



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

ECOLE DOCTORALE
AGRICULTURE-ELEVAGE-ENVIRONNEMENT
EQUIPE D'ACCUEIL
SOL-AGRONOMIE-ENVIRONNEMENT



THESE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Agronomiques

Protection agroécologique de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*), cas de la région Vakinankaratra

Présentée par

ANDRIAMIARISOA Lovaniana Dinanirina

Phytopathologiste

Soutenance, du 07 juin 2024

Devant le jury composé de

Tantely RAZAFIMBELO	Professeur ESSA-Université d'Antananarivo	Président du Jury
Volatsara Baholy RAHETLAH	Professeur Titulaire ESSA-ABC-Université d'Antananarivo	Directrice de Thèse
Nirina RAKOTOARIMANGA	Docteur, Chercheur Enseignant CNRE Madagascar	Co-Directeur de Thèse
Tendro RADANIELINA	Docteur HDR Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo	Rapporteur externe
Andry ANDRIAMANANJARA	Professeur, LRI, Université d'Antananarivo	Rapporteur interne
Noronirina RAKOTOARISOA	Professeur Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo	Examineur externe
Noroso Christine RAZAFINDRAMANANA-RAKOTONIAINA	Professeur ESSA, Université d'Antananarivo	Examineur interne



ORGANIZATION
FOR WOMEN IN
SCIENCE FOR THE
DEVELOPING WORLD

DEDICACE

À ma famille, qui a été mon roc et ma source de soutien tout au long de cette aventure académique. En particulier, à :

- Mon mari **ANDRIAMIALY Marino**, dont le soutien indéfectible, la patience et l'amour inconditionnel ont été mes plus grands atouts. Tu as été là à chaque étape, prêt à me reconforter après une longue journée de travail sur le terrain, à me soutenir dans les moments de doute et à célébrer chaque petite victoire avec moi. Même pendant les moments les plus difficiles, tu as toujours été mon pilier et ma motivation.
- Mes enfants **ANDRIAMIALY Samuelito** , **ANDRIAMIALY Mathieu** et ma petite princesse **ANDRIAMIALY Minah**, qui ont fait preuve d'une patience et d'une compréhension infinies pendant mes absences prolongées et mes périodes de stress intense. Votre amour et votre soutien m'ont donné la force de poursuivre mes efforts avec détermination.
- À mes deux mamans, **RAHANTAMIARISOA Marie Clairette** et **RAFANO HARANA Pascaline** dont les prières et les conseils avisés ont été une source de réconfort et de guidance tout au long de cette aventure. Votre amour inconditionnel et vos encouragements constants ont été les fondations sur lesquelles je me suis appuyée pour surmonter les défis et atteindre mes objectifs.
- A mon papa, **ANDRIANAIVO Ramambaso**a, que j'aime tant, et que je serai toujours reconnaissante pour le bonheur et le soutien qu'il m'apporte chaque jour.

À toute ma famille, qui avez été mes piliers dans les moments de joie et de peine, je vous dédie humblement ce travail. Votre amour, votre soutien et votre présence ont été les véritables moteurs de ma réussite. Merci du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait et pour tout ce que vous êtes.

AVANT-PROPOS

C'est avec un grand plaisir que nous présentons cette étude qui examine l'efficacité des plantes assainissantes et des souches natives d'actinomycètes dans la lutte contre le flétrissement bactérien *Ralstonia solanacearum* et pour l'amélioration du rendement des cultures de pomme de terre dans la région de Vakinankaratra de Madagascar. Cette recherche découle d'un intérêt profond pour les enjeux de la sécurité alimentaire et de la durabilité agricole dans les régions où le flétrissement bactérien constitue une menace sérieuse pour la culture de pomme de terre.

Au fil des années, les agriculteurs de la région ont été confrontés à des pertes de rendement importantes dues à cette maladie, ce qui a motivé l'équipe de recherche à explorer des approches alternatives pour atténuer son impact. À travers cette étude, nous avons cherché à évaluer le potentiel des plantes assainissantes, des actinomycètes et la combinaison des deux techniques en tant que solutions biologiques prometteuses pour protéger les cultures de la pomme de terre contre *Ralstonia solanacearum*.

Ce travail représente le fruit d'une collaboration étroite entre chercheurs, agronomes et agriculteurs locaux, et nous tenons à exprimer nos gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette étude. Leur engagement et leur soutien ont été essentiels à chaque étape de ce projet.

Enfin, nous espérons que les résultats présentés dans ce document contribueront à élargir les connaissances sur la gestion du flétrissement bactérien *Ralstonia solanacearum* et à fournir des pistes pour le développement de pratiques agricoles durables dans la région et au-delà.

Nous souhaitons à tous les lecteurs une lecture enrichissante et instructive de cette étude.

ANDRIAMIARISOA Lovaniana Dinanirina

REMERCIEMENTS

En premier lieu, nous souhaitons exprimer nos reconnaissances à Dieu pour les ressources et les opportunités qu'Il a mises sur nos routes, sans lesquelles ce travail n'aurait pas été possible.

Nous souhaitons exprimer nos sincères remerciements à toutes les personnes et institutions qui ont contribué à la réalisation de cette étude.

Nous tenons à saluer l'appui financier du **CRDI-Canada**, géré par l'organisation des femmes scientifiques du monde en développement **OWSD** de l'**UNESCO**.

Nous adressons nos remerciements les plus chaleureux au **Professeur titulaire RAHETLAH Volatsara Baholy**, notre Directrice de thèse, pour ses conseils avisés, son soutien indéfectible et son expertise précieuse tout au long de ce projet. Sa guidance éclairée a été d'une valeur inestimable et a grandement contribué à la qualité de nos travaux.

De même, nous sommes reconnaissants envers **Docteur RAKOTOARIMANGA Nirina**, notre Co-Directeur de thèse, dont la compétence nous a permis de mener à bien la recherche sur la recherche des souches d'actinomycètes prometteuses au niveau du laboratoire CNRE Madagascar.

Nous exprimons également notre profonde gratitude envers **Professeur ANDRIAMANIRAKA Harilala**, Directeur de l'Ecole Doctorale pour avoir accueilli notre projet de recherche au sein de leur établissement, ainsi qu'à tous les professeurs et membres de l'équipe d'accueil A2E pour les enseignements dispensés qui ont enrichi nos connaissances et nous ont permis de progresser.

Nos vifs remerciements à **Professeur RAZAFIMBELO Tantely**, notre Président de Jury pour avoir accepté de présider notre soutenance.

Nos vifs remerciements à **Professeur RADANIELINA Tendro** et **Professeur ANDRIAMANANJARA Andry** nos rapporteurs pour l'intérêt manifesté à l'égard de ce travail en s'engageant à être nos rapporteurs.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements à **Professeur RAKOTOARISOA Noronirina** et **Professeur RAZAFINDRAMANANA-RAKOTONIAINA Norosoa Christine** pour avoir accepté de jouer le rôle d'examinatrice lors

de l'évaluation de la thèse. Ses contributions expertes et ses commentaires éclairés ont grandement enrichi notre travail, apportant une perspective critique et constructive qui a considérablement contribué à son développement.

Nous adressons nos remerciements sincères à tous les membres de l'équipe de recherche qui ont participé à la collecte des données, à l'analyse et à l'interprétation des résultats. Leur dévouement et leur collaboration ont été indispensables à la réussite de cette étude.

Nous tenons également à remercier **Monsieur RANDRIAMAMPIANINA Onidera**, notre Chef de service, pour son soutien et sa compréhension qui nous ont permis de concilier travail et recherche.

Nous exprimons notre reconnaissance envers l'équipe de **Plant Molecular Biology Lab** de nous avoir donné l'accès au niveau de leur laboratoire.

Nous remercions également nos deux stagiaires en Master II, **Madame FANJANIRINA Chantal** et **Monsieur RANDRIAMAMPIONONA Andry**, qui ont beaucoup participé aux réalisations des activités de laboratoire et terrain.

Ainsi qu'à toute l'équipe de laboratoire de Phytopathologie de la DPV et à nos stagiaires, plus particulièrement **Monsieur BEBO Nirina Eric**, Responsable Laboratoire en Microbiologie et **Monsieur EDOUARD Noah**, Stagiaire Agronome pour leurs aides précieuses dans nos travaux de laboratoire et travaux en serre.

Nos remerciements vont également à l'équipe de la **Quarantaine Végétale de la DPV** pour avoir mis à notre disposition la serre nécessaire à nos expérimentations. Nous sommes également reconnaissants envers les agriculteurs et les participants qui ont consacré leur temps et leur expertise à cette recherche, contribuant ainsi à enrichir notre compréhension des enjeux agricoles.

Enfin, nous tenons à exprimer notre gratitude envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont apporté leur soutien, leurs conseils et leur encouragement tout au long de ce projet. Leur présence et leur engagement ont été une source d'inspiration et de motivation.

À tous, nous adressons nos plus sincères remerciements.

TABLE DE MATIERE

DEDICACE	i
AVANT-PROPOS	ii
REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES ACRONYMES	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES PLANCHES	xiv
FINTINA	xv
RESUME	xvii
ABSTRACT	xix
INTRODUCTION GENERALE	1
I. CONTEXTE GENERAL ET JUSTIFICATION DE L'ETUDE	1
II. OBJECTIF ET HYPOTHESES DE LA RECHERCHE	3
CHAPITRE 1. SYNTHESES BIBLIOGRAPHIQUES	6
I. L'IMPORTANCE ECONOMIQUE DE LA PRODUCTION DE LA POMME DE TERRE	8
II. LE FLETRISSEMENT BACTERIEN DE LA POMME DE TERRE CAUSE PAR <i>Ralstonia solanacearum</i>	10
II.1. Biologie et cycle du développement	10
II.2. Caractéristiques des races, Biovars et Phylotypes	10
II.3. Ecologie	16
II.4. Epidémiologie	16
II.5. Symptômes et dégâts de la maladie	18
II.6. Diagnostic de la maladie	18
III. LUTTE CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN DE LA POMME DE TERRE	19
III.1. Lutte préventive	20
III.2. Lutte génétique	20
III.3. Lutte mécanique	21
III.4. Lutte agronomique	21
III.5. Lutte biologique	24
IV. PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA et ACTINOMYCETES ...	25
IV.1. Intérêts des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)	26
IV.2. Actinomycètes dans les sols de rhizosphères de plantes	27

IV.3. Importances des actinomycètes	27
IV.4. Actinomycètes contre le flétrissement bactérien <i>R. solanacearum</i>	28
V. PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE	30
V.1. Localisation géographique de la zone d'étude	30
V.2. Climat.....	30
V.3. Culture de la pomme de terre dans la région.....	31
CHAPITRE 2. EVALUATION DES PLANTES ASSAINISSANTES DU SOL CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN (<i>Ralstonia solanacearum</i>) DE LA POMME DE TERRE DANS LA ZONE DE BETAFO	32
I. RESUME.....	34
II. INTRODUCTION	34
III. MATERIELS ET METHODES	35
III.1. Sites expérimentaux	35
III.2. Traitements et dispositifs expérimentaux	37
III.3. Paramètres agronomiques retenus.....	40
3.3.1. Paramètres de croissance et de rendement de la pomme de terre	40
3.3.2. Incidence et sévérité du flétrissement bactérien de la pomme de terre.....	40
3.3.3. Isolement et caractérisation biochimique des souches présumées de <i>R. solanacearum</i> aux champs	41
III.4. Analyses chimiques des échantillons de plant et de sol.....	43
III.5. Evaluation participative des systèmes de culture.....	44
III.6. Analyse statistique	44
IV. RESULTATS ET INTERPRETATIONS	44
IV.1. Effets de l'association sur les paramètres agronomiques	44
IV.2. Effets de l'association sur l'incidence et la sévérité du flétrissement bactérien de la pomme de terre dû à <i>R solanacearum</i>	50
IV.3. Evolution des propriétés physico-chimiques du sol	53
IV.4. Caractérisation biochimique et détermination du type de biovars des souches présumées de <i>R. solanacearum</i>	53
IV.5. Caractérisation moléculaire des souches présumées de <i>R. solanacearum</i>	53
IV.6. Evaluation participative des systèmes de culture	54
V. DISCUSSION.....	54
V. CONCLUSION PARTIELLE	57
CHAPITRE 3. EVALUATION DU POTENTIEL DE BIOCONTROLE DE SOUCHES NATIVES D'ACTINOMYCETES CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN (<i>Ralstonia solanacearum</i>) DE LA POMME DE TERRE.....	58

I.	RESUME.....	60
II.	INTRODUCTION	61
III.	MATERIELS ET METHODES	62
	III.1. Isolement et caractérisation des souches du flétrissement bactérien <i>Ralstonia solanacearum</i>	62
	III.2. Isolement des souches d'actinomycètes à partir de sols rhizosphériques de pomme de terre	62
	III.3. Test d'antagonisme au laboratoire	63
	III.4. Bioformulation des souches d'actinomycètes.....	66
	III.5. Expérimentation en serre	67
	III.6. Expérimentation en plein champs	70
	III.7. Analyse statistique	73
IV.	RESULTATS.....	73
	IV.1. Nombre et caractéristique d'isolats d'actinomycètes isolées	73
	IV.2. Test de confrontation des isolats d'actinomycètes aux isolats de <i>Ralstonia solanacearum</i>	74
	IV.3. Effet des isolats d'actinomycètes produisant sur la production d'AIA	75
	IV.4. Effet des isolats d'actinomycètes sur la solubilisation du phosphate	75
	IV.5. Pureté et viabilité des souches des actinomycètes	76
	IV.6. Effet des souches d'actinomycètes sur l'infestation de <i>R. solanacearum</i> en serre..	77
	IV.8. Essai en milieu réel	84
	IV.9. Isolement et caractérisation des souches de <i>R. solanacearum</i>	87
V.	DISCUSSIONS	88
VI.	CONCLUSION PARTIELLE	93
	CHAPITRE 4. EVALUATION EN MILIEU REEL DE LA COMBINAISON DES PLANTES ASSAINISSANTES DU SOL AVEC LES SOUCHES NATIVES D'ACTINOMYCETES SUR LE CONTROLE DU FLETRISSEMENT BACTERIEN DE LA POMME DE TERRE.....	94
I.	RESUME.....	96
II.	INTRODUCTION	96
III.	MATERIELS ET METHODES	97
	III.1. Site expérimental	97
	III.2. Matériels végétaux	99
	III.3. Souches d'actinomycètes	99
	III.4. Souches de <i>Ralstonia solanacearum</i>	99
	III.5. Traitement et dispositif expérimental	100

III.6. Suivi des paramètres agronomiques de la pomme de terre	100
III.7. Analyse statistique	101
IV. RESULTATS.....	102
IV.1. Effet de la combinaison de <i>Crotalaria grahamiana</i> et de la souche d'actinomycète A1S13 sur le rendement en tubercules.....	102
IV.2. Vérification des souches de <i>Ralstonia solanacearum</i> sur les plants de pomme de terre flétris et tubercules pourris	104
IV.3. Effet de la combinaison sur l'incidence et sévérité de la maladie	105
V. DISCUSSION.....	106
V.I. CONCLUSION PARTIELLE.....	111
DISCUSSION GENERALE	112
CONCLUSION GENERALE	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	a
ANNEXES.....	o
ARTICLES ET PUBLICATIONS.....	t
AUTRES ACTIVITES DE LA DOCTORANTE.....	u

LISTE DES ACRONYMES

°C : Degré Celsius

µm : Micromètre

A2E : Agriculture - Elevage - Environnement

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AIA : Acide indole 3-acétique

BDB: Banana Blood Disease

Bv: Biovar

C : Carbone

C. grahamiana : *Crotalaria grahamiana*

C. spectabilis : *Crotalaria spectabilis*

C/N : Rapport de carbone sur azote

CASEF : Croissance Agricole et Sécurité Foncière

CEFFEL : Centre d'Expérimentation et de Formation en Fruits Et Légumes

CFU : Colony-forming units

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement durable

Cl : Chlore

cm : Centimètre

CNRE : Centre National de Recherches sur l'Environnement

CPG : Casamino acide-peptone-glucose

DAPG : 2,4-diactétylphloroglucinol

DGM : Direction Générale de la Météorologie

DPV : Direction de la Protection des Végétaux

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FAO: Food and Agriculture Organization

FAOSTAT: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database

FIFAMANOR: Fiompiana Fambolena Malagasy Norveziana

g: Gramme

HCN: Acide cyanhydrique

IM: Incidence de la maladie

ISP: International Strptomyces Project

JAS: Jour après semis

KCl : Chlorure de potassium
Kg/ha : Kilogramme par hectare
KOH : Hydroxyde de potassium
LPGA : Levure Peptone Glucose Agar
m : mètre
MgSO₄ : Magnésium sulfate
ml : Millilitre
Mt : Millions de tonnes
N : Azote
NaCl: Chlorure de sodium
NaOH: Hydroxyde de sodium
NCMELISA: Nitrocellulosic Membrane Enzyme Linked Immunosorbent Assay
NH₄ H₂ PO₄ : Ammonium dihydrogène phosphate
NPK: Azote - Phosphore - Potassium
O/F: Oxydation/Fermentation
OWSD: Organization for Women in Science for the developing World
PCR: Polymerase Chain Reaction
PdS: Plante de service
PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
pH: Potentiel d'hydrogène
PVK: Pivovskaya
R. solanacearum: *Ralstonia solanacearum*
REP: Repeatitive Extragenic Palindromic
RFLP: Restricted Fragment Length Polymorphism
RM: Réduction de la maladie
SMSA: Sequira Medium South Africa
t/ha: Tonne par hectare
TRP: Tryptophane
TZC: Triphenyltetrazolium Chloride
UFC: Unité formant colonie
UNESCO: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
UPDR: Unité du Programme pour le Développement Rural
YPGA: Yeast Pepton Glucose Agar

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Principaux producteurs mondiaux de pomme de terre	9
Figure 2: Gels caractéristiques de PCR multiplex des quatre principaux groupes génétiques décrits chez <i>Ralstonia solanacearum</i> , ainsi que des groupes RFLP 24, 25 et 28.	12
Figure 3: Diversité génétique et phylogénie chez le complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i> , basées sur le polymorphisme de séquence du gène de l'endoglucanase	13
Figure 4: Cycle de développement de <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
Figure 5: Plant de la pomme de terre flétri au Champs	19
Figure 6: Tubercule de pomme de terre à exsudats bactériens	19
Figure 7: Carte de la région du Vakinankaratra.....	30
Figure 8: Diagramme ombrothermique de la région de Vakinankaratra.....	31
Figure 9: Valeurs moyennes de la précipitation et de la température mensuelle dans le district de Betafo (1981-2020)	36
Figure 10: Plant de <i>Crotalaria spectabilis</i>	38
Figure 11: Plant de <i>Crotalaria grahamiana</i>	38
Figure 12: Association culturale pomme de terre et <i>Crotalaria spectabilis</i>	39
Figure 13: Association culturale pomme de terre et <i>Crotalaria grahamiana</i>	39
Figure 14: Semis de tubercules semences de pomme de terre et épandage de fertilisation.....	40
Figure 15: Etapes microbiologiques pour l'identification de <i>R. solanacearum</i>	42
Figure 16: Profil électrophorétique sur gel agarose du produit d'amplification par PCR des isolats bactériens	53
Figure 17: Profil électrophorétique du produit d'amplification par Multiplex PCR des isolats de <i>Ralstonia solanacearum</i>	54
Figure 18: Culture pure de la souche bactérienne <i>Ralstonia solanacearum</i> de pomme de terre	62
Figure 19: Test antagonisme des actinomycètes	64
Figure 20: Technique de mensuration de diamètre de halo sur la solubilisation de phosphore	65
Figure 21 : Dispositif expérimental en serre	68
Figure 22: Valeurs moyennes de la précipitation et de la température mensuelle dans le district d'Ambatolampy.....	70
Figure 23: Aspect morphologique des isolats d'actinomycète	74
Figure 24: Inhibition des souches de <i>R. solanacearum</i> par les isolats d'actinomycètes antagonistes .	74
Figure 25: Test positif des souches d'actinomycètes A1S13, B7S5 et D2S9 sur la production d'AIA et le témoin(T).....	75
Figure 26: Halo transparent autour des souches d'actinomycètes sur le milieu PVK.....	76
Figure 27: Isolats d'actinomycètes A1S13 rajeunis sans contamination	77
Figure 28: Evolution des colonies d'isolats d'actinomycète dans les différentes formulations à 10 ⁹ UFC	77
Figure 29: Evolution de l'incidence de <i>Ralstonia solanacearum</i> sur les plants de pomme de terre en serre par traitement.....	78
Figure 30: Différentes sévérités du flétrissement bactérien en serre	79
Figure 31: Sévérité de flétrissement bactérien en fonction de traitement	80
Figure 32: Tubercules pourris en fonction des traitements.....	80
Figure 33: Croissance en hauteur des plants de pomme de terre en serre.....	82
Figure 34: Hauteur des plants en fonction de traitement de la bioformulation terreau en serre	83

Figure 35: Poids de tubercules par traitement de la bioformulation terreau en serre	83
Figure 36: Site expérimental démontrant le non développement des plants sur le témoin absolu	84
Figure 37: Rendement en tubercules totaux de pomme de terre selon les traitements du sol.....	85
Figure 38: Rendement en tubercules commercialisables de pomme de terre selon les traitements du sol	85
Figure 39: Incidence du flétrissement bactérien de la pomme de terre à 8 semaines de la plantation selon les traitements du sol	86
Figure 40: Sévérité du flétrissement bactérien de la pomme de terre à 8 semaines de la plantation selon les traitements du sol	86
Figure 41: Pourcentage de tubercules pourris de pomme de terre à la récolte selon les traitements	86
Figure 42: Profil électrophorétique sur gel agarose du produit d'amplification par PCR des isolats bactériens.....	87
Figure 43: Profil électrophorétique du produit d'amplification par Multiplex PCR des isolats de <i>Ralstonia solanacearum</i>	88
Figure 44: Valeurs moyennes de la précipitation et de la température mensuelle dans le district d'Antanifotsy (1981-2020)	98
Figure 45: Technique d'association la pomme de terre et <i>Crotalaria grahamiana</i>	100
Figure 46: Rendement en tubercules totaux de la pomme de terre	103
Figure 47: Rendement en tubercules commercialisables (diamètre ≥ 28 mm) de la pomme de terre	103
Figure 48: Nombre de tubercules totaux par parcelle pour chaque traitement	104
Figure 49: Nombre de tubercules commercialisables par parcelle pour chaque traitement	104
Figure 50: Incidence du flétrissement bactérien de la pomme de terre à 8 semaines de la plantation selon les traitements	105
Figure 51: Sévérité de la maladie par semaine au niveau de chaque traitement.....	105
Figure 52: Pourcentage de tubercules pourris par traitement.	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques différentielles utilisés pour identifier des souches bactériennes appartenant à l'espèce <i>Ralstonia solanacearum</i> par des tests biochimiques	10
Tableau 2: Amorces spécifiques utilisées en PCR-multiplexe pour le diagnostic de l'espèce <i>Ralstonia solanacearum</i> du phylotype d'appartenance	11
Tableau 3: Différenciation des biovars de <i>Ralstonia solanacearum</i> à l'aide de tests biochimiques basés sur l'aptitude à l'utilisation de 6 hydrates de carbone	14
Tableau 4: Répartition des races, biovars et divisions des souches de <i>Ralstonia solanacearum</i> par rapport à la gamme d'hôtes et la région géographique	15
Tableau 5: Propriétés chimiques du sol dans les sites expérimentaux.....	36
Tableau 6: Evolution des paramètres de croissance des plants et du nombre de tiges par pieds de pomme de terre	46
Tableau 7: Nombre et poids frais de tubercules totaux par pied de pomme de terre selon les traitements du sol	47

Tableau 8: Nombre et poids de tubercules commercialisables par pied de pomme de terre selon les traitements du sol	49
Tableau 9 : Pourcentage de l'incidence et sévérité du flétrissement bactérien par traitement	51
Tableau 10: Pourcentage de tubercules pourris à 12 semaines de la plantation de la pomme de terre	52
Tableau 11: Pourcentage moyenne de l'augmentation de production et la réduction de l'infestation du flétrissement bactérien sur les systèmes associés dans les deux sites.....	55
Tableau 12: Normes utilisés pour la méthode de diffusion sur gélose	64
Tableau 13: Propriétés chimiques du sol dans le site expérimental	71
Tableau 14: Souches d'actinomycètes isolées au laboratoire à partir des sols rhizosphériques	73
Tableau 15: Récapitulatif de l'augmentation de production et la réduction de l'infestation du flétrissement bactérien sur les lots des plants traités par les actinomycètes par rapport au témoin en serre.....	89
Tableau 16: Récapitulatif sur l'augmentation de production et la réduction de l'infestation du flétrissement bactérien sur les lots des plants traités par les actinomycètes par rapport au témoin aux champs	90
Tableau 17: Caractéristique chimique du sol	98

LISTE DES PLANCHES

Planche 1: Différents Domaines de la recherche	7
Planche 2: Expérimentation aux champs sur l'association culturale pomme de terre et légumineuse <i>Crotalaria</i>	33
Planche 3: Différents étapes pour l'évaluation des souches d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien <i>Ralstonia solanacearum</i>	59
Planche 4: Différents étapes sur l'évaluation en milieu réel de la combinaison des plantes assainissantes du sol avec les souches natives d'actinomycètes sur le contrôle du flétrissement bactérien de la pomme de terre	95

FINTINA

Ny fandazo dia aretina vokatry ny fitambaran'ny aina bitika bakteria avy amin'ny tany atao hoe *Ralstonia solanacearum* izay mitera-doza ho an'ny famokarana ovy. Ity fikarohana ity dia mifantoka indrindra amin'ny fomba agrôekôlôjika izay mikendry ny fiarovana ny voly ovy ao amin'ny faritr'i Vakinankaratra.

Ny andrana voalohany dia natao tao amin'ny toerana roa tao amin'ny distrikan'ny Betafo izay mifantoka amin'ny fampivadiana ny voly ovy karazany “Meva” amin'ny voly rakotra legiominezy *Crotalaria spectabilis* sy *Crotalaria grahamiana* ho enti-miady amin'ny fandazo. Ny kisinin'andranan'ny napetraka dia mitsinjara ho sokajy efatra, ary misy fiverenany efatra, izay mizara ho toy izao: T1: voly ovy manokana, T2: voly ovy miaraka amin'ny rako-maina (mulching) *Crotalaria grahamiana*, T3: voly ovy miaraka amin'ny zezika maitso *Crotalaria grahamiana* ary T4: voly ovy miaraka *Crotalaria spectabilis*.

Ny vokatry ny andranan'ny natao dia naneho fiantraikan'ny fampivadianam-boly amin'ny fampitomboana ny ahavon'ny tahon'ovy hatramin'ny 65% ho an'ny T3, sy ny isan'ny tahon'ovy hatramin'ny 83% ho an'ny T4, ary ny lanjan'ny biômasy ivelany dia niakatra hatramin'ny 208% ho an'ny T2 raha oharina amin'ny T1. Ho an'ny vokatra ovy manontolo dia niakatra hatramin'ny 144% ho an'ny T2, ary ho an'ny vokatra ovy famarotra kosa dia niakatra hatramin'ny 85% ho an'ny T4. Nahitana fihenana ihany koa ny taha sy ny tanjakan'ny fandazo mitranga eo amin'ny voly ovy, hatramin'ny 71% sy 63% ho an'ny T4, 50% sy 48% ho an'ny T2 ary 26% sy 36% ho an'ny T3.

Ny fikarohana faharoa natao dia nifantoka tamin'ny fampiasana aina bitika “Actinomycètes” fanohitry ny fandazo. Ireo « Actinomycètes » ireo dia nalaina tamin'ny ireo faritra manodidina ny fakan'ovy salama anaty tany tao amin'ny faritr'i Vakinankaratra. Ny andranan'ny natao tany amin'ny « laboratoire » dia nahazoana Actinomycètes miisa 84, izay manana toetra manohitra ny fitombon'ny bakteria *Ralstonia solanacearum*, ary 3 amin'izy ireo, atao hoe A1S13, B7S5 sy D2S9 no nanome faribolana tsy anirin'ny *Ralstonia solanacearum* lehibe indrindra izay mirefy hatramin'ny 30mm ny sakany. Nolarona taharo samihafa ireo aina bitika « Actinomycètes » ireo toy ny rano misy « peptone », ny lafarinina sy tanimanga maitso ary ny tany mainty lonaka mba ahazoana fanafody biolojika izay afaka ampiasaina. Ny andranan'ny natao tao amin'ny « serre » dia nifantoka tamin'ny fampiasana ireo fanafody misy « Actinomycètes » A1S13, B7S5 ary D2S9 miaraka amin'ny tany mainty lonaka amin'ny voly ovy karazany Meva. Ny andranan'ny natao teny ifotony tao amin'ny distrikan'ny Ambatolampy, faritr'i Vakinankaratra dia mifantoka amin'ny fampiasana fanafody biolojika vita amin'ny « Actinomycètes » A1S13,

B7S5 sy ny fitambaran'ireo « Actinomycètes » rehetra ireo izay atao hoe « Consortium » manohitra fandazo ka voafono anaty tany mainty lonaka.

Ny vokam-pikarohana tao amin'ny serre dia nahitana fa ny fanafody biolojika karazany A1S13 sy B7S5 dia mahatohitra ny fandazo hatramin'ny 80% sy 60% sy mampihena ny tanjany hatramin'ny 80% ary nampiakatra ny vokatra ovy hatramin'ny 46% sy 20%.

Ny andrana an-tsaha kosa dia nahitana fa ny A1S13 sy ny “Consortium” dia naneho fahafahana miaro ny voly ovy amin'ny fandazo, mampidina hatramin'ny 70% sy 58% ny tahan'ny lazo, 81% et 56% ny tanjaky ny lazo ary ny fahafahana mampitombo ny vokatra ovy hatramin'ny 57% sy 43%.

Ny fikarohana farany dia mifantoka amin'ny fampiasana ny *Crotalaria grahamiana*, zezika maitso miaraka amin'ny aina bitika « Actinomycètes » A1S13 tao amin'ny Fokontany Ihazolava faritr'i Vakinankaratra. Ny kisarin'andrana napetraka dia mitsinjara ho sokajy telo, ary nisy fiverenany telo izay mizara ho toy izao: T1: voly ovy manokana, T2: voly ovy miaraka amin'ny zezika maitso *Crotalaria grahamiana* sy Actinomycètes A1S13 ary T3: voly ovy miaraka amin'ny zezika maitso *Crotalaria grahamiana*.

Ny vokatry ny fikarohana dia nahazoana fitomboan'ny isan'ny ovy manontolo hatramin'ny 20% ary ny vokatra hatramin'ny 66%, ary fitomboan'ny ovy famarotra hatramin'ny 66% sy ny vokatr'ovy famarotra hatramin'ny 102%. Nahitana fihenana hatramin'ny 79% ihany koa ny tahan'ny fandazo. Izany no maneho ny fahombiazan'ny fampivadiam-boly sy fampiasana « Actinomycètes » hampitomboana ny vokatra sy hiarovana ny voly ovy amin'ny *Ralstonia solanacearum*.

Teny manan-danja: Actinomycètes, *Crotalaria grahamiana*, *Crotalaria spectabilis*, Fanafody biolojika, Fandazo *Ralstonia solanacearum*, Ovy, Vakinankaratra.

RESUME

Le flétrissement bactérien, provoqué par le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum*, constitue une menace significative pour la culture de la pomme de terre. Cette étude se concentre sur les approches agroécologiques visant à protéger contre cette maladie dans la région de Vakinankaratra.

La première expérimentation a été menée dans deux sites de la commune rurale de Betafo pour tester l'efficacité de l'association de la pomme de terre de la variété Meva avec des légumineuses assainissantes du sol. Le dispositif expérimental est un bloc aléatoire complet comprenant quatre traitements et quatre répétitions. Les traitements consistaient en T1 : monoculture de pomme de terre, T2 : association *Crotalaria grahamiana* et la pomme de terre (mulching), T3 : association *Crotalaria grahamiana* et la pomme de terre (engrais vert) et T4 : association *Crotalaria spectabilis* avec la pomme de terre.

Les résultats ont révélé une augmentation de 65% de la hauteur moyenne des tiges pour T3, une augmentation de 83% du nombre moyenne de tiges par plant pour T4, et une augmentation de 208% de la biomasse aérienne pour T2. Concernant le rendement, le poids total des tubercules a augmenté de 144% pour T2 et le poids des tubercules commercialisables a augmenté de 85% pour T4. L'étude a également montré une réduction significative de l'incidence et de la sévérité du flétrissement bactérien respectivement de 71% et 63% pour T4, des réductions de 50%, 48% pour T2, et T3 de 26% et 36%.

La deuxième expérimentation est basée sur l'utilisation des souches d'actinomycètes antagonistes de *Ralstonia solanacearum*. Elles ont été isolées au niveau de racine de pomme de terre saine dans des sols rhizosphériques des zones de production de pomme de terre à Vakinankaratra. Au total, 84 souches ont été obtenues comme antagonistes de *Ralstonia solanacearum*, parmi lesquelles trois souches prometteuses notamment A1S13, B7S5 et D2S9 ont été identifiées avec halo d'inhibition atteignant jusqu'à 30 mm de diamètre. Des bioformulations ont été réalisées à partir de trois types de formulations, notamment de l'eau peptonée, l'argile verte avec de la farine et du sol fertile noire à base de terreau. Des essais *in-vivo* ont été réalisés pour évaluer l'efficacité d'une bioformulation à base de terre noire enrichie avec des isolats d'actinomycètes, testant spécifiquement trois souches différentes A1S13, B7S5 et D2S9 sur la culture de la pomme de terre de la variété Meva. Les deux souches les plus performantes, A1S13 et B7S5 et un consortium de deux souches obtenues ont été ensuite testés

en milieu paysan dans la Commune d'Ambatolampy sur la culture de la pomme de terre de la variété Meva.

Les résultats obtenus en serre ont révélé que les souches A1S13 et B7S5 ont eu des impacts positifs significatifs sur la lutte contre le flétrissement bactérien, réduisant l'incidence de la maladie respectivement de 80% et 60% et la sévérité de jusqu'à 80%. Ces souches ont contribué à une augmentation du rendement en tubercules totaux de pomme de terre, avec des hausses respectives de 46% et 20%. Au champ, la souche A1S13 a réduit l'incidence de *Ralstonia solanacearum* de 70% et la sévérité de 81%, tandis que le consortium a atteint une réduction de 58% d'incidence et 56% de sévérité. Ces traitements ont également entraîné des augmentations significatives du rendement en tubercules totaux, respectivement de 49% pour la souche A1S13 et de 39% pour le consortium. Pour les tubercules commercialisables, les augmentations ont été de 57% pour la souche A1S13 et de 43% pour le Consortium.

Une troisième expérimentation a été menée à Ihazolava pour évaluer l'effet combiné de l'utilisation de l'engrais vert *Crotalaria grahamiana* et de l'inoculation avec la souche d'actinomycète A1S13 sur la culture de la pomme de terre. Cette étude comparait trois traitements différents, mettant en évidence que l'association de ces deux techniques offrait les meilleures performances agronomiques. Le dispositif expérimental est constitué de T1 : témoin avec fertilisation standard, T2 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* + inoculant A1S13, T3 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* seule.

Cette combinaison a entraîné une augmentation de 20% du nombre de tubercules et de 66% du rendement total en tubercules, ainsi qu'une hausse de 66% du nombre et de 102% du rendement en tubercules commercialisables par rapport au traitement témoin. Concernant la protection contre *Ralstonia solanacearum*, une réduction significative de l'incidence de 79% a été observée avec cette méthode combinée, démontrant son efficacité tant en termes de rendement agricole que de résistance au *Ralstonia solanacearum*.

Mots clés : Actinomycètes, *Crotalaria grahamiana*, *Crotalaria spectabilis*, flétrissement bactérien *Ralstonia solanacearum*, antagonistes, pomme de terre, Vakinankaratra.

ABSTRACT

Bacterial wilt, caused by the *Ralstonia solanacearum* species complex, poses a significant threat to potato cultivation. This study focuses on agroecological approaches to protect against this disease in the Vakinankaratra region.

The first experiment was conducted at two sites in the rural commune of Betafo to test the effectiveness of associating potatoes with legumes that improve soil health. The experimental design was a complete randomized block consisting of four treatments and four replications. The treatments were T1: potato monoculture, T2: mulching with *Crotalaria grahamiana* and potato association, T3: green manure with *Crotalaria grahamiana* and potato association, and T4: association with *Crotalaria spectabilis* and potato. The results revealed a 65% increase in average stem height for T3, an 83% increase in average stem number per plant for T4, and a 208% increase in aerial biomass for T2. Regarding yield, the total tuber weight increased by 144% for T2 and the weight of marketable tubers increased by 85% for T4. The study also showed a significant reduction in the incidence and severity of bacterial wilt for treatments using crop associations, with reductions of 71% and 63% respectively for T4, while T2 have showed reductions of less than 50% and 48%, and T3 less than 26% and 36%.

The second experiment was based on the use of antagonistic actinomycete strains, isolated from rhizospheric soils of potato production areas in Vakinankaratra. A total of 84 strains were obtained as antagonists of *Ralstonia solanacearum*, among which three promising strains notably A1S13, B7S5, and D2S9 were identified with inhibition halos reaching up to 30 mm in diameter. Bioformulations were made from three types of formulations, including peptone water, green clay with flour, and fertile soil-based potting soil. In vivo tests were conducted to evaluate the effectiveness of a potting soil-based bioformulation enriched with actinomycete isolates, specifically testing three different strains A1S13, B7S5, and D2S9. The two most effective strains, A1S13 and B7S5, and a consortium of two strains obtained will then be tested in the peasant environment in the Commune of Ambatolampy. The results obtained in the greenhouse revealed that the strains A1S13 and B7S5 had significant positive impacts on combating bacterial wilt, reducing the incidence of the disease by 80% and 60% respectively. Furthermore, these strains contributed to a notable increase in the total yield of potato tubers, with respective increases of 20% and 46%. In the field, the strain A1S13 and the Consortium demonstrated an even more marked antagonistic potential. Strain A1S13 reduced the incidence of *Ralstonia solanacearum* by 66%, while the consortium achieved a reduction of 58% and

reduced severity by 81% and 56%. These treatments also led to significant increases in total tuber yield, respectively 49% for strain A1S13 and 39% for the consortium. For marketable tubers, the increases were 57% for strain A1S13 and 43% for the Consortium.

A third experiment was conducted in Ihazolava to evaluate the combined effect of using the green manure *Crotalaria grahamiana* and inoculation with the actinomycete strain A1S13 on potato cultivation. This study compared three different treatments, highlighting that the association of these two techniques offered the best agronomic performances. The experimental design was a complete randomized block consisting of three treatments and three replications. The treatments were T1: potato monoculture, T2: green manure with *Crotalaria grahamiana* and potato association with antagonistic actinomycete strains A1S13, and T4: green manure with *Crotalaria grahamiana* and potato association.

This combination resulted in a 20% increase in the number of tubers and a 66% increase in the total tuber yield, as well as a 66% increase in the number and a 102% increase in the yield of marketable tubers compared to the control treatment. Regarding protection against *Ralstonia solanacearum*, a significant reduction in incidence of 79% was observed with this combined method, demonstrating its effectiveness in terms of both agricultural yield and *Ralstonia solanacearum* resistance.

Keywords: Actinomycetes, *Crotalaria grahamiana*, *Crotalaria spectabilis*, bacterial wilt *Ralstonia solanacearum*, antagonists, potato, Vakinankaratra.

INTRODUCTION GENERALE

I. CONTEXTE GENERAL ET JUSTIFICATION DE L'ETUDE

La pomme de terre, la première denrée alimentaire non céréalière joue un rôle majeur dans le système alimentaire mondial. En 2021, sa production est estimée à plus de 376,1 millions de tonnes, pour un niveau de surface de 18 millions d'hectares (FAO, 2021). Cette production a augmenté de 10% par an jusqu'au début des années 2023. Les principales régions productrices de la pomme de terre sont l'Asie avec 197,5 millions de tonnes, l'Europe avec 102,5 millions de tonnes, et l'Afrique avec 28 millions de tonnes. La FAO estime que la production mondiale pourrait atteindre 750 millions de tonnes d'ici 2030, mais les échanges internationaux de pomme de terre resteront marginaux. La mondialisation de l'industrie de la pomme de terre pourrait être favorisée par l'expansion des usines de transformation pour produire des produits comme les frites, les cubes, la féculé et les chips, exportables dans le monde entier.

La pomme de terre, originaire de la cordillère des Andes, a été introduite à Madagascar au XIXe siècle, probablement par des missionnaires français (FRANCOIS, 1924). La pomme de terre est une production importante pour les revenus monétaires des ménages agricoles des zones de production et en particulier les zones d'altitude sur les Hautes Terres centrales de Madagascar. Il s'agit en effet d'un produit avec une forte demande sur les marchés domestiques, en frais comme en transformé (BELIAIRE, 2020).

Aujourd'hui, la pomme de terre est l'un des produits maraîchers les plus populaires à Madagascar, occupant la sixième place en termes de superficie cultivée. Elle joue un rôle crucial dans la sécurité alimentaire des populations rurales et contribue à la diversification alimentaire en milieu urbain. Les principales régions de production de la pomme de terre sont le Vakinankaratra, l'Itasy et l'Analamanga. Le Vakinankaratra, en particulier, consacre 50 000 hectares à la culture de la pomme de terre (CEFFEL, 2012).

En 2018, la production totale de pomme de terre à Madagascar était estimée à 650 000 tonnes, provenant de superficies cultivées estimées à 68 000 hectares. Ces chiffres témoignent d'une augmentation significative de la culture de la pomme de terre dans le pays. Cette augmentation de la production découle de plusieurs facteurs, notamment la croissance démographique, l'augmentation du nombre de producteurs dans les zones de haute altitude des régions d'Analamanga et d'Itasy, ainsi que l'expansion des superficies cultivées. Cette forte progression

de la production est principalement alimentée par la demande croissante sur le marché intérieur, car les exportations sont presque inexistantes (BELIAIRE, 2020).

Dans les principales zones de production, la pomme de terre, à la fois une culture vivrière et une culture commerciale, est une ressource stratégique pour la sécurité alimentaire et le revenu des exploitants agricoles. Sa production est essentiellement (79%) orientée vers les marchés locaux et une grande partie des exploitations agricoles (25%), qui sont de petite taille, la produisent pour l'alimentation du ménage (BELIERE, 2020).

Malgré l'expansion continue de la culture de pomme de terre, cette culture fait face notamment à de fortes contraintes sanitaires dont la bactériose ou flétrissement bactérien causé par le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* et le mildiou causé par l'oomycète *Phytophthora infestans* (RAHETLAH et al., 2016 ; BELIERE, 2020). *Ralstonia solanacearum* constitue un des principaux facteurs limitant le développement de la pomme de terre, en provoquant le flétrissement soudain des feuilles, le jaunissement des tiges et finalement la mort rapide de la plante. Les tubercules de pomme de terre peuvent également être affectés, entraînant des pertes significatives de rendement (ELPHINSTONE, 2005).

Il est à rappeler que le flétrissement bactérien causé par les différents sous-groupes de *Ralstonia solanacearum* est une principale maladie de cultures d'importance économique notamment la tomate et la pomme de terre dans les pays tropicaux, subtropicaux et quelques pays tempérés chauds. Il constitue un complexe d'espèce qui, est génétiquement structuré en 4 phylotypes, correspondant aux souches originaires de l'Asie (phylotype I), du continent américain (phylotype II), de l'Afrique incluant Madagascar et la Réunion (phylotype III) et de l'Indonésie, Japon et Australie (phylotype IV) (PIOR et GUIDOT et al., 2007 ; FEGAN et PRIOR, 2005).

La bactérie est particulièrement redoutée en raison de sa capacité à survivre dans le sol pendant de longues périodes et à infecter diverses espèces végétales d'environ 400 espèces végétales cultivées et sauvages appartenant à plus de 50 familles botaniques (EPPO, 2005). Parmi les plantes plus sensibles, se trouvent la pomme de terre, le tabac, la tomate, l'aubergine, le piment, le poivron ainsi que l'arachide et les Cucurbitacées (FRENCH et al., 1982 ; PRIOU et ALEY, 2002). Les souches de *R. solanacearum* sont subdivisées en 5 races et sur la base de leurs caractéristiques biochimiques, en 6 biovars (HE et al., 1983).

Le contrôle de ce pathogène demeure toujours limité à des mesures prophylactiques. La désinfection du sol n'est jamais complète en raison, d'une part, de la difficulté de sa mise en œuvre et, d'autre part, de l'induction de souches résistantes (HERVAS et al., 1997 ;

ARUNODHAYAM *et al.*, 2014). Étant donné l'absence de lutte chimique (FRENCH, 1982), les mesures de contrôle généralement utilisées à Madagascar à titre préventif sont reposées principalement sur l'utilisation de variétés supposées résistantes et la rotation des cultures (FRENCH, 1982 ; FAO, 2008). Plusieurs auteurs s'accordent sur la nécessité de sélectionner des cultivars tolérants et résistants pour offrir une alternative de contrôle durable et bon marché (DESLANDES, 1997 ; GRIMSLEY et HANSON, 1997 ; MARCO *et al.*, 2005 ; WANG *et al.*, 1997 ; SIDIKOU, 2002 et SIDIKOU *et al.*, 2005). Cependant, la résistance des variétés de pomme de terre est spécifique aux souches de *Ralstonia solanacearum* et est influencée par les conditions agro-pédo-climatiques. De plus, la rotation des cultures est peu efficace car les souches de *Ralstonia solanacearum* peuvent survivre longtemps dans les profondeurs du sol ou sur les systèmes racinaires de nombreuses mauvaises herbes.

