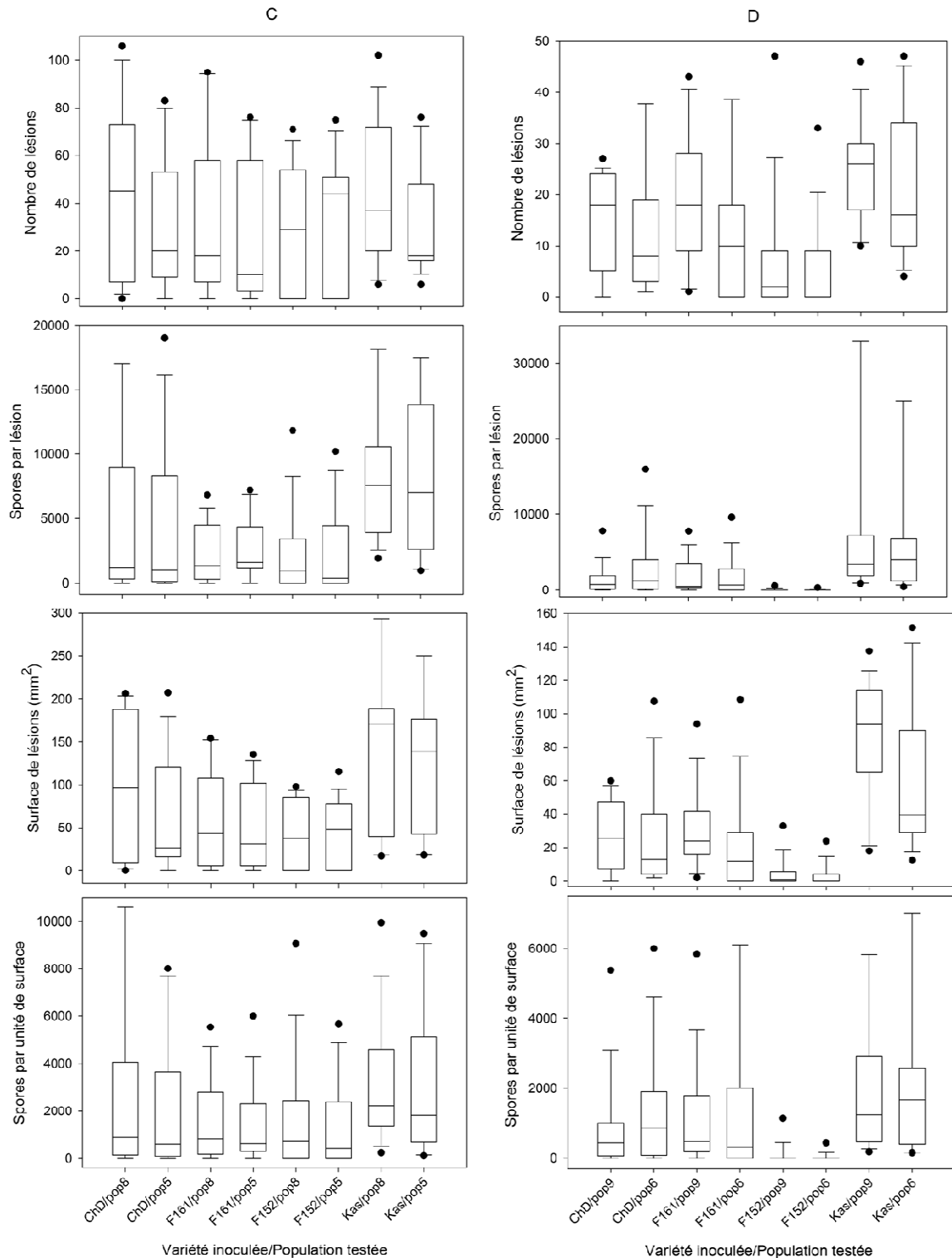


Figure 22 (suite) : Boîte à moustache pour les 4 composantes d'agressivité représentant la comparaison des populations de *Magnaporthe oryzae* échantillonnées sur Chhomrong Dhan et sur d'autres variétés :

C: population 8 vs population 5 (Fiantsonana) et D: population 9 vs population 6 (Andranomanelatra).

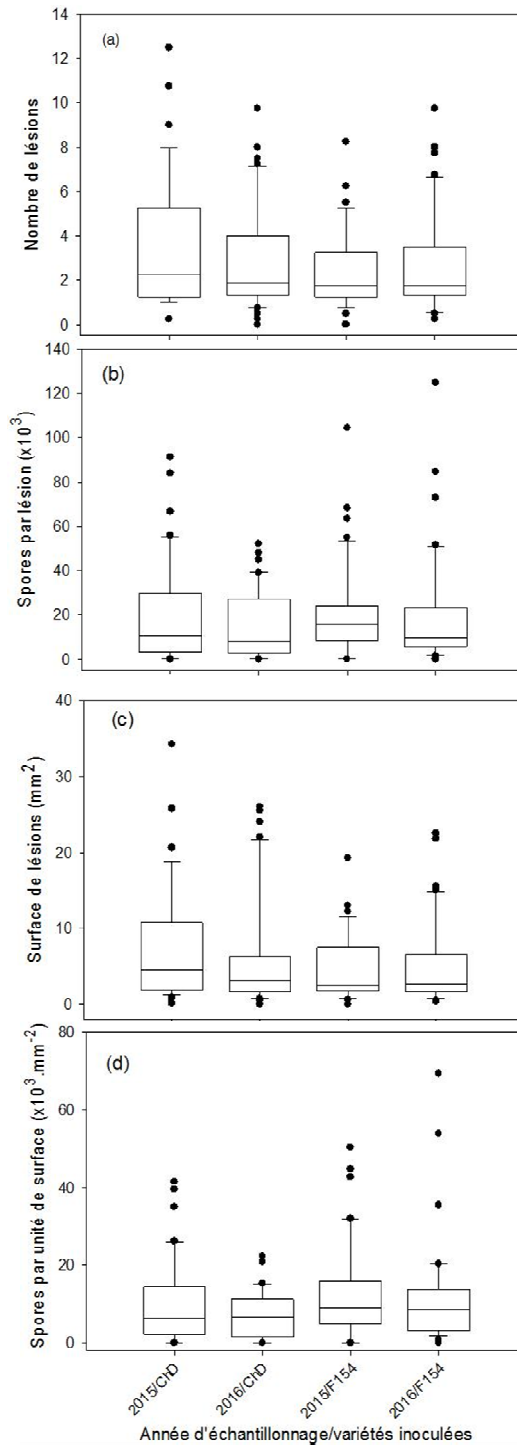


Figure 23 : Boîte à moustache représentant l'agressivité de 10 souches de *Magnaporthe oryzae* de la campagne 2015 et 10 souches de la campagne 2016 venant de Chhomrong Dhan sur le site de Fiantsonana inocuées sur deux variétés (ChD et Fofifa 154) :

a : efficacité de l'infection (nombre de lésions), b : capacité de sporulation (production de spores par lésion), c : colonisation des tissus de l'hôte (surface de lésions) et d : capacité de sporulation (production de spores par unité de surface de lésion en mm²).

Les limites des boîtes représentent les quartiles supérieur et inférieur, la ligne représente la médiane, les moustaches représentent les valeurs minimale et maximale et les points en cercle noir représentent les valeurs extrêmes.

III.4. Discussion

L'adaptation des populations de *M. oryzae* à la variété dominante Chhomrong Dhan (ChD), partiellement résistante à la pyriculariose, a été évaluée sur les Hautes Terres de Madagascar. L'approche utilisée pour conduire cette évaluation est de comparer la diversité, la structure génétique et le pouvoir pathogène des populations échantillonnées sur ChD et sur d'autres variétés. Le faible niveau d'attaque de la maladie recensée dans les sites suivis sur les Hautes Terres durant deux campagnes (2015 et 2016) nous a conduit à réduire l'échantillonnage des populations de *M. oryzae* par rapport à celui prévu au départ. Malgré tout, des populations venant de ChD (138 souches) et venant d'autres variétés de riz pluvial (213 souches) ont pu être isolées à partir de quelques sites présentant des symptômes de pyriculariose.

L'analyse des populations montre que le niveau de diversité génotypique est similaire entre les populations de ChD et d'autres variétés (dans chaque site et entre les sites). La comparaison des populations avant déploiement de ChD (2006) et durant les deux campagnes récentes (2015 et 2016) ne révèle pas non plus de différence en termes de diversité de ces populations. La résistance quantitative influence différemment l'évolution de la diversité génétique des populations de l'agent pathogène par rapport à la résistance qualitative (Burdon *et al.*, 2014 ; Zhan *et al.*, 2015). Cette dernière élimine les populations avirulentes entraînant une réduction de la diversité génotypique. La stabilité du niveau de diversité des populations de *M. oryzae* observée depuis le déploiement massif de ChD est un cas rare qui pourrait être expliqué par les hypothèses suivantes : soit une réduction de la diversité a eu lieu à un certain moment par l'effet de goulot d'étranglement mais la population sélectionnée a eu le temps de se diversifier à nouveau, soit ce déploiement n'a pas permis la sélection de populations spécifiques.

L'analyse de la structure génotypique des populations de *M. oryzae* pendant deux campagnes (2015 et 2016) révèle que la distribution des groupes clonaux (GC) des populations échantillonnées sur ChD et sur d'autres variétés de riz pluvial diffère. Cette différence observée pourrait être le signe d'adaptation des populations de *M. oryzae* sur la variété dominante (ChD). Des observations similaires ont été faites dans d'autre étude, Delmotte *et al.* (2014) ont trouvé une différence génétique entre les populations de *Plasmopara viticola* échantillonnées sur une variété de vigne avec une résistance quantitative et sur une variété sensible.

Le déploiement massif de ChD semble avoir modifié la structure génotypique de la population de *M. oryzae* de la riziculture pluviale sur les Hautes Terres. Les populations avant 2006 et récentes (campagnes 2015 et 2016) diffèrent par les fréquences des groupes clonaux entre ces périodes d'échantillonnage. Un tel changement de la structure génotypique de *M. oryzae* suite à l'utilisation d'une nouvelle variété ayant des gènes de résistance qualitative spécifique, a été observée aux Etats-Unis par Wang *et al.* (2017) lors d'une étude des populations durant plusieurs décennies. Avant le déploiement de ChD, les variétés adaptées à la haute altitude (dont F154) étaient sensibles à la pyriculariose. Par contre, cette variété était peu attaquée en milieu paysan durant le suivi de l'épidémie pour les campagnes 2011 à 2013 (Raveloson *et al.*, 2016) et pour les campagnes 2015-2016. Le changement de la structure génotypique de *M. oryzae* dans la région par la dominance de ChD pourrait être l'une des explications de la diminution d'attaque de la maladie sur F154. Suivant cette hypothèse, les populations virulentes sur cette variété seraient probablement diluées dans les populations existantes actuelles et auraient du mal à « trouver » leur hôte à cause de faible fréquence d'utilisation de F154 dans le paysage. L'explication alternative est que le déploiement de ChD a été suffisamment rapide et massif pour quasiment éradiquer et donc diminuer globalement la pression de pyriculariose.

Ces différences de la structure génotypique observées dans notre cas d'étude sont insuffisantes pour conclure à une spécialisation de certaines populations de l'agent pathogène sur ChD car la composition en GC des populations sur ChD n'est ni homogène, ni stable. En effet, la composition en GC diffère entre les sites (Fiantsonana, Mananetivohitra et Andranomanelatra). De même, la majorité des GC identifiés pour les populations de ChD en 2015 ne sont plus recensés en 2016. Les populations de *M. oryzae* échantillonnées sur d'autres variétés semblent plus stables. Par exemple, un même GC était dominant en 2015 et 2016 à Fiantsonana (GC 11) et à Andranomanelatra (GC 3 ; tableau 9). Ces observations montrent que la structure des populations sur ChD varie en fonction des sites et en fonction des années. Elles suggèrent qu'il n'y a pas un GC spécifique de la variété ChD qui se maintient. La variété ChD ne semble pas sélectionner de groupe clonal dominant. Brun *et al.* (2010) ont observé une évolution comparable des populations de *Leptosphaeria maculans* qui causent le chancre de la tige et du collet du colza sur des variétés avec une résistance quantitative. Ces auteurs ont montré que plusieurs types des souches ayant des niveaux de virulence différents sont détectés lorsqu'une résistance quantitative est utilisée alors que des fréquences élevées de souches virulentes ont été recensées lors du déploiement d'une résistance qualitative.

La comparaison du pouvoir pathogène des populations de *M. oryzae* échantillonnées sur la variété ChD et sur d'autres variétés de façon globale, ou par paire dans chaque site, montre que leur niveau d'agressivité est la même pour la plupart des composantes mesurées et sur toutes les variétés inoculées. Les populations sur ChD pourraient venir des populations présentes sur les autres variétés dans les parcelles voisines. Si les flux sont faibles, la dérive génétique pourrait être apparue. Cette dérive va générer une différenciation entre les populations. C'est ce que nous observons. L'hypothèse d'une contamination de ChD par de l'inoculum venant d'autres variétés est donc possible. Ces populations provoquent quelques symptômes sur ChD mais elles n'arrivent pas à développer une épidémie sur cette variété. Certaines études montrent que l'occurrence des variations d'agressivité est un facteur clé pour l'adaptation de l'agent pathogène à une résistance quantitative. L'inoculation croisée a permis de voir que les populations échantillonnées sur des variétés avec une résistance quantitative sont plus agressives par rapport à celles échantillonnées sur des variétés sensibles chez les pathosystèmes vigne/*Plasmopara viticola* (Delmas *et al.*, 2016) et houblon/*Podosphaera macularis* (Gent *et al.*, 2017). Dans notre cas, la similarité de pouvoir pathogène des populations échantillonnées sur ChD et à celles des autres variétés (campagne 2015) ne permet pas de conclure à une adaptation de l'agent pathogène à cette variété dominante.

L'adaptation de l'agent pathogène à une résistance quantitative paraît difficile à élucider et l'érosion de cette résistance nécessite un temps plus long. Le suivi de l'évolution des populations de *M. oryzae* devra être poursuivi sur une période plus longue. Bien que la structure génotypique entre les populations de *M. oryzae* sur ChD collectées en 2015 et en 2016 soit différente, la comparaison du pouvoir pathogène des ces deux populations de ChD dans le site de Fiantsonana révèle que leur niveau d'agressivité est le même sur cette variété. Ces deux observations vont dans le sens d'une absence d'adaptation des populations de *M. oryzae* présentes sur les Hautes Terres à la variété dominante ChD. Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent expliquer cette maladaptation. Nous supposons que la variété ChD possède une résistance quantitative non spécifique ou à large spectre. Ce type de résistance ne permet pas l'augmentation en fréquence de souches plus agressives et spécifiques à la variété. L'absence des souches spécifiques est une des explications de l'efficacité d'une résistance quantitative durant une période longue, et a été observée sur d'autres pathosystèmes (blé/*Puccinia triticina* Papaïx *et al.*, 2011 ; pommier/*Venturia inaequalis* Lê Van *et al.*, 2013). En outre, la variété ChD pourrait avoir des mécanismes de défense avec des effets complémentaires réduisant le développement de *M. oryzae*. Ces mécanismes considérés

comme de résistance basale sont rapportés par Liao *et al.* (2016) chez le riz vis-à-vis de la pyriculariose. Dans leurs tests, ces auteurs ont montré que certaines souches (populations de *M. oryzae* échantillonnées sur sous espèces *indica*) peuvent provoquer quelques symptômes sur des variétés de riz de la sous espèce *japonica* ayant de la résistance basale. Mais ces souches n'arrivent pas à causer des dégâts importants sur ces variétés au champ.

III.5. Conclusion partielle de la partie III

Toutes nos observations durant le suivi sur le terrain et les tests en conditions contrôlées nous permettent de dire qu'aucune adaptation particulière des populations de *M. oryzae* sur la variété dominante, ChD n'a été recensée pour le moment. De ce fait, l'exploitation de ce type de résistance considéré comme durable est une stratégie de lutte efficace contre la pyriculariose.

Les pratiques culturales utilisées en riziculture pluviale (absence de culture de riz durant plusieurs mois, faible fertilisation) pourraient également contribuer à la maladaptation de *M. oryzae* sur cette variété. L'absence de riz a un impact fort sur la variation des populations de *M. oryzae* entre deux saisons. Pour mieux comprendre ces phénomènes, il est nécessaire de connaître les réservoirs de cet agent pathogène durant l'intersaison et la durée de sa survie. C'est la partie traitée dans le chapitre IV de cette thèse.

Chapitre IV. **Caractérisation des sources d'inoculum**

L'augmentation de l'agressivité des populations pathogènes peut conduire à l'érosion de la résistance quantitative. Selon McDonald et Linde (2002 a), le potentiel évolutif d'un agent pathogène est influencé par la taille efficace de sa population. L'occurrence et l'émergence de souches plus agressives seront d'autant plus faciles que les populations seront importantes en nombre. Des stratégies permettant de réduire la taille des populations pourraient donc retarder l'adaptation des populations plus agressives sur des variétés avec une résistance quantitative. La gestion des sources d'inoculum constitue un des moyens pour limiter le développement des épidémies et réduire la taille des populations. Pour la pyriculariose, les sources potentielles d'inoculum de *M. oryzae* ont été décrites dès les premières études sur la maladie (Ou, 1985) sans que cela ne soit validé ni que leur importance relative n'ait été quantifiée.

Le but de ce chapitre est d'identifier et de hiérarchiser les sources potentielles d'inoculum de pyriculariose en riziculture pluviale dans une région où le riz est absent durant plusieurs mois de l'année.

En premier lieu, nous avons mesuré la survie de *M. oryzae* sur des résidus de riz et évalué leur rôle dans l'initiation de l'épidémie de pyriculariose au champ. Cette première partie a fait l'objet d'un article publié dans la revue *Plant Pathology* (Raveloson *et al.*, 2018). Elle montre que *M. oryzae* peut survivre sur les résidus de riz jusqu'à deux hivers et ces résidus infectés jouent un rôle important dans le démarrage des épidémies de pyriculariose l'année suivante, principalement lorsqu'ils sont placés sur le sol (Raveloson *et al.*, 2018) (IV.1).

En second lieu, nous avons évalué l'importance relative d'autres sources potentielles d'inoculum au sein de la parcelle. Plusieurs études ont démontré l'implication des semences infectées comme source d'inoculum primaire pour la pyriculariose (Manandhar *et al.*, 1998 ; Long *et al.*, 2001 ; Guerber et TeBeest, 2006 ; Faivre-Rampant *et al.*, 2013). Nous avons comparé les épidémies dues à l'inoculum porté par les semences et à différents types de résidus. Les pailles, les grains vides et les bases de tiges de riz infectées qui restent sur la parcelle après la récolte semblent quantitativement plus importants que les semences pour déclencher la maladie. Ce travail est présenté dans un article qui a été soumis au journal *Phytopathology*.

Enfin, nous avons testé si le riz irrigué, présent sur le terrain durant une période plus longue que le riz pluvial, pouvait jouer un rôle dans le développement de la pyriculariose sur le riz pluvial.

IV.1. Survie à long terme de l'agent pathogène de la pyriculariose dans les résidus de riz infectés constituant la principale source d'inoculum primaire pour la riziculture pluviale d'altitude (Article publié)

Le pathosystème riz/*M. oryzae* est considéré comme un modèle pour les champignons phytopathogènes. Cependant, les données sur le rôle des sources d'inoculum primaire et sur le mode et la durée de survie de l'agent pathogène sont peu disponibles. A part les travaux effectués sur le rôle de semences infectées sur le développement de la pyriculariose au champ, aucune étude convaincante n'a actuellement mesuré la capacité de *M. oryzae* à survivre sur des résidus de riz sur le terrain et si ces résidus peuvent servir de source d'inoculum primaire pour des épidémies futures. Or, la connaissance de ces informations est un élément essentiel pour formuler des stratégies de gestion de la pyriculariose dans une zone où le riz est absent durant plusieurs comme c'est le cas pour le riz pluvial dans les Hautes Terres.

Trois traitements (avec des résidus de riz infectés et non infectés laissés sur la surface du sol et sans résidus du riz) ont été comparés durant trois saisons culturales. Pour suivre les attaques de pyriculariose, les lésions présentes sur chaque poquet dans la parcelle ont été comptées et les sévérités foliaire et paniculaire ont été mesurées sur dix poquets dans chaque parcelle. D'autre part, la survie de *M. oryzae* sur des résidus de riz a été évaluée sur des lots de tige paniculaires infectées placées pendant 24 mois sur la couverture végétale du sol, sous la couverture végétale et dans le sol à 10 cm de profondeur. Des échantillons ont été prélevés chaque mois sur le terrain pour tester la capacité de sporulation des lots de panicules.

Les résultats montrent que le niveau d'attaque de pyriculariose foliaire est significativement plus élevé sur le traitement avec des résidus infectés par rapport aux traitements avec des résidus non infectés et sans résidus (par exemple pour la campagne 2015, le nombre moyen de lésions par poquet avec résidus est de 25,6 contre 2,8 avec résidus non infectés et 2,7 sans résidus). Concernant la survie sur les tiges paniculaires, *M. oryzae* perd rapidement sa capacité de sporulation lorsque les résidus sont enterrés. En revanche l'agent pathogène survit longtemps dans les autres conditions : la sporulation du champignon a été observée jusqu'à 18 mois sur les résidus laissés sur la couverture. Il est conclu que la présence de résidus infectés au champ pourrait initier le développement des épidémies de pyriculariose et que ceux-ci doivent impérativement être enlevés des zones de culture de riz.

Long-term survival of blast pathogen in infected rice residues as major source of primary inoculum in high altitude upland ecology

H. Raveloson^{a*}, I. Ratsimiala Ramonta^b, D. Tharreau^c and M. Sester^d

^aFOFIFA, CRR/DP SPAD, B.P. 230, 110, Antsirabe; ^bFaculté des Sciences, Université d'Antananarivo, B.P. 906, 101, Antananarivo, Madagascar; ^cCIRAD, UMR BGPI, Campus International de Baillarguet, Montpellier Cedex 5, 34398; and ^dCIRAD, UPR AIDA, Avenue Agropolis, Montpellier Cedex 5, 34398, France

Magnaporthe oryzae is the fungal plant pathogen that causes rice blast. The sources of primary inoculum and overwintering mode of the fungus remain largely unknown. The effect of rice residues on the onset of blast epidemics and the potential for survival of *M. oryzae* in the residues were studied in upland conditions in Madagascar. Blast disease was observed in a 3-year field experiment in three treatments: with either infected or uninfected rice residues on the soil surface, or without rice residues. Leaf blast incidence was significantly higher in the treatment with infected rice residues than in the two other treatments at the early stages of the epidemic. In a second set of trials, the survival of *M. oryzae* on rice residues was monitored. Infected rice stems were placed by lots in three places: on the mulch of rice residues, under the mulch, and buried at a depth of 10 cm in the soil. Each month, samples were taken from the field and tested for sporulation. The survival of the blast fungus decreased rapidly on the stems buried in the soil but remained high for the other conditions. Sporulation of the fungus was observed on stems left on the mulch for up to 18 months. It is concluded that under field conditions, the presence of infected rice residues could initiate an epidemic of blast. The results of this study may help in designing effective management strategies for rice residues infected by *M. oryzae*.

Keywords: *Magnaporthe oryzae*, primary inoculum, rice blast, rice straws, survival

Introduction

Rice blast, caused by the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*, is a devastating disease of rice worldwide (Pennisi, 2010) and a model for the study of plant–pathogen interactions (Valent, 1990; Dean *et al.*, 2012). The disease is currently managed by the use of resistant cultivars (Tanweer *et al.*, 2015; Raboin *et al.*, 2016), appropriate cultural practices (Pooja & Katoch, 2014; Bregaglio *et al.*, 2017) and treatment with fungicides when possible (Kunova *et al.*, 2014). Alone, none of these methods can completely control blast disease (Guerber & TeBeest, 2006).

Blast is a polycyclic disease propagated by asexual spores (conidia) that infect the aboveground parts of the rice plant in the field. Upon artificial inoculation in controlled conditions, *M. oryzae* is also able to colonize roots by forming hyphopodia (Sesma & Osbourn, 2004). In the tropics, airborne conidia are presumably present throughout the year (Ou, 1985), allowing permanent epidemics without overwintering issues. This assumption is unlikely to be valid in high altitude tropical regions, like the Highlands of Madagascar (1000 to 2000 m a.s.l.),

and in temperate regions where rice is absent for several months each year. According to some authors (Ou, 1985; Guerber & TeBeest, 2006), the pathogen can survive in infected seeds and residues, which are probably the main primary sources of inoculum in temperate regions. Previous studies have already reported the presence of the blast pathogen in infected rice seeds using PCR (Chadha & Gopalakrishna, 2006) and by visual inspection (Mew & Misra, 1994; Mew & Gonzales, 2002). Puri *et al.* (2007) found a significant correlation between the panicle infection and survival of *M. oryzae* in seed, and the level of pathogen survival varied on different cultivars tested. The infection process from the contaminated germinating seed to the seedling was investigated by cytological observations by Faivre-Rampant *et al.* (2013). Several studies have demonstrated the potential role of infected rice seeds in outbreaks of rice blast under field conditions (Manandhar *et al.*, 1998; Long *et al.*, 2001; Guerber & TeBeest, 2006). These studies clearly established that *M. oryzae* is a seedborne pathogen. However, to date, there has been no convincing demonstration that the pathogen can also survive in rice residues in the field and that these residues can serve as primary inoculum (review in Ou, 1985). Harmon & Latin (2005) reported that *M. oryzae* from ryegrass can survive on infected residues of its host plant, but that the proportion of surviving inoculum was insufficient to trigger an epidemic.

