

N° d'ordre : 534

CN0101293
H220
84

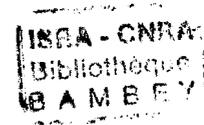
THESE

présentée

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR INGENIEUR

par



Abdoul Aziz S Y

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE
PYRICULARIA ORYZAE CAV.

- MORPHOLOGIE, BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE -

RECHERCHE *IN VITRO* D'ANTAGONISTES
DANS UNE PERSPECTIVE DE LUTTE BIOLOGIQUE

Soutenu le 30 juin 1976 devant la commission d'examen :

M. C. HAMANT Président

M^{lle} J. BERDUCOU

MM. L. ALBERTINI , Examineurs

C. TOROSSIAN \

*"Les fleurs qui tombent des arbres
vont préparer la terre pour les nouvelles
floraisons qui s'épanouiront plus
belles la saison prochaine..."*
Samora Machet

Tout au long de mon expérience au Laboratoire de Cytologie et Pathologie Végétales de l'E.N.S.A. Toulouse, j'ai bénéficié de l'attention, de la disponibilité et de la confiance de Monsieur le Professeur HAMANT qui a véritablement été l'initiateur du présent travail ; il a toujours su motiver ma curiosité intellectuelle et aiguïser mon esprit critique ; je voudrais ici lui exprimer ma sincère reconnaissance et mon respectueux attachement.

Mademoiselle BERDUCOU, professeur, dont j'ai gardé un très bon souvenir après 3 années de scolarité à l'E.N.S.A.T. ; me fait honneur en acceptant de participer à la commission d'examen ; je l'en remercie très vivement.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Monsieur ALBERTINI, Maître-Assistant, avec qui j'ai pu avoir des échanges enrichissants et dont les précieux conseils m'ont été d'une grande utilité.

Monsieur TOROSSIAN, Maître-Assistant, dont j'ai eu à apprécier les qualités humaines et pédagogiques, m'a consacré un temps inestimable pour la confection de documents photographiques ; je suis particulièrement sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à mon jury de thèse ; qu'il trouve ici le gage de ma profonde gratitude.

Je remercie tout particulièrement Madame PAVILLARD, Assistant, pour ses marques de sympathie ainsi que sa disponibilité permanente.

J'assure Monsieur LACOMBE, Assistant, de toute ma reconnaissance pour le temps qu'il m'a consacré et ses précieux conseils afférents aux tests statistiques.

Mademoiselle JEREMIE, dont j'ai beaucoup apprécié la patience, a consenti un effort et un soin inestimables pour la dactylographie de la présente thèse, je tiens à lui témoigner ma très sincère reconnaissance.

Monsieur GUERMOCHE, ainsi que ses collègues de service, m'ont toujours réservé un accueil agréable ; je les remercie du fond de moi-même pour l'intérêt constant qu'ils portèrent à la reproduction de mon mémoire.

Mes remerciements vont également à Monsieur LAUGA, dont l'aide technique m'a procuré un grand soulagement.

Je remercie Monsieur le Professeur MARIE de la Station **d'Amélioration** des Plantes de Montpellier pour les informations utiles qu'il a bien voulu me donner concernant les conditions de culture du riz sous serre.

Que l'ensemble du personnel technique et administratif de l'**E.N.S.A.T.**, et tous mes camarades de laboratoire soient ici remerciés pour l'amabilité qu'ils surent me réserver.

Je remercie enfin tous mes camarades et amis auprès de qui j'ai toujours trouvé un soutien sans limite.

S O M M A I R E

	Pages
INTRODUCTION.	1
- PREMIERE PARTIE -	
CARACTERES DESCRIPTIFS, BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DE <i>Pyricularia oryzae</i> CAV.	5
<u>CHAPITRE PREMIER</u> ■ <u>ISOLEMENT ET PURIFICATION DE <i>P. oryzae</i>,</u> ETABLISSEMENT DE CULTURES MONOCONIDIENNES, CYCLE EVOLUTIF DU PARASITE	6
I ■ <u>ISOLEMENT ET PURIFICATION DE <i>P. oryzae</i></u>	6
1.1 ■ Le matériel végétal	6
1.2 ■ Révélation du parasite.	6
1.3 ■ Isolement et purification : obtention de cultures pures	7
II ■ <u>ETABLISSEMENT DE CULTURES MONOCONIDIENNES</u>	8
2.1 ■ Préliminaire.	8
2.2 ■ Méthode de dilution	9
2.3 ■ Méthode de la dilution améliorée.	10
III ■ <u>CYCLE EVOLUTIF DE L'AGENT PATHOGENE.</u>	11
3.1 ■ <u>Préliminaire</u>	11
3.1.1 ■ Remarque	11
3.1.2 ■ Conservation des souches	11
3.2 ■ Infection de l'hôte	12

3.2.1 - L'hôte	12
3.2.2 - L'inoculum	13
3.2.3 - Technique d'inoculation.	13
3.2.4 - L'infection.	13
3.3 - Symptômes de la pyriculariose	14
3.3.1 - La pyriculariose foliaire ou "LEAF BLAST".	14
3.3.2 - La pyriculariose du cou.	15
3.3.3 - Notations en serres après inoculation artificielle	16
3.4 - Dissémination	16
3.5 - Longévité	17

CHAPITRE DEUXIEME . CARACTERES DESCRIPTIFS DE *Pyricularia*₁

<i>oryzae</i> CAV..	18
-----------------------------	----

I - CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES DE L'AGENT PATHOGENE.

1.1 - Le conidophore	18
1.2 - Les conidies.	19
1.3 - Caractères cytologiques	21

II - CARACTERES CULTURAUX EN FONCTION DU MILIEU.

2.1 - Morphologie de la culture	22
2.2 - Le mycélium	23
2.3 - Le revers des cultures.	23

III - CARACTERES CULTURAUX EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

IV - CARACTERES CULTURAUX EN FONCTION DU pH (tampon Mc Ilvaine, annexe technique n° 7).

.	24
-----------	----

CHAPITRE TROISIEME - BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DE *Pyricularia*₁

<i>oryzae</i> CAV..	25
-----------------------------	----

I - PARAMETRES DE LA CROISSANCE DE *P₁. oryzae*.

1.1 - Préliminaire.	25
-----------------------------	----

1.2 - Paramètres trophiques	26
1.2.1 - Nature des milieux utilisés.	27
1.2.2 - Définition de l'inoculum	27
1.2.3 - Résultats.	27
1.2.3.1 - Croissance en milieu solide	27
1.2.3.2 - Croissance en milieu liquide.	28
1.2.4 - Expression des résultats : discussion.	29
1.3 - Action de la température.	33
1.3.1 - Résultats.	33
1.3.2 - Expression graphique : interprétation.	33
1.4 - Action de l'héméroperiode	35
1.4.1 - Résultats.	35
1.4.2 - Expression graphique : discussion.	37
1.5 - Action du pH sur la croissance de <i>P₁. oryzae</i>	37
1.5.1 - Résultats.	37
1.5.2 - Expression graphique des résultats : discussion	38
1.5.2.1 - Préliminaire.	38
1.5.2.2 - Analyse des courbes traduisant la croissance pondérale en fonction du pH.	39
1.5.2.3 - Analyse des courbes traduisant le phénomène d'autolyse.	45
1.5.2.4 - Régularisation du pH.	45
1.5.2.5 - Croissance radiale du parasite en fonction du pH.	46
II - <u>PARAMETRES DE LA CONIDIOGENESE DE <i>Pyricularia₁ oryzae</i></u>	46
2.1 - Influence du milieu sur la conidiogénèse.	48
2.1.1 - Précocité de la sporulation.	48
2.1.2 - Caractéristiques des conidies en fonction du milieu.	48
2.2 - Influence de la température sur la conidiogénèse.	49
2.3 - Influence du pH sur la conidiogénèse.	50
2.3.1 - Sur la précocité de la conidiogénèse	50
2.3.2 - Intensité de la conidiogénèse en fonction du pH.	52

2.3.3 - Caractères des conidies en fonction du pH. ,	52
2.3.4 - Cinétique de la sporulation.	55
III - <u>PROBLEMES RELATIFS A LA GERMINATION DES CONIDIES</u>	56
3.1 - Germination en relation avec la concentration conidienne : résultats , expression, discussion. . .	57
3.2 - Germination des conidies en fonction de la température : résultats, expression, discussion . .	58
3.3 - Germination des conidies en fonction du pH : résultats, expression, discussion	59
3.4 - Germination des conidies en fonction de l' hémé- ropériode : résultats, expression, discussion . . .	60
- <u>DEUXIEME PARTIE</u> -	
CONTRIBUTION A L'ETABLISSEMENT D'UNE METHODE DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE <i>Pyricularia oryzae</i> CAV ,	62
<u>CHAPITRE PREMIER</u> - DEFINITION DU MATERIEL BIOLOGIQUE ET CRIBLAGE SELECTIF DES GERMES SAPROPHYTES.	67
I - <u>GERMES CRYPTOGAMIQUES.</u>	67
1.1 - <i>Pyricularia₁ oryzae</i> CAV.	67
1.2 - Germes saprophytes isolés à partir du riz	67
1.3 - Germes fournis par BAARN.	68
II - <u>CRIBLAGE SELECTIF EN VUE DU CHOIX DES GERMES UTILISA-</u> <u>BLES DANS UNE PERSPECTIVE DE LUTTE BIOLOGIQUE</u> (Planche n° 1).	68
III - <u>GERMES SELECTIONNES.</u>	72
<u>CHAPITRE DEUXIEME</u> - <u>MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE D'ANTAGONISME</u> <u>in vitro</u>	73

I	▪ <u>PRELIMINAIRE</u>	73
	1.1 - Comportement des germes en fonction de la température	74
	1.2 - Comportement des germes en fonction de l'héméroperiode	77
	1.2.1 - Résultats.	78
	1.2.2 - Caractères descriptifs en fonction de l'héméroperiode.	79
	1.2.3 - Expression graphique	79
	1.3 - Comportement des germes en fonction du pH	79
	1.3.1 - Formulation des résultats.	a4
	1.3.2 - Caractères descriptifs en fonction du pH après 3 jours d'incubation	a4
	1.3.3 - Expression graphique	a5
	1.4 - Synthèse	a5
II	▪ <u>EXPERIENCE DE MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE D'ANTAGONISME <i>in vitro</i> : CONFRONTATION SIMULTANEE (CS) DU PARASITE AVEC LES GERMES "ANTAGONISTES"</u>	a7
	2.1 - Appréciation de l'inhibition (%) exercée par les germes antagonistes sur la croissance radiale (mm) de <i>P₁. oryzae</i>	a7
	2.X.1 - Caractères descriptifs	88
	2.1.1.1 - Examen macroscopique (Planche n° II).	88
	2.1.1.2 - Examen microscopique (Planche n° III).	90
	2.1.2 - Expression graphique des résultats (fig. 16 A et C) : interprétation.	91
	2.2 - Appréciation de l'inhibition (%) exercée par les germes "antagonistes" sur la croissance en surface (cm ²) de <i>P₁. oryzae</i>	93
	2.2.1 - Résultats.	93
	2.2.2 - Expression numérique des résultats	94
	2.2.3 - Signification.	94
	2.3 - Expression graphique des résultats : discussion	95
	2.3.1 - Analyse comparative des pourcentages d'inhibition relative des croissances radiale (mm) et en surface (cm ²) de <i>P₁. oryzae</i> confronté durant 5 et 7 jours aux germes "antagonistes" (cf fig. 16, diagrammes A-C et B-D respectivement).	95

2.3.2 - Evolution du pourcentage d'inhibition de la croissance en surface (cm ²) de <i>P₁. oryzae</i> exercée par les germes "antagonistes" en fonction du temps ; PCA/25°C/pour 2 valeurs de pH/obscurité continue	98
2.3.3 - Représentativité de chacune des méthodes	98
2.4 - Remarques	98

CHAPITRE TROISIEME - ESSAI D'INTERPRETATION DU PHENOMENE D'ANTAGONISME in vitro 103

I - REMARQUE PRELIMINAIRE. 103

II - CONFRONTATION DU PARASITE ET DES GERMES ANTAGONISTES SUR MILIEU SOLIDE 104

2.1 - Confrontation différée du parasite avec les germes antagonistes	104
2.1.1 - Résultats.	104
2.1.2 - Observations	105
2.1.2.1 - Examen macroscopique (Planche n° IV).	105
2.1.2.2 - Examen microscopique (après 6 jours d'incubation ; planche n° V).	105
2.1.3 - Expression numérique des résultats	106
2.1.4 - Expression graphique : discussion.	106
2.2 - Conjugaison des confrontations simultanée et différée (CS x CD) du parasite avec les germes antagonistes (Planches n° VI et VII).	109
2.2.1 - Résultats.	109
2.2.2 - Expression numérique des résultats	110
2.2.2.1 - Relativement au témoin $T_1 = P_1. oryzae \times 0$	110
2.2.2.2 - Relativement à T2 = Sel λ (3)	110
2.2.3 - Expression graphique (fig. 20) : discussion	111
2.2.3.1 - Par rapport à T1.	111
2.2.3.2 - Par rapport à T2.	113
2.3 - Essai de mise en évidence de la production d'antibiotiques en milieu liquide	114

2.3.1	▪ Résultats	114
2.3.2	▪ Discussion	116
III	▪ <u>CONFRONTATION DU PARASITE ET DES GERMES ANTAGONISTES SUR MILIEU LIQUIDE : CROISSANCE PONDERALE (mg) DU PARASITE INCUBE SUR FILTRAT OU MELANGE DE FILTRATS DE CULTURES DES GERMES ANTAGONISTES.</u>	117
3.1	▪ Résultats	118
3.2	▪ Expression numérique des résultats.	119
3.3	▪ Expression graphique (fig. 21 et 22) : discussion	119
3.3.1	▪ Relativement au pH ₀ 4,10	119
3.3.2	▪ Relativement au pH ₀ 6, D.	122
3.3.3	▪ Remarques.	123
IV	▪ <u>INFLUENCE DE L'ANTAGONISTE SUR LA GERMINATION DES CONIDIES DU PARASITE</u>	125
4.1	▪ Action de la suspension conidienne (SC) et du mélange de SC (dans l'eau distillée) des antagonistes sur la germination du parasite	126
4.1.1	▪ Préliminaire	126
4.1.2	▪ Résultats et expression numérique.	128
4.1.3	▪ Expression graphique (fig. 23 et 24) : discussion	128
4.2	▪ Action des filtrats "naturels" (FCN) et filtrats autoclavés de cultures (FCA) des germes antagonistes sur la germination des conidies de <i>P₁. oryzae</i>	132
4.2.1	▪ Résultats et expression numérique.	132
4.2.2	▪ Expression graphique : discussion.	132
4.3	▪ Influence du mélange de filtrats "naturels" (MFCN) ou autoclavés (MFCA) des cultures antagonistes âgées de 10 j/25°C/obscurité continue sur la germination des conidies de <i>P₁. oryzae</i>	136
4.3.1	▪ Résultats et expression numérique.	136
4.3.2	▪ Expression graphique (fig. 27 et 28) : discussion	136
4.4	▪ Influence des conidies antagonistes maintenues en suspension dans le liquide de culture (CMS) sur la germination des conidies du parasite.	140

4.4.1 - Résultats et expression numérique.	141
4.4.2 - Expression graphique : discussion.	142
4.5 - Remarques	142
<u>CHAPITRE QUATRIEME</u> - ELEMENTS DE REFERENCE : ACTION DE QUELQUES FONGICIDES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DU PARASITE.	144
I - <u>EXAMEN MACROSCOPIQUE</u> (cf planches n° VIIIA et VIIB)	144
1.1 - Béno myl	144
1.2 - Chloronèbe	145
1.3 - EL-291	145
1.4 - Tri démorphe	145
II - <u>R E S U L T A T S</u>	146
III - <u>EXPRESSION NUMERIQUE : DISCUSSION</u>	147
CONCLUSION GENERALE	150
SYNTHESE DES ABREVIATIONS	157
BIBLIOGRAPHIE	159
ANNEXES TECHNIQUES.	173
PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES	

INTRODUCTION

Du fait de l'accroissement de la consommation de riz dans le monde, de nombreux cultivars hautement productifs ont été mis au point dans le sud-est asiatique notamment ; ces cultivars ont cependant dû être progressivement délaissés en raison de leur sensibilité à la pyriculariose.

Connue par le passé sous le terme de "fièvre du riz" usité dans la littérature chinoise et japonaise, successivement décrite par TSUCHIYA (1704), MIYANAGA (1788), KOJIMA (1793), KONISHI (1809), la pyriculariose a en réalité été signalée depuis 1637 en Chine par SOONG YING-SHIN dans son ouvrage intitulé "Utilisation des ressources naturelles".

En Italie, la maladie alors connue sous l'appellation de brusone fut décrite par ASTOLFI (1828), BRUGNATELLI (1838) et GERA (1846).

METCALF (1906, 1907) au vu de l'intensité des dégâts engendrés par la pyriculariose en 1876 dans le sud de la Caroline, la dépeignit comme étant la plus grave parmi les 8 maladies importantes répertoriées sur le riz aux U.S.A.. Il fut le premier à lui attribuer la dénomination anglaise de "blast".

En Inde enfin, la présence de la maladie daterait de 1913 ; l'épidémie catastrophique observée dans l'état de Madras en 1919 serait imputable à l'agent de la pyriculariose (PADMANABHAN, 1965).

En raison de sa plasticité par rapport aux conditions du milieu, de son spectre de répartition et des attaques graves engendrées par l'agent pathogène, la pyriculariose est considérée comme étant la principale maladie du riz dans le monde.

Les recensements du C.M. 1. ("Commonwealth Mycological Institute") de 1972, **révélaient** sa présence dans 70 pays des cinq continents (cf annexe n° 9).

Dans le cas particulier du Sénégal, la pyriculariose semble coloniser des régions de plus en plus vastes :

- 1951, CHEVAUGEON (cité par BOUHOT et MALLAMAIRE dans "les principales maladies des plantes cultivées au Sénégal") établissait la rareté de la maladie.

- 1972, l'I. R. A. T. la définit **comme** étant "la principale maladie cryptogamique du riz au **Sénégal**" (cf "les variétés de riz au Sénégal" - juillet 1972).

- Mai 1974, nous avons isolé et purifié le parasite à partir de la variété L. 5. 26 récoltée à SAVOIGNE (delta du fleuve Sénégal) ; cette région nord-ouest du pays **était** jusqu' alors exempte de germes infectieux.

- Octobre 1974 enfin, nous observons des infections **paniculaires** dans les parcelles de ROSSO en Mauritanie ; l'introduction de la riziculture datait seulement de quelques années (à l'origine, il y aurait eu notamment une importation de semences infectées).

La persistance et l'extension de la maladie ne sont donc plus à démontrer tant sur le territoire sénégalais que dans le monde.

Les pertes et dégâts occasionnés par la maladie sont considérables ; quelques chiffres suffisent pour nous en convaincre :

- Au Japon, en 1953, les pertes étaient évaluées à 800 000 tonnes.

- Durant la campagne agricole 1960-1961 en Inde, les pertes s'élevèrent à 266 000 tonnes.

- En 1960, au Japon, les pertes furent estimées à 273 000 tonnes (soit 24,8 % du total des pertes dues aux insectes, au froid, au typhon, aux inondations et maladies diverses).

- De **même** en 1962 (toujours au Japon), sur 909 000 ha traités chimiquement, l'infection **paniculaire** eut malgré tout lieu sur 721 000 ha.

- Au Sénégal, en octobre 1974, nous avons été amenés à observer le grillage foliaire très précoce affectant la variété 6044 sur près de 44 ha (MEDINA SANGAKO au SINE-SALOUM).

L'attaque foliaire pendant ou avant le tallage peut déterminer la destruction **complète** de l'hôte (cf planche n° 8A) ; moins précoce, elle engendre malgré tout un rabougrissement des plantes, une réduction du nombre de **panicules mûres** ainsi qu'une diminution du poids de 1 000 grains.

L'infection **paniculaire** est d'autant plus catastrophique qu'elle est précoce,

L'attaque du cou aboutit à une profonde altération qualitative et quantitative des grains (cf planche n° 9).

L'agent phytopathogène, baptisé pour la première fois *Pyricularia oryzae* par CAVARA en 1891 (Italie) fut décrit par SHIRAX en 1896 (Japon).

L'espèce *Pyricularia oryzae* Cav. se définit selon le **diagramme** suivant :

- Classe des Champignons,
- Groupe des **Adelomycètes** (champignons imparfaits),
- Ordre des Moniliales,
- Famille des Mucedinacées,
- Genre *Pyricularia*.

L'amélioration des **résistances** verticale ou horizontale de l'hôte, l'influence du type de fertilisation et le rôle des techniques culturales sur les relations hôte-parasite, l'action des facteurs physiques (température, humidité, lumière, etc...) et chimiques (**oxygène**, etc...) du milieu sur le parasite, la chimiothérapie, l'étude des mécanismes agressifs de l'agent pathogène, la multiplicité des races physiologiques, etc..., sont autant de thèmes importants préoccupant les chercheurs pour une meilleure connaissance et partant, un meilleur contrôle des relations hôte-parasite.

A ce jour cependant, aucune solution définitive n'a été trouvée au problème de la pyriculariose en raison notamment de la très forte variabilité de l'agent pathogène (PARTHASARATHY et OU, 1965) ; peu de choses ont été tentées dans le domaine de la lutte biologique ; on sait seulement que des souches **avirulentes** du parasite, préalablement inoculées sur l'hôte pouvaient induire une meilleure tolérance voire une meilleure résistance de celui-ci vis-à-vis d'une souche virulente (YOSHII, 1950 ; KIYOSAWA et FUJIMAKI, 1967).

Nous nous proposons, dans la présente étude, d'apporter une modeste contribution pour combler ce que nous osons appeler une lacune.

La lutte biologique, impliquant des organismes vivants est évidemment des plus complexes, des plus délicates puisque les composantes fondamentales en sont :

- la recherche de germes antagonistes,
- la définition de l'action des germes considérés sur tous les éléments de la biosphère : l'antagoniste, outre son action contre le parasite, ne doit manifester aucune influence néfaste, directe ou indirecte sur l'hôte, les végétaux utiles du milieu, l'homme, les animaux, l'environnement de façon générale,
- l'étude du mécanisme du phénomène d'antagonisme,
- la définition des conditions d'application (température, humidité, etc...) et d'efficacité,
- Les problèmes économiques posés par la vulgarisation.

La première partie de ce travail traitera de la morphologie, la biologie et de la physiologie du parasite ; l'objet de la deuxième partie étant la mise en évidence du phénomène d'antagonisme ainsi que de l'essai d'interprétation des mécanismes impliqués.

Quant au matériel biologique de base, il comporte :

- Les variétés hôtes : les échantillonnages ont été réalisés soit en plein champ, soit en parcelles expérimentales au cours de prospections effectuées au Sénégal et en Mauritanie au cours des campagnes agricoles 1973 et 1974 ; au total, nous avons observé, noté et récolté 77 variétés dont la liste est consignée dans l'annexe n° 8.
- Les germes cryptogamiques : classés dans le tableau 18 et le paragraphe 1.3 de la deuxième partie (p. 68).

1ÈRE PARTIE

CARACTERES DESCRIPTIFS, BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DE
Pyricularia oryzae Cav.

CHAPITRE PREMIER

1 SOLEMENT ET PURIFICATION DE *P. oryzae* ETABLISSEMENT DE CULTURES MONOCONIDIENNES CYCLE EVOLUTIF DU PARASITE

1 - ISOLEMENT ET PURIFICATION DE *P. oryzae*

1.1 - Le matériel végétal

Le matériel végétal qui a servi à nos expériences a été récolté en CASAMANCE (région sud du Sénégal), dans le périmètre expérimental de l'I.R.A.T. (Institut de Recherches Agronomiques Tropicales et des Cultures Vivrières) connu sous l'appellation de SEFA.

Ce matériel a été récolté le 17 septembre 1973 ; le séchage et la conservation ayant été réalisés dans du papier journal à l'abri de l'humidité.

1.2 - Révélation du parasite

Quelle que soit la technique employée, elle requiert toujours une humidité relative élevée ; deux méthodes ont été utilisées pour révéler et extérioriser le parasite présent dans les lésions foliaires.

• Dans la première, le fragment foliaire porteur de lésions est directement

incubé en chambre humide à température de 25°C et à température ambiante de laboratoire.

- Dans la deuxième, l'incubation est précédée par une désinfection du matériel végétal : les fragments sont immergés pendant 10 mn dans l'hypochlorite de sodium à 10 % ; ils sont ensuite lavés abondamment par l'eau distillée stérile et essorés dans une double épaisseur de papier filtre stérile ; ils sont alors déposés directement à la surface du substrat nutritif gélosé en l'occurrence du PCA ; l'incubation a été réalisée à $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

NB : la nature du PCA est définie dans l'annexe technique n° I.

1.3 - Isolement et purification : obtention de cultures pures

Après 3 à 4 jours d'incubation, la détection de *P. oryzae* se fait au binoculaire ; c'est à la lumière de ces observations que la deuxième méthode nous est apparue préférable : en effet, la présence d'une multitude de saprophytes masque très précocement les colonies très discrètes du parasite ; par contre, le deuxième traitement, s'il n'élimine pas entièrement la prolifération de germes tels les *Mucor*, *Uromyces*, *Curvularia*, *Starkeyomyces*, etc., en limite tout au moins l'installation.

Par ailleurs, nous avons, au cours de cette opération, été confrontés au problème de souillure par des germes bactériens ; nous disposons alors d'une série de méthodes dont certaines ont fait l'objet d'une application et ont abouti à des résultats plus ou moins satisfaisants :

- Incorporation dans le substrat nutritif d'antibiotique spécifique : en l'occurrence, nous avons opéré avec de la streptomycine (bactéricide et bactériostatique) mais avons dû renoncer à ce procédé du fait que l'antibiotique était sensé induire une modification des caractéristiques physiologiques du parasite et partant son comportement phytopathogène ; c'est du reste à ce titre que nous avons préféré l'hypochlorite de sodium 10 % au chlorure mercurique comme désinfectant superficiel.

- Méthode préconisée par VOLKONSKY, il s'agit d'ensemencer un milieu gélosé ; la face interne du couvercle ayant été préalablement recouverte par un peu du milieu gélosé, nous incubons à l'étuve couvercle en bas ; le mycélium en croissance finit par venir au contact du couvercle qui fournit dès lors un ino-

culum exempt. de germes étrangers et conduisant après repiquage à une culture pure.