Des résultats prometteurs ont été également observés aussi bien pour les traitements de sol à base d'amendement organique à haute teneur en azote tels que les engrais verts et les composts que pour l'exploitation des potentialités des microorganismes antagonistes (RHOADES, 1964 ; LEMAGA *et al.*, 2001 ; CARDOSO *et al.*, 2006).

La mise au point d'une méthode intégrée combinant la lutte génétique ou la sélection variétale ciblée sur une résistance spécifique aux souches de *Ralstonia solanacearum*, les pratiques culturales raisonnées, l'utilisation des microorganismes antagonistes apparaît ainsi comme alternative impérieuse pour lutter efficacement contre *Ralstonia solanacearum* de la pomme de terre à Madagascar. Ces approches semblent être fiables et respectueuses de l'environnement ainsi que de la santé des consommateurs, en particulier dans le contexte de la culture de la pomme de terre.

II. OBJECTIF ET HYPOTHESES DE LA RECHERCHE

L'objectif général de cette thèse est de développer une approche intégrée de protection agroécologique de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien, causé par le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* afin de garantir la sécurisation durable de l'alimentation et des revenus des ménages agricoles. Pour atteindre cet objectif, la recherche s'est focalisée sur l'exploration de la propriété assainissante du sol de deux espèces de Crotalaires, adaptées localement ainsi que la propriété antagoniste des souches natives d'actinomycètes contre l'action agressive de souches de *Ralstonia solanacearum* afin de réduire l'incidence et la sévérité du flétrissement bactérien et promouvoir une production durable de pomme de terre de haute qualité. Les axes stratégiques de la thèse sont divisés en quatre chapitres. Le Chapitre I

présente la revue de la littérature respectivement sur l'importance économique de la filière pomme de terre à Madagascar, le flétrissement bactérien causé par le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum*, les moyens de lutte adoptés ainsi que les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes ou PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) incluant les actinomycètes et la zone d'étude. Le Chapitre II se rapporte à l'étude réalisée en milieu réel, de façon participative portant sur la bioprotection de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien dû à *Ralstonia solanacearum* basée sur l'utilisation des plantes assainissantes du sol (*Crotalaria grahamiana* et *Crotalaria spectabilis*) dans deux sites du district de Betafo, dans la région Vakinankaratra. Le Chapitre III présente respectivement une étude portant sur l'évaluation de l'activité antagoniste *in-vitro*, *in-vivo* (sous serre) et au champ, en milieu paysan des souches d'actinomycètes natives isolées à partir de sols rhizosphériques de cultures de pomme de terre. Le Chapitre IV présente une expérimentation en milieu réel portant sur une approche agroécologique de contrôle du flétrissement bactérien de la pomme de terre intégrant la combinaison de l'utilisation d'une plante assainissante du sol *Crotalaria grahamiana* et de bioinoculant à base de souches natives d'actinomycètes antagonistes de *Ralstonia solanacearum*.

Les objectifs spécifiques (OS) correspondant aux trois derniers chapitres de la thèse sont :

OS1 : Evaluer le potentiel de biocontrôle des plantes assainissantes du sol (*Crotalaria grahamiana* et *Crotalaria spectabilis*.) contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre dû au complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum*.

OS2 : Evaluer le potentiel de bioprotection de la pomme de terre contre la maladie de flétrissement bactérien des souches d'actinomycètes antagonistes aux souches locales de *Ralstonia solanacearum*.

OS3 : Evaluer en milieu réel l'efficacité de la combinaison de l'utilisation des plantes assainissantes du sol avec l'inoculation du sol par les souches d'actinomycètes antagonistes aux souches de *Ralstonia solanacearum* sur le contrôle du flétrissement bactérien de la pomme de terre.

De ces objectifs, découlent trois principales hypothèses (H) :

H1 : L'intégration des plantes assainissantes du sol dans les systèmes de culture de la pomme de terre permet de réduire l'incidence et la sévérité du flétrissement bactérien tout en augmentant le rendement en tubercules.

H2 : Des souches d'actinomycètes isolées à partir des sols rhizosphériques de la pomme de terre possédant des propriétés antagonistes aux souches de *Ralstonia solanacearum in-vitro* présentent un potentiel de bioprotection *in-vivo* et au champ de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien.

H3 : La combinaison de l'utilisation de la plante assainissante du sol *Crotalaria grahamiana* avec l'inoculation par les souches d'actinomycètes antagonistes à *Ralstonia solanacearum* permet de renforcer la bioprotection de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien tout en augmentant le rendement en tubercules.

**CHAPITRE 1. SYNTHÈSES
BIBLIOGRAPHIQUES**

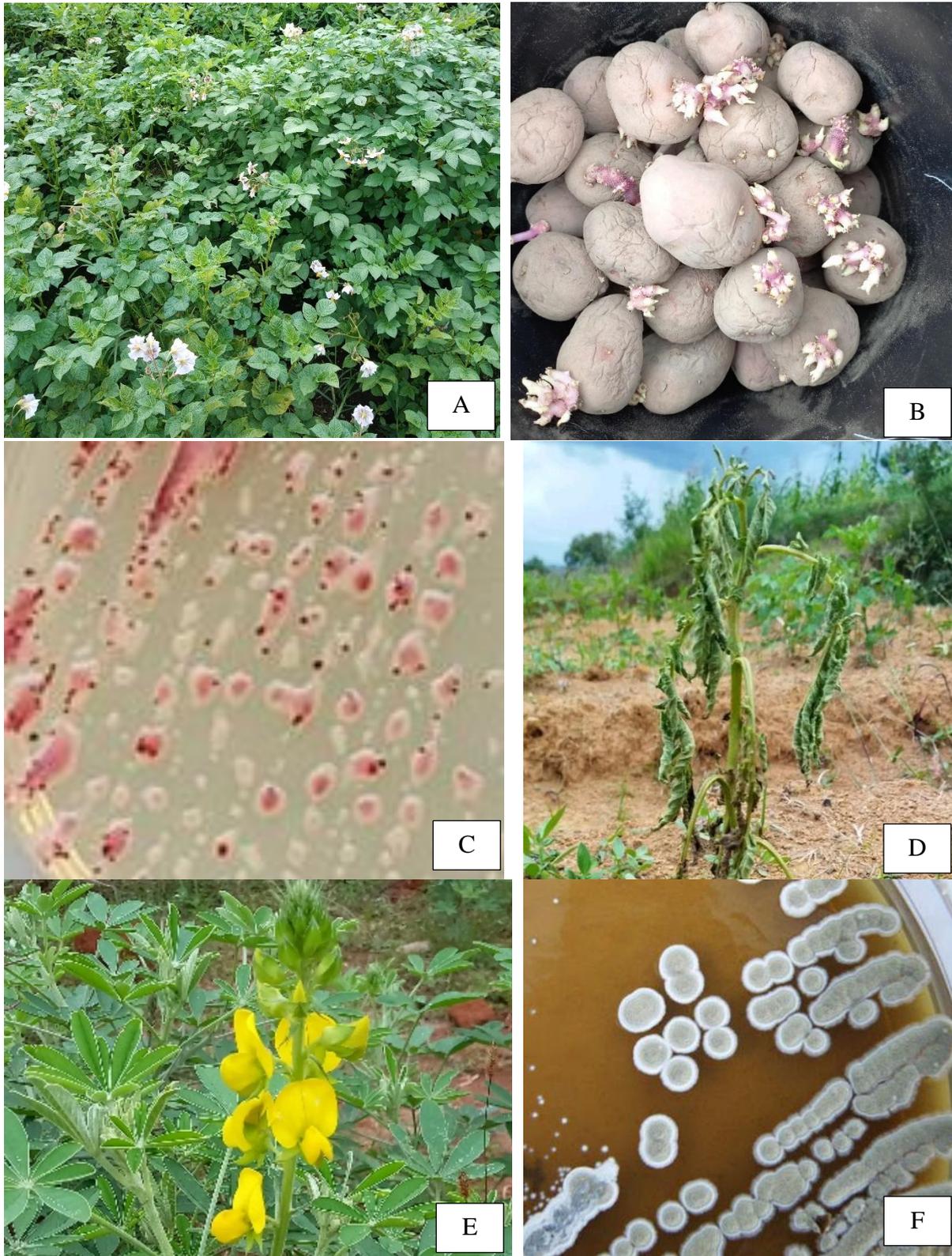


Planche 1: Différents Domaines de la recherche

A : pomme de terre (Source : Auteur), B : semence tubercules de pomme de terre (Source : Auteur), C : Souche de *Ralstonia solanacearum* sur milieu de culture (Source : Auteur), D : Flétrissement du plant causé par *Ralstonia solanacearum* (Source : Auteur), E : Plante assainissante du sol (Source : Auteur), F : Actinomycètes sur milieu de culture (Source : <http://juenvmicrobiotech.co.in/actinobacteria/>)

I. L'IMPORTANCE ECONOMIQUE DE LA PRODUCTION DE LA POMME DE TERRE

La pomme de terre est originaire de la région andine, en Amérique du Sud. Elle est arrivée en Europe au XVI^e siècle et s'est répandue dans le monde entier, elle représente bien plus qu'une source de nourriture car elle vient en quatrième position après le blé, le riz et le maïs qui constituent la base de l'alimentation humaine. (FAOSTAT, 2015).

La pomme de terre revêt une importance capitale dans les stratégies visant à fournir des aliments nutritifs et abordables, tout en renforçant les moyens de subsistance, surtout dans les zones rurales et autres régions où les ressources naturelles telles que les terres arables et l'eau sont limitées, et où les intrants agricoles sont coûteux. Sa polyvalence et sa capacité à prospérer dans des conditions variées en font un choix de culture extrêmement avantageux. En outre, la culture de la pomme de terre est respectueuse du climat, étant donné qu'elle génère peu d'émissions de gaz à effet de serre par rapport à d'autres cultures.

Ces dix dernières années, la production mondiale de pommes de terre a augmenté de 10%, entraînant une croissance de l'emploi et des revenus, mais il reste encore beaucoup à faire pour tirer pleinement parti du potentiel de cette culture dans le cadre de la lutte contre la faim et la malnutrition dans le monde.

La pomme de terre se caractérise par une grande diversité, avec plus de 5 000 variétés améliorées et variétés d'agriculteurs ou variétés locales, dont bon nombre ne se trouvent que sur leur lieu d'origine en Amérique latine. Les 150 espèces sauvages apparentées à la pomme de terre cultivée présentent une grande variation génétique, avec toute une série de particularités qui les distinguent, comme la capacité à s'adapter à différents environnements de production, la résistance aux organismes nuisibles et aux maladies ou encore les différentes caractéristiques des tubercules. Elles constituent un réservoir de caractères héréditaires permettant de poursuivre l'amélioration génétique de cette plante, qui pourra ainsi s'adapter à des conditions environnementales en constante évolution, à de nouveaux biotypes d'organismes nuisibles et de maladies et aux préférences des consommateurs. Environ 2/3 de la population mondiale consomme des pommes de terre comme aliment de base ; près de 50% des pommes de terre sont utilisées comme aliment de base ou légume par les ménages. La pomme de terre est résistante à la sécheresse, au froid et aux terres arides, avec une grande capacité d'adaptation. La base de données FAOSTAT de la FAO, comprend des statistiques sur la production de pommes de terre jusqu'en 2022. Les données révèlent qu'environ 375 millions de tonnes de pommes de terre ont été produites mondialement en 2021, la Chine (95,5 millions de tonnes) et

l'Inde (56 millions de tonnes) étant les principaux producteurs. L'Allemagne a produit 10,6 millions de tonnes, la France 8 millions de tonnes, les Pays-Bas 6,9 millions de tonnes, le Royaume-Uni 4,8 millions de tonnes, la Belgique 3,6 millions de tonnes. La Russie a produit 18,9 millions de tonnes, et l'Ukraine 20,9 millions de tonnes. Les États-Unis ont produit 17,8 millions de tonnes, et le Canada 6,2 millions de tonnes. L'Argentine a produit 2,2 millions de tonnes, et l'Australie 1,1 million de tonnes. L'Égypte a produit 6,1 millions de tonnes, et l'Afrique du Sud 2,5 millions de tonnes.

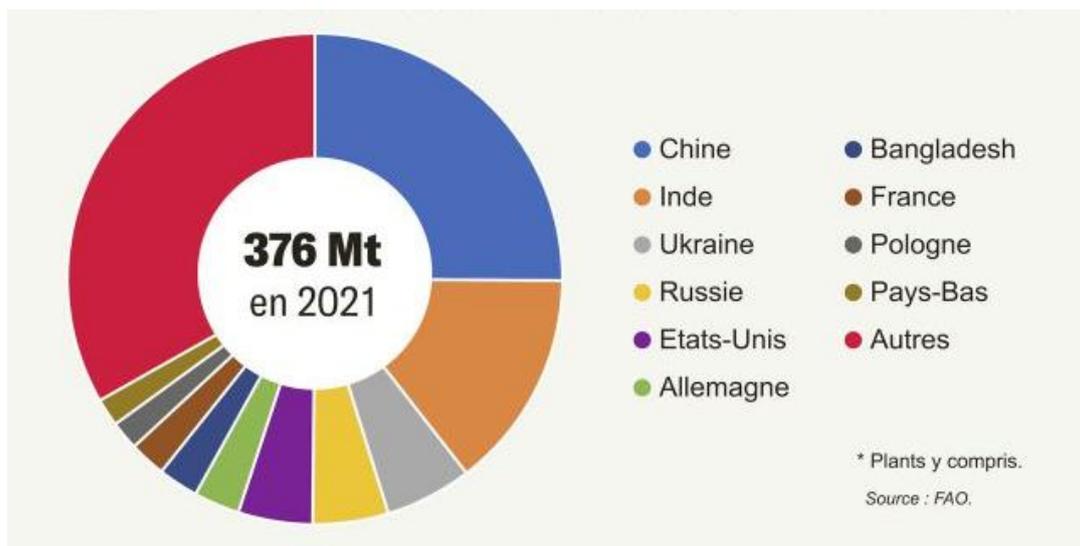


Figure 1: Principaux producteurs mondiaux de pomme de terre

Source : FAO, 2021

A Madagascar, la pomme de terre est cultivée sur trois saisons dont deux en culture pluviale et une en contre saison sur rizière. Ce qui explique la présence de pomme de terre sur les marchés presque toute l'année. La culture de pomme de terre est dans la plupart des cas pratiquée avec de l'engrais minérale ou au moins du fumier biologique ou du compost. En rotation culturale, la pomme de terre s'avère un bon précédent du riz en procurant une augmentation de rendement du riz de l'ordre de 30%. Les rendements varient d'une saison à l'autre et d'une région à l'autre. En 2018, la production totale de pommes de terre à Madagascar est estimée à 650 000 tonnes, provenant de superficies cultivées estimées à 68 000 hectares (BELIAIRE, 2020).

Cependant, la réussite de la production de pommes de terre est souvent entravée par la présence des maladies de cultures dont *Ralstonia solanacearum*, un pathogène redoutable responsable du flétrissement bactérien. Dans cette deuxième partie, nous examinerons de plus près la biologie, le cycle de développement, la caractérisation, l'épidémiologie, l'écologie et les symptômes et dégâts de cette maladie.

II. LE FLETRISSEMENT BACTERIEN DE LA POMME DE TERRE CAUSE PAR *Ralstonia solanacearum*

II.1. Biologie et cycle du développement

La bactérie *Ralstonia solanacearum* affecte plus de 400 espèces végétales cultivées et sauvages (EPPO, 2005). Parmi les plus sensibles, se trouvent la pomme de terre, le tabac, la tomate, l'aubergine, le piment, le poivron ainsi que l'arachide (MARTIN et FRENCH, 1985 ; MURIITHI, 2000 ; PRIOU et ALEY, 2002), les Cucurbitacées (MIAN *et al.*, 2003). La bactérie est Gram négatif, en forme de bacille ou bâtonnet, de 1,5 µm de long sur 0,5 µm de large en moyenne, asporulante, mobile par cils polaires. Elle est aérobic stricte, possédant toujours une oxydase et ne synthétise pas de pigments fluorescents. Elle appartient à la famille des Pseudomonadacées. La plupart des souches oxydent généralement le glucose et accumulent des réserves énergétiques sous forme de granules lipidiques (poly-β-hydroxybutyrate) (HAYWARD, 1990).

II.2. Caractéristiques des races, Biovars et Phylotypes

Ralstonia solanacearum appartient à un groupe taxonomique complexe subdiviser de manière informelle en cinq (5) races sur la base du premier hôte affecté ou en 5 Biovars sur la base du catabolisme de trois sucres et trois alcools de sucre (MACIEL *et al.*, 1997 ; SEAL *et al.*, 1992). Les principaux critères biochimiques utilisés pour identifier l'espèce *Ralstonia solanacearum* sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques différentielles utilisés pour identifier des souches bactériennes appartenant à l'espèce *Ralstonia solanacearum* par des tests biochimiques

Test	Résultat attendu
Production de pigments fluorescents	-
Inclusions de poly-β-hydroxybutyrate	+
Test d'oxydation/fermentation (O/F)	O+/F-
Activité de la catalase	+
Test de l'oxydase de Kovac	+
Réduction du nitrate	+
Utilisation du citrate	+
Croissance à 40 °C	-
Croissance dans du CI à 1 %	+
Croissance dans du CI à 2 %	-
Activité de la dihydrolase d'arginine	-
Liquéfaction de la gélatine	-
Hydrolyse de l'amidon	-
Hydrolyse de l'esculine	-
Production de levane	-

Source : KLEMENT *et al.*, 1990

+ : test positif, - : test négatif, O+ : oxydation positif, F- : Fermentation négative

Il s'agit de déterminer des caractéristiques phénotypiques, systématiquement présentes ou absentes chez *Ralstonia solanacearum*, pour identifier l'espèce *Ralstonia solanacearum* suivant les tests biochimiques de KLEMENT et *al.* (1990) et SCHAAD (2001).

II.2.1. Caractéristiques des phylotypes

La diversité observée au sein du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* est rendue plus perceptible grâce au schéma de classification hiérarchique proposé par FEGAN et PRIOR (2005). Il comprend les phylotypes I, II, III, IV et V caractérisés par le nombre et la position des amplicons (en paire de bases 'pb') sur le gel de migration des ADN des souches en question (PRIOR, 2003 ; FEGAN et PRIOR, 2005). Le travail de taxonomie réalisé par FEGAN et PRIOR (2005), fournit une nomenclature correcte des sous-groupes de *Ralstonia solanacearum* afin d'aider les sélectionneurs, les pathologistes et inspecteurs phytosanitaires à classer des souches selon leur épidémiologie, leur 38 pathogénicité, l'étendue de la gamme de leurs hôtes et de leur provenance géographique. La technique permettant de différencier les phylotypes est la réaction en chaîne par polymérase appelée PCR multiplexe qui utilise 4 amorces de tête, dont une spécifique de chacun des phylotypes ainsi qu'une amorce finale, spécifique de l'espèce *Ralstonia solanacearum*. Les caractéristiques des amorces sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2: Amorces spécifiques utilisées en PCR-multiplexe pour le diagnostic de l'espèce *Ralstonia solanacearum* du phylotype d'appartenance

Amorce	Séquence (5' 3')	Phylotype	Taille de l'amplicon
Nmult : 21 :1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	I (Asiaticum)	144 pb
Nmult : 21 :2F	AAGTTATGGACGGTGGGAAGTC	II (Americanum)	372 pb
Nmult : 23 :AF	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	III (Africain)	91 pb
Nmult : 22 :InF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	IV (Tropical)	213 pb
Nmult : 22 :RR	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA	Tout phylotype	Non applicable (amorce reverse)
759 R	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	R.	280 pb (marqueur interne)
760 F	GTCGCCGTCAGCAATGCGGAA TG		

Source : FEGAN et PRIOR, 2005

Le phylotype I est équivalent à la division 1 de COOK et *al.* (1989). Il comprend toutes les souches appartenant aux biovars 3, 4 et 5 isolées pour la première fois des régions asiatiques. Le phylotype II équivaut à la division 2 et est constitué des souches appartenant aux biovars 1, 2 et 2T initialement isolées d'Amérique. Le phylotype II inclut aussi, la race 3 de *Ralstonia*

solanacearum, pathogène de la pomme de terre et qui est disséminée à travers le monde, ainsi que la race 2 pathogène du bananier plantain. Le phylotype III se compose de souches originaires d’Afrique et des îles environnantes. Il s’agit des souches appartenant aux biovars 1 et 2T. Le phylotype IV est constitué de souches indonésiennes appartenant aux biovars 1, 2 et 2T de *Ralstonia solanacearum*. Certaines de ces souches ont aussi récemment été retrouvées en Australie et au Japon. *Pseudomonas syzygii* et la souche responsable de la maladie de sang de la banane (BDB) sont considérées comme des souches apparentées de celles du phylotype IV. 39 La planche 4 présente les positions des bandes de migration des quatre phylotypes (I, II, III, IV) de *Ralstonia solanacearum* ainsi que les souches MLG24, MLG25 et MLG28 spécifiques des bananiers, sur le gel d’Agarose d’après PRIOR (2003) ; FEGAN et PRIOR (2005).

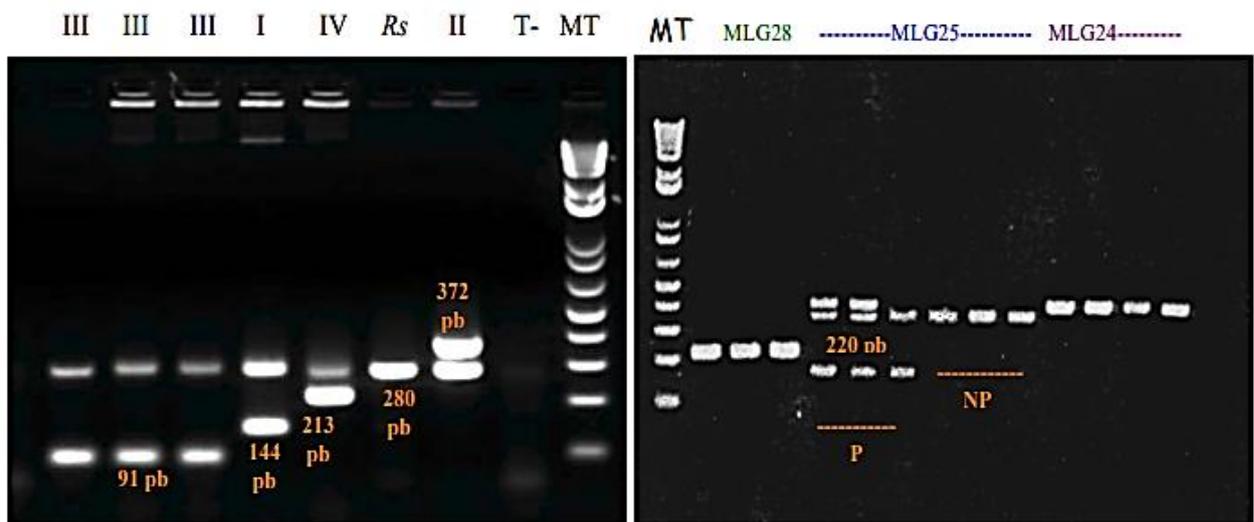


Figure 2: Gels caractéristiques de PCR multiplex des quatre principaux groupes génétiques décrits chez *Ralstonia solanacearum*, ainsi que des groupes RFLP 24, 25 et 28.

Source : FEGAN et PRIOR, 2005

Sur le gel de gauche (Figure 2), la ligne continue représente la bande spécifique de l’espèce *Ralstonia solanacearum* et qui se situe à 280 pb. Les phylotypes I, II, III, IV se situent respectivement à 144 pb, 372 pb, 91 pb et 213 pb. Sur le gel de droite, l’amplicon de 220 pb caractérise les souches MLG 25 pathogènes du bananier (P). Les souches MLG 25 ne fournissant pas ce produit PCR sont considérées non pathogènes du bananier (NPB). Ces dernières ont été récemment isolées sur anthurium et melon flétris à la Martinique (PRIOR, 2003). Les analyses moléculaires de réaction en chaîne par polymérase utilisant la technique de l’élément palindromique extragénique répété ou Repetitive Extragenic Palindromic Element (REP-PCR) et la technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou Restricted Fragment Length Polymorphism (PFLP-PCR) classent les souches en trois groupes

ayant 70% de similitudes. Les souches de gingembre sont réparties en groupes I et II génétiquement distincts ; celles de pomme de terre sont du groupe III. Il a aussi été observé 100% de similitudes malgré la diversité des provenances des souches de gingembre. Il existe donc une faible diversité génétique entre les souches à cause de l'origine clonale du pathogène qui est distribué par les rhizomes à travers les localités et les saisons dans une même localité. En plus de l'analyse des effecteurs de type III qui permet de caractériser des souches et analyser leur pathogénie (Figure 3).

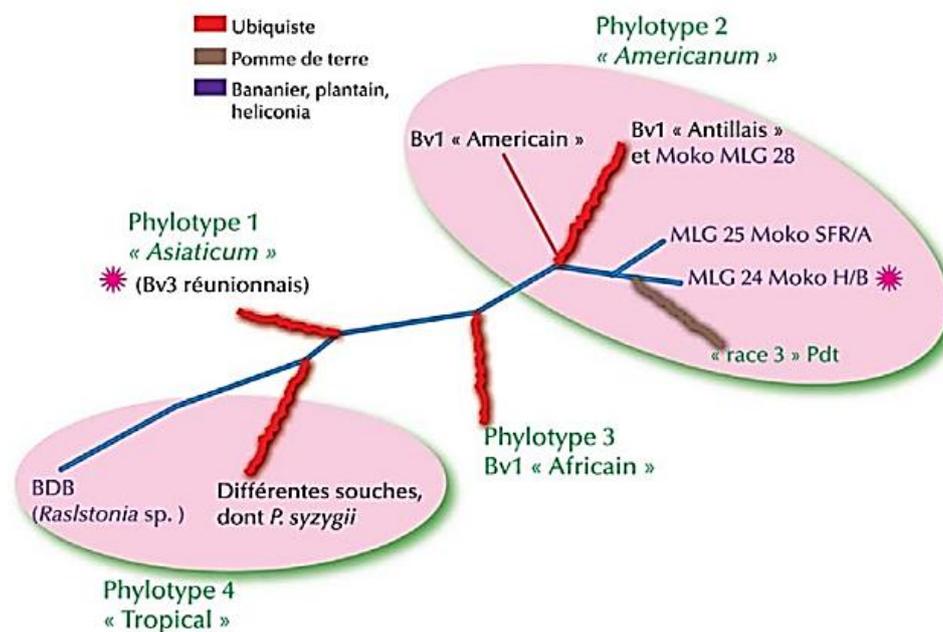


Figure 3: Diversité génétique et phylogénie chez le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*, basées sur le polymorphisme de séquence du gène de l'endoglucanase

Source : FEGAN et PRIOR, 2005

II.2.2. Caractéristiques des Biovars

Le complexe *Ralstonia solanacearum* comprend cinq (5) biovars sur la base du catabolisme de trois disaccharides notamment, le Cellobiose, le Lactose et le Maltose et trois alcools de sucre à savoir le Dulcitol, le Mannitol et le Sorbitol (MACIEL et al., 1997 ; SEAL et al., 1992). HAYWARD (1964) a défini les quatre premiers biovars. Le biovar 1 n'utilise pas les disaccharides et n'oxyde pas les alcools de sucres ; Le biovar 2 utilise les disaccharides mais n'oxyde pas les alcools de sucres ; Le biovar 3 utilise les disaccharides et oxyde les alcools de sucres ; Le biovar 4 n'utilise pas les disaccharides mais oxyde les alcools de sucres. HE et al., 1983 ont mis en évidence le biovar 5 qui se caractérise par l'utilisation des disaccharides,

l'oxydation du Mannitol mais pas celui du Dulcitol ni du Sorbitol. Le tableau 3 présente les caractéristiques des 5 biovars suivant les réactions du test de HAYWARD en 1964.

Tableau 3: Différenciation des biovars de *Ralstonia solanacearum* à l'aide de tests biochimiques basés sur l'aptitude à l'utilisation de 6 hydrates de carbone

Produits testés	Biovars				
	1	2	3	4	5
Disaccharides					
Cellulose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	-	+
Alcools de sucre					
Mannitol	-	-	+	+	-
Sorbitol	-	-	+	+	+
Dulcitol	-	-	+	+	-

Source : HAYWARD, 1964

II.2.3. Caractéristiques différentielles des races

Le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* peut aussi être subdivisé en races sur la base du spectre d'hôtes affectés. BUDDENHAGEN et *al.* (1962) ont initialement signalé la présence de trois races. Plus tard, ALVAREZ (2005) ; KUMAR et *al.*(2004), MACIEL et *al.*(1997); MARTIN et FRENCH (1985) ; MURIITHI (2000) ; PRIOU et ALEY (2002) se sont tous accordés sur l'existence de cinq (5) races dont la race 3 (biovar 2A) est inféodée à la pomme de terre (*Solanum tuberosum*).

- **La race 1** : affecte une large gamme de solanacées incluant la pomme de terre, plusieurs adventices. Certaines souches affectent le bananier diploïde, le tabac, la tomate, la pomme de terre, l'aubergine, les bananiers diploïdes et de nombreuses autres cultures comme l'arachide et le gingembre ainsi que des Solanacées adventices. Cette race présente un optimum de croissance à température élevée (35-37°C). La race 1 de *Ralstonia solanacearum* est considérée comme endémique. Elle se maintient bien dans le sol et dans la rhizosphère de nombreuses plantes ne présentant pas de symptômes, y compris les mauvaises herbes (HAYWARD, 1991 ; LEROUX, 2003).
- **La race 2** est inféodée aux bananiers triploïdes (agent causal de la Moko Disease) et quelques espèces de *Heliconia*. Elle présente une température optimale de croissance élevée (35-37°C).
- **La race 3** affecte principalement la pomme de terre et occasionnellement la tomate. Elle est sans grande virulence sur les autres cultures de Solanées et présentant un optimum de croissance à une température plus faible (27°C), en zones de hautes altitudes à climat froid.

Les souches de la race 3 possèdent un spectre d'hôte plutôt étroit, la pomme de terre et la tomate. Elles persistent moins bien dans le sol et peuvent disparaître à la suite de pratiques phytosanitaires et culturales adaptées. Chez la pomme de terre, les tubercules peuvent être contaminés de façon externe et surtout interne (forme latente) et transmettent le germe à un sol indemne. Cette caractéristique confère à la race 3, le remarquable pouvoir 42 de dissémination notamment sur de longues distances par le jeu des échanges commerciaux de tubercules (LEROUX, 2003).

- **La race 4** affecte le Gingembre (*Zingiber officinale*) en Asie.
- **La race 5** est principalement inféodée au mûrier (*Morus spp.*) en Chine.

Il n'existe pas de corrélation stricte entre les races et biovars, excepté pour la race 3 correspondant au biovar 2, la race 5 au biovar 5, tous deux inféodés au Mûrier en Chine (HAYWARD, 1983).

II.2.4. Répartition géographique des souches

Les analyses moléculaires utilisant la technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP-PCR) ont permis la répartition des souches en groupes génétiquement homogènes ou division ayant des préférences géographiques (Tableau 4).

Tableau 4: Répartition des races, biovars et divisions des souches de *Ralstonia solanacearum* par rapport à la gamme d'hôtes et la région géographique

Race	Hôte (s)	Région	Biovar (s)	Division
1	Cosmopolite	Asie, Australie	3,4	I
		Amériques	1	II
2	Bananier Autres <i>Musa spp.</i>	Caraïbes, Brésil, Philippines	1	II
3	Pomme de terre, Tomate	Monde entier	2	II
4	Gingembre	Asie	3,4	I
5	Mûrier	Chine	5	I

Source : SCHAAD et *al.*, 2001

Les races et biovars ont été répartis en deux groupes génétiques ou divisions, en fonction de l'analyse par méthode génétique Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) par COOK et SEQUEIRA (1994). Les souches asiatiques de la race 1 (biovars 3, 4, 5) sont rassemblées en un groupe, les souches américaines de la race 1 (biovar 1), la race 2 (biovar 1)

et la race 3 (biovar 2) dans un autre. Les quatre phylotypes (I, II, III et IV) constituent la structure génétique du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (REMENANT et al., 2010). Ils représentent par ailleurs, les principales origines des biovars de l'espèce. La figure 3 illustre parfaitement les origines Asiatique, Américaine, Africaine et Tropicale des principaux biovars et races actuellement connus dans le monde (Figure 3).

II.3. Ecologie

Selon MURIITHI (2000), *Ralstonia solanacearum* survit en régions froides notamment en zones d'altitude sous climat tropical. La race 3 (biovar 2) d'ordinaire inféodée aux climats chauds est en train de s'adapter au climat frais d'Europe. Le biovar 2 est aussi présent dans les cours d'eau européens (Espagne, Angleterre et Pays-Bas), à des concentrations faibles variant de 10 à 80 cfu/ml, aux températures comprises entre 9 et 20 °C selon CARUSO et al. (2004). D'après ELPHINSTONE et al. (2006), la souche de phylotype II, séquévar 1 (race 3, biovar 2) de *Ralstonia solanacearum* est capable de causer des symptômes de pourriture brune sur des tubercules et un flétrissement sur des plants de pomme de terre à travers le monde. L'homogénéité de cette souche reflète la faible pression de sélection dont elle fut l'objet au sein de son habitat traditionnel caractérisé par le mode de propagation végétatif de la plante ainsi que la dispersion relativement récente de la pomme de terre à partir de l'Amérique du Sud, suite aux échanges commerciaux mondiaux.

II.4. Epidémiologie

La survie de *Ralstonia solanacearum* dans les sols est très controversée. En effet, GRANADA et SEQUEIRA (1983) ont observé que *Ralstonia solanacearum* ne survivait pas plus de 24 semaines dans un mélange de sol plus du sable. Il semblerait que la bactérie ne survit pas dans le sol lui-même, mais dans les racines de plantes hôtes ou dans la rhizosphère des plantes non-hôtes. Selon HAYWARD (1991) certains sols peuvent être réceptifs à *Ralstonia solanacearum*, d'autres en revanche peuvent être suppressifs de par leurs caractéristiques physico-chimiques. La survie à long terme de différentes souches de *Ralstonia solanacearum* est en étroite corrélation avec leur habileté à infecter les racines d'une espèce végétale donnée (GRANADA et SEQUEIRA, 1981b). L'humidité et la température du sol sont aussi des facteurs déterminant dans la survie du germe dans le sol. BUDDENHAGEN et KELMAN (1964) ont constaté que la bactérie survit mieux dans un sol humide et bien drainé que dans un sol sec et inondé. Selon les mêmes auteurs, l'optimum de température de *Ralstonia solanacearum* se situe entre 30 et

35°C, sauf pour les souches de la race 3 (biovar 2) pour lesquelles l'optimum se trouve aux environs de 23°C.

L'inoculum est disséminé de différentes manières, notamment par l'utilisation de tubercules infectés comme semences, la culture sur sol contenant des débris végétaux non décomposés (Figure 4). Le système racinaire et la rhizosphère de plusieurs plantes hôtes cultivées ou non, ainsi que l'eau d'irrigation contaminée sont aussi des moyens de dissémination (PRIOU et ALEY, 2002).

En Europe, la plupart des épidémies naissent à partir des plantes aquatiques telles l'espèce sauvage de pomme de terre ou Morelle douce-amère et l'adventice *Urtica dioica* toutes deux reconnues comme réservoirs de la bactérie (CARUSO et al., 2004).

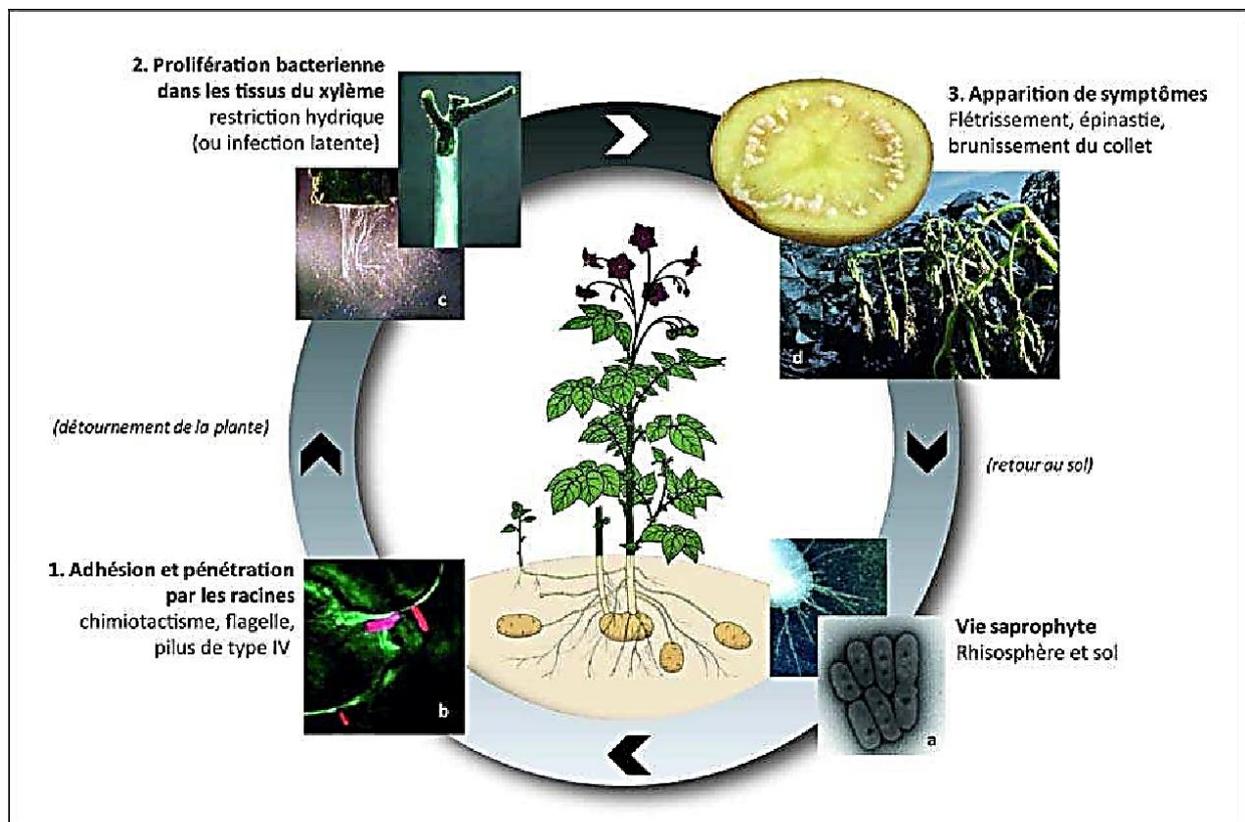


Figure 4: Cycle de développement de *Ralstonia solanacearum*

Source : <https://www.semanticscholar.org/paper/Description-des-%C3%A9cotypes-du-phyloTYPE-II->

Il est en outre observé une facile pénétration des bactéries dans les racines des plantes grâce aux blessures causées par les outils, les nématodes et les insectes du sol (PRIOU et ALEY, 2002). Mais CELLIER et PRIOR (2010) ont observé que chez la tomate et l'aubergine, l'agressivité des souches des phylotypes I et III dépendait essentiellement de la température.

LEROUX-NIO *et al.* (2008) ont travaillé sur plusieurs générations successives de tubercules de pomme de terre, ils ont démontré que des épidémies de pourriture brune pouvaient avoir pour origine une contamination initiée plusieurs années auparavant (Figure 4).

Le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sur membrane nitrocellulosique NCMEELISA est une bonne méthode de contrôle épidémiologique notamment en ce qui concerne la survie et la dispersion du pathogène (CARUSO *et al.*, 2004 ; PRIOU et ALEY, 2002 ; SIDIKOU, 2002 ; SIDIKOU *et al.*, 2005). Il s'agit de techniques immunologiques mises en œuvre pour l'identification et la détection des bactéries phytopathogènes.

II.5. Symptômes et dégâts de la maladie

Les symptômes de la maladie peuvent être observés aussi bien sur les parties aériennes que souterraines de la pomme de terre.

Sur les parties aériennes, les symptômes se caractérisent par un flétrissement, des taches, un jaunissement du feuillage. Le flétrissement est rapide et un exsudat laiteux est observable au niveau des vaisseaux de la tige (MARTIN et FRENCH, 1985). Selon PRIOU et ALEY (2002), le flétrissement peut être unilatéral ou total, similaire aux symptômes causés par un manque d'eau. Les faisceaux vasculaires apparaissent bruns lorsque l'on enlève le cortex de la tige. En cas de flétrissement soudain, il n'y a pas de jaunissement (Figure 5).

Sur tubercules, en cas d'infection sévère, on observe des exsudats bactériens au niveau des yeux avec adhérences de sol (Figure 6). Une coupe transversale montre un brunissement de la région vasculaire. Le tubercule entier peut être désagrégé (MARTIN et FRENCH, 1985 ; PRIOU et ALEY, 2002).

II.6. Diagnostic de la maladie

Au champ, il se réalise par la recherche d'exsudats au niveau de la région vascularisée de la tige ou des tubercules des plants montrant des symptômes typiques de flétrissement bactérien. Un nuage de cellules bactériennes peut être observé en trempant un bout de tige ou un morceau de tubercule issus d'un plant infecté dans un vers d'eau claire (PRIOU et ALEY, 2002). Selon MARTIN et FRENCH (1985), une autre méthode rapide consisterait à placer 2 ou 3 gouttes de KOH 3% (Hydroxyde de potassium) sur une lame, transférer un peu d'exsudat bactérien à l'aide d'un cure dent en bois puis mélanger par des mouvements circulaires rapides pendant 5 à 15 secondes. La présence de la maladie est marquée par la formation d'un fil laiteux.

Il est important de détecter les infections latentes au niveau des tubercules qui seront utilisés comme semences, on y parvient par la PCR (LE PENNEC, 1991).

Selon MAAS GEESTERANUS et VRUGGINK (1990), plusieurs inspections doivent être effectuées au cours d'un même cycle végétatif car un petit nombre de plants infectés associés à une longue période d'incubation peuvent conduire à une sérieuse infestation du matériel de propagation.



Figure 5: Plant de la pomme de terre flétri au Champs
Source : Auteur



Figure 6: Tubercule de pomme de terre à exsudats bactériens
Source : Auteur

Ayant examiné en détail les caractéristiques et les effets dévastateurs de *Ralstonia solanacearum*, nous nous tournerons maintenant vers les divers moyens de lutte visant à contrôler la propagation de cette maladie et à protéger les cultures de la pomme de terre.

III. LUTTE CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN DE LA POMME DE TERRE

Le contrôle du flétrissement bactérien représente un défi de taille, nécessitant une approche multifacette intégrant plusieurs techniques. Ces stratégies sont regroupées dans le cadre d'un programme de lutte intégrée, comprenant notamment la mise en œuvre de mesures préventives telles que la gestion du sol et l'apport de matières organiques, la pratique de la solarisation, l'utilisation de variétés de pommes de terre résistantes génétiquement, ainsi que la mise en place de rotations culturales et d'associations de cultures. De plus, l'emploi d'agents biologiques, d'inducteurs de résistance et de plantes non hôtes ou antagonistes des parasites identifiés s'avère être des approches prometteuses pour contrôler cette maladie.

III.1. Lutte préventive

La lutte contre cette maladie présente dans les sols dépend largement d'une bonne gestion du sol. Cela comprend des pratiques telles que l'incorporation de compost ou de fumier dans le sol, le contrôle du pH du sol en utilisant de la chaux pour élever le pH à un niveau compris entre 6 et 7. Il est également important d'éviter l'irrigation par inondation ou par sillons, ainsi que de lutter contre les nématodes à galles, car ils peuvent aggraver cette maladie. Il est crucial de prévenir la propagation de la maladie en évitant le transport d'outils, d'équipements ou d'eau d'un sol infecté à un sol non infecté. Changer la date de plantation peut également être nécessaire pour éviter des températures élevées du sol (>24°C) et une trop grande humidité. L'utilisation de variétés tolérantes ou résistantes, la greffe sur un porte-greffe résistant et l'utilisation de tubercules et de graines provenant de cultures exemptées de maladies au cours des deux dernières saisons sont des pratiques recommandées. Il est essentiel d'éviter d'endommager les racines, car des racines endommagées facilitent l'infection par des pathogènes. Éviter la rotation avec d'autres plantes hôtes telles que les solanacées, l'arachide ou le tabac, et enlever les plantes hôtes de la maladie telles que les mauvaises herbes solanacées et les repousses de tomates/pommes de terre sont également des mesures importantes à prendre pour contrôler la propagation de la maladie, la désinfection systématique du matériel (outils, chaussures, matériel d'irrigation) doivent être impérativement adoptées pour diminuer le potentiel infectieux du sol. (CABI, 2016).

Un inconvénient de cette lutte contre la maladie du flétrissement bactérien réside dans le fait qu'elle nécessite une gestion intensive du sol et une surveillance constante pour maintenir les conditions optimales et prévenir l'infection. L'utilisation de compost ou de fumier, peuvent être coûteuses en main-d'œuvre et en ressources. De plus, le contrôle du pH du sol peut nécessiter des ajustements fréquents et l'application régulière de chaux, ce qui peut être contraignant pour les agriculteurs, surtout dans les zones où les ressources sont limitées. En outre, bien que ces mesures contribuent à réduire les risques d'infection, elles ne garantissent pas une protection totale contre la maladie, surtout dans les conditions environnementales favorables à la propagation de *Ralstonia solanacearum*.

III.2. Lutte génétique

La plupart des flétrissements causés par les bactéries ne peut être contrôlée par des pesticides chimiques. Plusieurs auteurs s'accordent sur la nécessité de sélectionner des cultivars résistants pour offrir une alternative de contrôle durable et bon marché (DESLANDES et al., 1997 ;

GRIMSLEY et HANSON, 1997 ; MARCO et al., 2005 ; WANG et al., 1997b. Selon SIDIKOU, 2002 et SIDIKOU et al., 2005).