*E-mail: raveloharinjaka@yahoo.fr

Published online 11 December 2017

Rice residues are used in different ways in different countries. In Madagascar, especially in the central highlands, most of the rice residues are used to feed livestock during the dry season and, in some regions, some of the rice residues are used as bedding for livestock. After harvest, the residues are dried and stored in the upland rice fields near the farm homestead. In conservation agriculture cropping systems in the Madagascar Highlands, some of the rice residues are left in the field as mulch to ensure the environmental and agronomic sustainability of upland crops (Scopel *et al.*, 2013). The principles of conservation agriculture cropping systems are: (i) no-till or reduced tillage; (ii) permanent soil cover through intercropping or by leaving crop residues in the field; and (iii) the use of crop rotations (FAO, 2016). Due to the permanent presence of rice residues on the soil surface in conservation agriculture cropping systems, and the drying and storage practices of rice residues in upland rice plots, a study was proposed on the role of leftover residues in the field on blast disease development in rice.

This study thus had two specific objectives: (i) to determine the role of leftover rice residues on blast disease development; and (ii) to determine how long the blast pathogen can survive on infected rice residues in the field.

Materials and methods

Two experiments were conducted in upland conditions at Andranomanelatra, 16 km north of Antsirabe in the Vakinankaratra region of the Highlands of Madagascar (19°47'S, 47°06'E). The altitude is 1645 m a.s.l. and the climate is tropical with average annual rainfall of 1360 mm. The climate is characterized by two separate seasons: a warm rainy summer from October to April, and a cool dry season from May to September. The mean temperature is 20 °C or below. Generally, the upland rice is sown in this region between mid-October and mid-November, the reproductive phase (from booting to end of grain filling) occurs during February to March, and harvesting is in April.

Rice residue preparation and experimental design

The trials were carried out in the 2012/13, 2013/14 and 2014/15 cropping seasons (hereafter 2013, 2014 and 2015). In 2013 and 2014, two treatments were compared: either no rice residues (bare soil: BS), or infected rice residues (soil with diseased residues: SDR) left on the soil. In the last cropping season in 2015, a third treatment, uninfected rice residues left on the soil surface (soil with uninfected residues: SUR) was also included. In 2013, the infected rice residues of the susceptible cultivar Fofifa 152 (F152) were collected from a previous blast trial conducted in Andranomanelatra during 2012. Infected rice residues from trials of 2013 and 2014 were used for trials of 2014 and 2015, respectively. The uninfected rice residues used in the 2015 trial were collected from the resistant cultivar Fofifa 172 (F172) grown for the trial of 2014. Rice residues were collected at harvest time and kept in the field in straw piles until the next cropping season, and were manually spread on the ground after seedling emergence.

A randomized complete block design with four replications was used for the trials. The individual plots of 3 × 4 m (15 × 20 rows with 300 hills in total) were sown with the

susceptible cultivar F152. The plots were separated by a buffer strip planted with the resistant cultivar F172 to limit the spread of the disease among the plots. Six to eight seeds were sown manually in hills spaced 20 × 20 cm apart. Organic fertilizer (cattle manure 5 t ha⁻¹) and mineral fertilizers (NPK: 11% N, 22% P₂O₅, 16% K₂O) 300 kg ha⁻¹, dolomite (CaMg(CO₃)₂) 500 kg ha⁻¹ and two top-dressings of urea (46% N) 50 kg ha⁻¹ each, were applied.

Blast disease assessment

Initially, blast lesions were counted on the leaf at the beginning of the epidemics to evaluate the effect of rice residues on the onset of the disease in the field. Thereafter, leaf and panicle blast severity were measured to assess the progress of the blast epidemic in the trials.

To monitor the onset of the epidemic, the lesions were counted on the leaves of plants growing on the 176 innermost hills in the plot (11 × 16 rows) early in the season to account for the abundance of inoculum. Lesions were counted on 11, 15 and 24 January 2013 and on 16, 21 and 28 January 2014. In 2015, as the disease occurred earlier in the cropping season than in the two previous years, the lesions were counted only on 6 January. Counting was continued until the lesion numbers became numerous (50 in one hill). To evaluate the progress of the blast epidemic in later stages, the severity of leaf and panicle blast were assessed. For leaf blast severity, 10 hills were selected randomly along the diagonal of the plot. The total number of tillers (nbT) and the number of diseased tillers with at least one susceptible symptom (nbDT) were counted on each hill, and the leaf area affected by blast (%DLA) was estimated on the four uppermost leaves of three diseased tillers (when available).

The leaf blast severity of one hill was defined as LBSH = % DLA × nbDT/nbT. The leaf severity of one plot (LBSP) was defined as the mean of the leaf severity on the 10 hills sampled.

To measure panicle blast severity, 10 hills were selected randomly along the diagonal of the plot. The total number of panicles, nbP, and the number of diseased panicles (with at least one susceptible symptom, i.e. a black spikelet and an empty grain), nbDP, were counted on each hill, and the percentage of affected grains (%DG) was estimated visually on five diseased panicles (when available). When the neck nodes are infected by the fungus, the panicle dries and becomes white (counted as 100% of grains affected).

Panicle blast severity of one hill was defined as PBSH = % DG × nbDP/nbP. The panicle severity of a plot (PBSP) was defined as the mean of panicle severity on the 10 hills sampled (Dusserre *et al.*, 2017).

Leaf blast severity was assessed on one date in 2013 (12 February) and 2014 (4 February), and two dates in 2015 (13 and 20 January). Panicle blast severity was assessed on one date each year, on 18 March in 2013 and 2014, and 17 March in 2015.

Monitoring *M. oryzae* survival in infected rice residues

The infected panicles used in this study were collected from upland cultivars naturally infected with rice blast fungus in the area surrounding the experimental trials at rice harvest time. The trials were carried out to monitor the survival of *M. oryzae* in infected rice residues in 2011 and 2013. In 2011, infected residues placed in two positions (on top of the mulch of rice residues and under this mulch) were compared by using infected stems of upland cultivar Fofifa 161 (F161) (3840 stems of

panicle to prepare 192 batches of 20 stems wrapped in nylon mesh). In 2013, infected residues placed in three positions (on top of the mulch, under the mulch and at a depth of 10 cm in the soil) were compared by using infected stems of upland cultivar F152 (5760 stems of panicle to prepare 288 batches of 20 stems). These batches were placed in each position in experimental plots in no-tillage cropping systems and with four replications. The trials were initiated on 27 May 2011 and on 23 May 2013. In these two trials, the monitoring was planned for 2 years. For the first trial in 2011, the periods from May 2011 to April 2012 and May 2012 to April 2013 are called hereafter the first and second year, respectively. For the second trial in 2013, the periods from May 2013 to April 2014 and May 2014 to April 2015 are also called hereafter the first and second year, respectively.

Four batches of panicle stems were removed from each position in the field each month to assess survival of *M. oryzae*. The stems were placed in Petri dishes with dampened filter paper to stimulate sporulation of *M. oryzae* and observed under a binocular microscope to check for the production of spores. Evaluation was based on the presence or absence of typical spores of *M. oryzae*. The percentage of remaining stems was calculated as the number of stems counted after the samples were collected, divided by the initial number of stems per batch (20). The percentage of stems with living *M. oryzae* was calculated as the number of stems with visible sporulation of the pathogen divided by the number of stems remaining in the batch. Average percentages and standard errors were calculated for the four replicates.

For the climate data, daily temperature and rainfall data were collected by on-site automatic meteorological stations (ENERCO 404 series, Cimel, France) at Andranomanelatra site for the time period 1 May 2011 to 30 April 2015.

Analysis

Analysis of variance was worked out with data on blast severity. To obtain homoscedasticity, the number of lesions per hill and the leaf and panicle blast severity values were transformed using the logarithm and arcsine of the square root transformation, respectively.

The percentages of remaining stems and of stems with living *M. oryzae* were transformed with the arcsine of the square root. After transformation, changes over time in the rate of remaining stems and in the rate of stems showing sporulation of *M. oryzae* were analysed with a linear model.

All analyses were conducted using R v. 3.2.5 (R Core Team, 2013).

Results

Effect of infected rice residues on the onset of blast epidemics in the field

The number of lesions on the leaf per hill was counted to assess the influence of rice residues on the onset of blast in the field. Examples of the occurrence and distribution of lesions on the 176 hills for 2013 are shown in Figure 1. At the first count, leaf blast was found on a few hills in plots with no rice residues (bare soil, BS), and in almost every hill in plots with infected rice residues (soil with diseased residues, SDR). After 2 weeks (lesion count on 24 January 2013), the number of lesions

per hill in the BS treatment ranged from 0 to 4, and in the SDR treatment ranged from 0 to 46. The number of lesions per hill in BS plots was significantly lower than that in SDR plots at each sampling date, except the last sampling date in 2014 (28 January; Fig. 2). The quantitative evaluation of 2013, 2014 and 2015 campaigns indicate that overall, the development of leaf blast differed in the two treatments, with blast remaining at a lower level in BS than in SDR (Fig. 2). In 2015, no significant difference was found in the number of lesions per hill between the BS treatments and the treatment with healthy rice residues (soil with uninfected residues, SUR). However, the SDR treatment presented significantly more lesions than the SUR treatment. The average number of lesions per hill was 25.6 for SDR and only 2.8 for SUR on the only sampling date in 2015.

After the onset of the epidemic, progress of the blast epidemic in the trials was assessed by a late evaluation of leaf blast severity and by measuring panicle blast severity. In 2013 and 2014, no significant difference for leaf blast severity was observed between treatments (Fig. 2, right panel). In 2015, significantly more severe leaf blast was found in the treatment with infected residues than in the two other treatments. There was no difference in panicle blast severity in the three treatments, whatever the season (Fig. S1).

Survival of *M. oryzae* on infected rice residues

The rate of degradation of the stems was monitored by calculating the ratio of stems remaining in each batch that originally contained 20 stems. During the two trials, the number of remaining stems decreased over time (Fig. 3a,b). The stems of F161 persisted longer in the field than the stems of F152: F161 stems were recovered over a period of 19 months (from May 2011 to December 2012; Fig. 3a) whereas F152 stems were only recovered for 10 months (from May 2013 to March 2014; Fig. 3b). On each sampling occasion, with a few exceptions, the number of remaining stems was the same in all three positions (on top of the mulch, under the mulch and at a depth of 10 cm in the soil). However, in August, November and December 2013 and in March 2014, there was a significant difference between the number of stems of F152 remaining in the soil at a depth of 10 cm and the number remaining on top of and under the mulch (Fig. 3b).

Initially, in May of 2011 and 2013, 100% of stems were found to produce spores of *M. oryzae*. In 2011, rates of stems with pathogen sporulation were high and remained stable from June 2011 to November 2011 on stems placed on top of and under the mulch. In December 2011, the rate of sporulating stems started to decrease significantly, two months after the beginning of the rainy season (Fig. 4a). The rate of sporulating stems placed on top of the mulch was significantly higher compared to stems placed under the mulch from December 2011 to October 2012. The last sporulation of *M. oryzae* was observed 16 months (September 2012) after the

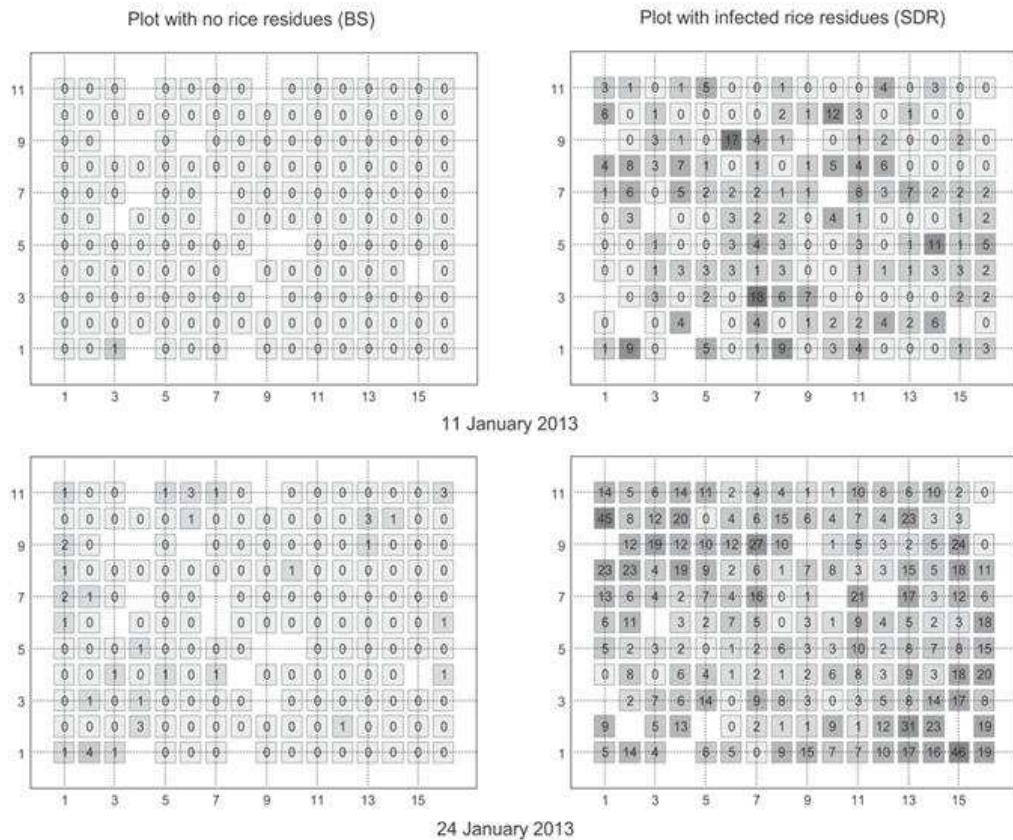


Figure 1 Comparison of plots with no rice residues (bare soil, BS, left panels) and with infected rice residues (soil with diseased residues, SDR, right panels) for the number of lesions counted on the 176 hills in the plot on two dates in the 2013 season. Empty spaces mean hills were missing. The darker the grey, the denser the lesions (square root of the number of lesions per hill). The digits on the x-axis and y-axis indicate the position of each hill in the plot.

beginning of the trial for stems placed under the mulch and 18 months (November 2012) for stems on top of the mulch.

In the second trial, with cultivar F152, the rate of sporulating stems when buried in the soil decreased significantly after the first observation and no more sporulation was found after November 2013, 5 months after burial. The number of sporulating stems both on top of and under the mulch was similar over a period of 10 months (May 2013 to March 2014; Fig. 4b).

Overall, a decrease in the rate of sporulating stems over time was observed, but with some variation - in January 2012 for the first trial and in June, July and August 2013 for the second trial.

Environmental data for Andranomanelatra site

Monthly rainfall and average temperature from May 2011 to April 2015 is presented in Figure 5. For the first

trial in 2011, the recorded rainfall was 1278 and 1089 mm for the first and second years, respectively, and for the second trial in 2013, the recorded rainfall was 1290 and 1549 mm for first and second years, respectively. Monthly average temperature was similar for all years in both trials.

Discussion

Understanding the origin of inoculum is key to developing integrated management strategies against plant pathogens. The ecology of the blast pathogen in respect to overwintering mode, particularly in high altitude upland, is not clearly characterized yet. The main primary sources of blast inoculum previously reported were infected rice seeds and rice residues (Ou, 1985). The role of rice seeds as a primary source of inoculum for rice blast has been investigated under field conditions and clearly demonstrated (Manandhar *et al.*, 1998; Long

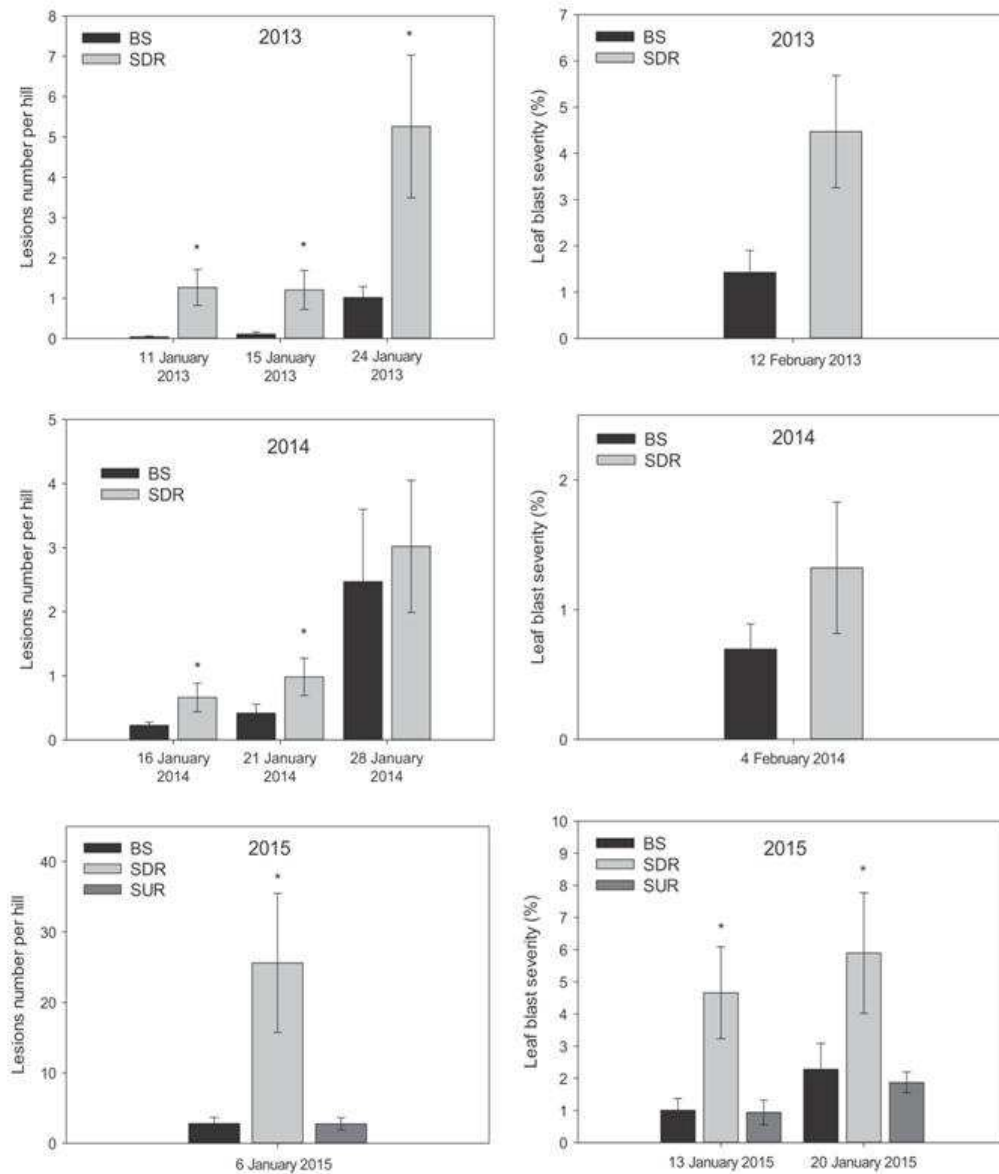


Figure 2 Number of lesions per hill at the onset of epidemics and leaf blast severity at later epidemic stages in the treatments with no rice residues (bare soil, BS) and with infected rice residues (soil with diseased residues, SDR) in 2013 and 2014, and in the three treatments BS, SDR, and soil with uninfected residues (SUR) in 2015. *show a significant effect of the treatments ($P < 0.05$). Vertical bars are standard errors of the means.

et al., 2001; Faivre-Rampant *et al.*, 2013). In contrast, survival on rice residues has rarely been studied and reported. To the authors' knowledge, the present work is the first to quantify the potential role of infected rice residues in the onset of rice blast and to evaluate survival of *M. oryzae* on rice residues in high altitude upland field conditions. Repeated field experiments including

treatments with no rice residues, with healthy rice residues, and with infected rice residues left on the soil surface showed that the presence of infected rice residues on the soil surface had a positive effect on the onset of blast in the field during the first stages of the epidemics. These results demonstrate the role of infected rice residues in the onset of these epidemics.

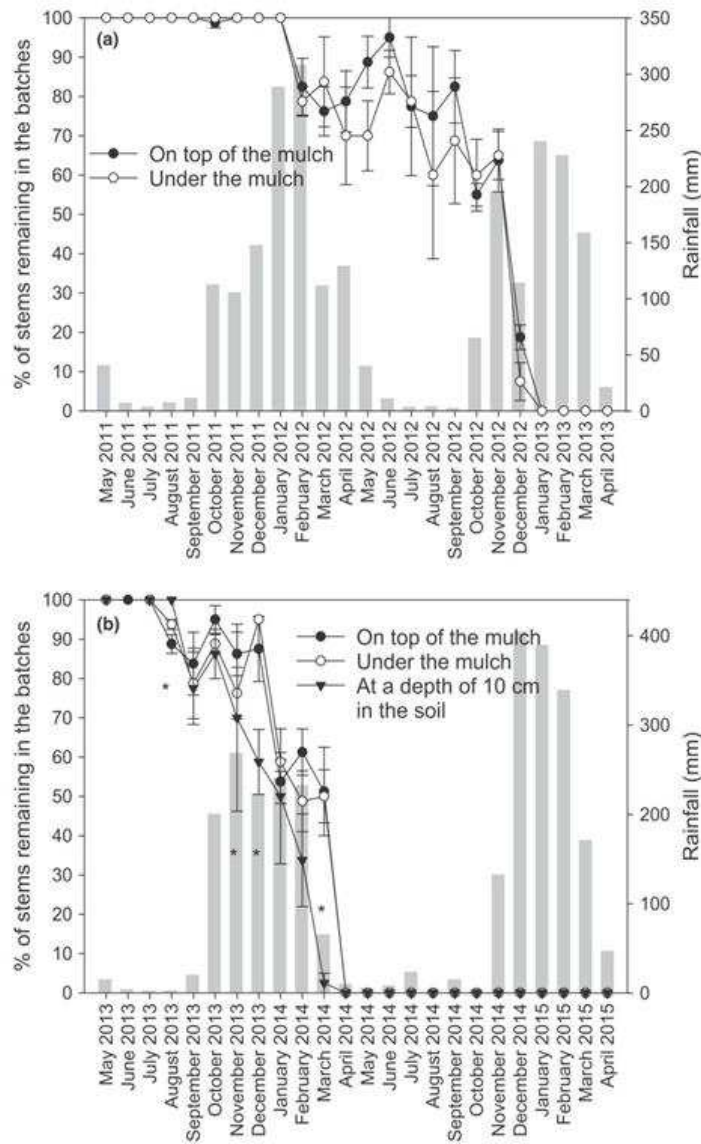


Figure 3 Variation over time of the percentage of panicle stems remaining in the field for different positions (on top of the mulch, in the soil) and rainfall per month (grey bars). (a) with cv. F161 in the 2011 trial and (b) with cv. F152 in the 2013 trial. *show a significant ($P < 0.05$) effect of position. Vertical bars are standard errors of the means.

Monitoring the survival of *Pyrenophora tritici-repentis* (Summerell & Burgess, 1989) and of *Gibberella zeae* (Pereyra *et al.*, 2004) on wheat residues showed that these fungi survived when infected wheat residues were left on the soil surface, whereas incorporating the wheat residues into the soil reduced the viability of the fungi. The presence of resting structures and of ascospores of these two fungi in the field is known, which explains their adaptation under different field conditions.

However, resting structures and sexual stage have not been reported for *M. oryzae* in the field so far. The results here suggest that the blast pathogen needs infected rice residues to survive for longer periods under field conditions. Results revealed that on cultivar F161, the blast pathogen was able to produce spores after 18 months and on cultivar F152, after 10 months when the infected residues were left on top of or under the mulch in the field. Long-term conservation on straw or

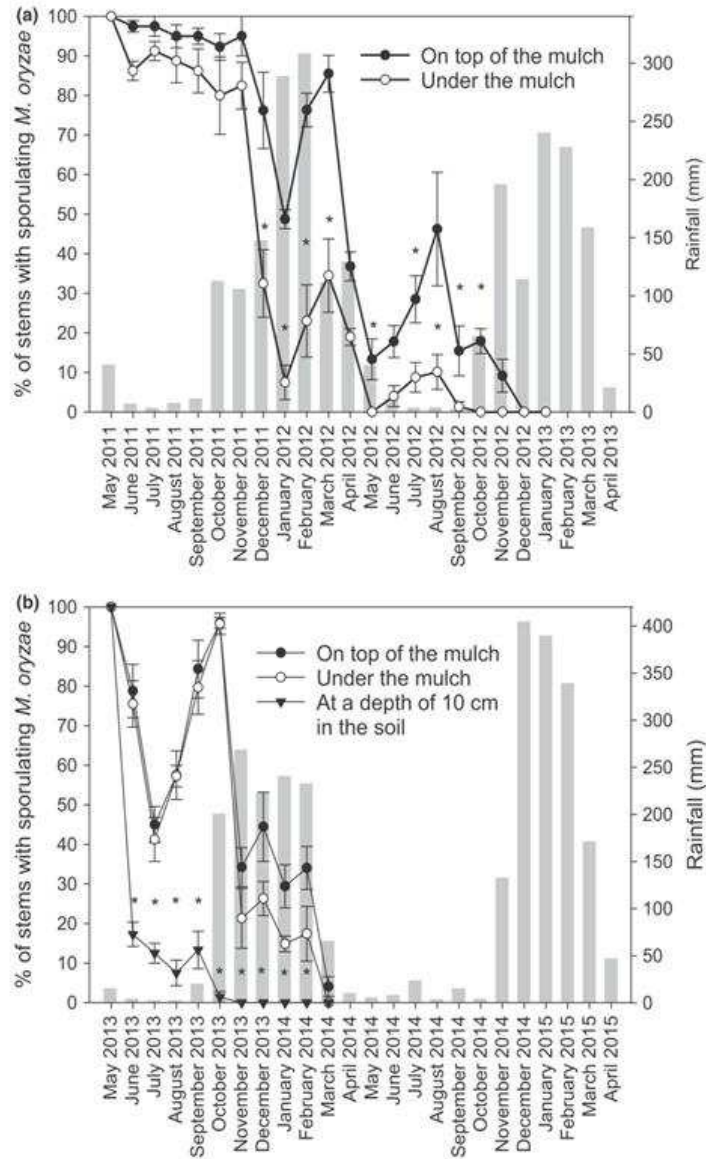


Figure 4 Variation over time of the percentage of panicle stems left in the field in different positions (on top of the mulch, under the mulch, in the soil) producing *Magnaporthe oryzae* spores, and rainfall per month (grey bars), (a) with cv. F161 in the 2011 trial and (b) with cv. F152 in the 2013 trial. *show a significant ($P < 0.05$) effect of position. Vertical bars are standard errors of the means.

artificial media has already been demonstrated under controlled conditions, particularly when conditions are dry (Latterell & Rossi, 1986). The observations here show for the first time that the rice blast pathogen can survive on rice residues in the field between at least two cropping seasons. However, recovery of viable *M. oryzae* declined rapidly at the first observation on residues buried at a depth of 10 cm in the soil. This result supports the hypothesis that *M. oryzae* survives poorly in the soil,

probably because of competition with other microorganisms. *Magnaporthe oryzae* is considered to be a poor saprophytic competitor (Ou, 1985). Filippi & Prabhu (1997) and Manandhar *et al.* (1998) found that blast lesions were rare when infected seeds were completely covered by soil. These observations and the present results of infected rice residues buried in the soil suggest that rice residues that are ploughed under just after harvest may not be a source of primary inoculum.