Cette méthode nous a semblé inadéquate d'abord parce que le germe se caractérise par une croissance en surface et non de type aérien ; ensuite parce que des bactéries se développant plus vite que la colonie parasite parviennent dans un très bref délai (48 heures environ) à recouvrir l'inoculum à purifier.

Compte-tenu de, la croissance relativement lente du parasite étudié, nous avons éliminé ce procédé de purification.

- Technique de RAPER (1937) : un anneau de verre préalablement stérilisé est placé dans une boîte de Petri stérile ; le milieu gélosé est coulé jusqu'à trois-quarts de la hauteur de l'anneau ; l'inoculum à purifier est placé au centre de l'anneau ; on observe alors la persistance des germes bactériens à l'intérieur de l'anneau tandis que ceux du champignon migrent à l'extérieur de l'anneau par la zone de contact entre la base de l'anneau et le fond de la boîte de Petri.

Seule la première méthode avait retenu notre attention, dans la période où nous réalisions une incubation sans désinfection préalable ; nous avons contourné ces difficultés supplémentaires de purification en procédant à une désinfection préalable ; dès lors il est possible, moyennant le respect des conditions d'asepsie, d'obtenir directement une culture pure après un seul repiquage.

A TITRE INDICATIF, nous citons une méthode de purification consistant à ensemer l'inoculum à purifier dans un tube incliné qui est ensuite dressé verticalement ; les auteurs affirment que le développement des champignons s'effectuerait vers la région supérieure du substrat et se détacherait des germes bactériens ; il suffirait d'un repiquage pour obtenir une culture pure (cf RAPILLY dans "TECHNIQUES DE MYCOLOGIE EN PATHOLOGIE VEGETALE" : obtention de cultures pures).

II - ETABLISSEMENT DE CULTURES MONOCONIDIENNES

2.1 - Préliminaire

Une preuve éclatante de la variabilité des races de *Pyricularia oryzae*

nous est donnée par le fait que des variétés de riz hautement résistantes (exemple FUTABA) manifestèrent subitement une forte sensibilité vis-à-vis du *P. oryzae*.

Ce comportement nouveau de cultivars initialement résistants serait lié soit au contact d'une race pathogène jusque là extérieure au milieu local, soit à une modification affectant les génotypes de l'hôte et (ou) du parasite.

S'agissant du *P. oryzae*, nous signalerons certaines observations matérialisant une très forte variabilité pouvant expliquer les relations hôte-parasite nouvellement établies :

- l'humidité relative, le type de lésions (lésions aiguës ou chroniques), la température, le milieu de culture, autant de paramètres qui influent sur les caractéristiques du germe et partant sur son expression dans le milieu ;

- il existerait même un cas limite pour lequel les conidies issues d'une culture monosporee donneraient naissance à plusieurs races

Pour expliquer ce phénomène, certains auteurs font intervenir la parasexualité : il y aurait une anastomose hyphale avec une migration suivie d'une fusion apparente des noyaux (YAMASAKI et MIIZUKI, 1965). Selon ces mêmes auteurs, l'haploïdisation de ces hétérozygotes diploïdes impliquerait des modifications génétiques qui, du reste, n'ont pas été mises en évidence sur le plan cytologique.

Nous nous en tiendrons là pour ce problème d'importance ; par ces données, nous voulions simplement insister sur la relative HETEROGENEITE de la culture pure déjà établie et partant, montrer la nécessité de pouvoir expérimenter à partir d'une culture PURE et MONOCONIDIENNE ; encore nous faudrait-il préciser que même une telle culture ne présentait pas une homogénéité et une stabilité indéfinies.

2.2 - Méthode de dilution

Le principe en est l'étalement d'un volume très réduit d'une suspension conidienne de faible concentration (et réalisée à partir de la culture pure) à la surface du substrat nutritif gélosé contenu dans une boîte de Petri ; en outre, nous postulons que toute colonie développée au cours de la période d'incubation proviendrait d'UNE SEULE CONIDIE ; dès lors, le repiquage de la colonie

considérée donnerait d'emblée une culture **monoconidienne**.

La relation UNE CONIDIE-UNE COLONIE n'étant pas nécessairement vérifiable, cette méthode ne nous paraît pas **sûre** ; de plus, la chance d'obtenir des colonies **réellement** issues de **conidies** isolées est d'autant plus grande que la concentration est réduite ; or, plus la concentration de l'**inoculum** est **faible** dans cette méthode, plus s'amenuise la fréquence des conidies dans le volume étalé ; d'où la nécessité d'un nombre élevé de répétitions et l'utilisation d'un matériel **considérable**.

Enfin, au **fil** des dilutions successives, une infime quantité de germes étrangers dans l'une des dilutions mères suffirait pour contaminer toutes celles de concentration inférieure et partant rendrait difficile l'établissement d'une culture **monoconidienne**.

Pour toutes ces raisons nous avons **dû** délaisser cette méthode qui nous **paraît** moins satisfaisante que celle de la dilution améliorée.

2.3 - Méthode de la dilution améliorée

Nous réalisons une suspension conidienne mère à partir de la culture pure déterminée plus haut ; par dilutions successives, nous ajustons la concentration **conidienne** à environ 1 000 **conidies/ml** ; cette concentration permet, à l'aide d'une pipette PASTEUR très fine, de déposer sur une lamelle des **microgouttes** ne renfermant qu'un nombre très réduit de conidies à défaut d'une seule. Le dénombrement des conidies présentes dans une microgoutte se fait au microscope, le **dessèchement** de la microgoutte étant évité par l'**usage** d'une chambre **humide** de VAN TIEGHEM préalablement stérilisée.

Ayant repéré la ou les microgouttes ne renfermant chacune qu'une **SEULE** conidie, nous les captions individuellement par la pointe d'un triangle de papier filtre stérilisé ; le fragment de papier filtre ainsi chargé d'une **conidie** est aseptiquement déposé à la surface du substrat nutritif qui est inoculé et incubé à 28°C.

Cette technique très délicate nous a **néanmoins** permis en 12 jours d'observer une colonie très nette dont la multiplication nous assurait suffisamment d'**inoculum** pour pouvoir démarrer les expériences proprement dites. Par cette **méthode**, nous avons établi 11 cultures **monoconidiennes** notées Se i (i = 1 à 11)

et 7 cultures monoconidiennes notées IKPj à partir de l'hôte !KONG PAO.

III - CYCLE EVOLUTIF DE L'AGENT PATHOGENE

3.1 - Préliminaire

3.1.1 - Remarque

Partant d'une culture monoconidienne, nous aboutissons, au fil des repiquages, à une culture relativement différente de celle de départ ; ce qui se traduit généralement par une réduction de la croissance, probablement liée à une variation dans la physiologie du parasite ; dès lors, le recyclage du *P. oryzae* sur l'hôte nous paraît nécessaire puisqu'au cours de la confrontation HOTE-PARASITE, ce dernier retrouve certains de ses caractères de base (exemple : taille, forme, vitesse de croissance, etc...) ou en acquiert de nouveaux à la faveur des relations nouvellement établies avec l'hôte.

3.1.2 - Conservation des souches

Dans l'état actuel de nos travaux, nous avons réalisé un repiquage toutes les 2 à 4 semaines ; nous n'avons observé aucune réduction de croissance.

Nous avons, par ailleurs, conservé des souches à température de 10°C pendant 60 jours ; le substrat nutritif utilisé étant soit de l'eau de pomme de terre (20 g de pomme de terre par litre d'eau), soit du PCA 50 % (10 g de pomme de terre, 10 g de carotte, 1 000 ml d'eau distillée) ; aucune réduction de croissance n'a été observée ; mieux, le repiquage sur PCA révèle même une vitesse de croissance relativement plus importante que celle observée à partir d'un inoculum régulièrement reproduit sur PCA.

De nombreux auteurs ont préconisé l'usage de la basse température (4°C) ; le substrat usité est généralement appauvri : exemple, MILIEU de SABOURAUD (glucose massé = 30 g ; peptone = 10 g ; gélose = 20 g ; eau distillée = 1 000 ml) ; eau de pomme de terre ou encore malt à 1 %.

Cette dernière méthode permettrait des repiquages espacés de 6 mois.

Il convient de situer ici le problème très fréquent des pollutions aux températures moyennes (20°C et 15°C notamment) ; ce qui, à notre avis, tien-

droit à la ventilation nécessaire pour une bonne régulation thermique ; l'enveloppement minutieux des boîtes de Petri par du papier filtre devrait permettre de pallier cet inconvénient.

Enfin la présence d'acariens doit être systématiquement combattue par une désinfection préalable des étuves à l'alcool éthylique 95° puis nécessairement au formol .

A ce propos, il nous paraît plus aisé de conserver intacte une culture en tube incliné ou en erlenmeyer qu'en boîte de Petri.

3.2 - Infection de l'hôte

3.2.1 - L'hôte

Les graines de trois variétés de riz (63-83 ; SEFA 302 G ; IKONG-PAO) sont abondamment rincées à l'eau de robinet d'abord, à l'eau permutée ensuite afin d'éliminer les fongicides de conservation ; elles sont alors réparties dans les boîtes de Petri tapissées intérieurement par du papier filtre humecté (50 graines par boîte de Petri de diamètre 90 mm) ; la prégermination dure 5 jours ; à cet âge, la première racine et le coléoptile sont très nets ; le repiquage se fait sur perlite ; pendant les 5 à 7 jours qui suivent la date de repiquage, l'arrosage se fait à l'eau permutée ; au-delà, nous arrosons à l'aide d'une solution nutritive de KIMURA dont la formule est définie dans l'annexe technique n° II.

Cependant, un procédé encore plus avantageux parce qu'aussi satisfaisant et relativement plus simple, consiste à repiquer les graines prégermées sur de la terre de jardin débarrassée des grosses particules par tamisage et lestée par environ 20 % de fumier.

Une fois par mois, nous avons arrosé à l'aide de la solution nutritive de KIMURA pour suppléer à un épuisement éventuel des réserves du substrat de culture. Pendant la durée de l'expérience (octobre à avril), la photopériode s'est révélée comme étant une donnée fondamentale ; la faible intensité lumineuse du jour impose un éclairage intense de 35 000 lux (mesure effectuée au niveau supérieur des cuves placées à 70 cm sous le dispositif d'éclairage) maintenu de 4 à 20 heures. La température et l'humidité relative sont groupées dans le tableau de l'annexe technique n° III. L'inoculation a été réalisée au 45^e jour.

3.2.2 • L'inoculum

L'inoculum est issu soit d'une culture liquide de *P. oryzae* sur PC (milieu à base de pomme de terre et de carotte) âgée de 15 jours, soit d'une culture sur PCA âgée de 8 à 12 jours ; l'incubation ayant été réalisée à 25°C et à l'obscurité continue. Après broyage et filtration, nous avons ajusté la concentration conidienne à 30 000 conidies/ml, valeur qui, selon FUJIMAKI (Y.967) induirait le maximum de lésions foliaires.

Deux à trois gouttes de TWEEN 80 (jouant le rôle de mouillant) sont ajoutées à la suspension conidienne ainsi préparée et disposée dans la cuve du pulvérisateur.

3.2.3 • Technique d'inoculation

Nous avons inoculé par pulvérisation directe de la masse foliaire ; les plantes ainsi traitées et celles témoin sont incubées 4 jours en chambre humide,

A cette méthode classique, des auteurs préfèrent l'usage d'une chambre à nébulisation permettant une meilleure répartition des conidies sur le matériel végétal.

Cependant, il est possible, sur de très jeunes plants (âgés de 3 semaines), d'utiliser la méthode d'inoculation par contact ; l'incubation à 25°C est maintenue pendant 48 heures.

Enfin, nous signalerons ici la méthode usitée par SAKAMOTO pour inoculer les gaines foliaires : le matériel végétal est découpé en fragments de 7 à 10 cm ; il est ensuite plongé dans une suspension conidienne maintenue 40 heures entre 24° et 28°C ; les cellules de la surface interne des gaines sont examinées au microscope ; la pénétration et le taux de croissance interne du parasite sont utilisés comme critères d'appréciation du degré de la résistance.

3.2.4 • L'infection

Elle exige comme préalable l'établissement de certaines conditions de température (exemple 32°C pendant 10 heures ; 28°C pendant 8 heures ; 24°C pendant 6 heures selon les expériences de HASHIOKA (1965)) ; d'humidité (exem-

ple 12 heures de rosée à 15,6°C selon BARKSDALE et JONES (1965)) et de lumière (l'infection serait plus aisée à l'obscurité qu'à la lumière et serait supprimée par la lumière diffuse).

Lorsque les conditions requises sont assurées, l'infection commence par la germination des conidies qui émettent un tube germinatif ; elle se poursuit par la formation d'**appressorium** ; la pénétration des cellules de la plante **hôte** se fait soit par la cuticule, soit par les stomates ; c'est après cette invasion que se développe une hyphe infectieuse issue d'une vésicule et dont le devenir est fonction de la réaction de l'**hôte** :

- l'hôte résistant réagit rapidement en produisant des granules **bruns** ou des "RESIN-LIKE-SUBSTANCES" d'où le blocage du développement de la vésicule et de la croissance de l'hyphe (cf planche n° XB).

- chez l'hôte sensible par contre, la vésicule et l'hyphe se développent librement étant donné la faible réaction de l'hôte (cf planche n° X_B).

3.3 - Symptômes de la pyriculariose

Ils peuvent s'exprimer sur les noeuds (pyriculariose nodale), le cou ("ROTTEN NECK ou NECK ROT"), les grains, les feuilles ("LEAF BLAST").

3.3.1 - La pyriculariose foliaire ou "LEAF BLAST" (cf planche n° X_A)

Les taches foliaires sont typiquement elliptiques à extrémité pointue ; la zone centrale est grise ou blanchâtre, la zone marginale est brune à brun rougedtre.

Sur variété sensible et sous des conditions d'humidité élevée, les taches foliaires se développent rapidement ; la coloration grisâtre persiste pendant un certain temps ; une attaque précoce peut conduire non seulement à une **dessiccation** de la gaine foliaire mais au grillage de tout l'appareil **foliaire** sans, lequel toute récolte se trouve gravement compromise.

La dimension des lésions **complètement** développées peut être de 1 à 1,5 cm x 0,3 à 0,5 cm.

Chez les variétés hautement résistantes, on observe seulement des taches de la dimension d'une tête d'épingle.

Les variétés présentant une réaction intermédiaire montrent des lésions rondes ou elliptiques dont la taille est voisine de quelques millimètres et dont la marge est brune.

Il semble que la couleur brune corresponde soit à une réaction de résistance variétale, soit aux conditions défavorables (exemple : lumière diffuse,..) de développement des lésions.

Cependant, la couleur, la forme des lésions, sont elles-mêmes fonction des conditions et du degré de sensibilité du riz ; on distingue généralement deux types de lésions :

- celles de dimension réduite, de couleur brune appelées lésions chroniques ou "chronic lesions",
- celles **grisâtres**, bien développées que l'on désigne par le terme de "ACUTE LESIONS" (lésions aiguës).

Selon OSHII (1937), la lésion elle-même se compose de trois zones bien caractéristiques :

- La zone empoisonnée- (ou zone plesionécrotique) : c'est la bande la plus externe de la lésion ; caractérisée par la diffusion de substances toxiques sécrétées par le champignon.
- La zone nécrotique : bande brune, étroite, **placée** le long du bord intérieur de la zone empoisonnée. La zone nécrotique se caractérise par des inclusions cellulaires et des parois cellulaires dégénérées et décolorées.
- La zone désintégrée, quant à elle, se définit par des inclusions cellulaires et des parois cellulaires complètement rompues et détruites.

3.3.2 • Pyriculariose du cou

Le cou (ou base de la panicule) peut **être** attaqué et conduire à l'apparition de **symptômes** de "Rotten neck" ou "neck rot", c'est-à-dire une pourriture au niveau du point de jonction qui se traduit par la chute de la **panicule**.

Tout se passe **comme** si l'installation du parasite au niveau du cou altérerait les tissus et vaisseaux conducteurs à l'endroit du site d'infection et partant empêchait les métabolites (élaborés par la plante ou puisés dans la rhi-

zosphère par son système racinaire) de parvenir dans l'épi dont la formation est dès lors qualitativement compromise ; pareilles à des épis de riz hébergeant un Borer ou à des épis d'orge altérés par une attaque tardive d'*Ophiobolus graminis*, les panicules du riz se composent de grains soit complètement vidés de leur contenu, soit sous-développés et donc dotés d'une fertilité amoindrie voire nulle.

Le "ROTTEN NECK" revêt à nos yeux l'une des formes d'expression les plus catastrophiques de la pyriculariose.

Notons que ce type d'attaque peut aussi se manifester sur les autres noeuds de la tige.

3.3.3 - Notations en serre après inoculation artificielle

▪ La variété 63-83 : fournie par l'I.R.A.T. est définie comme étant dotée d'une "très bonne résistance" : ce cultivar examiné et noté (par rapport au témoin) présente sur les feuilles subterminales, des taches brun-rougeâtre très fines ; certaines de ces lésions sont nettement brunes.

▪ La variété SEFA 302 G : semble moins attaquée dans son ensemble ; toutefois, eu égard à la teinte vert foncé, à la consistance des feuilles et à une luminosité déficiente à l'époque de ces observations, les symptômes étaient plus difficiles à apprécier.

▪ La variété TKP : les symptômes observés sont nets ; cependant nous signalerons qu'au cours d'une prospection effectuée à l'I.R.A.T. en septembre 1973, nous avons observé que ce cultivar, utilisé dans les essais I. R. R. I. (International Rice Research Institute) comme variété contaminatrice, s'était révélé plus résistant que des cultivars réputés résistants ; resterait donc à éclaircir ce problème.

3.4 - Dissémination

La production de conidies intervient 6 jours après l'inoculation et par une humidité relative supérieure ou égale à 93 % (HEMMI et IMURA, 1939) ; le taux d'émission serait de 2 000 à 6 000 conidies par jour et ce, pendant les 14 premiers jours dans les conditions expérimentales au laboratoire (cf I. R. R. I., données non publiées).

Des expériences très récentes (KATO et al., 1970) révèlent un pic au bout de 3 à 8 jours après apparition des lésions foliaires et au bout de 10 à 20 jours pour les lésions se manifestant sur les rachis.

La dissémination du champignon serait réalisée par l'eau d'irrigation (SUZUKI, 1969), le vent (les conidies transportées par le vent sont parfois recueillies jusqu'à une hauteur de 24 m), les semences infectées, le chaume infecté.

Le nombre de spores déposées par feuille est fonction du point d'insertion de la feuille et de son inclinaison par rapport à la tige ; ainsi le nombre des spores déposées par feuille est plus élevé pour les variétés de riz à feuilles voisines de l'horizontale que pour celles à feuilles formant un angle aigu avec la tige.

3.5 - Longévité

Dans les régions tempérées, le champignon passe l'hiver sous forme de mycélium ou de conidies ; lorsque les conditions sont sèches, la survie des conidies peut **être** de un an et celle du mycélium de trois ans.

Pour passer l'hiver, le champignon peut soit demeurer dans l'embryon de riz, dans l'endosperme, dans les **glumes** (SUZUKI, 1930), soit hiverner sur d'autres céréales jouant le rôle d'hôtes de transition.

CHAPITRE DEUXIEME

CARACTERES DESCRIPTIFS DE

Pyricularia oryzae Cavara.

De nombreux auteurs se sont attachés à caractériser et à définir le genre *Pyricularia* : SACCARDO (1880) ; CAVARA (1891) fut le premier à décrire une espèce de *Pyricularia oryzae* se manifestant sur le riz en Italie ; les recherches de BRIOSI et de CAVARA aboutirent en 1892 à l'apparition d'une description identique [dans la littérature courante, l'espèce *P. oryzae* est souvent attribuée à BRIOSI et CAVARA ; en réalité, seul CAVARA doit être cité comme auteur puisqu'il fut le premier à caractériser l'espèce *P. oryzae* ; d'où la dénomination *Pyricularia oryzae* Cavara.] ; HORI (1898) ; KAWAKAMI (1901-1902) ; SHI:RAI (1905) ; ASSUYAMA (1965), etc....

Conformément à ces travaux, le parasite du riz sera nommé *Pyricularia oryzae* cav. ; les recherches de BRIOSI et CAVARA (1893), KAWAKAMI (1901-1902), NISIKADO (1917, 1927) etc.. . conduisirent à réserver le binome *Pyricularia grisea* (CKE) sacc. au parasite rencontré sur d'autres graminées ou céréales (*Eleusine, Paspalum, Panicum, Setaria*).

1 • CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES DE L'AGENT PATHOGENE:1.1 - Le conidiophore (cf planche n° X)

P. oryzae est doté de conidiophores naissant groupés à partir d'un stroma ; la partie basale du conidiophore est renflée, fuligineuse et la région

apicale s'amincit progressivement.

La première conidie est émise par l'apex du conidiophore, les suivantes étant formées sur les extrémités de nouvelles ramifications émergeant juste au-dessous du point d'émission de la première conidie (radula spore); plusieurs conidies (de 2 à 20) peuvent naître d'un même conidiophore.

1.2 • Les conidies

Les conidies possèdent généralement une base arrondie et un apex rétréci; elles sont biseptées, rarement triseptées ou monoseptées; elles présentent parfois un rétrécissement au niveau des septa; les conidies sont le plus souvent hyalines à olive pâle; leur taille est voisine de 19 à 23 microns x 7 à 9 microns; elles portent généralement un petit appendice basal mesurant 1,6 à 2,4 microns; la germination de la conidie se fait le plus souvent au niveau de la cellule apicale ou de la cellule basale, parfois d'une cellule médiane.

Mais les conidies de *P. oryzae* se caractérisent aussi par une certaine variabilité dans leur forme et dans leur taille; la dimension des conidies serait fonction de nombreux paramètres, entre autres le type de lésion, l'hôte, l'humidité relative, la température:

• Ainsi, les conidies des lésions de type "acute lesion" seraient plus petites et un peu plus rondes que celles issues des "chronic lesions" (ONO et NAKAZOTO, 1958).

• De même le champignon de riz, inoculé sur différents hôtes donne lieu à l'apparition de conidies différentes d'un hôte à l'autre (cf tableau A);

Tableau A : taille des conidies de *P. oryzae* après infection de divers hôtes. [NARITA, IWATA et YAMANUKI, 1965; ASUYAMA, 1965]. Extrait de S.H. OU : "RICE DISEASES"

Hôte inoculé	Dimension (micron) des conidies	Hôte inoculé	Dimension (micron) des conidies
<i>Festuca arundinacea</i>	23,0 x 8,9	<i>Oryza sativa</i>	23,5 x 9,6
<i>F. elatior</i>	22,7 x 9,1	<i>Phalaris arundinacea</i>	25,7 x 8,7
<i>F. rubra</i> (1)	21,9 x 8,3	<i>P. canariensis</i>	25,8 x 9,3
(2)	19,9 x 8,8	<i>Pheumpratense</i>	25,4 x 9,2
<i>Holcus lanatus</i>	22,1 x 8,9	<i>Secale cereale</i>	24,3 x 9,0
<i>Hordeum vulgare</i> (1)	23,9 x 8,6	<i>Zea mays</i>	21,9 x 8,6
(2)	26,4 x 9,7		

par contre lorsque ces dernières conidies, toutes différentes les unes des autres sont inoculées sur le rit, toutes les nouvelles conidies, produites sur riz sont de même taille (NARITA, IWATA et YAMANUKI, 1956).

• Par ailleurs, des conidies produites sous une humidité élevée suffisante seraient plus longues que celles produites sous une faible humidité et a fortiori dans un milieu sec (NISIKADO, 1926 ; SUEDA, 1928).

• La température semble aussi Jouer un rôle significatif : les conidies produites à température élevée (30°C et 27°C respectivement) seraient plus longues que celles formées aux basses températures (18 à 20°C et 21 à 22°C) ; par contre la variation de la largeur sous l'action du facteur thermique ne semble pas significative (YAMANAKA et KDBAYASHY, 1962).

• Enfin, les conidies produites dans les milieux de culture présentent une certaine variabilité, fonction du type de milieu, et elles sont généralement plus longues que celles produites sur plante hôte (NISIKADO, 1926 ; KULKARNI et PATEL, 1956 ; ONO et NAKAZATO, 1958) (cf tableau B).

Tableau B : tailles moyennes des conidies de *P. oryzae* produites sur lésions de l'hôte et sur décoction gélosée de plantes [SAWADA, 1917 ; ASUYAMA, 1955]. Extrait de S.H. OU "RICE DISEASES"

Sur lésions de l'hôte	Sur milieu gélosé issu d'une décoction de				
	Fève	Riz	<i>Digitaria sanguinalis</i>	<i>Panicum repens</i>	Tomate
26,0 x 8,8	28,0 x 8,4	28,7 x 8,8	28,9 x 8,7	28,9 x 8,9	21,7 x 8,3

Quant à la germination des conidies, elle est suivie de la formation d'appressoria émis aux extrémités des tubes germinatifs ; l'appressorium (que d'aucuns baptisèrent "RECREATING SPORE" ou "RESTING SPORE" ou même "CHLAMYDOSPORE") semble jouer un rôle très important dans la première phase d'agression de l'hôte.

Il semblerait même (SUZUKI, 1951, 1953) qu'il y ait une relation entre pathogénie et grosseur de l'appressorium.

1.3 - Caractères cytologiques (cf planche n° X_B)

L'observation de conidies au microscope électronique a conduit à divers résultats : la membrane cellulaire serait composée de 3 couches selon certains auteurs (MIZUSAWA, 1959), 2 couches seulement selon d'autres (HORINO et AKAI, 1965) et enfin 4 couches selon WU et TSAO (1967) ; ces deux derniers chercheurs mirent en évidence l'existence de noyaux, de nucléoles, de pores au niveau du septum, ainsi, que la présence de 2 types de particules denses dont l'une serait le lysosome.

Le nombre de noyaux par cellule **mycélienne** ou conidienne est encore incertain eu égard aux résultats certes nombreux mais souvent controversés : les cellules seraient plurinucléées selon SUZUKI (1965, 1967), uninucléées selon HORINO et AKAI (1965), WU et TSAO (1967). YAMASAKI et NIIZEKI (1965) pensent au contraire que, de façon générale, les cellules seraient uninucléées mais qu'il existerait un faible pourcentage de cellules contenant 2 à 6 noyaux pour certaines souches seulement du champignon.