L'inconvénient de cette technique est l'instabilité de la variété ainsi il est crucial de maintenir cette résistance au fil du temps. Les pathogènes ont la capacité de s'adapter et de contourner la résistance des plantes, ce qui nécessite une surveillance continue et éventuellement des efforts pour introduire de nouvelles sources de résistance. La concentration excessive sur un petit nombre de variétés résistantes peut réduire la diversité génétique des cultures de pommes de terre. Cela rendrait les cultures plus vulnérables aux maladies et aux ravageurs qui pourraient évoluer pour contourner la résistance génétique.

III.3. Lutte mécanique

Il s'agit d'enlever et détruire les plantes infectées ainsi que les résidus de récolte. Cette méthode consiste à enlever complètement les plantes infectées du champ. Cela implique de déraciner les plantes en incluant leurs racines et la terre qui les entoure. Les plantes infectées sont ensuite transportées hors du champ dans un sac en plastique fermé pour éviter la propagation de la maladie. Ces plantes peuvent être brûlées ou enterrées à une profondeur d'au moins un mètre loin du champ pour empêcher la propagation de la maladie.

Une autre méthode est l'inondation le sol, elle consiste à inonder le sol pour une période prolongée, généralement pendant au moins six mois. Cela peut aider à réduire la population de pathogènes dans le sol. (CABI, 2016).

III.4. Lutte agronomique

L'irrigation, la rotation culturale, l'association culturale, et la fertilisation comme méthodes permettant de réduire les maladies bactériennes (OKON.,1990).

L'aspersion et la submersion sont des techniques d'irrigation favorisant la dispersion des bactéries d'un plant à un autre. L'effet de l'irrigation sur les maladies est probablement variable pour les parties aériennes (tiges et feuilles) que celles souterraines. Le maintien d'une période de sécheresse du sol et de la rhizosphère de 20 jours après 26 semaines (8 mois) de culture, réduit les populations bactériennes à un niveau non infectieux.

La survie à long terme de *R. solanacearum* peut dépendre de l'infection d'une grande variété de plants supposés non hôtes tels que le maïs et la canne à sucre. L'abondance des populations de *R. solanacearum* pathogènes dans la rhizosphère des plantes non hôtes, rend leur contrôle

très fastidieux car, une faible concentration bactérienne de l'ordre de 10^2 CFU/g de sol peut potentiellement déclencher une épidémie si les conditions environnementales sont favorables.

Dans le domaine de la fertilisation minérale, il faut noter que l'excès d'azote favorise une infection à *Ralstonia solanacearum* par l'accroissement de la transpiration et de l'ouverture des stomates alors que le potassium accroît la résistance des plantes aux maladies bactériennes. L'influence du phosphore est plutôt controversée ou variable. En fait, il ne s'agit pas de la présence seule d'un nutriment, mais plutôt de sa proportion relative.

La rotation culturale permet de réduire efficacement les sources et la quantité d'inoculum. Toutefois, la forte dépendance économique des petits maraîchers africains rend irréaliste la pratique des longues rotations (GILDEMACHER et *al.*, 2006). Parmi les plantes en association ou en rotation de culture, il existe les plante assainissante du sol ou les plantes de services.

III.4.1. Plantes de services à potentiel assainissant

Les plantes assainissantes regroupent une grande diversité de familles botaniques pouvant être employées pour optimiser la fertilisation (engrais verts), la structure et la conservation du sol (plantes de couverture), la diversité microbienne et la gestion des bioagresseurs (plantes pièges ou plantes assainissantes vis à vis de ravageurs, parasites et adventices). Si de nombreux travaux sont déjà rapportés dans la littérature sur l'utilisation des Plante de service dans la lutte contre les nématodes, on trouve moins de données sur la lutte contre les microorganismes pathogènes telluriques. L'utilisation de plante de service en cultures associées, mulch ou biofumigation dans le cadre d'une lutte agroécologique contre *R. solanacearum* est étudiée depuis plusieurs années en Martinique par le CIRAD avec des résultats prometteurs. On distingue deux voies d'action des plantes de service dans la lutte contre les bioagresseurs telluriques : directes et indirectes.

Les plantes de services sont les espèces implantées avant ou pendant une culture principale, dans la parcelle ou à proximité et qui sont destinées à fournir un ou plusieurs avantages (services écosystémiques) à la culture en place ou aux suivantes dans la rotation. Au-delà de réguler les maladies, les plantes de services peuvent également réguler d'autres bioagresseurs (adventices et ravageurs), améliorer la structure et la stabilité du sol, boucler le cycle des éléments nutritifs ou réguler le climat (stockage du carbone). Eventuellement, la biomasse produite peut être utilisée pour la fourniture d'aliments ou de combustibles. Elles n'ont toutefois pas une finalité productive, les services d'approvisionnement n'y sont pas recherchés

en priorité. La mise en place de plantes de services pour lutter contre les organismes phytopathogènes d'origine telluriques et les viroses transmises par les nématodes repose sur plusieurs mécanismes dont l'allélopathie et la Biofumigation.

➤ **Allélopathie**

L'exsudation racinaire de certaines espèces de plantes dans un couvert d'interculture permet de limiter les maladies transmises par les nématodes du sol, en sécrétant des composés répulsifs, inhibiteurs ou biocides. L'action sur le microbiote racinaire est permise par l'activité biologique du sol, elle-même favorisée par les couverts. Cela permet, par la présence de champignons utiles de type décomposeurs ou mycorhiziens voire de champignons antagonistes, de lutter contre les microorganismes pathogènes.

➤ **Biofumigation**

C'est une technique culturale biologique permettant de lutter contre les maladies du sol avec un couvert d'interculture qui a la capacité de libérer une grande quantité de composés biocides lors de sa destruction. L'effet de dilution ou de barrière perturbe les flux des spores.

III.4.1.1. Crotalaires

Les crotalaires sont des plantes appartenant à la famille des Fabaceae ou Fabacées, appelées également Légumineuses. Cette famille regroupe 650 genres et 18 000 espèces réparties dans monde entier. Leurs représentants peuvent être des plantes herbacées, des arbustes, des lianes ou de grands arbres. La présence des nodules fixateurs d'azote atmosphérique sur leurs racines leur permettent d'être classé dans la sous-famille des Faboideae anciennement appelés Papilionacées.

Les crotalaires sont des plantes dicotylédones, vivaces ou annuelles, érigées, buissonnantes souvent utilisés en tant qu'engrais vert. Elles sont originaires d'Inde et très répandues en Afrique. Madagascar en a jusqu'à une quarantaine espèces de crotalaires dont plus de la moitié sont endémiques. Elles sont distribuées de façon hétérogène dans diverses zones géographiques dans la grande Île. Les crotalaires sont des plantes photopériodiques du fait que leur cycle de vie est calé sur la longueur du jour. Leur intervalle de floraison varie entre 65 à 120 jours. Le système racinaire profond difficile à arracher manuellement. Il est constitué d'un pivot très puissante et plutôt court muni de très nombreuses racines latérales. Ces racines comportent une importante quantités de nodules actifs en forme de coraux allant jusqu'à 2,5 centimètres de diamètre.

Parmi les Légumineuses utilisables comme engrais vert, les crotalaires occupent une place importante dans l'agriculture tropicale. Elles ont donc été l'objet d'études de la part des services agricoles et de recherches agronomiques. Dans l'agriculture tropicale, les crotalaires sont parmi les Légumineuses les plus utilisées en tant qu'engrais vert. A Madagascar, une étude menée à Moramanga a montré que les crotalaires sont largement employées par les agriculteurs en tant qu'engrais vert, à savoir *C. retusa*, *C. sericea*, *C. juncea* et *C. fulva* (PELTIER, 1959). Plusieurs études ont montré aussi que les crotalaires produisent des métabolites secondaires appelées « alcaloïdes ». Ce produit leur confère la propriété « nématocides ». De ce fait, les crotalaires sont dotées de caractère répulsif des nématodes nématofuges et très connues dans la lutte contre l'attaque de ces bioagresseurs. Différentes espèces de crotalaires agissent sur les vers *Meloidogyne sp* en rendant les femelles stériles et provoque ainsi la suppression de la génération suivante.

Les crotalaires ont aussi la capacité d'améliorer la structure du sol et occupe un rôle non négligeable pour la production d'azote organique. Le système racinaire dense facilite le drainage et permet la filtration et l'infiltration jusqu'au aux horizons supérieurs du profil. En tant que légumineuse, les crotalaires sont capables de filtrer l'azote atmosphérique (N₂). Ce mécanisme se réalise à travers la symbiose des racines avec les rhizobiums du sol. Après la dégradation du couvert (engrais vert), l'azote capté par la plante sera minéralisé par les microorganismes et sera de nouveau restitué et disponible.

Les crotalaires sont des plantes antiérosives à croissance rapide et dont les semences ont des fortes capacités de germination et de levée. Grace à leur port érigé, les crotalaires sont capables de dominer rapidement la strate herbacée. Après deux mois de plantation, ils fournissent un ombrage selon leur densité, qui inhibe le développement de la majorité des adventices. Ce mécanisme de contrôle des mauvaises herbes est dû à la concurrence aux ressources surtout lumineuse. Leur couvert permet également de prévenir les effets des fortes pluies sur les sols.

III.5. Lutte biologique

Au cours de ces dernières années, il y a eu relativement peu d'études par rapport à l'utilisation de bactéries dans la lutte contre les maladies bactériennes. RANDRIANANGALY (2003), a montré que les bactéries *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* isolées à partir de bouillie bouse bovine sont efficace contre la maladie *Ralstonia solanacearum* de géranium par la production de l'antibiotique 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), ainsi que la production de sidérophores.

Selon SCHROTH et BAHME (1990), dans la nature, les microorganismes sont en interaction continuellement, excepté lorsqu'ils sont en état de dormance. Certains sont antagonistes à d'autres dans des conditions environnementales particulières. Une bonne utilisation du contrôle biologique nécessite la compréhension de l'écologie des antagonistes et les mécanismes par lesquels ils régulent les pathogènes (antibiose, prédation, parasitisme et compétition pour des sources de nutriments). Pour KEMPE et SEQUEIRA (1983), une résistance peut se perdre sous certaines conditions environnementales, notamment des températures supérieures à 30°C, c'est pourquoi elle est couplée à la lutte biologique. La bonne technique consiste à introduire l'antagoniste bactérien directement dans le système vasculaire des tubercules à protéger avant leur exposition à l'agent pathogène. En effet, il a été noté que l'application de bactéries antagonistes aux racines ou aux tubercules de semences, est souvent inhibée par des conditions adverses du sol, notamment la présence d'autres microorganismes. Pour lutter contre une souche virulente de *Ralstonia solanacearum*, ces deux auteurs ont essayé d'induire une résistance à quelques cultivars de pomme de terre en utilisant comme antagonistes, une souche avirulente de *Ralstonia*, une souche pathogène mais incompatible à la pomme de terre ainsi qu'une souche saprophyte.

Des recherches dans le cadre de projet PARURE à Madagascar en 2013, les chercheurs ont révélé que 4 souches d'actinomycètes endophytes, six souches d'actinomycètes telluriques et deux souches de *Pseudomonas fluorescens* isolés sur les cultures de pomme de terre en contre-saison sont actives sur 24 isolats de *R. solanacearum*.

IV. PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA et ACTINOMYCETES

Le développement des végétaux est étroitement lié au fonctionnement du sol. Il leur sert à la fois d'ancrage (racines) et de réserve d'alimentation en eau, en oxygène et en éléments nutritifs. Les micro-organismes jouent un rôle important dans l'aptitude du sol à répondre aux besoins des plantes.

Les microorganismes sont des organismes vivants qui ne peuvent être observés qu'à l'aide d'un microscope. Ils sont représentés essentiellement par des bactéries et des champignons et sont impliqués par exemple dans la minéralisation des matières organiques, le cycle de l'azote, la disponibilité du phosphore et également dans la régulation de la croissance racinaire. Dans le cas des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Ce sont des Rhizobactéries qui colonisent les racines et qui stimulent leur croissance. Elles colonisent la rhizosphère en

utilisant les exsudats racinaires comme substrat nutritif, mais à la différence des autres bactéries rhizosphériques elles ont, en retour, un effet bénéfique sur la plante via une multitude de mécanismes. En effet, la relation plante-PGPR : une relation mutualiste « gagnant-gagnant ». Les exsudats racinaires fournissent une nutrition carbonée aux bactéries PGPR en germination pour leur développement. En retour, la bactérie PGPR forme un biofilm (sorte de gel) sur les racines et génère des composés biologiquement actifs qui stimulent la croissance racinaire et la résistance des plantes.

IV.1. Intérêts des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

L'utilisation des PGPR présentent principalement les avantages ci-après :

(i) Amélioration de la disponibilité des éléments nutritifs (azote, phosphore, fer...) en chélatant le fer, en solubilisant et/ou minéralisant le phosphore du sol qui est souvent indisponible pour la plante car sous forme de phosphore organique et/ou de phosphore minéral insoluble dit rétrogradé en sels de phosphates.

(ii) Régulation de la production de phytohormones. La plante produit naturellement du tryptophane (TRP) qui est un acide aminé précurseur de l'auxine. Les bactéries détectent le tryptophane émis dans les exsudats racinaires et excrètent à leur tour dans le biofilm des substances équivalents auxines. Ces équivalents auxines stimulent ainsi la croissance racinaire.

(iii) Augmentation de la tolérance aux stress abiotiques (froid, chaleur, manque d'eau). La combinaison d'un plus grand volume racinaire et de nutriments plus assimilables donne des plantes qui valorisent mieux les ressources nutritives du sol et qui sont mieux à même de résister aux stress.

(iv) Compétition avec les bio agresseurs par occupation de l'espace dans le sol.

(v) Amélioration de la qualité de la plante (enracinement, densité...). Pour les cultures annuelles, la phase critique est à la levée, quand la plante doit puiser ses premiers nutriments. Il faut donc qu'elle ait la possibilité de développer au plus tôt son système racinaire. En s'implantant rapidement, elle dépassera plus vite le stade de sensibilité aux attaques des ravageurs et couvrira mieux le sol, laissant moins de fenêtre de développement aux adventices. Un système racinaire plus dense, plus profond, avec des racines plus épaisses a aussi son intérêt plus tard dans le cycle, si des épisodes de stress surviennent.

IV.2. Actinomycètes dans les sols de rhizosphères de plantes

La majorité des actinomycètes sont trouvés dans divers types de sols tels que les champs agricoles, les forêts tropicales et les grottes naturelles (GOMES et *al.*, 2000 ; NAKAEWET et *al.*, 2009). Certains des actinomycètes sont distribués dans les parties rhizosphériques du sol. Le terme de rhizosphère, tout d'abord utilisé par Martin et Kemp (HILTNER, 1904) et défini comme une zone du sol qui entoure les racines des plants. La densité de ces derniers est plus élevée dans cette zone que dans les sols dépourvus de racines. Cette différence est liée à la sécrétion des petits composés organiques par les racines sous forme d'exsudats qui fournissent la nutrition et les sources d'énergie pour la croissance microbienne (SODERBERG et BAATH, 1998). On sait depuis longtemps que les exsudats contiennent des acides organiques, des acides aminés, des acides gras, des vitamines et des monomères des glucides ; la composition et la quantité des exsudats racinaires varie selon les espèces végétales et les conditions abiotiques tels que de la température et l'humidité de sol (MARTIN et KEMP, 1980). Cette flore microbienne de la rhizosphère comprend principalement les bactéries, les champignons et les actinomycètes. Les interactions entre les microorganismes procaryotes et les racines des plantes peuvent avoir des effets bénéfiques, nuisibles ou neutres sur la plante en fonction du type d'interaction symbiote et les conditions de sol (SMITH et READ, 1997).

IV.3. Importances des actinomycètes

Les actinomycètes ont une importance considérable en tant que producteurs d'antibiotiques (BERDY, 2005). En plus de ces derniers, ils sont la source de métabolites à différentes activités biologiques comme les enzymes, les antitumorales, les insecticides, les pesticides, les herbicides et les immunomodulateurs (SUJATHA et *al.*, 2005 ; SMAOUI, 2010). Dans le domaine agronomique En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinomycètes possèdent d'autres potentiels intéressants tels que leur implication dans le processus de recyclage. En effet, ils sont vitaux pour le recyclage des nutriments et comptent parmi un nombre réduit d'organismes utilisés en bioremédiation, capable de dégrader des composés organiques complexes tels que la chitine (ZAITLIN et WATSON, 2006) et grâce à un potentiel enzymatique riche ainsi que des spores résistantes à la dessiccation (PIZZUL, 2006). Ils ont la possibilité de s'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire. Ils sont aussi capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes (EL-SHATOURYET al, 2004).

IV.4. Actinomycètes contre le flétrissement bactérien *R. solanacearum*

Les Actinomycètes sont bien connus pour la libération d'enzymes actives contre les microorganismes phytopathogènes, y compris les chitinases, les glucanases, les amylases, les cellulases, les lipases et les protéases (JOG et al., 2016). Ainsi, beaucoup de recherches sur la gestion des maladies de cultures ont été réalisées en utilisant des souches d'Actinomycètes.

Une espèce d'actinomycète appelée *Streptomyces cavourensis* SY224 produisant des chitinases et des glucanases a contrôlé la maladie de l'antracnose chez le poivre (LEE et al., 2012). *S. halstedii* et *S. griseus* ont produit des chitinases antifongiques très actives et sont des agents biologiques efficaces pour la protection des cultures (JOO, 2005). *Actinoplanes campanulatus* et *Micromonospora chalcea* produisant des glucanases ont protégé le concombre de *Pythium aphanidermatum* en conditions de serre (EL-TARABILY et al., 2009). *Streptomyces sp.* MT7, en tant que souche chitinolytique, a montré une activité antagoniste contre plusieurs champignons pourrissant le bois, notamment *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Polystictus versicolor* et *Schizophyllum commune*, les agents causaux de la pourriture blanche, ainsi que *Gloeophyllum trabeum*, *Postia placenta*, *Polyporus agaricans* et *Polyporus friabilis*, les agents causaux de la pourriture brune (NAGPURE et al., 2014). Gopalakrishnan et al. (2011) ont rapporté que les souches de *Streptomyces* ont réduit le flétrissement fusarien chez le pois chiche via la production de plusieurs métabolites en concert, comprenant non seulement les enzymes cellulase et protéase mais aussi le cyanure d'hydrogène.

Plusieurs auteurs ont également trouvé que les actinomycètes peuvent lutter contre *Ralstonia solanacearum*. JUNWEI et al., 2019 ont identifié une souche d'actinomycète, *Streptomyces sporangiiformans sp.* nommée souche NEAU-SSA 1T antagonistes dans le sol du mont Song. Elle présentait une activité inhibitrice contre la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*, a été isolée et soumise à une analyse taxonomique polyphasique. LE et al., 2022 ont vérifié que la souche *Streptomyces* peut jouer d'agent de biocontrôle contre *R. solanacearum* de la tomate en libérant des enzymes actives contre les microorganismes phytopathogènes, y compris les chitinases, les glucanases, les amylases, les cellulases, les lipases et les protéases. A Madagascar, des études ont été réalisées sur la Contrôle intégré du flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre dans la région du Vakinankaratra (RAHETLAH et al., 2016). Des actinomycètes telluriques, des actinomycètes endophytes et de *Pseudomonas fluorescens* ont été identifiées antagonistes de *R. solanacearum* au laboratoire et en serre.

V. PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE

V.1. Localisation géographique de la zone d'étude

L'expérimentation en milieu réel a été réalisée dans la région Vakinankaratra (Figure 7).



Figure 7: Carte de la région du Vakinankaratra

Source : https://www.researchgate.net/figure/Carte-de-la-region-du-Vakinankaratra-Source_fig4_356890561

V.2. Climat

La Région de Vakinankaratra dispose d'un régime climatique tropical d'altitude, supérieure à 900 mètres. Elle est caractérisée par une température moyenne annuelle inférieure ou égale à 20°C (Figure 8). Les températures ne présentent pas trop de risque pour les diverses spéculations agricoles, sauf pour quelques dégâts de gel au niveau des zones de hautes altitudes. La moyenne des pluies annuelles est environ de 1500 mm en 110 jours. La répartition annuelle, qui comporte parfois des mois secs trop longs au début de la saison (septembre à novembre) ne permettent pas un bon démarrage de la campagne agricole, surtout pour les rizicultures de bas-fonds.

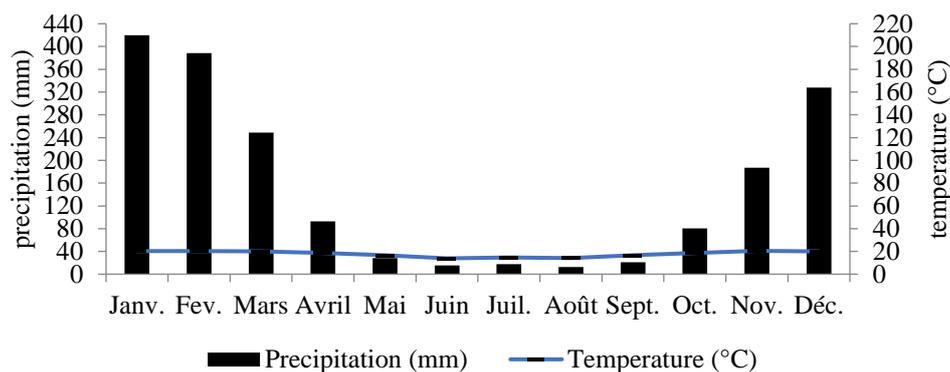


Figure 8: Diagramme ombrothermique de la région de Vakinankaratra

Source : weatherspark.com

V.3. Culture de la pomme de terre dans la région

La région de Vakinankaratra se distingue comme le principal centre de production de pommes de terre à Madagascar. Elle contribue à plus de 56% de la production nationale de ce tubercule et bénéficie d'un avantage concurrentiel remarquable. Son sol volcanique fertile, idéal pour la culture en altitude, combiné à la possibilité d'irrigation dans certaines zones durant la saison sèche, permet jusqu'à trois cycles de culture par an. De longue date, les petits producteurs locaux perpétuent une tradition bien établie dans la production de pommes de terre. Avec un rendement moyen d'environ 10 tonnes par hectare, soit le double de la moyenne nationale, la région jouit d'une position privilégiée dans le secteur. Néanmoins, environ plus de la moitié de la superficie de la région est constituée de sols ferrallitiques lessivés.

Le centre de recherche principal sur la pomme de terre à Madagascar, FIFAMANOR, est également basé dans cette région, offrant un soutien technique précieux aux exploitants locaux. Grâce à l'utilisation de la technologie *in vitro*, le centre multiplie rapidement et sans maladie les semences, permettant ainsi la création de nouvelles variétés mieux adaptées aux conditions locales et à la demande du marché.

La synthèse bibliographique souligne l'importance cruciale de développer des stratégies efficaces pour contrôler *R. solanacearum*, une menace majeure pour les cultures de pommes de terre. L'utilisation d'actinomycètes et des plantes assainissantes émerge comme une approche prometteuse dans cette lutte, offrant des perspectives encourageantes pour une gestion agroécologique intégrée de cette bactériose. Cette thèse se positionne ainsi au cœur de ce défi, visant à explorer ces solutions novatrices pour protéger les cultures de pommes de terre dans la région de Vakinankaratra.

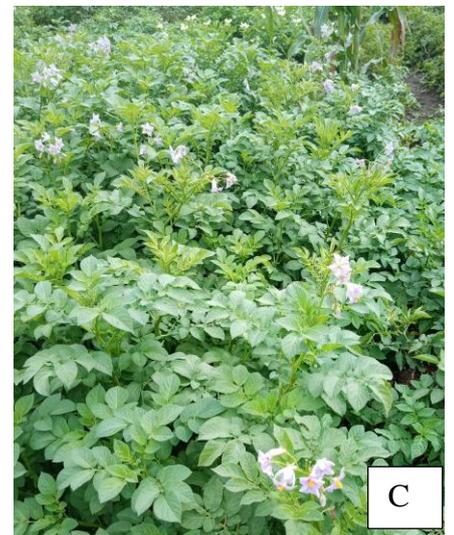
**CHAPITRE 2. EVALUATION DES PLANTES
ASSAINISSANTES DU SOL CONTRE LE
FLETRISSEMENT BACTERIEN (*Ralstonia
solanacearum*) DE LA POMME DE TERRE DANS
LA ZONE DE BETAFO**



A



B



C



D



E

Planche 2: Expérimentation aux champs sur l'association culturale pomme de terre et légumineuse *Crotalaria*

A : Epannage d'engrais organique et semis de pomme de terre (Source : Auteur), B : plant de pomme de terre flétris (Source : Auteur), C : développement végétatif de la pomme de terre (Source : Auteur), D : association culturale pomme de terre et *Crotalaria spectabilis* (Source : Auteur), E : association culturale pomme de terre et *Crotalaria grahamiana* (Source : Auteur).

Une partie de ce chapitre a été publié dans le journal FARA Research Report (FRR) Volume 7 :

Andriamiarisoa L. D, Fanjaniaina C, Rakotoarimanga N, Rahetlah V.B. (2023) Effects of Mulching/Green Manuring and Intercropping with *Crotalaria grahamiana* on Growth and Yield Parameters of Potato in the Vakinankaratra Region, Madagascar. FARA Research Report Vol 7(15) :134-141. <https://doi.org/10.59101/fr072315>.

Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'une communication scientifique orale réalisée à l'Akademia malagasy, du 18 Janvier 2024 :

Andriamiarisoa Lovaniaina Dinanirina¹, Fanjaniaina Chantal⁴, Tendro Radanielina², Nirina Rakotoarimanga³, Volatsara Baholy Rahetlah⁵. Utilisation de *Crotalaria spectabilis* contre le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre dans la zone de Betafo.

I. RESUME

A Madagascar, le flétrissement bactérien causé par le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* est une maladie majeure de la pomme de terre. L'étude visait à évaluer le potentiel de biocontrôle des plantes légumineuses assainissantes du sol *Crotalaria grahamiana* (mulching, engrais vert) et *Crotalaria spectabilis* en système associé en ligne simple contre *Ralstonia solanacearum* sur la pomme de terre de la variété Meva. L'essai est réalisé dans 2 sites du district de Betafo (andosol), dans la région Vakinankaratra. Le dispositif expérimental est un bloc aléatoire complet à 4 traitements et 4 répétitions avec T1: système monoculture de pomme de terre, T2: association *Crotalaria grahamiana* (mulching) avec la pomme de terre, T3: association *Crotalaria grahamiana* (engrais vert) avec la pomme de terre et T4 : association *Crotalaria spectabilis* avec la pomme de terre.

Les résultats ont révélé une augmentation significative des rendements en tubercules totaux et en tubercules commercialisables de 107% et de 85% pour T4, de 144% et de 78% en T2, ainsi que de 107% et de 79% pour T3 par rapport au témoin T1. De plus, une diminution significative de l'incidence et de la sévérité du flétrissement bactérien a été observée pour les traitements associés par rapport aux témoins, avec des réductions de moins de 71% et de 63% T4, de moins de 50% et de 48% pour T2, et de moins de 26% et de 36% pour T3 par rapport au témoin T1.

Mots-clés : Plantes légumineuses assainissantes du sol, *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria grahamiana*, flétrissement bactérien *Ralstonia solanacearum*, lutte culturale, pomme de terre.

II. INTRODUCTION

Le flétrissement bactérien, provoqué par le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*, une bactérie d'origine tellurique, représente une menace sérieuse pour la culture de la pomme de

terre dans divers environnements, notamment dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes (HAYWARD, 1991).

À Madagascar, cette maladie constitue un obstacle majeur à la production de pommes de terre, en particulier dans les principales zones de culture comme les Tanety, surtout pendant la saison chaude et pluvieuse. Cette maladie entraîne une réduction significative du rendement et de la qualité des récoltes, en raison du flétrissement des plants de pomme de terre pendant la croissance et de la pourriture des tubercules pendant la récolte ou le stockage. AUTEUR

La gestion du flétrissement bactérien, une maladie d'origine tellurique, s'avère complexe. La lutte chimique est absente, les producteurs pratiquent généralement à des mesures préventives telles que l'utilisation de variétés de pommes de terre supposées résistantes et la rotation des cultures (FRENCH, 1982). Cependant, la résistance des variétés est spécifique aux souches de *Ralstonia solanacearum* et dépend des conditions agro-pédo-climatiques. De plus, la rotation des cultures est souvent inefficace car les souches de *Ralstonia solanacearum* peuvent persister longtemps dans les profondeurs du sol ou sur les systèmes racinaires de nombreuses mauvaises herbes. Face à ces défis, les stratégies actuelles de gestion privilégient une approche intégrée combinant des mesures génétiques, biologiques et agronomiques.

Dans cette perspective, notre étude se concentre sur l'utilisation des plantes de services comme moyen de lutte contre *Ralstonia solanacearum*. Les plantes de services regroupent une grande diversité de végétaux utilisés pour améliorer la fertilité, la structure et la conservation du sol, ainsi que pour lutter contre les ravageurs, les maladies et les mauvaises herbes. Parmi eux existe les plantes assainissantes du sol contre les maladies telluriques.

L'objectif de cette recherche est d'évaluer une méthode de lutte agroécologique basée sur l'utilisation des plantes légumineuses assainissantes du sol en association avec la pomme de terre. Nous avons sélectionné deux types de plantes légumineuses pour évaluer leur capacité à réduire le potentiel infectieux des sols lié à *Ralstonia solanacearum* notamment *Crotalaria spectabilis* et *Crotalaria grahamiana*.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Sites expérimentaux

L'expérimentation a été conduite en milieu réel pendant une campagne culturale, s'étendant de novembre 2020 à mai 2021, dans deux sites situés respectivement dans les communes rurales de Mandritsara (19°49'39''S ; 46°53'19''E, 1,576 m) et d'Alakamisy anativato (19°53'01''S ; 46°54'20''E, 1524m), localisés dans le district de Betafo, dans la région Vakinankaratra, sur

les Hautes Terres centrales de Madagascar. Les parcelles, qui sont cultivées en pomme de terre depuis plusieurs années, ont été sélectionnées pour cette étude.

Le type de climat est tropical d'altitude avec deux saisons bien distinctes, une saison sèche et fraîche allant de Mai à Septembre avec une température journalière de 7,1°C à 22,8°C et une saison chaude et pluvieuse allant d'Octobre à Avril, avec une température journalière de 13,2 à 26°C. Les mois les plus pluvieux sont les mois de janvier, février et mars et les moins pluvieux les mois de juin, juillet et août et la pluviométrie moyenne annuelle est de 1728 mm (Figure 9).

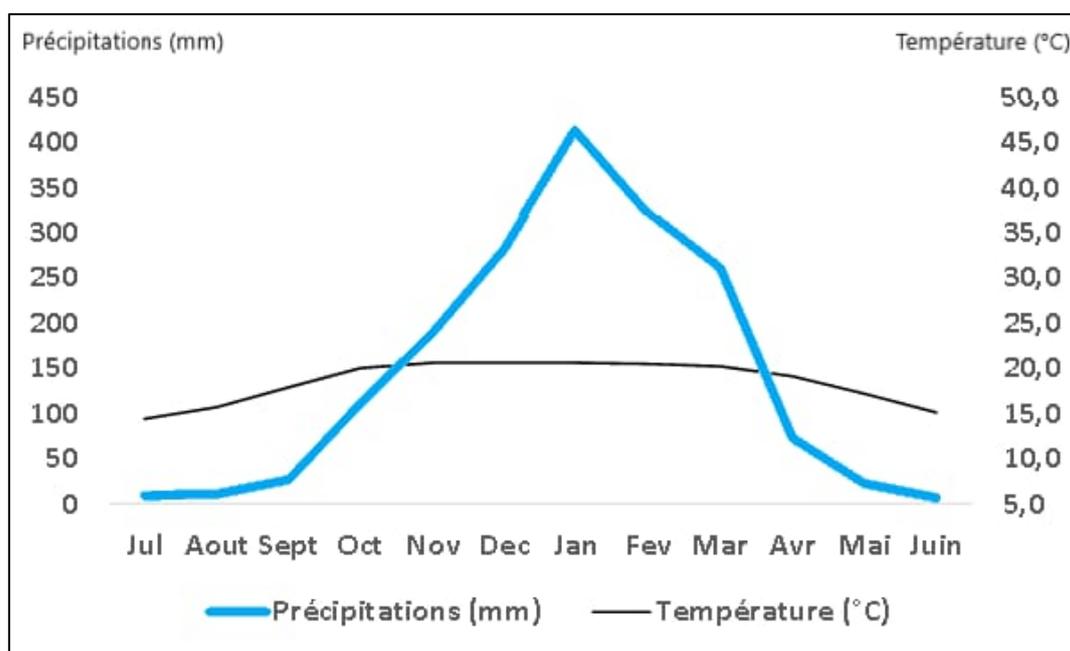


Figure 9: Valeurs moyennes de la précipitation et de la température mensuelle dans le district de Betafo (1981-2020)

Source : DGM

Dans les deux sites d'essai, le type du sol est brun tropical, produit d'un volcanisme récent. L'analyse chimique du sol a révélé qu'il s'agit d'un sol a pH acide à légèrement acide, relativement riche en carbone, en azote, avec un rapport C/N satisfaisant, moyennement riche en phosphore et en potassium avec une texture limono-sableux (Tableau 5).

Tableau 5: Propriétés chimiques du sol dans les sites expérimentaux

Site	pH	C%	N%	C/N	P (Bray II) ppm	K (meq/100g)
Mandritsara	4,82	4,20	0,270	13,9	3,50	0,209

Alakamisy 5,26 6,54 0,423 15,5 6,00 0,216

Anativato

pH : potentiel hydrogène, C% : Pourcentage en Carbone, C/N : rapport entre carbone et azote, P (Bray II) ppm : extraction de phosphore dans les acides en 1 mg/kg. , K(meq/100g) : Kalium en milliéquivalent par 100g du sol.

Source : Auteur

III.2. Traitements et dispositifs expérimentaux

3.2.1. Pomme de terre

La variété de pomme de terre utilisée était la variété Meva, une des variétés les plus appréciées par les producteurs. Elle s'affiche une sensibilité moyenne au flétrissement bactérien est appréciée par les producteurs notamment pour ses caractéristiques agronomiques dont sa précocité de 150 jours de cycle cultural, son aptitude à la friture, et au stockage ainsi que sa haute valeur marchande (Annexe 1). Les tubercules-semences de cette variété ont été fournis par une coopérative spécialisée dans la production de semences de base.

3.2.2. Plantes assainissantes du sol

Deux espèces de plantes assainissantes ont été sélectionnées pour être évaluées en conditions réelles quant à leur capacité à réduire l'infestation par *Ralstonia solanacearum* dont *Crotalaria spectabilis* (Figure 10) et *Crotalaria grahamiana* (Figure 11). Ces deux espèces appartiennent à la famille des Fabacées et sont originaires d'Asie. Elles sont désormais largement répandues dans les zones tropicales et subtropicales, notamment en Afrique. Outre leur capacité à fixer l'azote atmosphérique et à améliorer la fertilité du sol.

Du point de vue agronomique, elles offrent différents avantages (WANG et *al.*, 2002) mentionnés ci-dessous :

- Leur capacité intrinsèque en tant que légumineuses à établir une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique les distingue comme des engrais verts ;
- Leur adaptation à une variété de types de sol, leur tolérance à la sécheresse, leur croissance rapide et leur production de biomasse élevée en font des plantes de couverture efficaces pour lutter contre la pression des adventices et les phénomènes érosifs.
- La synthèse et la libération de la monocrotaline, un alcaloïde pyrrolizidinique connu pour sa toxicité envers les nématodes (WANG et *al.*, 2002), les désignent comme des cultures

intercalaires assainissantes dans les systèmes vulnérables aux nématodes tels que les plantations de bananiers et d'ananas.



Figure 10: Plant de *Crotalaria spectabilis*



Figure 11: Plant de *Crotalaria grahamiana*

Source : Auteur

3.2.3. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est un bloc aléatoire complet avec quatre traitements et quatre répétitions constitués par :

T1 : monoculture de pomme de terre (témoin),

T2 : mulching + association *Crotalaria grahamiana* avec pomme de terre (ligne alternée simple),

T3 : engrais vert + association *Crotalaria grahamiana* avec pomme de terre (ligne alternée simple)

T4 : association *Crotalaria spectabilis* avec pomme de terre (ligne alternée simple).

3.2.4. Itinéraire technique

Un travail du sol a été effectué avant le semis des plantes assainissantes du sol. Les graines de *Crotalaires* préalablement traitées par trempage dans l'eau chaude pendant 12 heures ont été semées entre les lignes de pomme de terre, espacée de 0,7m respectivement à la dose de 18 et 20kg/ha, 12 semaines avant la plantation de la pomme de terre.

Après 8 semaines de plantation, la biomasse aérienne de *Crotalaria grahamiana* a été pesée et découpée finement d'environ 5cm, mais le système racinaire est laissé poursuivre ses effets dans le sol. Cette biomasse a été par la suite restituée entièrement au sol, soit sous-forme de paillis à la surface de la parcelle (Mulching), soit sous forme incorporée au sol (Engrais vert), et laissée se décomposer pendant 4 semaines avant la plantation de la pomme de terre entre les lignes de crotalaire en association en ligne alternée simple (Figure 13). Pour *Crotalaria spectabilis*, les plants sont laissés en association culturale en ligne alternée simple de la pomme de terre (Figure 12).



Figure 12: Association culturale pomme de terre et *Crotalaria spectabilis*



Figure 13: Association culturale pomme de terre et *Crotalaria grahamiana*

Source : Auteur

Quarante (40) tubercules semences de pomme de terre ont été plantés dans chaque parcelle élémentaire à écartements de 0,7m x 0,3 m et la même dose de fertilisation de fond composée de 10 t ha⁻¹ de fumier de ferme et de 300kg ha⁻¹ d'engrais minéral NPK 11-22-16 ainsi que la même dose de fumure de couverture (urée) de 46kg ha⁻¹ ont été respectivement apportées à la plantation et au premier buttage (15-20cm) de la pomme de terre (Figure 14).



Figure 14: Semis de tubercules semences de pomme de terre et épandage de fertilisation

Source : Auteur

III.3. Paramètres agronomiques retenus

3.3.1. Paramètres de croissance et de rendement de la pomme de terre

Les paramètres de croissance, tels que la hauteur des plants, le poids et le nombre de tiges par pied, ainsi que les mesures de rendement, incluant le nombre et le poids frais total des tubercules par pied incluant le nombre et le poids frais des tubercules commerciaux (diamètre ≥ 28 mm), ont été évalués sur 12 plants sélectionnés au centre de chaque parcelle élémentaire.

3.3.2. Incidence et sévérité du flétrissement bactérien de la pomme de terre

Dans chaque parcelle élémentaire, l'incidence du flétrissement bactérien ou le pourcentage de plants flétris a été suivie pendant la plantation de la pomme de terre (WINSTEAD et KELMAN (1952), selon la formule :

$$\text{Incidence (100\%)} = \frac{\Sigma \text{ plants flétris} \times 100}{\text{nombre total des plants}}$$

La sévérité du flétrissement bactérien a été suivie en utilisant une échelle de notation de 1 à 5 (1 = aucun symptôme, 2 = flétrissement de quelques feuilles jeunes au sommet, 3 = deux feuilles flétries, 4 = quatre ou plus de feuilles flétries et 5 = mort du plant) et la formule est suivante :

$$\text{Sévérité (100\%)} = \Sigma (\text{pn}) \times 100 / \text{PN} [17]$$

Avec (p) = nombre de plants avec le score correspondant à la notation (n), P = la notation la plus élevée, N= nombre total de plants flétris

3.3.3. Isolement et caractérisation biochimique des souches présumées de *R. solanacearum* aux champs

a) Isolement des souches de *R. solanacearum*

Les souches bactériennes ont été isolées à partir des échantillons de tiges et de tissus vasculaires de tubercules de plants de pomme de terre présentant les symptômes caractéristiques du flétrissement bactérien prélevés aux champs. Des dilutions en série ont été effectués avant l'isolement sur milieu semi-sélectif SMSA (modified Sequiera Medium South Africa) (ELPHINSTONE, 1996) et milieu de Kelman (casamino acide-peptone-glucose CPG) au chlorure de triphényl tetrazolium (TZC) (KELMANN, 1954) (Annexe 3). Les colonies présumées de *R. solanacearum*, blanches au centre légèrement rosé, fluides, de forme irrégulière ont été repiquées et purifiées sur le milieu TZC.

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

Des tests biochimiques ont été réalisés pour l'identification des souches bactériennes dont la coloration Gram, test de KOH et la recherche d'oxydase.

b) Détermination du type de biovars

Elle est basée sur des tests biochimiques en lien avec les capacités des souches à utiliser et/ou à oxyder trois disaccharides, notamment le maltose, le lactose et la cellobiose, ainsi que trois hexoses alcools, le mannitol, le sorbitol et le dulcitol.

Le milieu de base utilisé est constitué de 1 g Bacto-peptone, 1 g de NH₄H₂PO₄ (Ammonium dihydrogène phosphate), 0,2 g de KCl (Chlorure de potassium), 0,2 g de MgSO₄, 7H₂O (magnésium sulphate), 0.03 g de Bleu de Bromothymol, 3 g d'Agar dans un litre d'Eau distillée 1.000 ml (HAYWARD, 1964 et 1976).

Le pH est ajusté à 7-7.1 en y ajoutant quelques gouttelettes de solution de NaOH 40% poids/volume. Le milieu ainsi obtenu à une coloration vert olive.

Le milieu de culture est réparti dans des bêche en aliquotes de 90 ml correspondant au nombre d'hydrates de carbone à tester avant autoclavage à 121°C pendant 21 minutes.

Dix millilitres (10 ml) d'une solution d'hydrates de carbone à 1 % composée de lactose, maltose, cellobiose, mannitol, sorbitol et dulcitol sont préparés puis versés dans des tubes à vis stériles. Toutes les solutions de sucres sont stérilisées par filtration (à l'aide de membranes à millipores de 0,22 microns) dans des tubes à essai préalablement stérilisés. Les solutions sont ensuite chauffées à 100°C pendant 20 minutes. Environ 10 ml de chaque solution de 10 % d'hydrate de carbone sont ajoutés à 90 ml du milieu de base refroidi à 60°C afin d'obtenir une concentration finale de 1 %. Cette solution est ensuite répartie à l'aide d'une pipette de précision de 200 µl par puits dans les 96 puits stériles des boîtes de culture, en gardant une rangée par sucre.

L'inoculum est une culture bactérienne de 48 heures. Les puits contenant les différents sucres sontensemencés en prélevant des colonies des souches pures à l'aide de cure-dents stériles. Il y a trois répétitions par sucre (sur la même ligne) et par souche. Un témoin négatif ainsi que deux témoins positifs, constitués des souches GMI 1.000 et 19-76, sont inclus. Les plaques sont ensuite incubées à 27°C et examinées à 48 heures et 72 heures. Un résultat positif du test est marqué par une variation du pH acide, se manifestant par un changement de couleur du vert olive au jaune. Selon MARTIN *et al.* (1982) ; SCHAAD *et al.* (2001), chez les alcools de sucre, la réaction survient entre 3 et 5 jours, tandis que pour les disaccharides, elle est un peu plus longue. La Figure 15 synthétise les différentes étapes d'isolement de *R. solanacearum*.



Figure 15: Etapes microbiologiques pour l'identification de *R. solanacearum*

Source : Auteur

3.3.4. Caractérisation moléculaire des souches présumées de *R. solanacearum*

Les souches isolées précédemment ont été sélectionnées pour une caractérisation plus approfondie, à savoir la caractérisation moléculaire. Il s'agit d'un outil fiable et précis,

développé pour la classification et l'identification des bactéries. L'identification moléculaire a été réalisée au laboratoire de Plant Molecular Biology Lab, au niveau de Mention Biologie et Ecologie Végétale, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo. Cette identification se divise en plusieurs étapes :

a) Extraction d'ADN

Un aliquote (1µl) de chaque colonie de souche présumée de *R solanacearum* en culture sur le milieu casamino acide-peptone-glucose (CPG) est mis en suspension dans 100µl d'eau distillée stérile et porté à ébullition à 95°C pendant 15 minutes sur un thermocycleur pour l'extraction d'ADN (WELLER, 1988).

b) Amplification des gènes

L'ADN extrait est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques du complexe d'espèce *R solanacearum* 759/760 (OPINA et al., 1997). La détermination du phylotype est réalisée par amplification à l'aide de PCR multiplexe qui utilise simultanément 4 couples d'amorces de tête respectivement spécifiques de chaque phylotype : N: mult21:1F (phylotype I), N: mult21:2F (phylotype II), N:mult23:AF (phylotype III), N:mult22:InF (phylotype IV) et un couple d'amorces finales spécifiques de l'espèce Nmult22:RR (FEGAN et PRIOR , 2005). Les conditions de réalisation des cycles de la réaction en chaîne par polymérase sont dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C ; 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 1 minute à 59°C et 1 minute à 72°C et une extension finale de 10 minutes à 72°C. Les réactifs, les volumes et le protocole de la réaction en chaîne par polymérase ont été préparés selon la description d'ABDURAHMAN et al., (2019).

c) Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de PCR ont été révélés par électrophorèse en gel d'agarose 1,5%, après application d'un courant électrique de 90 volts pendant 40 minutes. Les bandes ont été ensuite photographiées avec un système de capture digitale (Bio Imagine System).

III.4. Analyses chimiques des échantillons de plant et de sol

Après 10 semaines de la plantation, des échantillons de la partie végétative aérienne des plants de pomme de terre ont été prélevés en vue de l'analyse au laboratoire des teneurs en matière sèche, en azote, en phosphore et en potassium.