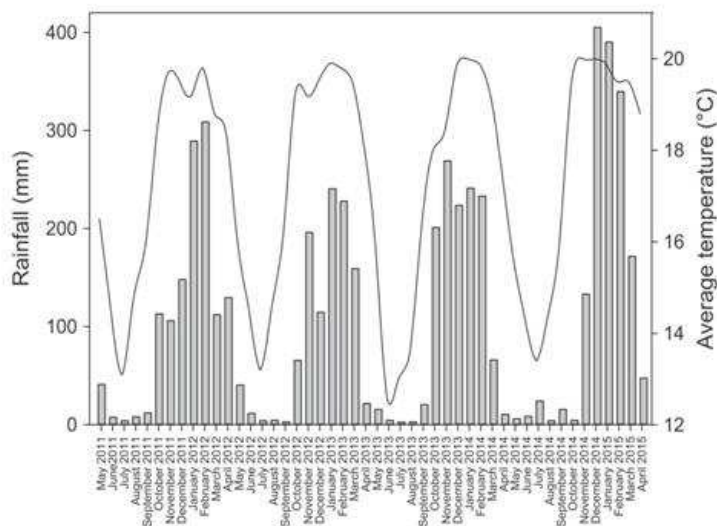


Figure 5 Monthly rainfall (mm) and average temperature (°C) at Andranomanelatra site from May 2011 to April 2015.

Environmental conditions (temperature, relative humidity, precipitation and leaf wetness) have a strong influence on the rice blast epidemic in the field (Suzuki, 1975; Greer & Webster, 2001). Increased cumulated rainfall was expected to influence the survival of *M. oryzae* on rice residues through maintenance of wet conditions in the field. During the survival monitoring, a decrease in the rate of sporulating stems on the top of and under the mulch was observed during both trials, in December 2011 and in November 2013. The cumulated rainfall before these periods reached 220 mm in October and November 2011, and 200 mm in October 2013. Moisture on the soil surface exhibits more variation than in the soil (Montzka *et al.*, 2014), and so the rapid decrease in *M. oryzae* survival and residue degradation at a depth of 10 cm could be due to the constant moisture, with the expected higher activity of microorganisms in the soil.

The rate of sporulating stems would normally decrease over time. However, for the first trial, a higher rate of sporulating stems was observed in February 2012 than in the previous month. No satisfactory biological explanation could be found, and an isolated technical problem cannot be excluded. The decrease in sporulating stems found in June, July and August 2013 for the second trial could be explained by difficulties with sporulation of *M. oryzae* in some stems because of the cold conditions in the laboratory where sporulation was induced.

Several reasons could explain the differences observed in the degradation rate of stems between F152 and F161. In August 2013, an early slight decrease in the number of F152 stems could be due to the lower temperature during that period. The degradation of residues in the second trial was accelerated compared to first trial, which implies lower resistance of the residues. This could

be due to differences between the F152 and F161 stem characteristics (Raboin *et al.*, 2014) or to the impact on rice stems of different environmental conditions during the rice growing seasons.

In the no-tillage cropping systems recommended to halt declining soil fertility and to limit erosion in hill-side fields in the Madagascan highlands, rice residues are left on the ground (Douzet *et al.*, 2010). In a previous study, it was shown that blast severity was significantly lower in the conservation agriculture cropping system than in the conventional tillage system (Sester *et al.*, 2014). The reduced blast epidemics observed in conservation agriculture were explained by reduced plant development, reduced nitrogen uptake and progressive assimilation of nitrogen (Sester *et al.*, 2014; Dusserre *et al.*, 2017). The results concerning the persistence of *M. oryzae* on infected rice residues and its role in the onset of blast epidemics suggests that the management of rice residues and the practice of crop rotations should be reviewed.

These findings on the survival of blast pathogen on infected rice residues and its role in the onset of rice blast in high altitude upland field conditions should help to fill the gap in understanding epidemiological factors that favour the initiation of blast epidemics in the field, and should improve the management of this disease.

Acknowledgements

The authors thank François Bonnot (UMR BGPI Montpellier France) for assistance with data analysis. Special thanks to Jean-Benoit Morel for his advice on the paper. This work was supported in part by the French Agence Nationale de la Recherche under the Systerra programme: ANR-09-STRA-03 (agronomic management of

rice blast resistance) and by the GSDM (Groupement Semis Direct Madagascar).

References

- Bregaglio S, Titone P, Hossard L *et al.*, 2017. Effects of agro-pedo-meteorological conditions on dynamics of temperate rice blast epidemics and associated yield and milling losses. *Field Crops Research* **212**, 11–22.
- Chadha S, Gopalakrishna T, 2006. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 1147–53.
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA *et al.*, 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**, 414–30.
- Douzet J-M, Scopel E, Muller B, Rakotoarisoa J, Albrecht A, Razafindramanana NC, 2010. Effets des systèmes de cultures en semis direct avec couverture végétale sur le ruissellement et l'érosion des cultures pluviales des Hautes Terres de Madagascar. *Etude et Gestion des Sols* **17**, 131–42.
- Dusserre J, Raveloson H, Michellon R, Gozé E, Auzoux S, Sester M, 2017. Conservation agriculture cropping systems reduce blast disease in upland rice by affecting plant nitrogen nutrition. *Field Crops Research* **204**, 208–21.
- Faivre-Rampant O, Genies L, Piffanelli P, Tharreau D, 2013. Transmission of rice blast from seeds to adult plants in a non-systemic way. *Plant Pathology* **62**, 879–87.
- FAO, 2016. Conservation Agriculture. [http://www.fao.org/ag/ca/index.html]. Accessed 26 July 2016.
- Filippi MC, Prabhu AS, 1997. Integrated effect of host plant resistance and fungicidal seed treatment on rice blast control in Brazil. *Plant Disease* **81**, 351–5.
- Greer CA, Webster RK, 2001. Occurrence, distribution, epidemiology, cultivar reaction and management of rice blast disease in California. *Plant Disease* **85**, 1096–102.
- Guerber C, TeBeest DO, 2006. Infection of rice seed grown in Arkansas by *Pyricularia grisea* and transmission to seedlings in the field. *Plant Disease* **90**, 170–6.
- Harmon PF, Latin R, 2005. Winter survival of the perennial ryegrass pathogen *Magnaporthe oryzae* in north central Indiana. *Plant Disease* **89**, 412–8.
- Kunova A, Pizzatti C, Bonaldi M, Cortesi P, 2014. Sensitivity of nonexposed and exposed populations of *Magnaporthe oryzae* from rice to tricyclazole and azoxystrobin. *Plant Disease* **98**, 512–8.
- Latterell FM, Rossi AE, 1986. Longevity and pathogenic stability of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* **76**, 231–5.
- Long DH, Correll JC, Lee FN, TeBeest DO, 2001. Rice blast epidemics initiated by infested rice grain on the soil surface. *Plant Disease* **85**, 612–6.
- Manandhar HK, Jorgensen HJL, Smedegaard-Petersen V, Mathur SB, 1998. Seedborne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings. *Plant Disease* **82**, 1093–9.
- Mew TW, Gonzales P, 2002. *A Handbook of Rice Seedborne Fungi*. Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute.
- Mew TW, Misra JK, 1994. *A Manual of Rice Seed Health Testing*. Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute.
- Montzka C, Moradkhani H, Weihermüller L, Franssen HH, Canty M, Vereecken H, 2014. Hydraulic parameter estimation by remotely-sensed top soil moisture observations with the particle filter. *Journal of Hydrology* **399**, 410–21.
- Ou SH, 1985. *Blast. Rices Diseases*, 2nd edn. Kew, UK: CMI, 109–201.
- Pennisi E, 2010. Armed and dangerous. *Science* **327**, 804–5.
- Pereyra SA, Dill-Macky R, Sims AL, 2004. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease* **88**, 724–30.
- Pooja K, Katoch A, 2014. Past, present and future of rice blast management. *Plant Science Today* **1**, 165–73.
- Puri KD, Shrestha SM, Joshi KD, Khatri GB, 2007. Survival of *Magnaporthe grisea* on rice seeds from artificially inoculated panicles of selected rice lines. *Tropical Agricultural Research* **19**, 91–100.
- R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. [http://www.R-project.org/]. Accessed 20 January 2016.
- Raboin L-M, Randriambololona T, Radanielina T, Ramanantoanirina A, Ahmadi N, Dusserre J, 2014. Upland rice varieties for smallholder farming in the cold conditions in Madagascar's tropical highlands. *Field Crops Research* **169**, 11–20.
- Raboin L-M, Ballini E, Tharreau D *et al.*, 2016. Association mapping of resistance to rice blast in upland field conditions. *Rice* **9**, 1–12.
- Scopel E, Triomphe B, Affholder F *et al.*, 2013. Conservation agriculture cropping systems in temperate and tropical conditions, performances and impacts. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **33**, 113–30.
- Sesma A, Osbourn AE, 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* **431**, 582–6.
- Sester M, Raveloson H, Tharreau D, Dusserre J, 2014. Conservation agriculture cropping system to limit blast disease in upland rainfed rice. *Plant Pathology* **63**, 373–81.
- Summerell BA, Burgess LW, 1989. Factors influencing survival of *Pyrenophora tritici-repentis* stubble management. *Mycological Research* **93**, 38–40.
- Suzuki H, 1975. Meteorological factors in the epidemiology of rice blast. *Annual Review of Phytopathology* **13**, 239–56.
- Tanweer FA, Rafiq MY, Sijam K, Rahim HA, Ahmed F, Latif MA, 2015. Current advance methods for the identification of blast resistance genes in rice. *Comptes Rendus Biologies* **338**, 321–34.
- Valent B, 1990. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology* **80**, 33–6.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Figure S1. Panicle blast severity in plots with different residue treatments: soil with no rice residues (bare soil, BS), soil with diseased residues (SDR) in 2013, 2014 and 2015, and soil with uninfected rice residues (SUR) in 2015. Vertical bars are standard errors of the mean.

IV.2. Importance relative des sources potentielles d'inoculum de *Magnaporthe oryzae* en riziculture pluviale de haute altitude à Madagascar (*Article soumis*)

Le processus d'infection de l'agent pathogène de la pyriculariose est bien documenté et des progrès significatifs ont été réalisés dans la compréhension des bases moléculaires du pouvoir pathogène, des mécanismes de défense du riz et des interactions entre riz/*M. oryzae*. Dans les régions où une seule culture de riz est possible chaque année, l'agent pathogène de la pyriculariose doit survivre entre la récolte et la saison suivante pour pouvoir provoquer de nouvelles épidémies. Nous avons montré que les pailles étaient des sources potentielles d'inoculum lorsqu'elles sont laissées sur le terrain après la récolte mais d'autres sources sont possibles dont l'importance doit être évaluée.

Des tests pluriannuels ont été conduits. Pour les saisons culturales 2013 et 2014, trois traitements ont été comparés (semences infectées, semences infectées traitées avec de fongicide azoxystrobine et semences infectées traitées avec une solution d'hypochlorite de sodium) et pour la saison 2015, deux traitements ont été comparés (semences saines et semences infectées) afin de déterminer l'effet des semences infectées sur le niveau d'attaque de pyriculariose. En 2016 et 2017, les essais ont permis de caractériser la contribution des différents résidus de riz infectés (grains vides, pailles et bases de tige) dans l'initiation des épidémies. Le nombre de lésions présentes sur chaque poquet dans la parcelle a été compté durant les stades précoces des épidémies de pyriculariose.

Les mesures de niveaux d'attaque de pyriculariose pour les saisons 2013 et 2014 montrent qu'il n'y avait pas de différence significative pour le nombre de lésions par poquet entre les traitements semences infectées, semences infectées traitées avec un fongicide et semences infectées traitées avec l'hypochlorite de sodium. Pour la saison 2015, le niveau d'attaque foliaire ne différait pas entre les deux traitements semences infectées et semences non infectées. Concernant la caractérisation de la contribution des différents types de résidus, les traitements avec des grains vides et des pailles infectées ont présenté significativement plus de lésions que le traitement sol nu (sans résidu de riz sur la parcelle). Le nombre de lésions compté sur le traitement avec des bases de tige était significativement plus élevé que sur le traitement sol nu la majorité des notations. La comparaison des trois traitements avec grains vides, pailles et bases de tiges infectés ne faisait pas apparaître de différence significative du nombre de lésions pour la saison 2016. Par contre, pour la saison 2017, le

nombre de lésions sur le traitement avec de bases de tiges était significativement plus faible que les deux traitements avec grains vides et pailles de riz.

Ces observations ont montré que l'implication des semences infectées sur l'initiation d'épidémie de pyriculariose sur le terrain n'était pas très marquée, tandis que grains vides, pailles et bases de tige de riz laissés sur le sol constituent des sources majeures d'inoculum primaire de *M. oryzae*. Il faut mentionner que l'importance relative des différentes sources d'inoculum pourrait être liée à la contamination des organes de riz durant la saison culturale précédente. L'infection des bases de tiges est probablement corrélée à la pyriculariose foliaire, l'infection des grains vides à la pyriculariose paniculaire et l'infection des pailles à la pyriculariose foliaire et paniculaire. Ceci peut expliquer la différence des niveaux d'attaque de pyriculariose observés dans les trois traitements de la saison 2017. La caractérisation de ces sources d'inoculum primaire de *M. oryzae* permettra d'améliorer la gestion intégrée de la pyriculariose par des actions réalisables par les agriculteurs malgaches.

Phytopathology

Relative importance of potential inoculum sources of *Magnaporthe oryzae* in a high altitude upland rice agrosystem in Madagascar

Journal:	<i>Phytopathology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Raveloson, Harinjaka; Centre National de la Recherche Appliquee au Developpement Rural, Centre Régional de Recherches Ratsimiala Ramonta, Isabelle; Universite d'Antananarivo, Faculté des Sciences Tharreau, Didier; CIRAD, UMR BGPI Sester, Mathilde; CIRAD Occitanie-Montpellier, UPR AIDA
Keywords:	Ecology and epidemiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

view

1 **Relative importance of potential inoculum sources of *Magnaporthe oryzae* in a high**
2 **altitude upland rice agrosystem in Madagascar**

3

4 H. Raveloson^a, I. Ratsimiala Ramonta^b, D. Tharreau^{c,d} and M. Sester^{e,f}

5

6 a: FOFIFA, CRR Trivatrnikamo, B.P. 230, 110 Antsirabe, Madagascar.

7 b: Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, B.P. 906, 101 Antananarivo,
8 Madagascar.

9 c: CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France.

10 d: BGPI, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France.

11 e: CIRAD, UPR AIDA, F-34398 Montpellier, France.

12 f: AIDA, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France.

13 *E-mail: raveloharinjaka@yahoo.fr

14 Raveloson *et al.*: sources of blast inoculum

15 Keywords: rice blast, rice residues, *Magnaporthe oryzae*, primary inoculum, epidemiology.

16

17 **Abstract**

18 Rice blast, caused by the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*, is a serious threat to rice
19 production worldwide. Understanding the way the pathogen survives between rice crops is
20 indispensable for efficient control. Multiyear field experiments measured the relative
21 importance of infected rice seeds, empty grains that fall to the ground during harvest, rice
22 straw and stem bases on the initial development of rice blast. No significant difference was
23 found in the number of lesions per hill between the treatments using infected rice seeds, seeds
24 treated with fungicides and uninfected seeds. However, leaf blast incidence was significantly
25 higher in treatments with infected empty grains, straw and stem bases left on top of the soil.

26 Infected rice organs (empty grains, straw and stem bases) left on the soil surface were shown
27 to be a major source of *M. oryzae* inoculum in upland rice fields, whereas epidemics
28 triggered by seeds were marginal at the plot scale. These findings will improve the integrated
29 management of rice blast by allowing targeted reduction of the sources of inoculum.

30

31 **Introduction**

32 Blast, which is caused by the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*, is one of the most
33 destructive diseases of rice worldwide (Pennisi, 2010) and is a model for the study of fungal-
34 plant interactions (Dean *et al.*, 2012; Valent, 1990). In field conditions, *M. oryzae* is able to
35 infect all aerial parts of rice, resulting in leaf, node and panicle blast (Ou, 1985). After
36 artificial inoculation in controlled conditions, *M. oryzae* has been shown to have the capacity
37 to infect plant roots (Sesma and Osbourn, 2004). Blast is an ascomycete disease caused by a
38 heterothallic hemibiotrophic fungus propagated by asexual spores (conidia). The infection
39 process is well documented and there have been significant advances in the basic
40 understanding of the biology of blast fungus from the attachment of the conidia to the surface
41 of the rice organ, the penetration of the fungus into the rice plant cells using a specialized cell
42 called the appressorium, the invasive growth and colonization of rice plant tissues, to the
43 release of new conidia from the lesion (Jenkinson *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2016; Martin-
44 urdiroz *et al.*, 2016; Ribot *et al.*, 2008; Wilson and Talbot, 2009; Yan and Talbot, 2016;).
45 Several studies have been conducted to assess the airborne concentration of *M. oryzae* spores
46 during blast epidemics in the field (Huang *et al.* 2016; Pinnschmidt *et al.*, 1993).
47 Knowledge of the life cycle of the fungus before infection is also indispensable for the
48 development of effective control strategies against this pathogen. In the tropics, airborne
49 conidia are presumably present throughout the year (Ou, 1985), allowing permanent
50 epidemics with no overwintering problems. By contrast, in high altitude tropical regions like
51 the Highlands of Madagascar (1,000 to 2,000 m above sea level) and in temperate regions,

52 where rice is absent for several months each year, overwintering is indispensable for the life
53 cycle and primary infection of the rice pathogen. The infected aerial parts of rice plants,
54 including seeds, residues and straw, are considered to be important overwintering sites and
55 sources of inoculum of the blast pathogen (Ou, 1985).

56 The role of infected seeds as a source of inoculum for blast epidemics has been relatively
57 well studied. Previous studies reported the presence of the blast pathogen in infected rice
58 seeds using polymerase chain reaction (Chadha and Gopalakrishna, 2006) and by visual
59 inspection (Mew and Gonzales, 2002). Puri *et al.* (2007) found a significant correlation
60 between the severity of panicle infection and the survival of *M. oryzae* in seeds on different
61 rice cultivars. The infection process from the contaminated germinating seed to the seedling
62 was investigated by cytological observations by Faivre-Rampant *et al.* (2013). Several studies
63 demonstrated the potential role of infected rice seeds in outbreaks of rice blast in field
64 conditions according to how the seeds are sown and their emplacement in the field (Guerber
65 and TeBeest, 2006; Long *et al.*, 2001; Manandharet *et al.*, 1998). These studies clearly
66 established that *M. oryzae* is a seedborne pathogen. Two types of rice grains were
67 distinguished. First, the full grains used for sowing (hereafter termed 'rice seeds'). Second,
68 the empty spikelets that fall to the ground during harvesting and remain on the surface of the
69 soil of the same plot (hereafter termed 'empty grains').

70 In Japan, where conditions are cold and wet (rain and snow), most of the studies cited in
71 Akase and Kusaba (2017) showed that blast fungus survival was difficult or impossible when
72 the infected rice residues remained in the field. However, in the high altitude upland rice
73 agrosystems used in the Vakinankaratra region of Madagascar where conditions are cold and
74 dry, Raveloson *et al.* (2017) showed that *M. oryzae* can survive on the rice stem and leaf
75 residues left on and under the rice mulch, at least between two cropping seasons, whereas
76 burying the rice residues in the soil at a depth of 10 cm reduced the viability of the blast

77 fungus. The result also revealed that the presence of infected rice residues on the soil surface
78 increased the level of the blast epidemic in the following crop of upland rice.
79 Rice straw is easy to remove from the field, but the base of the rice stems remain in both
80 upland and lowland fields after rice harvest, including during the intercropping seasons. *M.*
81 *oryzae* was shown to be able to infect the node of rice stem bases (Kato, 2001), but to date,
82 no convincing evidence has been produced to show that the rice stem bases remaining in the
83 field are a source of primary inoculum of rice blast.
84 Taken together, these findings suggest that different sources of inoculum contribute to rice
85 blast epidemics in upland rice fields and that their relative contribution needs to be assessed.
86 The main objective of the present study was thus to quantify the relative importance of
87 potential sources of inoculum for the development of blast disease. We divided our analyses
88 into two parts. Our first objective was to determine the effect of infected rice seeds on the
89 level of blast disease. The second was to characterize the contribution of the different
90 infected rice residues (empty grains, straw and stem bases) left on the soil surface to the
91 initial stages the development of blast disease.

92

93 **Materials and Methods**

94 The field trials were conducted in upland conditions at Andranomanelatra, 16 km north of
95 Antsirabe in the Vakinankaratra region of the Highlands of Madagascar (19°47' S, 47°06' E).
96 The altitude is 1,645 m above sea level and the climate is tropical with average annual
97 rainfall of 1,360 mm. The climate is characterized by two separate seasons: a warm rainy
98 summer season from October to April with a mean temperature 19 °C, and a cool dry season
99 from May to September with a mean temperature 14 °C. In this region, upland rice is
100 generally sown between mid-October and mid-November and the reproductive stage (from

booting to the end of grain filling) lasts from February to March. The rice is harvested in April. Trials were conducted over five growing seasons 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015, 2015-2016 and 2016-2017 (hereafter referred to as 2013, 2014, 2015, 2016 and 2017, respectively). Different potential sources of primary inoculum were evaluated in the field: infected seeds and rice residues (empty grains, straw and rice stem bases). Table 1 lists the treatments compared in each season. In 2013 and 2014, three treatments were compared: rice seeds from an infected field (diseased seeds: DS), diseased seeds treated with fungicide azoxystrobin (DSF), and diseased seeds disinfected with sodium hypochlorite (DSS). In 2015, two treatments were compared: rice seeds produced in a field where no blast attack was recorded (uninfected seeds: US) and seeds produced in a field where blast epidemics were recorded (DS). Treatments using uninfected and infected rice residues left on the soil surface were tested in this experimental design in 2013, 2014 and 2015, and the results on the role of rice residues on the development of blast disease have already been published (Raveloson *et al.*, 2017). Here these results are used as references. In 2016 and 2017, four treatments were compared: no crop residues left on the soil surface (bare soil: BS), infected empty grains left on the soil surface (diseased empty grains: DEG), infected straw (stems and leaves) left on the soil surface (diseased straw: DR) and infected rice stem bases left on the soil surface (diseased stem bases: DSB). Uninfected seeds were sown in all four treatments.

121

122 ***Preparation of rice seeds, empty grains, straw, and stem bases***

123 Susceptible cultivar Fofifa 152 (F152) was used in this study. The infected rice seeds of F152
124 used in 2013 were collected from a previous blast trial conducted in Andranomanelatra in the
125 2012 crop season. Infected rice seeds from trials conducted in 2013 and 2014 were used

126 respectively for the trials conducted in 2014 and 2015. The uninfected seeds used in 2015,
127 2016 and 2017 were obtained from cultivar F152 grown in seed production fields where no
128 blast attack was recorded in 2014, 2015, 2016, respectively. Infected empty grains, straw and
129 stem bases of F152 collected during trials conducted in 2015 and 2016 were used for the
130 trials conducted in 2016 and 2017, respectively.

131 For DSF treatments, infected seeds were treated with azoxystrobin (4 g per kg of seeds). The
132 seeds were mixed with the fungicide solution in a can and regularly shaken by hand. After 15
133 minutes, the seeds were spread out in a basin and dried before use. For the DSS treatment, the
134 infected seeds were soaked in a solution of 10% sodium hypochlorite for 30 minutes and then
135 dried. Rice seeds and empty grains were checked for the presence of *M. oryzae* using the
136 blotter methods described by Mew and Misra (1994). Four lots of one hundred seeds or
137 empty grains for each sample were checked for the presence of *M. oryzae* sporulation. The
138 percentage contamination of seeds or empty grains by the blast pathogen was determined as
139 the average of the four lots examined.