HASHIOKA et INAGAKI (1968) établirent que les 7 espèces de *Pyricularia* étaient uninucléées mais qu'il y avait possibilité d'anastomose entre *P. oryzae* et *P. zizaniae* ; ce qui conduirait à la formation d'un noyau mixte générateur de différents types de conidies.

Enfin, récemment encore, GIATGONG et FREDERIKSEN (1967, 1968, 1969), établirent que de façon générale, les cellules conidiennes ou **mycéliennes** étaient uninucléées mais qu'un nombre réduit de cellules, reconnaissables par leur forme (forme en tonneau), avaient 4 noyaux ou plus.

Cette étude cytologique révèle, entre autres, toute la difficulté de caractérisation de l'agent **pathogène** ; si nous ajoutons par ailleurs que des études très récentes révèlent une très grande variabilité dans la pathogénie du parasite, nous conviendrons alors une fois de plus de la nécessité de mieux appréhender les caractéristiques biologiques du **pathogène**, autrement dit des relations entre ces caractéristiques et la variabilité de la pathogénie ; pourquoi la quantité de **mycélium** parasite **varie-t-elle** d'une masse cotonneuse épaisse à un très mince film ? Pourquoi observe-t-on de si fortes variations de la couleur du mycélium ? Quelle relation existe-t-il entre ces variations et la **pathogénie** ? Autant de problèmes à définir et à résoudre pour une meilleure approche des relations **hôte-parasite** et partant pour l'édification d'une méthode efficace de lutte.

II - CARACTERES CULTURAUX EN FONCTION DU MILIEU

Seuls seront examinés dans ce paragraphe les **caractères** descriptifs afférents à la morphologie des cultures et à celle du mycélium ; les conidies, quant à elles, seront examinées dans la partie traitant de la conidiogénèse.

Les milieux utilisés : PCA, PDA, MISATO 6.5, **ORGEOSE** dont les composantes sont **définies** dans l'annexe technique n° 1 ont été incubés après inoculation ; les notations ont été journalières jusqu'au **15^e** jour-d'incubation-
% 25°C

2.1 - Morphologie de la culture

-- La forme de la colonie est régulière par rapport au site d'inoculation quel que soit le milieu solide **utilisé** ; cependant, alors que l'épaisseur du mycélium est **très** fine sur PCA, nous observons sur PDA, **ORGEOSE**, une masse **mycélienne** relativement plus abondante quoique moins importante que sur MISATO 6.5.

▪ La couleur : la teinte "brun cendre" est **très** nette quel que soit le milieu ; cependant, alors qu'elle est homogène et régulière sur toute l'étendue de la **colonie** observée sur PCA, **ORGEOSE** ou MISATO 6.5, nous notons au **10^e** jour sur PDA une gamme de nuances ainsi réparties de l'intérieur vers l'extérieur :

. autour du site d'inoculation (c'est la zone la plus âgée), un anneau d'environ 3 mm d'épaisseur, d'aspect poudreux très fin et de teinte **gris-rosâtre**,

. une zone de 8 mm d'épaisseur, de teinte beige à gris clair, **légèrement** plus épaisse que la précédente,

. une bande annulaire d'environ 8 mm d'épaisseur caractérisée par un mycélium floconneux **lâche** (telles les particules peu denses d'un velours),

. une zone d'environ 10 mm dont la masse **mycélienne** relativement plus épaisse que toutes les précédentes est nettement plus **claire**, de teinte "huileuse",

. enfin, une marge externe claire.

2.2 - Le mycélium

La croissance mycélienne semble bloquée au contact des parois des boîtes de Petri ; ce qui suggère la présence d'un mycélium du type rampant.

Au microscope, le mycélium très fin, hyalin, de diamètre moyen avoisinant 3,14 à 4,18 microns ne présente aucune différence significative liée au substrat nutritif.

La longueur moyenne des cellules mycéliennes est de 26,78 microns (moyenne de 50 valeurs observées sur PCA).

2.3 - Le revers de cultures

Nous nous bornerons à signaler la très forte pigmentation observée sur PDA.

III - CARACTERES CULTURAUX EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

Les cultures décrites ici sont issues d'un inoculum isolé de la variété 302 G ; le substrat nutritif choisi est le PCA, l'observation s'est faite à 25°C pendant 9 jours.

Nous avons réalisé cet essai aux températures de 10,5°, 15°, 17°, 20°, 25°, 30° ; chacune de ces valeurs étant entachée d'une marge d'erreur de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

- La masse mycélienne formée à 30° et 25°C est d'une teinte brune régulière ; cette coloration, nous le verrons ultérieurement, traduit une bonne sporulation de façon générale ; les cultures placées à ces deux températures sont aussi caractérisées par un revers très pigmenté.

- A 20°, se développe une masse mycélienne d'aspect poudreux très homogène.

- Pour les températures de 17°, 15°, 10,5°, le mycélium, parfois floconneux, devient blanchâtre et on constate l'absence de pigmentation du revers des cultures.

IV ▪ CARACTERES CULTURAUX EN FONCTION DU pH (Tampon Mc Ilvaine, ann. tech. n° 7)

Les caractères ci-dessous ont **été** établis sur la base de culture en milieu liquide à base de carotte-pomme de terre ; dès les premières **périodes** d'incubation à 25°C, nous observions dans les erlenmeyers des masses **mycéliennes** cotonneuses à duveteuses, **blanchâtres, isolées** les unes des autres, de dimension variable en fonction du pH ; **très tôt** cependant, des différences se révèlent et se **concrétisent** avec l'âge.

- Pour les pH bas de 2,95 et 2,35, la teinte initiale persiste hormis une **légère** augmentation dans la taille ou la confirmation de l'aspect blanc laiteux.

- Pour les pH 3,95 et 4,60, les flocons deviennent plus solidaires et à la **périphérie** se développent dès les 5e et 6e jours, un anneau continu brun **verdâtre** au contact de la paroi de l'erlenmeyer.

- A pH 5,30, s'est **développée**, des les 5e et 6e jours, une assise **mycélienne** porteuse par endroit de "touffes" brun clair.

- Au cours des essais réalisés, le pH 5,95 est celui qui a révélé la plus grande **homogénéité** tant du point de vue régularité dans l'épaisseur du mycélium que répartition de la teinte brune.

- Aux pH 6,45, 7,00, 7,55 se développent, par endroit, des touffes **duveteuses**.

CHAPITRE TROISIEME

BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DE *Pyricularia oryzae*

I - PARAMETRES DE LA CROISSANCE DE *P. oryzae*

1.1 - Préliminaire

L'établissement d'une méthode de lutte contre le *P. oryzae* impose a priori une définition **même** partielle des relations **hôte-parasite**, ce qui suppose entre autres la connaissance de la biologie et de la physiologie du parasite au travers de ses exigences nutritives, thermiques, lumineuses, etc... ; l'importance de cet aspect du problème n'est plus à démontrer et, s'il en était besoin, nous pourrions très bien la matérialiser à la **lumière** des expériences de TANAKA et KATSUKI (1956) qui **révélèrent** que de nombreux composés du cycle de **KREBS** présents dans les feuilles de riz jouaient un **rôle** stimulant dans la croissance du parasite impliqué ; cette "réceptivité", sur le plan trophique tout au moins, liée à la présence d'acides succinique, **malique**, citrique, joue donc un **rôle** important dans la nature des relations établies entre le parasite et **l'hôte considéré**.

Dans l'étude qui va suivre, nous nous efforcerons de cerner l'action du milieu, de la température et celle du pH sur la croissance de *P. oryzae*.

Il convient cependant de signaler l'existence de certaines souches utilisatrices de sorbose, de sorbitol, de mannitol, d'inuline, ce qui **révèle** une variation dans l'utilisation des métabolites ; resterait donc à établir la corrélation -si corrélation il y a- entre cette variation de type trophique et la variabilité du pathogène.

TANAKA et KATSUKI (1956) postulèrent par la suite que les **amino-**acides libres tels par exemple le glutamate, l'aspartate ainsi que des traces de Mn, de Zn, de Mo pouvaient jouer un **rôle** de cofacteurs de croissance.

1.2 • Paramètres trophiques

De façon générale, la croissance de *P. oryzae* est relativement aisée sur milieux naturels, autrement dit de milieux composés soit de tissus de plante, soit de décoction de plante ; de même l'addition dans un milieu de culture d'extraits de chaume de riz dans l'eau chaude stimule considérablement la **croissance** et la sporulation de *P. oryzae*, ce qui **témoigne** en faveur de l'existence d'une substance inductrice de croissance ou "GROWTH-PROMOTING-SUBSTANCE" dans l'extrait de chaume de riz.

Par contre la croissance de *P. oryzae* s'avère difficile sur milieu synthétique.

De nombreuses expériences ont été réalisées dans le but de mieux cerner la nutrition **carbonée** ; il semble bien établi de nos jours, que les meilleures sources de carbone soient le **sucrose**, le glucose, le **maltose**, le fructose, le lactose, le xylose et que de façon générale les acides organiques ne soient pas des sources convenables (OTSUKA et al., 1965).

Quant à la nutrition azotée, l'état actuel de nos connaissances met en évidence l'intervention convenable de l'histidine L ; de l'acide **L-glutamique**, L-proline, **L-sérine** ; de la L-glycine, L-arginine, L-asparagine, L-alanine.

Pour quantifier la croissance mycélienne, nous nous limiterons à deux méthodes :

▪ La méthode radiale : fondée sur la mesure du diamètre moyen des colonies ; dans tous les cas, la valeur moyenne indiquée représente la moyenne établie à partir de 5 boîtes de Petri ; pour chaque boîte, la valeur affectée est une moyenne entre 2 mesures effectuées le long de 2 diamètres perpendiculaires.

L'unité de mesure sera le millimètre (mm).

▪ La méthode pondérale : dont le principe est de suivre l'évolution **pondérale** (en mg) de la masse mycélienne préalablement filtrée (papier filtre DURIEUX n° 111) et séchée à l'étuve à 105°C.

Dans tous les cas, la valeur **moyenne mentionnée** a **été** établie à partir de 3 mesures correspondant à 3 erlenmeyers.

1.2.1 - Nature des milieux utilisés

cf annexe n° 1.

1.2.2 - Définition de l'inoculum

Il est, de façon **générale**, issu d'une culture présentant une bonne **croissance** dont l'**âge** est de 5 à 12 jours.

1.2.3 - Résultats

1.2.3.1 - Croissance en milieu solide

Expérience n° 1

Nature des milieux Age des cultures (jours)	PCA	MISATO 6.5	PADDY/A	PDA	ORGE/A
3	20,2	18,4	20,4	19,8	19,6
5	33,4	30,8	35,5	34,3	35,1
8	53,1	49,6	53,8	55	59
10	67,0	62,4	68,2	68	70,2
12	80,0	76	82,5	80,4	86,25

Tableau 1 - *Pyricularia oryzae* : croissance radiale (exprimée en mm) en fonction du milieu de culture ; température d'incubation = 28°C/obscurité continue.

Expérience n° 2

Nature des milieux / Age des cultures (jours)	PCA	PDA	MISATO 6.5	ORGEOSE
6	33,6	36	31,1	30,4
8	45,2	48,5	42,0	40,0
12	77	83,0	74,4	65,2
14	84	87,2	81,1	68,4

Tableau 2 - *P. oryzae* : croissance radiale en fonction du milieu ; incubation à 28°C/obscurité continue.

1.2.3.2 - Croissance en milieu liquide

Age des cultures (jours) / Nature des milieux	7	16	211	28	35	41
PC	21,7	56,46	37,96	28,20	28,06	25,00
MISATO 6.5	23,3	107,26	144,00	138,00	80,93	80,39

Tableau 3 - *P. oryzae* : croissance pondérale (exprimée en mg) en fonction du milieu de culture ; température d'incubation = 28°C/obscurité continue.

Remarque : Quant aux milieux à base de pomme de terre-glucose, Paddy, orge, ils se prêtent très mal à ce genre de manipulation ; nous avons dû les éliminer au

21^e jour eu **égard à** la quantité de **milieu** qui, au cours de la filtration venait fausser l'**appréciation pondérale** de la croissance mycélienne ; en effet, l'emploi de papier filtre rapide ne permet pas une séparation correcte **mycélium/milieu** ; par contre la filtration est **extrêmement** lente voire impossible lorsque le papier filtre utilisé est du type lent.

1.2.4 - Expression des résultats : discussion

Les résultats obtenus sur les tableaux 1 et 2 sont respectivement exprimés par les figures 1 et 2 ; on peut conclure au regard de ces **représentations** graphiques que ORGE/AGAR, PADDY/AGAR, PCA, PDA, MISATO 6.5 confèrent au parasite une bonne croissance, relativement **équivalente** pour tous ces milieux.

Par contre, le milieu à base d'**orgéose** manifeste une **infériorité** sur le plan stimulation de la croissance.

L'ORGEOSE, le PDA (qui induit une stérilité très **précoce**), le PADDY/A, l'**ORGE/A** ne présentent pas de supériorité particulière par rapport aux deux autres milieux et, du fait qu'en outre, leur usage s'avère très difficile pour les cultures en milieu liquide, nous avons choisi de poursuivre notre étude **avec** seulement le PCA et le MISATO 6.5.

Pour cette raison, l'appréciation de la croissance pondérale exprimée par la figure 2 ne fait intervenir que les **2** milieux retenus ; sur cette figure, nous détectons un maximum de croissance situé entre **2 ou 3** semaines ; le MISATO 6.5 manifeste une **très** nette supériorité sur le PC (pomme de **terre-carotte**).

Le fait que le maximum de croissance observé sur PC soit atteint environ 5 jours avant celui sur MISATO 6.5 ne devrait pas être étranger à la précocité de la décroissance pondérale présentée par PC ; autrement dit, il nous semble que plus la croissance est active au départ, plus précoce sera le phénomène de lyse mycélienne expliquant la décroissance pondérale.

Remarque : à notre avis, l'évaluation de la croissance pondérale devrait **être plus** précise que celle de la croissance radiale ; à y regarder de plus **près**, l'appréciation de la croissance radiale donne un aperçu sur la vitesse **d'étalement** de la colonie, aucune information **n'étant** fournie quant au développement aérien du **mycélium**.

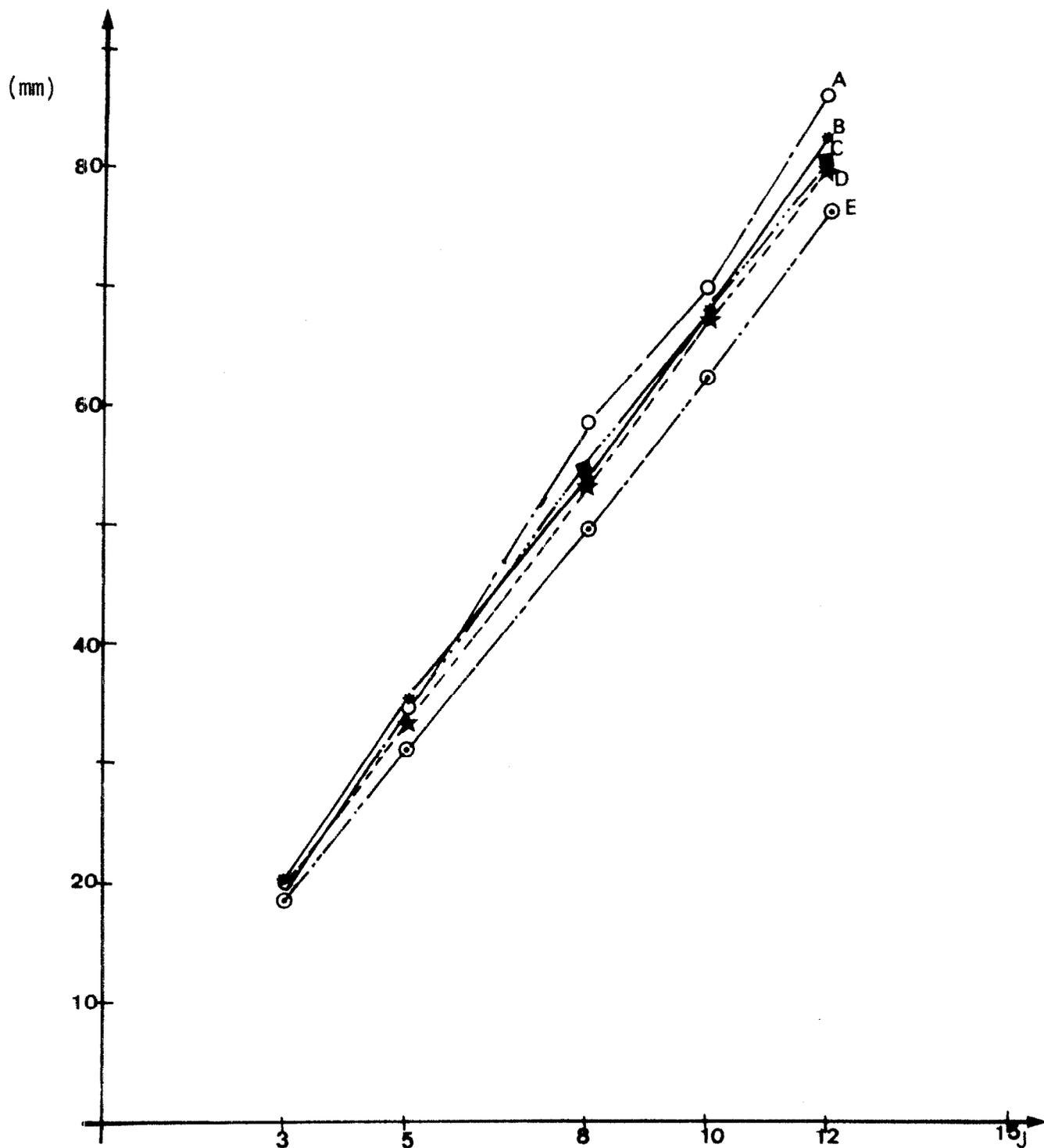


Fig. 1 - *P. oryzae* : croissance radiale (mm) en fonction du milieu et du délai d'incubation ; 28°C/obscurité. A = orge/agar ; B = paddy/agar ; C = PDA ; D = PCA ; E = Mi sato 6.5

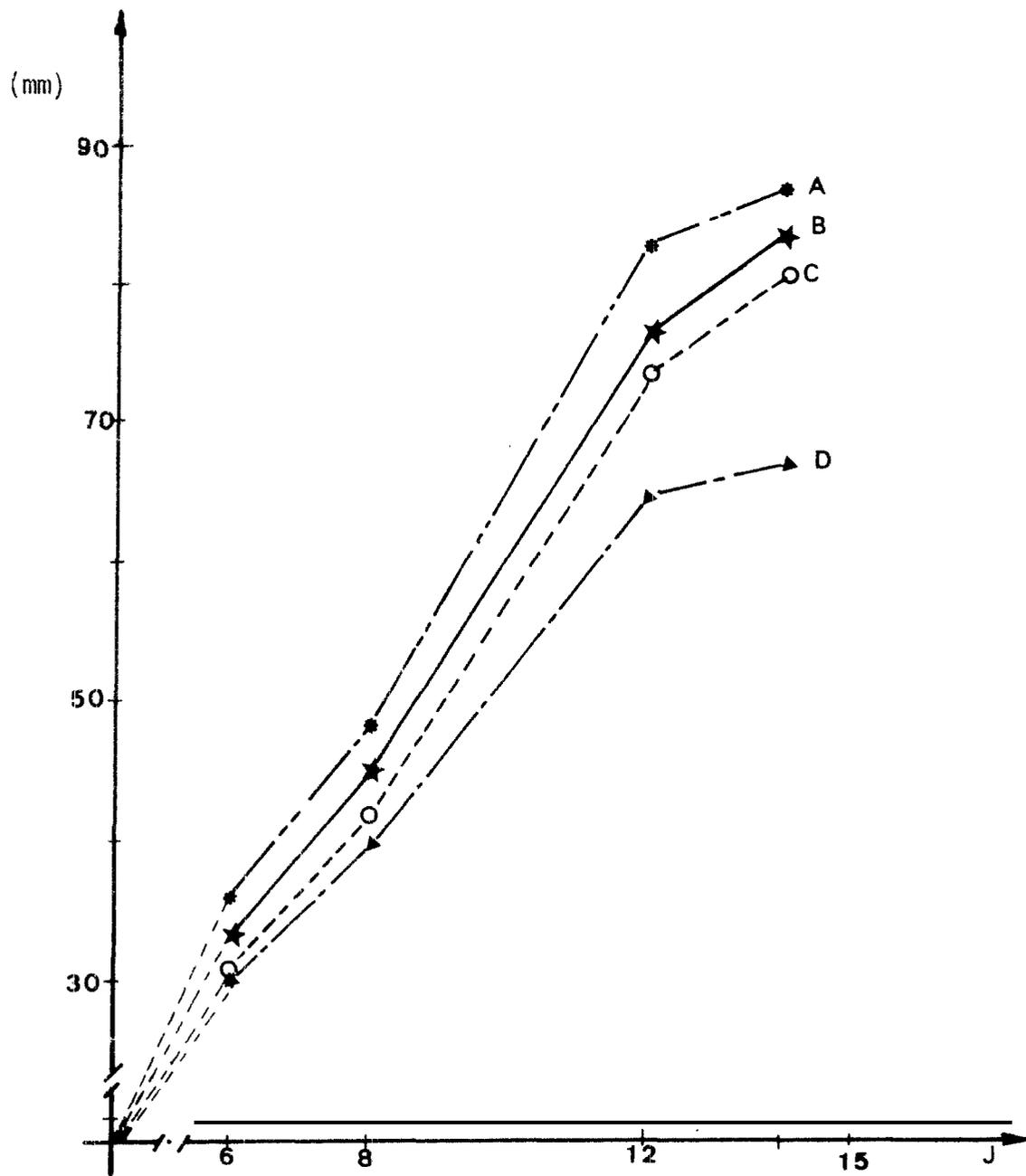


Fig. 1 bis - *P. oryzae* : croissance radiale (mm) en fonction du milieu et du délai d'incubation ; 28°C/obscurité.
 A = PDA ; B = PCA ; C = Misato 6.5 ; D = Orgéose.

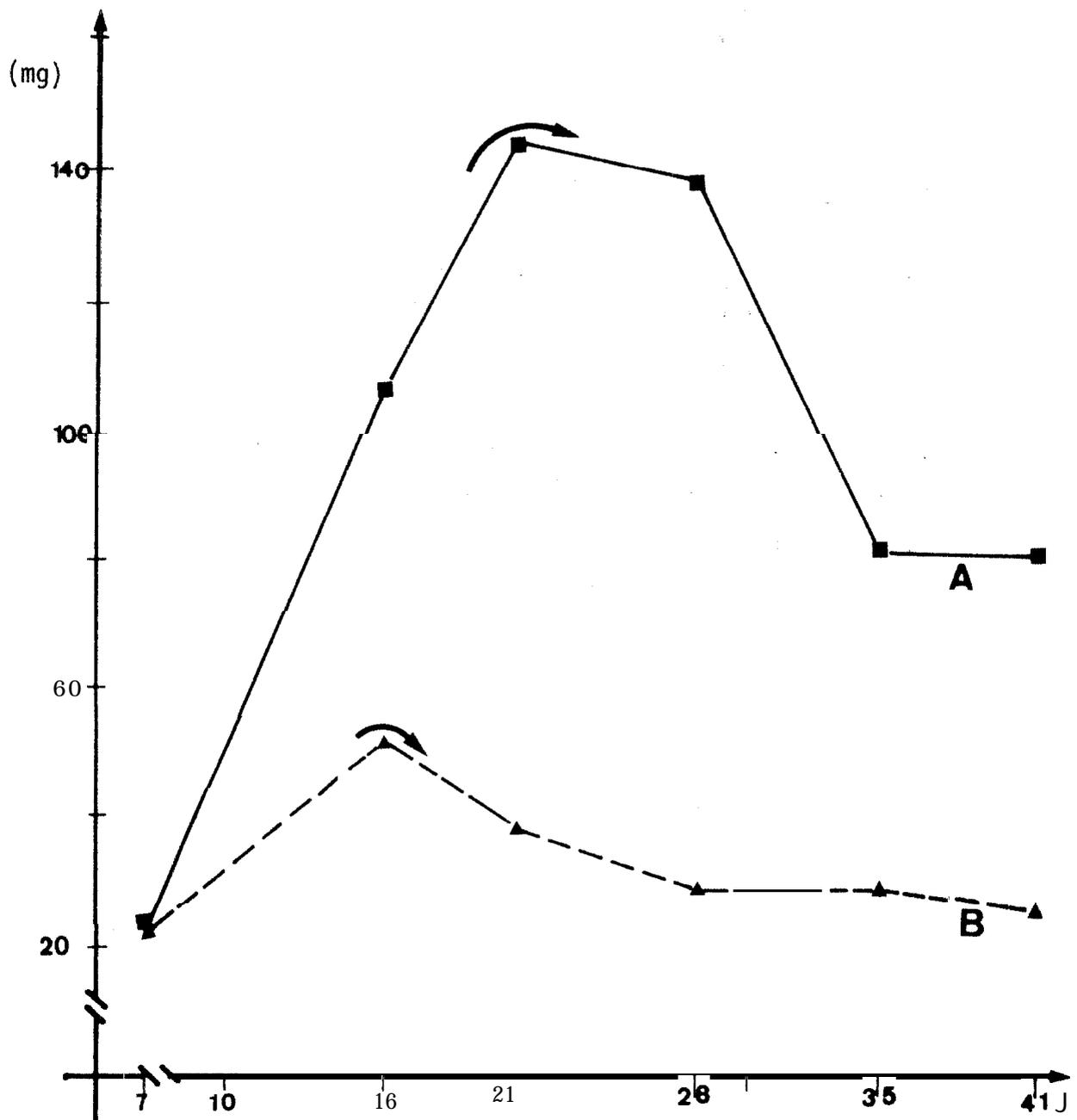


Fig. 2 - *P. oryzae* : croissance pondérale (mg) en fonction du milieu et du délai d'incubation ; 28°C/obscurité ;
 A = Misato 6.5 ; B = PC.

1.3 - Action de la température

Théoriquement, la croissance mycélienne de *P. oryzae* a lieu entre 8-9° et 37°C ; l'optimum se situant à 28°C. Les températures expérimentales choisies appartiennent à la fourchette ainsi définie : 10,5°C, 15°C, 17°C, 20°C, 25°C, 27°C, 30°C, 32°C, 35°C et 37°C sont en effet les températures que nous avons retenues.