A la fin de l'expérimentation (12 semaines après la plantation de la pomme de terre), des échantillons de sol ont été prélevés dans les horizons de 5 à 20 cm en vue de la détermination

de la concentration respective en carbone, en matière organique, en azote, en phosphore et en potassium.

III.5. Evaluation participative des systèmes de culture

Après 10 semaines de la plantation de la pomme de terre, l'essai agronomique a fait l'objet d'évaluation participative par des représentants des acteurs de la filière pomme de terre dans la région du Vakinankaratra. L'essai a été évalué sur une échelle de notation de 1 à 5 la base de 4 critères : (i) efficacité technique ; (ii) praticabilité ; (iii) coût ; (iv) préservation de l'environnement (exemple : 1 : non efficace, 2 : peu efficace, 3 : moyennement efficace, 4 : efficace, 5 : très efficace).

III.6. Analyse statistique

Les données paramétriques ont été soumises à l'analyse de la variance suivie par la séparation des moyennes selon la méthode de Tukey ($p < 0.05$). Pour les données non paramétriques, le test de Kruskal-Wallis et le test de comparaison des paires ont été effectués ($\alpha = 0.05$) au moyen du logiciel XLSTAT.

IV. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

IV.1. Effets de l'association sur les paramètres agronomiques

4.1.1. Hauteur, nombre de tige et biomasse aérienne

A 10 semaines après la plantation de la pomme de terre, la hauteur des plants variait significativement ($p < 0.05$) entre les sites, les traitements et leurs interactions.

Dans le site de Mandritsara, la hauteur des plants dans le système associé était significativement ($p < 0.05$) plus haute de 43% dans le lot traité T2 (mulching + association avec *Crotalaria grahamiana*), de 30% dans le lot traité T3 (engrais vert + association *Crotalaria grahamiana*) et de 27% dans le lot traité T4 (association avec *Crotalaria spectabilis*).

Dans le site Alakamisy anativato, la hauteur des plants dans le système associé était significativement ($p < 0.05$) plus haute de 99 % dans le lot traité T3, de 87% dans le traité T4 et de 59% au le lot traité T2. Sur la moyenne des deux sites, un écart positif, significatif ($p < 0.05$) de l'ordre de 51 à 65% de la hauteur des plants est enregistré entre les lots traités à base d'espèce de *Crotalaria* et le lot témoin. L'optimum de hauteur moyenne est donc observé pour le lot traité T2 (Tableau 6).

Dans le site d'Alakamisy anativato, le nombre moyen de tige le plus élevé est enregistré dans T4, de 83% significativement supérieur par rapport au témoin ($p < 0,05$). Les autres traitements ont montré un nombre de tige plus élevé de 79% pour T2 et de 51% pour T3.

Le poids frais de la partie aérienne végétative est évalué dans le site Mandritsara, il était de 208% significativement ($p < 0,05$) plus élevé dans T2, 111% plus élevé dans T4 et 42% dans T3 (Tableau 6).

4.1.2. Nombre et poids de tubercules totaux par pied de pomme de terre

A la récolte, 12 semaines après la plantation de la pomme de terre, le nombre et le poids frais de tubercules totaux de pomme de terre par pied étaient significativement ($p < 0,05$) différents entre les sites, les traitements et leurs interactions.

Dans le site de Mandritsara, le nombre de tubercules totaux avec le système associé est significativement ($p < 0,05$) plus élevé respectivement de 44%, 52% et 63% (T2, T3 et T4) par comparaison au lot témoin (Tableau 7). Dans le site d'Alakamisy anativato, le nombre de tubercules totaux étaient respectivement 74%, 77% et 96% plus élevées dans les systèmes associées (T2, T3 et T4) par rapport au lot témoin.

Dans le site d'Alakamisy anativato, le poids frais maximal des tubercules totaux est observé pour le lot traité T4 et T2. Un écart positif et significatif ($p < 0,05$) de 168% et de 170% du poids frais des tubercules totaux est enregistré pour ces lots (T4 et T2) par rapport au lot témoin. Dans le lot traité T3, le poids frais des tubercules est significativement plus élevé de 112 % par rapport au lot témoin, mais significativement moins élevé de 26 et 32 % entre T2 et T4 (Tableau 7).

En moyenne entre les deux sites, une augmentation du poids frais de tubercules totaux de 144% pour le lot T2, de 107% pour le lot traité T3 et de 128% pour T4 a été enregistrée.

Tableau 6: Evolution des paramètres de croissance des plants et du nombre de tiges par pieds de pomme de terre

Traitement de sol	Hauteur des plants* (cm)			Augmentation (%)**			Nombre de tiges par pied*	Augmentation (%) **	Biomasse aérienne Pied * (g)	Augmentation (%)**
	Site	Mandritsara	Alakamisy anativato	Moyenne	1	2				
T1	40,81 ± 1,26 c	34,64 ± 1,26 b	37,73 ± 0,96 b		2,44 ± 0,17 b	...	22,04 ± 3,50 c	...
T2	58,22 ± 1,30 a	58,31 ± 1,77 a	58,27 ± 1,09 a	43	59	51	4,36 ± 0,23 a	79	67,79 ± 7,77a	208
T3	52,64 ± 1,05 b	62,67 ± 2,02 a	57,65 ± 1,28 a	30	99	65	3,69 ± 0,30 a	51	38,17 ± 5,43 bc	42
T4	51,72 ± 0,80 b	64,69 ± 2,03 a	58,21 ± 1,09 a	27	87	57	4,47 ± 0,28 a	83	46,67 ± 5,32 ab	112
p-value (site)	-	-	<0,0001				-		-	
p-value (traitement)	<0,0001	<0,0001	<0,0001				<0,0001		<0,0001	
p-value (site x traitement)	-	-	<0,0001				-		-	

* Données collectées à 10 semaines de la plantation de la pomme de terre, les moyennes avec les mêmes lettres de l'alphabet ne diffèrent pas significativement à $p \geq 0,05$

** Augmentation des valeurs (nombre, poids) traités par rapport au témoin

T1 : monoculture de pomme de terre (témoin), T2 : mulching + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple), T3 : engrais vert + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple) T4 : association *Crotalaria spectabilis* x pomme de terre (ligne alternée simple), 1: Abréviation du site Mandritsara, 2 : Abréviation du site Alakamisy Anativato, M : Moyenne

Tableau 7: Nombre et poids frais de tubercules totaux par pied de pomme de terre selon les traitements du sol

Traitement du sol	Nombre de tubercules totaux/pied*			Augmentation (%) **			Poids frais de tubercules totaux/pied (g)*			Augmentation (%) **			
	Site	Mandritsara	Alakamisy Anativato	Moyenne	1	2	M	Mandritsara	Alakamisy Anativato	Moyenne	1	2	M
T1		6,61 ± 0,80 b	5,53 ± 0,47 b	6,07 ± 0,46 b	243,67 ± 26,44 c	273,06 ± 21,34 c	258,37 ± 16,96 c
T2		10,06 ± 0,68 a	9,61 ± 0,76 a	9,84 ± 0,51 a	44	74	62	533,75 ± 32,72 a	731,94 ± 41,03 a	632,85 ± 28,58 a	119	112	144
T3		10,78 ± 0,88 a	9,81 ± 0,99 a	10,30 ± 0,66 a	52	77	68	491,94 ± 31,80 ab	578,61 ± 47,08 b	535,28 ± 28,67 b	102	168	107
T4		9,50 ± 0,54 a	10,83 ± 0,60 a	10,17 ± 0,41 a	63	96	70	420,39 ± 27,38 b	761,39 ± 41,60 a	590,89 ± 31,95 ab	72	170	128
P-value (site)		-	-	ns				-	-	<0,0001			
P-value (traitement)		0,001	<0,0001	<0,0001				<0,0001	<0,0001	<0,0001			
P-value (site X traitement)		-	-	ns				-	-	<0,0001			

*Données collectées pendant la récolte de la pomme de terre, les moyennes avec les mêmes lettres de l'alphabet ne diffèrent pas significativement à $p \geq 0,05$

** Augmentation de nombre de tubercules par plants traités par rapport au témoin

T1 : monoculture de pomme de terre (témoin), T2 : mulching + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple), T3 : engrais vert + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple) T4 : association *Crotalaria spectabilis* x pomme de terre (ligne alternée simple)

1 : Abréviation du site Mandritsara, 2 : Abréviation du site Alakamisy Anativato, M : Moyenne

ns : non significative

4.1.3. Nombre et poids de tubercules commercialisables

Le nombre de tubercules commercialisables (diamètre supérieur ou égal à 28mm) variait significativement ($p < 0,05$) entre les traitements du sol et non entre les sites et l'interaction site*traitement (Tableau 8).

Dans le site de Mandritsara, les trois lots traités aux espèces de crotalaires affichent le même nombre de tubercules commercialisables, qui est de 57% supérieur par rapport au lot témoin.

Dans le site d'Alakamisy anativato, les mêmes effets sont observés pour les traitements à base d'espèces de crotalaire, avec un accroissement significatif ($p < 0,05$) du nombre de tubercules commercialisables de l'ordre de 124% pour le traitement T4, de 115% pour le lot traité T3 et de 108% T2 (Tableau 8). Sur la moyenne des deux sites, une augmentation du nombre de tubercules commercialisables de l'ordre de 78, 79 et 85% est observé dans les lots à base de crotalaire par rapport au lot témoin, le maximum étant observé pour le traitement T4.

Concernant le poids frais des tubercules commercialisables par pied, une différence très significative ($p < 0,05$) est observée entre les sites, entre les traitements et entre les interactions site et traitement.

Dans le site de Mandritsara, les meilleurs rendements sont respectivement observés pour le lot traité T2, avec une augmentation significative ($p < 0,05$) de 129% et le lot traité T3, avec une augmentation significative ($p < 0,05$) de 108% suivi par le lot traité T4 avec un écart positif significatif ($p < 0,05$) de 82% (Tableau 8).

Dans le site d'Alakamisy anativato, les meilleurs rendements sont observés pour le lot traité T2 ($p < 0,05$) et le lot traité T4, avec une augmentation respective de 214% et 210%, suivi par le lot traité T3 avec une augmentation significative ($p < 0,05$) de 144% de poids frais en tubercules par rapport au lot témoin (Tableau 8).

Sur la moyenne des deux sites, le poids frais de tubercules commercialisables varie de façon marquée ($p < 0,05$) entre les lots à base de *Crotalaria* et le lot témoin, les valeurs le plus élevées étant observées pour le lot T2 avec une augmentation significative ($p < 0,05$) de 171% , suivi par le lot traité T4, avec une augmentation significative ($p < 0,05$) de 159% et finalement par le lot traité T3 avec une augmentation significative ($p < 0,05$) de 98% de poids frais en tubercules par rapport au lot témoin (Tableau 8).

Tableau 8: Nombre et poids de tubercules commercialisables par pied de pomme de terre selon les traitements du sol

Traitement du sol	Nombre de tubercules commercialisables /pied*			Augmentation (%) **			Poids frais de tubercules commercialisables /pied (g)*			Augmentation (%) **			
	Site	Mandritsara	Alakamisy Anativato	Moyenne	1	2	M	Mandritsara	Alakamisy Anativato	Moyenne	1	2	M
T1		4,22 ± 0,47 b	3,06 ± 0,32 b	3,64 ± 0,29 b	210,61 ± 23,33 b	198,61 ± 18,53 c	204,61 ± 14,81 c
T2		6,61 ± 0,36 a	6,36 ± 0,45 a	6,49 ± 0,29 a	57	108	78	482,14 ± 32,12 a	623,61 ± 39,36 a	552,88 ± 26,58 a	214	129	170
T3		6,61 ± 0,49 a	6,44 ± 0,65 a	6,53 ± 0,40 a	57	115	79	437,11 ± 30,81 a	484,72 ± 41,44 b	460,92 ± 25,79 b	114	82	98
T4		6,61 ± 0,37 a	6,86 ± 0,46 a	6,74 ± 0,30 a	57	124	85	383,53 ± 27,40 a	615,83 ± 36,72 a	499,68 ± 26,60 ab	210	144	159
P-value (site)		-	-	ns									
P-value (traitement)		<0,0001	<0,0001	<0,0001				<0,0001	<0,0001	<0,0001			
P-value (site*traitement)		-	-	ns				-	-	<0,0001			

*Données collectées pendant la récolte de la pomme de terre, les moyennes avec les mêmes lettres de l'alphabet ne diffèrent pas significativement à $p \geq 0,05$

** Augmentation de nombre de tubercules par plants traités par rapport au témoin

T1 : monoculture de pomme de terre (témoin), T2 : mulching + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple), T3 : engrais vert + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple) T4 : association *Crotalaria spectabilis* x pomme de terre (ligne alternée simple)

1 : Abréviation du site Mandritsara, 2 : Abréviation du site Alakamisy Anativato, M : Moyenne

IV.2. Effets de l'association sur l'incidence et la sévérité du flétrissement bactérien de la pomme de terre dû à *R. solanacearum*

4.2.1. Incidence et la sévérité de *R. solanacearum*

L'incidence et la sévérité du flétrissement bactérien ont été suivis dès l'apparition des symptômes jusqu'avant le fanage de la partie aérienne végétative (Tableau 9).

Dans les deux sites, l'incidence et la sévérité flétrissement bactérien croissent avec le temps. Toutefois, un retard d'environ une semaine de l'apparition des symptômes du flétrissement et un faible pourcentage de plants flétris ont été observés dans les systèmes associés.

Au pic de la maladie, à 8 semaines de la plantation, l'incidence cumulée du flétrissement bactérien était significativement différente ($p < 0,05$) entre les sites, les traitements et leurs interactions.

Pour le traitement T4, le pourcentage de pieds flétris était 67% et 74% moins élevé, respectivement pour le site de Mandritsara et d'Alakamisy anativato. Pour le traitement T2, le pourcentage de pieds flétris est moins de 47% et 53%, respectivement pour le site d'Alakamisy anativato et de Mandritsara. Pour le traitement T3, le pourcentage de pieds flétris est moins de 26% et 27%, respectivement pour le site d'Alakamisy anativato et de Mandritsara.

Sur l'ensemble des deux sites, T4 et T2 affichent des pourcentages moyens de pieds flétris les plus bas, avec un écart négatif, significatif ($p < 0,05$) de 71% et de 50%, respectivement par rapport au lot témoin. Un écart négatif, significatif ($p < 0,05$) de moins 26% du pourcentage de pieds flétris est également observé entre le lot traité T3.

Dans le site de Mandritsara, une réduction significative ($p < 0,05$) de la sévérité du flétrissement bactérien par rapport au lot témoin, est observée pour les lots traités aux deux espèces de crotalaire. La sévérité de la maladie est réduite de moins de 36% dans le traitement T3, de moins de 50%, dans le lot traité T2 et de moins 65% dans le lot traité T4 (Tableau 9). Dans le site d'Alakamisy anativato, une baisse significative ($p < 0,05$) de la sévérité de la maladie par rapport au lot témoin de l'ordre de moins de 46% pour le lot traité T2 et de moins de 62% le lot traité T4 a été enregistrée.

Pour la moyenne de deux sites, la réduction de la sévérité de *R. solanacearum* est enregistrée sur T4 avec une réduction de 63%, ensuite, le traitement T2 avec une réduction 48 %, et enfin le traitement T3 de 36%.

Tableau 9: Pourcentage de l'incidence et sévérité du flétrissement bactérien par traitement

Traitement du sol	Pourcentage de pieds flétris (%)			Réduction (%) **			Pourcentage de sévérité du flétrissement bactérien (%)			Réduction (%) **			
	Site	Mandritsara	Alakamisy Anativato	Moyenne	1	2	M	Mandritsara	Alakamisy Anativato	Moyenne	1	2	M
T1		12,50 ± 1,44 a	15,83 ± 2,20 a	14,17 ± 1,39 a	10,67 ± 0,88 a	13,67 ± 1,76 a	12,17 ± 1,11 a
T2		5,83 ± 0,83 bc	8,33 ± 0,83 bc	7,08 ± 0,77 bc	53	47	50	5,33 ± 0,33 bc	7,33 ± 0,74 b	6,33 ± 0,58 bc	50	46	48
T3		9,17 ± 0,83 ab	11,67 ± 1,67 ab	10,42 ± 1,00 b	27	26	26	6,83 ± 0,44 b	9,17 ± 1,20 ab	8,00 ± 10,77 b	36	36	36
T4		4,17 ± 0,83 c	4,17 ± 0,83 c	4,17 ± 0,53 c	67	74	71	3,75 ± 0,72 c	5,21 ± 1,37 b	4,48 ± 0,76 c	65	62	63
P-value (site)		-	-	0,002				-	-	0,008			
P-value (traitement)		0,002	0,003	<0,0001				<0,0001	0,0011	<0,0001			
P-value (site*traitement)			-	ns				-	-	ns			

* Données collectées à 8 semaines de la plantation de la pomme de terre, les moyennes avec les mêmes lettres de l'alphabet ne diffèrent pas significativement à $p \geq 0,05$

**Réduction de pourcentage de plants flétris sur chaque traitement

T1 : monoculture de pomme de terre (témoin), T2 : mulching + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple), T3 : engrais vert + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple) T4 : association *Crotalaria spectabilis* x pomme de terre (ligne alternée simple)

1 : Abréviation du site Mandritsara, 2 : Abréviation du site Alakamisy Anativato, M : Moyenne

4.2.2. Pourcentage de tubercules pourris

Le pourcentage de tubercules pourris à la récolte est significativement ($p < 0,05$) différent entre les traitements et non entre les sites, ni entre l'interaction site et traitement (Tableau `10).

Dans le site de Mandritsara, une baisse significative ($p < 0,05$) de 84%, 89% et 91% du pourcentage de tubercules pourris par rapport au témoin est respectivement enregistrée pour les traitements T3, T2 et T4. Aucune différence significative du pourcentage de tubercules pourris n'est observée entre les lots traités aux espèces de crotalaires (Tableau `10).

Dans le site d'Alakamisy anativato, les systèmes associés avec crotalaires affichent également des taux en tubercules pourris significativement ($p < 0,05$) plus bas par rapport au lot témoin, avec un écart négatif, respectif de 61%, 80% et 96% pour T3, T4 et T2. Sur l'ensemble des deux sites, un écart significatif ($p < 0,05$) et négatif de moins de 76%, 87% et 92% du pourcentage moyen de tubercules pourris est observé dans pour T3, T4 et T2 par rapport au lot témoin.

Tableau 10: Pourcentage de tubercules pourris à 12 semaines de la plantation de la pomme de terre

Traitement du sol	Pourcentage de tubercules pourris (%)			Reduction (%)		
	Mandritsara	Alakamisy anativato	Moyenne	1	2	M
T1	13,53 ± 1,82 a	8,47 ± 5,97 a	11,00 ± 3,01a			
T2	1,33 ± 1,33 b	0,38 ± 0,38 a	0,86 ± 0,66 b	84	96	92
T3	2,10 ± 2,10 b	3,28 ± 1,66 a	2,69 ± 1,23 b	89	61	76
T4	1,22 ± 1,22 b	1,68 ± 1,68 a	1,45 ± 0,93 b	91	80	87
P-value (traitement)	-	-	ns			
P-value (site * traitement)	-	-	-			

* Données collectées pendant la récolte de la pomme de terre, les moyennes avec les mêmes lettres de l'alphabet ne diffèrent pas significativement à $p \geq 0,05$, **Reduction de pourcentage de plants flétris sur chaque traitement

T1 : monoculture de pomme de terre (témoin), T2 : mulching + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple), T3 : engrais vert + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple) T4 : association *Crotalaria spectabilis* x pomme de terre (ligne alternée simple)

1 : Abréviation du site Mandritsara, 2 : Abréviation du site Alakamisy Anativato, M : Moyenne

IV.3. Evolution des propriétés physico-chimiques du sol

A la fin de l'expérimentation (12 semaines après la plantation de la pomme de terre), un léger accroissement des concentrations en carbone (12,2%), en matière organique (39%) et en azote (17,9%) a été observé dans le sol du système associé par comparaison au sol de la monoculture de pomme de terre.

IV.4. Caractérisation biochimique et détermination du type de biovars des souches présumées de *R. solanacearum*

Les résultats des tests biochimiques ont révélé que dans les deux sites d'essai agronomique, les bactéries isolées sont de GRAM négatif, a catalase positif, oxydase positif et test de KOH positif.

Les isolats bactériens sont capables d'utiliser les disaccharides maltose, lactose, cellobiose et les hexoses alcools mannitol, sorbitol, dulcitol excepté l'inositol et appartiennent ainsi au **biovars 3**.

IV.5. Caractérisation moléculaire des souches présumées de *R. solanacearum*

Le profil électrophorétique sur gel agarose du produit issu respectivement de l'amplification par PCR et par Multiplex PCR des souches bactériennes isolées dans les sites d'essai a généré le fragment de 280pb, spécifique au complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* et le fragment 144pb correspondant au phylotype I, originaire d'Afrique (figures 16 et 17).

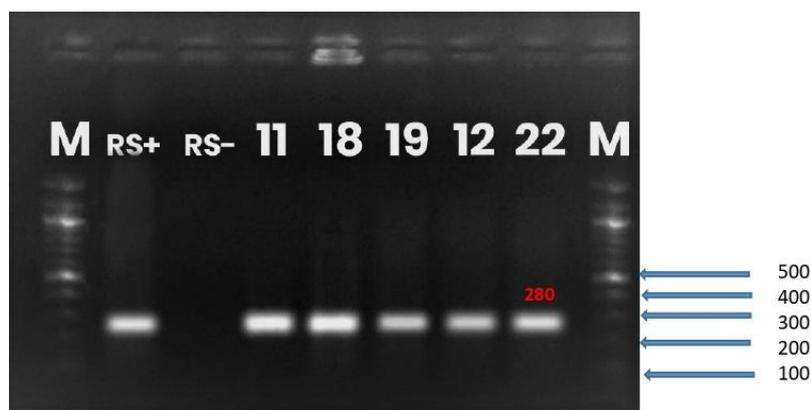


Figure 16 : Profil électrophorétique sur gel agarose du produit d'amplification par PCR des isolats bactériens

M : marqueur de taille, RS+ : souche référence de *R. solanacearum*, RS- : souche négative de *R. solanacearum*, 18 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Alakamisy anativato, Betafo, 22 : souche de *Ralstonia solanacearum* isolée dans le site de Mandritsara, Betafo.

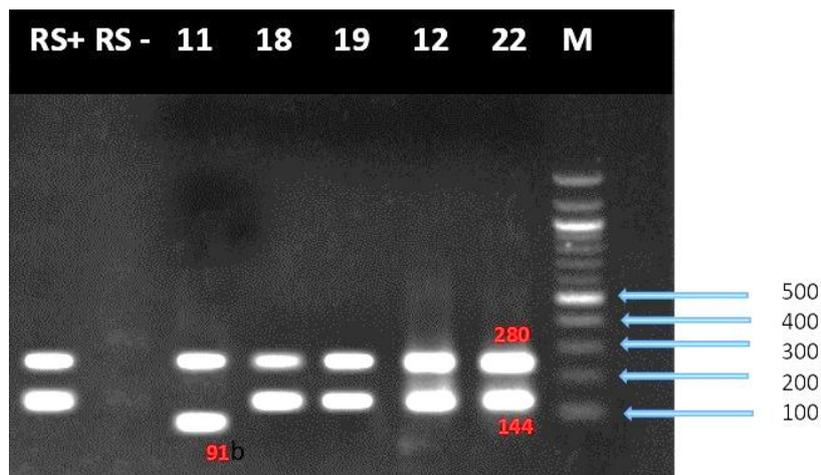


Figure 17 : Profil électrophorétique du produit d'amplification par Multiplex PCR des isolats de *Ralstonia solanacearum*

M : marqueur de taille, RS+ : souche référence de *Ralstonia solanacearum*, RS- : souche négative de *Ralstonia solanacearum*, 18 : souche de *Ralstonia solanacearum* isolée dans le site d'Alakamisy anativato, Betafo, 22 : souche de *Ralstonia solanacearum* isolée dans le site de Mandritsara, Betafo

IV.6. Evaluation participative des systèmes de culture

Les systèmes de culture de la pomme de terre à base de crotalaire pérenne (*Crotalaria grahamiana*) ont fait l'objet d'évaluation participative par des acteurs locaux (producteurs, transformateurs, techniciens, décideurs...) répartis dans 5 Districts (Betafo, Antsirabe II, Antanifotsy, Ambatolampy, Faratsiho) de la région Vakinankaratra.

Sur les 145 participants à cette évaluation, dont 44% sont de sexe féminin, 75% ont évalué ces systèmes de culture comme très efficaces, hautement praticables, économiquement profitables et très respectueux de l'environnement.

V. DISCUSSION

L'association de la pomme de terre avec la légumineuse a permis de stimuler la croissance de la pomme de terre. La hauteur moyenne de tige est de 21 % et de 57 % plus élevée que le système monoculture. Le poids frais des tiges des plants de pomme de terre à 10 semaines de la plantation sont respectivement supérieurs de 43 % et 208 % dans le lot associé par rapport à la monoculture. Les effets positifs de l'association se reflètent également sur le nombre et le poids frais de tubercules totaux et de tubercules commercialisables de la pomme de terre. En moyenne, le poids frais de tubercules totaux est de 107 et 144% et de tubercules commercialisables est 98% et 170% plus élevés dans le lot associé par rapport à la monoculture (Tableau 11).

La stimulation de la croissance de la pomme de terre peut s'expliquer par des effets positifs de l'association sur les propriétés physico-chimiques du sol conduisant à une amélioration de l'absorption de nutriments. En effet, l'absorption d'azote, de phosphore et de potassium dans les parties aériennes à ce stade sont plus élevées dans le lot associé par rapport à la monoculture. En outre, les concentrations en matière organique et en azote de sol sont légèrement plus élevées dans le sol du lot associé à la fin de l'expérimentation.

Des effets positifs de l'association de la pomme de terre avec des légumineuses sur la croissance des plants de pomme de terre résultant d'une amélioration des propriétés physico-chimiques du sol ont été rapportés par d'autres auteurs (GITARI et al., 2018 ; GITARI et al., 2019 ; NAYAWADE et al., 2019).

Par ailleurs, l'association de la pomme de terre avec *Crotalaria* a révélé des effets protecteurs contre le flétrissement bactérien causé par *R solanacearum* phylotype I, biovar 3. Au niveau de l'association avec *Crotalaria spectabilis*, un retard de l'apparition des symptômes a été constaté, une baisse significative de l'incidence jusqu'à 71% et de la sévérité, jusqu'à 63% du flétrissement bactérien des plants de pomme de terre en cours de végétation ainsi qu'une réduction marquée du taux de tubercules pourris à la récolte jusqu'à 87% ont été observées. Au niveau de l'association avec *Crotalaria grahamiana*, un retard de l'apparition des symptômes a été également constaté, une baisse significative de l'incidence jusqu'à 50% et de la sévérité, jusqu'à 48% du flétrissement bactérien des plants de pomme de terre en cours de végétation ainsi qu'une réduction marquée du taux de tubercules pourris à la récolte (92%) ont été observées (Tableau 11).

Tableau 11: Pourcentage moyenne de l'augmentation de production et la réduction de l'infestation du flétrissement bactérien sur les systèmes associés dans les deux sites

Traitem ent	Ht.	Nb. Tige	Biom.	Augmentation (%)				Réduction (%)		
				Tubs totaux		Tubs com		Inc	Sév	Tub pourris
				Nb	Poids	Nb	Poids			
T2	51	79	208	62	144	78	170	50	48	92
T3	65	51	43	68	107	79	98	26	36	76
T4	57	83	112	70	128	85	159	71	63	87

T2 : mulching + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple), T3 : engrais vert + association *Crotalaria grahamiana* x pomme de terre (ligne alternée simple) T4 : association *Crotalaria spectabilis* x pomme de terre (ligne alternée simple)

Ht : hauteur de tige, Nb tige : nombre de tige par pied, Biom, : biomasse aérienne par pied, tubs totaux : tubercules totaux, Nb : nombre, Tubs.com : tubercules commercialisables, Inc : incidence, Sév : sévérité, Tub pourris : tubercules pourris.

Ces observations corroborent celles d'une expérimentation réalisée sur un champ endémiquement infesté de flétrissement bactérien en Ouganda portant sur l'évaluation des effets de *Crotalaria falcata* valorisé en tant que jachère ou culture associée de la pomme de terre. Une réduction significative de 85% de l'incidence du flétrissement bactérien au cours de la végétation et de 94% du pourcentage de tubercules pourris à la récolte a été reportée avec la jachère de *Crotalaria falcata*. En outre, une suppression d'infection latente dans les tubercules fut observée après 6 à 12 mois d'association de la pomme de terre avec cette espèce de Crotalaire (KAKUHENZIRE et al., 2013).

Par ailleurs, une expérimentation au champ réalisée à la Martinique a révélé des effets protecteurs de la culture de *Crotalaria spectabilis* et de *Crotalaria juncea* en précédent cultural contre le flétrissement bactérien de la tomate, se manifestant par un retardement de 25 jours l'apparition des symptômes et la réduction jusqu'à 70% du taux d'incidence de la maladie (DEBERDT et al., 2014).

Outre l'amélioration des caractéristiques physico-chimiques du sol, les espèces de *Crotalaria* spp sont également reconnues pour leur effet suppressif sur les nématodes phytoparasites (OPINA et al., 1997). En effet, ces espèces sont généralement des hôtes non privilégiés ou des non hôtes d'un grand nombre de nématodes phytoparasites, sécrétant un composé allélopathique (pyrolizidine), toxique pour les nématodes et les bactéries (JOOSTEN et al., 2011 ; WAGURA et al., 2011). De plus, ils sont capables de stimuler la croissance de microorganismes antagonistes des nématodes, prévenant ainsi l'infection du flétrissement bactérien via les blessures occasionnées par les morsures des nématodes (DESAEGER et RAO, 2000).

Par ailleurs, d'autres travaux ont rapporté que l'augmentation de la matière organique du sol est corrélée avec la croissance de bactéries facultatives telles que *Clostridium sp*, et *Bacillus sp* qui entrent en compétition avec les souches de *R solanacearum* (MESSIHA et al., 2007 ; NGUYEN et al., 2010).

Mais au niveau des deux espèces, l'espèce *Crotalaria spectabilis* a donné un bon résultat par rapport au *Crotalaria grahamania* au niveau de poids, au niveau de nombre de tubercules et la protection de la pomme de terre. Ceux-ci peuvent être due aux qualités de composition allélopathique de *Crotalaria spectabilis* et aux éléments nutritifs apportés par chaque espèce.

Ces effets protecteurs de *Crotalaria* contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre peuvent être associés d'une part à l'amélioration de la résistance de la variété Meva de pomme de terre en relation avec l'amélioration de la nutrition et d'autre part à des effets inhibiteurs de la croissance de *R. solanacearum* dans le sol à travers la modification de la diversité et de la

composition des communautés microbiennes du sol et/ou la stimulation de la croissance de souches antagonistes spécifiques à *R. solanacearum* (ELPHINSTONE, 2005).

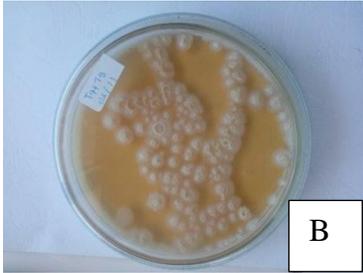
V. CONCLUSION PARTIELLE

La présente expérimentation a permis de mettre en évidence le potentiel de biocontrôle contre le flétrissement bactérien dû au complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* de la légumineuse de couverture *Crotalaria spectabilis* et *Crotalaria grahamiana* cultivée en association culturale avec la pomme de terre sur andosol. Le système associé a permis de réduire respectivement l'incidence et la sévérité du flétrissement bactérien au cours de la végétation de la pomme de terre et le pourcentage de tubercules pourris lors de la récolte, le système associé avec *Crotalaria spectabilis* a permis de réduire l'incidence, la sévérité et de poids de tubercules pourris. L'effet protecteur contre le flétrissement bactérien semble être couplé à un effet améliorant de la structure du sol et de l'absorption en nutriments des plants de pomme de terre conduisant à une amélioration de nombre et poids de tubercules. Le système associé avec *Crotalaria grahamiana* (mulching) a montré la meilleure augmentation de 144% pour poids de tubercules totaux et de 170% pour tubercules commercialisables.

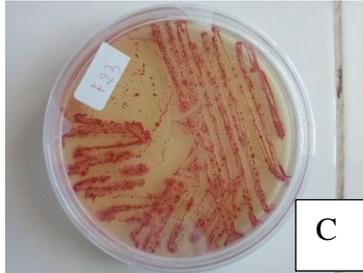
**CHAPITRE 3. EVALUATION DU POTENTIEL
DE BIOCONTROLE DE SOUCHES NATIVES
D'ACTINOMYCETES CONTRE LE
FLETRISSEMENT BACTERIEN (*Ralstonia
solanacearum*) DE LA POMME DE TERRE**



A



B



C



D



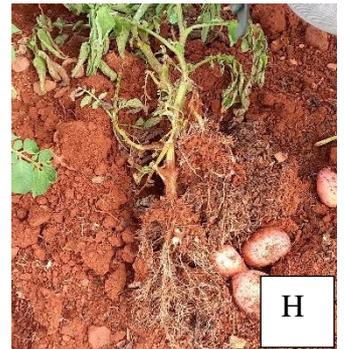
E



F



G



H

Planche 3: Différents étapes pour l'évaluation des souches d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien *Ralstonia solanacearum*

A : Test des bioformulation à base d'actinomycètes sur la culture de la pomme de terre en serre, B : Culture d'actinomycètes sur boîte de pétri, C : souche de *Ralstonia solanacearum*., D : formulation pestagranule. E : Mise en place du dispositif expérimental au champs, F : plant de pomme de terre flétri au champs, G : Développement de la pomme de terre en plein champs, H : Récolte d'un pied de pomme de terre.

Une partie de ce chapitre a été soumise et communiquée oralement à l'Akademia Malagasy le 21 Mars 2024.

« Evaluation du potentiel de biocontrôle de souches d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre. »

Andriamiarisoa Lovaniaina Dinanirina ¹, Rakotoniaina Andry Mampionona ², Radanielina Tendro ⁴, Nirina Rakotoarimanga ³, Volatsara Baholy Rahetlah ⁵.

I. RESUME

A Madagascar, le flétrissement bactérien causé par le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* est une maladie grave de la pomme de terre. Des souches natives d'actinomycètes ont été isolées à partir de sols rhizosphériques de pomme de terre à des fins de production de biopesticides microbiens. Sur 84 souches d'actinomycètes isolées qui se sont avérées antagonistes aux souches de *R solanacearum*, 4 souches ont affiché la plus forte activité antagoniste *in-vitro* avec un diamètre d'halo d'inhibition jusqu'à 30mm.

Lors d'une expérimentation en serre, un bioinoculant à base terreau et de souche unique d'actinomycète antagoniste (A1S13, B7S5, D2S9) et capable de solubiliser le phosphate a été évaluées. L'application de ce bioinoculant a montré des effets protecteurs contre le flétrissement bactérien de la variété Mevamena de pomme de terre, avec une réduction respective jusqu'à 60% et 76% du taux de flétrissement, en plus d'un effet positif sur la croissance, avec une augmentation jusqu'à 54% du rendement en tubercules totaux.

Les souches les plus prometteuses (A1S13, B7S5) ont été testées sur le terrain, dans le District d'Ambatolampy, région de Vakinankaratra. L'application de bioinoculants à base de souche unique d'actinomycète antagoniste A 1S13 et des souches consortiums a révélé des effets protecteurs contre le flétrissement bactérien de la variété Mevamena de pomme de terre, avec une baisse allant respectivement jusqu'à 70% et 58% du taux de flétrissement, associée à une augmentation respectivement jusqu'à 57% et 43% du rendement en tubercules.

Mots-clés : antagoniste, biopesticide, biostimulant, flétrissement bactérien, lutte biologique, pomme de terre, *Ralstonia solanacearum*.

II. INTRODUCTION

Le flétrissement bactérien causé par le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* est une importante maladie des cultures maraîchères dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes (BUDDENHAGEN *et al.*, 1962). A Madagascar, cette maladie est un facteur limitant de la production des Solanacées maraîchères telles que la pomme de terre, la tomate, l'aubergine mais également d'autres cultures d'importance économique dont le géranium (IPHINSTONE, 2005). Elle est devenue endémique dans de nombreuses zones de production de la pomme de terre sur les Hautes Terres provoquant des dégâts considérables et des pertes pouvant atteindre 100% de la récolte (CEFFEL, 2012).

La lutte chimique contre cette maladie est absente, l'efficacité de la lutte génétique est limitée par la variabilité génétique de *R. solanacearum* et le caractère instable des propriétés de résistance de la plante hôte résultant d'une interaction complexe entre l'hôte, le pathogène et l'environnement (HAYWARD, 1964).

Ces dernières années, une multitude de microorganismes antagonistes des maladies végétales ont été identifiés (WHIPPS et LUMSDEN, 1991). Parmi eux, les actinomycètes se distinguent en tant qu'agents potentiels stimulant la croissance et contrôlant les maladies des plantes (BAKER, 1988). Leur capacité à synthétiser des phytohormones et à solubiliser le phosphore les classe parmi les biostimulants reconnus. De plus, ils agissent en tant qu'agents de biocontrôle pour gérer diverses maladies du sol, en produisant des composés antibiotiques, des sidérophores, du cyanure d'hydrogène (HCN) et des enzymes hydrolytiques (EL-TARABILY *et al.*, 2009 ; DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010 ; PASSARI *et al.*, 2015).

Il est indéniable qu'il serait extrêmement bénéfique de pouvoir compter sur des actinomycètes à la fois protecteurs contre le complexe *Ralstonia solanacearum* et stimulant la croissance de la pomme de terre. Les résultats que nous nous proposons de présenter démontrent qu'il est effectivement possible de trouver de telles souches.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude, qui vise à évaluer *in vitro*, *in vivo* et en milieu réel le potentiel des souches natives d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre causé par le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Isolement et caractérisation des souches du flétrissement bactérien *Ralstonia solanacearum*

La souche bactérienne de *Ralstonia solanacearum* est isolée à partir de tubercules pourris de la pomme de terre, codée F 18 provenant du site Mandritsara du District de Betafo de la région de Vakinankaratra. L'isolement a été effectué au sein du laboratoire de Phytopathologie de la Direction de la Protection des Végétaux.

L'inoculum utilisé est issu d'une culture âgée de 48h au plus, incubée à $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, avec une concentration d'environ $2,54 \times 10^9$ CFU/ml (Figure 14). Les différentes étapes de culture ont été déjà détaillées dans le chapitre II (Figure 19).

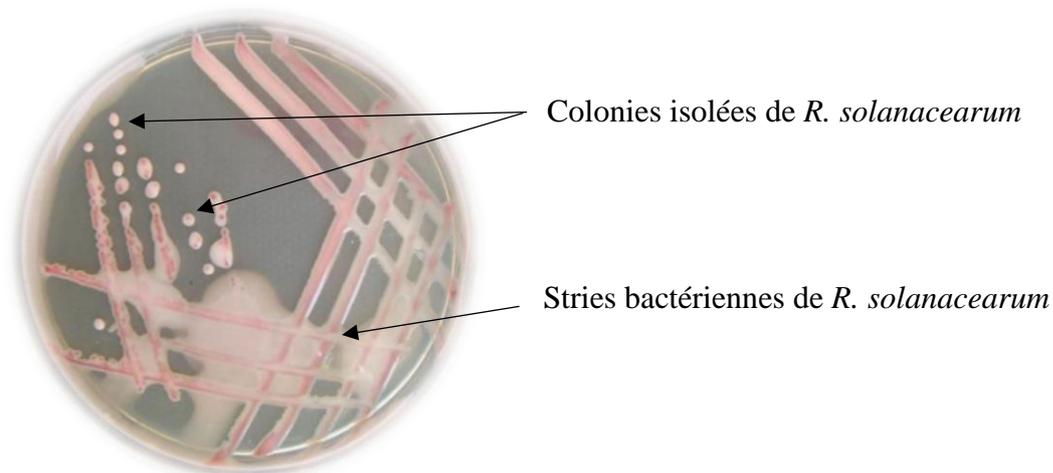


Figure 18: Culture pure de la souche bactérienne *Ralstonia solanacearum* de pomme de terre
Source : Auteur

III.2. Isolement des souches d'actinomycètes à partir de sols rhizosphériques de pomme de terre

Les souches d'actinomycètes se trouvent en grande quantité au niveau des sols rhizosphériques de culture des pommes de terre au niveau de racine, indemne de *Ralstonia solanacearum*. Ainsi des échantillons de sols ont été prélevés sur différentes zones de culture de pomme de terre de la région de Vakinankaratra. L'isolement et la sélection des actinomycètes antagonistes de *Ralstonia solanacearum* à partir d'échantillons de sols de la région ont été réalisées au niveau de Laboratoire de microbiologie de CNRE Madagascar.

3.2.1. Echantillonnage des sols rhizosphériques

Les échantillons de sols rhizosphériques de la pomme de terre ont été collectés répartis dans cinq sites situés dans les quatre districts de la Région Vakinankaratra. Pour chaque échantillon, 500g de sol ont été prélevés à une profondeur de 10 cm à 20 cm, au niveau de la rhizosphère. Les sites d'échantillonnage est donc composé de Antsirabe II (A), Betafo (B), Antanifotsy (C) et Faratsiho (D) avec des sols de Tanety et bas fond.

3.2.2. Isolement des souches d'actinomycètes

A l'arrivé au laboratoire, les sols collectés sont séchés à l'air libre puis tamisés à 2 mm après broyage. 5g de sol rhizosphérique pour chaque échantillon, ont été pesés et placés dans 45 ml d'eau distillée stérilisée pour créer une suspension bactérienne. Cette suspension a été homogénéisée sur un agitateur magnétique pendant 15 minutes, constituant ainsi une dilution de 10^{-1} . Ensuite, après agitation, 100 μ l de la dilution 10^{-1} ont été prélevés et mélangés avec 900 μ l d'eau distillée stérilisée pour obtenir une dilution de 10^{-2} . Ce processus de dilution en cascade a été répété jusqu'à atteindre une dilution de 10^{-4} (RAKOTOARIMANGA *et al.*, 2014).

Chaque solution diluée à 10^{-3} et 10^{-4} a ensuite été ensemencée et étalée sur le milieu de culture Waksman (Annexe 2), spécifique pour actinomycète. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 28°C pendant 7 jours. Les isolats ont été observés macroscopiquement pour leur identification et leur différenciation, en tenant compte de leur forme, aspect, taille, couleur du mycélium végétatif, couleur du mycélium aérien, ainsi que d'autres caractéristiques telles que la production de pigment diffusible (WILLIAMS *et al.*, 1971). Un numéro de code attribué à chaque colonie d'actinomycète observée a permis de désigner chaque souche.

Après l'observation macroscopique, chaque colonie d'isolat d'actinomycètes a été repiquée sur le milieu de culture à l'aide d'un cure-dent stérilisé. Toutes les boîtes ont été ensuite incubées dans une étuve à 30°C pendant 7 jours.

III.3. Test d'antagonisme au laboratoire

Il est primordial d'évaluer *in vitro* du potentiel bioprotecteur des souches d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre avant les différentes expérimentations en serre et au niveau de milieu réel.

3.3.1. Technique par inondation ou culture en nappe

La surface entière du milieu Yeast Pepton Glucose Agar (YPGA) solide dans une boîte de pétri a été inondée par 10ml de l'inoculum de 10^8 UFC/ml de *R. solanacearum*. La culture a été incubée dans une étuve à 30°C pendant 15mn afin que les souches puissent adhérer à l'intérieur du milieu. Puis, l'excès de liquide a été aspiré à l'aide d'une pipette graduée stérilisée et le milieu a été séché pendant 15mn dans une étuve à 30°C. Ensuite, les isolats d'actinomycète ont été déposés en spots à la surface des boîtes de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 72h. Après incubation, la présence de zone d'inhibition (zone claire sans coloration rosâtre autour des isolats testés) a été notée et le diamètre d'inhibition a été mesuré à l'aide d'une règle graduée millimétrée (Figure 20). Les résultats ont été exprimés suivant les normes ci-après (Tableau 12).

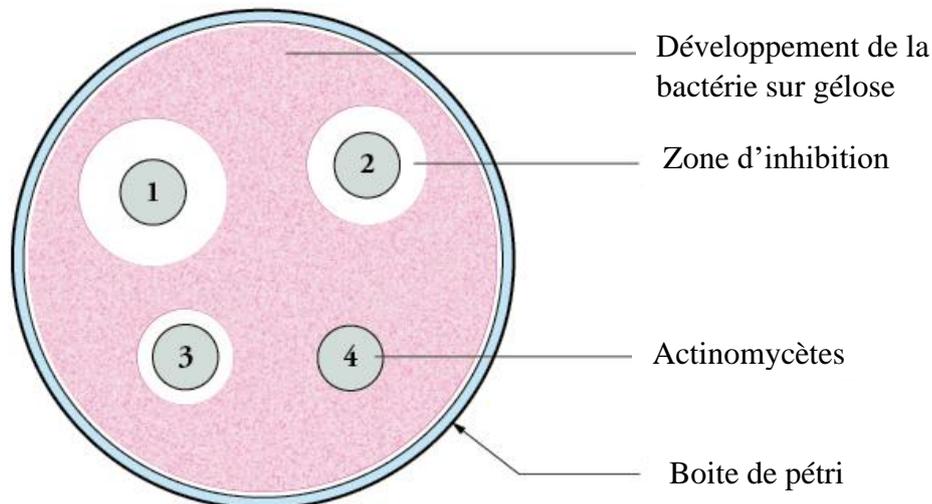


Figure 19: Test antagonisme des actinomycètes
Source : <https://microbiologie-clinique.com/antibiogramme.html>

Tableau 12: Normes utilisés pour la méthode de diffusion sur gélose

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

(ADESINA et al., 2007)

3.3.2. Capacité des actinomycètes à synthétiser des auxines

Les actinomycètes peuvent synthétiser les auxines en particulier l'Acide Indol Acétique (AIA) à partir du tryptophane par différentes voies bien que le mécanisme général de sa synthèse soit

essentiellement le métabolisme du tryptophane (BHATTACHARYYA *et al.*, 2012). La principale auxine active AIA est impliquée dans la formation des racines, la division et l'accroissement des cellules (SALISBURY, 1994) Cette capacité peut permettre de classer les actinomycètes comme Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ou Rhizobactérie promotrice de la croissance de la plante. La production de l'AIA par les souches d'actinomycètes est testée selon le protocole de (BRIC *et al.*, 1991), la fermentation était réalisée en utilisant le milieu LB (annexe 3) additionné de 500µg/ml de tryptophane, dans un volume de 50 ml. Le milieu est ensemencé par 100 µl d'une culture d'actinomycètes jeune, les flacons sont incubés à 30°C pendant 96 h avec 100 rpm,. Après incubation, 10 ml de chaque culture sont centrifugés pendant 20 min à 3800 rpm, 1 ml du surnageant est additionné à 3 ml du réactif de Salkowski (annexe 4). Une demi-heure plus tard d'incubation à l'obscurité, Le développement d'une couleur rose indique la production de l'AIA.