140 Rice straw (entire aerial rice parts normally cut and removed from the field during harvest but
141 left on the soil surface in the conservation agriculture system) were kept in the field in piles
142 until the following cropping season. The rice stem bases remained in the field after the
143 harvest and were torn off before use. Infected empty grains, residues and stem bases were
144 manually spread on the ground after seedling emergence.

145

146 ***Experimental design***

147 Randomized complete block designs with four replications were used for the trials. The
148 individual 3 m x 4 m plots (15 x 20 rows with a total of 300 hills) in 2013, 2014 and 2015,
149 and 4 m x 4 m plots (with a total of 400 hills) in 2016 and 2017 were sown with the
150 susceptible cultivar F152. The plots were separated by a buffer strip planted with the resistant

151 cultivar F172 to limit the spread of the disease between the plots. Six to eight seeds were
152 sown manually in hills spaced 20 cm x 20 cm apart. Organic fertilizer (cattle manure 5 t.ha⁻¹)
153 and mineral fertilizer (300 kg.ha⁻¹ NPK: 11% N, 22% P₂O₅, 16% K₂O; 500 kg.ha⁻¹ dolomite
154 (CaMg (CO₃)₂) and two topdressings of urea 50 kg.ha⁻¹ each (46% N)) were applied.

155

156 ***Blast disease assessment***

157 Since this study focused on primary sources of inoculum, blast was assessed at the onset of
158 the epidemics. Blast lesions were counted on the leaves of plants growing on the 176
159 innermost hills in the plots (11 x 16 rows) early in the 2013, 2014 and 2015 cropping seasons
160 and on the 256 innermost hills in the plots (16 x 16 rows) early in the 2016 and 2017
161 cropping seasons. Lesions were counted three times in 2013, 2014, 2016 and 2017 and once
162 in 2015 (because the disease occurred earlier in the 2015 cropping season).

163

164 ***Analyses***

165 All statistical analyses were performed with R version 3.2.5 (R Core Team, 2013). Analysis
166 of variance was carried out using data on blast severity. The numbers of lesions per hill were
167 log transformed to obtain homoscedasticity.

168

169 **Results**

170 ***Control of contamination of seeds and empty grains used in the experiments***

171 As expected, no sporulation of *M. oryzae* was recorded on seeds from the field where no blast
172 attack was found and no sporulation was recorded on infected grains treated either with
173 fungicide or sodium hypochlorite. Conversely, *M. oryzae* sporulation was observed on
174 infected seeds and empty grains. Average contamination was 24.5%, 31.5% and 40.8% of

175 seeds sown in 2013, 2014 and 2015 and 7.8% and 6.5% for empty grains left on the soil
176 surface in 2016 and 2017 cropping seasons, respectively.

177

178 ***Effect of seed contamination on the onset of blast epidemics in the field***

179 In 2013 and 2014, no significant difference was found in the number of lesions per hill
180 between the treatments diseased seeds (DS), diseased seeds treated with fungicide (DSF) and
181 diseased seeds disinfected with sodium hypochlorite (DSS) on the three sampling dates per
182 cropping season (figure 1). The level of the leaf blast attack on one sampling date in 2015
183 indicated that there was no significant difference between the treatments diseased seeds and
184 uninfected seeds (figure 1).

185

186 ***Effect of infected empty grains, straw and stem bases left on the soil surface on the onset of***
187 ***blast epidemics in the field***

188 Changes in the number of leaf blast lesions with the four treatments, bare soil (BS), infected
189 empty grains (diseased empty grains: DEG), infected straw (diseased straw: DR) and infected
190 stem bases (diseased stem bases: DSB) are shown in figure 2. Treatments DEG and DR
191 resulted in significantly more lesions than the BS treatment on the three sampling dates in the
192 two seasons monitored (2016 and 2017). The number of lesions per hill in plots with diseased
193 rice stem bases (DSB) on the soil surface was significantly higher than the number of lesions
194 in plots with no rice residues on the soil surface (BS) on the three sampling dates in 2016 and
195 on the second sampling date in 2017 (January 13). For the three treatments DEG, DR and
196 DSB, no significant difference was found in the number of lesions per hill on the three
197 sampling dates in 2016. In 2017, the number of lesions per hill in treatment DSB was
198 significantly lower than in the two treatments DEG and DR on the three sampling dates.

199

200 Discussion

201 Our results showed that sowing infected rice seeds in upland fields in the conditions that
202 prevail in Vakinankaratra region did not significantly influence the onset of blast epidemics,
203 since there was no significant difference in the number of leaf blast lesions between
204 treatments with infected rice seeds, infected rice seeds treated with fungicide or sodium
205 hypochlorite and uninfected rice seeds. This could be explained by the low viability of *M.*
206 *oryzae* in the soil because this fungus is considered to be a poor saprophytic competitor (Ou,
207 1985). Manandhar *et al.* (1998) found that the recovery of *M. oryzae* was lower and declined
208 faster from seeds sown in unsterilized soil than from seeds sown in sterilized soil. This
209 observation supports the hypothesis that the fungus is inhibited by antagonistic soil
210 microorganisms. Lesions on seedling were rarely found when infected seeds were completely
211 covered by soil (Filippi and Prabhu, 1997; Manandhar *et al.*, 1998). In addition, cytological
212 observation of the process of infection from the contaminated germinating seed to the
213 seedling conducted by Faivre-Rampant *et al.* (2013) did not show systemic movement of *M.*
214 *oryzae* within seedlings grown from infected seeds. Nevertheless, analyses of *M. oryzae*
215 population genetics highlighted the essential role of infected rice seeds for the migration of
216 blast pathogen from its origin to other countries (Tharreau *et al.*, 2009; Saleh *et al.*, 2014) but
217 the phenomenon appears to be of limited importance at the field level.

218 Empty grains can fall to the ground in blast infected fields, especially during harvest when
219 seed-shattering susceptible cultivars are used. In this study, we found that the presence of
220 infected empty grains on the soil surface had an effect on the level of leaf blast at the early
221 stage of the epidemic. Similar results have been reported in previous studies conducted in
222 fields in which infected non-germinated seeds left on the soil surface after planting resulted in
223 the development of the disease (Guerber and TeBeest, 2006; Long *et al.*, 2001).

224 During harvest in the Vakinankaratra region of the Madagascar Highlands, some of the rice
225 straw is dried and stored in upland fields near the farm homestead before being used to feed
226 livestock. In conservation agriculture cropping systems, some rice straw is left in the field as
227 mulch to ensure the environmental and agronomic sustainability of upland crops (Scopel *et*
228 *al.*, 2013). In a previous study, it was shown that the *M. oryzae* can survive for long periods
229 on rice straw in field conditions (Raveloson *et al.*, 2017). The results of both the previous and
230 the present study revealed that the presence of infected straw in the plot influenced the onset
231 of blast epidemic in all the cropping seasons.

232 After harvest, rice stem bases remain in the field in both upland and lowland rice
233 agrosystems. To our knowledge, no study has been published on the role of these rice stem
234 bases as potential sources of rice blast inoculum. In 2016, the level of leaf blast was
235 significantly higher in the treatment in which infected rice stem bases were left on the soil
236 surface than in the bare soil treatment. This observation suggests that infected rice stem bases
237 may be sources of rice blast inoculum in the field. Blast symptoms were found on stem base
238 nodes but less frequently than symptoms were observed on the leaf and neck. The effect of
239 stem bases on the onset of blast epidemic in 2017 was lower than the effects of empty grains
240 and straw, which could be explained by the level of blast attack on the plots of the previous
241 year of the trials where stem bases samples were taken. In the 2015 and 2016 cropping
242 seasons, the average leaf blast severities were 3.8% and 0.1% and panicle blast severities
243 were 30% and 33%, respectively. The relative importance of the different inoculum sources
244 could be linked to the sources of contaminations of rice organs. Infection of stem bases is
245 probably correlated with leaf blast, infection of empty grains to panicle blast, and infection of
246 straw to leaf and panicle (neck) blast. This is consistent with the fact that stem bases, attacked
247 by leaf blast, could be less infected than empty grains, related to panicle blast, and less
248 infected than straws, related to leaf and panicle (neck) blast. Our results revealed that infected

249 rice organs (empty grains, straw and stem bases) left on the soil surface are the main sources
250 of *M. oryzae* inoculum in the upland fields in the Vakinankaratra region of the Highlands of
251 Madagascar. Faivre-Rampant *et al.* (2013) proposed two non-exclusive scenarios of rice blast
252 epidemics in the field. The first scenario was the systemic colonization of the plant from the
253 seed via the stem vascular system, without symptom expression as proposed by Guerber and
254 TeBeest (2006) and Marcel *et al.* (2010). Our results do not support this scenario because
255 when infected rice seeds were sown and then covered completely by soil, the effect on the
256 level of blast appeared to be the same as that of uninfected rice seeds. The second scenario
257 was the production of inoculum from dead seeds or dead seedlings and the contamination of
258 healthy seedlings by the transportation of mycelium or spores. Our results are in agreement
259 with this second scenario. Infected rice empty grains, straw and stem bases left on the soil
260 surface caused earlier leaf blast attack on the rice plant. We suggest that the blast fungus
261 mycelium can survive on these rice organs, sporulate when the environmental conditions
262 become favorable, and infect healthy seedlings. The spores are then dispersed by rain, wind
263 or by contact with adjacent rice plants and will infect new leaves, new plants and new plots.
264 To reduce the onset of blast epidemics in the field, control measures should focus on these
265 rice organs. Control can be achieved by removing these organs from the infected field.
266 Removal is possible for rice straw but could be more difficult for grains and stem bases. The
267 result showing that the survival of *M. oryzae* was reduced when the rice organs were buried
268 in the soil could be exploited. Plowing the infected field just after the harvest buried the
269 remaining infected organs and could be an effective way to reduce the amount of *M. oryzae*
270 inoculum. The use of healthy seed lots and crop rotation is always to be recommended.

271

272

273

274 **Acknowledgements**

275 This research was conducted at the DP/SPAD unit in Madagascar. We thank FOFIFA
276 technicians for their assistance in the field and laboratory experiments, François Bonnot
277 (UMR BGPI, CIRAD Montpellier France) for his help with statistical analysis of the data.
278 This work was supported in part by funds from ANR-09-STRA-03 “GARP” project, CIRAD
279 *Action Incitative* and by CGIAR Research Program on Rice (RICE).

280

281 **References**

- 282 Akase, K., and Kusaba, M. 2017. Overwintering of *Pyricularia oryzae* in wild infected
283 foxtails. *Journal of General Plant Pathology*. 83:197–204.
- 284 Chadha, S., and Gopalakrishna, T. 2006. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice
285 seeds using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*. 100:1147–
286 1153.
- 287 Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu,
288 P. D., Rudd, J. A., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G. D. 2012. The
289 Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*.
290 13:414–430.
- 291 Faivre-Rampant, O., Geniès, L., Piffanelli, P., and Tharreau, D. 2013. Transmission of rice
292 blast from seeds to adult plants in a non-systemic way. *Plant Pathology*. 62:879–887.
- 293 Filippi, M. C., and Prabhu, A. S. 1997. Integrated effect of host plant resistance and
294 fungicidal seed treatment on rice blast control in brazil. *Plant Disease*. 81: 351–355.
- 295 Guerber, C., and TeBeest, D. O. 2006. Infection of rice seed grown in Arkansas by
296 *Pyricularia grisea* and transmission to seedlings in the field. *Plant Disease*. 90:170–176.

- 297 Huang, C. M., Liao, D. J., Wu, H. S., Shen, W. C., and Chung, C. L. 2016. Cyclone-based
298 spore trapping , quantitative real-time polymerase chain reaction and high resolution
299 melting analysis for monitoring airborne inoculum of *Magnaporthe oryzae*. *Annals of*
300 *Applied Biology*. 169:75–90.
- 301 Jenkinson, C. B., Jones, K., Zhu, J., Dorhmi, S., and Khang, C. H. 2017. The appressorium of
302 the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* remains mitotically active during post-
303 penetration hyphal growth. *Fungal Genetics and Biology*. 98:35–38.
- 304 Jones, K., Jenkinson, C. B., Araújo, M. B., Zhu, J., Kim, R. Y., Kim, D. W., and Khang, C.
305 H. 2016. Mitotic stopwatch for the blast fungus *Magnaporthe oryzae* during invasion of
306 rice cells. *Fungal Genetics and Biology*. 93:46–49.
- 307 Kato, H. 2001. Rice blast disease. *Pesticide Outlook*. 12:23–25.
- 308 Long, D. H., Correll, J. C., Lee, F. N., and TeBeest, D. O. 2001. Rice blast epidemics
309 initiated by infested rice grain on the soil surface. *Plant Disease*. 85:612–616.
- 310 Manandhar, H. K., Jørgensen, H. J. L., Smedegaard-Petersen, V., and Mathur, S. B. (1998).
311 Seedborne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings.
312 *Plant Disease*. 82:1093–1099.
- 313 Marcel, S., Sawers, R., Oakeley, E., Angliker, H., and Paszkowski, U. 2010. Tissue-adapted
314 invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell*. 22:3177–
315 3187.
- 316 Martin-urdiroz, M., Oses-ruiz, M., Ryder, L. S., and Talbot, N. J. 2016. Investigating the
317 biology of plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics*
318 *and Biology*. 90:61–68.
- 319 Mew, T., and Gonzales, P. 2002. *A handbook of rice seedborne fungi*. Los Baños,
320 Philippines: International Rice Research Institute.

- 321 Mew, T. W., and Misra, J. K. 1994. *A manual of rice seed health testing*. Los Baños,
322 Philippines: International Rice Research Institute.
- 323 Ou, S. H. (1985). Blast. In *Rices Diseases* 2nd ed. International Rice Research Institute, Kew,
324 UK. 109–201.
- 325 Pennisi, E. 2010. Armed and Dangerous. *Science*. 327:804–805.
- 326 Pinnschmidt, H. O., Klein-Gebbinck, H. W., Bonman, J. M., and Kranz, J. 1993. Comparison
327 of aerial concentration deposition and infectiousness of conidia of *Pyricularia grisea* by
328 spore-sampling techniques. *Phytopathology*. 83:1182–1189.
- 329 Puri, K. D., Shrestha, S. M., Joshi, K. D., and Khatri, G. B. 2007. Survival of *Magnaporthe*
330 *grisea* on rice seeds from artificially inoculated panicles of selected rice lines. *Tropical*
331 *Agricultural Research*. 19:91–100.
- 332 R Core Team. (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna,
333 Austria: R Foundation for Statistical Computing. [<http://www.r-project.org>]. Accessed
334 20 January 2016.
- 335 Raveloson, H., Ratsimiala Ramonta, I., Tharreau, D., and Sester, M. 2017. Infected rice
336 residues allowing long term survival of blast pathogen serve as major source of primary
337 inoculum in high altitude upland ecology. *Plant Pathology*. Online publication:
338 doi:10.1111/ppa.12790
- 339 Ribot, C., Hirsch, J., Balzergue, S., Tharreau, D., Nottéghem, J. L., Lebrun, M. H., and
340 Morel, J. B. 2008. Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal*
341 *of Plant Physiology*. 165:114–124.
- 342 Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Fournier, E., and Tharreau, D. 2014. South-East Asia is the
343 center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*.
344 *New Phytologist*. 201:1440–1456.

- 345 Scopel, E., Triomphe, B., Affholder, F., Da Silva, F. A. M., Corbeels, M., Xavier, J. H. V.,
346 Lahmar, R.; Recous, S., Bernoux, M., Blanchart, E., de Carvalho Mendes, I., and De
347 Tourdonnet, S. 2013. Conservation agriculture cropping systems in temperate and
348 tropical conditions, performances and impacts. A review. *Agronomy for Sustainable*
349 *Development*. 33:113–130.
- 350 Sesma, A., and Osbourn, A. E. 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental
351 processes typical of root-infecting fungi. *Nature*. 431:582–586.
- 352 Tharreau, D., Fudal, I., Andriantsimialona, D., Utami, D., Fournier, E., Lebrun, M., and
353 Nottéghem, J. L. 2009. World population structure and migration of the rice blast
354 fungus, *Magnaporthe oryzae*. In: Wang GL, Valent B, eds., *Advances in genetics,*
355 *genomics and control of rice blast disease*. (pp. 209–215). Dordrecht, the Netherlands:
356 Springer:209-215.
- 357 Valent, B. 1990. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*. 80:33–
358 36.
- 359 Wilson, R. A., and Talbot, N. J. 2009. Under Pressure : Investigating the biology of plant
360 infection by *Magnaporthe oryzae*. *Microbiology*. 7:185–195.
- 361 Yan, X., and Talbot, N. J. 2016. Investigating the cell biology of plant infection by the rice
362 blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Current Opinion in Microbiology*. 34:147–153.

363 **Table**

364 Table 1: *Treatments compared in each season in this study*

365

366 **Figure Legend**

367 Figure 1 *Number of lesions per hill at the onset of the epidemic in the three treatments:*
368 *diseased seeds (DS), diseased seeds treated with fungicide (DSF), and diseased seeds*
369 *disinfected with sodium hypochlorite (DSS) in 2013 and in 2014, and in the two treatments*
370 *DS and uninfected seeds (US) in 2015. Vertical bars are standard errors of the means.*

371

372 Figure 2 *Number of lesions per hill at the onset of epidemics under the four treatments with*
373 *no rice organs (bare soil, BS) and with infected empty grains on the soil surface (diseased*
374 *empty grains, DEG) with infected straws on the soil surface (diseased straw, DR) and with*
375 *infected stem bases on the soil surface (diseased stem bases, DSB) in 2016 and in 2017.**
376 *show a significant effect of the treatments ($P < 0.05$). Vertical bars are standard errors of the*
377 *means.*

378

Phytopathology

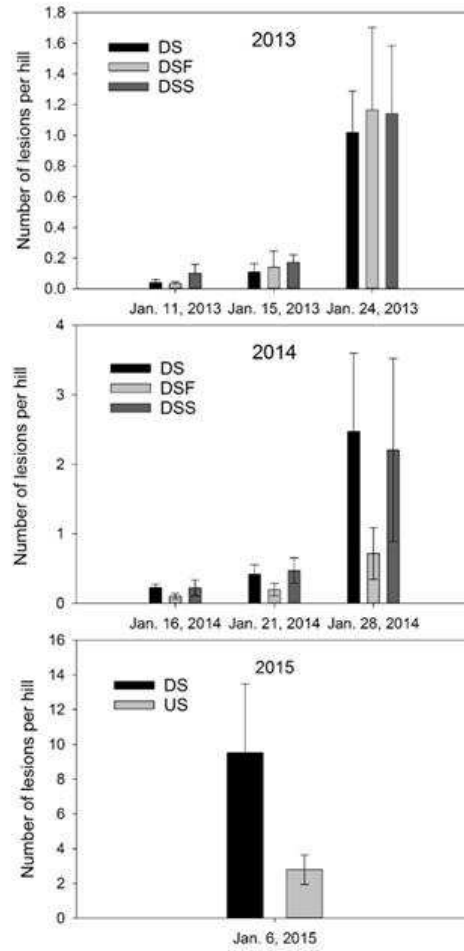


Figure 1 Number of lesions per hill at the onset of the epidemic in the three treatments: diseased seeds (DS), diseased seeds treated with fungicide (DSF), and diseased seeds disinfected with sodium hypochlorite (DSS) in 2013 and in 2014, and in the two treatments DS and uninfected seeds (US) in 2015. Vertical bars are standard errors of the means.

Phytopathology

Table 1

Cropping seasons	Number of treatments	Name of treatment	Seeds sown	Emplacement in field plot
2012-2013 and 2013-2014	3	Diseased seeds (DS) DS treated with fungicide (DSF) DS disinfected with sodium hypochlorite (DSS)	Diseased seeds	Covered by soil
2014-2015	2	Diseased seeds (DS) Uninfected seeds	Diseased seeds Uninfected seeds	Covered by soil
2015-2016 and 2016-2017	4	Bare soil (BS) Diseased empty grains (DEG) Diseased straw (DR) Diseased stem bases (DSB)	Uninfected seeds	No residues On the soil surface

For Peer Review

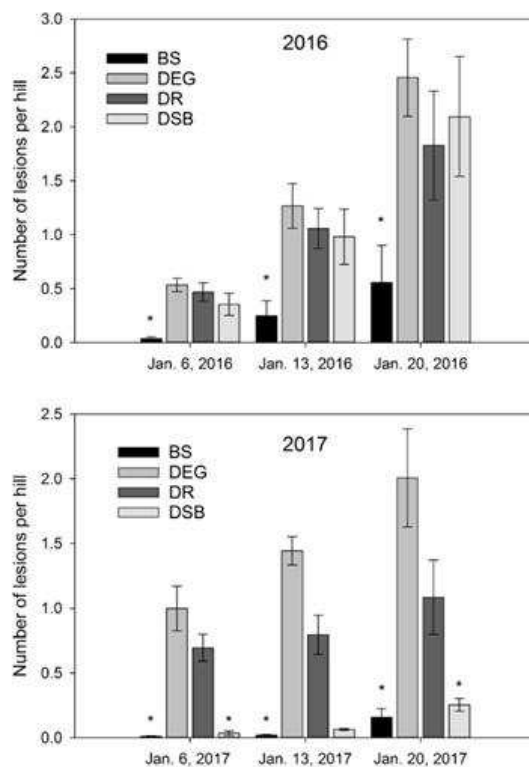


Figure 2 Number of lesions per hill at the onset of epidemics under the four treatments with no rice organs (bare soil, BS) and with infected empty grains on the soil surface (diseased empty grains, DEG) with infected straws on the soil surface (diseased straw, DR) and with infected stem bases on the soil surface (diseased stem bases, DSB) in 2016 and in 2017.* show a significant effect of the treatments ($P < 0.05$). Vertical bars are standard errors of the means.

IV.3. Le riz irrigué constitue-t-il une source d'inoculum pour le riz pluvial ?

IV.3.1. Introduction

Le risque de propagation de la pyriculariose entre le riz irrigué et le riz pluvial dépend de la distance de dispersion de la pyriculariose et de l'adaptation des souches de l'agent pathogène aux variétés cultivées dans les deux systèmes. Des études suggèrent que la majorité des spores sont dispersées sur quelques mètres (1-5 m) lors d'une épidémie au champ et que la dispersion à longue distance est rare (Nottéghem, 1977; Ou, 1985 ; Tharreau *et al.*, 2009). Dans le cas des Hautes Terres de la région du Vakinankaratra à Madagascar, les parcelles de riz irrigué et de riz pluvial sont très proches dans la majorité des bassins versants. Andriantsimialona et Tharreau (2008) ont comparé des populations de *M. oryzae* échantillonnées sur des parcelles irriguées et pluviales dans des bassins versants de la région. D'après la structure génétique et le pouvoir pathogène des populations étudiées, leurs résultats suggèrent qu'il y a eu une différenciation des souches de *M. oryzae* isolées dans l'agrosystème pluvial à partir des populations qui étaient présentes initialement sur l'agrosystème irrigué et que le flux génétique est limité entre ces agrosystèmes.

L'étude de la diversité et de la structure des populations de *M. oryzae* a été utilisée pour mieux comprendre l'origine et le processus de migration (Kumar *et al.*, 1999 ; Saleh *et al.*, 2014). Sur d'autres pathosystèmes, les auteurs considèrent que deux populations de pathogène avec peu de différenciation génétique proviennent de la même source d'inoculum (Vaghefi *et al.*, 2017). Dans notre cas, nous avons étudié la structure génotypique des populations de *M. oryzae* pour déterminer si les souches présentes sur les parcelles irriguées pourraient avoir servi de sources d'inoculum pour les parcelles pluviales. Notre hypothèse de travail est que si le riz irrigué est une source d'inoculum pour le riz pluvial, la population de *M. oryzae* sur riz pluvial doit être la même que sur riz irrigué. Nous avons utilisé deux types d'échantillons : 1) des souches collectées sur des plantes pièges sensibles distribuées le long de la toposéquence, 2) des souches collectées sur les variétés cultivées le long de la toposéquence.

IV.3.2. Matériels et méthodes

a. Sites d'études

Il faut rappeler que les suivis de pyriculariose sur la variété dominante, ChD ont été réalisés dans 6 sites (chapitre II). Le choix des sites pour mener cette étude est basé sur la proximité entre les parcelles de riz irrigué et de riz pluvial. Trois des 6 sites suivis (Antsapanimahazo, Mananetivohitra et Morarano) correspondent à des bassins versants dans lesquels les parcelles irriguées sont proches des parcelles pluviales (figure 24).