1.3.1 - Résultats

Température °C \ Age cultures (jours)	10,5	15	17	20	25	27	30	32	35	37
1,5	0,0	0,0	10,2	10,4	12,8	13,5	<u>14,0</u>	8,0	0,0	0,0
4	10,0	13,0	17,3	18,8	26,0	28,0	<u>29,0</u>	23,5	18,5	0,0
6	14,0	18,1	26,5	27,5	38,4	41,0	<u>42,4</u>	34,7	29,0	0,0
9	22,7	27,0	37,3	41,0	56,8	-	<u>62,5</u>	50,4	47,5	0,0

Tableau 4A - *P. oryzae* : croissance radiale (mm) en fonction de la température/
PCA/obscurité continue.

1.3.2 - Expression graphique : interprétation

Si aux températures expérimentales extrêmes (10,5°, 15° et 35°) la croissance demeure possible, elle reste faible voire nulle (cf fig. 3 pour la durée d'incubation de 36 heures).

Pour les 3 premiers délais d'incubation, le parasite manifeste une meilleure croissance à 30°C (qui est la température optimale observée) qu'à 27°C ; cependant, au bout de 9 jours, la vitesse de croissance à 27°C augmente au point de surpasser la croissance observée à 30°C ; il n'est pas impossible que ce phénomène puisse s'expliquer par le fait que la valeur de 27° est relativement proche de l'optimum théorique qui est de 28°C.

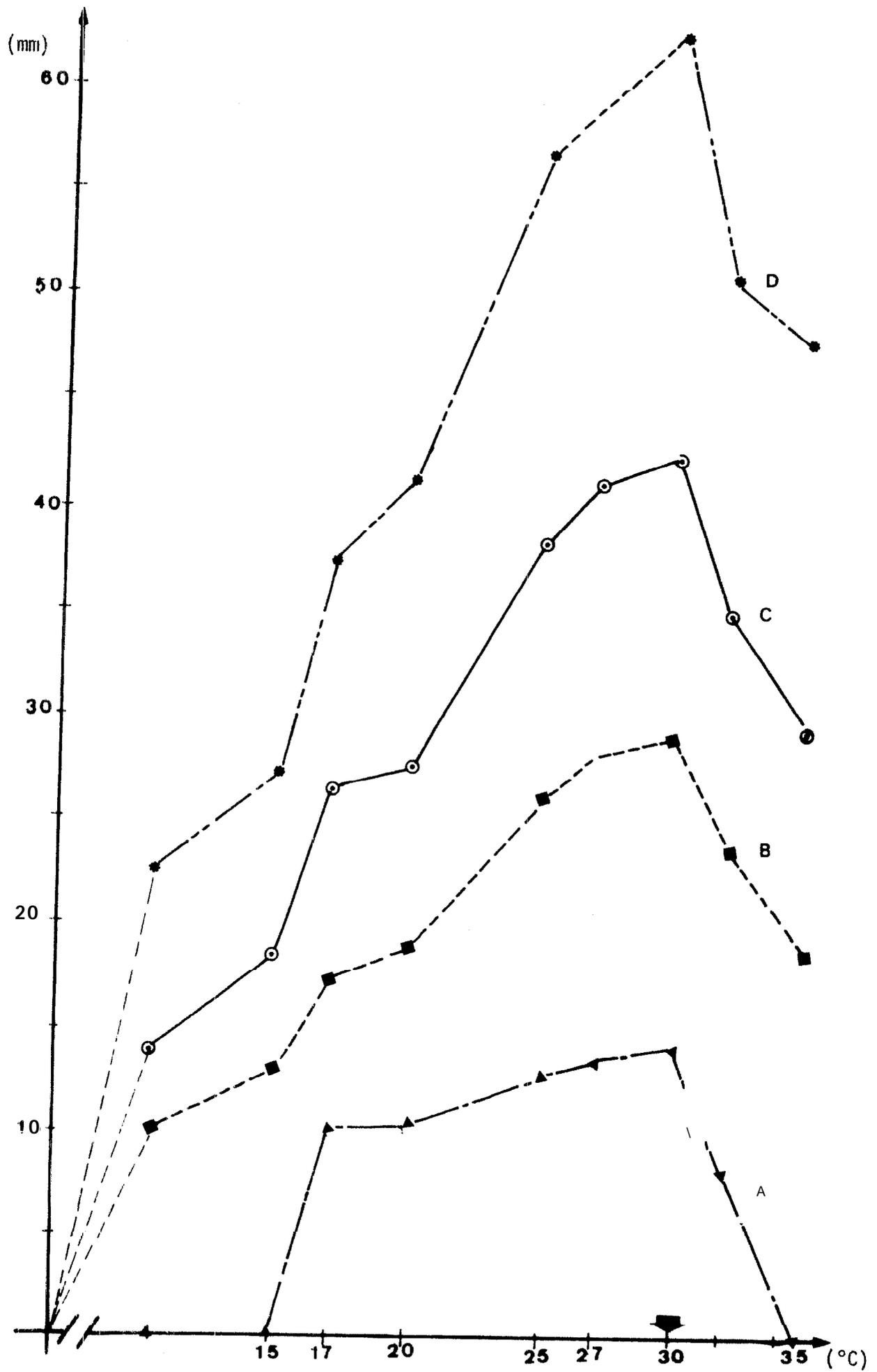


Fig. 3 - *P. oryzae* : croissance radiale (mm) en fonction de la température ; PCA/obscurité ; A = âge de 36 h ; B = 4 j ; C = 6 j ; D = 9 j.

A 37°C, la croissance observée est nulle au bout des 9 jours d'incubation ; nous avons alors transporté le matériel conservé de 37° 25" pour situer le seuil de létalité ; les valeurs observées après cette transplantation sont représentées dans le tableau 4B/25°C/obscurité continue.

Délai incubation (jours)	1	2	4	18
Diamètre moyen colonies (mm)	0,0	0,0	15,0	>> 90,0

Tableau 4Bis - *P. oryzae* : culture préalablement incubée 9 jours à 37°/obscurité et transplantée à 25°/obscurité.

1.4 - Action de 1 'héméropériode

1.4.1 - Résultats

Age (jours) / Héméropériode	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(1)	13,0	18,3	23,7	29,0	35,0	40,0	46,7	52,0	58,7	66,0
(2)	14,0	20,5	26,0	32,0	39,0	45,0	50,0	54,0	60,0	67,0
(3)	14,0	21,0	27,0	34,0	40,0	47,0	53,0	56,0	63,0	69,0

Tableau 4' - *P. oryzae* : croissance radiale en fonction de l'héméropériode et du délai d'incubation/PCA/25°.

- (1) = lumière continue
- (2) = obscurité continue
- (3) = 8 heures lumière + 16 heures obscurité

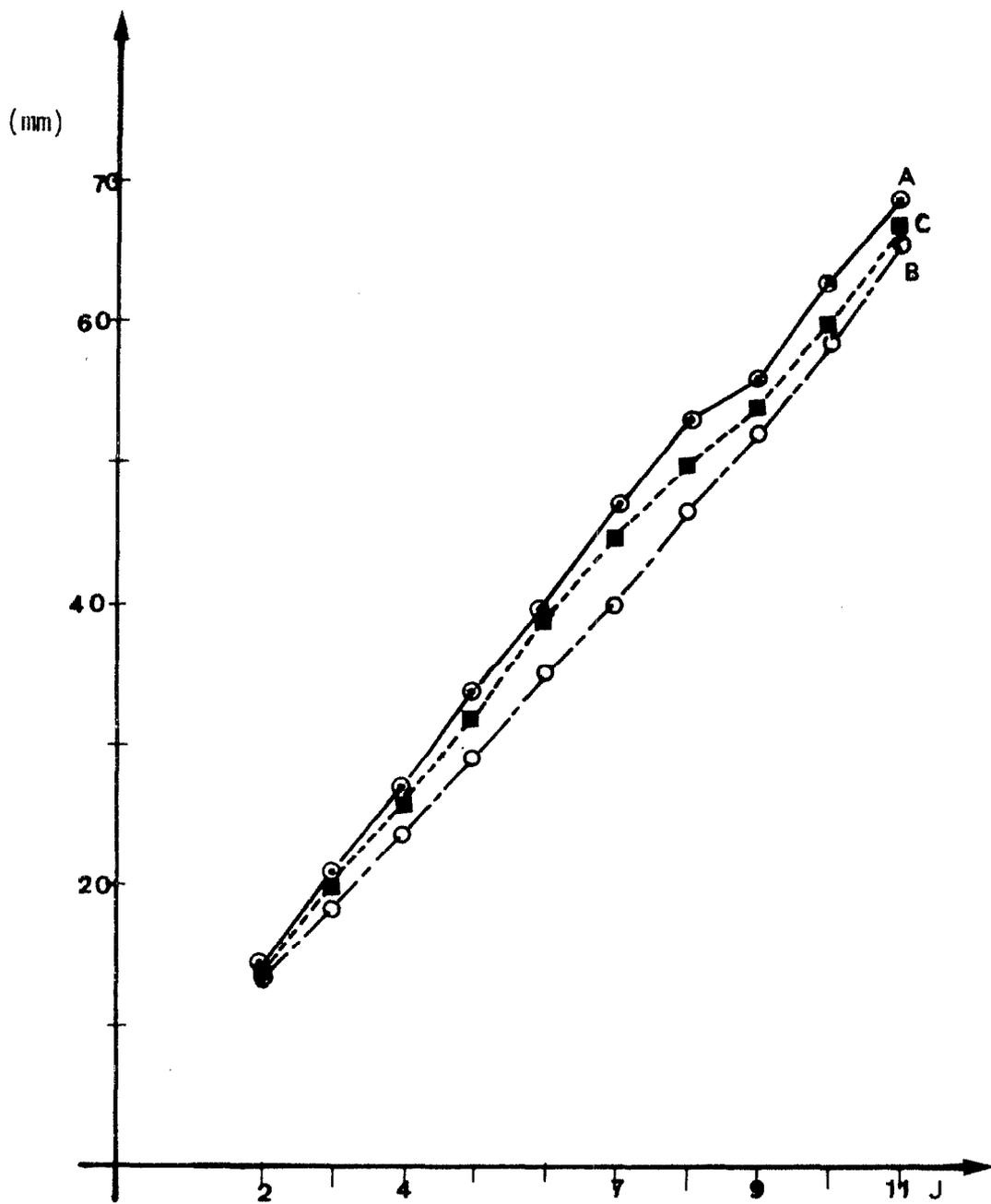


Fig. 3' - *P. oryzae* : croissance radiale (mm) en fonction de l'héméroperiode et du délai d'incubation ; 25°C/PCA.
 A = 8 heures LUM + 16 heures OBS
 B = Lumière
 C = Obscurité

1.4.2 - Expression graphique : discussion

Quoique la croissance mycélienne fût très satisfaisante quelle que soit l'hémérope, l'alternance LUMIERE:-OBSCURITE semble plus bénéfique que la lumière ou l'obscurité continue ; il aurait probablement été intéressant de pouvoir affiner les durées respectives dans l'association lumière-obscurité afin de détecter la combinaison optimale pour la croissance mycélienne.

Par ailleurs, l'obscurité continue serait préférable à la lumière continue.

Dans la suite de nos expériences, nous travaillerons -sauf indication contraire- à l'obscurité, d'abord parce qu'elle correspond à la courbe moyenne (cf fig. 3'), ensuite en raison de contraintes matérielles.

1.5 - Action du pH sur la croissance de *P. oryzae*

1.5.1. RÉSULTATS -

pH \ Age cultures (jours)	2,35	2,95	3,95	4,60	5,30	5,95	6,45	7,0	7,50
7	9,9	24,1	60,13	62,73	55,06	58,60	48,66	53,06	46,00
18	18,80	57,7	46,43	41,00	34,66	28,26	29,30	31,53	30,56
26	24,3	39,46	35,73	38,76	30,50	30,85	30,73	25,30	21,06
37	34,35	29,65	27,10	37,15	24,50	25,85	26,00	21,55	31,20
460,70	42,53		37,95	36,85	31,10	37,80	27,45	30,05	30,80

Tableau 5 - *P. oryzae* : croissance pondérale (exprimée en mg) en fonction du pH/PC/25°C/obscurité continue.

Age cultures (jours) \ pH	2,35	2,95	3,95	4,60	5,30	5,95	6,45	7,0	7,50
7	2,75	3,75	6,90	5,95	7,20	7,50	7,60	7,50	7,85
18	2,85	5,85	7,85	8,10	8,15	8,15	8,25	8,25	8,35
26	2,70	8,05	8,05	8,15	8,15	8,30	8,35	8,35	8,40
37	2,65	8,25	8,25	8,20	8,15	8,25	8,25	8,25	8,30
41	2,70	8,20	8,20	8,20	8,20	8,20	8,20	8,20	8,30

Tableau 6 - *P. oryzae* : évolution du pH au cours du vieillissement des cultures/PC/25°/obscurité continue.

Age cultures (jours) \ pH	3,95	4,60	5,30	5,95	6,45	7,00	7,50
2	11,50	13	13,75	14,25	13,25	12,75	12,75
4	21,50	23	23,50	25,00	23,75	23,75	22,25
9	51,0	52,75	54,50	53	53,75	54,0	50

Tableau 7 - *P. oryzae* : croissance radiale (mm) en fonction du pH/PCA/25°/obscurité continue.

1.5.2 - Expression graphique des résultats : discussion

1.5.2.1 - Préliminaire

La croissance en milieu liquide implique une interaction entre l'inoculum et le substrat nutritif :

• Le substrat, par ses composantes (glucides, lipides, protides et ici pH) induit une certaine croissance du parasite ; à telle enseigne qu'à la limite il peut en modifier quelque peu la physiologie.

• Le parasite consomme certains métabolites issus du milieu, y rejette des composés résultant de son métabolisme et partant modifie qualitativement le milieu sur lequel il pousse.

En l'occurrence, cette interaction, très remarquable pour ce qui est du pH en milieu liquide (ce qui serait moins important pour les milieux gélifiés en raison des échanges très limités), suggère qu'au fil du temps, le parasite n'est jamais confronté au même milieu de base ; connaissant les relations parfois étroites entre la nature du milieu et certaines caractéristiques du parasite, l'on saisit alors la **nécessité** de tenir compte de l'évolution du pH du milieu.

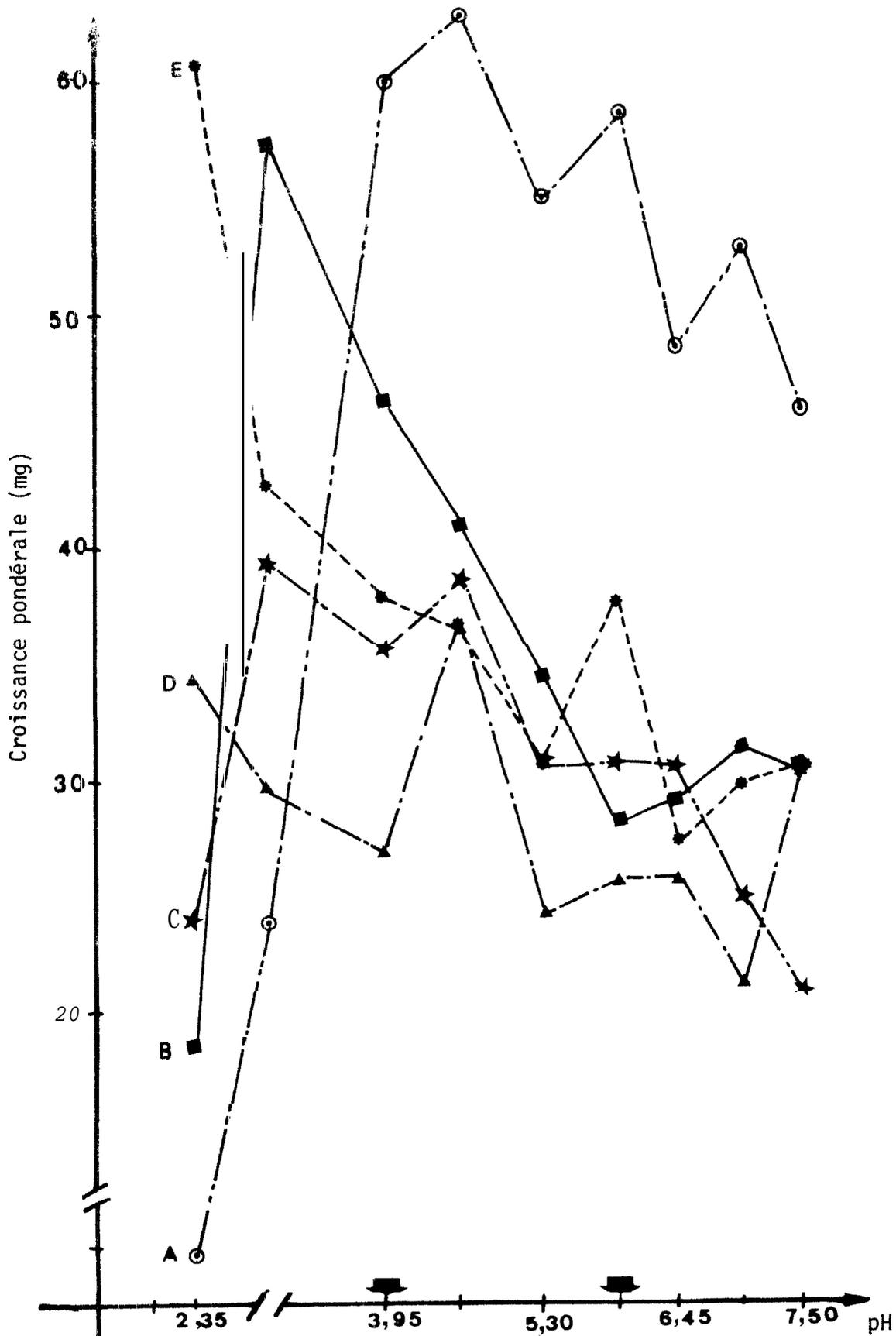
En d'autres termes, l'appréciation de la croissance pondérale en fonction du pH devra, sous peine d'erreur, tenir compte du **rôle** joué par le parasite dans l'évolution du pH au cours du vieillissement des cultures. Cette "régularisation" du pH dans le temps vers une valeur optimum est un fait constant observé dans la plupart des cultures.

Pour ce faire, les représentations graphiques de la croissance pondérale et de l'évolution du pH devront être **analysées** de façon concomitante ou du moins, la figure 4 sera analysée en ayant **toujours** présente à l'esprit la figure 5.

1. 5. 2. 2 - Analyse des courbes traduisant la croissance pondérale en fonction du pH

La figure 4 comporte 5 courbes qui n'ont pas toutes la même importance ; les courbes A et B étant surtout les plus **représentatives** de la croissance (encore que des évaluations plus précoces auraient certainement été plus significatives) ; les autres traduisent **plutôt** une croissance interférant avec le vieillissement des cultures.

En nous fiant **plus** à la courbe obtenue après 7 jours (A), nous estimons que la bande des pH optimums comporterait toutes les valeurs **situées** entre 3,95 et 5,95. Il est vrai qu'à cette date **déjà**, les pH limites correspondant à ces deux valeurs sont de 6,90 et 7,20 ; autrement dit, **même** à cet dge re-



F-ig. 4 - *P. oryzae* : croissance pondérale (mg) en fonction du pH/PC/25°C/obscurité ; A = âge de 7 j ; B = 18 j ; C = 26 j ; D = 37 j ; E = 41 j.

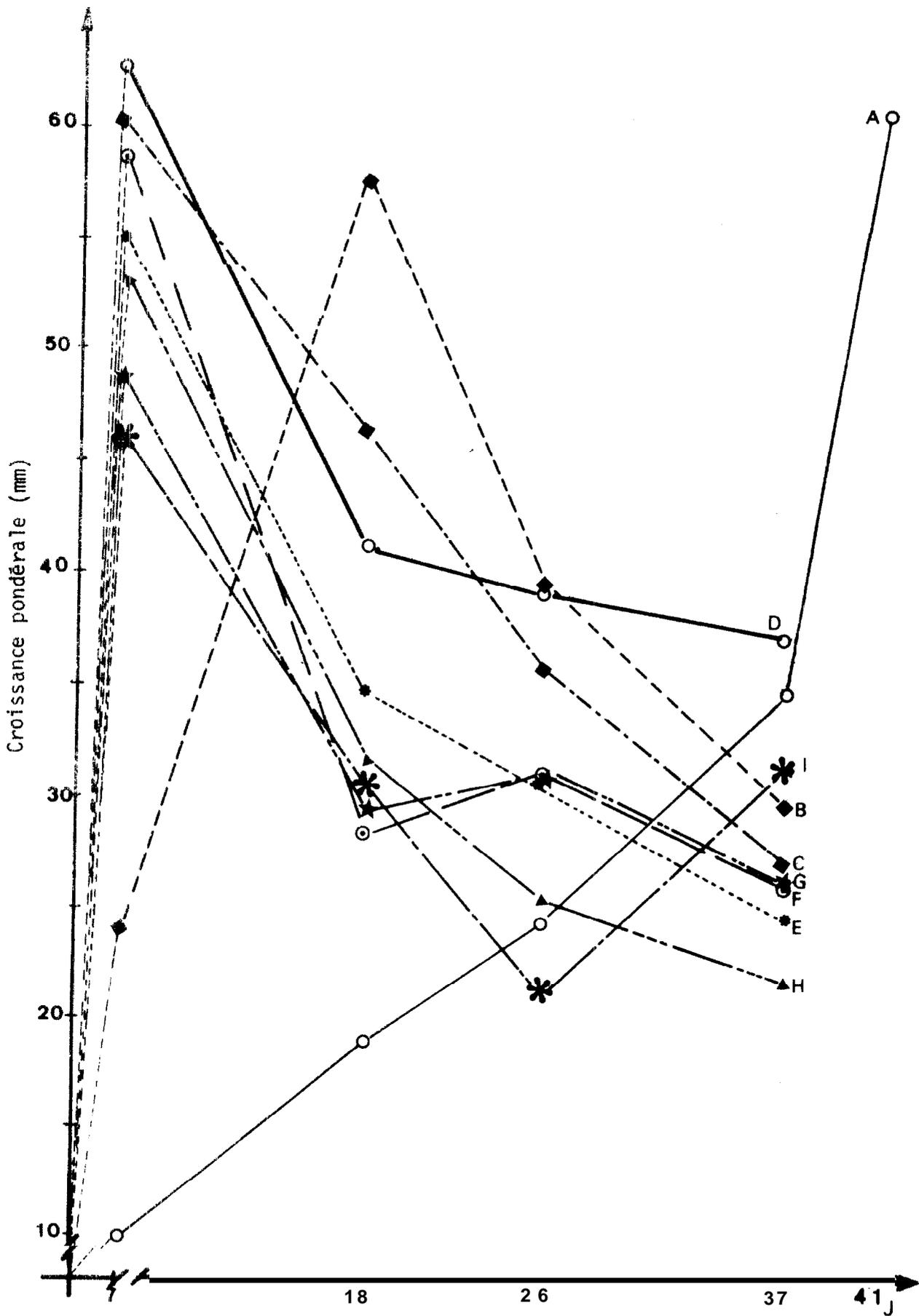


Fig. 5 - *P. oryzae* : croissance pondérale (mg) au cours du vieillissement des cultures ; PC/25°C/obscurité.
 pH₀ : A = 2,35 ; B = 2,95 ; C = 3,95 ; D = 4,60 ; E = 5,30 ;
 F = 5,95 ; G = 6,45 ; H = 7,0 ; I = 7,50

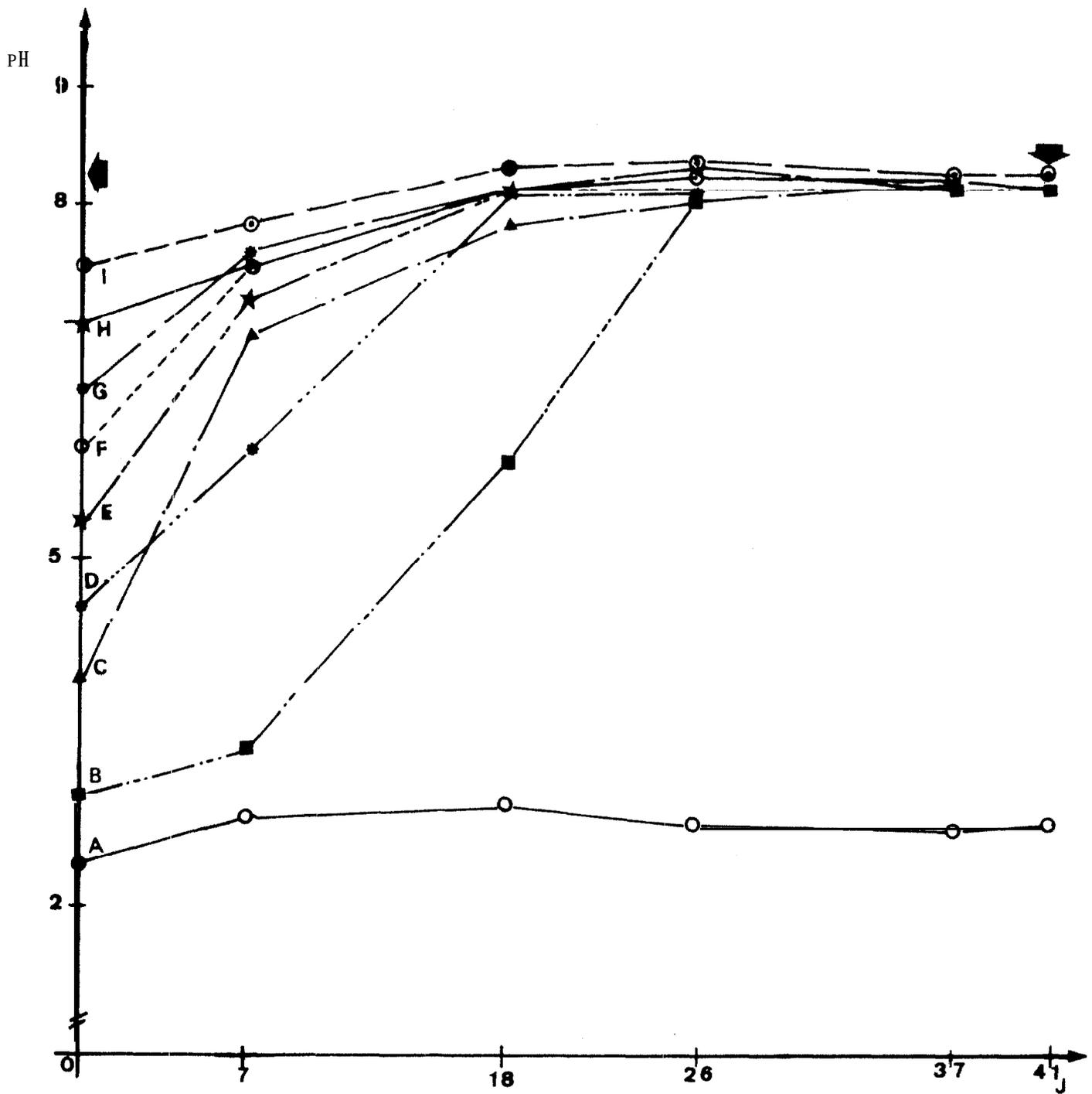


Fig. 6 • *P. oryzae* : Régularisation du pH au cours du vieillissement des cultures ; PC/25°C/obscurité ; pH_0 : cf fig. n° 5.