3.3.3. Test de solubilisation du phosphate

Des souches d'actinomycètes ont été ensemencées par touches sur milieu PVK (PIKOVSKAYAS, 1948) solide contenant le $(Ca_3PO_4)_2$ comme source de phosphate a raison de 4 souches par boîte de pétri. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant une semaine. Après incubation, le diamètre d' halo ainsi que la colonie d'actinomycètes ont été mesurées (Figure 21).

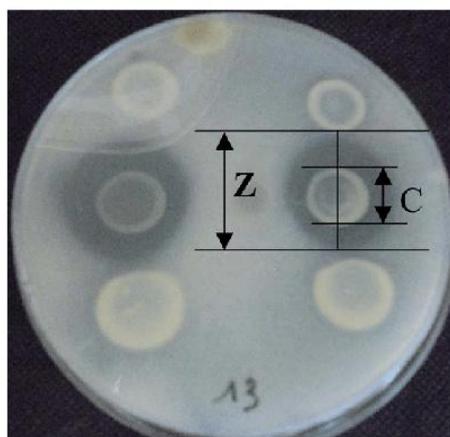


Figure 20: Technique de mensuration de diamètre de halo sur la solubilisation de phosphate
 C = diamètre de colonie bactérienne (mm), Z = diamètre de zone ou halo (mm)

La mesure des diamètres des halos est réalisée par l'équation suivante :

$$\text{Diamètre total} = \text{Diamètre de la colonie} + \text{Diamètre du halo}$$

$$\text{Donc : Diamètre de halo} = \text{Diamètre total} - \text{Diamètre de la colonie}$$

3.3.4. Conservation des actinomycètes

Pour chaque souche d'actinomycètes antagonistes obtenue, une copie a été conservée afin d'assurer leur disponibilité en cas de contamination en cours de manipulation ou bien pour les utilisations ultérieures.

Dans des tubes vissés contenant le milieu AIA incliné à 45°, les isolats d'actinomycètes antagonistes ont été repiqués par des stries d'épuisement parallèles de manière à avoir des colonies abondantes. Les couvercles des tubes de collection ont ensuite été scellés à l'aide d'un parafilm. L'incubation a été effectuée à 30°C jusqu'à l'apparition des colonies puis, les tubes ont été stockés à +4°C. Cette méthode permet de garder les isolats viables jusqu'à plusieurs mois sans repiquage et sans mutation.

III.4. Bioformulation des souches d'actinomycètes

Le processus de formulation joue un rôle crucial dans l'efficacité des produits en améliorant la survie et l'efficacité de l'agent microbien (MARTINEZ-ALVAREZ *et al.*, 2016).

Trois formulations ont été préparées pour cette étude dont la formulation liquide avec de l'eau peptonée, la formulation solide format pestagranules avec farine et argile verte et la formulation solide avec la carrière terreau. (Annexe 2).

3.4.1. Test de pureté et viabilité des Isolats d'actinomycètes dans les bioformulations

La pureté des souches d'actinomycètes sur les différentes bioformulations a été vérifiée après les processus de formulation.

Une quantité de 0,2 g de chaque formulation a été mélangée dans 4 ml d'eau distillée stérile pendant 1 minute pour obtention de suspension de spores. 0,1 ml de cette suspension a été inoculé sur milieu Actinomyces Isolation Agar (AIA), qui a ensuite été incubé à 30°C pendant 7 jours. Après d'incubation, les cultures ont été examinées pour détecter toute contamination microbienne.

La viabilité des spores formulées a été déterminée à des intervalles d'un mois pendant une période de stockage de huit mois. Les spores viables des souches d'actinomycètes cultivées sur milieu AIA ont été déterminées en comptant le nombre de colonie CFU/g à l'aide de la méthode de la plaque de comptage (MARTINEZ-ALVAREZ *et al.*, 2016), trois répétitions ont été réalisées pour chaque formulation.

III.5. Expérimentation en serre

Une expérimentation a été menée dans la serre de la Direction de la Protection des Végétaux pour tester l'efficacité de la bioformulation terreau avec les isolats d'actinomycètes. Elle s'est déroulée en mars 2023, sur une période de quatre mois. Les conditions environnementales de la serre ont été maintenues à une température constante entre 28 et 30°C, recréant ainsi un climat propice à la croissance des plantes. La serre a bénéficié de l'éclairage naturel du soleil pendant la journée, procurant aux végétaux les conditions lumineuses nécessaires à leur développement optimal.

3.5.1. Préparation du sol

Le sol utilisé dans cet essai provient du site expérimental de la DPV où il n'y pas de contamination de *Ralstonia solanacearum*. Pour éviter la contamination des autres microorganismes du sol, le sol a été préalablement tamisé à 5 mm et stérilisé sous étuve à 80°C pendant une heure.

3.5.2. Inoculation de *Ralstonia solanacearum*

Elle a été faite artificiellement car la quantification précise de la densité d'inoculum bactérien est difficile à évaluer dans les sols naturels. L'inoculum de *Ralstonia solanacearum* utilisé est un liquide légèrement trouble conditionné dans des erlenmeyers de 1l. Il s'agit de 9,9 litres d'eau permutée stérile ayant une concentration de 8 ‰ de chlorure de sodium (NaCl). Il y est ajouté 100 ml de bouillon constitué de 99 ml d'eau physiologique et 1 ml d'une culture de la souche codée F18, une souche de *Ralstonia solanacearum* provenant du site Mandritsara sur milieu liquide LPGA (Annexe 3).

Avant le semis, les sols (témoins positifs) sont d'abord inoculés par la souche *Ralstonia solanacearum* avec une quantité de 5ml de solution trouble de *Ralstonia solanacearum* contenant $2,5 \times 10^9$ UFC/ml dans chaque pot.

3.5.3. Choix et inoculation de bioformulation

Les formulations solides avec la carrière-terreau a utilisée pour l'essai en serre parce que par rapport au formulation liquide, la formulation solide est facile à stocker et à transporter, ainsi que de leur durée de conservation est prolongée (TAMREIHAO et al., 2016).

Dans le processus de préparation de la bioformulation, une suspension d'actinomycète contenant $2,4 \times 10^9$ CFU a été mélangée avec 80g de terreau. La préparation de la formulation terreau ne requiert pas de préparation complexe, mais simplement une stérilisation par UV.

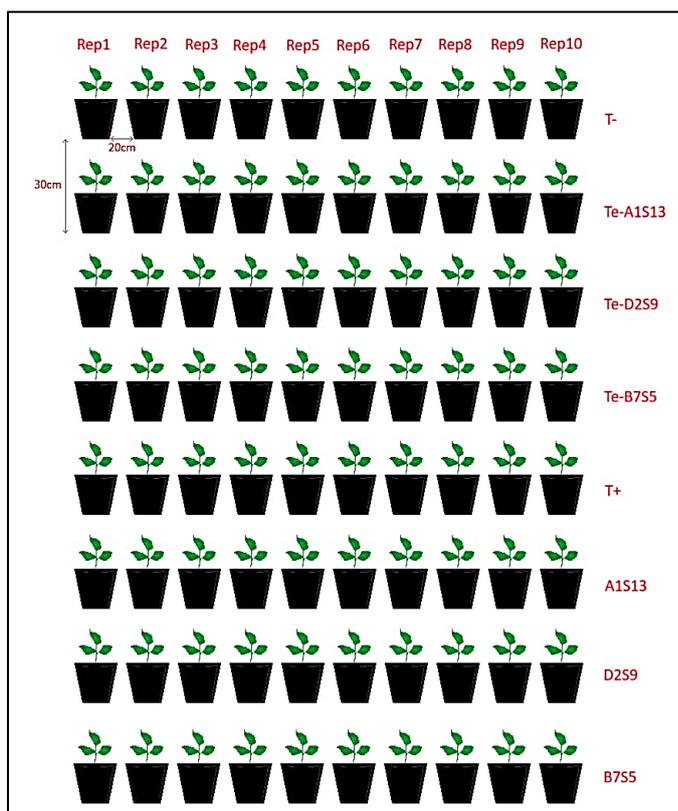
3.5.3. Variété de pomme de terre et semis

La variété Meva a été sélectionnée en raison de ses caractéristiques distinctives. Cette variété est particulièrement appréciée par les producteurs en raison de ses qualités agronomiques, notamment sa précocité avec un cycle cultural de 150 jours, son aptitude à la friture, sa capacité de stockage et sa haute valeur marchande. La variété Meva présente une sensibilité moyenne au flétrissement bactérien. La caractéristique de la variété est détaillée sur Annexe 1.

Les tubercules-semences de cette variété ont été fournis par une coopérative spécialisée dans la production de semences de base à Antsirabe.

3.5.5. Dispositif expérimental et traitement

Les dispositifs est un bloc aléatoire complet composée de 8 traitements avec des témoins négatifs sans inoculum de *Ralstonia solanacearum* et des témoins positifs avec inoculum *Ralstonia solanacearum* (Figure 22). Les plants flétris pendant l'expérimentation ont été remplacés surtout pour les plants témoins pour la mesure de la hauteur et les rendements des plants par traitement.



Les traitements sont constitués de :

T- : Témoin négatif sans souche d'actinomycète

Te_ A1S13 : Témoin négatif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète A1S13

Te_ D2S9 : Témoin négatif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète D2S9

Te_ B7S5 : Témoin négatif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète B7S5

T+ : Témoin positif composé uniquement de terreau sans souche d'actinomycètes

A1S13 : Témoin positif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète A1S13

D2S9 : Témoin positif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète D2S9

B7S5 : Témoin positif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète B7S5

Figure 21 : Dispositif expérimental en serre

Source : Auteur

3.5.6. Evaluation de l'efficacité des souches d'actinomycète sur la croissance production de pomme de terre

Les paramètres de croissance ont été mesurés à la fin de la période végétative, jusqu'au stade de maturation des tubercules. Chaque traitement a été soumis à des mesures de la hauteur des plants et pesage des tubercules.

3.5.7. Evaluation de l'efficacité de l'actinomycète sur la lutte contre *Ralstonia solanacearum*

L'incidence de la maladie (IM) des plantes inoculées par *Ralstonia solanacearum* ont été réalisés sur une période 8 semaines à compter du premier jour de plantation de pomme de terre. L'incidence de la maladie (IM) a été calculée par la formule suivante (WINSTEAD et KELMAN,1952)

$$\text{IM (\%)} = (\text{nombre de plantes infectées} / \text{nombre total de plantes}) \times 100$$

La sévérité du flétrissement bactérien a été suivie en utilisant une échelle de notation de 1 à 5 avec 1 = aucun symptôme, 2 = flétrissement de quelques feuilles jeunes au sommet, 3 = deux feuilles flétries, 4 = quatre ou plus de feuilles flétries et 5 = mort du plant)

La formule de sévérité est :

$$\text{Sévérité (100\%)} = \sum (pn) \times 100 / PN$$

Avec (p) = nombre de plants avec le score correspondant à la notation (n), P = la notation la plus élevée, N= nombre total de plants flétris

Les tubercules pourris sur chaque traitement ont été aussi comptée pour savoir la protection des souches d'actinomycètes jusqu'à la récolte.

3.5.8. Evaluation du potentiel infectieux de la bactérie *Ralstonia solanacearum* à partir des plants inoculés

Les plants présentant des symptômes de flétrissement ont été analysés en laboratoire afin de confirmer que les symptômes de flétrissement observés pendant leur développement végétatif sont dus aux infestations de *Ralstonia solanacearum*. Cette vérification a été effectuée à partir des plants de pomme de terre malade en serre, en isolant à nouveau la bactérie sur milieu CPG (contenant 1 g de casamino-acide, 10 g de peptone, 5 g de dextrose, 15 g d'agar dans 1 litre d'eau distillée), suivie de sa purification sur milieu LPGA (contenant 7 g de levure, 7 g de

peptone, 7 g de glucose, 15 g d'agar dans 1 litre d'eau distillée stérile) et les caractérisations biochimiques des souches obtenues (Coloration GRAM, Biovar).

III.6. Expérimentation en plein champs

3.6.1. Site expérimental

L'essai en milieu réel a été conduit dans un site, localisé dans le Fokontany d'Antanimbarilehibe (19°20'57''S ; 47°26'05''E, 1584m), dans la commune rurale de Manjakatampo, dans le district d'Ambatolampy, dans la région Vakinankaratra, sur les Hautes Terres de Madagascar au cours d'une campagne culturale (Novembre 2022 à Mars 2023). La précipitation et la température mensuelle moyenne sur 40 ans pour le district d'Ambatolampy sont présentées dans la figure 1. Les mois les plus pluvieux et les plus chauds sont les mois de janvier, février et décembre qui à comptent à eux seuls 60,4% de toutes les précipitations annuelles (1310mm). Les mois les plus secs et les plus frais sont les mois de juin, juillet et août (Figure 23).

Le type de climat est tropical d'altitude avec deux saisons bien distinctes, une saison sèche et fraîche allant de Mai à Septembre et une saison chaude et pluvieuse allant d'Octobre à Avril.

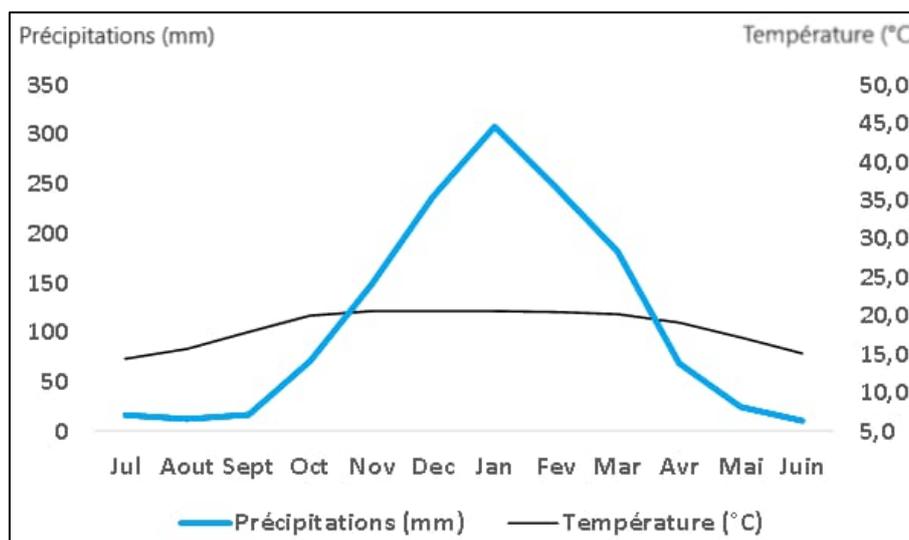


Figure 22: Valeurs moyennes de la précipitation et de la température mensuelle dans le district d'Ambatolampy

Source : DGM

Le type de sol dans le site d'essai est un sol ferrallitique, relativement riche en carbone et en azote, avec un rapport C/N satisfaisant et pauvre en phosphore et en potassium avec une texture limono-sableux (Tableau 13).

Tableau 13: Propriétés chimiques du sol dans le site expérimental

Site	pH	C%	N%	C/N	P (Bray II) ppm	K (meq/100g)
Antanimba rilehibe	4,77	3,93	0,305	13,0	2,5	0,204

3.6.2. Souches d'actinomycètes utilisées contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre

Dans le cadre de cette expérimentation, deux souches d'actinomycètes, codifiées respectivement Bioinoculant A1S13 et Bioinoculant B7S5 ont été choisies, disposant deux activités caractéristiques des Rhizobactéries favorisant la croissance des plantes ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), à savoir l'activité antagonistique vis-à-vis des agents phytopathogènes et l'activité de production de phytohormones stimulant la croissance et le développement de la plante hôte, en particulier l'acide indol-3-acétique ou l'activité de solubilisation des phosphates du sol ou d'amélioration de leur biodisponibilité.

3.6.3. Traitements et dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est un bloc aléatoire complet avec 6 traitements et a 3 répétitions. Les traitements sont constitués par :

Témoin : témoin, lot de pomme de terre fertilisé mais non inoculé,

Te_A1S13 : lot de pomme de terre inoculé avec 400kg ha⁻¹ de bioinoculant A1S13 et non fertilisé,

Te_B7S5 : lot inoculé avec 400kg ha⁻¹ de bioinoculant B7S5 et non fertilisé,

A1S13 : lot inoculé avec 400kg ha⁻¹ de bioinoculant A1S13 et fertilisé,

B7S5 : lot inoculé avec 400kg ha⁻¹ de bioinoculant B7S5 et fertilisé

Consortium : lot inoculé avec 400kg ha⁻¹ de consortium d'inoculants A1S13 et B7S5.

La variété de pomme de terre Meva, une des variétés les plus adaptées et les plus appréciées par les producteurs du District d'Ambatolampy a été adoptée pour l'expérimentation. Cette variété qui se prête particulièrement à la friture affiche une sensibilité moyenne au flétrissement bactérien dû aux souches de *R. solanacearum*.

Dans chaque parcelle élémentaire de 0,3 x 2,8 m², 40 plants de pomme de terre ont été plantés à écartements de 0,7 x 0,3 m. La fertilisation standard (fumure de fond : 10 t ha⁻¹ de fumier de ferme et 300kg ha⁻¹ d'engrais minéral NPK 11-22-16 ; fumure de couverture : 100kg ha⁻¹ d'urée 46%) a été uniformément apportée dans les parcelles, excepté pour les lots inoculés mais non fertilisés T2 et T3.

Dans les lots inoculés et fertilisés (T2, T3, T4 et T5), les doses de bioinoculants à base de souche unique d'actinomycète ont été apportées localement et en deux fractions, respectivement à la plantation et avant le premier buttage (6 semaines) de la pomme de terre.

Au cours de l'expérimentation, dans chaque parcelle élémentaire, les plants de pomme de terre présentant les symptômes typiques du flétrissement bactérien ont été arrachés au fur et à mesure, après confirmation au laboratoire de l'agent responsable de la maladie.

3.6.4. Isolement et caractérisation des souches de *R. solanacearum* à partir d'échantillons de plant et de tubercules de pomme de terre infectés

Des échantillons de plants flétris et de tubercules pourris de pomme de terre ont été respectivement prélevés à 8 semaines et à 12 semaines de la plantation. Les différentes étapes sont identiques à celles décrites sur le chapitre II dont :

- Isolement des souches *R. solanacearum* sur milieu semi-sélectif SMSA (modified Sequiera Medium South Africa) et milieu de Kelman (casamino acide-peptone-glucose CPG) au TZC (chlorure de triphényl tetrazolium).
- Purification des isolats bactériens
- Caractérisation biochimique, identification de biovar

3.6.5. Extraction d'ADN à partir d'isolats présumés de *R solanacearum*

Pour l'extraction d'ADN, un aliquot (1µl) de chaque colonie d'isolat présumé de *R solanacearum* sur le milieu de culture Kelman est mis en suspension dans 100µl d'eau de biologie moléculaire et porté à ébullition à 95°C pendant 15 minutes sur un thermocycleur (WELLER, 1988).

3.6.6. Détection par PCR du complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* et identification du phylotype

L'identité du complexe d'espèce *R solanacearum* a été vérifiée après amplification de l'extrait d'ADN par réaction en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques 759/760 (OPINA et al., 1997). Le phylotype a été déterminé par amplification de l'extrait d'ADN à l'aide de PCR multiplexe qui utilise simultanément 4 couples d'amorces de tête respectivement spécifiques de chaque phylotype: N: mult21:1F (phylotype I), N: mult21:2F (phylotype II), N:mult23:AF (phylotype III), N:mult22:InF (phylotype IV) et un couple d'amorces finales spécifiques de l'espèce Nmult22:RR selon la description de FEGAN ET PRIOR (2005). Les conditions de réalisation des cycles de PCR sont constituées d'une dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C, suivie de 30 cycles de 30 secondes à 94°C, d'une (1) minute à 59°C, d'une (1) minute à 72°C et d'une extension finale de 10 minutes à 72°C. Les

réactifs, les volumes et le protocole de la réaction en chaîne par polymérase ont été préparés selon la description d'ABDURAHMAN *et al.* (2019).

La révélation des produits de PCR a été réalisée après électrophorèse en gel d'agarose (1,5%), après application d'un courant électrique de 90 volts pendant 40 minutes.

III.7. Analyse statistique

Les données obtenues pour chaque traitement ont fait l'objet d'analyses statistiques sur logiciel R Studio, version 4.3.1, les packages utilisées sont Ggplot2, Tydiverse, dplyr. Des analyses de la variance (ANOVA) ont été effectuées. Le test de Tukey est utilisé pour comparer les moyennes pour ces paramètres à chaque fois que le F calculé était significatif.

IV. RESULTATS

IV.1. Nombre et caractéristique d'isolats d'actinomycètes isolées

Au total, 643 isolats d'actinomycètes sont isolés à partir des sols rhizosphériques de culture de pommes de terre saines collectés dans les 4 districts de la région Vakinankaratra (Tableau 14).

Tableau 14: Souches d'actinomycètes isolées au laboratoire à partir des sols rhizosphériques

Code localité	Nombre d'isolats obtenus	Code Isolats
A1	41	A1S1...A1S41
A2	63	A2S1...A2S63
A3	11	A3S1...A3S11
B1	40	B1S1...B1S40
B2	21	B2S1...B2S21
B3	21	B3S1...B3S21
B4	55	B4S1...B4S55
B7	38	B7S1...B7S38
C1	33	C1S1...C1S33
C2	34	C2S1...C2S34
C3	66	C3S1...C3S66
C4	44	C4S1...S44
C5	32	C5S1...C5S32
D1	11	D1S1...D1S11
D2	74	D2S1...D2S74
D4	9	D4S1...D4S9
D5	31	D5S1...D5S31
D6	19	D6S1...D6S19
Total	643	

A : Antsirabe II, B : Betafo, C : Antanifotsy, D : Faratsiho

Les 643 souches d'actinomycètes isolées sont morphologiquement identiques c'est-à-dire que les colonies sont opaques, de formes arrondies, de petite taille, à bords irréguliers et incrustés dans le milieu de culture. Les isolats se différencient par la couleur du mycélium aérien et du mycélium végétatif ainsi que par la taille et la production de pigments (figure 24).

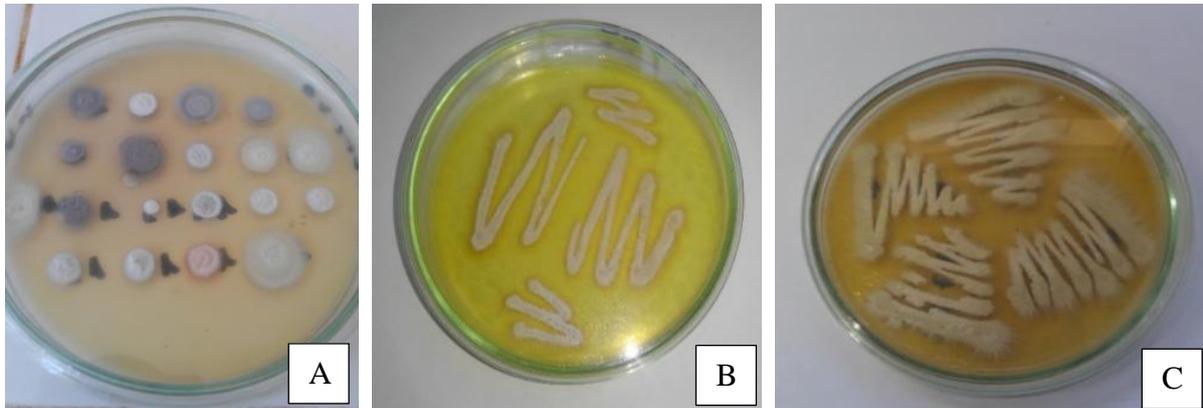


Figure 23: Aspect morphologique des isolats d'actinomycète

A : souches d'actinomycètes produisant différents pigments de couleur différente, B : souches pures d'actinomycètes à couleur de mycélium végétatif rose , C : souches pures d'actinomycètes à couleur du mycélium végétatif blanche

IV.2. Test de confrontation des isolats d'actinomycètes aux isolats de *Ralstonia solanacearum*

Après 72h d'incubation, les résultats obtenus ont montré que sur les six cent quarante-trois (643) souches d'actinomycètes quatre-vingt-quatre (84) inhibent le développement de *Ralstonia solanacearum* (Figure 25).

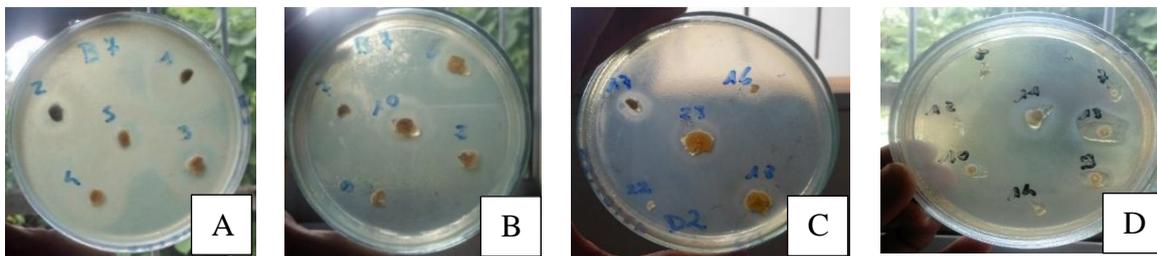


Figure 24: Inhibition des souches de *R. solanacearum* par les isolats d'actinomycètes antagonistes

A : antagonisme sur les souches d'actinomycètes provenant de Betafo, C : antagonisme sur les souches d'actinomycètes provenant t de Betafo, C : Antagonisme sur les souches d'actinomycètes Faratsiho et D : Antagonisme sur souche d'actinomycètes provenant de Antsirabe II.

Ces résultats ont donc permis de choisir les souches d'actinomycètes A1S13, B7S3, B7S5 et D2S9 pour le test d'efficacité pour la solubilisation de phosphore, la production d'AIA et le test *in vivo*.

IV.3. Effet des isolats d'actinomycètes produisant sur la production d'AIA

Les isolats d'actinomycètes présentant d'halo d'inhibition enlevé pendant le test d'antagonismes ont été testés sur leurs capacités à produire d'AIA. L'intensité de la couleur rose indique la concentration d'AIA libérée par isolat en présence son précurseur D-Tryptophane. Les résultats ont montré que parmi les 84 isolats d'actinomycètes antagonistes de *Ralstonia solanacearum* choisis, trois souches seulement sont capables de produire de l'acide indole-3-acétique AIA. Les quantités enlevées d'AIA de sont donc enregistrées sur les isolats A1S13, B7S5, D2S9 (Figure 26).

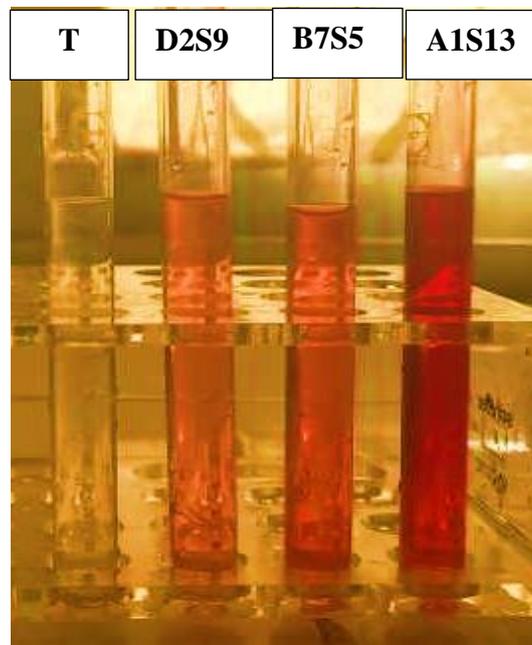


Figure 25: Test positif des souches d'actinomycètes A1S13, B7S5 et D2S9 sur la production d'AIA et le témoin(T)

Source : Auteur

IV.4. Effet des isolats d'actinomycètes sur la solubilisation du phosphate

L'efficacité de la solubilisation du phosphate par les isolats des actinomycètes dépend, de la souche. La plupart des colonies forment un halo clair dans le milieu PVK, elles ont donc la capacité de solubilisation du phosphate. Le milieu PVK permet d'observer un halo transparent autour de chaque colonie. Quatorze souches forment un halo clair dans le milieu ISP2 où le plus grand diamètre (0,8 cm) est observé autour de la souche B7S5 (Figure 27).

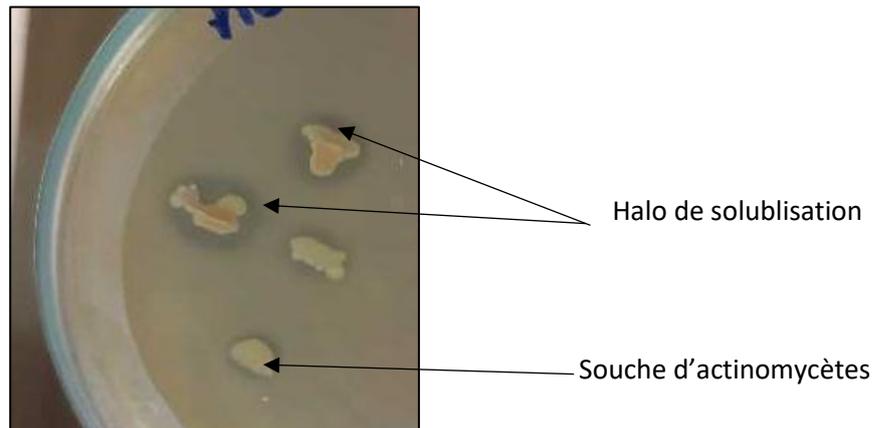


Figure 26: Halo transparent autour des souches d'actinomycètes sur le milieu PVK

Source : Auteur

Les souches testés A1S13, D2S9 et B7S5 proviennent de trois sites différents alors que B7S3, B7S5 proviennent du même site. La diversité de l'origine des souches permet de voir les différents comportements des souches et leurs adaptations. Ainsi, la souche B7S3 a été éliminée pour les prochains tests *in vivo*.

IV.5. Pureté et viabilité des souches des actinomycètes

La pureté microbienne des isolats d'actinomycètes dans les trois formulations a été vérifiée. Les suspensions de spores des actinomycètes obtenues à partir de la formulation pestagranule, composée d'argile verte, de farine, de terreau et d'eau peptonée, ont montré des cultures pures de souche et aucune contamination microbienne n'a été observée (Figure 28).

Les cinétiques des comptages de spores viables, évalués à des intervalles d'un mois pendant huit mois, sont présentées (Figure 29), montrant un taux de 8,75% de spores mortes au niveau des pestagranules et de 9,16% au niveau de la formulation liquide. Cependant, la densité de spores viables après stockage dans le terreau a montré le taux de mortalité le plus élevé, atteignant 11,3% de spores morte. L'analyse statistique ne montre pas de différence significative entre les trois formulations ($p > 0,05$).

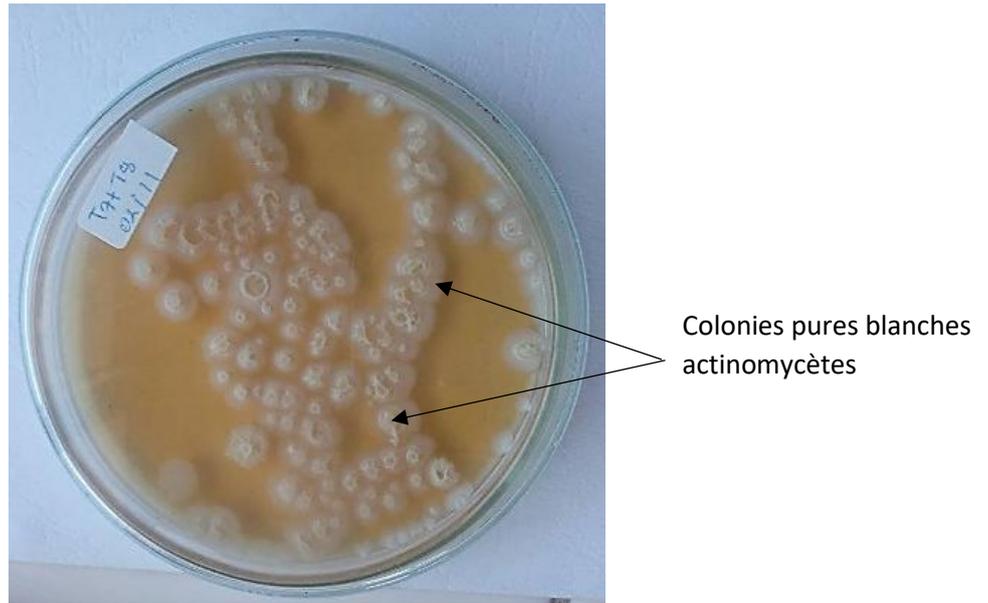


Figure 27: Isolats d'actinomycètes A1S13 rajeunis sans contamination

Source : Auteur

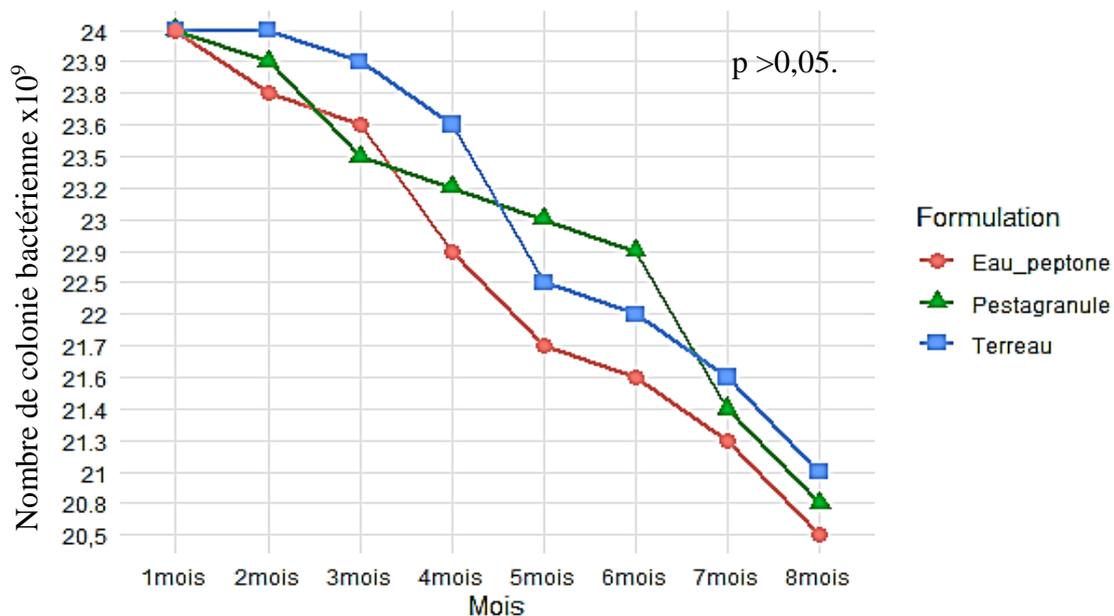


Figure 28: Evolution des colonies d'isolats d'actinomycète dans les différentes formulations à 10⁹UFC

IV.6. Effet des souches d'actinomycètes sur l'infestation de *R. solanacearum* en serre

L'incidence du flétrissement bactérien a été suivi dès le semis et ensuite tous les 10 jours jusqu'à 60 jours ou il y a le pic de la maladie (Figure 30). De manière générale les plants traités par les actinomycètes ont de faible plant infesté par *Ralstonia solanacearum* par rapport au témoin. L'analyse statistique entre les traitements montre une différence significative ($p < 0,05$).

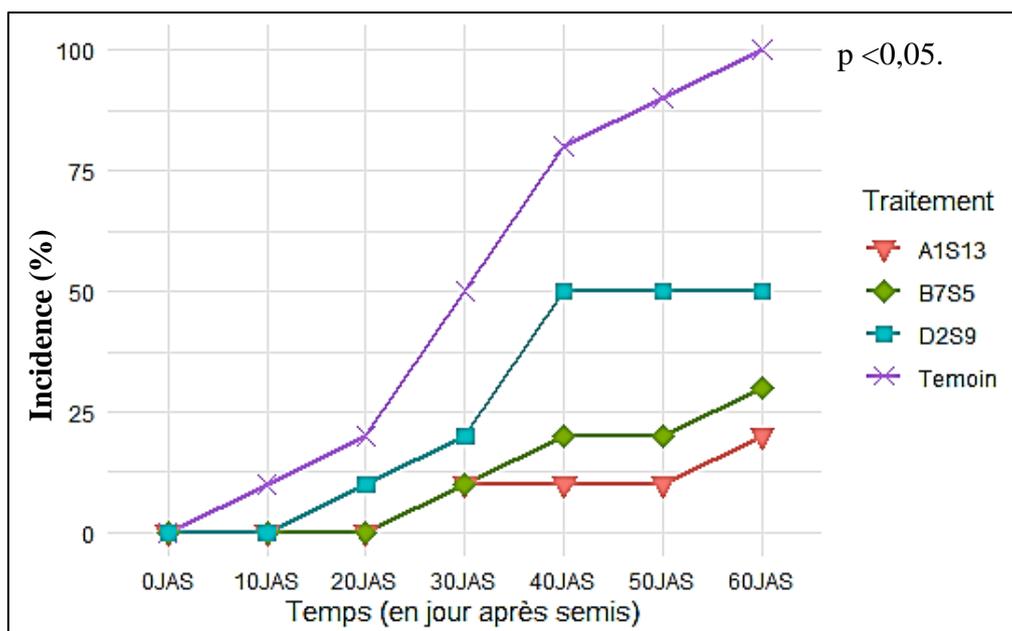


Figure 29: Evolution de l'incidence de *Ralstonia solanacearum* sur les plants de pomme de terre en serre par traitement

Pour les plants traités avec les souches d'actinomycète, plusieurs tendances distinctes sont observées. Pour le traitement A1S13, l'incidence de *Ralstonia solanacearum* observée est la plus faible, aucun plant est infesté jusqu'à 20 JAS, suivie d'une légère recrudescence de l'infestation de la maladie à 30 JAS (10%) et une stabilisation à 20% à 50 JAS et 60 JAS. Pour le traitement B7S5, l'incidence est à 10% à 10 JAS et augmente à 20% à 20 JAS. Une augmentation est ensuite observée à 40 JAS, atteignant 40%, mais cette valeur se stabilise jusqu'à 60 JAS. En ce qui concerne le traitement D2S9, l'incidence débute à 10% à 10 JAS, puis augmente à 20% à 30 JAS. Une augmentation significative est observée à 40 JAS, atteignant 50% et cette valeur continue d'augmenter pour atteindre 60% à 60 JAS. Le traitement A1S13 semble offrir donc la meilleure protection à court et moyen terme, tandis que les traitements B7S5 et D2S9 montrent une augmentation progressive de l'incidence des maladies, avec des périodes critiques à 40 JAS et au-delà.

Les plants témoins avec terreau présentent une progression rapide et importante de l'incidence des maladies, avec une augmentation constante au fil du temps. Dès 10 JAS, une incidence de 20% est observée. Cette incidence augmente rapidement à 50% à 20 JAS, ce qui suggère une propagation rapide des maladies. À 30 JAS, l'incidence atteint 70%, signalant une augmentation continue de la maladie. Cette tendance à la hausse se poursuit avec 80% d'incidence à 40 JAS. Le pic est atteint à 50JAS et 60JAS, où l'incidence des maladies atteint son maximum de 100%. A 60JAS, les plants flétris du traitement témoin atteint le 100%. L'incidence des plants inoculés

par A1S13 ne dépassaient pas le 20%, l'incidence du *Ralstonia solanacearum* est significativement ($p < 0,05$) réduit de 80% par rapport au témoin. Au niveau du traitement B7S5, l'incidence du flétrissement bactérien est réduite de 60% par rapport au témoin. L'infestation est plus élevée au niveau du traitement D2S9 à 50%, il y a quand même une réduction d'incidence de 50%, même si la différence n'est pas significative ($p > 0,001$).

Le suivi de la sévérité de la maladie du flétrissement bactérien a été effectué dès l'apparition des premiers symptômes, soit à partir du 15JAS, et ce, jusqu'à la fin de la période d'observation à 90JAS. La Figure 31 présente de manière évolutive l'intensité du flétrissement bactérien observé en conditions de serre. À 90JAS, la sévérité moyenne du flétrissement bactérien a été analysée.



Figure 30: Différentes sévérités du flétrissement bactérien en serre

A : pomme de terre saine, sans attaque de maladie, B : pomme de terre malade à sévérité de 50%, C : Pomme de terre morte à sévérité de 100%.

La Figure 32 récapitule ainsi la sévérité *Ralstonia solanacearum* en fonction des différents traitements. Il est observé que le lot des plants non inoculés d'actinomycètes présente des niveaux de sévérité significativement plus élevés (34%) comparativement aux traitements inoculés avec une réduction de 70,5% pour A1S13, de 53% pour B7S5 et 47% pour D2S9.

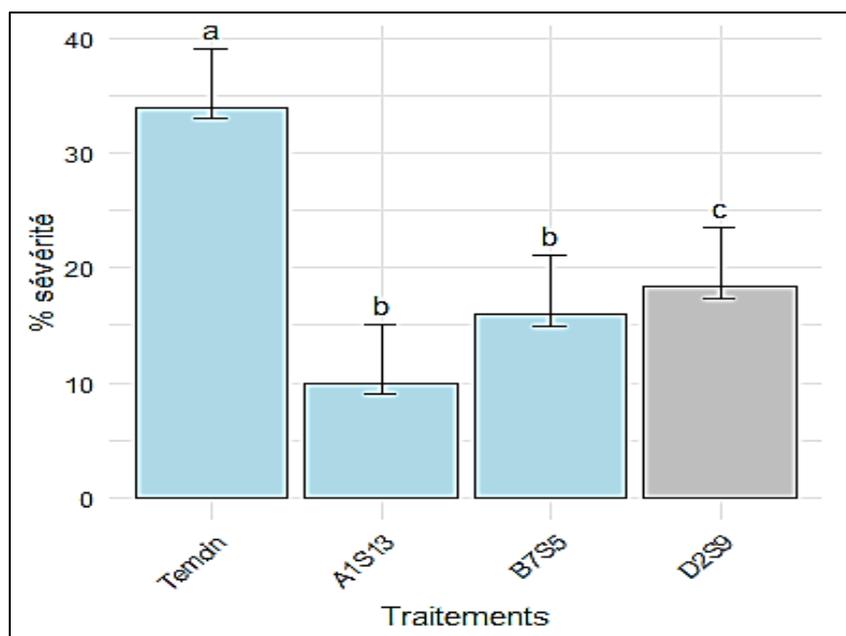


Figure 31: Sévérité de flétrissement bactérien en fonction de traitement

Pendant la récolte, le nombre de tubercules pourris infesté par *R. solanacearum* par plant sont évalués, la figure 33 résume le nombre moyen de tubercule par plant par traitement. L'analyse de variance a montré de différence significative entre les traitements ($p < 0,001$). Les lots des plants non traité (Témoin) ont beaucoup plus de tubercules pourris par rapport aux lots de plants traitées par des actinomycètes, une réduction de tubercules pourris par plant de 76% est constaté sur le traitement A1S13, de 65% au niveau de B7S5 et 41% au niveau de D2S9 (Figure 33).

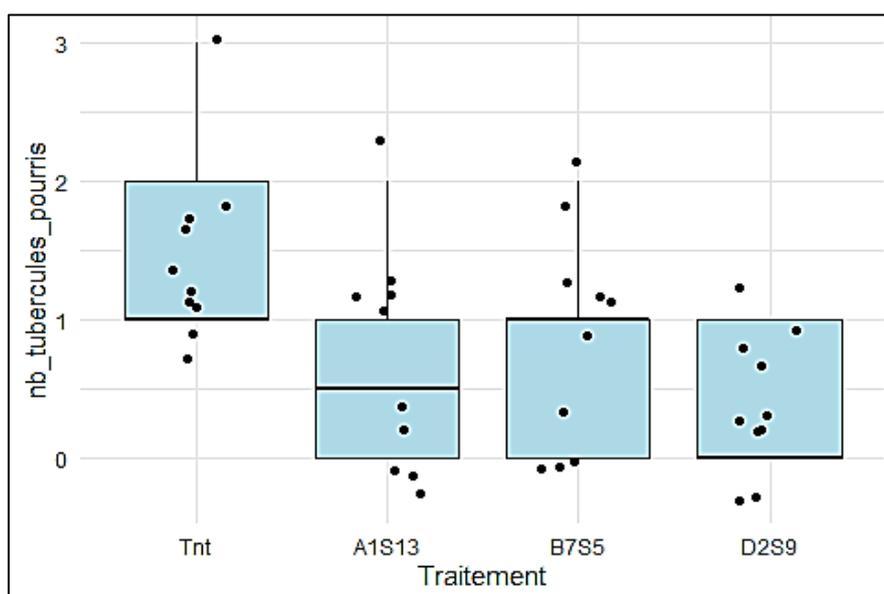


Figure 32: Tubercules pourris en fonction des traitements

IV.7. Effet des isolats d'actinomycète sur la croissance et la production de pomme de terre en serre

4.7.1. Hauteurs des plants

L'analyse statistique montre des variations significatives ($p < 0,05$) de la hauteur des plants de pomme de terre parmi les différents traitements (figure 35). Les plants inoculés avec l'isolat d'actinomycète ont montré une augmentation significative de leur hauteur moyenne par rapport aux témoins (figure 34).