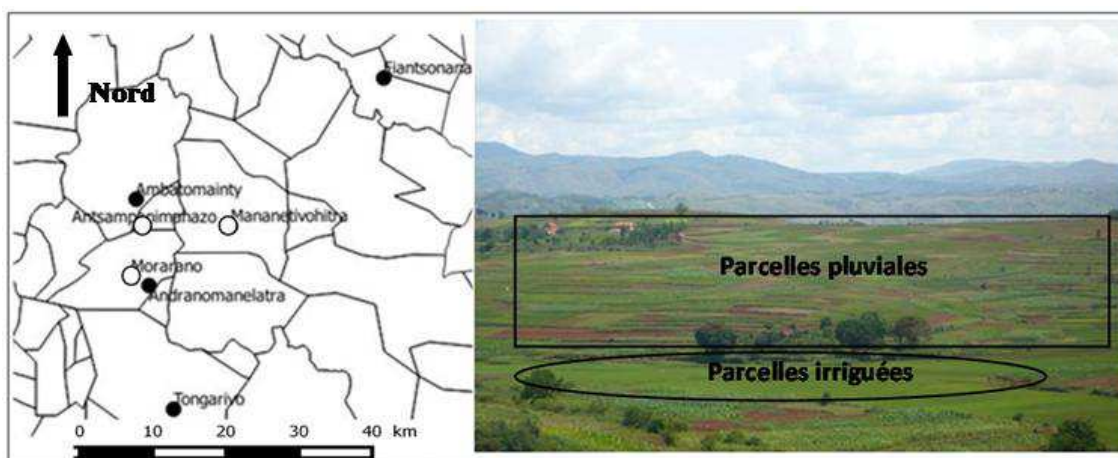


Figure 24 : Trois sites (points en blanc) présentant des parcelles irriguées et pluviales proches

b. Suivis de la maladie et collecte des échantillons

Durant la campagne 2014-2015 (nommée ci-après 2015), les suivis de pyriculariose ont été effectués sur des parcelles paysannes de riz irrigué et de riz pluvial avec différentes variétés. Pour la campagne 2015-2016 (nommée ci-après 2016), une variété très sensible à la pyriculariose, Kasalath, a été utilisée pour le piégeage des souches de *M. oryzae*. Cette variété a été semée sur des parcelles de 1.5 m² mises en place sur 4 positions de la toposéquence, du bas-fond irrigué jusqu'aux parcelles cultivées pluviales, qui ont été nommées comme : parcelle irriguée (PI), parcelle intermédiaire (PM), parcelle à proximité du pluvial (PR) et parcelle pluviale (PP) (figure 25). Ce dispositif a été mis en place dans les trois sites étudiés en 2015.

Lors des campagnes 2015 et 2016, la mesure du niveau d'attaque de pyriculariose sur les parcelles paysannes a été effectuée selon la même procédure que celle décrite au chapitre 2. Lors de la campagne 2016, sur les parcelles de Kasalath, l'attaque de la pyriculariose a été classée en 4 niveaux : niveau 1 : absence de lésion (parcelle non infectée), niveau 2 :

quelques lésions recensées sur certains feuilles et poquets (attaque faible <1% de surface foliaire), niveau 3 : présence de plusieurs lésions sur les feuilles et sur les poquets (attaque moyenne <20%) et niveau 4 : lésions qui présentent sur la majorité des feuilles et sur tous les poquets (attaque forte >20%).

Sur les parcelles présentant des attaques de pyriculariose, des échantillons de riz malades ont été collectés pour obtenir environ 20 souches (une population) de *M. oryzae* par variété et par parcelle dans une position de la toposéquence.

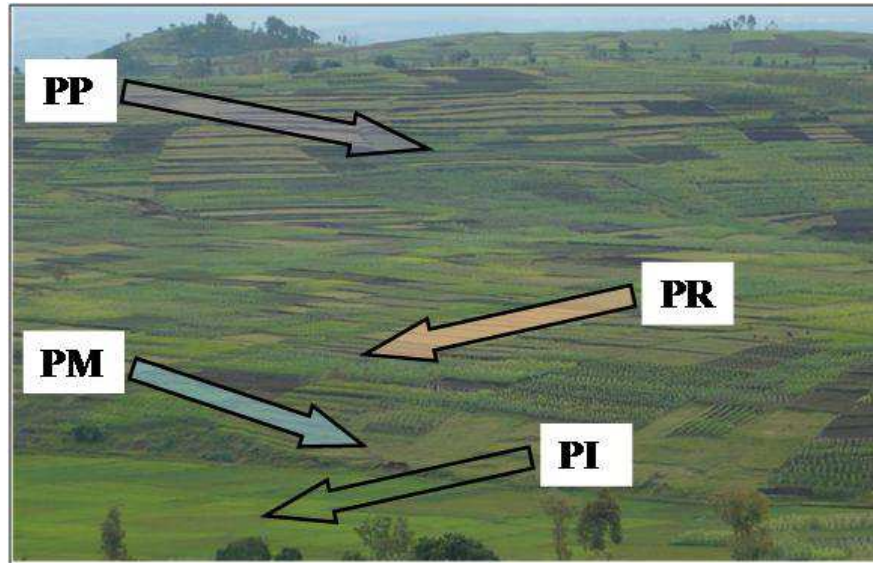


Figure 25 : Représentation de la mise en place de la variété Kasalath sur les 4 positions : PI : Parcelle irriguée, PM : parcelle intermédiaire, PR : parcelle à proximité du pluvial et PP : parcelle pluviale

c. *Analyse moléculaire des souches*

Les souches de *M. oryzae* étudiées ont été traitées suivant les méthodes décrites précédemment (chapitre III). L'isolement monospore a été réalisé à partir des échantillons malades collectés au champ. Puis, les souches ont été conservées à -20 °C. Lors du génotypage, ces souches ont été remises en culture et l'extraction de l'ADN a été réalisée. Les ADN obtenus ont été amplifiés avec 12 marqueurs microsatellites avec la technique de PCR multiplexée. Les détails de ces procédures de génotypage des souches sont décrits dans le chapitre III, partie III.2.2 du matériel et méthodes.

Les souches ayant strictement le même génotype avec les 12 marqueurs SSR utilisés, ont été groupées au sein d'un même génotype multilocus (MLG). Ces MLGs ont ensuite été groupés en groupes clonaux (GC) en fonction de leur proximité génétique et du nombre de souches par MLG. Chaque MLG représenté par 5 individus ou plus a été considéré comme un

GC. Chaque MLG représenté par moins de 5 individus a été rattaché au GC le plus proche génétiquement. La distribution des GC en fonction de leur position sur la toposéquence a été analysée par le test exact de Fisher pour chaque site. L'analyse statistique a été conduite sous R (version R 3.2.5 ; R Core Team, 2016).

IV.3.3. Résultats

a. *Suivis de la maladie*

Pour la campagne culturale 2015, des attaques de pyriculariose ont été observées dans deux des trois sites suivis : 2 parcelles irriguées et 4 parcelles pluviales à Mananetivohitra, et 1 parcelle irriguée et 1 parcelle pluviale à Morarano (tableau 11). Le niveau d'attaque de la maladie varie selon les variétés et les parcelles suivies mais les plus fortes attaques ont été observées en culture pluviale. Pour la campagne 2016, des attaques de pyriculariose sur la variété très sensible Kasalath ont été observées sur les 4 positions de la toposéquence (parcelle irriguée : PI, parcelle intermédiaire : PM, parcelle à proximité du pluvial : PR et parcelle pluviale : PP) à Mananetivohitra. Pour les deux autres sites, des attaques ont été observées sur les PM et PR d'Antsapanimahazo et sur la PM de Morarano. La sévérité de la pyriculariose sur la variété Kasalath montre que les plantes de riz sur parcelles intermédiaires sont très attaquées par la maladie dans les trois sites. Par contre le niveau d'attaque sur les autres parcelles (PI, PR et PP) varie selon les sites. Les suivis sur des parcelles d'autres variétés ont permis de recenser des attaques de pyriculariose sur les parcelles irriguées pour les trois sites et sur la parcelle pluviale seulement à Morarano (tableau 11).

b. *Génotypage des souches*

A partir de ces parcelles attaquées par la pyriculariose, nous avons obtenu 8 populations de *M. oryzae* en 2015 et 11 en 2016. Le détail de ces populations est donné dans le tableau 10. En 2015, les 137 souches de *M. oryzae* génotypées venant des huit populations des deux sites échantillonnés (Mananetivohitra et Morarano), ont mis en évidence 31 génotypes multilocus (MLG) qui ont été répartis dans 14 groupes clonaux (GC) (figure 26).

A Mananetivohitra, deux GC sont communs entre les souches de parcelles irriguées (PI) et pluviales (PP) dont un (GC75) pour lequel la fréquence est très différente entre PI et PP, 3 GC sont spécifiques pour PI et 7 GC sont spécifiques pour PP.

Tableau 11 : Description des populations de *Magnaporthe oryzae* utilisées dans la présente étude et niveau d'attaque de pyriculariose sur ces parcelles

Sites	nom des populations	nombre de souches	Variété d'origine	Sévérité de la maladie en (%)	parcelle
Campagne		2015			
Mananetivohitra	pop11	24	variété locale	15	irriguée
	pop12	19	variété locale	8	irriguée
	pop1	10	Chhomrong Dhan	<1	pluviale
	pop7	17	Chhomrong Dhan	<1	pluviale
	pop2	15	variété locale	60	pluviale
	pop14	21	variété locale	5	pluviale
Morarano	pop13	19	variété locale	5	irriguée
	pop10	12	variété locale	80	pluviale
Campagne		2016			
Mananetivohitra	pop34	20	variété locale	10	irriguée
	pop18	19	Kasalath	<1	irriguée
	pop20	20	Kasalath	>20	intermédiaire
	pop21	18	Kasalath	>20	proximité pluviale
	pop22	20	Kasalath	<20	pluviale
Morarano	pop32	17	variété locale	<1	irriguée
	pop24	21	Kasalath	>20	intermédiaire
	pop30	20	Fofifa 154	2	pluviale
Antsapanimahazo	pop33	20	variété locale	<1	irriguée
	pop25	20	Kasalath	>20	intermédiaire
	pop26	21	Kasalath	<1	proximité pluviale

pop : population

A Morarano, deux GC sont communs entre les souches de PI et PP dont l'un (GC31) pour lequel la fréquence est très différente entre PI et PP, 1 GC est spécifique pour PI et 5 GC sont spécifiques pour PP.

L'analyse statistique de la composition en GC des différentes populations (test exact de Fisher) indique qu'elles sont significativement différentes ($P < 0.001$) entre les parcelles irriguées et les parcelles pluviales dans les deux sites (figure 26).

En 2016, les 216 souches de *M. oryzae* génotypées venant de 11 populations des trois sites échantillonnés (Mananetivohitra, Morarano et Antsapanimahazo), ont permis d'identifier 31 MLG répartis dans 20 GC. A Mananetivohitra, 2 GC sont spécifiques pour PI, 2 GC pour PM, 2 GC pour PR et 1 GC pour PP. Les 6 autres GC sont communs au moins entre deux positions. A Morarano, 6 GC sont spécifiques pour PI, 2 GC pour PM et 2 GC

pour PP. Un GC est commun pour PI et PM. A Antsapanimahazo, 3 GC sont spécifiques pour PI et 2 GC pour PR. Un GC est commun entre PI et PM et un GC est commun entre PM et PR. L'analyse statistique avec le test exact de Fisher en comparant les 4 endroits (PI, PM, PR et PP) à Mananetivohitra, 3 endroits (PI, PM et PP) à Morarano et 3 endroits (PI, PM et PP) à Antsapanimahazo, montre que la composition en GC diffère significativement ($P < 0.001$) dans toutes les comparaisons par paires de positions au sein d'un site (figure 26) à l'exception d'Antsapanimahazo où il n'y a pas de différence entre les souches échantillonnées sur la parcelle irriguée et sur la parcelle intermédiaire.

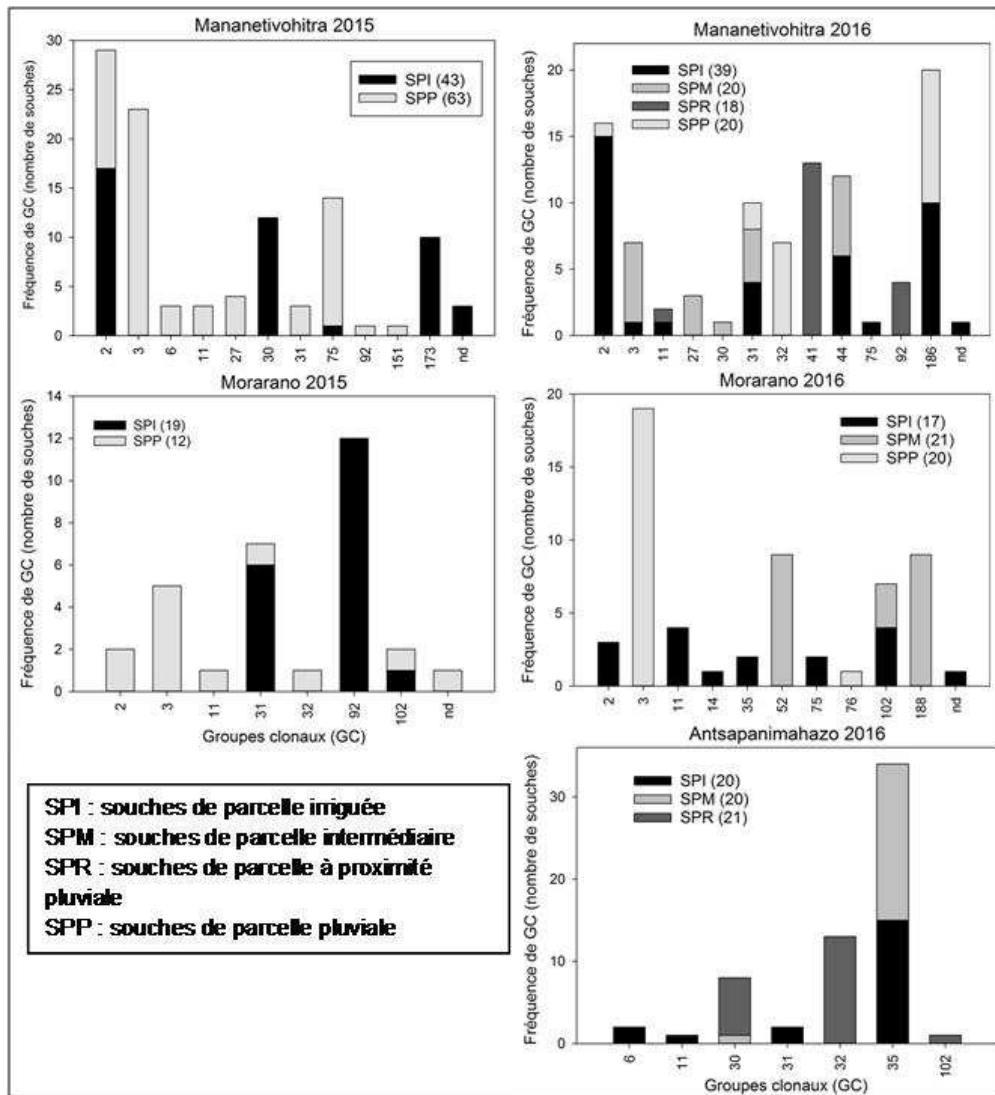


Figure 26 : Distribution des groupes clonaux de *Magnaporthe oryzae* sur les trois sites en fonction de positions de collecte (Campagnes culturales 2015 et 2016)

Le nombre de souches échantillonnées sur des parcelles de chaque position est donné entre parenthèses.

Un effet significatif a été observé sur tous les sites et pour les deux années (Test de Fisher).

Ces analyses montrent que les populations de l'agent pathogène ne sont pas les mêmes à différentes positions de la toposéquence et en particulier entre la culture irriguée et la culture pluviale.

IV.3.4. Discussion

Pour examiner le rôle potentiel des parcelles de riz irrigué comme source d'inoculum pour la pyriculariose des parcelles de riz pluvial, des suivis des attaques de pyriculariose tout au long du bassin versant ont été conduites. La structure génétique des populations de *M. oryzae* collectées sur différentes positions de la toposéquence a été caractérisée et comparée.

Nous n'avons pas pu piéger des souches de *M. oryzae* sur certaines parcelles (parcelles irriguées, parcelles à proximité du pluvial et parcelles pluviales à Morarano et parcelles irriguées et pluviales à Antsapanimahazo) malgré la sensibilité de la variété Kasalath sur les Hautes Terres. Malgré son spectre de sensibilité assez large à un panel de souches représentatives de la diversité mondiale (testé en conditions contrôlées), cette absence d'attaque de pyriculariose dans certains endroits pourrait s'expliquer par une certaine spécificité de la variété. Si c'est le cas, le dispositif pourrait être amélioré en utilisant une ou deux variétés sensibles supplémentaires pour pouvoir capturer au maximum les populations de *M. oryzae* aux environs des parcelles pièges. Le choix de ces variétés sensibles devra prendre en compte les deux sous-espèces de riz cultivées *indica* et *japonica* car Gallet *et al.* (2016) ont montré des différences de compatibilité entre variétés des groupes *indica*, *japonica* tropical et *japonica* tempéré vis-à-vis de 31 souches de *M. oryzae* représentant la diversité mondiale de l'agent pathogène de pyriculariose. Les attaques sur la variété Kasalath placée au niveau intermédiaire se sont révélées systématiquement les plus fortes dans les trois sites. Cette situation pourrait être expliquée en partie par le niveau de fertilité du sol de chaque position bien que la quantité d'intrants apportée pour chaque parcelle dans les 4 positions de la toposéquence ait été la même. L'effet de la fertilité sur la sensibilité des variétés est très connu (Long *et al.*, 2000 ; Ballini *et al.*, 2013). L'omniprésence de la pyriculariose sur les parcelles intermédiaires pourrait être due à la forte fertilité dans ces parcelles à cause des dépôts de nutriments venant de l'amont par érosion.

L'analyse des 8 populations de *M. oryzae* échantillonnées sur les parcelles irriguées et pluviales dans deux sites (Mananetivohitra et Morarano) en 2015 montre que la distribution des souches de *M. oryzae* dans les groupes clonaux diffère significativement entre les populations venant des parcelles irriguées et des parcelles pluviales dans chaque site. En 2016, les résultats ont révélé que la structure génotypique des populations venant d'une

position est significativement différente de celle des populations venant d'autres positions dans un même site. Ces résultats concordent avec les observations décrites par Andriantsimalona et Tharreau (2008) montrant que les populations sur irrigué et sur pluvial sont différenciées. Cette différenciation résulterait d'une adaptation aux variétés en conditions pluviales des populations de *M. oryzae* présentes initialement en riziculture irriguée. Nos observations confirment également que les échanges de souches de *M. oryzae* sont limités entre les deux agrosystèmes. La faible dispersion des spores de *Magnaporthe oryzae* (1-5 m) lors d'une épidémie au champ (Nottéghem, 1977 ; Ou, 1985 ; Tharreau *et al.*, 2009) et la spécialisation des souches en fonction des variétés pourraient expliquer cette différenciation.

IV.4. Conclusion partielle de la partie IV

Nous avons pu mettre en évidence que l'agent pathogène de la pyriculariose peut survivre sur des résidus infectés (tiges et feuilles) de riz au moins entre deux, voire trois saisons culturales lorsqu'ils sont laissés sur le sol et que ces résidus infectés constituent une source potentielle d'inoculum primaire et contribuent à l'initiation de la pyriculariose sur le terrain. L'agent pathogène survit, en revanche, beaucoup moins longtemps sur les résidus lorsqu'ils sont enfouis. Ensuite, nous avons pu montrer que la présence sur la surface de sol de grains vides et des bases de tige de riz infectés est également impliquée dans l'initiation des épidémies de pyriculariose en riziculture pluviale. En revanche, la présence des parcelles de riz irrigué attaquées par la pyriculariose semble moins importante pour l'initiation de cette maladie dans les parcelles de riz pluvial du même bassin versant.

Pour conclure, une bonne gestion des organes de riz issus des parcelles attaquées devrait permettre de réduire l'installation précoce d'épidémie de pyriculariose, notamment en les enfouissant après la récolte.

Chapitre V. **Discussion générale**

La recherche de variétés durablement résistantes aux bioagresseurs est un élément essentiel des stratégies de lutte contre les maladies des plantes. La variété Chhomrong Dhan a été adoptée très massivement en riziculture pluviale d'altitude sur les Hautes Terres de la région du Vakinankaratra. Elle est très peu attaquée par la pyriculariose pour l'instant mais la situation présente un risque important d'adaptation de l'agent pathogène qui pourrait conduire au développement d'épidémies.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à cette situation exceptionnelle d'homogénéité variétale pour détecter une éventuelle adaptation de *M. oryzae* à une résistance quantitative. En premier lieu, nous avons suivi les attaques de pyriculariose pour évaluer l'érosion ou non de la résistance quantitative. Ensuite, l'analyse de la diversité et de la structure génétique des populations de *M. oryzae* a été réalisée pour comprendre leur capacité d'adaptation à la variété ChD. Enfin, nous avons mesuré l'importance de différentes sources d'inoculum qui pourraient constituer des éléments clés à gérer pour éviter la propagation d'éventuelles souches adaptées.

V.1. Durabilité de la résistance de Chhomrong Dhan.

V.1.1. Comment se passe l'érosion de la résistance partielle d'une variété déployée massivement dans le temps et dans l'espace ?

La variété Chhomrong Dhan (ChD) a été déployée en milieu paysan sur les Hautes Terres depuis 2006. Depuis, cette variété domine largement le paysage agricole dans les zones d'altitudes. D'après l'enquête conduite par Raboin *et al.* (2014) durant la campagne 2011-2012, ChD occupait 82% de la surface destinée au riz pluvial. Aucun changement sur cette dominance n'a été observé durant nos suivis en milieu paysan. En effet sur 120 parcelles dans 6 sites, ChD était cultivée sur 103 parcelles en 2015 et 113 parcelles en 2016.

L'évolution des attaques de pyriculariose sur ChD et d'autres variétés a été suivie dans 6 sites en milieu paysan et sur un site expérimental. Durant les suivis, quelques cas d'attaque sévère de pyriculariose ont été recensés sur des parcelles de variétés locales comme à Mananetivohitra (avec une sévérité paniculaire à 60%). La variété sensible Kasalath (chapitre IV, paragraphe IV.3.3) présentait des attaques de pyriculariose dans tous les sites où elle a été mise en place. L'inoculum de *M. oryzae* est donc toujours présent dans la région étudiée et a la capacité de provoquer de dégâts importants sur des variétés sensibles. En dépit de cela, le niveau d'attaque de la pyriculariose sur la variété ChD était nul ou très faible en 2015 et 2016 et nous avons pu observer un effet variété assez marqué sur un même site : en

2016 à Fiantsonana, la sévérité foliaire de la pyriculariose était de 0.05% pour ChD et 5% pour F154 et la sévérité paniculaire était de 4% pour ChD et de 54% pour F154. Le contournement des premières séries de variétés de Fofifa (F133, F134, F152 et F154) adaptées et diffusées en riziculture pluviale de haute altitude a été observée après environ 5 ans de déploiement de ces variétés (Raboin *et al.*, 2013). Cependant, **aucune érosion de la résistance quantitative de la variété ChD n'a été signalée** d'après les enquêtes faites au niveau des paysans. Le faible niveau d'attaque observé sur cette variété par nos suivis pendant trois campagnes (2015, 2016 et 2017) illustre l'efficacité de la résistance de ChD vis-à-vis des populations de *M. oryzae* sur les Hautes Terres et amène à dire que sa résistance est durable. Cette observation vient corroborer l'hypothèse rapportée par Parlevliet (2002) et Kou et Wang (2010) que la résistance quantitative serait plus durable.

Les mécanismes de la résistance quantitative de ChD restent encore à explorer. Mais l'efficacité de sa résistance pendant une dizaine d'année suggère que ChD pourrait avoir l'un des deux déterminants de la durabilité des résistances quantitatives proposé par Palloix *et al.* (2009). Soit les facteurs de résistance de ChD sont nombreux avec des effets complémentaires exigeant ainsi de nombreuses mutations de virulence dans le génome des agents pathogènes pour qu'ils puissent s'adapter. Par conséquent, la probabilité d'apparition de souche de l'agent pathogène virulente est plus faible. Soit la résistance de ChD exerce une pression de sélection faible sur les populations de *M. oryzae* et cela ne permet pas l'émergence de populations de l'agent pathogène plus virulentes.

Pour certaines variétés de riz de type *japonica*, Liao *et al.* (2016) ont identifié une résistance basale avec une réponse faible et non spécifique vis-à-vis des populations de *M. oryzae*. Vu le faible niveau d'attaque sur la variété ChD (type *japonica*), il est possible que cette résistance basale soit responsable de la résistance quantitative et non spécifique de ChD, expliquant le maintien de l'efficacité de sa résistance depuis 2006. Afin de confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire de caractériser de façon détaillée les bases génétiques de la résistance de cette variété et de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

V.1.2. Est-ce que des populations de *Magnaporthe oryzae* existantes sur les Hautes Terres sont déjà adaptées à la résistance quantitative de la variété Chhomrong Dhan ?

L'adaptation d'agents pathogènes à des résistances peut conduire à :

- une différence de structure entre populations échantillonnées sur la variété résistante et sur des variétés sensibles (différenciation liée à la sélection),

- une réduction de la diversité génétique des populations échantillonnées sur la variété résistante (goulot d'étranglement consécutif à la sélection),
- un niveau plus élevé d'agressivité sur la variété résistante des populations de l'agent pathogène échantillonnées sur cette même variété (sélection des individus les plus agressifs).

L'analyse de la structure génotypique des populations de *M. oryzae* pendant deux campagnes (2015 et 2016) révèle que la majorité des groupes clonaux GC observés sur ChD sont recensés sur d'autres variétés. De plus, la distribution des GC des populations échantillonnées sur ChD diffèrent entre les 3 sites (Fiantsonana, Mananetivohitra et Andranomanelatra) et entre les deux campagnes (2015 et 2016). Ces observations suggèrent qu'il n'y a pas de GC spécifiques de la variété ChD qui se maintient. De plus, les tests phénotypiques montrent que le niveau d'agressivité est comparable entre les populations sur ChD et sur d'autres variétés. Toutes ces observations indiquent que **la variété ChD ne semble donc pas sélectionner de groupe clonal spécifique et qu'aucune adaptation particulière des populations de *M. oryzae* actuelles échantillonnées sur ChD n'est détectée.**

La comparaison du pouvoir pathogène des populations de *M. oryzae* échantillonnées sur la variété ChD et sur les autres variétés pluviales de façon globale, ou par paire dans chaque site montre que leur niveau d'agressivité est la même pour la plupart des composantes mesurées et sur toutes les variétés inoculées (ChD, F152, F161 et Kasalath). La similarité du niveau d'agressivité des populations de ChD et celles des autres variétés surtout sur la variété ChD amène à dire que **la contamination de ChD par un inoculum venant d'autres variétés et provoquant quelques symptômes opportunistes en fin de cycle sur racème ou grains est probable.**

Cependant, il faut mentionner que les différences de distribution des GC entre les populations sur ChD et sur d'autres variétés de riz pluvial et entre les populations avant déploiement de ChD (2006) et durant les deux campagnes récentes (2015 et 2016), pourraient être des signes d'un début d'adaptation. Pour rejeter cette hypothèse et valider l'hypothèse qui nous paraît la plus vraisemblable d'autres tests méritent d'être conduits. Des mesures sur d'autres traits de vie de l'agent pathogène (la capacité de la survie hivernale par exemple) et/ou la mesure de fitness dans des conditions de compétition entre les souches de *M. oryzae* (Zhan and McDonald, 2013) pourraient être réalisées.