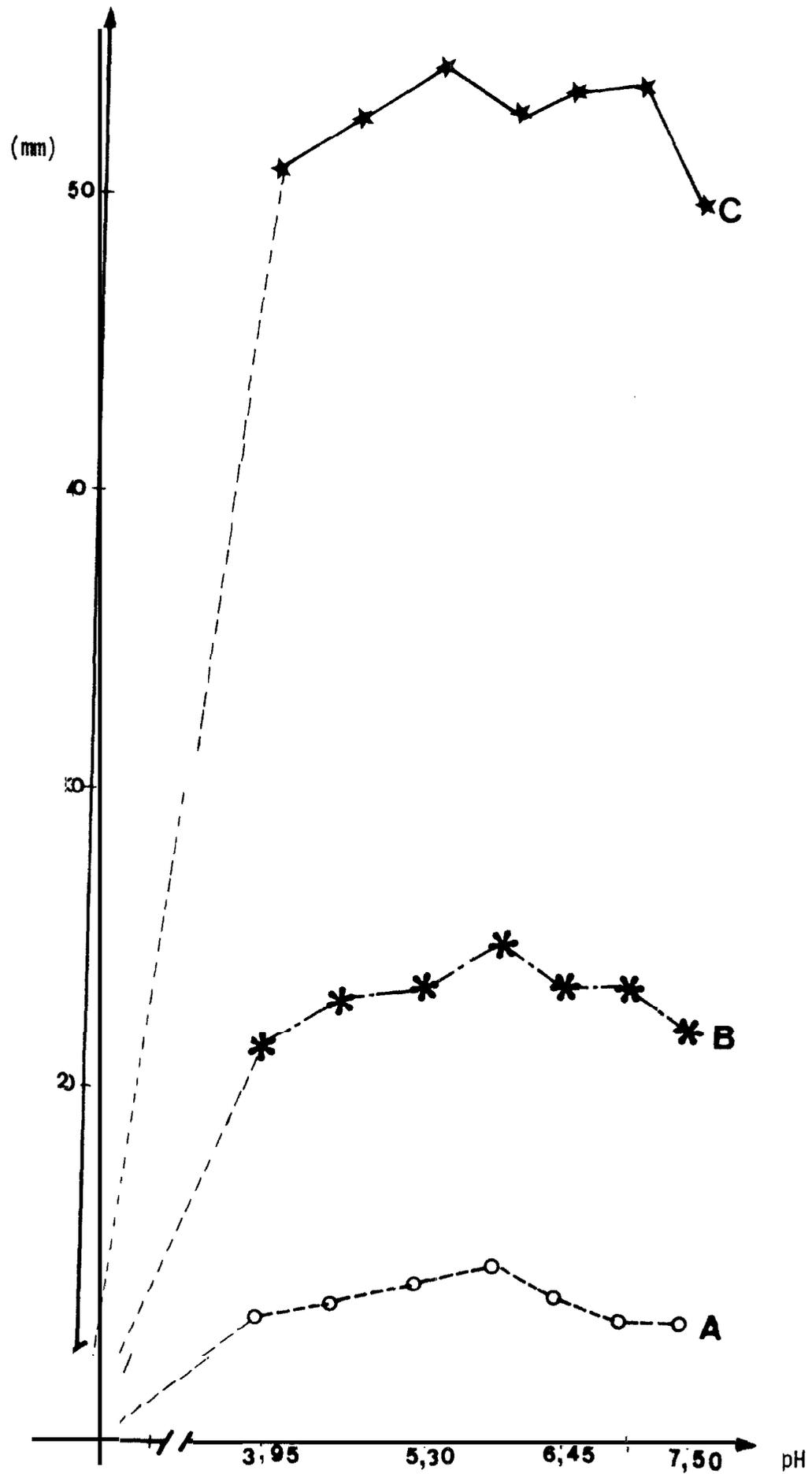


Fig. 7 - *P. oryzae* : Croissance radiale (mm) en fonction du pH ; PCA/25°C/obscurité ; A = âge de 2 jours ; B = 4 j ; C = 9 j.

lativement jeune, les poids observés tiennent bien entendu aux pH de base (3,95 ; 4,6 et 5,30) mais aussi aux effets certainement bénéfiques induits par les pH intermédiaires (aux 3^e, 4^e, 5^e et 6^e jours par exemple) ; par là nous voulions dire que l'accroissement pondéral observé n'était pas dû au SEUL effet du pH de base ; l'idéal serait d'avoir un tampon suffisamment STABLE pour TOUJOURS NEUTRALISER les variations éventuelles induites par le parasite.

Cette contrainte n'étant pas réalisée, il faudrait alors effectuer des mesures au moment où les modifications du milieu sont les moins perceptibles, c'est-à-dire au 3^e jour, peut être même après 48 ou 24 heures ; mais alors les valeurs observées sont tellement faibles que la marge d'erreur risquerait de conduire à des conclusions aberrantes.

La courbe (B) correspondant à une durée d'incubation de 18 jours traduit naturellement de manière plus prononcée les fluctuations du milieu ; néanmoins, son allure générale est conforme à la courbe précédente.

Nous observons qu'au 18^e jour, l'accroissement pondéral au point pH = 2,95 est presque le double (57,7 mg) de celui observé à la même abscisse au 7^e jour (24,1 mg) ; cela signifie que le pH 2,95 est hors de la bande optimale des pH puisqu'il faut au champignon un certain délai pour, qu'au terme d'une activité même faible, le pH de base soit REHAUSSE à une valeur compatible avec un meilleur épanouissement de son métabolisme.

Quant aux autres courbes traduisant la croissance en milieux liquides (C, D, E), elles ne sauraient à notre avis, représenter VALABLEMENT la dynamique du phénomène étudié.

En effet, au-delà d'un certain dge, en l'occurrence à l'âge 26, 37 et 41 jours il y aurait tellement de modifications (notamment du pH) que nous ne sommes plus assurés que toutes les manifestations observées dépendent seulement du pH.

Il faut 41 jours au parasite pour fabriquer 60,70 mg à partir du pH de base 2,35 alors qu'en 7 jours, il synthétise 60,13 et 62,73 mg pour les pH de base 3,95 et 4,60 respectivement, ce qui signifie en clair que le pH de 2,35 ne répond pas aux exigences du germe étudié.

1. 5. 2. 3 - Analyse des courbes traduisant le phénomène d'autolyse

La figure 5, établie à partir du tableau 5 traduit le phénomène d'autolyse ; ce **phénomène** serait d'autant plus précoce que le pH de base est voisin de la valeur optimale. Par exemple : à pH = 2,95 le phénomène de lyse mycélienne ne se manifeste qu'à partir du 18^e jour (environ) ; par contre, ce **phénomène** est déclenché dès le 7^e jour par les pH favorables de 3,95, 4,60, 5,30.

De même, l'autolyse mycélienne ne se manifeste qu'au delà du 41^e jour pour pH 2,35.

Ces courbes traduisent parfaitement la dynamique des cultures du parasite en fonction des délais d'incubation ; elles extériorisent 3 phases continues et successives :

• Première phase : la croissance mycélienne est supérieure à l'autolyse mycélienne ; la croissance mycélienne du parasite est alors très active au tout début de l'expérience ; le phénomène d'autolyse **apparaît** progressivement et tend à neutraliser l'accroissement pondéral dont la vitesse s'amenuise ; cette première phase correspond aux branches ascendantes des courbes.

• Deuxième phase : la croissance myclilienne égale l'autolyse mycélienne ; à mesure qu'augmente la durée d'incubation, le phénomène d'autolyse **s'intensifie** et parvient à équilibrer exactement l'**accroissement** pondéral ; la conjugaison de ces deux **phénomènes** se traduit par un maximum qui, très certainement, aurait correspondu à un plateau si nous avions pris le soin d'affiner autour du délai optimum d'incubation.

• Troisième phase : la croissance mycélienne devient inférieure (en valeur absolue) à l'autolyse mycélienne ; au fur et à mesure du vieillissement des cultures, l'autolyse augmente au point de devenir prééminente par rapport à l'**accroissement** pondéral ; la résultante **décroit** progressivement, ce qui correspond aux branches descendantes des courbes.

Toutes ces données confirment parfaitement les conclusions tirées de la figure 4.

1. 5. 2. 4 - Régulation du pH

La figure 6, matérialisant l'évolution du pH au cours du vieillisse-

ment révèle, qu'excepté pour le pH de 2,35, tous les autres tendent vers 8,20 à 8,30 au bout de 41 jours.

Cette évolution s'expliquerait par l'activité du champignon, la preuve nous en est fournie par le fait que pour un pH très bas (2,35) où l'activité du parasite est **très** réduite, nous observons corrélativement une **très** faible variation du pH. Cette hypothèse est conforme aux conclusions établies par LILLY et BARNETT (1951) qui **expliquèrent** le **phénomène considéré** à partir du métabolisme du champignon : le parasite utiliserait des **anions** et **cations** pour fabriquer et excréter dans le milieu des composés acides ou basiques (édifiés respectivement par utilisation de glucides et d'acides aminés). Ainsi au-delà d'une certaine date, le tampon ne parvient plus à s'opposer aux variations de pH imposées par le parasite.

C'est pourquoi, et en dépit de ce que nous avons soutenu par ailleurs, la plus grande fiabilité de la méthode pondérale, il nous semble que pour le facteur pli, la méthode radiale devrait fournir des résultats bien plus représentatifs à la condition que les mesures soient réalisées très précocement ; encore qu'on puisse nous opposer l'argument somme toute logique de l'accumulation des produits excrétés par le parasite faute de migration possible sur un substrat gélosé.

1.5.2.5 - Croissance radiale du parasite en fonction du pH

S'agissant de la croissance radiale en fonction du pH (cf figure 7), la **précocité** des mesures suppose par exemple qu'au bout de 48 heures, le pH du milieu soit **très** peu différent de ce qu'il était le jour de l'inoculation ; si cette hypothèse est vraie, le pH 5,95 serait le meilleur pour la croissance **mycélienne** ; la bande des pH observés en liquide s'expliquant par l'activité du champignon qui rehausse **très tôt** les valeurs de 3,95, 5,30, vers cette valeur optimale.

II - PARAMETRES DE LA CONIDIOGENESE DE *P. oryzae*

De nombreux facteurs (température, humidité relative, lumière, période d'incubation, nombre de repiquages, nature des substrats nutritifs, etc...) influent sur la production d'organes de reproduction.

Ainsi par exemple, la production de conidies **à** partir de lésions **foliaires** n'a lieu que par une humidité relative de 93 % ou plus ; on observe par ailleurs une corrélation positive entre vitesse de sporulation et élévation de **l'humidité** relative (tout au moins dans certaines limites bien précises de l'humidité relative).

De **même**, des feuilles sur pied porteuses de lésions placées **à** 100 % **d'humidité** relative émettent des conidies pendant la seule période nocturne ; l'émission débute peu de temps **après** la chute du jour, atteint un maximum en quelques heures et **décroit** lentement pour **s'arrêter à** l'aube.

Il semble que l'alternance obscurité-lumière soit nécessaire.

Dans ce paragraphe, nous nous proposons de tenter une approche de la conidiogénèse en relation avec le milieu nutritif, la température, le pH. C'est en considérant conjointement les aspects trophiques et ceux ayant trait **à** la conidiogénèse que nous parviendrons **à** appréhender les **critères** de choix des conditions des cultures.

Le principe d'appréciation de la conidiogénèse sera le suivant :

- pour les cultures en milieu liquide-, nous ajoutons **à** la culture (en erlenmeyer) une vingtaine de billes de verre, le bouchon de coton cardé est recouvert de papier d'aluminium ; l'homogénéisation est obtenue après 2 minutes d'agitation vigoureuse ; l'évaluation de la concentration conidienne se **fait** alors **à** l'aide de **l'hématimètre** de MALASSEZ,

- pour les cultures en milieu solide, 4 rondelles **sont** prélevées par **boîte** de Petri **à** l'aide d'un **emporte-pièce** de **diamètre** intérieur égal **à** 13 mm. Pour un essai donné (un pH par exemple), 4 x 5 échantillons sont ainsi **prélevés** et placés dans un erlenmeyer renfermant une vingtaine de billes de verre ainsi que 10 ml d'eau distillée. La **détermination** de la concentration **conidienne** est réalisée **comme précédemment**.

Remarque : en raison des méthodes différentes de mise en suspension des **conidies**, aucune comparaison directe n'est valable entre les chiffres obtenus pour les milieux solide et **liquide**.

On devrait cependant, en interprétant isolément chacun de ces résultats, aboutir **à** une **même** conclusion pour un paramètre donné.

2.1 ▪ Influence du milieu sur la conidiogénèse

2.1.1 ▪ Précocité de la sporulation

On sait depuis longtemps (cf KREBS cité par BERDUCOU : thèse, 1957) que, de façon générale, les conditions favorables à une **croissance** luxuriante sont quelque peu défavorables à la prolifération d'organes de fructification ; par contre la **dessiccation** des cultures, les variations subites de température, l'appauvrissement du substrat sont autant de conditions favorisant le phénomène de sporulation.

Certains milieux, par leur composition **même**, sont plus favorables à la conidiogénèse que d'autres ; ainsi, le milieu modifié de GOTO (20 g de grains d'orge lavés ; 1 g de feuilles de riz hachées ; 20 ml d'eau distillée stérile dans un erlen de 250 ml) induirait une très bonne sporulation en 3 ou 4 jours.

Le choix des milieux pour les essais concernés a porté sur le PCA, le PDA, le MISATO 6.5/AGAR, l'ORGEOSE/A.

- La sporulation sur PCA et MISATO 6.5 a été excellente dès le 5e jour d'incubation à 25°C.

- Sur ORGEOSE, la croissance est luxuriante et parallèlement les organes de fructification ne se manifestent que très tardivement vers le 12e jour.

- Sur PDA, 4 zones concentriques ont été examinées :

- les deux zones centrales et la région marginale (déjà décrite au 2e chapitre) sont toutes trois exemptes de conidies,

- seule la 3e zone (bordant intérieurement la bande externe) révèle des conidies vers le 12e jour.

2.1.2 ▪ Caractéristiques des conidies en fonction du milieu

Les résultats suivants ont été observés sur PCA, MISATO 6.5, ORGEOSE.

Milieux / Evaluations	PCA	MISATO 6.5	ORGEOSE
Longueur moyenne des conidies (micron)	24,39 (\pm 0,48)	23,19 (\pm 0,42)	21,40 (\pm 0,37)
Largeur moyenne des conidies (micron)	8,96 (\pm 0,19)	9,07 (\pm 0,17)	8,71 (\pm 0,17)
Nb de conidies unicellulaires	2	0	0
Nb de conidies bicellulaires	2	1	1
Nb de conidies à 3 cellules	96	99	99
Nb de conidies à plus de 3 cellules	0	0	0
Nombre total de conidies examinées	100	100	100

Tableau 8 - *P. oryzae* : dimensions moyennes et cloisonnement des conidies en fonction du milieu ; 25°/obscurité continue ; les valeurs entre parenthèses désignent les intervalles de confiance.

2.2 - Influence de la température sur la conidiogénèse

La **gamme** des températures compatibles avec la conidiogénèse serait comprise entre 10-15° et 35°C ; l'optimum thermique étant de 28°C. Cependant, le rythme de la **conidiogénèse** est fonction de la température ; ainsi à 28°C, l'**émission** des conidies est **très** rapide jusqu'au 9e jour seulement ; par contre, à 16°, 20° et 24° cette émission se poursuit **même au-delà** du 15e jour (HENRY et ANDERSON, 1948). La température **létale** des conidies est de 50°C en 13 à 15 mn dans l'eau ; cependant, certaines conidies survivent 30 heures à 60°C lorsque l'environnement est sec (SUEDA, 1928).

Les températures expérimentales choisies sont : 10,5°, 15°, 17°, 25° et 30°.

Le diamètre **intérieur** de l'**emporte-pièce** utilisé est de 6 mm.

L'inoculum utilise provient de la variété 302 G, il est dgé de 15 jours à 25°C sur PCA.

Les essais ont fourni les résultats suivants après 9 jours d'incubation.

Températures Evaluations	10,5°	15°	17"	20"	25"	30"
Précocité de la sporulation	9e jour	9e jour	6e jour	6e jour	5e jour	5e jour
Concentration conidienne/ml	4 333	17 000	17 333	89 000	156 333	206 666

Tableau 9 - *P. oryzae* : Précocité et intensité de la sporulation en fonction de la température ; PCA/obscurité continue.

L'expression graphique de ces **résultats (cf fig. 8)** permet de situer l'optimum thermique autour de 30°.

Nous nous posons ici la question de savoir quelle serait l'influence -si influence il y a- du transfert subit de l'inoculum de 25° vers les autres températures ?

N'y a-t-il pas eu au cours de ce transfert un choc thermique qui s'ajoute à l'effet direct de la température de 10,5° ; 15° ; 17° ; 20° et 30° ?

2.3 - Influence du pH sur la conidiogénèse

2.3.1 - Sur la précocité de la conidiogénèse

pH	2,35	2,95	3,95	4,60	5,30	5,95	6,45	7,00	7,50
le observation de la conidiogénèse	GELOSE NON SOLIDIFIEE		8e j	6e j					

Tableau 10 - *P. oryzae* : **précocité** de la sporulation en fonction du pH/PCA/25°/obscurité continue.

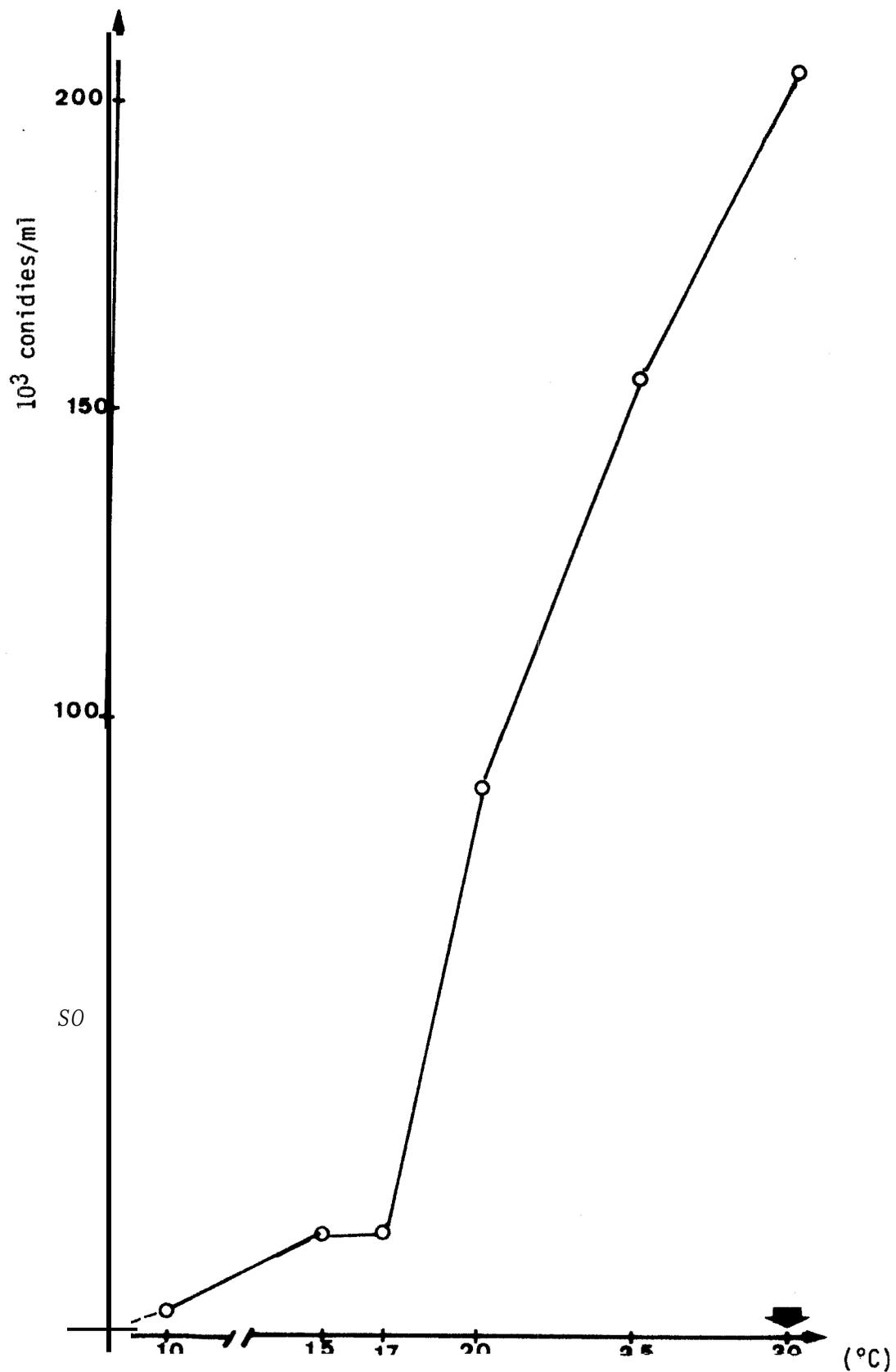


Fig. 8 - *P. oryzae* : Intensité de la conidiogénèse (milliers de conidies/ml) en fonction de la température ; PCA/âge = 9 j/obscurité.

2.3.2 - Intensité de la conidiogénèse en fonction du pH

Milieu \ pH	2,35	2,95	3,95	4,60	5,30	5,95	6,45	7,00	7,50
PCA	GELOSE NON SOLIDIFIEE		60 666	157 666	183 666	234 000	154 000	97 000	50 666
PC	0	666	432 333	389 333	350 000	124 333	162 000	110 000	49 666
Devenir du pH après 16 jours	2,33	4,20	7,50	7,70	7,90	7,85	7,85	8,10	8,20

Tableau 11 - *P. oryzae* : intensité de la conidiogénèse (exprimée en nombre de conidies/ml) en fonction du pH à 25°C après 16 jours d'incubation

En milieu solide, les valeurs adéquates de pH se situent entre 4,60 et 5,95 (cf fig. 9, courbe A). Par contre, les résultats obtenus en milieu liquide (cf fig. 9, courbe B) situent cette bande entre 3,95 et 5,30. Enfin, compte-tenu de l'évolution des pH de base que nous avons évoquée au début de ce chapitre et que nous retrouvons **naturellement** ici (cf devenir du pH après 16 jours : tableau 11), il serait normal que nous décalions la bande jugée convenable vers les pH **révélés** par l'essai sur PCA ; en effet, nous devrions pour interpréter, tenir compte du fait que la valeur de 432 333 conidies (pour le pH de base 3,95) serait partiellement imputable à une action du parasite qui élève ce pH pour les raisons déjà évoquées.

2.3.3 - Caractères des conidies en fonction du pH

Nous nous proposons de voir si les divers pH induisaient une **variation** significative dans les dimensions des conidies.

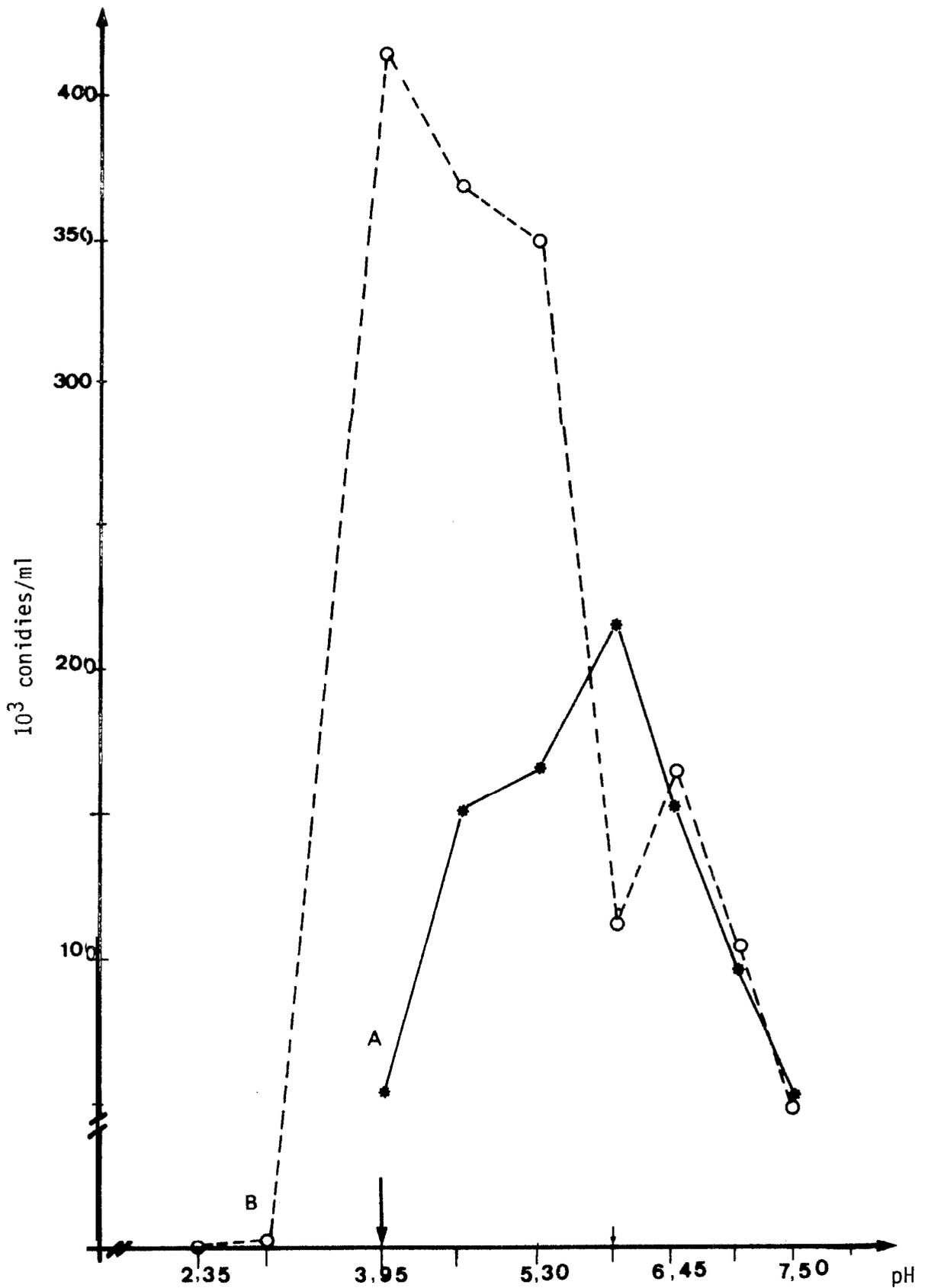


Fig. 9 - *P. oryzae* : Intensité de la conidiogénèse (milliers de conidies/ml) en fonction du pH ; 25°C/âge = 16 j/obscurité ; A = PCA ; B = PC.