Au niveau des lots de plants témoins négatifs de *Ralstonia* mais inoculés d'actinomycètes, les lots des plants du traitement Te_A1S13 ont présenté des hauteurs plus élevées avec une augmentation de 41% par rapport au témoin. Pour les lots de plants traités avec Te_B7S5, une augmentation de 20% par rapport au témoin a été observée. Le traitement Te_D2S9 a montré des hauteurs modérées, elle est de 6% plus élevée par rapport au témoin.

Au niveau des témoins positifs, les lots de plants inoculés avec des souches A1S13 ont manifesté une croissance significativement plus élevée ($p < 0,05$) de 17 % par rapport au témoin. Pour les deux autres traitements, le traitement B7S5 a montré une augmentation significative ($p < 0,05$) de 14% par rapport au témoin et le traitement D2S9 montrait une augmentation de 5% par rapport au témoin.

Ces résultats indiquent donc que l'inoculation avec la souche A1S13 conduit à la plus forte augmentation de la hauteur moyenne des plants de pomme de terre par rapport au témoin, suivie par le traitement B7S5, tandis que les traitements D2S9 montrent également des améliorations significatives mais de moindre importance et ne diffèrent pas significativement du témoin.

En comparant les traitements négatifs non inoculés par *Ralstonia solanacearum* et les témoins positifs inoculés par *Ralstonia solanacearum*, les témoins négatifs ont des hauteurs plus élevées de 4% par rapport au témoin positif au niveau des traitements. L'analyse statistique ne montrait pas de différence significative. Ceci peut conclure que l'inoculation a permis de protéger les plantes face aux infestations de *Ralstonia solanacearum*.



Figure 33: Croissance en hauteur des plants de pomme de terre en serre

Source : Auteur

4.7.2. Poids de tubercules

Le figures 36 montre la variation de poids de tubercules en fonction des traitements. L'utilisation des isolats d'actinomycètes a conduit à une nette amélioration du poids des tubercules par pot par traitement ($p < 0,05$).

Pour les lots de plants non infestés par *Ralstonia solanacearum* et inoculés par les actinomycètes, le poids des tubercules a augmenté de manière significative, avec une augmentation respectivement de 54% pour Te_A1S13. Les deux souches d'actinomycètes ont également entraîné une augmentation de la production de tubercules par rapport au témoin, bien que de manière moins prononcée, avec une hausse respective de 20% pour Te_D2S9 et respectivement de 29% pour Te_ B2S7 comparativement au groupe témoin terreau seul.

Pour les lots positifs infestés par *R. solanacearum*, le poids des tubercules a augmenté de manière significative de 46% sur les lots de plants traité par A1S13, de 20% pour B7S5 et de 15% pour D2S9. En comparant les poids de tubercules au niveau des plants inoculés par les souches d'actinomycètes, infestés et non par *Ralstonia solanacearum*, il a une faible réduction poids de tubercules de 1,68% au niveau des lots des inoculés par la souche A1S13, de 1% pour B7S5 et 8% pour D2S9.

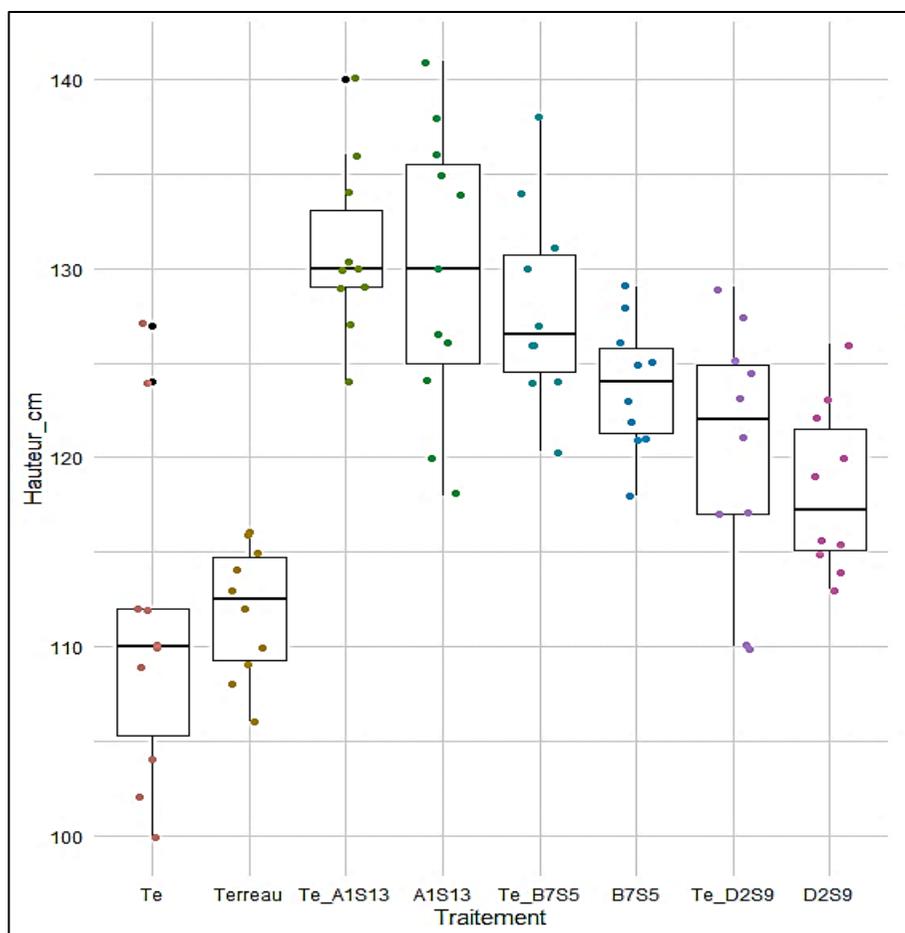


Figure 34: Hauteur des plants en fonction de traitement de la bioformulation terreau en serre

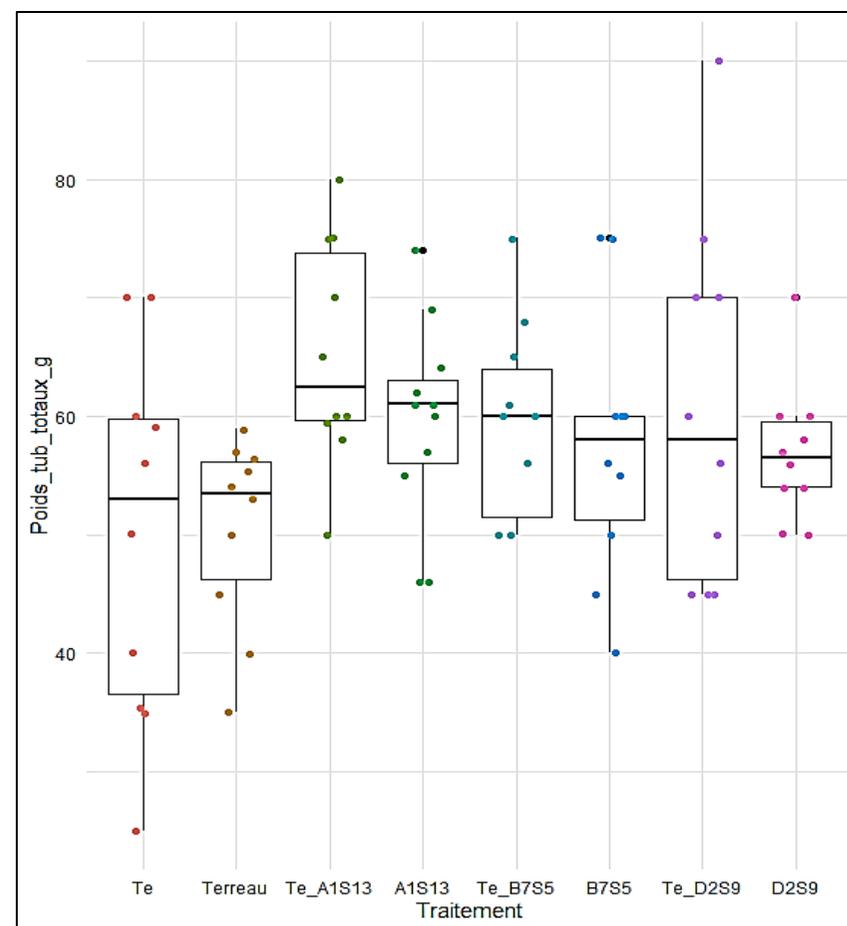


Figure 35: Poids de tubercules par traitement de la bioformulation terreau en serre

IV.8. Essai en milieu réel

4.8.1. Evolution des paramètres de rendement de la pomme de terre selon les traitements du sol

Douze semaines après la plantation de la pomme de terre, le rendement en tubercules totaux varie significativement ($p < 0.05$) entre les différents traitements du sol. Le lot témoin absolu, non fertilisé et non inoculé n'a donné aucun rendement (figure 37). Pour le reste des lots, le rendement le plus bas (5,78t/ha) et le plus élevé (8,61t/ha) sont respectivement observés pour le lot témoin non fertilisé mais inoculé avec l'inoculum B7S5 et le lot fertilisé et inoculé avec l'inoculum A1S13 (figure 38). Le rendement en tubercules totaux est significativement ($p < 0,05$) plus élevé de 49 fois dans le lot fertilisé et inoculé avec l'inoculum A1S13 et de 39 fois dans le lot fertilisé et inoculé avec le consortium comparativement au lot témoin fertilisé mais non inoculé. Il est 27 fois plus élevé dans le lot fertilisé et inoculé avec l'inoculum B7S5 par rapport au lot T1 mais la différence n'est pas significative. En outre, le rendement en tubercules totaux est statistiquement comparable entre les lots témoin non fertilisé mais respectivement inoculé avec l'inoculum A1S13 et l'inoculum B7S5 (Figure 38).



Figure 36: Site expérimental démontrant le non développement des plants sur le témoin absolu

Source : Auteur

Le rendement en tubercules commercialisables (avec diamètre ≥ 28 mm) est significativement différent entre les traitements du sol. La valeur minimale (1,70 t/ha) et la valeur maximale (8,14t/ha) sont respectivement enregistrées pour les traitements Te_B7S5 et A1S13 (Figure 39). Le rendement en tubercules commercialisables est significativement 57 fois supérieur dans le lot fertilisé et inoculé avec l'inoculum A1S13 par rapport au témoin fertilisé mais non inoculé.

Il est respectivement 43% et 27% plus élevé dans le lot fertilisé et inoculé avec le consortium et le lot fertilisé et inoculé avec l'inoculum B7S5 par rapport au lot témoin fertilisé mais l'écart de rendement n'est pas significatif.

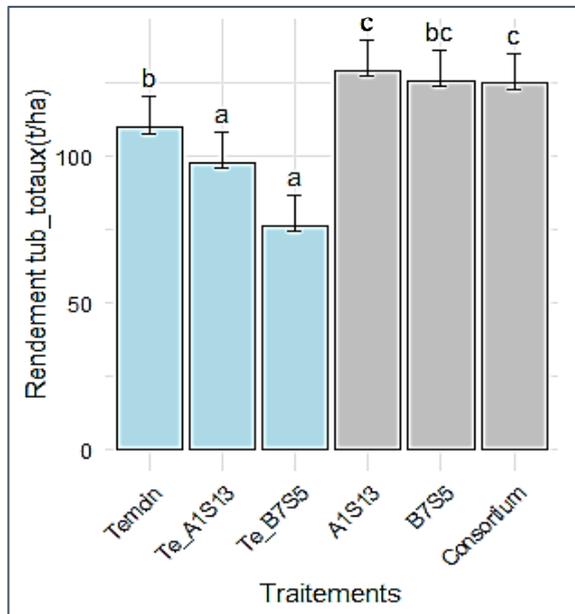


Figure 37: Rendement en tubercules totaux de pomme de terre selon les traitements du sol

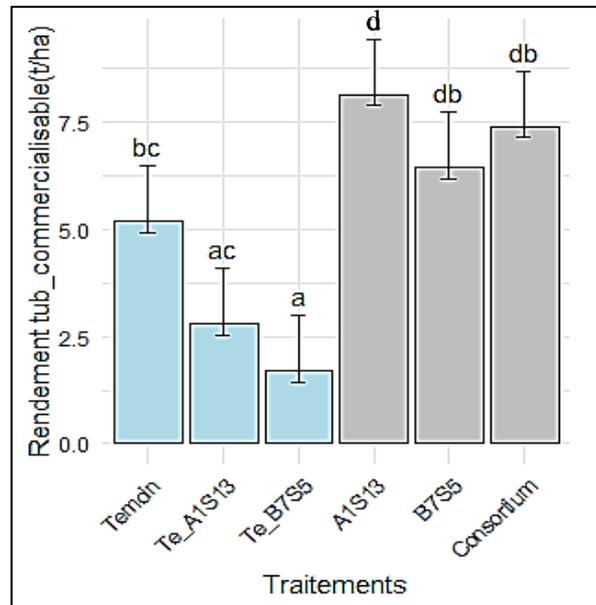


Figure 38: Rendement en tubercules commercialisables de pomme de terre selon les traitements du sol

4.8.2. Incidence et sévérité du flétrissement bactérien

Les symptômes typiques du flétrissement bactérien sur pomme de terre ont fait leur apparition à partir de 5 semaines après la plantation dans les différents lots de traitement du sol. L'incidence du flétrissement bactérien est significativement différente entre les traitements tout au long de l'expérimentation. Au pic de la maladie, à 8 semaines de la plantation de la pomme de terre, le cumul du pourcentage de plants flétris le plus élevé (36,25%) et le plus bas (8,75%) sont respectivement observés pour le lot témoin fertilisé mais non inoculé témoin et le lot témoin non fertilisé mais inoculé avec l'inoculum A1S13 (figure 39). Dans les lots fertilisés et inoculés respectivement avec l'inoculum A1S13 et le consortium, l'incidence du flétrissement bactérien est significativement ($p < 0,05$) réduite de 66 et 58% par rapport au lot témoin fertilisé mais non inoculé. Dans le lot fertilisé et inoculé avec l'inoculum B7S5, l'incidence du flétrissement est significativement ($p < 0,05$) réduit de 24% par rapport au lot témoin (Figure 38). Concernant la sévérité du flétrissement bactérien, elle varie également de façon significative entre les traitements du sol tout au long de l'expérimentation. A 8 semaines de la plantation de la pomme de terre, le flétrissement bactérien est le plus sévère (32%) dans le lot

témoin fertilisé mais non inoculé et le moins sévère (6%) dans le lot témoin non fertilisé et inoculé avec l'inoculum A1S13 (Figure 40). Le degré de sévérité de la maladie est significativement ($p < 0,05$) moins élevé de 56 à 81% dans les autres lots inoculés (B7S5, A1S13) par rapport au lot témoin (Figure 41).

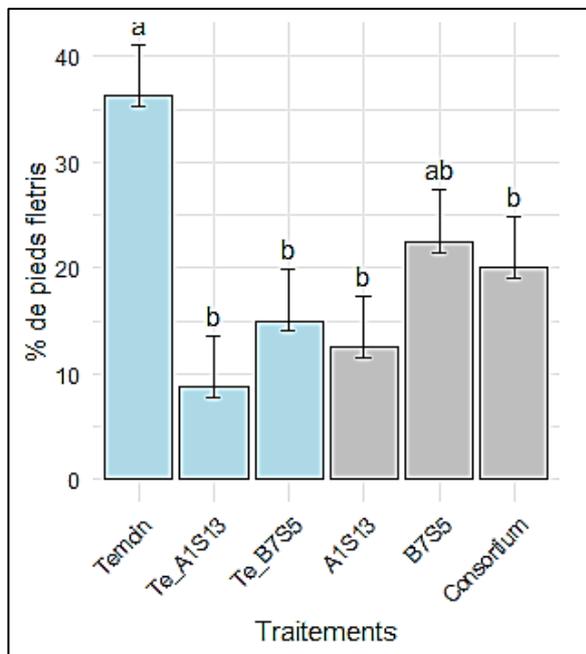


Figure 39: Incidence du flétrissement bactérien de la pomme de terre à 8 semaines de la plantation selon les traitements du sol

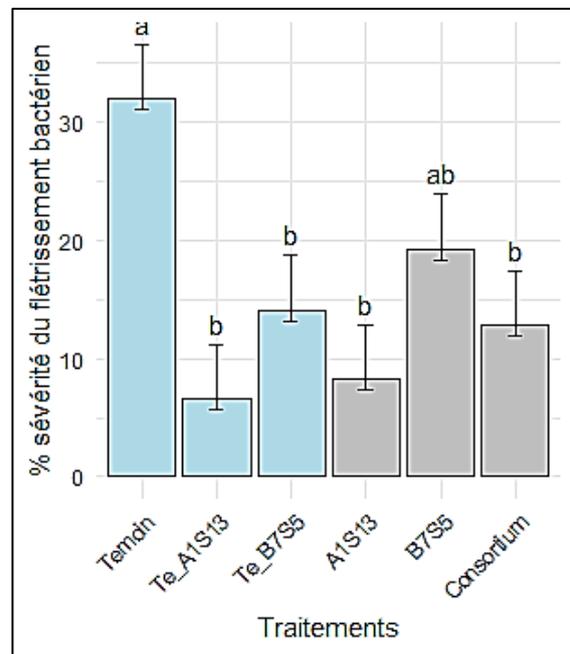


Figure 40: Sévérité du flétrissement bactérien de la pomme de terre à 8 semaines de la plantation selon les traitements du sol

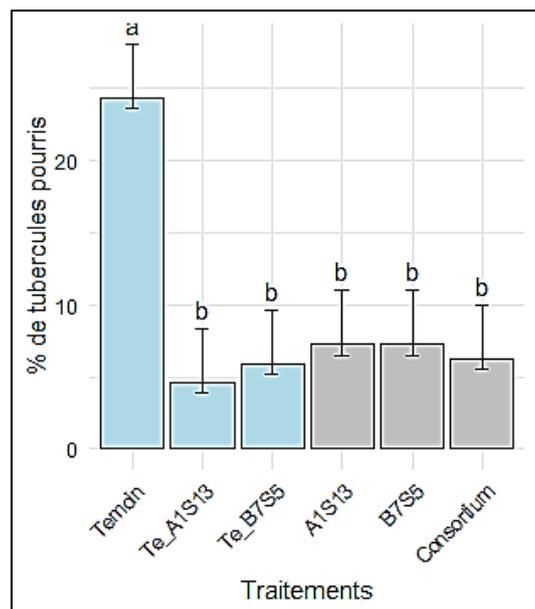


Figure 41: Pourcentage de tubercules pourris de pomme de terre à la récolte selon les traitements

Par ailleurs, le pourcentage de tubercules pourris à la récolte varie de façon marquée entre les traitements du sol. La valeur maximale (24,3%) est observée pour le lot témoin fertilisé mais non inoculé alors que la valeur minimale (4,6%) est enregistrée pour le lot témoin non fertilisé mais inoculé avec l'inoculum A1S13. Le pourcentage de tubercules pourris est significativement réduit de 70 à 80% dans les autres lots par rapport au lot témoin fertilisé non inoculé (Figure 42). Le tableau 16 récapitule les pourcentages moyens sur l'augmentation de production sur les lots des plants inoculés par les actinomycètes et la diminution de l'infestation de *R. solanacearum* aux champs.

IV.9. Isolement et caractérisation des souches de *R. solanacearum*

4.9.1. Détermination du biovar des isolats de *R. solanacearum*

Les résultats des tests biochimiques ont révélé qu'en serre et dans le site d'essai agronomique, les isolats bactériens sont capables d'utiliser les disaccharides maltose, lactose, cellobiose et les hexoses alcools mannitol, sorbitol, dulcitol excepté l'inositol et appartiennent ainsi au biovar 3.

4.9.2. Confirmation de l'espèce et détermination du phylotype des isolats de *R. solanacearum*

Le profil électrophorétique sur gel agarose du produit issu respectivement de l'amplification par PCR et par Multiplex PCR des souches bactériennes isolées dans les sites d'essai a généré le fragment de 280pb, spécifique au complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* et le fragment 144pb correspondant au phylotype I, originaire d'Afrique (Figures 43 et 44).

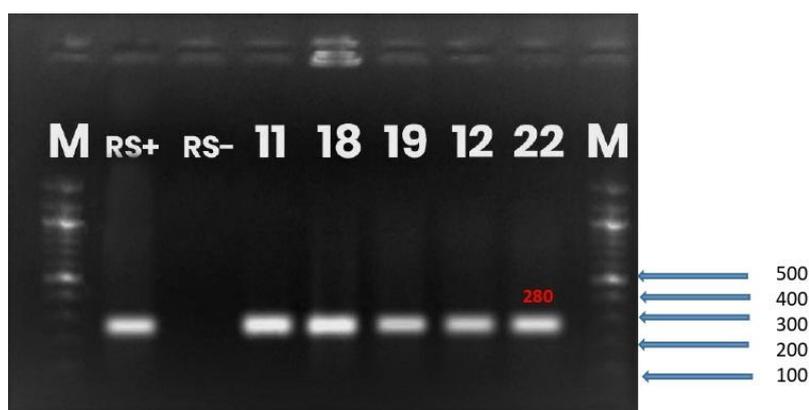


Figure 42: Profil électrophorétique sur gel agarose du produit d'amplification par PCR des isolats bactériens

M : marqueur de taille

RS+ : souche référence de *R. solanacearum*

RS- : souche négative de *R. solanacearum*

11 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Antsoantany, Antsirabe II

12 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Andraokavato, Antsirabe II

18 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Alakamisy anativato, Betafo
 19 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Antanimbarilehibe, Ambatolampy
 22 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site de Mandritsara, Betafo

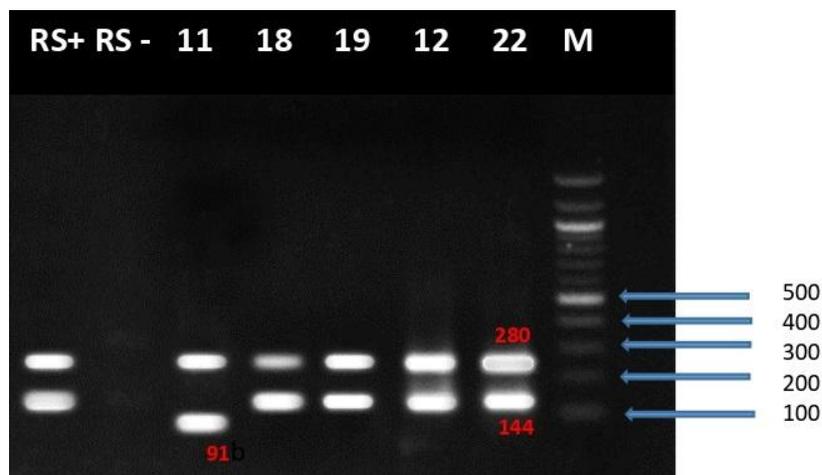


Figure 43: Profil électrophorétique du produit d'amplification par Multiplex PCR des isolats de *Ralstonia solanacearum*

M : marqueur de taille

RS+ : souche référence de *R. solanacearum*

RS- : souche négative de *R. solanacearum*

11 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Antsoantany, Antsirabe II

12 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Andraokavato, Antsirabe II

18 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Alakamisy anativato, Betafo

19 : souche de *R. solanacearum* isolée dans le site d'Antanimbarilehibe, Ambatolampy

22 : souche de *Ralstonia solanacearum* isolée dans le site de Mandritsara, Betafo

V. DISCUSSIONS

Dans le cadre de la présente expérimentation, les résultats de l'évaluation *in-vitro* de l'activité antagoniste des souches d'actinomycètes vis-à-vis des souches de *Ralstonia solanacearum* sont consistants avec ceux de l'évaluation en serre et en milieu réel du potentiel de biocontrôle de ces souches contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre. Le test d'antagonisme au laboratoire a montré que quatre souches d'actinomycètes sont capables de lutter contre *R. solanacearum* avec des halos d'inhibition jusqu'à 30 mm de diamètre. Ces souches ont été formulées avec des sol riche ou terreau pour être facilement incorporées dans le sol. Lors de l'expérimentation en serre, le traitement du sol par application localisée de souches d'actinomycètes a permis de déceler un effet protecteur contre le flétrissement bactérien des plants de pomme de terre. L'effet protecteur des bioinoculants contre le flétrissement bactérien se manifeste par la baisse généralement significative du pourcentage de plants flétris et de l'ampleur de la sévérité de la maladie jusqu'à la fin de la plantation de la pomme de terre ainsi que du pourcentage de tubercules pourris à la récolte dans tous les lots inoculés par rapport au

lot témoin non inoculé et substrat terreau uniquement. Tous les isolats d'actinomycètes testées ont tous des potentiels à réduire l'incidence de la maladie puisqu'en fin de culture le pourcentage de plantes infesté est de 100 % dans le traitement témoin alors que sur les plants inoculés par les actinomycètes, le taux d'infestation est réduit de 80% pour le traitement A1S13, de 60% pour B7S5 et de 40% pour D2S9 (Tableau 15).

Tableau 15: Récapitulatif de l'augmentation de production et la réduction de l'infestation du flétrissement bactérien sur les lots des plants traités par les actinomycètes par rapport au témoin en serre

Traitement	Augmentation (%)		Réduction (%)		
	Hauteur	Poids totaux (g)	Incidence	Sévérité	Tub pourris
Te-A1S13	41	54
Te_ B7S5	17	46
Te_ D2S9	20	29
A1S13	14	20	80	70,5	76
B7S5	6	20	60	53	65
D2S9	5	15	40	47	41

Te-A1S13 : Témoin négatif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète A1S13, Te-D2S9 : Témoin négatif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète D2S9, Te-B7S5 : Témoin négatif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète B7S5. A1S13 : Témoin positif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète A1S13, D2S9 : Témoin positif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète D2S9, B7S5 : Témoin positif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète B7S5.

Lors de l'expérimentation en milieu réel, le traitement du sol par application localisée et fractionnée de bioinoculants à base de souches d'actinomycètes a permis de déceler un effet protecteur contre le flétrissement bactérien se manifestant par la baisse généralement significative du pourcentage de plants flétris et de l'ampleur de la sévérité de la maladie jusqu'à 8 semaines de la plantation de la pomme de terre ainsi que du pourcentage de tubercules pourris à la récolte dans tous les lots inoculés par rapport au lot témoin non inoculé (Tableau 16). Par ailleurs, les effets protecteurs les plus marqués contre le flétrissement bactérien dû à *R. solanacearum* ont été observés pour les lots inoculés avec l'inoculum A1S13 (moins de 66%) suivi par le lot inoculé avec le consortium formé par la combinaison de l'inoculum A1S13 avec l'inoculum D2S9 (moins de 58%).

Tableau 16: Récapitulatif sur l'augmentation de production et la réduction de l'infestation du flétrissement bactérien sur les lots des plants traités par les actinomycètes par rapport au témoin aux champs

Traitement	Augmentation (%)		Réduction (%)		
	Tub totaux (g)	Tub commercialisables (g)	Incidence	Sévérité	Tub pourris
Te-A1S13		
Te_ B7S5		
A1S13	49	57	66	34	80
B7S5	39	43	24	81	76
Consortium	27	27	58	56	70

Te-A1S13 : Témoin négatif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète A1S13, Te_ B7S5 : Témoin négatif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète B7S5. A1S13 : Témoin positif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète A1S13, B7S5 : Témoin positif avec sol inoculé de la souche d'actinomycète B7S5, Consortium : Témoin positif avec sol inoculé par la combinaison des souches A1S13 et b7S5

Le potentiel de bioprotection des microorganismes associés aux racines (rhizo-microbiome) incluant les actinomycètes contre les maladies du flétrissement bactérien a été rapporté par de nombreux travaux (LE et *al.*, 2022 ; SOLANKI et *al.*, 2016 ; NGUYEN et *al.*, 2010 ; KHEIRANDISH et HARIGHI., 2015, KUARABACHEW et *al.*, 2007). Différents mécanismes agissant individuellement ou en combinaison peuvent être à l'origine des effets protecteurs contre le flétrissement bactérien des souches d'actinomycètes, dont le phénomène d'antibiose ou sécrétion de métabolites secondaires volatiles et des antibiotiques inhibiteurs de la croissance bactérienne, la production d'enzymes hydrolytiques pour dégrader les parois bactériennes, la compétition de niche écologique ou compétition pour l'espace et la nutrition ainsi que l'induction de résistance systémique chez la plante hôte ou la mise en place d'une immunité pour les infections futures dans l'ensemble de la plante (KURABACHEW et WYDRA., 2013 ; CHEN et *al.*, 2014 ; TREJO-ESTRADA et *al.*, 1998 ; NAKKEERAN et *al.*, 2006 ; SESSITSCH, et *al.*, 2004). Ces mécanismes peuvent ainsi favoriser directement ou indirectement la croissance de la plante hôte.

D'une manière générale, au champs le taux de flétrissement est le plus élevé dans les lots fertilisés mais inoculés par rapport aux lots témoins non fertilisés mais inoculés. Cet accroissement du taux de flétrissement peut être lié à l'apport de la fertilisation, en particulier du fumier de ferme, fourni par les paysans qui pourrait constituer une source d'inoculum de *R. solanacearum*. Dans ce contexte, la fortification de la fertilisation organique par les inoculants d'antagonistes à *R. solanacearum* est une alternative intéressante. Des effets protecteurs sous serre et au champ contre le flétrissement bactérien du tabac de fertilisants organiques fortifiés

par des inoculants de bactérie (*Bacillus sp*) antagonistes à *R solanacearum* furent rapportés. A ces effets sont corrélés une sécrétion de divers métabolites secondaires par la bactérie antagoniste conduisant à une réduction significative de la dynamique de la population de *R. solanacearum* dans le sol et une modification des communautés microbiennes du sol associées aux racines (YUAN, 2014).

Une réduction de trois à quatre fois l'incidence du flétrissement bactérien du tabac par l'application au champ de bactéries (*Pseudomonas sp*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus artrophaeus*) antagonistes à *R solanacearum* (production de substances volatiles contre *R solanacearum*) (TTAHIR, 2017).

Par ailleurs, une diminution de la sévérité du flétrissement bactérien sur des plants de pomme de terre et de tomate inoculés par des agents de biocontrôle a été rapportée par CHANDRASEKARAN (2015).

Il a été observé au cours de la présente expérimentation que les effets de biocontrôle contre le flétrissement bactérien et de stimulation de la croissance des plants de pomme de terre de l'inoculation simple sont plus marqués avec l'inoculation simple qu'avec la co-inoculation de souches d'actinomycète antagonistes. Ceci corrobore les résultats trouvés par certains auteurs (RAMESH et PHADKE, 2012 ; SARMA et *al.*, 2015 ; SOLANKI, 2019). Toutefois, d'autres auteurs recommandent notamment la co-inoculation d'espèces différentes en particulier de bactérie et de champignon pour le contrôle biologique du flétrissement bactérien (STILING et CORNELISSEN, 2005).

Dans le cadre de la présente étude, des résultats consistants furent obtenus quant à l'efficacité *in-vitro* et en milieu réel des effets protecteurs des souches d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien. Ce qui n'est pas le cas pour certaines études, qui ont révélé une performance significativement réduite des isolats des agents de biocontrôle contre *R. solanacearum* en milieu réel comparé aux conditions *in-vitro* et sous-serre (STILING et CORNELISSEN, 2005 ; LIU, 2011)

La réduction de la performance au champ des agents de biocontrôle est généralement attribuée à divers facteurs abiotiques (propriétés physico-chimiques du sol...) et biotiques tels que la capacité de colonisation du milieu, de compétition vis-à-vis des autres microorganismes du sol (STILING et CORNELISSEN, 2005 ; Yuan et *al.*, 2014 ; SARMA et *al.*, 2015).

Les souches d'actinomycète sont particulièrement connues pour leur forte capacité de colonisation du milieu et de compétition vis-à-vis des autres microorganismes du sol (SOLANKI et *al.*, 2016).

Les actinomycètes ont montré des effets positifs sur la stimulation de la croissance de pomme de terre. Au laboratoire, les souches d'actinomycètes (A1S13, B7S5, D2S9) ont démontré une capacité de solubilisation *in-vitro* des phosphates et une capacité de production *in-vitro* de phytohormone de croissance dont l'acide indole acétique.

In vivo, les souches d'actinomycètes possèdent respectivement la propriété de promoteur de croissance des plantes, une stimulation de la hauteur des plants de pomme de terre de 41% a été observé pour traitement Te_A1S13 et de 20% pour le traitement Te_B7S5 par rapport au témoin, ainsi que l'accroissement du rendement en tubercules de 54% pour les témoins positifs avec A1S13.

Aux champs, Le rendement en tubercules totaux le plus élevé est observé sur les plants fertilisées et traités par la souche A1S13, atteignant jusqu'à 8,61t/ha.

Lorsque les inoculants ont été apporté seuls, sans fertilisation, ils ont permis d'obtenir respectivement 2,19 et 3,35t/ha de rendement en tubercules totaux de pomme de terre par opposition au lot témoin absolu, non fertilisé et non inoculé qui ne produisait aucune récolte. Différents auteurs ont montré que les actinomycètes sont capables de stimuler la croissance des plants en produisant d'auxine et en solubilisant des phosphore (BAKER, 1988 ; LUGTENBERG et al., 2002 ; SOMERS et al., 2004 ; VESSEY, 2003).

La caractérisation des souches bactériennes, responsable du flétrissement de la partie végétative aérienne et le pourrissement des tubercules de pomme de terre dans le site expérimental a révélé qu'elles appartiennent au phylotype I et biovar 2 du complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum*. La distribution des différents phylotypes, biovars confirme les observations de PLENER et al. (2008) selon lesquelles *Ralstonia solanacearum* est capable de se développer dans différentes niches écologiques car il dispose pour cela d'un système de régularisation très complexe pour intégrer les signaux environnementaux et s'adapter aux conditions dans lesquelles il se trouve.

VI. CONCLUSION PARTIELLE

Le flétrissement bactérien est causé par un complexe de souches de *Ralstonia solanacearum* qui s'attaquent à plus de 400 espèces végétales sur tous les cinq continents. La faible efficacité des stratégies classiques de lutte chimique, agronomique et variétale de contrôle efficace de ce pathogène en évolution constante oriente la recherche vers la lutte biologique qui est à la fois économique et protège l'environnement. L'application des inoculants d'actinomyète dans le cadre de la présente expérimentation a permis d'obtenir une baisse jusqu'à 70% de l'incidence du flétrissement bactérien dû à *R. solanacearum* couplée à un accroissement de 57% des rendements en tubercules commercialisables de pomme de terre. Malgré l'écart significatif, les rendements en tubercules totaux de pomme de terre obtenus demeurent inférieurs aux rendements potentiels des variétés améliorées de pomme de terre sous fertilisation standard, la présente étude mérite ainsi d'être approfondie afin d'optimiser les performances agronomiques observées.

L'importance socio-économique croissante de la culture de la pomme dans les productions maraîchères et la réduction de la pauvreté semble menacée par le développement d'épidémies de flétrissement bactérien. Les résultats de ce test 'efficacité des souches d'actinomyètes face à une souche locale de *R. solanacearum* de pomme de terre constituent une base d'éléments de décision dans la gestion rationnelle de cette maladie bactérienne.

**CHAPITRE 4. EVALUATION EN MILIEU REEL
DE LA COMBINAISON DES PLANTES
ASSAINISSANTES DU SOL AVEC LES
SOUCHES NATIVES D'ACTINOMYCETES SUR
LE CONTROLE DU FLETRISSEMENT
BACTERIEN DE LA POMME DE TERRE**



Planche 4: Différents étapes sur l'évaluation en milieu réel de la combinaison des plantes assainissantes du sol avec les souches natives d'actinomycètes sur le contrôle du flétrissement bactérien de la pomme de terre

A : Plant de *Crotalaria grahamiana* (Source : Auteur), B : Inoculation du sol avec la souche actinomycète A1S13 (Source : Auteur), C : Tubercule de pomme de terre (Source : Auteur), D : Suivi phytosanitaire des plants de pomme de terre (Source : Auteur), E : pomme de terre en stade de floraison (Source : Auteur).

I. RESUME

Le flétrissement bactérien, causé par *Ralstonia solanacearum*, est une bactérie phytopathogène majeure responsable de la première bactériose mondiale. Des résultats intéressants ont été obtenus précédemment sur l'utilisation individuelle de *Crotalaria* et d'actinomycètes. Cependant, malgré ces résultats prometteurs, l'efficacité de l'application simultanée de ces deux agents biologiques n'avait pas été explorée jusqu'à présent. Dans le cadre de la présente étude, nous avons cherché à évaluer l'effet de l'association de l'inoculation du sol avec une souche d'actinomycète A1S13 et l'application de *Crotalaria grahamiana* en tant qu'engrais vert sur la suppression de *Ralstonia solanacearum* et sur l'amélioration du rendement de la pomme de terre. Une expérimentation au champ a été menée en utilisant des plants de pomme de terre avec trois traitements : un témoin avec fertilisation standard (T1), un traitement avec fertilisation standard et un engrais vert *Crotalaria grahamiana* (T3), et un traitement avec fertilisation standard et la combinaison des deux méthodes : engrais vert *Crotalaria grahamiana* et l'inoculation de la souche d'actinomycète A1S13 (T2). Les résultats agronomiques ont démontré des différences significatives dans plusieurs paramètres de rendement de la pomme de terre en fonction des trois traitements appliqués. L'association des deux méthodes a conduit à de meilleures performances agronomiques, avec une augmentation du nombre de tubercules et du rendement en tubercules totaux de respectivement de 20% et 66%, ainsi qu'une augmentation du nombre et du rendement en tubercules commercialisables notamment de 66% et de 102% par rapport au témoin. Pour l'effet bioprotecteur contre *R. solanacearum*, une réduction de l'incidence de 79 % a été observée.

Mots-clés : antagoniste, biostimulant, flétrissement bactérien, lutte biologique, pomme de terre, combinaison, *C. grahamiana*, actinomycètes, *Ralstonia solanacearum*

II. INTRODUCTION

Le flétrissement bactérien, causé par *Ralstonia solanacearum*, est une bactérie phytopathogène majeure responsable de la première bactériose mondiale (COUPAT, 2008). Cette protéobactérie possède une gamme d'hôtes étendue, couvrant plus de 50 familles botaniques dans les zones tropicales et intertropicales (CELLIER et PRIOR, 2010). En Europe, *Ralstonia solanacearum* est classée comme un "organisme de quarantaine", ce qui signifie que sa présence n'est pas tolérée sur le territoire et qu'elle fait l'objet d'une surveillance stricte concernant son introduction, sa détention et sa manipulation (EPPO, 2001). Aux États-Unis, *Ralstonia solanacearum* est répertoriée comme un agent de "bioterrorisme" en raison de sa large gamme

d'hôtes, de sa variabilité génétique, phénotypique et écologique exceptionnelle (WICKER et PRIOR, 2010).

A Madagascar, il s'agit de la maladie bactérienne la plus préoccupante observée sur la culture de la pomme de terre, avec une perte estimée à 30 % de la production en tubercules et tubercules semences (FAOSTAT, 2016). Cette maladie peut entraîner des pertes économiques importantes et menacer la sécurité alimentaire dans les régions touchées.

La lutte contre les microorganismes phytopathogènes telluriques sans recours aux pesticides est devenue une priorité majeure dans l'agriculture, en raison des préoccupations croissantes concernant l'impact néfaste de ces produits chimiques sur l'environnement, la santé humaine et la durabilité à long terme des systèmes de production alimentaire. Face à ce défi, il est impératif de développer des stratégies alternatives et durables pour contrôler cette bactériose. Dans cette perspective, un programme de lutte intégrée est recommandé, combinant différentes techniques de luttés pour maximiser l'efficacité tout en minimisant les impacts négatifs.

Les études antérieures ont démontré l'efficacité individuelle des plantes assainissantes du sol (Crotalaires) et des souches natives d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre. Suite aux succès individuels, il reste encore à explorer la possibilité de combiner ces deux stratégies pour une approche plus complète et efficace. Dans cette optique, la présente étude vise à évaluer les effets combinés des souches d'actinomycètes et de *Crotalaria grahamiana* sur la production de la pomme de terre et le contrôle de l'infestation de *Ralstonia solanacearum* en milieu réel.

III. MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre représente encore une étude préliminaire visant à explorer l'efficacité de la combinaison de deux approches prometteuses dans la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre : l'utilisation de *Crotalaria grahamiana*, une espèce de plantes assainissantes du sol, et la souche native d'actinomycète A1S13, qui a démontré les meilleurs résultats en termes de croissance et de protection des plants de pomme de terre, ainsi que d'amélioration du rendement en tubercules.

III.1. Site expérimental

L'essai en milieu réel a été conduit dans un site, localisé dans le Fokontany d'Ihazolava (altitude 1572m, latitude -192655°, longitude 47,2447°), dans la commune rurale d'Antanifotsy, dans le

district d'Antanifotsy, dans la région Vakinankaratra, sur les Hautes Terres de Madagascar au cours d'une campagne culturale (Novembre 2022 à Mars 2023).

Le type de climat est tropical d'altitude avec deux saisons bien distinctes, une saison sèche et fraîche allant de Mai à Septembre et une saison chaude et pluvieuse allant d'Octobre à Avril.

La précipitation et la température mensuelle moyenne sur 40 ans pour le district d'Antanifotsy sont présentées dans la figure 1. Les mois les plus pluvieux et les plus chauds sont les mois de janvier, février et décembre qui à comptent à eux seuls 60,4% de toutes les précipitations annuelles (1310mm). Les mois les plus secs et les plus frais sont les mois de juin, juillet et août (figure 45).

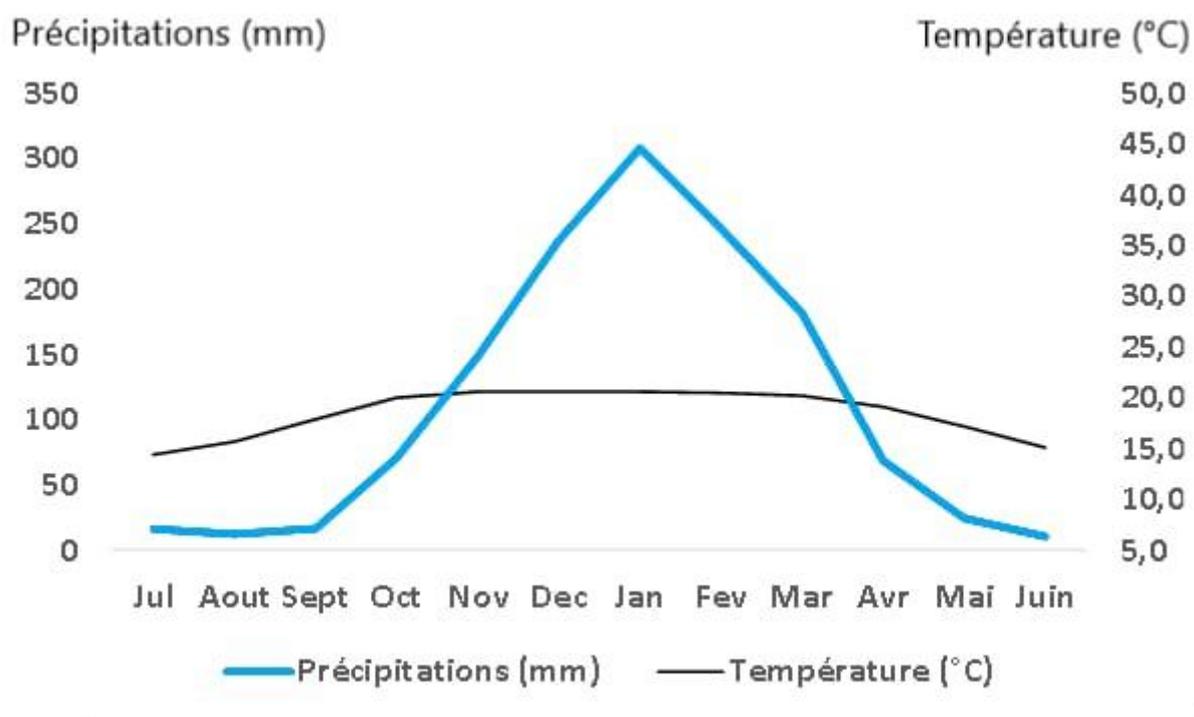


Figure 44: Valeurs moyennes de la précipitation et de la température mensuelle dans le district d'Antanifotsy (1981-2020)

Source : DGM

Le type de sol dans le site d'essai est un sol ferralitique, acide, relativement riche en carbone et en azote, avec un rapport C/N satisfaisant et pauvre en phosphore et en potassium avec une texture limono-sableux (Tableau 17).

Tableau 17: Caractéristique chimique du sol

pH	C%	N%	C/N	P (Bray II) ppm	K (meq/100g)
4,86	8,06	0,532	15,2	2,5	0,262

III.2. Matériels végétaux

La variété de pomme de terre Meva a été utilisée pour cette étude. Elle est moyennement sensible à *Ralstonia solanacearum* (voir Annexe 1), plus adaptée au District d'Antanifotsy et plus appréciée par les producteurs.