A une échelle régionale, le déploiement massif d'une résistance quantitative a réduit la pression de la pyriculariose sur les Hautes Terres. Ainsi, les variétés sensibles comme F154

étaient peu attaquées en 2016 dans 5 des 6 sites suivis. Il est généralement considéré que l'utilisation de la diversité génétique soit par la conduite d'associations de cultures (revu dans Boudreau, 2013), soit par la pratique des mélanges variétaux ou multi-lignées (Finckh *et al.*, 2000 ; Koizumi *et al.*, 2004), permet une réduction de la pression des maladies des plantes. Dans notre cas, au contraire, c'est l'utilisation de la résistance quantitative de façon homogène qui a influencé le niveau de pression dans une région. L'exploitation de ce type de résistance pourrait donc être une autre voie durable pour limiter la pression des agents pathogènes et pourrait être exploitée dans des stratégies d'amélioration variétale.

V.1.3. Intensification en engrais azoté et efficacité de la résistance de Chhomrong Dhan

En général, à Madagascar, l'utilisation de l'azote minéral pour la fertilisation des cultures reste faible (Randrianarisoa et Minten, 2003). Durant notre étude, 4% des parcelles suivies avec du riz pluvial ont reçu des engrais minéraux pour la campagne 2015. Cependant, vue l'importance croissante du riz pluvial dans cette région et la diffusion de guides de bonnes pratiques culturales par les institutions de recherche et de vulgarisation, l'utilisation progressive des intrants par les agriculteurs sur le riz pluvial est à envisager. En effet, le riz pluvial a permis ces dernières années un complément alimentaire non négligeable pour les ménages qui ont été confrontés à des incidents climatiques ayant mis en péril la production dans les rizières. La résistance à la pyriculariose de certaines variétés de riz est influencée par la quantité d'azote apportée et par le fractionnement de ces apports (Ballini *et al.*, 2013). Généralement, l'apport excessif en intrant azoté favorise l'attaque de pyriculariose sur des variétés sensibles (Long *et al.*, 2000). La situation actuelle ne permet pas de voir clairement l'effet d'intrants azotés sur l'attaque de la maladie sur la variété ChD. Par ailleurs, malgré l'apport de la dose de fertilisation recommandée sur des parcelles témoins de la variété ChD pour la campagne 2016 dans les 6 sites en milieu paysan et dans le site expérimental, le niveau d'attaque de la pyriculariose sur ChD est resté faible. Ceci suggère que l'intensification en azote n'a pas beaucoup d'effet sur la résistance de ChD. Mais pour vérifier cela, des tests avec et sans azote méritent d'être conduits. La productivité obtenue sur la variété ChD même sur des sols peu fertiles illustre son efficacité de l'utilisation de l'azote. Le phénomène de sensibilité induite par l'azote ou NIS (« Nitrogen-Induced Susceptibility») est variable selon les variétés. Il sera donc important pour l'avenir de vérifier si la résistance de ChD n'est pas sujette à la NIS.

V.2. Caractérisation des sources potentielles d'inoculum en riziculture pluviale

Les essais pluriannuels conduits dans cette étude ont permis de caractériser et de hiérarchiser les sources potentielles de pyriculariose pour la riziculture pluviale. Nos résultats montrent que le niveau d'attaque de la maladie reste similaire lorsque les semences sont semées quel que soit leur état sanitaire (semences saines, infectées ou traitées par d'hypochlorite de sodium ou par un fongicide). Ces résultats confortent les observations de Filippi et Prabhu (1997) sur la riziculture pluviale au Brésil selon lesquelles les symptômes de pyriculariose sont très rares sur les plants de riz quand la pyriculariose vient des semences. Par contre, différentes études ont suggéré l'implication majeure des semences infectées sur la dispersion à longue distance par l'analyse de génétique des populations de *M. oryzae* (Tharreau *et al.*, 2009 ; Saleh *et al.*, 2014). Ceci amène à toujours prendre des précautions quant à l'état sanitaire des semences utilisées car elles pourraient initier la maladie, même avec une probabilité faible et pourraient être un facteur de dissémination à longue distance dans un système comme celui de Madagascar où les paysans échangent, vendent ou réutilisent leurs semences sans contrôle sanitaire.

Sur une parcelle contaminée par la pyriculariose, les grains vides infectés peuvent tomber sur le sol au moment de la récolte. Nous avons observé que ces grains vides infectés laissés sur le sol favorisent l'initiation des épidémies l'année suivante. L'effet des grains sur le sol pour le développement de la maladie mis en évidence dans le cas de la riziculture pluviale sur les Hautes Terres a déjà été observé en irrigué par Long *et al.* (2001) et Guerber et TeBeest (2006) dans les rizières aux Etats-Unis.

Les pailles de riz sont utilisées pour la couverture des parcelles dans les systèmes de culture en semis direct sous couverture végétal (SCV). La survie de *M. oryzae* sur les résidus de riz et le rôle de ces résidus dans l'initiation de la pyriculariose sur le terrain étaient très peu documentés pour *M. oryzae*. Notre étude confirme que l'agent responsable de la pyriculariose peut survivre sur des résidus de riz jusqu'à deux saisons culturales. Les résidus infectés restant à la surface du sol participent à l'initiation des épidémies de pyriculariose sur le terrain dans les conditions de la riziculture pluviale des Hautes Terres du Vakinankaratra. Ces informations sont des éléments complémentaires pour la gestion des résidus et devront être prises en compte pour garder l'effet bénéfique de systèmes SCV sur l'atténuation des attaques de pyriculariose (Sester *et al.*, 2014 ; Dusserre *et al.*, 2017). Nous avons montré que lorsque les pailles de riz sont enfouies dans le sol, en revanche, *M. oryzae* perd rapidement sa

capacité de sporulation. Ceci démontre qu'il est possible de réduire la survie de l'agent pathogène par l'enfouissement des organes infectés, avec un labour pratiqué juste après la récolte par exemple.

Il faut mentionner que les résidus du riz peuvent être enlevés de la parcelle après la récolte, notamment pour l'alimentation du bétail durant la saison sèche. Par contre, les bases de tiges restent au sol de la parcelle en général jusqu'au labour qui a lieu quelques jours avant le semis. Nos essais ont montré que ces bases de tiges infectées par la pyriculariose pourraient jouer un rôle dans la transmission de *M. oryzae* d'une saison à une autre et dans l'initiation des épidémies. En cas d'attaque de pyriculariose sur la parcelle, ces bases de tiges devront être gérées: un enfouissement précoce avant la saison de culture suivante permettra de s'assurer qu'elles ne sont plus une source d'inoculum la saison suivante.

La comparaison des populations de *M. oryzae* échantillonnées sur différentes positions à travers la toposéquence entre le riz de bas fond et le riz pluvial, montre qu'il y a une différence significative de structure génotypique entre ces populations. Ce résultat confirme la différenciation entre des populations de riz pluvial et de riz irrigué observée par Andriantsimalona et Tharreau (2008) et montre qu'il y a peu d'échanges de souches entre le riz de bas fond et le riz pluvial. Cependant, nous avons vu certains groupes clonaux qui sont présents sur différentes positions mais que leur fréquence de distribution varie entre ces positions. Ces observations devront être complétées par des tests phénotypiques pour vérifier que les populations présentes en rizière n'infectent pas ou mal les variétés cultivées en pluvial.

Parmi les sources potentielles d'inoculum testées, nous avons montré que **les semences, les résidus de riz et les bases de tige jouent un rôle important dans le développement de la pyriculariose au champ**. Des modes de gestion adéquats devront être proposés aux paysans pour réduire les risques de dispersion de cette maladie, principalement si des souches adaptées à ChD devaient apparaître. L'enlèvement des organes de riz infectés est recommandé, en particulier les pailles. Pour les grains vides et les bases de tiges, vue l'incapacité de l'agent pathogène de la pyriculariose à survivre dans le sol, l'enfouissement des résidus restant sur la parcelle par un travail du sol juste après la récolte est recommandé sur des parcelles attaquées par la pyriculariose. Ce travail du sol précoce permettra de réduire la survie de *M. oryzae* sur ces organes de riz.

Le fumier est le principal moyen de fertilisation de la culture du riz à Madagascar. Il est constitué des déjections de bétail et des pailles de riz utilisées comme litière dans l'étable. Ces pailles de riz pourraient constituer de réservoir pour l'agent pathogène de pyriculariose.

Par ailleurs, l'agent pathogène de la pyriculariose est capable d'attaquer plusieurs plantes de la famille des *Poaceae*. Les études génétiques conduites montrent que les souches de *M. oryzae* échantillonnées sur le riz appartiennent à un clade particulier (Yoshida *et al.*, 2016 ; Gladieux *et al.*, 2018 a) et sont donc probablement spécifiques. Mais, la pathogénicité croisée des souches échantillonnées sur le riz et sur d'autres espèces de plantes reste encore en débat pour ce pathogène et certaines espèces de plantes (par exemple l'orge) sont connues pour être sensibles à différents clades de *M. oryzae*.

V.3. Recommandation pour les agriculteurs pratiquant la riziculture pluviale

L'efficacité de la résistance quantitative de ChD a été observée durant le suivi de l'évolution d'épidémie de pyriculariose. Par ailleurs les tests phénotypiques et l'analyse moléculaire ne montrent pas des populations spécifiques et adaptées à cette variété dominante. Cette variété très appréciée par les paysans grâce à sa productivité peut donc encore être utilisée. Par contre, il faut toujours être prudent sur la réponse de cette variété vis-à-vis des populations de *M. oryzae* présentes dans la région. De ce fait, des anticipations devraient être mise en place pour en garder l'efficacité de la résistance de ChD : disposition de nouvelles variétés plus productives et résistantes et application des mesures préventives pour limiter l'inoculum.

La connaissance des sources d'inoculum primaire de *M. oryzae* complète les informations sur le déclenchement de l'épidémie de pyriculariose dans une zone où le riz est absent pendant plusieurs mois et permettra de formuler les stratégies de gestion des résidus du riz suivant :

- Utiliser toujours des semences saines et certifiées, ou au moins ne pas utiliser des semences issues d'une parcelle infectée par la pyriculariose.
- Enlever les pailles des parcelles attaquées, puis les stocker dans un endroit loin des parcelles de riz avant de leur utilisation comme fourrage. Il ne faut pas utiliser les pailles infectées comme couverture végétale pour le SCV, car elles pourraient contaminer non seulement les riz dans la parcelle, mais aussi les parcelles voisines.
- Il paraît difficile d'enlever les grains vides et les bases de tiges tombant sur le sol à la récolte mais le travail du sol précoce en enfouissant ces organes de riz dans le sol juste après récolte, permettra de réduire la survie de l'agent pathogène de la pyriculariose.

- Toutes ces stratégies peuvent être renforcées par la pratique des rotations culturales, mais aussi la rotation de ChD avec d'autres variétés résistantes peuvent être effectuée.

Enfin, des affiches, des posters et des documents ont été diffusés pour que les agriculteurs informent les techniciens agricoles les plus proches (du CSA, de la direction régionale de l'agriculture et de l'élevage DRAE ou des centres de recherche FOFIFA, *Fiompiana Fambolena Malagasy Norvéziana* : FIFAMANOR, CIRAD etc.) en cas d'observation d'attaques de pyriculariose en particulier sur la variété Chhomrong Dhan nommée généralement « *Tsipolitra* ».

Conclusion générale et perspectives

La pyriculariose reste une des principales contraintes pour la production de riz dans le monde. Dans cette thèse, nous avons eu l'opportunité de travailler sur un cas exceptionnel de déploiement massif d'une variété partiellement résistante à la pyriculariose en riziculture pluviale d'altitude sur les Hautes Terres de Madagascar. L'attaque de la maladie sur la variété dominante reste faible tout au long de nos suivis sur le terrain et depuis plus de 10 ans. Les analyses moléculaires et phénotypiques des populations de *M. oryzae* sur la variété ChD et sur d'autres variétés ne révèlent pas d'adaptation particulière de l'agent pathogène sur la variété dominante. La résistance quantitative peut donc être efficace durant une période de plus d'une dizaine d'années (2006 à 2017) et est intéressante à exploiter dans l'amélioration de stratégie de lutte contre la pyriculariose (gestion spatiale et temporelle de la résistance des variétés) à cause de sa durabilité à l'instar de la résistance qualitative qui est souvent contournée en quelques années (2 à 3 ans).

La caractérisation des sources potentielles d'inoculum de la pyriculariose en conditions pluviales d'altitude a permis de compléter les informations qui manquaient dans la compréhension des facteurs épidémiques qui favorisent l'initiation de l'épidémie sur le terrain. Les semences, les résidus et les bases de tige du riz sont apparus comme des sources potentiellement importantes d'inoculum de pyriculariose, ce qui renforce les recommandations sur la gestion de ces organes de riz dans les parcelles attaquées.

L'exploration des autres sources potentielles d'inoculum de la pyriculariose mérite d'être conduite pour compléter les informations obtenues dans cette thèse. La capacité de survie de *M. oryzae* sur les pailles dans le fumier et son implication dans l'initiation de la pyriculariose seront intéressantes à mesurer. De telles études pourraient être assistées par des méthodes de suivi particulières comme des quantifications par réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel (Qi et Yang, 2002 ; Huang *et al.*, 2016). L'implication d'hôtes alternatifs potentiels comme réservoirs d'inoculum de *M. oryzae* pour le riz mériterait aussi d'être testée dans le contexte des Hautes Terres de Madagascar.

Il est probable que la résistance d'une variété ne durera pas éternellement dans une situation de dominance d'une variété. Il faut mentionner aussi que la plupart des variétés sélectionnées et diffusées actuellement sur la riziculture pluviale de haute altitude à Madagascar sont issues de croisement de la variété ChD avec d'autres variétés. Certaines composantes de la résistance de ChD sont donc présentes dans la plupart des variétés qui seront diffusées à l'avenir. Par conséquent, les suivis des épidémies de pyriculariose sur la variété ChD (qui va être utilisée par les paysans jusqu'à une possible érosion de sa résistance)

et sur les autres variétés nouvellement diffusées (base génétique de résistance étroite avec ChD) devront se poursuivre en milieu paysan, surtout en cas d'intensification en engrais azoté, pour déterminer si l'érosion de cette résistance apparaît dans le futur. Les échanges d'informations entre les paysans et les techniciens agricoles faciliteront ces suivis. La détection précoce des populations de *M. oryzae* qui pourraient s'adapter à cette résistance quantitative de ChD constituera un élément clé pour éviter les risques de dispersion rapide de la maladie.

Enfin, vue la durabilité et l'efficacité de la résistance quantitative de la variété ChD sur une dizaine d'année, ce travail peut ouvrir des nouvelles perspectives d'études de l'utilisation de ce type de résistance pour ralentir l'émergence rapide de populations agressives d'un agent pathogène.

L'extension de la riziculture pluviale dans la région du Vakinankaratra et dans d'autres régions de Madagascar a un fort impact social et économique pour les paysans malgaches. L'augmentation de la production de riz apportée par la pratique de cette riziculture joue un rôle important au niveau de la sécurité alimentaire à Madagascar. Pour maintenir et améliorer cette production, il est nécessaire de trouver des mesures de contrôle durables pour les ravageurs et les maladies. Le cas de la résistance de ChD apparaît comme une stratégie adéquate pour les paysans malgaches pour qui l'utilisation de pesticides pour lutter contre les ennemis de la culture est non envisageable.

Références bibliographiques

- Adreit, H., Santoso, Andriantsimialona, D., Utami, D. W., Notteghem, J. L., Lebrun, M. H., and Tharreau, D. (2007). Microsatellite markers for population studies of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes*, **7** : 667-670.
- Aglawe, B. S., Bangale, U., Satya, R. D. S. J., Balija, V., Pal, B. V, Kumar, S. S., Kumar, S. P., Kumar, S., Maddamshetty, SP., and Maganti, S. M. (2017). Identification of novel QTLs conferring field resistance for rice leaf and neck blast from an unique landrace of India. *Gene Reports*, **7**: 35-42.
- Ahmadi, N., Becquer, T., Larroque, C., and Arnaud, M. (1988). Variabilité génétique du riz (*Oryza sativa* L.) à Madagascar. *L'Agronomie Tropicale*, **43**: 209-221.
- Ahmadi, N., Glaszmann, J.-C., and Rabary, E. (1991). Traditional highland rices originating from intersubspecific recombination in Madagascar. In : IRRI International Rice research Institute. *Rice genetics II*. IRRI, Los Baños, Philippines, 67-79.
- Andriantsimialona, R. D., and Tharreau, D. (2008). Evolution of *Magnaporthe grisea* populations and adaptation to upland rice in the Vakinankaratra region of Madagascar. In : *ENDURE International Conference Diversifying Crop Protection*. La Grande-Motte, France, pp 1-3.
- Andrison, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E. H., Pellé, R., and Ellissèche, D. (2007). Adaptation of *Phytophthora infestans* to Partial resistance in potato : evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology*, **97**: 338-343.
- Azzimonti, G., Lannou, C., Sache, I., and Goyeau, H. (2013). Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars : diversity, variability and specificity. *Plant Pathology*, **62**: 970-981.
- Bai, J., Choi, S., Ponciano, G., Leung, H., and Leach, J. E. (2000). *Xanthomonas oryzae* pv . *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**: 1322-1329.
- Ballini, E. (2007). Etude des interactions riz-*Magnaporthe oryzae*. Diversité, origine et évolution du locus du gène de résistance Pi33. *Thèse de Doctorat*, Montpellier SupAgro. 308 p.
- Ballini, E., Morel, J., Droc, G., Price, A., Courtois, B., Notteghem, J., and Tharreau, D. (2008). A Genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**: 859-868.
- Ballini, E., Nguyen, T. T. T., and Morel, J. (2013). Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice*, **6**: 1-13.
- Bastiaans, L. (1991). Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology*, **81**: 611-615.
- Bent, A. F., and Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors and R Genes : the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, **45**: 399-436.

- Bidzinski, P., Ballini, E., Ducasse, A., Michel, C., Zuluaga, P., Genga, A., Chiozzotto, R., and Morel, J-B. (2016). Transcriptional basis of drought-induced susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1-13.
- Bonman, J. M., Bandong, J. M., Lee, Y. H., Lee, E. J., and Valent, B. (1989). Race-specific partial resistance to blast in temperate *japonica* rice cultivars. *Plant Disease*, **73**: 496-499.
- Boudreau, M. A. (2013). Diseases in intercropping systems. *Annual Review of Phytopathology*, **51**: 499-519.
- Boutrot, F., and Zipfel, C. (2017). Function , discovery , and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **55**: 257-286.
- Bregaglio, S., Titone, P., Hossard, L., Mongiano, G., Savoini, G., Piatti, F. M., Paleari, L., Masseroli, A., and Tamborini, L. (2017). Effects of agro-pedo-meteorological conditions on dynamics of temperate rice blast epidemics and associated yield and milling losses. *Field Crops Research*, **212**: 11-22.
- Breumier, P., Ramarosandratana, A., Ramanantsoanirina, A., vom Brocke, K., Marquié, C., Dabat, M., and Raboin, L. (2018). Évaluation participative des impacts de la recherche sur le riz pluvial d'altitude à Madagascar de 1980 à 2015. *Cahiers Agriculture*, **27**: 1-9.
- Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B. D. L., Powers, S., Besnard, A-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., and Andrivon, D. (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, **185**: 285-299.
- Brun, H., Levivier, S., Somda, I., Ruer, D., Renard, M., and Chèvre, A-M. (2000). A field method for evaluating the potential durability of new resistance sources: application to the *Leptosphaeria maculans-Brassica napus* pathosystem. *Phytopathology*, **90**: 961-966.
- Buddenhagen, I. W. (1985). Rice disease evaluation in Madagascar. *International rice commission. Newsletter*, **34**: 74-78.
- Burdon, J. J., Barrett, L. G., Rebetzke, G., and Thrall, P. H. (2014). Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications*, **7**: 609-624.
- Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Giraud, M., Lascostes, M., Stievenard, R., Lemarquand, A., van de Weg, E., Expert, P., Denancé, C., Didelot, F., Le Cam, B., and Durel, C-E. (2014). Erosion of quantitative host resistance in the apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infection, Genetics and Evolution*, **27**: 481-489.
- Caffier, V., and Laurens, F. (2005). Breakdown of Pl2, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. *Plant Pathology*, **54**: 116-124.
- Caffier, V., Le Cam, B., Al Rifaï, M., Bellanger, M-N., Comby, M., Denancé, C., Didelot, F., Expert, P., Kerdraon, T., Lemarquand, A., Ravon, E., and Durel, C-E. (2016). Slow

- erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific Quantitative Trait Locus. *Infection, Genetics and Evolution*, **44**: 541-548.
- Calenge, F., Faure, A., Goerre, M., Gebhardt, C., Van de Weg, W. E., Parisi, L., and Durel, C-E. (2004). Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab Resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, **94**: 370-379.
- Castilla, N. P., Willocquet, L., Suwarno, S., Santoso, S., Nasution, A., Sulaeman, Y., Savary, S., and Cruz, C. M. V. (2010). Assessing the effect of resistant-susceptible associations and determining thresholds for associations in suppressing leaf and neck blast of rice. *Crop Protection*, **29**: 390-400.
- Cesari, S. (2012). Etude de l'activité et de la reconnaissance d'AVR1-CO39, un effecteur du champignon pathogène *Magnaporthe oryzae*, agent causal de la pyriculariose. *Thèse de Doctorat*, Université Montpellier II. 158 p.
- Chadha, S., and Gopalakrishna, T. (2006). Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, **100**: 1147-1153.
- Chen, C., Chen, M., Hu, J., Zhang, W., Zhong, Z., Jia, Y., Allaux, L., Fournier, E., Tharreau, D., Wang G-L., Wang, Z., Shen, W-C., Lu, G., Wang, B and Mitchell, T. K. (2014). Sequence variation and recognition specificity of the avirulence gene AvrPiz-t in *Magnaporthe oryzae* field populations. *Fungal Genomics Biology*, **4**: 1-8.
- Chiapello, H., Mallet, L., Guérin, C., Aguilera, G., Amselem, J., Kroj, T., Ortega-Abboud, E., Lebrun, M-H., Henrissat, B., Gendrault, A., Rodolophe, F., Tharreau, D., and Fournier, E. (2015). Deciphering genome content and evolutionary relationships of isolates from the fungus *Magnaporthe oryzae* attacking different host plants. *Genome Biology and Evolution*, **7**: 2896-2912.
- Correa-Victoria, F. J., and Zeigler, R. S. (1995). Stability of partial and complete resistance in rice to *Pyricularia grisea* under rainfed upland conditions in Eastern Colombia. *Phytopathology*, **85**: 977-982.
- Correll, J. C., Harp, T. L., Guerber, J. C., Zeigler, R. S., Liu, B., Cartwright, R. D., and Lee, F. N. (2000). Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology*, **90**: 1396-1404.
- Couch, B. C., and Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*, **94**: 683-693.
- Crowther, A., Lucas, L., Helm, R., Horton, M., Shipton, C., Wright, H. T., Walshaw, S., Pawlowicz, M., Radimilahy, C., Douka, K., Picornell-Gelabert, L., Fuller, D. Q., and Boivin, N. L. (2016). Ancient crops provide first archaeological signature of the westward Austronesian expansion. *PNAS*, **113**: 6635-6640.

- Dabat, M-H., Razafimandimby, S., et Bouteau, B. (2004). Atouts et perspectives de la riziculture périurbaine à Antananarivo (Madagascar). *Cahiers Agriculture*, **13**: 99-109.
- Datnoff, L. E., Elmer, W. H., and Huber, D. M. (2007). Mineral nutrition and plant disease. *American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 278 p.
- De Vallavieille-pope, C., Ali, S., Leconte, M., Enjalbert, J., Delos, M., and Rouzet, J. (2012). Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in France between 1984 and 2009. *Plant Disease*, **96**: 131-140.
- Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J-R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L-J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E., and Birren, B. W. (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, **434**: 980-986.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **13**: 414-430.
- Delmas, C. E. L., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I. D., Cervera, S. R., Delière, L., and Delmotte, F. (2016). Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance : selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evolutionary Applications*, **9**: 709-725.
- Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., Rouxel, M., and Delière, L. (2014). Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete : evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, **27**: 500-508.
- Djidjou-Demasse, R., Moury, B., and Fabre, F. (2017). Mosaics often outperform pyramids : insights from a model comparing strategies for the deployment of plant resistance genes against viruses in agricultural landscapes. *New Phytologist*, **216**: 239-253.
- Dodds, P., and Thrall, P. (2011). Recognition events and host-pathogen co-evolution in gene-for-gene resistance to flax rust. *Functional Plant Biology*, **36**: 395-408.
- Dusserre, J., Raveloson, H., Michellon, R., Gozé, E., Auzoux, S., and Sester, M. (2017). Conservation agriculture cropping systems reduce blast disease in upland rice by affecting plant nitrogen nutrition. *Field Crops Research*, **204**: 208-221.
- Dzido, J. L., Rakotoarisoa, J., Chabanne, A., and Ahmadi, N. (2004). Upland rice for the highlands: new varieties and sustainable cropping systems to face food security. Promising prospects for the global challenges of rice production the world will face in the coming years. In: *Food Agriculture Organization Rice Conference*. Rome, Italy. 12-13.