Paramètres observés \ pH	3,95	4,60	5,95	6,45	7,00	7,50
Longueur (micron)	23,40 (± 0,54)	23,36 (± 0,61)	23,23 (± 0,55)	22,77 (± 0,68)	22,72 (± 0,73)	20,40 (± 0,65)
Largeur (micron)	9,11 (± 0,17)	8,80 (± 0,41)	9,25 (± 0,18)	9,13 (± 0,19)	9,03 (± 0,18)	8,82 (± 0,16)
Nb de conidies unicellulaires	0	0	0	0	0	0
Nb de conidies bicellulaires	0	0	0	0	0	0
Nb de conidies tricellulaires	50	50	50	50	50	50
Nb de conidies à plus de 3 cellules	0	0	0	0	0	0
Total conidies examinées	50	50	50	50	50	50

Tableau 12 - *P. oryzae* : dimensions moyennes et cloisonnement des conidies en fonction du pH ; culture sur PCA tamponné, dgée de 8 jours, à 25°C/obscurité continue.

NB - Les valeurs entre parenthèses désignent les intervalles de confiance

Afin de cerner le type de liaison établi entre dimensions des conidies de *P. oryzae* et pH initial du milieu de culture (PCA), nous avons évalué les paramètres de la régression considérée ; les valeurs observées sont les suivantes :

• par rapport à la longueur des conidies :

- le coefficient de régression observé est $r = -0,73$
- la pente de la droite de régression $m = -0,60$
- l'ordonnée à l'origine $b = +26,23$

Ces résultats révèlent une **régression** négative très significative [$r/ = 0,73$] voulant exprimer que la longueur des conidies de *P. oryzae* est inversement proportionnelle à la valeur des pH_0 (tampon Mc Ilvaine).

Conformément aux travaux de ALBERTINI et al. (1972) sur *Coryneum beijerinckii*, *C. cardinale*, *Helminthosporium teres*, *H. sativum* et dans la limite des pH compatibles avec une bonne croissance et une bonne sporulation, les conidies de *P. oryzae* sont d'autant plus longues que le pH_0 est bas ~~et~~ inversement.

quant à la régression éventuelle entre largeur des conidies et pH_0 , elle est à nos yeux peu significative puisque les valeurs observées sont :

$$r = -0,10 \qquad m = -0,10 \qquad b = +9,02$$

enfin, nous avons comparé par test statistique les longueurs moyennes des conidies à pH_0 3,95 et pH_0 7,50 (cf les valeurs extrêmes du tableau n° 12) ; nous trouvons :

$$t = 8,33 \text{ pour un } t_{0,05} = 2 \text{ au seuil de } 5 \%$$

La différence étant **très** hautement significative tant au seuil de 5 % qu'à celui de 1%, nous pouvons rejeter l'hypothèse nulle et postuler que le pH initial exerce une action significative sur la longueur des conidies de *P. oryzae*.

2. 3. 4 - Cinétique de la sporulation

Cette expérience réalisée en milieu liquide vise à déterminer la période optimale d'incubation pour une sporulation **maximum**.

Le milieu de base a été tamponné à pH = 5,30 ; l'incubation a eu lieu à 25°C.

Périodes d'incubation (j)	5	7	14	18	26
Nombre de conidies par ml	13 333	124 000	471 666	227 333	253 000
Devenir du pH de base	5,95	6,70	7,60	8,00	8,20

Tableau 13 - *P. oryzae* : cinétique de la conidiogénèse ; PCA/25°C/ pH_0 5,30.

La période optimale d'incubation à 25°C pour un pH de base à 5,30 serait de 14 jours environ.

III - PROBLEMES RELATIFS A LA GERMINATION DES CONIDIES

Les spores sont des **structures** microscopiques spécialisées, autonomes et pouvant initier une croissance nouvelle ; toute intervention écologique ou visant à cerner le spectre de répartition de germes économiquement importants devra, sous peine d'inefficacité, tenir compte de la germination des spores.

La germination quant à elle sera définie comme un processus dans lequel partie ou totalité des métabolites nécessaires sont présents *ab initio* dans l'organe considéré ; c'est dans la nature qualitative et quantitative de ces réserves que réside le degré de dépendance de la spore en germination **vis-à-vis** des **métabolites** exogènes.

Outre cet aspect trophique, ce phénomène physiologique **est fonction** de **paramètres** divers tels par exemple la température, le pH, l'oxygène, la concentration conidienne, etc....

La turgescence des spores par exemple (donc la présence d'eau) **paraît** être une règle générale ; elle a été observée et décrite pour les **sporangiophores** (BULLER, 1934), les **ascospores** (GWYNNE-VAUGHAN et WILLIAMSON, 1927), les **basidiospores** (HESSE, 1876 ; BRODIE, 1936) et les **conidies** (BONNER, 1948 ; GOTTLIEB, 1953 ; HAINES, 1930 ; MANDELS et DARBY, 1953 ; SÖRGEL, 1956 ; YARWOD, 1932 ; etc...). Il faudrait remarquer que les conidies des **oidium** ne s'hydratent pas avant germination et constituent l'exception à la règle générale universellement admise ("Water and germination" par V.W. COCHRANE in "Physiology of Fungi", 1958). De plus, il arrive que des spores morphologiquement normales ne germent qu'après une certaine période ; de telles spores seraient en phase soit de maturation (ladite période est alors relativement brève), soit de **dormance** (plusieurs semaines à plusieurs mois) ; le taux de germination pouvant varier en conséquence, chaque expérience réalisée ici sera analysée par rapport à un témoin **fraîchement** établi à partir de la même suspension conidienne.

Enfin, le phénomène physiologique qu'est la germination révèle trois manifestations successives :

- la turgescence,
- la division nucléaire (BAKER, 1945 ; BELLINGER, 1956),
- l'émission du tube germinatif.

Sous peine de demeurer partielle, notre **interprétation** devra tenir compte du taux global de germination et de la dimension du tube mycélien qui, d'une certaine façon, visualise la cinétique du phénomène.

Nous nous limiterons dans ce qui suit à l'étude de la germination des conidies de *P. oryzae* en fonction de la concentration conidienne, de la température, de la lumière et du pH.

N. B. : "BAIN D'ARRET" : au bout du délai fixe d'incubation (5 heures), nous stoppons l'évolution de la germination ainsi que le développement des tubes **mycéliens** par addition de 2 gouttes d'acide acétique concentré ou de formol.

3.1 - Germination en relation avec la concentration conidienne :
Résultats. exoression. discussion

Caractères observés	Nombre conidies par ml	490 000	245 080	122 500	61 250	30 125
	Germination	%	45	61,66	75,77	66
	Nombre de conidies	300	300	300	300	300
Longueur tube mycélien (microns)		66,64	80,08	86,38	83,15	85,68
Nombre de tubes mesurés		79	75	75	75	75

Tableau 14 - Influence de la concentration conidienne sur la germination des conidies de *P. oryzae* ; expérience réalisée à 25° / **obscurité totale/durée** d'incubation de 5 heures.

NB - Chaque pourcentage indiqué est une moyenne entre 3 mesures isolées effectuées à partir de 3 lames à concavité différentes.

Nous constatons (cf tableau 14) que le taux de germination ainsi que la longueur du tube germinatif sont plus élevés (75,77 % et 80,08 microns respectivement) pour la concentration moyenne de 122 500 conidies/ml que pour celle très forte de 490 000 conidies/ml [les valeurs obtenues sont de 45 % et 66,64 microns respectivement] ; cette réduction, notée pour les concentrations conidiennes élevées tiendrait au phénomène d'auto-inhibition ou "SELF-INHIBITION" qui a été très étudiée chez *Uromyces phaseoli* (YARWOOD, 1954-1956), chez *Puccinia graminis tritici* (ALLEN, 1955) et *P. helianthi* (YARWOOD, 1956).

L'auto-inhibition, dont l'existence a été établie *in vivo* et *in vitro* tiendrait, par exemple chez *P. graminis tritici*, à l'intervention d'une substance thermostable, plus efficace à pH élevé et qui serait relativement inactivable par les surfaces de verre.

Pyricularia oryzae serait lui-même générateur d'une toxine appelée pyricularine et toxique vis-à-vis des conidies du parasite dont elle interdit la germination ; lorsqu'il infeste un hôte sensible, le parasite produit et accumule parallèlement de la pyricularine dont il se prémunit par la synthèse d'une "PYRICULARIN-BINDING PROTEIN" formant avec la toxine un complexe non toxique pour le champignon mais toxique pour le riz.

Au-delà de ce problème expérimental, l'auto-inhibition joue un rôle écologique essentiel en ce qu'elle réduit la germination des spores au niveau des fructifications ; les spores non germées sont plus résistantes aux agressions du milieu que ne le sont celles germées ; ce qui en fait les agents de dispersion par excellence.

3.2 - Germination des conidies en fonction de la température : résultats, expression, discussion

Température °C	5	11	15	20	25	30	40
Evaluations							
Germination (%)	4	5,33	31,70	88	90,66	85	0
Nb de conidies	300	300	300	300	300	300	300
Longueur tube germinatif (micron)	3,14	4,49	40,69	56,58	66,14	47,22	0
Nb de tubes mesurés	50	50	50	50	50	50	50

Tableau 15 • *P. oryzae* : germination des conidies en fonction de la température.

Remarque : les conidies ont été mises en suspension dans l'eau distillée à concentration de 47 600 conidies/ml ; la période d'incubation, égale pour toutes les températures, est de 5 heures.

Manifestement les très basses températures sont inadéquates pour la germination des conidies ; nous pouvons aussi postuler que les conidies placées à 40°C ont été tuées puisqu'en les reprenant pour les incuber à 25°C (qui semble proche de l'optimum thermique), il n'y a aucune modification, aucune évolution, même après 48 heures.

De plus nous observons une corrélation positive entre pourcentage de germination et longueur du tube mycélien ce qui paraît normal puisque le tube mycélien serait d'autant plus allongé que son émission est plus précoce.

3.3 - Germination des conidies en fonction du pH : résultats, expression discussion

pH tampon	2,40	4,60	5,45	6,75	8,10
Evaluations					
Nombre conidies germées	0	92	96	79	54
Nombre conidies non germées	100	8	4	21	46
Total	100	100	100	100	100
% germination	0	92	96	79	54
Longueur tube germinatif (30 conidies)		43,4 (± 2,9)	43,86 (± 6,5)	39,5 (± 5,72)	20,06 (± 2,63)
Nb tubes germinatifs avec appressorium pour 50 conidies	0/50	25/50	3/50	0/50	0/50

Tableau 16 - Germination des conidies de *P. oryzae* en fonction du pH ; mélange volume à volume de la suspension conidienne et du tampon Mc Ilvaine dans la lame à concavité ; incubation de 5 heures/25°C/obscurité.

De façon **générale**, les spores germent au sein d'une fourchette de pH plus restreinte que celle qui est caractéristique de la **croissance mycélienne** ; cela pourrait s'expliquer par le fait que les spores ne disposent pas d'un délai suffisant pour modifier par leurs dérivés **métaboliques** un milieu à pH de base peu favorable.

La plupart des germes cryptogamiques, dont *P. oryzae*, germent mieux entre pH 4,5 et pH 6,5 et présentent une réduction notable à pH 3 et pH 8.

3.4 - Germination des conidies en fonction de l'héméropériode : résultats, expression, discussion

Héméropériode / Evaluations	L	L + 0	0
Nb conidies germées	8	90	50
Nb conidies non germées	92	10	50
Total	100	100	100
% germination	8	90	50
Longueur tube mycélien (micron) Moyenne pour 30 conidies	16,80 (± 2,6) p.20 conidies	32,20 (± 3,6)	40,13 (± 493)

Tableau 17 - Germination des conidies de *P. oryzae* en fonction de l'héméropériode : L = 5 heures lumière ; L + 0 = 2 heures lumière + 3 heures obscurité ; 0 = 5 heures **obscurité** ; incubation à 25°.

La lumière continue semble peu favorable à la germination ; par contre, l'alternance lumineuse et l'obscurité continue induisent une bonne germination.

Discussion

Il est évident que des chapitres aussi importants que complexes tels les mécanismes agressifs (toxines, enzymes), les mécanismes de variation... du parasite **mériteraient d'être** abordés ou approfondis ; cependant, nous avons voulu nous en tenir à ce PREALABLE PROSPECTIF sur la base duquel nous en arrivons au **problème** crucial de la lutte contre le parasite.

De par son essence **même** (et à fortiori de par l'esprit qui le guide de nos jours), l'art qu'est l'agriculture est source de rupture des équilibres naturels ; ainsi, les modifications physico-chimiques du milieu, l'introduction de **cultivars** élaborés au point de **ne persister** qu'avec le secours de l'homme, le maintien des **mêmes** génotypes dans une **même** aire géographique, le retour d'une culture sur **elle-même** pendant plusieurs **années**, l'usage abusif de pesticides, etc..., s'ils assurent une meilleure production à court terme, n'en engendrent pas moins de graves problèmes si l'on en juge par l'équilibre instable des relations **hôte-parasite** nouvellement établies **après** intervention de l'homme : l'exemple du riz et du *Pyricularia oryzae* est à ce propos édifiant ; dans la suite de cet ouvrage, nous voudrions aborder le problème de **l'eradication** du parasite ou mieux, celui du maintien de ce dernier en-dessous d'un seuil économiquement tolérable par le biais d'auxiliaires naturels.

2ÈME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETABLISSEMENT D'UNE
METHODE DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE
Pyricularia oryzae Cav.

Les systèmes foliaire et **radiculaire**, ainsi que les milieux associés (**phyllosphère** et rhizosphère respectivement) sont le **siège** d'une population baptisée spermoflore et dont le **rôle** et la nature sont des plus variables.

Certains de ces germes sont parasites actifs, d'autres saprophytes vrais, d'autres encore sont dits **symbiotiques**.

Quant à la composition qualitative et quantitative de la microflore saprophyte, elle varie suivant l'espèce de **végétal** (KERLING, 1964), l'**âge** des feuilles (DICKINSON, 1967), la température, l'**héméroperiode** et l'humidité **relative** qui est **particulièrement** importante.

La microflore caractéristique de la rhizosphère serait relativement plus stable que celle de la phyllosphère soumise à de fréquentes fluctuations du milieu.

La population microbienne foliaire serait en outre liée au stade **physiologique** de la plante **hôte** ; ainsi, l'activité maximale serait observée pendant la période de floraison en raison d'un apport de grains de pollen (FOKKEMA, 1968, 1971 ; DIEM, 1970).

La connaissance de la biologie, du **rôle** et des potentialités des germes foliaires exige **comme préalable** l'isolement et l'établissement de cultures pures et **monosporées** des germes considérés (cf annexe technique n° 4).

Nous **savons** qu'au cours de la phase infectieuse (ou après une blessure), le végétal peut manifester une réaction de **résistance** par le biais d'**inhibiteurs** préexistants et connus sous le terme de phytoncides.

Nous savons également que suite à l'infection, l'**hôte** peut fabriquer "de **novo**" des substances (phytoalexines) inhibitrices **à l'endroit** du germe **exogène**.

Au-delà de ces observations, force nous est de constater que dans la diversité de la flore fongique, il existe des espèces souvent banales qui, de par leur comportement (hyperparasites de **germes phytopathogènes** ou producteurs de toxines antifongiques), permettent d'envisager une forme de lutte biologique.

D'un autre **côté**, l'implication de la mycoflore dans la technologie alimentaire (fromages et fermentations diverses), le large spectre d'utilisation

des antibiotiques tels la pénicilline, la streptomycine, la tyrothricine (élaborés par *Penicillium notatum*, *Streptomyces griseus* et *Bacillus brevis* respectivement), la blasticidine S (produite par *Streptomyces griseo-chromogenes* FUKUNAGA), témoignent de l'intérêt considérable porté aux générateurs de tels produits).

L'utilisation d'auxiliaires microbiens dans la lutte contre les maladies est des plus diverses :

- activités antibactériennes des champignons,
- action antifongique de certains champignons,
- effets des bactéries et actinomycètes sur les champignons,
- champignons entomophages,
- particules virales destructrices de certains champignons,
- bactériophages, etc....

Nous nous bornerons ici à examiner quelques exemples permettant de cerner l'état actuel des recherches traitant des champignons mycoparasites :

- Des feuilles de riz préalablement inoculées par une race avirulente de *Cochliobolus miyabeanus* (forme parfaite de *Helminthosporium oryzae*) sont moins sujettes à l'infection par une race phytopathogène du germe (SINHA et TRIVEDI, 1969).

- Selon les travaux de Mc LEAN (1967), DEVERALL et al. (1968), l'infection des feuilles de melon ou de fève par des races virulentes de *Colletotrichum orbiculare* et *C. lindemuthianum* respectivement est moins grave si elle est précédée par l'inoculation par une race avirulente des germes correspondants.

- De même, on observe une réduction notable des urédospores de *Melampsora occidentalis* par *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Aspergillus spp* qui sont autant de germes communément présents sur les feuilles de peuplier ; la germination des urédospores semble très affectée *in vitro* (BIER, 1965).

- Enfin, les plants de riz développés à partir de semences trempées dans un extrait de culture d'*Helminthosporium oryzae* BREDA de HAAN, manifestent une meilleure résistance que ceux issus de semences non traitées (GANGLY et PADMANABHAN, 1962).

De nombreuses recherches permettent désormais d'affirmer que la présence d'une microflore naturelle, notamment sur les parties aériennes telles que

les fleurs, les fruits, les feuilles, les tiges, engendrerait un milieu **fon-**
gistique vis-a-vis de certains agents phytopathogènes.

Des études approfondies expliquent l'antagonisme *in vitro* soit par un **phénomène** de **mycoparasitisme**, soit enfin par l'implication de substances antibiotiques inhibitrices : FAWCETT (1931), PORTER et CARTER (1938), WAKSMAN (1945), WEINDING et al. (1950), WOOD et TVEIT (1955), DARPOUX (1960), BARNETT (1963, 1964), BOOSALIS (1964) et TOUZE-SOULET (1967).

Dès lors, toute intervention pouvant altérer qualitativement **et/ou** quantitativement la population microbienne du biotope (traitement pesticide **notamment**) devra **être** soigneusement dosée :

- Nous savons par exemple que, lorsqu'un sol **préalablement stérilisé** est recontaminé par certains parasites telluriques (germes occasionnant la fonte des semis en l'**occurrence**), les **symptômes** morbides observés sont plus prononcés que sur un sol non stérilisé au niveau duquel le parasite se trouve neutralisé par les microorganismes antagonistes (LILIAN E. HAWKER, 1950).

- Des feuilles de seigle porteuses de **densités** variables de germes saprophytes (pulvérisation soit par l'eau, soit par une solution de bénomyl) sont soumises **à** une infection par *C. miyabeanus* juste avant floraison ; on remarque que les échantillons préalablement pulvérisés par l'eau présentaient une quantité de **nécroses** inférieure de 60 % **à** ceux **prétraités** par le bénomyl ; dans cet essai, réalisé en 1972-1973 en parcelle expérimentale, le fongicide avait détruit la microflore saprophyte normalement antagoniste du parasite (FOKKEMA, VAN DE LAAR, NELIS-BLOMBERG et SCHIPPER, 1975).

La présente étude vise **à** révéler ***in vitro*** les aptitudes des **micro-**organismes épiphytes **à** s'opposer **à** l'infection du riz par *Pyricularia oryzae* et **à** en dégager le mécanisme ; l'isolement et la caractérisation des produits impliqués ainsi que les expérimentations ***in vivo*** retiendront notre attention **au-**
delà de notre cadre actuel de travail.

Du reste, avant d'expérimenter *in vivo* (sur l'**hôte** ou les organes de l'**hôte** maintenus en survie), il n'est pas inutile d'opérer *in vitro* où les conditions de croissance sont **à priori** plus favorables que celles offertes par l'**hôte** dans son milieu naturel.

Les investigations actuelles distinguent le parasitisme (par exemple

le mycélium de *Trichoderma* s'enroule autour des **hyphes** de *Rhizoctonia solani*), de l'antagonisme (où l'agent auxiliaire intervient à distance par le biais de substances inhibitrices diffusibles) et du **phénomène conjugant** les deux **prédé-**
dents.

Nous parlerons d'ANTAGONISME pour désigner **indifféremment** l'un quelconque de **ces trois** aspects ; souvent **d'ailleurs**, les phénomènes que nous avons observés traduisent l'interférence entre **parasitisme** de contact et antagonisme avec **prédominance** de l'un ou de l'autre selon les conditions expérimentales.

Les composantes de cette deuxième partie seront abordées dans l'ordre qui suit :

- Définition du matériel biologique et criblage sélectif des germes saprophytes.
 - Mise en évidence du phénomène d'antagonisme *in vitro*.
 - Essai d'interprétation du phénomène d'antagonisme.
 - Action de quelques fongicides comparée à celle des germes antagonistes.
-

CHAPITRE PREMIER

DEFINITION DU MATERIEL BIOLOGIQUE ET CRIBLAGE SELECTIF DES GERMES SAPROPHYTES

I - GERMES CRYPTOGRAMIQUES

1.1 - *Pyricularia oryzae* Cav.

Nous pouvons le **caractériser** par la formule globale $Se_1 302 G (N) H_2ODS$ exprimant qu'il s'agit de la souche n° 1 de *P. oryzae* isolée à partir de fragments infectés du cou (N = NECK) de la **variété Sefa 302 G** et incubés sur papier filtre stérile inhibé d'eau distillée stérile (H_2ODS).

1.2 - Germes saprophytes isolés à partir du riz

La microflore concernée est isolée à partir des 4 hôtes suivants :

- BOUAKE P11
- variété Se 302 G
- variété IKONG PAO ou IKP
- variété TTW

Pour chacun des organes (graine, cou, feuille) des variétés **précitées**, les méthodes d'isolement utilisées (lavage, impression, observation directe avec ou sans désinfection) sont consignées dans l'annexe technique n° 4 figurant à la fin de cet ouvrage.

Afin de matérialiser la variété **hôte** d'origine ainsi que la **réparti-**

tion des germes isolés selon les organes de l'hôte et en fonction des techniques d'isolement, nous formulons les résultats sous forme de tableau à triple entrée (cf tableau 18).

1.3 - Germes fournis par BAARN

- *Alternaria dauci* (KÜHN) GROVES et SKOLKO
- *Aureobasidium pullulans* (DE BARY) ARNAUD
- *Chaetomium globosum* KUNZE ex FR.
- *Epicoccum purpurascens* EHRENB. ex SCHLECHT. (Extra)
- *Epicoccum purpurascens* EHRENB. ex SCHLECHT. (*E. oryzae* souche ITO)
- *Gliocladium roseum* (LINK) BAIN
- *Gonatobotrys simplex* CORDA
- *Gonatobotryum maculicolum* (WINT.) SACC.
- *Myrothecium verrucaria* (ALB. et SCHW.)
- *Penicillium frequentans* WESLING
- *Pyricularia oryzae* CAVARA
- *Trichoderma viride* PERS. ex S. F. GRAY

Tous ces germes cryptogamiques ainsi que *Coniothyrium minutans* sont reproduits sur PCA/25°/obscurité continue,

II - CRIBLAGE SELECTIF EN VUE DU CHOIX DES GERMES UTILISABLES DANS UNE PERSPECTIVE DE LUTTE BIOLOGIQUE (Planche n° 1)

Disposant ainsi d'une série de germes, nous nous proposons d'en révéler l'activité antagoniste éventuelle sur la base du degré d'inhibition de la croissance mycélienne radiale du parasite. Ne sont retenus au travers de ce criblage sélectif que les germes exerçant une inhibition jugée significative et qui serviront de base pour une étude mieux approfondie.

Dans cette première étape, seul le parasite est issu d'une culture monoconidienne.

Au moment du criblage sélectif, tous les germes y compris *P. oryzae* avaient évolué pendant 7 jours à 25°C, sur PCA et à l'obscurité continue.

La confrontation se fait par inoculation simultanée d'un disque

Organes Hôtes	cou	Feuille	Grain	Organes Technique! isolément
BOUAKE P 11	<i>Streptomyces sp</i>	<i>Streptomyces sp</i> <i>Curvularia lunata</i>	-	l = Impression
	<i>Fusarium</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Botrytis</i> <i>Verticillium</i>	-	O.D. = Observation directe : 1 heure agitation dans H ₂ O ₂ + séchage
	<i>Curvularia clavata</i>	-	<i>Curvularia lunata</i> <i>Helminthosporium</i>	O.D.D. = observat. directe après désinfection par hypochlorite de sodium, 10 % pdt 7 mn
	<i>Aspergillus niger</i> <i>Curvularia clavata</i>	-	-	L = lavage dans H ₂ O ₂
KONG- PAO	<i>Streptomyces sp</i>	<i>Streptomyces sp</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Gliocladium X₄</i>	-	l
	<i>Aspergillus flavus</i> AX ₁ (?) <i>Curvularia</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i> <i>Streptomyces</i>	-	AX ₂ (?) <i>Fusarium roseum</i> <i>Streptomyces</i>	O.D.
	<i>Fusarium</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Ramularia</i>	-	<i>Curvularia lunata</i> <i>Fusarium roseum</i> <i>Helminthosporium</i> <i>Pyricularia oryzae</i> (HgCl ₂)	O.D.D.
	-	-	-	L
SEFA 302 G	-	-	-	l
	<i>Botrytis</i> <i>Fusarium</i> <i>Drechslera rostrata</i> <i>Pyricularia oryzae</i> <i>Starkeyomyces</i> <i>koorchalomoides</i>	-	-	O.D.
	-	-	-	O.D.D.
	-	-	-	L
TTW	-	-	-	l
	-	-	<i>Rhizopus nigricans</i>	O.D.
	-	-	-	O.D.D.
	-	-	-	L

Tableau 1.8 - Germes cryptogamiques isolés à partir de 4 variétés de riz.

inoculum du parasite à 30 mm du disque **représentant** le germe teste ; les deux rondelles étant disposées symétriquement par rapport au centre de la **boîte** de Petri (cf annexe technique n° 5).