Pour la plante assainissante du sol, *Crotalaria grahamiana* a été sélectionnée, en se basant sur une évaluation multicritère issue de recherches antérieures. Les résultats de ces études ont démontré que *Crotalaria grahamiana* présente un effet notable de suppression du flétrissement au cours de la phase de culture, ainsi qu'une réduction significative des tubercules pourris. Elle a également conduit à une augmentation appréciable du rendement (Voir Chapitre II). Des itinéraires spécifiques ont été optimisés, seules les parties aériennes des plantes de *Crotalaria grahamiana* ont été coupées et utilisées comme engrais vert, incorporées mécaniquement dans le sol. Les parties souterraines, notamment les systèmes racinaires n'ont pas été prélevées, ce qui a permis de maintenir l'intégrité structurale du sol et d'éviter toute perturbation qui pourraient compromettre les effets bénéfiques observés précédemment.

III.3. Souches d'actinomycètes

La souche native d'actinomycètes codée A1S13 a été choisie pour l'essai en milieu paysan. Elle dispose des activités caractéristiques favorisant la croissance des plantes ou PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

Rappelons que cette souche est originaire d'Antsirabe II, dans la région de Vakinankaratra. Elle est capable de produire des phytohormones, en particulier l'acide indol-3-acétique AIA, qui est bénéfique pour le développement végétal, présente une activité de solubilisation des phosphates du sol (améliore leur biodisponibilité pour les plantes), ainsi qu'une capacité antagoniste vis-à-vis des *Ralstonia solanacearum* (Voir Chapitre 3).

L'inoculation des parcelles d'expérimentation est réalisée par traitement du sol avec la bioformulation liquide à base d'eau peptonée contenant la souche d'actinomycètes A1S13.

III.4. Souches de *Ralstonia solanacearum*

Le sol utilisé pour l'essai est déjà infesté par *Ralstonia solanacearum*, éliminant ainsi la nécessité d'inoculer les plantes avec cette bactérie pathogène. Des souches de *Ralstonia solanacearum* ont été préparées en laboratoire au cas où aucune maladie n'apparaîtrait naturellement dans les parcelles expérimentales. Dans ce cas, une inoculation artificielle serait nécessaire pour simuler l'infestation par *Ralstonia solanacearum*.

III.5. Traitement et dispositif expérimental

Le dispositif d'essai est un bloc aléatoire complet comprenant 3 traitements et 3 répétitions. Chaque parcelle élémentaire mesure 3 mètres de large sur 2,8 mètres de long, avec 4 lignes de semences-tubercules de pomme de terre plantées à un espacement de 0,3 mètres entre les rangs et de 0,7 mètres entre les tubercules au sein d'une même ligne, soit un total de 40 semences-tubercules par parcelle élémentaire (Figure 46).

Les traitements sont séparés les uns des autres par des allées de 0,5 mètre, tandis que les blocs ou répétitions sont séparés par des allées de 1 mètre. Ainsi, la superficie totale de l'essai est de 9,4 mètres de large sur 11 mètres de long, ce qui équivaut à une superficie totale de 1,034 ares. Tous les traitements ont reçu de fertilisation standard composés de 1 soubique bien rempli de fumier par parcelle (8 à 17kg) (10 à 20t/ha) + 300kg/ha d'engrais NPK (11-22-16) (250g/parcelle élémentaire) + 100kg/urée (46N) au premier buttage (4 à 5 semaines après la plantation). Les traitements sont constitués de : **T1** : témoin avec fertilisation standard, **T2** : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* + inoculant A1S13, **T3** : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* seule.

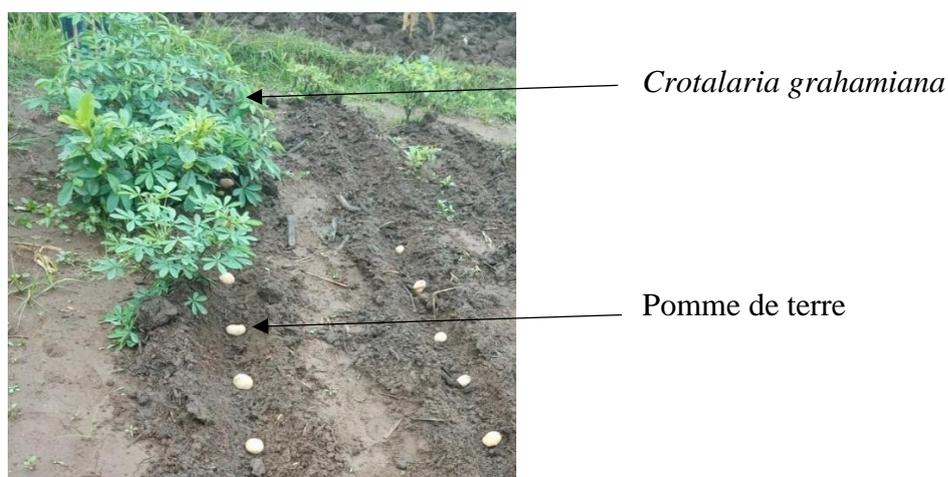


Figure 45: Technique d'association la pomme de terre et *Crotalaria grahamiana*

Source : Auteur

III.6. Suivi des paramètres agronomiques de la pomme de terre

3.6.1. Paramètres de rendement de la pomme de terre

A la maturité des tubercules de pomme de terre (12 semaines après la plantation), dans chaque parcelle élémentaire, le rendement respectif en tubercules totaux et en tubercules commercialisables (avec diamètre ≥ 28 mm), a été calculé à partir de la pesée des tubercules de l'ensemble des pieds ramenée à l'hectare.

Le nombre de tubercules totaux et de tubercules commercialisables ont été aussi suivi pendant la récolte pour chaque traitement.

3.6.2. Incidence et sévérité du flétrissement bactérien de la pomme de terre

Dans chaque parcelle élémentaire, l'incidence du flétrissement bactérien ou le pourcentage de plants de pomme de terre flétris a été suivie depuis l'apparition des symptômes jusqu'à 4 semaines de la plantation (WINSTEAD et KELMAN,1952), selon la formule :

$$\text{Incidence (100\%)} = \Sigma \text{ plants flétris} \times 100 / \text{total des plants levés}$$

La sévérité du flétrissement bactérien a été suivie en utilisant une échelle de notation de 1 à 5 avec 1 = aucun symptôme, 2 = flétrissement de quelques feuilles jeunes au sommet, 3 = deux feuilles flétries, 4 = quatre ou plus de feuilles flétries et 5 = mort du plant) La formule est :

$$\text{Sévérité (100\%)} = \Sigma (pn) \times 100 / PN$$

Avec (p) = nombre de plants avec le score correspondant à la notation (n), P = la notation la plus élevée, N= nombre total de plants flétris

3.6.3. Isolement et caractérisation des souches de *Ralstonia solanacearum* à partir des plants flétris et de tubercules de pomme de terre infectés

Des échantillons de plants flétris et de tubercules pourris de pomme de terre ont été respectivement prélevés à 8 semaines et à 12 semaines de la plantation pour vérifier l'infestation de *Ralstonia solanacearum*.

La vérification est faite par l'isolement des souches bactériennes sur milieu sur milieu semi-sélectif SMSA (modified Sequiera Medium South Africa) et milieu de Kelman (casamino acide-peptone-glucose CPG) au chlorure de triphényl tetrazolium (TZC) suivie de la purification sur milieu LPGA (levure 7 g, peptone 7 g, glucose 7 g, agar 15g, eau permutée 1 litre) (BUDDENHAGEN, 1962). Le test de caractérisation biochimique des isolats bactériens purifiés a été réalisé sur le milieu basal de Ayers ajouté respectivement de trois hexoses alcools (mannitol, sorbitol, dulcitol) et trois disaccharides (cellobiose, lactose and maltose) comme source de carbone.

III.7. Analyse statistique

Les données paramétriques collectées sur les paramètres agronomiques de la pomme de terre ont été soumises à l'analyse de la variance suivie par la séparation des moyennes selon la méthode de Tukey et Fisher ($p < 0.05$). Le test de Kruskal-Wallis et le test de comparaison des

pairs ont été effectués ($\alpha = 0.05$) pour les données non-paramétriques au moyen du logiciel R Studio, version 4.3.1, les packages utilisées sont Ggplot2, Tydiverse, dplyr.

IV. RESULTATS

IV.1. Effet de la combinaison de *Crotalaria grahamiana* et de la souche d'actinomycète A1S13 sur le rendement en tubercules

4.1.1. Rendement en tubercules totaux

Douze semaines après la plantation de la pomme de terre, le rendement en tubercules totaux en tonne par hectare (t/ha) présente une variation significative ($p < 0.05$) entre les différents traitements du sol (Figure 47).

Les résultats ont révélé une augmentation significative de 66% du rendement dans le traitement combinant la *Crotalaria grahamiana* et la souche d'actinomycète A1S13 (T2) par rapport au témoin (T1), et une augmentation de 8% par rapport au traitement *Crotalaria grahamiana* seule (T3). Ces observations suggèrent un effet positif de la combinaison de *Crotalaria grahamiana* et de la souche d'actinomycètes A1S13 sur le rendement en tubercules de la pomme de terre (Figure 47).

4.1.2. Rendement en tubercules commercialisables

Le rendement en tubercules commercialisables (avec un diamètre ≥ 28 mm) varie de manière significative ($p < 0.05$) entre les différents traitements du sol (Figure 48).

La combinaison de la *Crotalaria grahamiana* et de la souche d'actinomycète A1S13 conduit à une production de tubercules commercialisables significativement plus élevée, avec une augmentation de 102% par rapport au témoin et de 59% par rapport à l'utilisation de la *Crotalaria grahamiana* seule. Ces résultats suggèrent que la combinaison des deux moyens de lutte contribue à améliorer la qualité des tubercules de pomme de terre, en produisant des grands tubercules répondant aux normes commerciales en termes de diamètre.

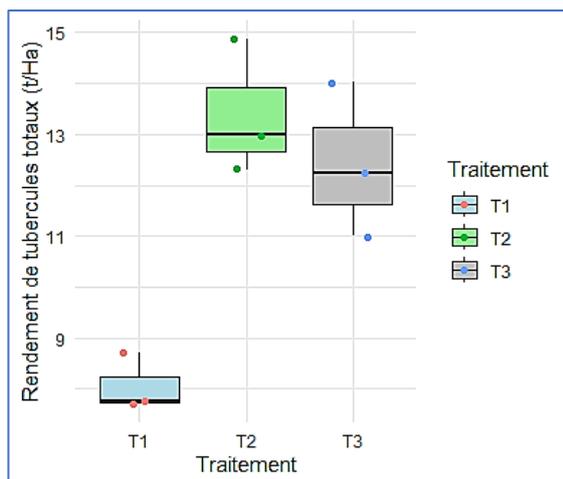


Figure 46: Rendement en tubercules totaux de la pomme de terre

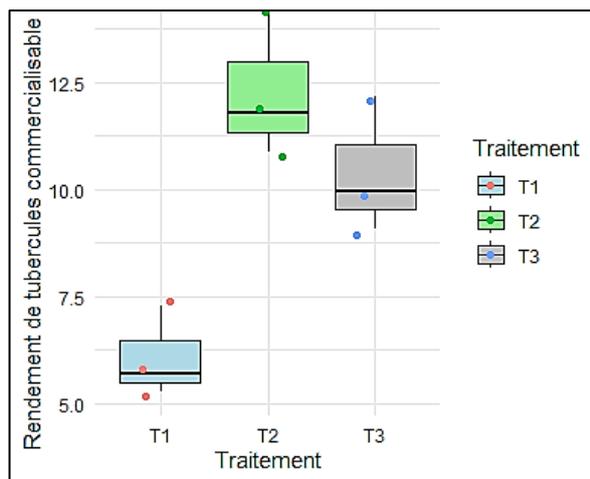


Figure 47: Rendement en tubercules commercialisables (diamètre ≥ 28 mm) de la pomme de terre

T1 : témoin avec fertilisation standard, T2 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* + inoculant A1S13, T3 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* seule

4.1.3. Nombre de tubercules totaux

Le traitement combinant *Crotalaria grahamiana* et la souche d'actinomyète A1S13 présente un nombre de tubercules plus élevé par rapport aux deux autres traitements, avec une augmentation de 20% par rapport au témoin et de 18% par rapport à l'utilisation de la *Crotalaria grahamiana* seule. Bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives, elles suggèrent une tendance vers une augmentation du nombre de tubercules dans le traitement combiné, ce qui pourrait indiquer un potentiel d'amélioration de la productivité en utilisant cette combinaison de méthodes (Figure 49).

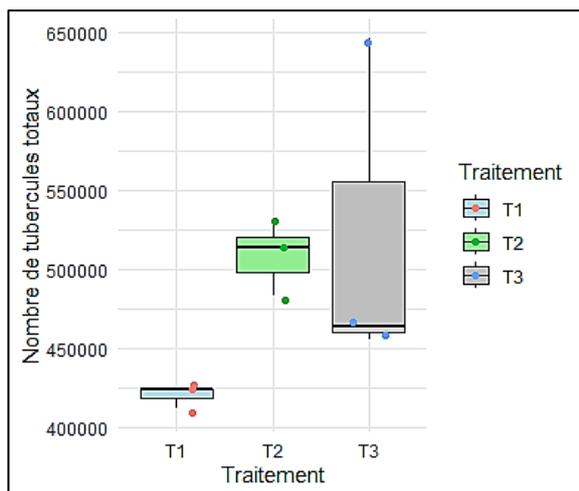


Figure 48: Nombre de tubercules totaux par parcelle pour chaque traitement

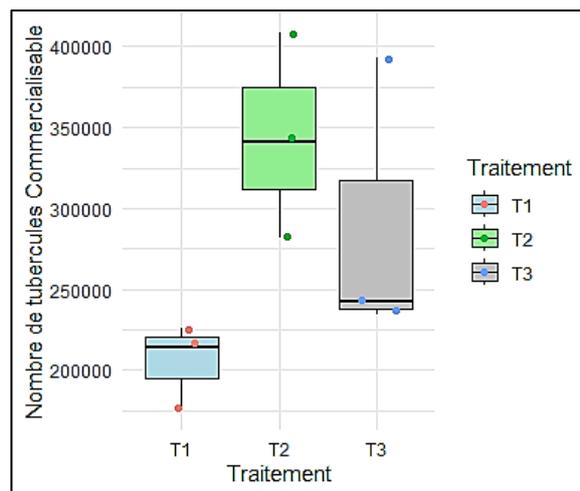


Figure 49: Nombre de tubercules commercialisables par parcelle pour chaque traitement

T1 : témoin avec fertilisation standard, T2 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* + inoculant A1S13, T3 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* seule

4.1.4. Nombre de tubercules commercialisables

Pour le nombre de tubercules commercialisables, le traitement combinant la *Crotalaria grahamiana* et la souche A1S13 la souche d'actinomycète (T2) présente un nombre significativement ($p < 0,05$) plus élevé de tubercules commercialisables (Figure 50). En effet, ce traitement affiche un nombre plus élevé de 91% par rapport au traitement témoin avec la fertilisation standard (T1), ainsi qu'une augmentation de 4% par rapport au traitement utilisant uniquement la *Crotalaria grahamiana* en plus de la fertilisation standard (T3).

Ces résultats mettent en évidence l'efficacité de la combinaison des deux méthodes pour améliorer le nombre de tubercules répondant aux normes commerciales, ce qui pourrait avoir un impact positif sur la rentabilité et la qualité de la récolte de la pomme de terre.

IV.2. Vérification des souches de *Ralstonia solanacearum* sur les plants de pomme de terre flétris et tubercules pourris

Les résultats des tests biochimiques ont révélé que dans les plants flétris et pomme de terre pourris dans l'essai agronomique sont infestés par *Ralstonia solanacearum* Biovar 3.

Les isolats bactériens sont capables d'utiliser les disaccharides maltose, lactose, cellobiose et les hexoses alcools mannitol, sorbitol, dulcitol excepté l'inositol.

IV.3. Effet de la combinaison sur l'incidence et sévérité de la maladie

L'incidence du flétrissement bactérien a été surveillée dès l'apparition des symptômes, c'est-à-dire dès la première semaine de culture jusqu'à la quatrième semaine (Figure 49). Dans tous les traitements, une augmentation de l'incidence du flétrissement bactérien a été observée au fil du temps. Cependant, un retard d'une semaine d'apparition des symptômes de flétrissement a été constatée le système associé (T2). Au pic de la maladie, à quatre semaines après la plantation, l'incidence cumulée du flétrissement bactérien était significativement différente ($p < 0,05$). Le taux d'infestation était de 13,5% pour le traitement témoin, tandis qu'il était de 7,5% pour le traitement combinant la *Crotalaria grahamiana* et la souche A1S13, et de 11,4% pour le traitement utilisant uniquement la *Crotalaria grahamiana* (Figure 51).

Ces résultats indiquent que la combinaison de la *Crotalaria grahamiana* et de la souche A1S13 a un effet significatif sur la réduction de l'incidence de 79% du flétrissement bactérien par rapport au témoin. Ce système associé semble offrir une certaine protection contre cette maladie, ce qui pourrait avoir des implications positives pour la santé des plants de pomme de terre et le rendement.

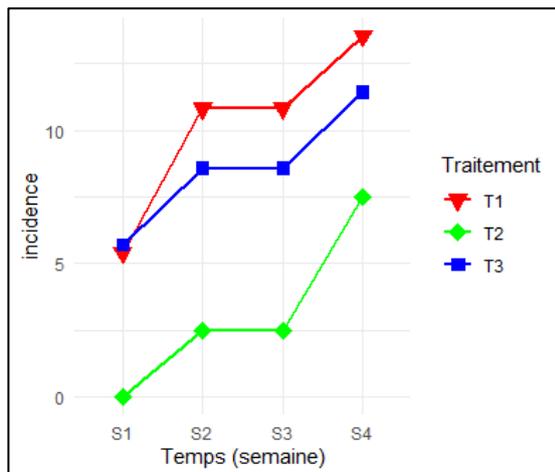


Figure 50: Incidence du flétrissement bactérien de la pomme de terre à 8 semaines de la plantation selon les traitements

T1 : témoin avec fertilisation standard, T2 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* + inoculant A1S13, T3 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* seule

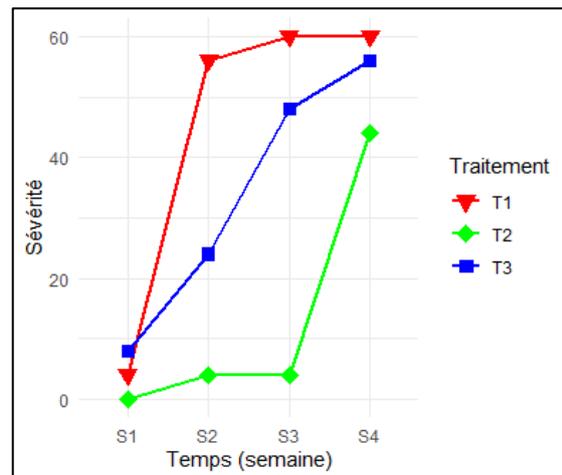


Figure 51: Sévérité de la maladie par semaine au niveau de chaque traitement.

Pour la sévérité du flétrissement bactérien au niveau des plants de pomme de terre, des variations significatives entre les traitements du sol ont été également observées tout au long de l'expérimentation. En première semaine de suivi, La sévérité est encore faible au niveau des traitements allant de 0% pour T2 et 5 % pour T3 ainsi que 8,5% pour le témoin (Figure 52).

Deux semaines après la plantation, la sévérité du flétrissement bactérien est la plus élevée dans le lot témoin, atteignant 56%, tandis qu'elle est la moins sévère dans le traitement combiné T2, avec seulement 4%, et modérée dans le traitement T3, avec 24%.

Au cours de la troisième semaine, la sévérité du flétrissement bactérien reste relativement stable dans le traitement T2, mais augmente à 44% au pic de la maladie, soit à la quatrième semaine. Dans les deux autres traitements, T1 et T3, la sévérité atteint respectivement 60% et 56% au pic de la maladie. (Figure 52)

À la récolte, les tubercules pourris ont été triés dans chaque traitement, et la Figure 49 illustre le nombre de tubercules affectés pour chaque plante. Une différence significative entre les traitements a été observée ($p < 0,05$). Les parcelles traitées T2 ont présenté une réduction de pourcentage de tubercules infectés par *Ralstonia solanacearum* de 49% par rapport au témoin, et moins de 27% par rapport à la présence de *Crotalaria grahamiana* seule (Figure 53).

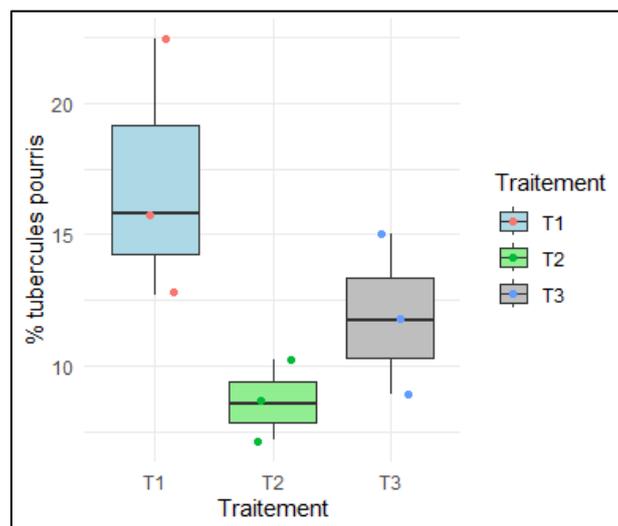


Figure 52: Pourcentage de tubercules pourris par traitement.

T1 : témoin avec fertilisation standard, T2 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* + inoculant A1S13, T3 : fertilisation standard + *Crotalaria grahamiana* seule

V. DISCUSSION

Dans le cadre de la présente étude, nous avons cherché à évaluer l'effet de l'association de l'inoculation du sol d'une souche d'actinomycète A1S13 et l'application de *C. grahamiana* en engrais vert sur la suppression de *Ralstonia solanacearum* et sur l'amélioration de rendement de la pomme de terre. Une expérimentation au champ a été menée utilisant des plants de pomme de terre avec trois traitements, un témoin avec fertilisation standard (T1), un traitement avec fertilisation standard et un engrais vert *Crotalaria grahamiana* (T3) et un traitement avec

fertilisation standard et la combinaison de deux méthodes engrais vert *C. grahamiana* et la souche d'actinomycète A1S13 (T2).

Les résultats agronomiques ont démontré des différences significatives dans plusieurs paramètres de rendement de pomme de terre en fonction des trois traitements appliqués. L'association des deux méthodes a conduit à des meilleures performances agronomiques avec augmentation de rendement en tubercules totaux et tubercules commercialisables en t/ha et le nombre en tubercules totaux et tubercules commercialisables en comparaison avec le témoin et les plants traités et *C. grahamiana* seule. Mais la plus marquant est l'augmentation respective jusqu'à 91% et 102% le nombre et le poids de tubercules commercialisables.

Les résultats confirment l'efficacité du traitement combiné T2 dans la réduction de la sévérité du flétrissement bactérien par rapport aux autres traitements. Cette observation souligne l'importance de la combinaison de la *Crotalaria grahamiana* et de la souche A1S13 pour atténuer l'impact négatif de cette maladie sur les plants de pomme de terre.

Les résultats soulignent l'efficacité de la combinaison de la *Crotalaria grahamiana* et de la souche A1S13 pour réduire l'incidence des tubercules pourris causés par *Ralstonia solanacearum*. Cette combinaison semble offrir une protection significative contre cette maladie, ce qui peut avoir des implications positives pour la qualité et le rendement des tubercules de la pomme de terre.

L'utilisation de *Crotalaria grahamiana* comme plante de couverture peut améliorer la structure du sol. Elle apporte des matières organiques au sol et qui vont ensuite décomposer par les microorganismes par minéralisation. De plus, la présence d'un pivot associé à un réseau de racines latérales dense de *Crotalaria grahamiana* va favoriser les capacités de filtration et d'infiltration dans les horizons supérieurs du profil, les capacités de drainage en seront aussi améliorées. FERNANDES et *al.*, (2014) a montré que *Crotalaria grahamiana* peut apporter en moyenne 3 à 5 tonnes/ha de matière sèche en deux mois, correspondant à un apport d'azote de 3,3 % de la plante entière soit 100 à 165 kg/N.

Les actinomycètes se caractérisent aussi par leur aptitude à dégrader les matières organiques du sol grâce à de nombreuses enzymes hydrolytiques extracellulaires, participant ainsi activement à la formation de l'humus, des molécules complexes, ainsi que des substances récalcitrantes. En particulier la cellulose, la lignocellulose, le xylane et la lignine, qui jouent un rôle important dans les processus de décomposition de la matière organique du sol (PETROSYAN et *al.*, 2004).

Par conséquent, l'augmentation de biomasse microbienne par *C. grahamiana* peut favoriser les activités microbiennes des microorganismes du sol dont les actinomycètes et plus particulièrement A1S13 du sol. A1S13 peut stimuler la minéralisation de la matière organique et permettre d'accroître la biodisponibilité des nutriments pour les plants de la pomme de terre. Les souches actinomycètes sont aussi caractérisées par leurs effets PGPR vis-à-vis des plantes. L'apport de la souche A1S13 peut favoriser donc la production d'auxine qui va stimuler le développement racinaire des plants de la pomme terre, favorisant ensuite l'absorption racinaire des nutriments. L'AIA peut aussi montrer des actions sur la solubilisation des phosphates. CRAWFORD et al., 1993 a démontré que les actinomycètes (*Streptomyces*) produisent des substances qui favorisent la croissance des plantes, la solubilisation des phosphates et la compétition avec les agents phytopathogènes pour le substratum et les nutriments (CRAWFORD et al., 1993). Les actinomycètes ont aussi la promotion de la croissance des plantes (HOSTER et al., 2005).

Par conséquent, l'inoculation d'actinomycètes A1S13 avec la légumineuse *Crotalaria grahamiana* pourrait apporter de nutriment au sol, favoriser la minéralisation du sol, stimuler le développement racinaire par la synthèse d'AIA et favoriser la solubilisation des phosphates.

En ce qui concerne l'incidence de la maladie, nos résultats ont également révélé des tendances intéressantes. Les plants de pomme de terre traités avec la combinaison des deux agents biologique *C. grahamiana* et l'actinomycète A1S13 ont montré une réduction significative de l'incidence de *Ralstonia solanacearum* par rapport au traitement témoin et avec *C. grahamiana* seule. Les différences possibles dans l'incidence et la gravité du flétrissement bactérien après l'essai ne seraient probablement pas attribuées à des différences de fertilité, bien que l'on sache que les sols fertiles réduisent l'incidence et la gravité du flétrissement bactérien dans la pomme de terre en améliorant la vigueur des plantes (LEMAGA, 2001 ; LEMAGA et al., 2005 ; MESSIHA et al., 2007b ; FONTEM et N'TCHORERE, 2009).

En 2002, WANG et al. (2002) ont démontré que l'introduction de crotalaires entre les cycles de culture d'ananas avait un effet positif sur la réduction de populations de nématodes *Rotylenchulus reniformis* (WANG (b), SIPES, & SCHIMTT, 2002). La crotalaire favoriserait, d'après cette étude, le développement de champignons capables de piéger *Rotylenchulus reniformis*, permettant ainsi un contrôle de ces populations. Dans une étude similaire, WANG et al. (2002) ont également décrit que les crotalaires développent naturellement des champignons piégeant les nématodes, mais elle libère également un composé ayant des effets allélopathiques sur les nématodes durant les premiers jours de sa

décomposition dans le sol. Les tissus des parties aériennes d'un couvert de crotalaire enfouis diffusent de la monocrotaline qui s'avère être létale pour les nématodes (WANG, SIPES, et SCHMITT, 2001). Des recherches montrent des effets similaires sur les populations de nématodes, aussi bien en couvert végétal et en enfouissement de *C. grahamiana*. Une des substances toxiques actives pour *C. grahamiana* a été déterminée comme étant de la Pyrolizidine, dérivé de l'ornithine et du monocrotaline (LUC et al., 2005.)

NASSAR et al. (2003) ont montré que les actinomycètes, en plus d'agir comme décomposeurs de matière organique, ces microorganismes ont un grand potentiel en tant qu'agents de lutte contre les agents pathogènes des plantes. Ceci est dû à leur capacité à produire des antibiotiques, des sidérophores, des enzymes qui ont une activité antimicrobienne.

Les résultats de cette étude démontrent que la combinaison des actinomycètes et de la *Crotalaria grahamiana* entraîne une croissance et un rendement accrus en poids de tubercules de pomme de terre, tout en réduisant considérablement l'infestation par *Rastonia solanacearum* et en atténuant la sévérité de la maladie. Cette combinaison présente une synergie positive, dépassant les effets observés avec les traitements simples utilisant uniquement *Crotalaria grahamiana*. Ces résultats soulignent l'importance d'adopter une approche intégrée pour la gestion des maladies des plantes, en tirant parti des interactions bénéfiques entre les microorganismes du sol, les plantes assainissantes et les plantes hôtes. En intégrant cette combinaison dans les pratiques agricoles, il est possible d'améliorer à la fois la productivité des cultures et la résistance aux maladies, contribuant ainsi à une agriculture plus durable et plus résiliente.

Les résultats obtenus pendant l'expérimentation ne montrent pas des effets antagonistes entre les deux méthodes, les plantes se développent très bien. WANG, 2023 a montré que la croissance des plantes assainissantes n'impacte pas négativement les communautés microbiennes (phase de végétation), contrairement à la culture de la tomate et au sol nu. Si des mécanismes biocides étaient mis en jeu par ces plantes, ils ne se traduisent en tous cas pas de manière générale sur les populations microbiennes. Il est possible même d'observer même un accroissement des bactéries Gram+ pour l'ensemble des plantes ainsi qu'un accroissement des champignons utiles. De même, la phase de décomposition rapide après enfouissement de la biomasse se traduit par un accroissement rapide et massif de certains groupes microbiens. Mais chaque espèce a un effet différencié sur les communautés ainsi stimulées.

V.I. CONCLUSION PARTIELLE

Nos résultats mettent en évidence l'efficacité potentielle de la combinaison de la *Crotalaria grahamiana* et des actinomycètes dans la gestion de l'incidence et de la sévérité de *Ralstonia solanacearum* chez les plants de pomme de terre. Cette approche combinée a montré des avantages significatifs par rapport aux traitements individuels et aux témoins, suggérant un potentiel synergique entre la *Crotalaria* et les actinomycètes dans la protection des cultures contre cette maladie.

De plus, cette combinaison a également favorisé la croissance des plants de pomme de terre, surtout au niveau de tubercules commercialisables, soulignant son intérêt pour une gestion intégrée des maladies tout en améliorant les rendements agricoles. Ces résultats offrent des perspectives prometteuses pour le développement de stratégies durables de lutte contre les maladies des cultures, contribuant ainsi à la sécurité alimentaire et à la durabilité environnementale. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de cette interaction et pour évaluer son potentiel dans d'autres contextes agronomiques.

DISCUSSION GENERALE

Les actinomycètes, ainsi que les légumineuses assainissantes comme *C. grahamiana* et *C. spectabilis*, ont été largement étudiés pour leur potentiel de contrôle de *Ralstonia solanacearum*, l'agent pathogène responsable du flétrissement bactérien dans de nombreuses cultures, notamment la pomme de terre. Plusieurs études antérieures ont souligné leur capacité à réduire partiellement l'incidence de cette maladie (WANG et al., 2002 ; GERMANI et PLENCHETTE, 2004 ; VOS et al., 2012a ; KOFFI et al., 2013a ; ANENE et al., 2013).

Pendant notre première expérimentation, l'association de la pomme de terre avec les légumineuses *Crotalaria grahamiana* et *Crotalaria spectabilis*, a démontré des effets positifs significatifs sur la croissance et le rendement de la pomme de terre. Une augmentation notable de la hauteur et du poids frais des tiges des plants de pomme de terre associés, ainsi qu'une augmentation substantielle du nombre et du poids frais des tubercules totaux et commercialisables ont été observées par rapport à la monoculture de pomme de terre. Ces avantages agronomiques peuvent être attribués à l'amélioration des propriétés physico-chimiques du sol, liées à l'apport de matière organique, en particulier à une amélioration de la structuration (stabilisation des agrégats, conservation de l'humidité...) et une stimulation du recyclage des nutriments (carbone, azote, phosphore, potassium...) et de l'activité biologique du sol favorisant une meilleure disponibilité des nutriments. En effet, une augmentation de l'absorption d'azote, de phosphore et de potassium dans les parties aériennes des plants de pomme de terre associés a été constatée, en plus d'une légère augmentation des concentrations en matière organique et en azote dans le sol. Des effets positifs de l'association de la pomme de terre avec des légumineuses sur la croissance des plants de pomme de terre résultant d'une amélioration des propriétés physico-chimiques du sol ont été rapportés par d'autres auteurs (GITARI et al., 2018 ; GITARI et al., 2019 ; NAYAWADE et al., 2019).

De plus, l'association avec *Crotalaria grahamiana* et *Crotalaria spectabilis* a démontré des effets protecteurs significatifs contre le flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum*. Ces effets comprennent un retard dans l'apparition des symptômes, une réduction importante de l'incidence et de la sévérité du flétrissement bactérien pendant la végétation des plants de pomme de terre, ainsi qu'une réduction marquée du pourcentage de tubercules pourris à la récolte. Ces observations sont cohérentes avec d'autres études qui ont également rapporté des effets protecteurs similaires des légumineuses, notamment les crotalaires, contre le flétrissement bactérien dans diverses cultures (KAKUHENZIRE et al., 2013 ; DEBERDT et al., 2014).

Par ailleurs, l'utilisation de souches d'actinomycètes comme agents de biocontrôle a également montré des résultats prometteurs dans la suppression du flétrissement bactérien de la pomme de terre. Les expériences *in vitro* et en milieu réel ont respectivement montré une réduction significative de l'incidence de la maladie et du pourcentage de tubercules de pomme de terre pourris à la récolte dans les lots traités avec les inoculants d'actinomycètes par rapport au lot témoin. Ces effets positifs peuvent être attribués à une sécrétion de divers métabolites secondaires par les souches d'actinomycètes conduisant d'une part à une répression de l'agression des souches de *Ralstonia solanacearum* couplée d'une modification des communautés microbiennes du sol associées aux racines (propriété d'antagoniste) et d'autre part à la stimulation de la croissance des plants de pomme de terre à travers la solubilisation des phosphates et/ou la production de phytohormones de croissance (propriété de promoteur de croissance des plantes).

Le potentiel de bioprotection des microorganismes associés aux racines (rhizo-microbiome) incluant les actinomycètes contre les maladies du flétrissement bactérien a été rapporté par de nombreux travaux (LE et *al.*, 2022 ; SOLANKI et *al.*, 2016 ; NGUYEN et *al.*, 2010 ; KHEIRANDISH et HARIGHI., 2015, KUARABACHEW et *al.*, 2007). Différents mécanismes agissant individuellement ou en combinaison peuvent être à l'origine des effets protecteurs contre le flétrissement bactérien des souches d'actinomycètes, dont le phénomène d'antibiose ou sécrétion de métabolites secondaires volatiles et des antibiotiques inhibiteurs de la croissance bactérienne, la production d'enzymes hydrolytiques pour dégrader les parois bactériennes, la compétition de niche écologique ou compétition pour l'espace et la nutrition ainsi que l'induction de résistance systémique chez la plante hôte ou la mise en place d'une immunité pour les infections futures dans l'ensemble de la plante (KURABACHEW et WYDRA., 2013 ; CHEN et *al.*, 2014 ; TREJO-ESTRADA et *al.*, 1998 ; NAKKEERAN et *al.*, 2006 ; SESSITSCH, et *al.*, 2004). Ces mécanismes peuvent ainsi favoriser directement ou indirectement la croissance de la plante hôte.

D'une manière générale, au champs le taux de flétrissement est le plus élevé dans les lots fertilisés mais inoculés par rapport aux lots témoins non fertilisés mais inoculés. Cet accroissement du taux de flétrissement peut être lié à l'apport de la fertilisation, en particulier du fumier de ferme, fourni par les paysans qui pourrait constituer une source d'inoculum de *R solanacearum*. Dans ce contexte, la fortification de la fertilisation organique par les inoculants d'antagonistes à *R. solanacearum* est une alternative intéressante. Des effets protecteurs sous serre et au champ contre le flétrissement bactérien du tabac de fertilisants organiques fortifiés

par des inoculants de bactérie (*Bacillus sp*) antagonistes à *R solanacearum* furent rapportés. A ces effets sont corrélés une sécrétion de divers métabolites secondaires par la bactérie antagoniste conduisant à une réduction significative de la dynamique de la population de *R solanacearum* dans le sol et une modification des communautés microbiennes du sol associées aux racines (YUAN, 2014).

Une réduction de trois à quatre fois l'incidence du flétrissement bactérien du tabac par l'application au champ de bactéries (*Pseudomonas sp*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus artrophaeus*) antagonistes à *R solanacearum* (production de substances volatiles contre *R solanacearum*) (TTAHIR, 2017)

Par ailleurs, une diminution de la sévérité du flétrissement bactérien sur des plants de pomme de terre et de tomate inoculés par des agents de biocontrôle a été rapportée par CHANDRASEKARAN, 2015.

Il a été observé au cours de la présente expérimentation que les effets de biocontrôle contre le flétrissement bactérien et de stimulation de la croissance des plants de pomme de terre de l'inoculation simple sont plus marqués avec l'inoculation simple qu'avec la co-inoculation de souches d'actinomycète antagonistes. Ceci corrobore les résultats trouvés par certains auteurs (RAMESH et PHADKE, 2012 ; SARMA et *al.*, 2015 ; SOLANKI, 2019). Toutefois, d'autres auteurs recommandent notamment la co-inoculation d'espèces différentes en particulier de bactérie et de champignon pour le contrôle biologique du flétrissement bactérien (STILING et CORNELISSEN, 2005).

Dans le cadre de la présente étude, des résultats consistants furent obtenus quant à l'efficacité *in-vitro* et en milieu réel des effets protecteurs des souches d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien. Ce qui n'est pas le cas pour certaines études, qui ont révélé une performance significativement réduite des isolats des agents de biocontrôle contre *R solanacearum* en milieu réel comparé aux conditions *in-vitro* et sous-serre (STILING et CORNELISSEN, 2005 ; LIU, 2011).

La réduction de la performance au champ des agents de biocontrôle est généralement attribuée à divers facteurs abiotiques (propriétés physico-chimiques du sol...) et biotiques tels que la capacité de colonisation du milieu, de compétition vis-à-vis des autres microorganismes du sol (STILING et CORNELISSEN, 2005 ; Yuan et *al.*, 2014 ; SARMA et *al.*, 2015).

Les souches d'actinomycète sont particulièrement connues pour leur forte capacité de colonisation du milieu et de compétition vis-à-vis des autres microorganismes du sol (SOLANKI et *al.*, 2016).

Enfin, la combinaison de l'inoculation du sol avec des souches d'actinomycètes avec le traitement du sol par l'apport d'engrais vert et l'association de la pomme de terre avec la Crotalaire pérenne *Crotalaria grahamiana* a montré une synergie positive, entraînant une augmentation significative du poids des tubercules de pomme de terre récoltés et une bioprotection renforcée contre le flétrissement bactérien se manifestant par, une réduction importante de l'incidence du flétrissement bactérien et une atténuation de la sévérité de la maladie. FERNANDES et *al.*, (2014) a montré que *Crotalaria grahamiana* peut apporter en moyenne 3 à 5 tonnes/ha de matière sèche en deux mois, correspondant à un apport d'azote de 3,3 % de la plante entière soit 100 à 165 kg/N.

Les actinomycètes se caractérisent aussi par leur aptitude à dégrader les matières organiques du sol grâce à de nombreuses enzymes hydrolytiques extracellulaires, participant ainsi activement à la formation de l'humus, des molécules complexes, ainsi que des substances récalcitrantes. En particulier la cellulose, la lignocellulose, le xylane et la lignine, qui jouent un rôle important dans les processus de décomposition de la matière organique du sol (PETROSYAN et *al.*, 2004).

Par rapport aux résultats obtenus, nous pouvons conclure que les hypothèses formulées dans l'introduction ont été vérifiées.

L'intégration des plantes assainissantes du sol dans les systèmes de culture de la pomme de terre a permis de réduire de manière significative l'incidence et la sévérité du flétrissement bactérien, tout en entraînant une augmentation notable du rendement en tubercules. Cette observation confirme l'efficacité des plantes assainissantes du sol dans la protection contre cette maladie et souligne leur potentiel dans les pratiques agricoles durables.

Les souches d'actinomycètes isolées à partir des sols rhizosphériques de la pomme de terre, présentant des propriétés antagonistes aux souches de *Ralstonia solanacearum* in vitro, ont démontré un potentiel de bioprotection in vivo et sur le terrain de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien. Ces résultats confirment le rôle bénéfique des actinomycètes en tant qu'agents de biocontrôle dans les systèmes agricoles.

La combinaison de l'utilisation de la plante assainissante du sol *Crotalaria grahamiana* avec l'inoculation par les souches d'actinomycètes antagonistes à *Ralstonia solanacearum* a renforcé de manière significative la bioprotection de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien. Cette constatation souligne l'importance de l'intégration de différentes approches de biocontrôle pour maximiser l'efficacité dans la protection des cultures contre les maladies.

CONCLUSION GENERALE

Le flétrissement bactérien causé par le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum* est une maladie grave de cultures maraîchères d'importance économique dont la pomme de terre dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes. A Madagascar, cette maladie est devenue endémique dans nombreuses zones de production sur les Hautes Terres centrales, en particulier dans la région Vakinankaratra, la principale zone de production. A l'instar des maladies d'origine tellurique, les stratégies de lutte contre le flétrissement bactérien, uniquement à titre préventif, s'appuient sur la combinaison de différentes méthodes de lutte (génétique, culturale, agronomique, mécanique) afin de réduire son incidence et sa sévérité.

Cette thèse a permis de tester l'efficacité d'une méthode intégrée de bioprotection de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien basée respectivement sur l'exploration des propriétés assainissantes du sol de deux espèces de Crotalaire dont *C. grahamiana* et *C. spectabilis*, adaptées localement et les propriétés antagonistes aux souches de *R. solanacearum* et promotrices de la croissance des plants, de souches d'actinomycètes endogènes isolées à partir de sols rhizosphériques de plants de pomme de terre.

La thèse a contribué à l'apport de connaissances sur les déterminants de l'efficacité de la bioprotection de la pomme de terre contre le flétrissement bactérien assurée par les plantes assainissantes du sol (*Crotalaria grahamiana*, *Crotalaria spectabilis*). Ces plantes, exploitées tant comme précédents culturels, cultures associées, engrais verts que paillis végétaux, ont démontré leur potentiel remarquable dans l'amélioration des rendements et la réduction des maladies dans les cultures de pommes de terre. Les résultats obtenus ont mis en évidence une augmentation significative du développement des parties aériennes des plants de pomme de terre ainsi que des rendements en tubercules totaux et commercialisables dans les systèmes de culture associée, par rapport à la monoculture. De plus, une diminution notable du pourcentage de plants malades et de tubercules pourris a été observée, soulignant ainsi l'impact positif de ces pratiques agroécologiques sur la santé et la productivité des cultures de pommes de terre.

Les souches d'actinomycètes isolées des sols rhizosphériques de la région de Vakinankaratra ont présenté des capacités remarquables au laboratoire, avec des halos d'inhibition élevés contre *R. solanacearum*, ainsi qu'une capacité à solubiliser les phosphates et à produire de l'acide indole-3-acétique (AIA). Les résultats des expérimentations en serre et sur le terrain ont corroboré ceux obtenus en laboratoire, en mettant en évidence une réduction significative de l'infestation par *R. solanacearum*, ainsi qu'une augmentation notable de la croissance et des

rendements en tubercules totaux et commercialisables. Ces conclusions renforcent l'idée que ces souches d'actinomycètes peuvent jouer un rôle important dans la gestion durable des cultures de pommes de terre, offrant ainsi des perspectives prometteuses pour leur utilisation future.

La bioformulation utilisant un terreau riche en nutriments a été efficace pour favoriser la croissance active des actinomycètes, et aucun cas de contamination n'a été observé lors du suivi en laboratoire. Cependant, il reste crucial de mettre au point des formulations plus économiques et facilement accessibles en grande quantité pour les actinomycètes, tout en conservant leur efficacité. Ces formulations devraient être conçues de manière à être facilement appliquées par les producteurs sur le terrain, offrant ainsi une solution pratique et abordable pour l'amélioration des cultures de pommes de terre et d'autres cultures agricoles.

Outre leur efficacité dans la lutte contre le flétrissement bactérien, le traitement du sol par inoculation avec les souches d'actinomycètes avec association à *Crotalaria grahamiana* ont également eu des effets positifs sur la croissance et le rendement des plants de pomme de terre. Les plants traités ont présenté une croissance plus vigoureuse et des rendements en tubercules plus élevés, en particulier pour les tubercules commercialisables, par rapport aux plants non traités.

Cette observation suggère que ces approches de biocontrôle peuvent non seulement protéger la culture de pomme de terre contre *R. solanacearum*, mais également stimuler leur développement et leur productivité. L'intégration des plantes assainissantes du sol dans les systèmes de culture, le traitement du sol par inoculation avec des souches d'actinomycètes antagonistes ou la combinaison de ces traitements offrent ainsi des perspectives intéressantes pour une approche intégrée de la gestion des maladies du flétrissement bactérien, en tirant parti des interactions bénéfiques entre les micro-organismes du sol et les plantes hôtes. En intégrant ces pratiques dans les systèmes de productions agricoles sur les Hautes Terres, il est possible de promouvoir une agriculture plus durable et résiliente, alliant accroissement de la productivité agricole, sécurisation alimentaire et préservation et régénération des ressources de l'environnement.