- Ellis, J. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., and Dodds, P. N. (2014). The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in Plant Science*, **5**: 1-13.
- Faivre-Rampant, O., Geniès, L., Piffanelli, P., and Tharreau, D. (2013). Transmission of rice blast from seeds to adult plants in a non-systemic way. *Plant Pathology*, **62**: 879-887.
- FAO. (2016a). Mission Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture /Programme alimentaire mondial d'évaluation des récoltes et de la sécurité alimentaire à Madagascar. *Rapport spécial*. Rome. 94 p.
- FAO. (2016b). Round up. *Rice Market Monitor*, **19**: 1-44.
- Filippi, M. C., and Prabhu, A. S. (1997). Integrated effect of host plant resistance and fungicidal seed treatment on rice blast control in Brazil. *Plant Disease*, **81**: 351-355.
- Finckh, M. R., Gacek, E. S., Goyeau, H., Lannou, C., Merz, U., Mundt, C. C., Munk, L., Nadziak, J., Newton, A. C., de Vallavieille-Pope, C., and Wolfe, M. S. (2000). Cereal variety and species mixtures in practice, with emphasis on disease resistance. *Agronomie*, **20**: 813-837.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**: 275-296.
- French, E., Kim, B., and Iyer-pascuzzi, A. S. (2016). Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **56**: 201-208.
- Fudal, I., Böhnert, H. U., Tharreau, D., and Lebrun, M. (2005). Transposition of MINE, a composite retrotransposon, in the avirulence gene ACE1 of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology*, **42**: 761-772.
- Fudal, I., Collemare, J., Böhnert, H. U., Melayah, D., and Lebrun, M. (2007). Expression of *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 is connected to the initiation of appressorium-mediated penetration. *Eukaryotic Cell*, **6**: 546-554.
- Fukuoka, S., Saka, N., Koga, H., Ono, K., Shimizu, T., Ebana, K., Hayashi, N., Takahashi, A., Hirochika, H., Okuno, K., and Yano, M. (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science*, **325**: 998-1002.
- Fukuoka, S., Saka, N., Mizukami, Y., Koga, H., Yamanouchi, U., Yoshioka, Y., Hayashi, N., Ebana, K., Mizobuchi, R., and Yano, M. (2015). Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice. *Scientific Reports*, **5**: 1-7.
- Fukuta, Y., Cruz, C. M. V., and Kobayashi, N. (2009). Development and characterization of blast resistance using differential varieties in rice. Japan International Research Center for Agricultural Sciences. Tsukuba, Japan. *Report No.* **63**: 127p.
- Gallet, R., Bonnot, F., Milazzo, J., Tertois, C., Adreit, H., Ravigné, V., Tharreau, D., and Fournier, E. (2014). The variety mixture strategy assessed in a G × G experiment with rice and the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Genetics*, **4**: 1-11.

- Gallet, R., Fontaine, C., Tertois, C., Adreit, H., Ravign, V., Fournier, E., and Tharreau, D. (2016). Evolution of compatibility range in the rice-*Magnaporthe oryzae* system: an uneven distribution of R genes between rice subspecies. *Phytopathology*, **106**: 348-354.
- Ge, S., Sang, T., Lu, B., and Hong, D. (1999). Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *PNAS*, **96**: 14400-14405.
- Gent, D. H., Massie, S. T., Twomey, M. C., and Wolfenbarger, S. N. (2017). Adaptation to partial resistance to powdery mildew in the hop cultivar Cascade by *Podosphaera macularis*. *Plant Disease*, **101**: 874-881.
- Gill, U. S., Lee, S., and Mysore, K. S. (2015). Host versus nonhost Resistance: distinct wars with similar Arsenals. *Phytopathology*, **105**: 580-587.
- Giraldo, M. C., Dagdas, Y. F., Gupta, Y. K., Mentlak, T. A., Yi, M., Martinez-rocha, A. L., Saitoh, H., Terauchi, R., Talbot, N. J., and Valent, B. (2013). Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature Communications*, **4**: 1-12.
- Gladieux, P., Condon, B., Ravel, S., Soanes, D., Leodato, J., Maciel, N., Nhani Jr, A., Terauchi, R., Lebrun, M-H., Tharreau, D., Mitchell, T., Pedley, F. R., Valent, B., Talbot, N. J., Farmann, M., and Fournier, E. (2018). Gene flow between divergent cereal- and grass-specific lineages of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *mBio*, **9**: 1-19.
- Gladieux, P., Ravel, S., Rieux, A., Cros-Arteil, S., Adreit, H., Milazzo, J., Thierry, M., Fournier, E., Terauchi, R., and Tharreau, D. 2018. Coexistence of multiple endemic and pandemic lineages of the rice blast pathogen. *mBio* **9**: 1-18.
- Greer, C. A., and Webster, R. K. (2001). Occurrence, distribution, epidemiology, cultivar rection and management of rice blast disease in California. *Plant Disease*, **85**: 1096-1102.
- Guerber, C., and TeBeest, D. O. (2006). Infection of rice seed grown in Arkansas by *Pyricularia grisea* and transmission to seedlings in the field. *Plant Disease*, **90**: 170-176.
- Hayashi, N., Inoue, H., Kato, T., Funao, T., Shirota, M., Shimizu, T., Kanamori, H., Yamane, H., Hayano-Saito, Y., Matsumoto, T., Yano, M., and Takatsuji, H. (2010). Durable panicle blast-resistance gene *Pbl* encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. *The Plant Journal*, **64**: 498-510.
- Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 315-319.
- Huang, C. M., Liao, D. J., Wu, H. S., Shen, W. C., and Chung, C. L. (2016). Cyclone-based spore trapping, quantitative real-time polymerase chain reaction and high resolution melting analysis for monitoring airborne inoculum of *Magnaporthe oryzae*. *Annals of Applied Biology*, **169**: 75-90.

- Huang, Y.-J., Balesdent, M., Li, Z., Evans, N., Rouxel, T., and Fitt, B. D. L. (2010). Fitness cost of virulence differs between the *AvrLm1* and *AvrLm4* loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology*, **126**: 279-291.
- Huang, Y.-J., Li, Z.-Q., Evans, N., Rouxel, T., Fitt, B. D. L., and Balesdent, M.-H. (2006). Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology*, **114**: 77-89.
- Hurles, M. E., Sykes, B. C., Jobling, M. A., and Forster, P. (2005). The dual origin of the Malagasy in island southeast Asia and East Africa : evidence from maternal and paternal Lineages. *American Journal of Human Genetics*, **76**: 894-901.
- Ishihara, T., Hayano-saito, Y., Oide, S., Ebana, K., La, N. T., Hayashi, K., Ashizawa, T., Suzuki, F., and Koizumi, S. (2014). Quantitative trait locus analysis of resistance to panicle blast in the rice cultivar Miyazakimochi. *Rice*, **7**: 1-11.
- Jenkinson, C. B., Jones, K., Zhu, J., Dorhmi, S., and Khang, C. H. (2017). The appressorium of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* remains mitotically active during post-penetration hyphal growth. *Fungal Genetics and Biology*, **98**: 35-38.
- Jenner, C. E., Wang, X., Ponz, F., and Walsh, J. A. (2002). A fitness cost for Turnip mosaic virus to overcome host resistance. *Virus Research*, **86**: 1-6.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *European Molecular Biology Organization*, **19**: 4004-4014.
- Johnson, R. (1984). A Critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **22**: 309-330.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**: 323-329.
- Jones, K., Kim, D. W., Park, J. S., and Khang, C. H. (2016). Live-cell fluorescence imaging to investigate the dynamics of plant cell death during infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology*, **16**: 1-8.
- Kang, H., Wang, Y., Peng, S., Zhang, Y., Xiao, Y., Wang, D., Qu, S., Li, Z., Yan, S., Wang, Z., Liu, W., Ning, Y., Korniliev, P., Leung, H., Mezey, J., McCouch, S. R., and Wang, G.-L. (2016). Dissection of the genetic architecture of rice resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, **17**: 959-972.
- Kang, S., Lebrun, M. H., Farrall, L., and Valent, B. (2001). Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**: 671-674.
- Kankanala, P., Czymmek, K., and Valent, B. (2007). Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *The Plant Cell*, **19**: 706-724.
- Kato, H. (2001). Rice blast disease. *Pesticide Outlook*, **12**: 23-25.

- Kaundal, R., Kapoor, A. S., and Raghava, G. P. S. (2006). Machine learning techniques in disease forecasting : a case study on rice blast prediction. *BMC Bioinformatics*, **7**: 1-16.
- Kawecki, T. J., and Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, **7**: 1225-1241.
- Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M., and Tharreau, D. (2003). The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genetics and Biology*, **40**: 207-214.
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S-Y., Czymmek, K., Kang, S., and Valent, B. (2010). Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *The Plant Cell*, **22**, 1388-1403.
- Khush, G. S. (1997). Origin , dispersal , cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*, **35**: 25-34.
- Khush, G. S. (2005). What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*, **59**: 1-6.
- Kim, C-H., MacKenzie, D. R., and Rush, M. C. (1988). Field testing a computerized forecasting system for rice blast disease. *Phytopathology*, **78**: 931-934.
- Kiyosawa, S. (1982). Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **20**: 93-117.
- Koizumi, S., Ashizawa, T., and Zenbayashi, K. S. (2004). Durable control of rice blast with multilines. In S. Kawasaki (Ed.), *Rice blast: Interaction with Rice and Control*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp 191-199.
- Kou, Y., and Wang, S. (2010). Broad-spectrum and durability : understanding of quantitative disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**: 181-185.
- Kumar, J., Nelson, R. J., and Zeigler, R. S. (1999). Population structure and dynamics of *Magnaporthe oryzae* in the Indian Himalayas. *Genetics*, **152**: 971-984.
- Kürschner, E., Bonman, J., Garrity, D. P., Tamisin, M. M., Pabale, D., and Estrada, B. A. (1992). Effects of nitrogen timing and split application on blast disease in upland rice. *Plant Disease*, **76**: 384-389.
- Kushalappa, A. C., Yogendra, K. N., and Karre, S. (2016). Plant innate immune response : qualitative and quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **35**: 38-55.
- Lai, X. H., Marchetti, M. a., and Petersen, H. D. (1999). Comparative slow-blasting in rice grown under upland and flooded blast nursery culture. *Plant Disease*, **83**: 681-684.
- Laloi, G. (2016). Etude du pyramidage de résistances quantitatives du pommier à la tavelure. *Thèse de Doctorat*. Université Bretagne Loire. 265p.
- Lannou, C. (2012). Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **50**: 319-338.
- Lannou, C., Hubert, P., and Gimeno, C. (2005). Competition and interactions among stripe rust pathotypes in wheat-cultivar mixtures. *Plant Pathology*, **54**: 699-712.

- Lara-Alvarez, I., Tharreau, D., Aguilar-Portero, M., and Castejón-Muñoz, M. (2010). Evidence for rapid changes in the population genetic structure of *Magnaporthe oryzae* in Southern Spain. *Journal of Phytopathology*, **158**: 785-791.
- Lê Van, A., Caffier, V., Lasserre-zuber, P., Chauveau, A., Brunel, D., Le Cam, B., and Durel, C-E. (2013). Differential selection pressures exerted by host resistance quantitative trait loci on a pathogen population: a case study in an apple x *Venturia inaequalis* pathosystem. *New Phytologist*, **197**: 899-908.
- Leach, J. E., Cruz, C. M. V., Bai, J., and Leung, H. (2001). Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*, **39**: 187-224.
- Lehman, J. S., and Shaner, G. (1997). Selection of populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology*, **87**: 170-176.
- Li, J., Lu, L., Jia, Y., and Li, C. (2014). Effectiveness and durability of the rice *Pi-ta* gene in Yunnan province of China. *Phytopathology*, **104**: 762-768.
- Liao, J., Huang, H., Meusnier, I., Adreit, H., Ducasse, A., Bonnot, F., Pan, L., He, X., Kroj, T., Fournier, E., Tharreau, D., Gladieux, P., and Morel, J-B. (2016). Pathogen effectors and plant immunity determine specialization of the blast fungus to rice subspecies. *eLiFE*, **5**: 1-18.
- Liu, J., Wang, X., Mitchell, T., Hu, Y., Liu, X., Dai, L., and Wang, G. (2010). Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice – *Magnaporthe oryzae* interaction. *Molecular Plant Pathology*, **11**: 419-427.
- Liu, W., Liu, J., Triplett, L., Leach, J. E., and Wang, G. (2014). Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **52**: 213-241.
- Lof, M. E., and van der Werf, W. (2017). Modelling the effect of gene deployment strategies on durability of plant resistance under selection. *Crop Protection*, **97**: 10-17.
- Long, D. H., Correll, J. C., Lee, F. N., and TeBeest, D. O. (2001). Rice blast epidemics initiated by infested rice grain on the soil surface. *Plant Disease*, **85**: 612-616.
- Long, D. H., Lee, F. N., and TeBeest, D. O. (2000). Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. *Plant Disease*, **84**: 403-409.
- Luo, Y., Teng, P. S., Fabellar, N. G., and TeBeest, D. O. (1997). A Rice-leaf blast combined model for simulation of epidemics and yield Loss. *Agricultural Systems*, **53**: 27-39.
- Ma, J., Lei, C., Xu, X., Hao, K., Wang, J., Cheng, Z., Ma, X., Ma, J., Zhou, K., Zhang, X., Guo, X., Wu, F., Lin, Q., Wang C., Zhai, H., Wang, H and Wan, J. (2015). *Pi64* , encoding a novel CC-NBS-LRR protein , confers resistance to leaf and neck blast in rice, **28**: 558-568.
- Mackill, D. J., and Bomann, J. M. (1991). Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology*, **82**: 746-749.

- Manandhar, H. K., Jorgensen, H. J. L., Smedegaard-Petersen, V., and Mathur, S. B. (1998). Seedborne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings. *Plant Disease*, **82**: 1093-1099.
- Marcel, T. C., Gorguet, B., Ta, M. T., Kohutova, Z., Vels, A., and Niks, R. E. (2008). Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *New Phytologist*, **177**: 743-755.
- Martin-urdiroz, M., Osés-ruiz, M., Ryder, L. S., and Talbot, N. J. (2016). Investigating the biology of plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, **90**: 61-68.
- Mather, K. A., Molina, J., Flowers, J. M., Rubinstein, S., Rauh, B. L., Lawton-Rauh, A., Caicedo, A. L., McNally, K. L., and Purugganan, M. D. (2010). Migration, isolation and hybridization in island crop populations: the case of Madagascar rice. *Molecular Ecology*, **19**: 4892-4905.
- McDonald, B., and Linde, C. (2002a). Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 349-379.
- McDonald, B. A., and Linde, C. (2002b). The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, **124**: 163-180.
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J., and Talbot, N. J. (2012). Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell*, **24**: 322-335.
- Miah, G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Puteh, A. B., Rahim, H. A., Asfaliza, R., and Latif, M. A. (2013). Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches. *Molecular Biology Reports*, **40**: 2369-2388.
- Montarry, J., Cartier, E., Jacquemond, M., Palloix, A., and Moury, B. (2012). Virus adaptation to quantitative plant resistance: erosion or breakdown? *Journal of Evolutionary Biology*, **25**: 2242-2252.
- Mosquera, G., Giraldo, M. C., Khang, C. H., Coughlan, S., and Valent, B. (2009). Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell*, **21**: 1273-1290.
- Mundt, C. C. (2002). Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 381-410.
- Mundt, C. C. (2014). Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution*, **27**: 446-455.
- Nalley, L., Tsiboe, F., Durand-morat, A., Shew, A., and Thoma, G. (2016). Economic and environmental impact of rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*) alleviation in the United States. *PLoS ONE*, **11**: 1-15.

- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583-590.
- Nottéghem, J.-L. (1977). Mesure au champ de la résistance horizontale du riz à *Pyricularia oryzae*. *L'Agronomie Tropicale*, **32**: 400-412.
- Nottéghem, J.-L. (1983). Définition d'une stratégie d'utilisation de la résistance par l'analyse génétique des relations hôte-parasite. Cas du couple riz-*Pyricularia oryzae*. *Thèse de Doctorat*. Université de Paris-Sud. 112p.
- Orbach, M. J., Farrall, L., Sweigard, J. A., Chumley, F. G., and Valent, B. (2000). A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *The Plant Cell*, **12**: 2019-2032.
- Ou, S. H. (1985). Blast. In *Rices Diseases*, 2nd edn Kew, UK: Commonwealth Agricultural Institute. pp. 109-201.
- PADR. (2017). L'Observatoire du riz de Madagascar. *Horizon*, **65**: 1-6.
- Pagliaccia, D., Urak, R. Z., Wong, F., Douhan, L. I., Greer, C. A., Vidalakis, G., and Douhan, G. W. (2017). Genetic structure of the rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*) over a decade in North Central California rice fields. *Microbial Ecology*, **75**: 310-317.
- Palloix, A., Ayme, V., and Moury, B. (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist*, **183**: 190-199.
- Papaïx, J., Goyeau, H., Cheyron, P. Du, Monod, H., and Lannou, C. (2011). Influence of cultivated landscape composition on variety resistance: an assessment based on wheat leaf rust epidemics. *New Phytologist*, **191**: 1095-1107.
- Park, S., Milgroom, M. G., Han, S., Kang, S., and Lee, Y. (2003). Diversity of pathotypes and DNA fingerprint haplotypes in populations of *Magnaporthe grisea* in Korea over two decades. *Phytopathology*, **93**: 1378-1385.
- Park, S. Y., Milgroom, M. G., Han, S. S., Kang, S., and Lee, Y. (2008). Genetic differentiation of *Magnaporthe oryzae* populations from scouting plots and commercial rice fields in Korea. *Phytopathology*, **98**: 436-442.
- Parlevliet, J. E. (2002). Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, **124**: 147-156.
- Pennisi, E. (2010). Armed and Dangerous. *Science*, **327**: 804-805.
- Pilet-Nayel, M.-L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.-C., Fournet, S., Durel, C.-E., and Delourme, R. (2017). Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science*, **8**: 1-9.
- Poland, J. A., Balint-Kurti, P. J., Wissler, R. J., Pratt, R. C., and Nelson, R. J. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*, **14**: 21-29.
- Pooja, K., and Katoch, A. (2014). Past, present and future of rice blast management. *Plant Science Today*, **1**: 165-173.

- Poulin, L., Raveloson, H., Sester, M., Raboin, L., Silué, D., Koebnik, R., and Szurek, B. (2014). Confirmation of bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas oryzae* pv . *oryzicola* on rice in Madagascar. *Plant Disease*, **98**: 1423.
- Puri, K. D., Shrestha, S. M., Joshi, K. D., and Khatri, G. B. (2007). Survival of *Magnaporthe grisea* on rice seeds from artificially inoculated panicles of selected rice lines. *Tropical Agricultural Research*, **19**: 91-100.
- Qi, M., and Yang, Y. (2002). Quantification of *Magnaporthe grisea* during infection of rice plants using real-time polymerase chain reaction and northern blot/phosphoimaging analyses. *Phytopathology*, **92**: 870-876.
- Rabary, E., Noyer, J-L., Benyayer, P., Arnaud, M., and Glaszmann, J-C. (1989). Variabilité génétique du riz (*Oryza sativa* L.) à Madagascar; origine de types nouveaux. *L'Agronomie Tropicale*, **44**: 305-312.
- Raboin, L., Ballini, E., Tharreau, D., Ramanantsoanirina, A., Frouin, J., Courtois, B., and Ahmadi, N. (2016). Association mapping of resistance to rice blast in upland field conditions. *Rice*, **9**: 1-12.
- Raboin, L., Ramanantsoanirina, A., Dusserre, J., Razasolofonahary, F., Tharreau, D., Lannou, C., and Sester, M. (2012). Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem. *Plant Pathology*, **61**: 1103-1111.
- Raboin, L., Ramanantsoanirina, A., Dzido, J., Frouin, J., Radanielina, T., Tharreau, D., Dusserre, J., and Ahmadi, N. (2013). Création variétale pour la riziculture pluviale d'altitude à Madagascar : bilan de 25 années de sélection. *Cahiers Agriculture*, **22**: 450-458.
- Raboin, L., Randriambololona, T., Radanielina, T., Ramanantsoanirina, A., Ahmadi, N., and Dusserre, J. (2014). Upland rice varieties for smallholder farming in the cold conditions in Madagascar's tropical highlands. *Field Crops Research*, **169**: 11-20.
- Radanielina, T. (2010). Diversité génétique du riz (*Oryza sativa* L.) dans la région de Vakinankaratra, Madagascar structuration, distribution éco-géographique et gestion in situ. *Thèse de Doctort*. Agro Paris Tech. 190p.
- Radanielina, T., Ramanantsoanirina, A., Raboin, L., Frouin, J., Perrier, X., Brabant, P., and Ahmadi, N. (2013). The original features of rice (*Oryza sativa* L.) genetic diversity and the importance of within-variety diversity in the highlands of Madagascar build a strong case for in situ conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **60**: 311-323.
- Rakotoarisoa, J. (2004). Les systèmes de cultures rizicoles à Madagascar et les stratégies de la recherche pour l'intensification rizicole. *Revue de La Recherche Agricole à Madagascar*, **22**: 5-8.
- Rakotoarisoa, J., Oliver, R., Dusserre, J., Muller, B., Douzet, J-M., Michelon, R., Moussa, N., Razafinjara, L. A., Rajeriarison, C., et Scopel, E. (2010). Bilan de l'azote minéral au cours du cycle du riz pluvial sous systèmes de culture en semis direct sous couverture

- végétale en sol ferrallitique argileux à Madagascar. *Etude et Gestion Des Sols*, **17**: 169-188.
- Rakotomalala, M., Pinel-galzi, A., Mpunami, A., Randrianasolo, A., Ramavovololona, P., Rabenantoandro, Y., and Fargette, D. (2013). Rice yellow mottle virus in Madagascar and in the Zanzibar Archipelago ; island systems and evolutionary time scale to study virus emergence. *Virus Research*, **171**: 71-79.
- Randrianarisoa, J-C., and Minten, B. (2003). Accessibilité et utilisation des engrais chimiques à Madagascar. In *Agriculture et Pauvreté*. Antananarivo: Programme ILO. 1-6.
- Raveloson, H., Rafenomanjato, A., Ramanantsoanirina, A., Sester, M., et Raboin, L. (2016). Gestion de la diversité variétale du riz pluvial pour contrôler la pyriculariose. In H. Duchaufour, A. T. Razafimbelo, J. Rakotoarisoa, B. Ramamonjisoa, & Rakotondravao (Eds.), *Recherche interdisciplinaire pour le développement durable et la biodiversité des espaces ruraux malgaches. Application à différentes thématiques de territoire*. MYE, Antananarivo: Actes du Projet PARRUR. 137-167.
- Raveloson, H., Ratsimiala Ramonta, I., Tharreau, D., and Sester, M. (2018). Long-term survival of blast pathogen in infected rice residues as major source of primary inoculum in high altitude upland ecology. *Plant Pathology*, **67**: 610-618.
- Razafimbelo, T. (2005). Stockage et protection du carbone dans un sol ferrallitique sous systèmes en semis direct avec couverture végétale des Hautes Terres malgaches. *Thèse de Doctorat*. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 145p.
- Ribot, C., Hirsch, J., Balzergue, S., Tharreau, D., Nottéghem, J. L., Lebrun, M. H., and Morel, J-B. (2008). Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Physiology*, **165**: 114-124.
- Rossmann, A. Y., Howard, R. J., and Valent, B. (1990). *Pyricularia grisea* , the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia*, **82**: 509-512.
- RoyChowdhury, M., Jia, Y., Jia, M. H., Fjellstrom, R., and Cartwright, R. D. (2012). Identification of the rice blast resistance gene *Pib* in the national small grains collection. *Phytopathology*, **102**: 700-706.
- Ryder, L. S., and Talbot, N. J. (2015). Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, **26**: 8-13.
- Saitoh, H., Fujisawa, S., Mitsuoka, C., Ito, A., Hirabuchi, A., Ikeda, K., ... Terauchi, R. (2012). Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. *Plos PATHOGENS*, **8**: 1-16.
- Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Fournier, E., and Tharreau, D. (2014). South-East Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *The New Phytologist*, **201**: 1440-1456.
- Saleh, D., Xu, P., Shen, Y., Li, C., Adreit, H., Milazzo, J., Ravigné, V., Bazin, E., Nottéghem, J-L., Fournier, E., and Tharreau, D. (2012). Sex at the origin: an Asian

- population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology*, **21**: 1330-1344.
- Schiff, C. L., Wilson, I. W., and Somerville, S. C. (2001). Polygenic powdery mildew disease resistance in *Arabidopsis thaliana*: quantitative trait analysis of the accession Warschau-1. *Plant Pathology*, **50**: 690-701.
- Seebold, K. W. J., Datnoff, L. E., Correa-Victoria, F. J., Kucharek, T. A., and Snyder, G. H. (2004). Effects of silicon and fungicides on the control of leaf and neck blast in upland rice. *Plant Disease*, **88**: 253-258.
- Sesma, A., and Osbourn, A. E. (2004). The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature*, **431**: 582-586.
- Sester, M., Raboin, L. M., Ramanantsoanirina, A., and Tharreau, D. (2008). Toward an integrated strategy to limit blast disease in upland rice. In *Endure International Conference*. La Grande-Motte, France. 4p.
- Sester, M., Raveloson, H., and Degenne, P. (2016). Modelling the impacts of varietal diversity and cropping system on the dispersion of rice blast at the landscape level. Building of the model. In *the 7th International Rice Blast Conference*. Manila, Philippines.
- Sester, M., Raveloson, H., Tharreau, D., and Becquer, T. (2019). Difference in blast development in upland rice grown on an Andosol vs a Ferrelsol. *Crop Protection*, **115**: 40-46.
- Sester, M., Raveloson, H., Tharreau, D., and Dusserre, J. (2014). Conservation agriculture cropping system to limit blast disease in upland rainfed rice. *Plant Pathology*, **63**: 373-381.
- Sharma, T. R., Rai, A. K., Gupta, S. K., Vijayan, J., Devanna, B. N., and Ray, S. (2012). Rice blast management through host-plant resistance : retrospect and prospects. *Agricultural Research*, **1**: 37-52.
- Sharpee, W., Oh, Y., Yi, M., Franck, W., Eyre, A., Okagaki, L. H., Valent, B., and Dean, R. A. (2017). Identification and characterization of suppressors of plant cell death (SPD) effectors from *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, **18**: 850-863.
- Shrestha, S., Asch, F., Dusserre, J., Ramanantsoanirina, A., and Brueck, H. (2012). Climate effects on yield components as affected by genotypic responses to variable environmental conditions in upland rice systems at different altitudes. *Field Crops Research*, **134**: 216-228.
- Singh, R. P., Hodson, D. P., Jin, Y., Lagudah, E. S., Ayliffe, M. A., Bhavani, S., Rouse, M. N., Pretorius, Z. A., Szabo, L. J., Huerta-Espino, J., Basnet, B. R., Lan, C., and Hovmøller, M. S. (2015). Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology*, **105**: 872-884.