Enfin, l'appréciation du pourcentage d'inhibition de la croissance radiale du parasite par le microorganisme testé est basée sur la relation (VAN DEN HEUVEL, 1970) :

$$M_i = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100 \quad \text{avec}$$

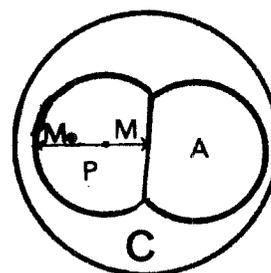
M_0 = croissance normale exprimée en mm ; M_0 représente le rayon opposé à la colonie du germe testé.

M = croissance mycélienne influencée (mm)

M_i = pourcentage d'inhibition de la croissance **mycélienne** du parasite par le germe testé.

L'ensemble des résultats figure dans le tableau 19.

Au terme des confrontations, nous observons diverses conformations qu'illustre le schéma théorique ci-contre :

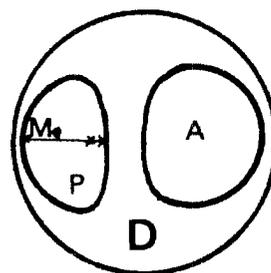


P = colonie du parasite

A = colonie du germe dont on recherche le **caractère** antagoniste

M_0 = croissance radiale (mm) **distale** de la colonie parasite ($M_0 = R$)

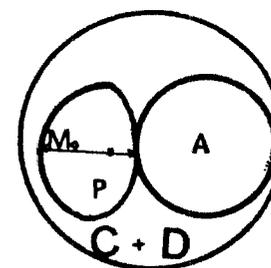
M = croissance radiale (mm) **proximale** de la colonie parasite ($M = r$)



(C) = action par contact

(D) = action à distance

(D) + (C) = action à distance et par contact



Germes confrontés avec <i>P₁</i> . <i>oryzae</i>	M ₀ (mm)	M (mm)	M _i (%)	Remarques
<i>Chaetomium globosum</i>	20,0	8,0	60,0	<u>Action nette à distance</u>
<i>Epicoccum purpurascens</i> ITO	21,0	15,0	28,5	Limitat. mutuelle par contact
<i>Gliocladium rosewn</i>	21,0	15,0	28,5	Idem
<i>Alternaria dauci</i>	20,0	13,0	35,0	Idem
<i>Epicoccum purpurascens</i> Extra	21,0	15,0	28,5	Idem
<i>Aureobasidium pullulans</i>	22,0	19,0	13,6	Idem
<i>Gonatobotryum maculicolum</i>	22,0	18,0	18,0	Idem
<i>Myrothecium verrucaria</i>	21,0	13,0	38,0	<u>Action nette à distance</u>
<i>Trichoderma viride</i>	22,0	9,0	59,0	<u>Action nette et enveloppement du parasite</u>
<i>Gonatobotrys simplex</i>	22,0	12,0	45,4	Limitation nette par contact + action inverse de 51 %
<i>Penicillium frequen tans</i>	19,0	17,0	10,5	Limitat. mut. par contact
<i>Aspergillus flavus</i>	18,0	13,0	27,8	
<i>Aspergillus niger</i>	20,0	12,0	-40,0	
<i>Curvularia clavata</i>	19,0	10,0	47,4	Action inverse de 46 %
<i>Curvularia luna ta</i>	20,0	10,0	50,0	Action inverse de 50 %
<i>Drechslera rostrata</i>	20,3	10,3	49,2	-
<i>Fusarium roseum</i>	19,0	13,0	31,6	Action inverse de 50 %
<i>Coniothyrium minitans</i>	19,0	15,0	21,0	Action inverse de 11,1%
<i>Gliocladium X₄</i>	19,0	14,0	26,3	Appréciation difficile car colonie dispersée
<i>Starkeyomyces koorchalomoïdes</i>	20,0	16,0	20,0	Croissance trop lente car pas contact en 7 j
Contrôle = Sel X 0	24,0	24,0	0,0	

Tableau 19 - *P. oryzae* : croissance radiale et inhibition de la croissance radiale par les germes cryptogamiques. Observations réalisées après incubation de 5 jours sur PCA/25°/12 heures lumière + 12 heures obscurité. Chaque valeur moyenne est établie à partir de 5 boîtes de Petri,

III - GERMES SELECTIONNES

A la **lumière** des résultats ci-dessus, nous nous sommes **arrêtés** aux trois germes suivants pour l'**étude** de ce type d'interaction :

- *Trichoderma viride* en raison du taux d'inhibition relativement important (59 %) exerce sur le parasite.
- *Chaetomium globosum* qui exerce un taux d'inhibition de 60 % est de plus responsable d'une action **à** distance et d'une action par contact.
- Enfin, *Myrothecium verrucaria* retiendra notre attention en raison d'une très nette action **à** distance.

Ces résultats appellent cependant quelques remarques, voire quelques restrictions : les trois germes sélectionnés l'ont **été** sur la base d'une expérience **in vitro** ; cela signifie que dans les conditions expérimentales (confrontation sur PCA, température de **25°C**, cycle lumineux **homophasique**), les germes retenus paraissent les plus intéressants ; rien ne laisse supposer que lesdits microorganismes manifestent une activité inhibitrice supérieure **à** celle des germes non sélectionnés au cours d'expériences **in vivo**, **prévues** ultérieurement et ce, en raison **même** de la nature 'complexe des interactions possibles entre la plante et le germe saprophyte ; interactions dont la nature peut engendrer des effets tout **à** fait différents de ceux observés **in vitro**.

CHAPITRE DEUXIEME

MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENE D'ANTAGONISME in vitro

I - PRELIMINAIRE

Les cultures pures établies peuvent, en fait, **être** chacune un mélange de plusieurs souches possédant chacune des **caractères** propres ; nous expérimenterons pour tous les germes sélectionnés (*P. oryzae*, *T. viride*, *C. globosum*, et *M. verrucaria*) à partir de cultures monospores afin de limiter au mieux les aleas inhérents au matériel biologique lorsqu'il est soumis à l'action des divers paramètres.

L'Établissement des cultures monoconidiennes se fait par examen microscopique en chambre de VAN TIEGHEM selon la technique utilisée dans la première partie pour *P. oryzae* (paragraphe intitulé "Méthode de la dilution **améliorée**").

Ainsi, nous avons pu disposer de :

- 7 cultures monoconidiennes de *T. viride*,
- 12 cultures monospores de *C. globosum*,
- 9 cultures monoconidiennes de *M. verrucaria*,
- le nombre de cultures monoconidiennes de *P. oryzae* étant de 18 dont 11 obtenues à partir de la **variété** Se 302 G et 7 de la **variété** IKP,

Dans la suite des travaux, nous utiliserons strictement :

- la souche n° 5 de *Trichoderma viride* **notée** *T*₅. *viride*,
- la souche n° 1 de *Chaetomium globosum* **notée** *C*₁. *viride*,

- la souche n° 1 de *Myrothecium verrucaria* notée *M₁. verrucaria*,
- le parasite étant représenté par la souche 1 utilisée dès le début de cet ouvrage et notée *Se₁* ou *P₁. oryzae*.

Par ailleurs, la largeur de la zone d'inhibition de *Se₁* ou le pourcentage d'inhibition de *Se₁* par le germe testé est fonction de la vigueur du germe et de celle du parasite ; cela veut dire qu'en fonction du substrat nutritif **gélifié**, de la température, de **l'héméroperiode**, du pH, etc..., le parasite aura plus ou moins le temps de se développer avant que "l'antagoniste" ne le contrarie soit à distance, soit par contact.

En bref, la largeur de la zone d'inhibition peut être affectée par un retard de la croissance de **l'isolat** "antagoniste" par rapport à *P. oryzae* et inversement ; d'où la nécessité d'étudier le comportement intrinsèque propre à chacun des microorganismes sélectionnés.

Il importe aussi de cerner quelque peu la biologie des germes choisis sur les plans trophique, thermique, lumineux, ainsi que l'influence du pH.

Nous avons simultanément réalisé **l'étude** du comportement des germes en fonction des paramètres précités.

1.1 - Comportement des germes en fonction de la température

Les températures retenues sont de 15, 20, 25, 28 et 37°C ; les cultures sont suivies jusqu'au **10e** jour ; les résultats sont consignés dans le tableau 20.

Remarques : - pour une température et un délai d'incubation donnés, \bar{x} désigne une moyenne de 3 valeurs moyennes ; chacune étant obtenue à partir de 2 mesures effectuées le long de 2 diamètres perpendiculaires pour la **boîte** de Petri **considérée**,

- tous les germes incubés à 37°C sont transférés à **25°/obscurité** au bout de 7 jours ; le but de ce transfert est de savoir si la température de 37°C est létale ou provoque simplement une inhibition réversible ; les résultats sont représentés par le tableau 21.

Age (j)	Germe (°C)	<i>P₁. oryzae</i>	<i>T₅. viride</i>	<i>C₁. g lobosum</i>	<i>M₁. verrucaria</i>
2	15	φ ₀	25,5	13,0	φ ₀
	20	10,0	25,0	15,0	10,0
	25	12,0	38,0	19,5	11,0
	28	15,0	12,0	21,0	14,3
	37	φ ₀	φ ₀	φ ₀	φ ₀
3	15	φ ₀	42,0	18,0	9,0
	20	16,0	43,0	24,0	13,0
	25	17,0	61,3	27,7	14,0
	28	21,0	16,0	29,3	18,7
	37	φ ₀	φ ₀	φ ₀	7,0
4	15	9,0	54,0	22,3	11,0
	20	19,0	60,0	30,0	17,0
	25	26,0	84,0	35,0	18,0
	28	28,0	19,0	35,0	25,0
	37	φ ₀	φ ₀	φ ₀	7,0
7	15	17,0		33,0	16,0
	20	32,0		51,0	26,0
	25	36,0	> 90	53,7	27,7
	28	49,0		50,0	40,5
	37	φ ₀		15,0	9,0
9	15	23,0		40,0	20,0
	20	41,0		63,0	32,0
	25	48,0	> 90	62,0	36,0
	28	64,0		58,0	53,0
	37	Transfert à 25°C	Transfert à 25°C	Transfert à 25°C	Transfert à 25°C
10	15	26,0		42,0	22,0
	20	48,0			35,0
	25	55,0	> 90	64,0	40,3
	28	72,0		63,0	58,0
	37	Transfert à 25°C	Transfert à 25°C	Transfert à 25°C	Transfert à 25°C

Tableau 20 - Croissance radiale (mm) de *P₁. oryzae*, *T₅. viride*, *C₁. globosum* et *M₁. verrucaria* en fonction de la température ; PCA/obscurité continue.

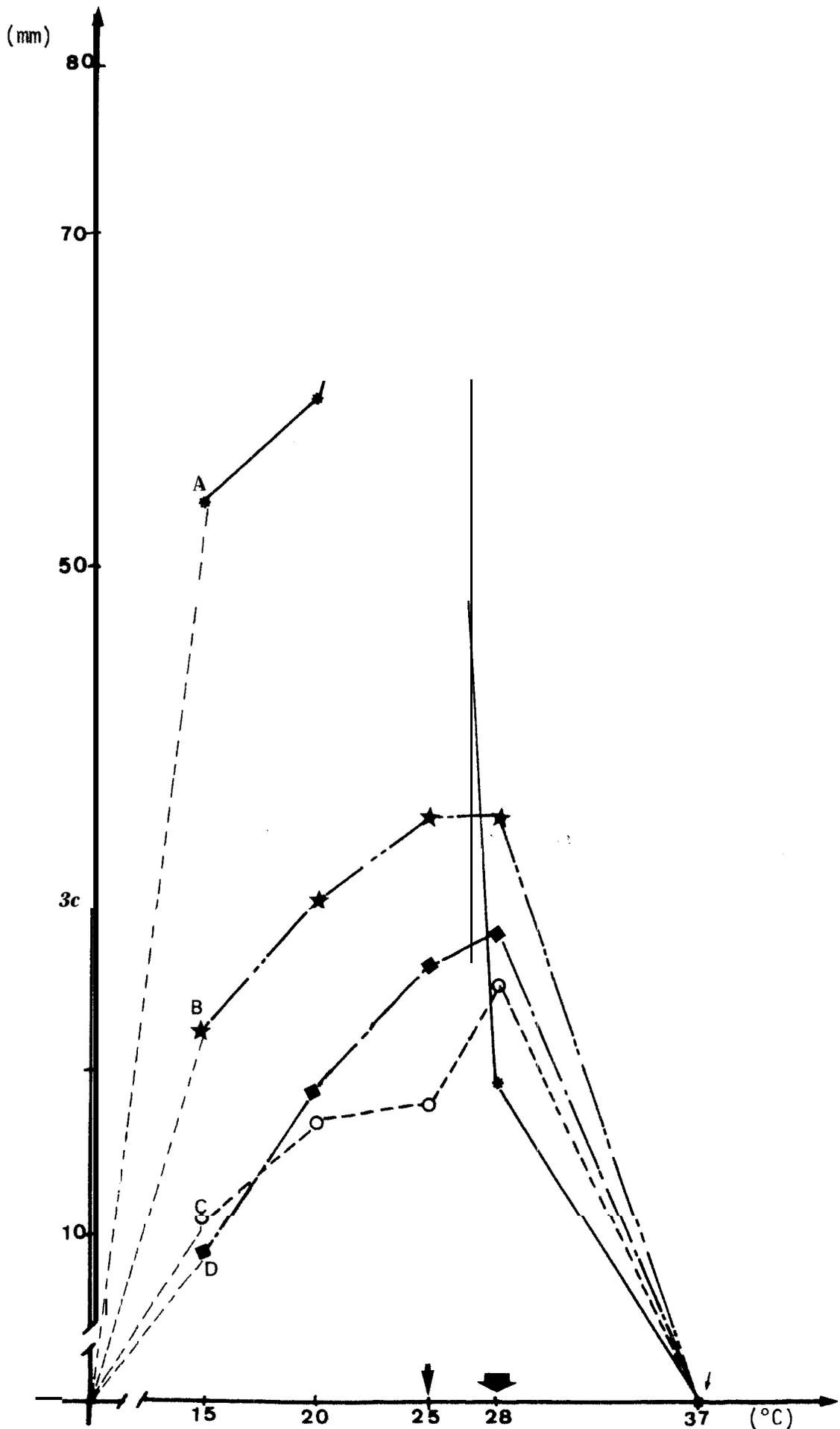


Fig. 10 - *P1. oryzae* (D) ; *T5. viride* (A) ; *C1. globosum* (B) ; *M1. verrucaria* (C) : croissance radiale (mm) en fonction de la température ; PCA/4 j/obscurité.

Age (j) à 25°C \ Germes	<i>P₁. oryzae</i>	<i>T₅. viride</i>	<i>C₁. globosum</i>	<i>M₁. verrucaria</i>
1 (lumière continue)	φ ₀	φ ₀	20,0	12,0
2 (lumière continue)	φ ₀	φ ₀	27,0	16,0
4 (lumière continue)	15,0	φ ₀	45,0	27,0
Arrêt de la lumière au 4e jour et permanence dans obscurité continue du 4e au 18e jour				
18	> 90,0	> 90,0 Blocage puissant mais réversible	> 90,0 Réversibilité très précoce	> 90,0 Réversibilité très précoce

Tableau 21 - Croissance radiale (mm) de *P₁. oryzae*, *T₅. viride*, *C₁. globosum*, *M₁. verrucaria* préalablement incubés 7 jours à 37°C/obscurité continue et transférés à 25°C/PCA.

La représentation graphique du comportement des germes en fonction de la température après 4 jours d'incubation est matérialisée par la figure 10.

1.2 - Comportement des germes en fonction de l'héméropériode,

Nous soumettons les germes implantés sur PCA à 3 éclairagements :

- lumière continue = LUM soit 24 h/24 lumière
- alternance lumineuse = LUM + OBS soit 8 h lumière + 16 h obscurité
- obscurité continue = OBS soit 24 h/24 obscurité.

L'ensemble des résultats est représenté dans le tableau 22.

1.2.1 - Résultats

	<i>P₁. oryzae</i>			<i>T₅. viride</i>			<i>C₁. globosum</i>			<i>M₁. verrucaria</i>		
	LUM	LUM + OBS	OBS	LUM	LUM + OBS	OBS	LUM	LUM + OBS	OBS	LUM	LUM + OBS	OBS
Conidiogénèse												
- Précocité	4e j	4e j	4e j	4e j	4e j	4e j	zéro au 6e j	zéro au 6e j	6e j	4e j	4e j	4e j
- Intensité relative	t+t	ttt	ttt	t	ttt	tt			t	+++	+++	+++
Age incubation												
2 j	13,0	14,0	14,0	23,3	24,0	23,0	17,7	16,3	21,0	13,0	12,5	12,5
3 j	18,3	21,0	20,5	38,7	46,7	36,3	27,7	26,0	32,3	18,0	17,0	16,0
4 j	23,7	27,0	26,0	57,3	65,0	55,0	38,0	34,7	39,0	23,2	21,5	20,0
5 j	29,0	34,0	32,0	75,0	> 90	74,0	46,0	42,0	47,0	28,0	26,0	25,0
6 j	35,0	40,0	39,0	> 90	> 90	> 90	56,0	47,0	52,7	33,0	31,0	28,0
7 j	40,0	47,0	45,0	> 90	> 90	> 90	65,0	55,0	59,7	39,0	35,0	33,0
8 j	46,7	53,0	50,0	> 90	> 90	> 90	72,0	62,0	65,0	43,0	39,0	37,0
9 j	52,0	56,0	54,0	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	47,5	44,3	41,0
10 j	58,7	63,0	60,0	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	52,0	49,0	44,3
11 j	66,0	69,0	67,0	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	> 90	56,0	53,0	48,0

Tableau 22 - Croissance radiale (mm) de *P₁. oryzae*, *T₅. viride*, *C₁. globosum* et *verrucaria* sur PCA/25° en fonction de l'héméroperiode et du délai d'incubation.

Remarques : - Chaque valeur du présent tableau désigne une moyenne entre 3 mesures issues chacune d'une moyenne entre 2 **évaluations déterminées** selon 2 dimensions perpendiculaires de la colonie.

- S'agissant de la **conidiogénèse**, excepté *C₁. globosum* pour lequel les fructifications sont apparues vers le 6e jour, le **phénomène** s'est manifesté dès le 4e jour pour les autres germes. L'intensité de la conidiogénèse est appréciée visuellement et matérialisée par des croix :

+++ = excellente conidiogénèse
 ++ = conidiogénèse bonne
 + = conidiogénèse moyenne.

1.2.2 - Caractères descriptifs en fonction de l'héméroperiode

- *T₅. viride* : colonie poudreuse ; l'intensité de la teinte **verdâtre** est liée à la conidiogénèse ; la croissance se fait par "bonds" ; on distingue sur la colonie, des bandes de coloration et de **compacité** variables : plus la bande considérée est dgée (bordant extérieurement le disque inoculum), plus dense est le **mycélium**.

- *C₁. globosum* : nous observons une colonie régulière qui, au 4e jour est morphologiquement identique quelle que soit l'héméroperiode.

- *M₁. verrucaria* : colonie d'un blanc laiteux ; les anneaux observables sont liés à la conidiogénèse et sont d'autant plus compacts, continus et pigmentés que celle-ci est plus prononcée.

1.2.3 - Expression graphique

Figures 11, 12, 13 et 14.

1.3 - Comportement des **germes** en fonction du **pH**

Nous avons opéré avec le PCA tamponné à 20 % par le tampon de Mc Ilvaine, à 25°C et à l'obscurité ; nous avons arbitrairement choisi 3 valeurs : faible, moyenne et forte de pH autorisées par l'échelle Mc Ilvaine.

b'inoculum effectivement utilisé est âgé de 4 jours sur PCA ; les disques inoculum sont prélevés à la périphérie **des** colonies.

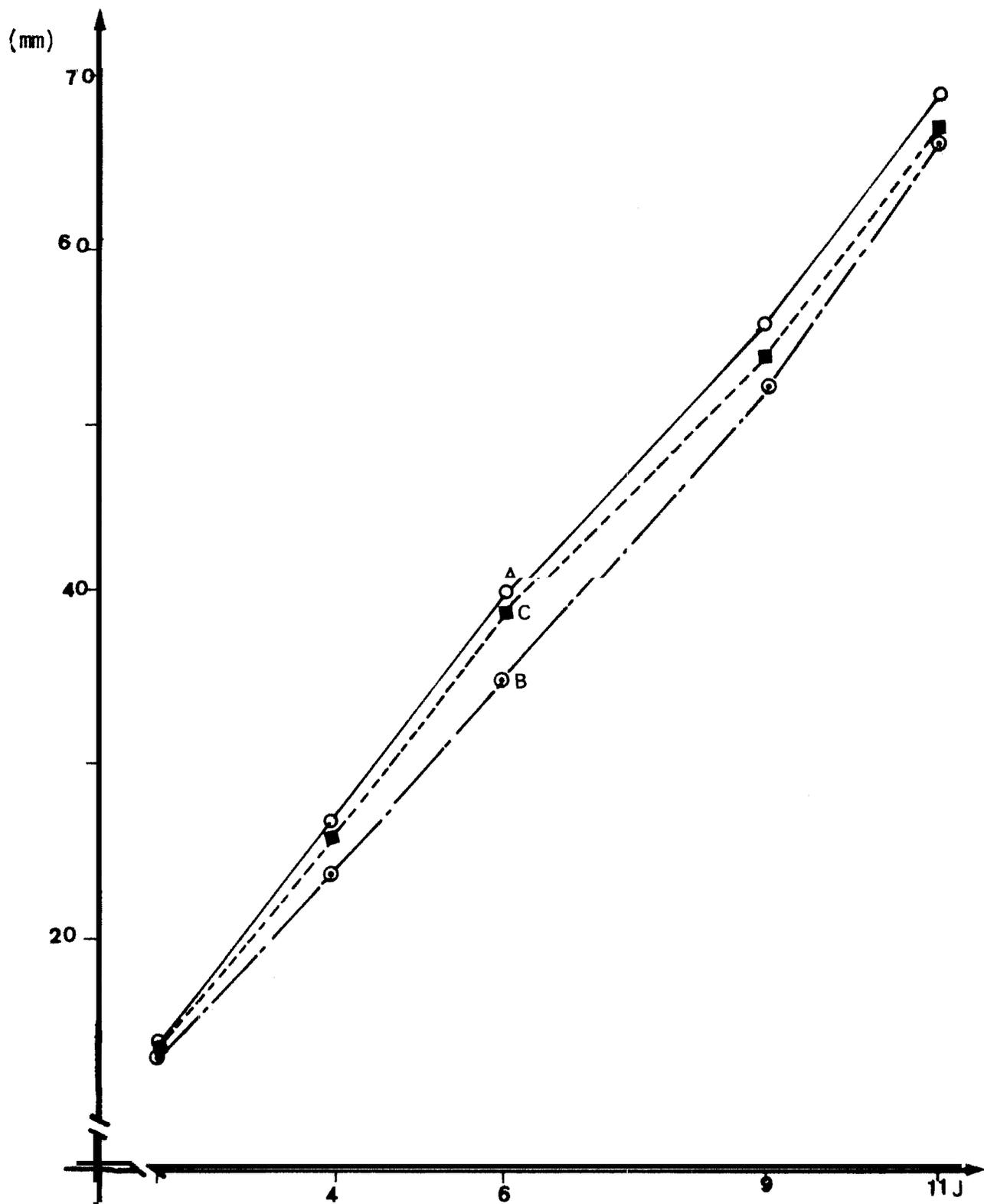


Fig. 11 - *P. oryzae* : Croissance radiale (mm) en fonction de l'héméropériode et du délai d'incubation ; PCA/25°C ;
 A = Lum + Obs ; B = Lumière ; C = Obscurité.