Malgré les résultats prometteurs obtenus dans cette étude, il est important de reconnaître certaines limites qui peuvent influencer l'interprétation et l'applicabilité des résultats. Tout d'abord, cette recherche a été menée dans un contexte spécifique, ce qui soulève la question de se généraliser à d'autres régions ou conditions environnementales. De plus, la durée relativement courte de l'étude limite notre capacité à évaluer pleinement les effets à long terme

des pratiques de biocontrôle sur la santé des sols et la durabilité des systèmes agricoles. De plus, les variations naturelles et les limitations techniques peuvent avoir influencé les résultats et nécessitent une approche prudente dans leur interprétation. Enfin, le manque de données à long terme sur l'efficacité et la durabilité des pratiques de biocontrôle souligne la nécessité de poursuivre les recherches dans ce domaine pour mieux comprendre leur impact sur les rendements agricoles et l'environnement.

Au regard de tout ce qui précède, nous pouvons affirmer en toute modestie avoir atteint les principaux objectifs que nous nous sommes fixés au début de la présente étude, à savoir :

- Evaluer le potentiel de biocontrôle des plantes assainissantes du sol (*Crotalaria grahamiana* et *Crotalaria spectabilis*.) contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre dû au complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum*.
- Evaluer le potentiel de bioprotection de la pomme de terre contre la maladie de flétrissement bactérien des souches d'actinomycètes antagonistes aux souches locales de *R solanacearum*.
- Evaluer en milieu réel l'efficacité de la combinaison de l'utilisation des plantes assainissantes du sol avec l'inoculation du sol par les souches d'actinomycètes antagonistes aux souches de *Ralstonia solanacearum* sur le contrôle du flétrissement bactérien de la pomme de terre.

Ces approches de biocontrôle offrent des alternatives prometteuses aux pesticides chimiques traditionnels et peuvent contribuer à une agriculture plus durable et respectueuse de l'environnement. En exploitant la synergie entre les micro-organismes bénéfiques et les plantes de couverture, il est possible de développer des stratégies de lutte intégrées qui protègent les cultures tout en préservant la santé des sols et de l'environnement. Ces résultats fournissent une base solide pour de futures recherches et pour la mise en œuvre de pratiques agricoles innovantes visant à assurer la sécurité alimentaire et la durabilité des systèmes agricoles.

Les résultats de cette thèse ouvrent des perspectives de recherche dans le domaine de la protection des cultures contre les maladies. Des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la bioprotection contre le flétrissement bactérien observée et pour évaluer l'efficacité de ces approches sous d'autres conditions agro-pédo-climatiques dont :

- Poursuivre la recherche pour développer des formulations de biocontrôle des actinomycètes plus économiques, faciles à produire à grande échelle et simples à appliquer sur le terrain.

- Étendre les études sur l'utilisation des actinomycètes en biocontrôle à d'autres cultures sensibles aux maladies bactériennes, en évaluant leur efficacité et leur impact sur la croissance et le rendement.
- Explorer des méthodes d'inoculation plus efficaces pour garantir une colonisation optimale des actinomycètes dans le sol et sur les racines des plantes, améliorant ainsi leur efficacité en tant qu'agents de biocontrôle.
- Étudier les synergies entre l'utilisation des actinomycètes en biocontrôle et d'autres pratiques agricoles durables telles que la rotation des cultures, la gestion de l'eau et l'utilisation d'engrais organiques, pour développer des approches holistiques de gestion des maladies des cultures.
- Faciliter le transfert des connaissances et des technologies des laboratoires de recherche vers les agriculteurs en fournissant une formation et un accompagnement technique, ainsi qu'en favorisant l'accès aux produits et aux équipements nécessaires à la mise en œuvre des pratiques de biocontrôle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDURAHMAN, A., PARKER, M.L., KREUZE, J., ELPHINSTONE, G., STRUIK, P.C., KIGUNDU, A., ARENGO, E., SHARMA, K., 2019.** Molecular epidemiology of *Ralstonia solanacearum* species complex strains causing bacterial wilt of potato in Uganda, *Phytopathology* 109 (11): 1922-1931
- ADAMA, O., KLOTIOLOMA, C., KONATE, I., BOUBACAR, I., 2019.** Selection of Cocoa Tree (*Theobroma cacao* Linn) Endophytic Bacteria Solubilizing Tri-Calcium Phosphate, Isolated from Seedlings Grown on Soils of Six Producing Regions of Côte d'Ivoire *Advances in Microbiology*, 2019, 9, 842-852 <https://www.scirp.org/journal/aim> ISSN Online: 2165-3410 ISSN Print: 2165-3402
- ADESINA, M.F., LEMBKE, A., COSTA, R., SPEKSNIJDER, A., SMALLA, K., 2007.** Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards.
- ALVAREZ, A. M., 2005.** Diversity and diagnosis of *Ralstonia solanacearum*. In: *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum* species complex.
- BELIAIRE, J. F., 2020.** Importance de la culture de la pomme de terre pour les exploitations agricoles et rentabilité de la production de plants de semence et de consommation. pp. 24-40.
- BELYAGOUBI, L., 2014.** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, P 143.
- BERDY, J., 2005.** Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot* 58, 1-26
- BUDDENHAGEN, I. W., et KELMAN, A., 1964.** Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* Vol. 2, pp. 294-230.
- BUDDENHAGEN, I. W., SEQUEIRA, L., KELMAN, A., 1962.** Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology.* Vol. 52, pp. 726.
- BRIC, J.M., BOSTOCK, R.M., SILVERSTONE, S.E., 1991.** Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535–538.
- CABI, 2016**
- CARDOSO, S.C, SOARES, A.C.F, BRITO, A. DOS S, LARANJEIRA, F.F, LEDO C.A.S et SANTOS, A.P., 2006.** Control of tomato bacterial wilt through the incorporation of aerial part of pigeon pea and *Crotalaria* to soil. *Summa Phytopathologica*, v.32, p. 27-33.
- CARUSO, P., PALOMO, J.L., BERTOLINI, E., ALVAREZ, B., LÓPEZ, M.M., and BIOSCA E.G., 2004.** Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 populations in a

Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71 N°1, pp. 140–148.

CEFFEL., 2012. Etude de la filière légumes sur les Hautes Terres de Madagascar-régions Analamanga, Itasy, Vakinankaratra, Amoron'i Mania (pomme de terre, tomate, oignon, carotte, haricot vert et chou).

CELLIER, G. et PRIOR, P., 2010. Diversité génétique, phylogénétique et discernement du pouvoir pathogène sur Solanacées des souches de *Ralstonia solanacearum* : [Résumé]. IN : 9èmes rencontres plantes-bactéries, 18-22 janvier 2010, Paris, AUSSOIS, France, p 39.

CHANDRASEKARAN, M., SUBRAMANIAN, D., YOON, E., KWON, T., CHUN, S., 2016. Meta-analysis reveals that the Genus *Pseudomonas* Can Be a Better Choice of Biological Control Agent against Bacterial Wilt Disease Caused by *Ralstonia solanacearum* Plant Pathol. J. 32(3): 216-227. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2015.0235> pISSN 1598-2254 eISSN 2093-9280

CHEN, D., LIU, X., LI, C., TIAN, W., SHEN, Q., and SHEN, B., 2014. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt. *J. Environ. Manage.* 137:120-127

CIP-CGIAR., 2008. The odyssey of the potato (L'odyssée de la pomme de terre). 24/04/2006, 24 p.

COOK, D. R., BARLOW, E., and SEQUEIRA, L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and the hyperse,sitive response. *Molecular plant-Microbe Interaction*, N° 2, pp. 113-121.

COOK, D. R., and SEQUEIRA, L., 1988. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in taxonomy and diagnosis. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter*, N° 4, pp. 4.

COOK, D., & SEQUEIRA, L., 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetics methods. IN: *Bacterial wilt: the disease and it's causative agent, Pseudomonas solanacearum*, Edited by A. C. HAYWARD &G. L. HARTMAN, Wallingford, UK, CAB International. pp. 77-93.

COUPAT, B., GUIDOT, A., FALL, S., PRIOR, P., NESME, X., et BERTOLLA, F., 2008. Transformation naturelle dans le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* : détection d'évènements de transferts multiples d'ADN et d'ADN de grande taille. In : AUSSOIS 2008, 8èmes rencontres plantes-bactéries. INRAN, Angers, du 14 – 18/01/2008, p. 13.

CRAWFORD, D. L., LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.L., and OUSLEY, M.A., 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of fungal root pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*.v.59, p.3899-390.

DAIRI, T., 2005. Studies on Biosynthetic Genes and Enzymes of Isoprenoids Produced by Actinomycetes. *J. Antibio*, 58 (4), 227-243.

DEBERDT, P., GOZE, E., CORANSON-BEAUDU, R., PERRIN, B., FERNANDES, P., LUCAS, P., and RATNADASS, A., 2014. *Crotalaria spectabilis* and *Raphanus sativus* as Previous Crops Show Promise for the Control of Bacterial Wilt of Tomato Without Reducing Bacterial Populations

DESLANDES, L., PILEUR, F., LIAUBET, L., CAMUT, S., BEYNON, J., ARLAT, M. and MARCO, Y., 1997. Identification and mapping of RRS1, a single recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to *Ralstonia solanacearum*. In: Bacterial wilt disease, Molecular and ecological aspects. Ph. PRIOR, C. ALLEN and J. ELPHINSTONE (edit.), Gosier, Guadeloupe, France, 22-27 June 1997, pp. 205-254.

DENNY, T.P., HAYWARD, A.C., 2001. Gram-negative bacteria: *Ralstonia*. Pages 151-174 in: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd ed. Shaad, NW; Jones JB, Chun W., eds. APS Press, St. Paul, M. N. CABI/EPPO.1999.

DESAEGER, J. and RAO, M., 2000. Parasitic nematode populations in natural fallows and improved cover crops and their effects on subsequent crops in Kenya, International Centre for Research in Agroforestry (ICRAF), PO Box 30677, Nairobi, Kenya.

ELPHINSTONE, J., 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview, in Bacterial Wilt Disease and The *Ralstonia solanacearum* Species Complex, eds C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (St. Paul, MN: APS Press), pp. 9–28.

ELPHINSTONE, J.G., HENNESSY, J., WILSON, J.K., and STEAD, D.E., 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *Bull. OEPP*, Vol. 26, pp. 663-678.

ELPHINSTONE, J.G., PARKINSON, N.M., TOMLINSON, D.L., BEW, J. and STANFORD, H., 2006. Ecology and management of the *Ralstonia solanacearum* Phylotype II, séquévars 1 strain, pandemic on potato. In: The 4th bacterial wilt symposium, The Lakeside Conference Center, Central Science Laboratory, York, U.K. 17th – 20th July 2006., pp. 43.

EL-TARABILY K.A., NASSAR A.H., HARDY G.E., SIVASITHAMPARAM K., 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J. Appl. Microbiol.*106:13–26. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03926.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

ENGLEBRECHT, M. C., 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A. C. Hayward (ed.), Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. Bacterial Wilt Newsletter, No. 10, pp. 3-5.

EPPO, 2005. Fiche informative sur les organismes de quarantaine “*Ralstonia solanacearum*”. CABI/OEPP/UE Contrat 90/399003. pp 1.

FAO, 2008. Année internationale de la pomme de terre : Eclairage sur un trésor enfoui. Compte rendu de fin d'année. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Rome, ISBN : 978- 92-5-306142-7, 148 p.

FAOSTAT, 2015.

FAOSTAT, 2021.

FARAG, N., STEAD, D.E., JANSE, J.D., 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3, biovar 2, Detected in Surface (irrigation) Water in Egypt. *Journal of Phytopathology* 147:485-487.

FEGAN, M. and PRIOR, P., 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. C. ALLEN, P. PRIOR, and A. C. HAYWARD (Eds.), The American phytopathological society, pp. 449-461.

FRANÇOIS, E., 1927. Sur deux ennemis de la Pomme de terre à Madagascar. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée.*, pp. 172-175

FRENCH, ER., HERBERT, Y., 1980. *Methodos de Investigacion fitopatologica.* IICA san Jose Costa Rica. 289p.

FRENCH, E.R., ALEY, P., TORRES, E., NYDEGGER, U., 1993. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil. *ACIAR Proceedings* 45: 70–77.

GHERBAWY, Y., ELHARIRY, H., ALTALHI, A., EL-DEEB, B., KHIRALLA, G., 2012. Molecular screening of *Streptomyces* isolates for antifungal activity and family 19 chitinase enzymes. *J.Microbiol.* 50:459–468. doi: 10.1007/s12275-012-2095-4.

GILDEMACHER, P.R., KINYUA, Z. M., WAKAHIU, M., and PRIOU, S., 2006. Integrated management of bacterial wilt in potato in the East African highlands. In: The 4th bacterial wilt symposium, The Lakeside Conference Center, Central Science Laboratory, York, U.K. 17th – 20th july 2006., pp. 44.

GITARI, H.I., GACHENE, C.K.K, KARANJA, N.N., KAMAU, S., NYAWADE, S.O., SCHULTE-GELDERMANN, E., 2019. Potato-legume intercropping on a sloping terrain and its effects on soil physico-chemical properties. *Plant Soil* 438–447.

GLICK, R.B., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, 012:2012:963401. doi: 10.6064/2012/963401. Epub 2012 Sep 19.

GOMES, R.C., SEMÊDO, L., SOARES, R.M.A., ALVIANO, C.S., LINHARES, L.F., and COELHO, R.R., 2000 Chitinolytic actinomycetes from a Brazilian tropical soil active.

GOPALAKRISHNAN, S., PANDE, S., SHARMA, M., HUMAYUN, P., KIRAN, B.K., SANDEEP, D., VIDYA, M.S., DEEPTHI, K., RUPELA, O., 2011. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of Fusarium wilt of chickpea. *Crop Prot.*30:1070–1078.

GRANADA et SEQUEIRA 1981a. A selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. Abstract, Phytopathology, Vol. 71 N°2, p. 220. **GRANADA G. A. and SEQUEIRA L., 1981b.** Survival of *Pseudomonas solanacearum* in the soil rhizosphere, and plant roots. Abstract, Phytopathology, Vol. 71 N°8, p. 877.

GRIMAUULT, V., GÉLIE, B., LEMATTRE, M., PRIOR, P., SCHMIT, J., 1994. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44:105-1.

GRIMSLEY, N. and HANSON, P., 1997. Genetics of plant resistance to bacterial wilt: Round table report. In: *Bacterial wilt disease, Molecular and ecological aspects*. Ph. PRIOR, C. ALLEN and J. ELPHINSTONE (edit.), Gosier, Guadeloupe, France, 22-27 June 1997, pp. 263-266.

HAYWARD, A. C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* Vol. 27, pp. 265-277.

HAYWARD, A. C., 1976. Systematics and relationship of *Pseudomonas solanacearum*, p. 6-21. In: *Proceedings of the 1st International Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas solanacearum*. L. Sequeira and A. Kelman (Edi.), North Carolina State University, Raleigh, N.C.

HAYWARD, A. C., 1983. *Pseudomonas solanacearum*: bacterial wilt and moko disease. In: *plant bacterial diseases*. FAHY P. C. and PERSLEY G.J. (edit.), Academic Press, Sydney, Australie, pp. 129-135.

HAYWARD, A. C., 1990. Proposal for a quick practical identification. In: *Methods in phytopathology*. Z. KLEMENT R., RUDOLPH and D.C. SANDS (edit.), AKADEMIAI KIADO, pp. 272-274. **HAYWARD A. C., 1991.** Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* Vol. 29, pp. 65-87.

HAYWARD, A.C., EI-NASHAAR, H.M., NYDEGGER, U. and DE LINDO, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 69, pp. 269-280.

HAYWARD, AC., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29, 65– 87.

HE, L.Y., SEQUEIRA L., KELMAN, A., 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease*, Vol. 67, pp. 1357–1361.

HERVAS, A., LANDA, B. B., JIMENEZ-DIAZ R. M., 1997. Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from *Fusarium* wilt by seed treatment with non pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 631-642.

HILTNER, L., 1904 Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderes Berücksichtigung der Grundungen und Brauche. Arb Dtsch Landwirt Ges Berl 98:59–78.

HONG, J., JI, P., MOMOL, M.T., OLSON, S.M., AND JONES, J. B., 2006. Association of *Ralstonia solanacearum* in irrigation ponds and on semi-aquatic weeds in North Florida. In: The 4th International bacterial wilt symposium: Programme and abstracts book. 17th-20th July 2006, the Lakeside conference center, Central science laboratory, York, United Kingdom, pp. 80.

JANSE, JD, ARULAPPAN, F.A.X., SCHANS, J., WENNEKER, M., & WESTERHUIS, W., 1998. Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in The Netherlands. In: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects (Ed. Poussier et al., 1999).

JOG, R., NARESHKUMAR, G., RAJKUMAR, S., 2016. Enhancing Soil Health and Plant Growth Promotion by Actinomycetes. In: Subramaniam G., Arumugam S., Rajendran V., editors. Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes. Springer; Singapore: pp. 33–45. [[Google Scholar](#)].

JOO, G.J., 2005. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol. Lett.* 27:1483–1486. doi: 10.1007/s10529-005-1315-y. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

JOOSTEN, L., and VANVEEN, J., 2011. Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against micro-organisms. *Photochem. Rev.*, 10, 127–136.

KAKUHENZIRE, R., LEMAGA, B., KASHAIJA, I., ORTIZ, O., MATEEKA, B., 2013. Effect of *Crotalaria falcata* in Crop Rotation and Fallowing on Potato Bacterial Wilt Incidence, Disease Severity and Latent Infection in Tubers and Field Soil, *Biopestic. Int.* 9(2) : 182-194.

KELMAN, A., 1954. The Relationship of Pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to Colony Appearance in a Tetrazolium Medium. *Phytopathology*, 44, 693-695. Hayward., 1964.

KELMAN, A. and PERSON, L., 1961. Strains of *Ralstonia solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut. *Phytopathology*. Vol. 51, pp 158-161., 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum* 55:304-309.

KELMAN, A., SEQUEIRA, L., 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum* 55:304-309.

KEMPE, J. and SEQUEIRA, L., 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant disease*, Vol. 67, N°5, pp. 499-503.

KHEIRANDISH, Z., HARIGHI, B., 2015. Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato, *Biological Control*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.007>.

KINYUA, Z. M., GILDEMACHER, P.R., DEMO, P., PRIOU, S. and OTIPA, M. J., 2006. Opportunities and challenges of field sanitation in potato bacterial wilt management. In: *The 4th bacterial wilt symposium, The Lakeside Conference Center, Central Science Laboratory, York, U.K. 17th – 20th july 2006.*, pp. 48.

KLEMENT, Z. 1990. isolation of bacteria. in: klement, z., rudolph, k. and sands, D.C., Eds., *Methods in Phytobacteriology*, Akademiai Kiado, Budapest, 95-124.

KUMAR, A., BOHRA, C., SINGH, C.K. 2003. *Environnent pollution and management*. India: New delhi-110035(Ed), Pp532-534.

KURABACHEW and WYDRA, K., 2013. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bio- protectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, *Biological Control*, 67(1): 75–83.

KUARABACHEW, H., FASIL, A., and YAYNU, H., 2007. Evaluation of Ethiopian isolates of *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*. *Acta Agriculturae Slovenica*, 90(2): 125–135.

LEE, S.Y., TINDWA H., LEE, Y.S., NAING, K.W., HONG, S.H., NAM, Y., KIM, K.Y., 2012. Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase, beta-1,3 glucanase, and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *J. Microbiol. Biotechnol.* ;22:1359–1366. doi: 10.4014/jmb.1203.02056. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

LEMAGA, BERGA., SIRIRI, D. and EBAYANT, P., 2001. Effect of Soil Amendments on Bacterial Wilt Incidence and Yield of Potatoes in Southwestern Uganda. *African Crop Science Journal*, Vol 9, No 1, p. 267-276.

LEKD, YU, N.H., PARK, A.R., PARK, D.J., KIM, C.J., KIM, J.C., 2022. *Streptomyces sp.* AN090126 as a biocontrol agent against bacterial and fungal plant diseases. *Microorganisms* 10 :791.

LEROUX, A.C., 2003. Détection des bactéries *Ralstonia solanacearum* et *Clavibacter*.

LEROUX, A.C., HUCHET, E. et MORLIERE, S., 2008. Evaluation du risque sanitaire lié à la contamination latente de tubercules de pomme de terre par *Ralstonia solanacearum* sur plusieurs années de multiplication. In : AUSSOIS 2008. 8ème rencontres plantes-bactéries 14-18/01/2008. INRA- Centre de recherche d'Angers. Résumé, *Plantes-bactéries-AUSSOIS-2008*.pdf, p. 81. michiganensis sepadonicus. Poster, INRA, UMR BiO3P, Rennes, France, 1p.

LUGTENBERG, B. J. J., DEKKERS, L. and BLOEMBERG, G.V., 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:461-490.

LUC, M., SIKORA, R., BRIDGE, J., 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2ème Edition. CABInternational, London. 896 pp.

LYNCH, J.M., 1990. Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Lynch JM (Ed) *The rhizosphere*. Wiley, Chichester, pp 1–10.

LIU, Q., LI, Y., CHEN, J., 2011. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* on *Mesona chinensis* in China. *Plant Dis.* 95(2):222. doi: 10.1094/PDIS-08-10-0603. PMID: 307434.

MAAS, GEESTERANUS, H. P. and VRUGGINK H., 1990. Methods for phytosanitary measures. In: *Methods in phytopathology*. Z. KLEMENT R., RUDOLPH and D.C. SANDS (edit.), AKADEMIKI KIADO, pp. 307-313.

MACIEL, J.L.N., ST VAN DER SAND, and DUARTE, V., 1997. Incidence of *Ralstonia solanacearum* groups on a single potato field determined by TRNA Consensus primers. Departemto de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS, C.P. 776, Porto Alegre, RS 90001-970, Brazil, *Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium*, pp. 77.

MARCO, Y., TRIGALET, A., VASSE, J., OLIVIER, J., FENG, D. X. and DESLANDES, L., 2005. Host resistance to *Ralstonia solanacearum*. In: *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum* species complex. C. ALLEN, Ph. PRIOR and A. C. HAYWARD (edit.), pp. 275-283.

MARTIN, C., FRENCH, E.R., 1985. Bacterial wilt of potato *Pseudomonas solanacearum*. Centro internacional de la papa (CIP), Bulletin No 13, Section 2-97,1-8.

MARTIN, C., FRENCH, E.R. AND NYDEGGER, U., 1982. Strains of *Pseudomonas solanacearum* affecting Solanaceae in the Americas. *Plant disease*, Vol. 66, No 6, 458-460.

MESSIHA, N.A., VAN BRUGGEN AH, VAN DIEPENINGEN A.D., DE VOS, O.J., TERMORSHUIZEN, A.J, TJOU-TAM-SIN, N.N.A., JANSE, J.D., 2007. Potato brown rot incidence and severity under different management and amendment regimes in different soil types. *European Journal of Plant Pathology* 119(4):367–381.

MIAN, D., CORANSON BEAUDU, R., GRASSART, L., WICKER, E., GUIBAUD, C. AND PRIOR, P., 2003. A new *Ralstonia* population affects Anthurium plantations and Cucurbitaceous crops in Martinique. [Abstract] In: *Proceeding of the 39th Annual meeting on the Caribbean Food crops Society “Food production, marketing, and safety: Strategies for Caribbean Food Society”*, St George’s Grenada, 13-18 July 2003, pp. 173.

MURIITHI, L.M.M., 2000. Farmer participation in management of potato wilt in central and eastern Kenya. African potato association conference proceedings, Kampala, Uganda, 29th May – 2nd June 2000, Vol. 5, pp. 361-367.

- NAKAEW, N.W., PATHOM-AREE and LUMYONG, S. 2009.** Generic diversity of rare actinomycetes from Thai cave soils and their possible use as new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, 23: 21-26.
- NAKKEERAN, S., KAVITHA, K., CHANDRASEKAR, G., RENUKADEVI, P., FERNANDO, W.G.D., 2006.** Induction of plant defense compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Sci Technol* 16 (4): 403-416.
- NAGPURE A., CHOUDHARY B., KUMAR S., GUPTA R.K., 2014.** Isolation and characterization of chitinolytic *Streptomyces* sp. MT7 and its antagonism towards wood-rotting fungi. *Ann. Microbiol.*64:531–541. doi: 10.1007/s13213-013-0686-x.
- NGUYEN, M.T., RANAMUKHAARACHCHI, S.L., 2010.** Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *J Plant Pathol* 92 (2): 395-406.
- NYAWADE, S.O., KARANJA, N.N., GACHENE, C.K.K., GITARI, H., SCHULTE GELDERMANN, E., PARKER, M.L., 2019.** Intercropping Optimizes Soil Temperature and Increases Crop Water Productivity and Radiation Use Efficiency of Rainfed Potato; *American Journal of Potato Research* <https://doi.org/10.1007/s12230-019-09737>.
- OKON J.,1990.** Methods in agronomy to reduce bacterial diseases. In: *Methods in phytopathology*. Z. KLEMENT R., RUDOLPH and D.C. SANDS (edit.), AKADEMIKI KIADO, pp. 301-306.
- OCDE, 1997.** Consensus document on the biology of *Solanum tuberosum* subsp; tuberosum (Potato), 38 p.
- OPINA, N., TAVNER, F., HOLLWA, G., WANG, J .F., LI, T. H., MAGHIRANG, R., 1997.** A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum*. *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5, 19–30.
- PARRUR, 2013.** Contrôle intégré de la bactériose (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre dans les petites exploitations agricoles de la Région Vakinankaratra.
- PETLIER, M.A.G., 1959.** Notes sur les Légumineuses-Papilionoïdées de Madagascar et des Comores, *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée* Année 1959 6-10 pp. 482-486.
- PENNEC, J.P., 1991.** Amplification enzymatique in vitro de l'ADN: Technique PCR. *Phytoma*, N°430, pp. 23-26.
- PRIOR, P., 2003.** Analyse du risque phytosanitaire (ARP), Ra “race 2” Moko, INRA, La Réunion, France, pp. 31. BAN-b1.pdf du 15/05/08, 16h 33’ 38”
- PRIOR, P. et GUIDOT, A., 2005.** Epidémiologie des maladies bactériennes et virales. “Le flétrissement bactérien à *Ralstonia solanacearum* : dynamique et adaptation des populations de

pathogènes''. Rapport annuel, CIRAD, pp. 58-59. protectiondesplantes.pdf du 15/05/2008 16h 33' 38''.

PRIOU, S. and ALEY, P., 2002. Bacterial wilt of potato. International potato center (CIP), Apartado 1558, Lima 12, Peru, 5 p. PRIOU, S. AND ALEY, P., CHUJOY, E. LEMAGA, B. AND FRENCH, E.R., 1999. Integrated control of Bacterial wilt of potato. International potato center (CIP), Apartado 1558, Lima 12, Peru, pp. 1-30.

PRIOU, S. VARGAS, M., ALEY, P., GUTARRA, L. and SALAS, A. 2006. Characterization of promising sources of high levels of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum* biovar 2A) in wild species of potato. In: The 4th bacterial wilt symposium, The Lakeside Conference Center, Central Science Laboratory, York, U.K. 17th – 20th July 2006., pp. 16.

PTROSYAN, P., GARCIA-VARELA, M., LUZ-MADRIGAL, A., 2003. *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v.53, p.269-273. uc, M., Sikora, RALSTONIA, Bridge, J., 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2ème Edition. CAB International, London. 896 pp.

RAHETLAH, V B., RAVELOMANANTSOA, S., Prior, P., RASOLOMAMPIANINA, R., RAKOTOARIMANGA, C N, ANDRIANARISOA, A A B., ANDRIAMBELOSON, O., RAVELOSON RAVELOMANARIVO, L H., RAZAFINDRALEVA, H A., RALISOA, N., ANDRAINARISOA, B., 2016. Contrôle intégré du flétrissement Bactérien (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre dans la région Vakinankaratra region In : Recherche interdisciplinaire pour le développement durable et la biodiversité des espaces ruraux malgaches. Application à différents thématiques du territoire. Duchaufour Hervé (ed.), Razafimbelo-Andriamifidy Tantely (ed.), Rakotoarisoa Jacqueline (ed.), Ramamonjisoa Bruno (ed.), Rakotondravao. SCAC, PARRUR. Antananarivo : MYE, 169-188.

RAKOTOARIMANGA, N., ZANANIRINA, J., RAMAMONJISOA, D., RAMANANKIERANA, H. 2014. Lutte biologique antifongique : actinomycètes du sol rhizosphérique antagonistes de *Fusarium* isolé du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* L., 1753) pourri, Afrique SCIENCE, p243 – 255.

RAMESH, R. and PHADKE, G.S, 2012. Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Journal of crop protection, 37: 35-41, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.008>.

RANDRIANANGALY, S., 2003. Le flétrissement bactérien du Géranium rosat à Madagascar « Caractérisation de l'agent causal et étude des effets phytosanitaires de la bouse de vache et de sa microflore sur le pathogène », p 123 – 155.

RECKHAUS, P., 1997. MALADIES ET RAVAGEURS DES CULTURES MARAICHÈRES. : à l'exemple de Madagascar/ Peter Reckhaus.- Weikershein : Margraf ISBN 3-8236-1274-3.

REMENANT, B., COUPA-GOUTALAND, B., CELLIER, G., GUIDOT, A., WICKER E., MANGENOT, S., BARBE, V., MEDIGUE, C. et PRIOR, P., 2010. Séquençage de trois nouvelles souches du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* : Pangénome et génomique comparative. [Résumé]. IN : 9èmes rencontres plantes-bactéries, 18-22 janvier 2010, Paris, AUSSOIS, France, p 32.

RHOADES, H.L. 1964. Effect of *Crotalaria spectabilis* and *sesbania exaltata* on plant nematode populations and subsequent yield of snap beans and cabbage.

RODRIGUEZ KABANA R., NC. 1992. Evaluation of the herbicidal and nematicidal activities of DMDS- a potential alternative to methyl bromide, Rodriguez Kabana R., NC

ROUSSEL, P., ROBERT, Y. et CROSNIER, J.C., 1996. La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. P. ROUSSEL, Y. ROBERT et J.C. CROSNIER (edit.), INRA Paris, France, ISBN : 2-7380-0676-0, 607 p.

SARMA, B.K., YADAV, S.K., SINGH, S., SINGH, H.B., 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biol Biochem* 87:25–33. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.001>.

SCHAAD W., 2001. Laboratory guide for identification of plant bacterial. SCHAAD [Hrsg.] - 3, Edit. St. PAUL, Minnesota, 373 p.

SCHROTH, M. N., BAHME, J. B. C., 1990. Rhizosphere bacteria: Biological control. In: *Methods in phytopathology*. Z. KLEMENT R., RUDOLPH and D.C. SANDS (edit.), AKADEMIKI KIADO, pp. 375-379.

SEAL, S.E., LUKE, A., JACKSON and DANIELS, M.J., 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, pp. 3759-3761.

SESSITSCH, A., MITTER, B., BERG, G., 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology* 50(4): 239-49, doi: [10.1139/w03-118](https://doi.org/10.1139/w03-118).

SIDIKOU, R.D.S., 2002. Contribution des biotechnologies végétales à l'adaptation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) au Niger. Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences, Université Abdou Moumouni de Niamey, Niamey, Niger, 359 p.

SIDIKOU, R.D.S., SIHACHAKR, D., LE ROUX, A.C., SERVAES, A., AMBROISE, A., JOUAN, B., ELLISSECHE, D. ET DUCREUX, G., 2005. Etude de la résistance in vitro à *Ralstonia solanacearum* chez six hybrides somatiques de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et leurs parents. *Cahiers de l'Institut National de la Recherche Scientifique, Série A sciences et médecine*, Vol. 3, pp. 75-80.

SKOGLUND, L.G., SEAL, S., ELPHINSTONE, J. G. and BERRIORS, D.E., 1993. Study of latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum* in Burundi. *Bacterial wilt, Australian Centre for International Agricultural Research proceedings* 45, 106-110.

SMAOUI S., 2010. Génie de Procédés et Environnement : Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse. 182p.

SMITH SE, READ, D.J., 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London, etc

SODERBERG, K.H., BAATH, E., 1998. Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10-11): 1259–1268.

SOLANKI, M. K., YANDIGERI, M. S., KUMAR, S. 2019. Co-inoculation of different antagonists can enhance the biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Antonie van Leeuwenhoek* 112: 1633–1644, <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01290-8>.

SOLANKI, M.K, MALVIYA, M.K, WANG, Z., 2016. Actinomycetes bio- inoculants: a modern prospectus for plant disease management. In: Subramaniam G, Arumugam S, Rajendran V (eds) *Plant growth promoting actinobacteria*. Springer Singapore, Singapore, pp 63–81.

SOLSTNER D., 1983. Les grandes productions végétales. Collection Sciences et Techniques Agricoles, 13ème édit., Paris, France, pp. 242-278.

STILING, P AND CORNELISSEN T., 2005. What makes a successful biocontrol agent? A meta-analysis of biological control agent performance. *Biol. Control* 34:236-246.

TAM-SIN, N.N.A., JANSE, J.D., 2007. Potato brown rot incidence and severity under different management and amendment regimes in different soil types. *European Journal of Plant Pathology* 119(4):367–381. doi: 10.1007/s10658-007-9167-z.

TREJO-ESTRADA, S.R., RIVAS, S.I. and CRAWFORD, D. L., 1998. In vivo and In vivo Antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against Fungal Pathogens of Turfgrass. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 865-827.

TTAHIR, H., GU, Q., WU, H. et al. 2017. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Sci Rep* 7, 40481. <https://doi.org/10.1038/srep40481>

VASSE, J., FREY, P., TRIGALET, A., 1995. Microscopic studies of intercellular infection and proto xylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8, 241-251.

WANG, J. F., THOQUET, P., OLIVIER, J. and GRIMSLEY, N., 1997a. Genetic analysis of quantitative resistance loci (QRL) of tomato variety Hawaii 7996 in Taiwan. In: *Bacterial wilt disease, Molecular and ecological aspects*. Ph. PRIOR, C. ALLEN and J. ELPHINSTONE (edit.), Gosier, Guadeloupe, France, 22-27 June 1997, pp. 245-249.

WANG, K., SIPES, B.S., SCHMITT, D.P., 2002. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review, *Nematropica*, 32(1)

WANG, J. F., HANSON, P. and BARNES, J. A., 1997b. Worldwide evaluation of an international set of resistance sources of bacterial wilt in tomato. In: *Bacterial wilt disease, Molecular and ecological aspects*. Ph. PRIOR, C. ALLEN and J. ELPHINSTONE (edit.), Gosier, Guadeloupe, France, 22-27 June 1997, pp. 269-275.

WANG, K.H., MCSORLEY, 2009. Management of Nematodes with Cowpea Cover Crops.

WANG, K.H., MCSORLEY, GALLAHER, RALSTONIAN., 2003. Effect of *Crotalaria juncea* amendment on nematode communities in soil with different agricultural histories. *Journal of Nematology*. 35(3), 294–301. Wang, K.H., McSorley, RALSTONIA, Gallaher, RALSTONIAN., 2004. Winter Cover Crops and Nematode Den-sities. *Journal of Nematology*. 36(4), 517–523.

WANG, L., HUANG, Y., LIU, Z., GOODFELLOW, M., RODRIGUEZ, C. 2006. *Sreptacidiphilus oryzae* sp. Nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in hailand. In. *J. Sys. Ev. Microbiol.* Vol 56. Pp: 1257-1261.

WAGURA, A.G., WAGAI, S.O., MANGURO, L. and GICHUMI, B.M., 2011. Effects of plant extracts on in-vitro growth of *Ralstonia solanacearum* (Smith), the causal agent of bacterial wilt of Irish Potato. *Plant Pathol. J.*, 10, 66–72.

WAKSMAN SA., 1961. The actinomycetes: nature occurrence and activity. Waverly press, inc: Baltimore 1, 327pp.

WELLER, D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26, 379-407.

WINSTEAD, N.N. and KELMAN, A., 1952. Inoculation technique for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, Vol. 42, pp. 628-634.

WICKER, E. et PRIOR, P., 2010. Interactions entre le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* et les ressources génétiques pour la résistance au flétrissement bactérien chez la tomate, l'aubergine et le piment : [Poster]. IN : 9èmes rencontres plantes-bactéries, 18-22 janvier 2010, Paris, AUSSOIS, France, p 75.

WOOD, J.B., 1985. brevet American Cyanamid Corporation N°EP-170006.

YADESSA, G.B., VAN BRUGGEN, A.H.C. and OCHO, F.L., 2010. Effects of different soil amendments on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and on the yield of tomato, *Journal of Plant Pathology* (2010), 92 (2), 439-450.

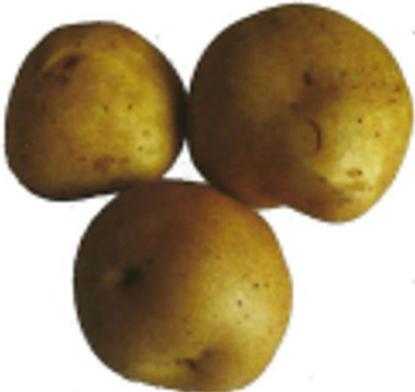
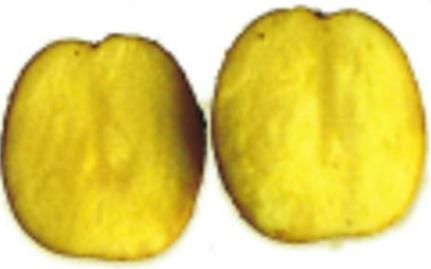
YUAN, S., WANG, L., WU, K., SHI, J., WANG, M., YANG, X., SHEN, Q. and SHEN, B., 2014. Evaluation of Bacillus-fortified organic fertilizer for controlling tobacco bacterial wilt in greenhouse and field experiments. *Appl. Soil Ecol.* 75:86-94.

ZAITLIN, B. et WATSON, S.B., 2006. Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. 40 (9), 1741-1753.

ZVYAGINTSEV, D. G., ZENOVA, G. M., SUDNIZIN, I. I., DOROSHENKO, E. A., 2005. The Ability of Soil Actinomycetes to Develop at an Extremely Low Humidity. Vol : 405. Pp 461-463.

ANNEXES

ANNEXE 1 : DESCRIPTION DE LA VARIETE MEVA

Nom commun	Nom scientifique	Dénomination	Nature génétique	Obtenteur (code)	Année de diffusion	Mainteneur
Pomme de terre	<i>Solanum tuberosum</i>	Meva	Clone	CIP (377.957.6) FIFAMANOR (C30)	1991	FIFAMANOR / CP
CARACTERES MORPHOLOGIQUES						
<p>Tubercules</p>  <p>Coupe transversale</p> 			TUBERCULE			
			●	Forme	:	arrondie
			●	Couleur de la peau	:	crème
			●	Couleur de la base de l'œil	:	jaune
			●	Couleur de la chair	:	jaune moyenne
			●	Profondeur des yeux	:	moyenne
			FLEUR			
			●	Couleur	:	rouge claire
			FEUILLE			
			●	Couleur	:	verte
CARACTERES AGRONOMIQUES						
●	Cycle (à maturité)	:	85 - 95 jours			
●	Hauteur	:	40 - 55 cm			
●	Rendement moyen	:	20 - 25 t/ha			
	- gros tubercules	:	élevé			
	- tubercules moyens	:	moyen			
	- petits tubercules (écarts)	:	moyen			
●	Longueur de la dormance	:	moyenne			
Comportement vis-à-vis des bioagresseurs						
●	Mildiou (<i>Phytophthora infestans</i>)	:	moyennement sensible			
●	Alternariose (<i>Alternaria solani</i>)	:	moyennement sensible			
●	Bactériose vasculaire (<i>Ralstonia solanacearum</i>)	:	sensible			
●	Enroulement de la pomme de terre (PRLV)	:	moyennement résistante			
CARACTERES TECHNOLOGIQUES						
●	Teneur en matière sèche	:	assez bonne			
●	Transformation	:	bonne pour frites et chips			
●	Aptitude au stockage	:	très bonne			

ANNEXE 2 : PREPARATION DE PESTAGRANULES

1- Préparation de bioformulation pestagranule

1. Ingrédients

- Farine de blé : 800 g
- Argile verte : 200 g
- Eau distillée stérile

Stériliser à l'autoclave (121°C pendant 20 minutes)

(Vérifier la capacité de rétention en eau de ce mélange à partir de la différence entre le poids d'un aliquote sec du mélange et d'un aliquot imbibé d'eau jusqu'à saturation du mélange).

2. Après refroidissement, selon la capacité de rétention en eau, ajouter 200 à 400ml de suspension de souches d'actinomycètes contenant 10^9 Cfu/ml.

3. Bien mélanger à l'aide de gants stériles jusqu'à la formation de pâte cohésive. Ensuite, malaxer et plier la pâte plusieurs fois, en utilisant un rouleau à pâtisserie jusqu'à l'obtention d'une lame mince de 1mm d'épaisseur.

4. La lame de pâte de 1mm d'épaisseur est placée sur un écran (ou papier aluminium) et laissée se sécher à l'air sous hôte à flux laminaire.

5. La lame de pâte de 1mm séchée est brisée en morceaux, broyé à l'aide d'un mortier et pilon préalablement désinfecté (stérilisé).

6. Tamiser (2mm) le broyat de lame de pâte séchée pour obtenir une taille uniforme.

7. Placer les granules dans des sachets plastiques en polyéthylène stériles et conserver à température ambiante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

8. Après 13 à 14 jours de maturation, la teneur en eau de la bioformulation doit être ajustée à 30-50%.

9. Vérifier la concentration bactérienne dans la bioformulation prête pour l'application au champ.

10. Un exemplaire de la bioformulation est laissée à la température ambiante pour le suivi régulier jusqu'à 8 mois de la survie des souches bactériennes.

ANNEXE 3 : COMPOSITION DE MILIEU DE CULTURE

1) MILIEU LB (g/l)

10 g..... Peptone
5 gExtrait de levures
10 g NaCl

2) MILIEU PIKOVSKAYA

10g..... Glucose
0,5 g(NH₄)₂SO₄
0,2 gNaCl
0,1 gMgSO₄·7H₂O
0,2 g.....KCl
0,5 gExtrait de levure
0,002g..... MnSO₄·7H₂O
0,002g.....FeSO₄·7H₂O
5gCa₃(PO₄)₂
15g..... Agar, pH=7

3) EAU PEPTONEE

10 g Peptone
5g, NaCl, pH=7,2

4) Milieu SMSA

1,0 g.....acide casaminique,
10,0 g Bacto-peptone,
5,0 ml..... Glycérol,
15,0 gBacto-Agar
5 mg..... Violet cristallisé (Sigma
100 mgSulfate de polymixine-B
25 mg..... Bacitracine
5 mg.....Chloramphénicol
0,5 mgPénicilline-G
50 gChlorure de 2, 3, 5-triphényltétrazolium

5) MILIEU KELMAN avec TZC

1,0 g.....acide casaminique,

10,0 g Bacto-peptone,

5,0 ml..... Glycérol,

15,0 gBacto-Agar

5ml TZC

ARTICLES ET PUBLICATIONS

AUTRES ACTIVITES DE LA DOCTORANTE

Nom : ANDRIAMIARISOA Lovaniaina Dinanirina

D3 a l'Ecole Doctorale A2E/Equipe d'accueil : SAE

Fonction : Chef de Division en Phytopathologie / Direction de la Protection des Végétaux/
Ministère de l'Agriculture et Elevage

MODULES OBLIGATOIRES REALISES : 90 heures

- 1- Formation à la gestion des données bibliographiques et à la publication scientifique
- 2- Recherche action participative
- 3- Conception et montage de projet + recherche financement bailleurs
- 4- Aide à l'écriture scientifique en anglais
- 5- Analyse de données et concepts théoriques, formalisation et modélisation
- 6-Journée des doctorants
- 7- Innovations, création d'entreprises

B- FORMATIONS REALISEES PAR RAPPORT A LA THESE (pendant la thèse)

- 1-Hands-on Practical Training of Potato Cyst Nematode (PCN), Diagnostics » Date: 15-17 Novembre 2022, KEPHIS-Muguga , Kenya
- 2-Global Forum on Biological Control ,26-28 June 2023, Nairobi, Kenya
- 3- Training on Biological Control,29-30 June 2023, Nairobi, Kenya

C-COMMUNICATIONS ORALES REALISEES

1-Parlons de l'ADN, IKM Antsahavola : 18juin 2022,

ANDRIAMIARISOA Dinanirina¹, « **Communication sur la santé des plantes : *Ralstonia solanacearum* et leur ADN** »

2-Communication orale à l'Akademia malagasy :18 janvier 2024

Andriamiarisoa Dinanirina¹, Fanjanirina Chantal², Tendro Radanielina², Nirina Rakotoarimanga³, Volatsara Baholy Rahetlah¹ « **Utilisation de *Crotalaria spectabilis* contre le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre dans la zone de Betafo** »

3-Communication orale à l'Akademia malagasy :21 MARS 2024

Andriamiarisoa Lovaniaina Dinanirina¹, Rakotoniaina Andry Mampionona², Radanielina Tendro², Nirina Rakotoarimanga³, Volatsara Baholy Rahetlah⁴

Evaluation du potentiel de biocontrôle de souches d'actinomycètes contre le flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) de la pomme de terre

D- ARTICLE SCIENTIFIQUE VALIDE ET PUBLIE INTERNATIONALEMENT : 1

Andriamiarisoa L. D, Fanjaniaina C, Rakotoarimanga N, Rahetlah V.B. (2023) **Effects of Mulching/Green Manuring and Intercropping with *Crotalaria grahamiana* on Growth and Yield Parameters of Potato in the Vakinankaratra Region, Madagascar.** FARA Research Report Vol 7(15):134- 141. <https://doi.org/10.59101/frr072315>