- Spence, C., Alff, E., Johnson, C., Ramos, C., Donofrio, N., Sundarsen, V., and Bais, H. (2014). Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology*, **14**: 1-17.
- St.Clair, D. A. (2010). Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology*, **48**: 247-268.
- Steele, K. A., Gyawali, S., Joshi, K. D., Shrestha, P., Sthapit, B. R., and Witcombe, J. R. (2009). Has the introduction of modern rice varieties changed rice genetic diversity in a high-altitude region of Nepal? *Field Crops Research*, **113**: 24-30.
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, **47**: 233-263.
- Sthapit, B. R., Pradhanang, P. M., and Witcombe, J. R. (1995). Inheritance and selection of field resistance to sheath brown rot disease in rice. *Plant Disease*, **79**: 1140-1144.
- Sthapit, B. R., and Witcombe, J. R. (1998). Inheritance of tolerance to chilling stress in rice during germination and plumule greening. *Crop Science*, **38**: 660-665.
- Stukenbrock, E. H., and McDonald, B. A. (2008). The Origins of plant pathogens in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, **46**: 75-100.
- Tanweer, F. A., Rafii, M. Y., Sijam, K., Rahim, H. A., Ahmed, F., and Latif, M. A. (2015). Current advance methods for the identification of blast resistance genes in rice. *Comptes Rendus Biologies*, **338**: 321-334.
- Tharreau, D., Fudal, I., Andriantsimialona, D., Utami, D., Fournier, E., Lebrun, M., and Nottéghem, J. L. (2009). World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. In G. Wang and B. Valent (Eds.), *Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease..* Dordrecht, Netherlands: Springer. 209-215
- UPDR/FAO. (2001). Diagnostic et perspectives de développement de la filière riz à Madagascar. *FAO/RFP Antananarivo*:. 111p.
- Vaghefi, N., Nelson, S. C., Kikkert, J. R., and Pethybridge, S. J. (2017). Genetic structure of *Cercospora beticola* populations on *Beta vulgaris* in New York and Hawaii. *Scientific Reports*, **7**: 1-16.
- Valent, B. (1990). Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*, **80**: 33-36.
- Valent, B., and Khang, C. H. (2010). Recent advances in rice blast effector research. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**, 434-441.
- Van der Hoorn, R. A. L., and Kamoun, S. (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors, *The Plant Cell*, **20**: 2009-2017.
- Vasudevan, K., Cruz, C. M. V., Gruissem, W., and Bhullar, N. K. (2014). Large scale germplasm screening for identification of novel rice blast resistance sources. *Frontiers in Plant Science*, **5**: 1-9.

- Vasudevan, K., Gruissem, W., and Bhullar, N. K. (2015). Identification of novel alleles of the rice blast resistance gene *Pi54*. *Scientific Reports*, **5**: 1-11.
- Vergne, E., Grand, X., Ballini, E., Chalvon, V., Saindrenan, P., Tharreau, D., Nottéghem, J.-L., and Morel, J.-B. (2010). Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology*, **10**: 1-17.
- Wang, X., Jia, Y., Wamishe, Y., Jia, M. H., and Valent, B. (2017). Dynamic changes in the rice blast population in the united states over six decades. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **30**: 803-812.
- Xiao, W-M., Luo, L-X., Wang, H., Guo, T., Liu, Y-Z., Zhou, J-Y., Zhu, X-Y., Yang, Q-Y., and Chen, Z. (2016). Pyramiding of *Pi46* and *Pita* to improve blast resistance and to evaluate the resistance effect of the two R genes. *Journal of Integrative Agriculture*, **15**: 2290-2298.
- Xu, J., and Hamer, J. E. (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation, and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes and Development*, **10**: 2696-2706.
- Yan, X., and Talbot, N. J. (2016). Investigating the cell biology of plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Current Opinion in Microbiology*, **34**: 147-153.
- Yasuda, N., Mitsunaga, T., Hayashi, K., Koizumi, S., and Fujita, Y. (2015). Effects of pyramiding quantitative resistance genes *pi21*, *Pi34* and *Pi35* on rice leaf blast disease. *Plant Disease*, **99**: 904-909.
- Yoshida, K., Saunders, D. G. O., Mitsuoka, C., Natsume, S., Kosugi, S., Saitoh, H., Inoue, Y., Chuma, I., Tosa, Y., Cano, L. M., Kamoun, S., and Terauchi, R. (2016). Host specialization of the blast fungus *Magnaporthe oryzae* is associated with dynamic gain and loss of genes linked to transposable elements. *BMC Genomics*, **17**: 1-18.
- Young, N. D. (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, **34**: 479-501.
- Zhan, J., and McDonald, B. A. (2013). Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annual Review of Phytopathology*, **51**: 131-153.
- Zhan, J., Mundt, C. C., Hoffer, M. E., and McDonald, B. A. (2002). Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution : an experimental test in a plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**: 634-647.
- Zhan, J., Thrall, P. H., Papaïx, J., Xie, L., and Burdon, J. J. (2015). Playing on a pathogen's weakness : using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. *Annual Review of Phytopathology*, **53**: 19-43.
- Zhang, N., Luo, J., Rossman, A. Y., Aoki, T., Chuma, I., Crous, P. W., Dean, R., de Vries, R. P., Donofrio, N., Hyde, K. D., Lebrun, M-H., Talbot, N. J., Tharreau, D., Tosa, Y., Valent, B., Wang, Z., and Xu, J-R. (2016). Generic names in *Magnaporthales*. *IMA Fungus*, **7**: 155-159.

- Zhang, S., Wang, L., Wu, W., He, L., Yang, X., and Pan, Q. (2015). Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AvrPib responding to the rice blast resistance gene Pib. *Scientific Reports*, **5**: 1-10.
- Zhang, S., and Xu, J. (2014). Effectors and effector delivery in *Magnaporthe oryzae*. *Plos PATHOGENS*, **10**: 1-4.
- Zhang, Y., Lubberstedt, T., and Xu, M. (2013). The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics*, **40**: 23-35.
- Zhou, X., Zhao, X., Xue, C., Dai, Y., and Xu, J. (2014). Bypassing both surface attachment and surface recognition requirements for appressorium formation by overactive ras signaling in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **27**: 996-1004.
- Zhu, Y., Chen, H., Fan, J., Wang, Y., Li, Y., Chen, J., Fan, J-X., Yang, S., Hu, L., Leung, H., Mew, T. W., Teng, P. S., Wang, Z., and Mundt, C. C. (2000). Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*, **406**: 718-722.

Webmographie :

- R Core Team. (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.r-project.org>

Annexes

Annexe 1 : Fiche variétale de Chhomrong Dhan

Fiche Technique de riz pluvial

Variété : **Chhomrong Dhan**

Identifiée par : FOFIFA / CIRAD
 Année d'inscription : 1995
 Origine géographique : Népal
 Structure génétique : variété locale
 N° catalogue FOFIFA : 4368 N° catalogue gervex/Cirad

Caractéristiques d'Adaptation

Groupe morphologique	<i>O. sativa ss japonica</i>
Cycle semis-floraison	130 jours (Moyenne à 1650 m d'altitude)
Cycle semis-maturité	165 jours (Moyenne à 1650 m d'altitude)
Aire de culture	1000 - 1800 m
Vocation culturale	pluviale



Points forts :

- adaptation à la très haute altitude
- résistance aux maladies
- productivité
- tallage
- aspect sanitaire du grain

Points faibles :

- sensible à la verse
- sensible au stress hydrique avec apparition de « panicules blanches »

Caractéristiques Végétatives

Hauteur moyenne de la plante	109 cm
Aptitude au tallage	très bonne
Port de la plante	ouvert
Longueur et largeur des feuilles	24 cm * 1,3 cm
Exertion paniculaire	excellente
Longueur de la panicule	19 cm

Caractéristiques Agronomiques

Verse	sensible
Egrenage	moyennement résistante
Pyriculariose du cou	tolérante
Pyriculariose foliaire	tolérante
Résistance au froid (% épillets fertiles)	bonne (85%)
Rendement maximum observé en essai	6,4 t/ha
Rendement moyen observé en essai	5,3 t/ha



Caractéristiques des Graines

Aristation	aristulée
Couleur de l'apex	violet foncé
Couleur des glumelles	bicolore (jaune/rouge)
Pilosité des glumelles	très faible
Poids de 1000 grains	26 g
Type de grain	demi-rond
Couleur de péricarpe	rouge
Longueur du grain vêtu	7,4 mm
Largeur du grain vêtu	3,1 mm
Translucidité	bonne
Appréciation du goût	très bonne



Annexe 2 : Etapes d'analyse moléculaire des souches de *Magnaporthe oryzae*

Extraction d'ADN :

L'extraction d'ADN des souches dans cette étude est réalisée selon la procédure au chloroforme isoamilalcool (CIAA) :

- Le mycélium récupéré et séché à l'aide de papier filtre est déposé dans un tube d'Eppendorf de 2 ml.
- La digestion des parois cellulaires est effectuée à l'aide de 1.5 ml de la solution d'enzyme Vinoflow avec une incubation de 2 heures à la température ambiante.
- Une centrifugation de 3 min est ensuite effectuée et le surnageant est écarté.
- Puis avec l'ajout de 600 µl de tampon de lyse tissulaire sur le culot, les tubes sont mis au bain-marie à 65 °C pendant 30 minutes.
- 600 µl de CIAA est ajouté dans les tubes qui sont mélangés par inversion jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- Pour purifier l'ADN, une centrifugation de 10 minutes est conduite et le surnageant est enlevé.
- 600 µl d'isopropanol froid est ajouté dans chaque tube suivi d'une centrifugation de 7 minutes. L'ADN précipité sur la paroi de tube est rincé avec 500 µl d'éthanol à 70%. L'alcool est enlevé après centrifugation de 2 minutes et les tubes sont séchés sous une hotte jusqu'à l'évaporation totale de l'alcool.
- Enfin, les résidus d'ARN sont digérés par l'addition de 100 µl de Tris HCl-éthylène diamine tétra acétate (TE) et 1 µl RNase par tube.

Amplification d'ADN :

L'ADN obtenu est amplifié avec 12 marqueurs microsatellites spécifiques pour *M. oryzae*. Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) multiplexées sont réalisées dans un volume final de 5 µl contenant : 2.5 µl de kit QIAGEN (HotStarTaq DNA polymerase, KCl (NH₄) SO₄, TrisHCl, 3mM MgCl₂, et 0.2 µM of each dNTP) multiplex PCR, 0.5 µl du mélange des amorces, 0.5 µl de solution tampon (Q) et 1.5µl de l'ADN extrait de chaque souche.

Le cycle de la PCR est accompli selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 95°C pendant 15 minutes, suivie de 3 étapes répétées 40 fois :

- dénaturation de l'ADN durant 30 secondes à 94 °C,
- hybridation des marqueurs pendant 90 secondes à 57 °C,
- polymérisation pendant 60 secondes à 72 °C,
- élongation finale pendant 30 minutes à 60 °C.

La séparation et la détection des produits obtenus se font par une électrophorèse

Annexe 3 : Résumé communication orale au 7th International Rice Blast Conference : IRBC, Manille, Philippines du 09 au 13 Octobre 2016.



7th International Rice Blast Conference
The Bellevue Manila, Alabang, Metro Manila, Philippines

Potential Inoculum Sources of Rice Blast on Upland Rice in the Central Highlands of Madagascar.

Raveloson, H.¹ Ratsimiala Ramonta, I.² Tharreau, D.³ and Sester, M.³

(¹ Centre National de Recherche Appliquée au développement rural : FOFIFA, Antsirabe 110, Madagascar ;
² Université d'Antananarivo, Antananarivo 101, Madagascar ; ³ Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomiques pour le Développement : CIRAD, Montpellier 34398, France).

In the central Highlands of Madagascar, where rice is not cultivated for several months each year, the knowledge of the potential inoculum sources which contribute to the initial onset of the disease is an important information to manage blast pressure. Several studies have demonstrated the survival of *Magnaporthe oryzae* on rice seeds and the role of infested seeds in outbreaks of rice blast. However, little information is available on the role of other inoculum sources (rice residues, rice stem bases and unfilled grains left on the plot after rice harvest) in the onset of blast epidemics.


Two experiments were conducted in upland conditions in the Vakinankaratra region of the Highlands of Madagascar: One experiment aimed at comparing the effect of potential inoculum sources (rice grains, residues and stem bases) on the onset of blast epidemic in the field. The disease severity was measured from the first appearance of the symptoms through the rice plant development on plots with different potential inoculum sources. The second experiment aimed at measuring how long the pathogen could survive on the infested rice residues left above or in the soil. Survival of the pathogen was observed during 24 months by taking residue samples monthly.

The results showed that significant difference of severity and development of blast were obtained on plots with different potential inoculum sources. The highest level of blast was observed on plots with infested rice residues, stem bases and unfilled grains than the other tested plots. It was found also that the level of blast seemed at the same level for the plots sowing with infested seeds, non infested seed and non infested residues. So, the presence of infested rice organs on plots (such as rice residues, stem bases and unfilled grains) allowed the onset of blast epidemic in the field. The survival monitoring of *M. oryzae* on infested rice residues showed that significant difference of pathogen sporulation capacity was observed on infested rice residues left above the soil than rice residues in the soil. In the first observation of the residue samples, pathogen sporulation rates decreased rapidly and no more sporulation was observed after few months for buried rice residues while high pathogen sporulation rates remained high for few months and surviving of *M. oryzae* was recorded on rice residues placed on the soil surface at least during two cropping seasons.

This new data concerning other inoculum sources will allow establishing appropriate cultural practices for their management and could help identifying strategies to limit the spread of blast epidemics at a regional scale.

Keywords: rice blast, inoculum sources, survival, *Magnaporthe oryzae*.


Annexe 4 : Communication par poster 2^{ème} Edition des Doctoriales, Toliara, Madagascar du 13 au 17 Décembre 2016.



Adaptation des populations de *Magnaporthe oryzae* à une variété de riz pluvial partiellement résistante et analyse des risques de propagation de la pyriculariose sur les Hautes-Terres de Madagascar



Harinjaka Raveloson^{1*}, Isabelle Ratsimiala Ramonta^{2*}, Didier Tharreau^{3*} et Mathilde Sester⁴

* Ecole Doctorale : Médecine de la Vie et de l'Environnement, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo et Centre National de Recherche Appliquée au Développement Rural : FOR FANGA FANGA, Antananarivo, 110 Madagascar; ² Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, 101 Antananarivo 101, Madagascar; ³ Centre de Coopération Intercontinentale Recherche Agrobiologie pour le Développement, ISIRI, Montgaillet 24300, France



1- INTRODUCTION :

- ◆ Développement rapide de la riziculture pluviale sur les Hautes Terres de Madagascar
- ◆ Pyriculariose causée par *M. oryzae*, maladie fongique la plus dévastatrice des cultures de riz dans le monde et présente sur tous les types de riziculture
- ◆ La variété Chinomang (ChD) partiellement résistante, a été très majoritairement adoptée par les agriculteurs (90% de la surface de riz pluvial)
- ◆ Le risque de l'adaptation de l'agent pathogène qui conduirait à une épidémie, s'il n'est identifié le plus tôt possible de sa durabilité





Pyriculariosis foliaire
Pyriculariosis paniculaire

- ◆ Donc, en cas d'érosion de la résistance de cette variété prédominante, il est indispensable de proposer de nouvelles stratégies pour limiter la propagation de la pyriculariose

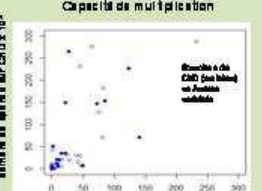
3- RESULTATS :

Répartition géographique de sites suivis dans la région du Vakinankaratra



➔ La pression de la pyriculariose sur les variétés du riz pluvial reste faible sur les Hautes Terres de Madagascar.

Capacité de multiplication






Biomasse de spores sur F101 x 10⁵



Distribution à fréquence de génotypes multialèles (MLG)

Numero MLG	Nombre des souches		Pourcentage	
	ChD	Autres variétés	ChD	Autres variétés
1	11	7	34	9
2	26	49	49	63
3	5	2	17	2
4	3	4	6	4
13	1	1	1	1
15	1	2	2	2
16	1	2	2	2
17	1	2	2	2
18	1	2	2	2
Total	54	83	100	100

➔ Pas d'adaptation particulière de souches collectées sur ChD pour la campagne 2014-2015

Semences et grains vides
Résidus du riz


Bases de tige du riz

➔ Semences, grains vides, résidus et bases de tiges du riz infestés contribuent sur le démarrage de l'épidémie de la pyriculariose.

2- MATERIELS ET METHODES :


- > Suivi de la pyriculariose foliaire et paniculaire sur des parcelles paysannes et un dispositif expérimental dans la région du Vakinankaratra durant les campagnes 2014-2015
- > Analyse de la structure et de la diversité des populations de *M. oryzae* en comparant les souches collectées sur ChD et sur d'autres variétés

Suivi de tache et collecte d'échantillons




ChD AUTRE


Folles et panicules malades



Isolation et conservation des souches de *M. oryzae*



Test phénotypique méthode décrite par Gallot *et al.* 2014



Analyse moléculaire à l'aide de microsatellites méthode décrite par Adrait *et al.* 2007

- > Des essais de plusieurs années de caractérisation de sources d'inoculum primaires de la pyriculariose

4- CONCLUSIONS :


- ◆ Plus de connaissance sur la résistance partielle, sujet peu documenté
- ◆ Nouvelles informations pour la gestion de la durabilité de la résistance variétale
- ◆ Amélioration des stratégies de lutte contre la pyriculariose

5- REFERENCES ET REMERCIEMENTS :


- Adrait, M., Sautou, A., Chombré, D., Llança, M., Montagne, J., Llança, M., and Tharreau, D. (2007). Microsatellites markers for population structure of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Ecology* 16(12): 2677-2692.

- Adrait, M., Sautou, F., Llança, J., Yano, K., Adait, M., Bouquet, V., Tharreau, D., and Fomich, F. (2016). The early rice blast pathogen associated to the IR 8 population with the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Data* 5 (15666), 1-9. doi:10.1038/sdata.2016.00166.

Partenaires techniques :



Bureau de financement :



DOCTORIALES 2016, 2^{ème} EDITION à TOLIARA

Université d'Antananarivo
Faculté des Sciences
Domaine des Sciences et Technologie

Ecole doctorale : Science de la Vie
et de l'Environnement
Spécialité : Biotechnologie

Adaptation of *Magnaporthe oryzae* populations to partially resistant upland rice variety (*Oryza sativa*) and factors contributing to the rice blast onset in Madagascar Highlands

Abstract:

Quantitative resistance is considered sustainable, but examples exist of adaptation of the pathogen agent on this type of resistance. The case of the Highlands of Madagascar with a massive deployment of the variety Chhomrong Dhan (ChD) since 2006 in rainfed upland rice was studied in order to better understand the erosion or the durability of a quantitative resistance for the complex rice and blast pathogen fungus *Magnaporthe oryzae*.

Blast epidemics have been followed in farmer's fields in six sites, one experimental design during three seasons 2014-2017 and in control plots (with ChD and Fofifa 154, a susceptible variety) during wet season 2015-2016. Then, pathogen adaptation was studied by phenotypic and genetic comparisons of *M. oryzae* populations sampled recently (seasons 2014-2016 with 351 strains) and populations sampled before deployment (between 2001 and 2006 with 455 strains). Trials were also carried out over several years for assessing the relative importance of different *M. oryzae* inoculum sources which could constitute key elements of their management to avoid dispersion of strains potentially adapted.

Panicle blast severity (60% of infected grains) was observed on one susceptible variety proving the presence of *M. oryzae* inoculum in the studied region, while the maximum panicle severity inventoried on ChD was 4%. ChD resistance remains then effective to *M. oryzae* populations in the highlands. ChD population's genotypic structure varied according to the sites and according to the sampling years. In addition, the comparison of components of aggressiveness (number of lesions, surface of lesions and number of spores produced) showed that aggressiveness level was similar between the populations sampled on ChD and on other varieties. These results of molecular analysis and phenotypic tests revealed the absence of particular adaptation of present *M. oryzae* populations on ChD. On the other hand, the massive deployment of ChD seemed to have modified the genotypic structure of *M. oryzae* population on upland rice on the highlands given the difference of GC frequencies between the populations before 2006 and recent. The characterization of *M. oryzae* inoculum sources showed that seeds, rice residues and stem bases play a determinant role in the development of rice blast in the field.

Keywords: rice variety, Chhomrong Dhan, rice blast, *Magnaporthe oryzae*, quantitative resistance, massif deployment.

Author: Harinjaka RAVELOSON

Thesis advisor: Isabelle RATSIMIALA RAMONTA

Thesis co-advisor: Didier THARREAU

Thesis supervisor: Mathilde SESTER

Adaptation des populations de *Magnaporthe oryzae* à une variété de riz pluvial (*Oryza sativa*) partiellement résistante et facteurs contribuant à l'initiation de la pyriculariose dans les Hautes Terres de Madagascar

Résumé :

La résistance quantitative est généralement considérée comme une résistance durable. Pourtant, des cas d'adaptation de l'agent pathogène sur ce type de résistance existent dans certains pathosystèmes. La situation des Hautes Terres de Madagascar avec le déploiement massif de la variété Chhomrong Dhan (ChD) depuis 2006 en riziculture pluviale a été étudiée afin de mieux comprendre l'érosion ou la durabilité d'une résistance quantitative pour le complexe riz et le champignon pathogène responsable de la pyriculariose *Magnaporthe oryzae*.

Les épidémies de pyriculariose ont été suivies sur des parcelles paysannes dans six sites et sur un dispositif expérimental durant trois campagnes (2014-2017) ainsi que sur des parcelles témoins (avec ChD et Fofifa 154 variété sensible) durant une campagne (2015-2016). Ensuite, l'adaptation de l'agent pathogène a été évaluée par des comparaisons phénotypique et génétique des populations de *M. oryzae* échantillonnées récemment (campagnes 2014-2016 avec 351 souches) et avant le déploiement (entre 2001 et 2006 avec 455 souches). Des essais ont également été réalisés pour mesurer l'importance de différentes sources d'inoculum de *M. oryzae* qui pourraient constituer des éléments clés à gérer pour éviter la propagation d'éventuelles souches adaptées.

Le niveau d'attaque de la pyriculariose paniculaire (60% des grains infectés) a été observé sur une variété sensible prouvant la présence d'inoculum de *M. oryzae* dans la région étudiée, alors que la sévérité paniculaire maximale recensée sur ChD est de 4%. La résistance de ChD reste donc efficace vis-à-vis des populations de *M. oryzae* dans les Hautes Terres. La structure génotypique des populations sur ChD varie en fonction des sites et en fonction des années. La comparaison des composantes d'agressivité (nombre de lésions, surface de lésions et nombre de spores produites) montre que le niveau d'agressivité est similaire entre les populations prélevées sur ChD et celles d'autres variétés. Ces résultats d'analyses moléculaires et de tests phénotypiques révèlent l'absence d'adaptation particulière des populations de *M. oryzae* actuelles sur ChD. Par contre, le déploiement de ChD semble avoir modifié la structure génotypique de population de *M. oryzae* de la riziculture pluviale sur les Hautes Terres à cause de la différence de fréquences de groupes clonaux entre les populations prélevées avant 2006 et les populations récentes. La caractérisation des sources d'inoculum de *M. oryzae* montre que les semences, les résidus de riz et les bases de tige jouent un rôle important dans le développement de la pyriculariose au champ.

Mots clés : variété de riz, Chhomrong Dhan, pyriculariose, *Magnaporthe oryzae*, résistance quantitative, déploiement massif.

Auteurs : Harinjaka RAVELOSON
Directeur de thèse : Isabelle RATSIMALA RAMONTA
Co-directeur de thèse : Didier THARREAU
Encadrante de thèse : Mathilde SESTER