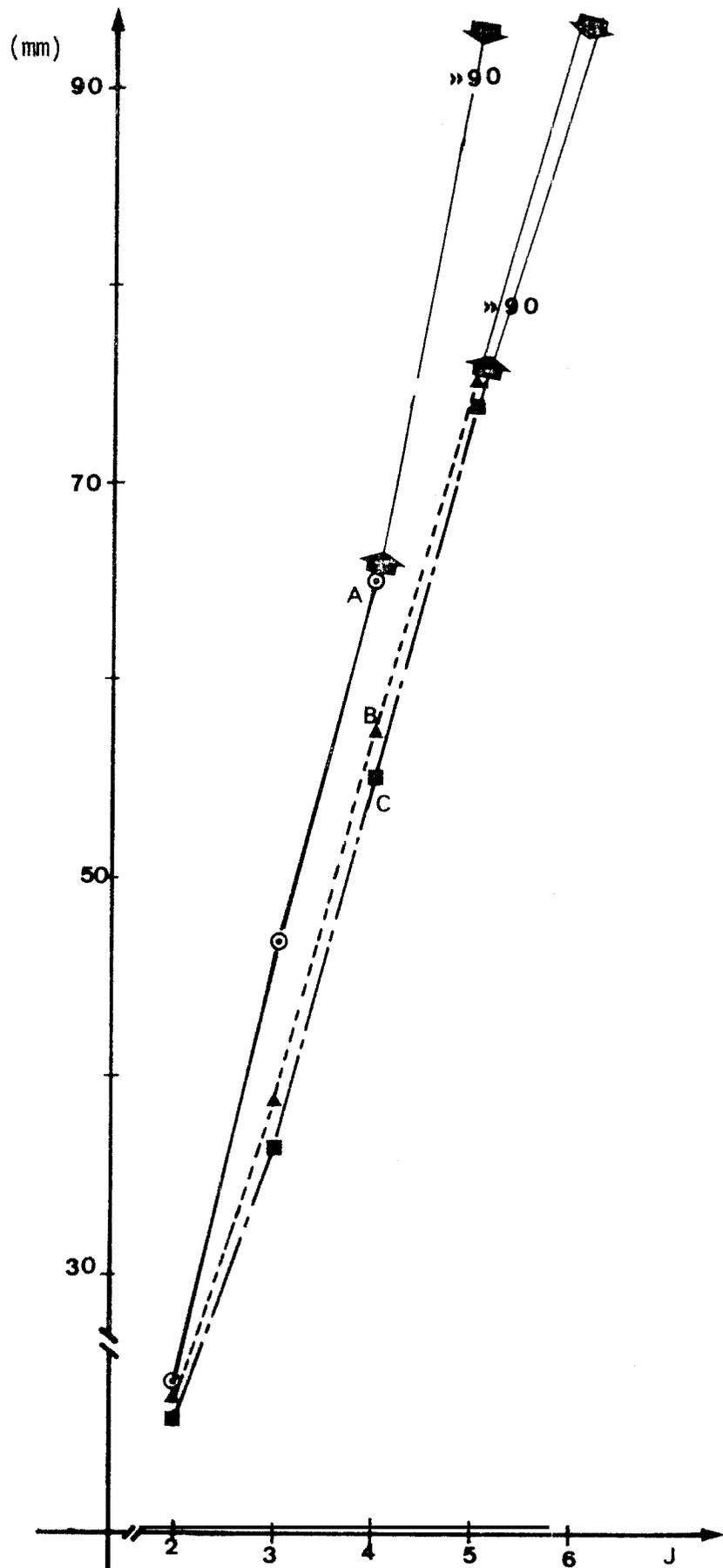


Fig. 12 - *T₅. viride* : croissance radiale (mm) en fonction de l'héméropériode et du délai d'incubation ; PCA/25°C ; A = Lum + Obs ; B = Lumière ; C = Obscurité.

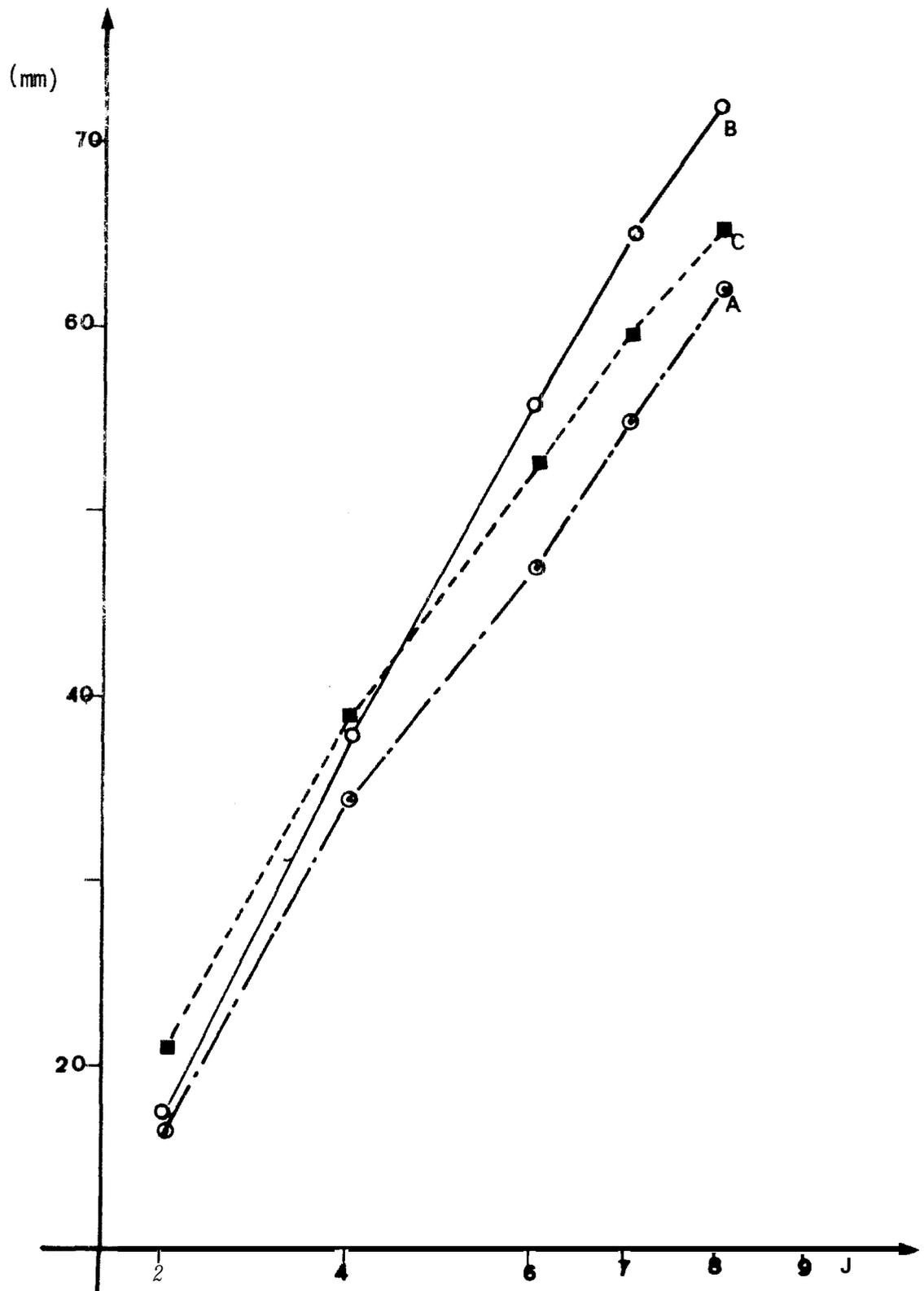


Fig. 13 : *C. globosum* ; Croissance radiale (mm) en fonction de l'héméroperiode et du délai d'incubation ; PCA/25°C ; A = Lum t Obs ; B = Lumière ; C = Obscurité.

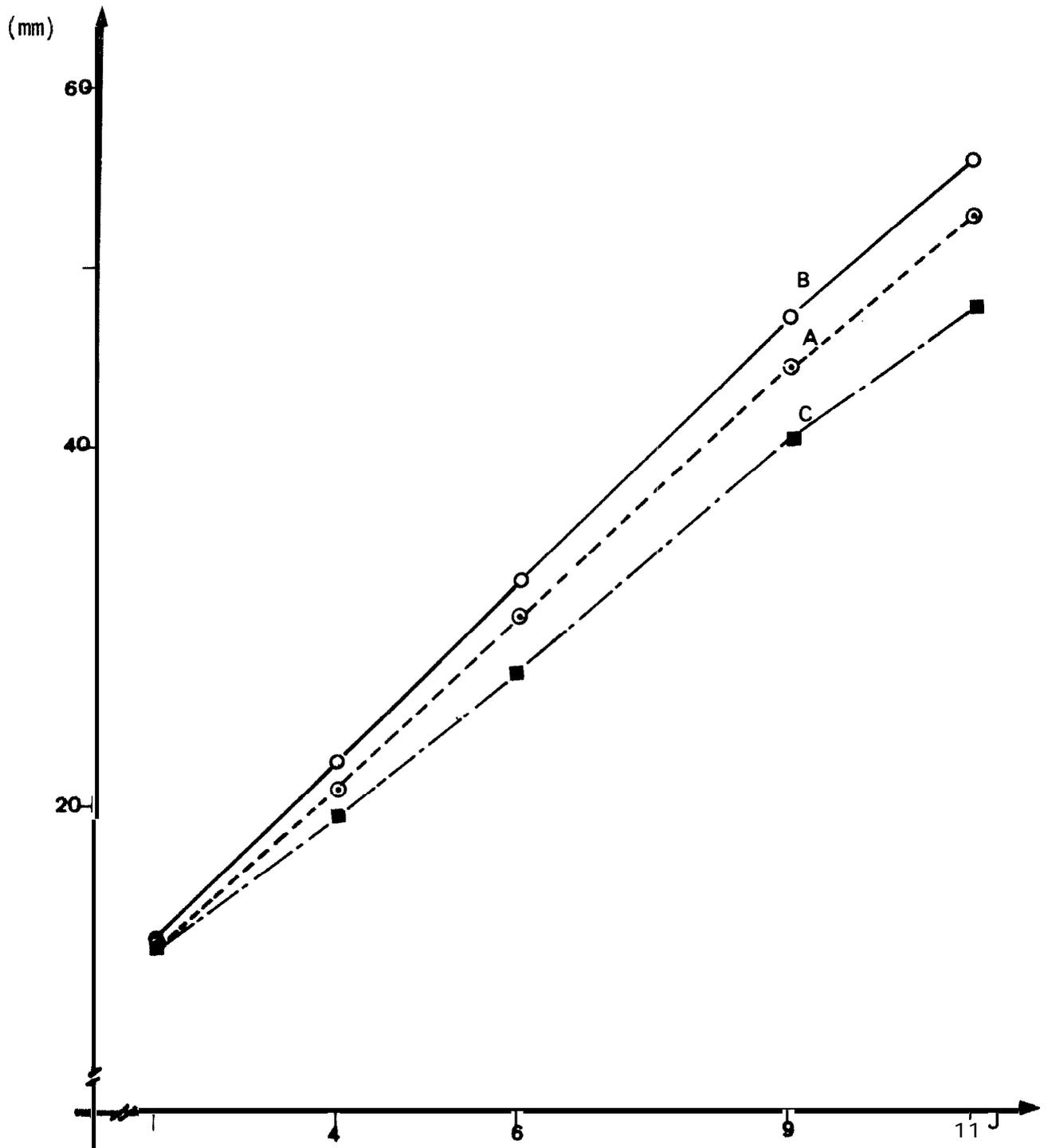


Fig. 14 - *M₁. verrucaria* : croissance radiale (mm) en fonction de l'héméroperiode et du délai d'incubation ; PCA/25°C ;
 A = Lum + Obs ; B = Lumière ; C = Obscurité.

1.3.1 - Formulation des résultats

Germe		<i>P₁. oryzae</i>			<i>T₅. viride</i>			<i>C₁. globosum</i>			<i>M₁. verrucaria</i>		
Age (j)	pH	3,50	5,75	7,50	3,50	5,75	7,50	3,50	5,75	7,50	3,50	5,75	7,50
	2		12,3	15,3	15,0	49,0	18,7	10,0	15,7	20,7	18,0	12,3	15,0
3		18,0	21,0	21,0	70,0	31,0	11,0	18,7	28,0	20,3	15,0	15,5	15,0
4		23,3	28,0	27,0	> 90	39,3	11,0	21,3	34,0	23,3	18,7	19,5	18,7
5		31,0	37,0	35,0	> 90	51,0	11,5	24,0	43,0	28,0	23,0	24,0	23,0
7		42,0	50,0	47,7	> 90	71,0	13,0	30,0	52,0	35,0	30,0	32,0	30,0
9		55,0	64,0	62,7	> 90	86,0	13,0	42,0	57,0	38,7	40,0	40,5	38,0
11		72,0	82,0	76,0	> 90	> 90	13,0	51,0	65,0	44,0	48,0	49,0	46,5
Précocité conidiogénèse		7e j	3e j	3e j	3e j	5e j	-	-	-	-	3e j	3e j	3e j

Tableau 23 - Croissance radiale (mm) de *P₁. oryzae*, *T₅. viride*, *C₁. globosum* et *M₁. verrucaria* en fonction du pH. PCA/25°C/obscurité continue. Chaque valeur est une moyenne établie à partir de 3 mesures moyennes.

1.3.2 - Caractères descriptifs en fonction du pH après 3 jours d'incubation

- *P₁. oryzae* : cf première partie.

- *T₅. viride*

. A pH 3,50 : la croissance est très rapide ; autour du site d'inoculation, nous avons une zone annulaire large de 20 mm caractérisée par un mycélium très fin, se confondant presque avec le milieu gélosé ; bordant extérieu-

rement cette zone, nous découvrons une bande large de 10 mm dont le mycélium est plus "aérien", cotonneux ; c'est le site de plus intense conidiogénèse ; enfin, à la périphérie, une plage de 5 mm d'un mycélium très diffus.

. A pH 5,75 : mycélium enchevêtré lâchement ; teinte d'un blanc cendré.

. A pH 7,50 : mêmes caractères qu'à pH 5,75 ; cependant la conidiogénèse est absente jusqu'au 11^e jour compris.

- *C₁. globosum* : le mycélium est dense, "levuriforme", d'un blanc laiteux ; à pH 3,50 le contour des colonies ne se régularise qu'au 9^e jour alors que cette irrégularité persiste au-delà du 11^e jour pour les colonies développées à pH 7,50.

- *M₁. verrucaria* : le disque inoculum est cerclé par de très fins anneaux noirs ; le reste est d'un "blanc-hyalin" ; on observe la formation d'un anneau caractérisé par un mycélium floconneux dense, relativement aérien par rapport au reste et qui correspond à la zone de conidiogénèse légèrement pigmentée.

1.3.3 - Expression graphique

Figure 15 (établie après 3 jours d'incubation).

1.4 - Synthèse

L'approche de la biologie et de la physiologie des germes concernés nous autorise à expérimenter dans les conditions suivantes :

- Substrat nutritif : milieu à base de pomme de terre-carotte, soit sous forme solide (PCA), soit sous forme liquide (PC) ; ce milieu facile à préparer donne des résultats satisfaisants pour tous les microorganismes.

- Température : nous opérerons à 25°C eu égard au fait qu'une température donnée est toujours plus ou moins favorable à l'un ou à l'autre germe ; en aucun cas nous ne pouvons satisfaire simultanément les exigences thermiques optimales de tous les germes.

- Héméroperiode : nous travaillerons à l'obscurité continue (héméroperiode nulle) compte tenu du fait que nous ne sommes pas toujours assurés de pouvoir disposer d'un équipement adéquat (muni d'une rampe d'éclairage).

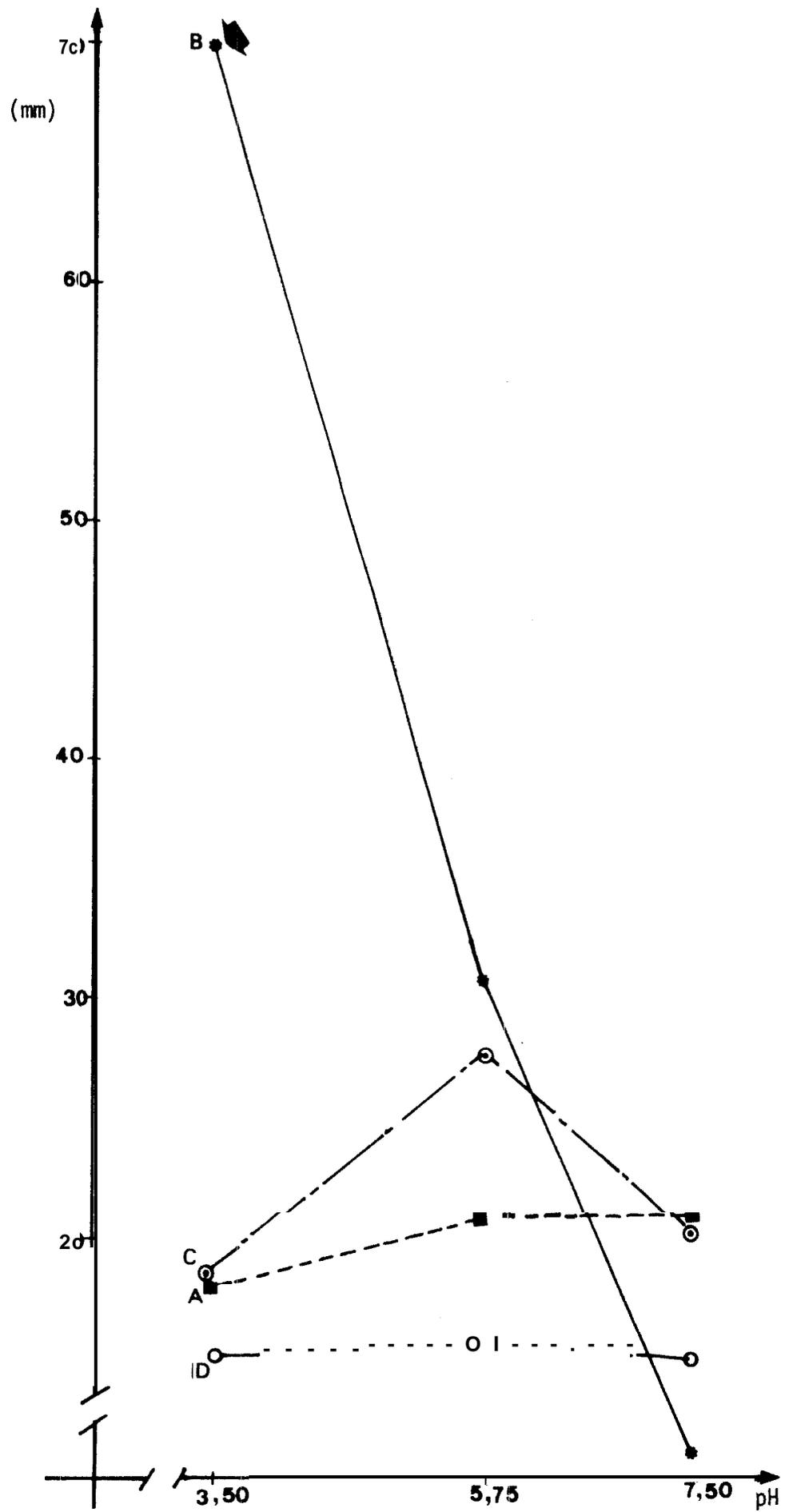


Fig. 15 - *P1. oryzae* (A) ; *T5. viride* (B) ; *C1. globosum* (C) ; *M1. verrucaria* (D) : croissance radiale (mm) en fonction du pH ; PCA/25°C/3 j/obscurité.

- pH : deux valeurs de pH sont retenues ; l'une basse (3,0 à 4,10) et l'autre élevée (5,55 à 6,0).

La définition des paramètres **expérimentaux** paraît être liée à la nature de l'équipement du laboratoire, ce qui est tout à fait logique ; mais il nous faut dire que ce choix répond dans une certaine mesure aux **exigences** des germes étudiés ; de toute façon, nous ne pouvons retenir que des VALEURS MOYENNES puisqu'une valeur spécifique **très** favorable à un microorganisme donne (pH de 3,50 pour *T₅.viride*) peut se montrer moins favorable pour un autre (pH de 3,50 pour *P₁.oryzae*).

Ces précisions étant apportées, nous allons aborder le problème de la mise en évidence du phénomène d'antagonisme dans les conditions expérimentales préalablement définies.

II - EXPERIENCE DE MISE EN EVIDENCE DU PHENOMENIE D'ANTAGONISME *in vitro* : CONFRONTATION SIMULTANEE (C.S.) DU PARASITIE AVEC LES GERMES "ANTAGONISTES"

2. i. - Appréciation de l'inhibition (%) exercée par les germes antagonistes sur la croissance radiale (mm) de *P₁.oryzae*

Nous faisons appel à la méthode de confrontation simultanée (décrite dans l'annexe technique n° 5 et utilisée dans le criblage sélectif réalisé au chapitre 1 de la présente partie) sous les conditions expérimentales définies ; le tableau 24 matérialise les résultats observés après 5 et 7 jours d'incubation et pour deux valeurs de pH.

Age (j)	pH	3,50			5,55		
	Evaluation "Antagoniste"	M ₀ = R (mm)	M = r (mm)	M _i (%)	M ₀ (mm)	r (mm)	M _i (%)
5	<i>T₅. viride</i>	12,8	5,7	55,8	18,5	6,5	64,9
	<i>C₁. globosum</i>	17,2	9,8	42,7	18,3	9,8	46,3
	<i>M₁. verrucaria</i>	18,2	8,2	55,0	18,2	8,7	52,5
7	<i>T₅. viride</i>	12,8	5,7	55,8	24,1	6,3	73,7
	<i>C₁. globosum</i>	22,7	9,9	56,2	24,2	10,2	57,6
	<i>M₁. verrucaria</i>	23,7	8,6	63,7	24,0	8,7	63,9

Tableau 24 - *P₁. oryzae* : croissance (en mm) et inhibition de la croissance (%) radiale au cours d'une confrontation simultanée ; PCA/25°C/obscurité continue.

2.1.1 - Caractères descriptifs

2.1.1.1 - Examen macroscopique (Planche n° II)

2.1.1.1.1. - *P₁. oryzae* x *T₅. viride*

• pH 3,50 : le développement de la colonie parasite est bloqué dès les premières 48 heures en raison notamment du pH particulièrement favorable au *T₅. viride* et peu favorable au *P₁. oryzae* (cf comportement des germes vis-à-vis du pH) ; la zone proximale (par rapport au site d'inoculation de "l'antagoniste") de la colonie parasite est souvent le siège d'une auréole en forme de croissant de couleur brun jaunâtre à jaune et dont l'intensité va décroissant jusqu'à s'annuler sur le côté distal de la colonie.

T₅. viride qui exerce principalement ici une action par contact parvient, dès le 7e jour, à englober la colonie parasite comme pour "l'étouffer" ; dès lors, le développement de *P₁. oryzae* est définitivement stoppé ; la colonie du parasite envahie par "l'antagoniste" est également inapte à produire des organes de fructification.

* pH 5,55 : le phénomène est moins prononcé en raison du pH relativement élevé qui "contrarie" la croissance de *T₅. viride* alors qu'il exerce sûrement une action bénéfique sur *P₁. oryzae* ; ce qui impose donc au *T₅. viride* un délai plus important pour bloquer le parasite ; ce dernier, exploitant ce sursis, s'étale **latéralement** et du côté opposé au *T₅. viride*.

Remarques : Dans les deux cas, nous observons que la pigmentation ("brun **caramel**") est d'autant plus intense que la zone considérée de la colonie du parasite est plus soumise à l'effet inhibiteur de *T₅. viride*.

De plus, une intense inhibition de la croissance radiale du parasite se traduit par une croissance aérienne de celui-ci, lui conférant une épaisseur croissante ainsi qu'une densité plus élevée à mesure que l'on se rapproche du site d'inoculation de "l'antagoniste".

2.1.1.1.2 - *P₁. oryzae* x *C₁. globosum*

* pH 3,50 : en raison de la croissance **radiale** relativement faible de *C₁. globosum*, le contact entre les 2 colonies n'est pas établi au 3e jour ; pourtant, nous observons une très nette "régression" de la colonie parasite mettant en valeur l'intervention précoce d'une action à distance ; le contact est bien établi au 7e jour ; nous remarquons que la zone de la colonie de *P₁. oryzae* contiguë à l'antagoniste se caractérise par un très bon développement aérien, témoignant de ce que cette zone subit une **action** inhibitrice plus intense que celle exercée sur la zone **distale**. Il y a donc ici superposition d'une action à distance et d'une action par contact.

* pH 5,55 : l'action de *C₁. globosum* est ici très nette et la gravité de l'inhibition se manifeste **comme précédemment** ; corrélativement à la densité mycélienne du parasite, il se développe une pigmentation brune répartie dans la zone épaisse en forme de **croissant** à la limite commune des 2 colonies.

2.1.1.1.3 - *P₁. oryzae* x *M₁. verrucaria*

* pH 3,50 : la vitesse de croissance relativement élevée de *P₁. oryzae* (par rapport à "l'antagoniste") lui permet de **se** développer notamment du **côté** distal et latéralement ; sa croissance n'est donc que partiellement limitée en dépit d'une action à distance très nette dès les 3e et 4e jours.

Nous observons également le **phénomène** d'épaississement dont nous

avons **précédemment** fait état ainsi qu'une pigmentation (brun cendré) qui lui est liée.

• pH 5 ,55 : en dehors de la taille plus grande de la colonie parasite, nous n'observons aucune différence particulière par rapport au pH 3,50 ; le **côté distal** de la colonie parasite semble nettement moins affecté par la présence de *M₁. verrucaria*.

2. 1. 1. 1. 4 - Remarque

En aucun cas, nous n'avons remarqué une odeur **particulière** émanant des milieux de confrontation.

2. 1. 1. 2 - Examen microscopique (Planche n° III)

Pour tous les types de confrontation, nous avons, au 3e jour, réalisé des préparations microscopiques à partir des régions proximale et **distale** de la **colonie** du parasite et les avons examinées par rapport au témoin.

2. 1. 1. 2. 1 - *P₁. oryzae* x *T₅. viride*

• pH 3 ,50 : lorsque nous examinons le **mycélium** parasite prélevé du **côté** proximal par rapport à la colonie "antagoniste" (par souci de brièveté nous l'appellerons "**mycélium proximal**" par opposition au "**mycélium distal**"), il se montre contourné, pelotonné, épaissi, fortement branché et intensément colorable par le bleu coton ; souvent, nous voyons **apparaître** des morphoses rappelant un "**balai de sorcière**".

Hormis l'épaississement observable sur certains filaments **mycéliens**, tous les autres caractères se trouvent plus ou moins dilués au niveau du "**mycélium distal**".

• pH 5 ,55 : le "**mycélium proximal**" présente souvent un ensemble de filaments fortement entrelacés longitudinalement ; nous trouvons parfois des cellules **mycéliennes** isolées **hypertrophiées** et situées sur le trajet mycélien à la manière de **chlamydospores** (remarquer qu'ici les cultures sont âgées de 3 jours) ; nous observons **également** un épaississement **mycélien**, de légères ramifications courtes ainsi que des torsades et pelotes terminales.

Tous ces caractères semblent moins prononcés lorsque l'examen porte sur le "mycélium distal".

2.1.1.2.2 - *P₁. oryzae* x *C₁. g lobosum*

Le "mycélium proximal" issu des cultures à pH 3,50 est souvent vrillé ou fortement torsade ; aucune déformation notable n'a été observée pour le "mycélium distal" ou pour le mycélium obtenu à pH 5,55.

2.1.1.2.3. - *P₁. oryzae* x *M₁. verrucaria*

La seule observation positive porte sur le "mycélium proximal" issu du pH 5,55 ; les filaments mycéliens sont vrillés deux à deux rappelant étrangement les 2 torons du DNA.

2.1.2 - Expression graphique des résultats (fig. 16 A et C) :

Interprétation

L'intensité de l'inhibition exercée sur le développement de la colonie du parasite relève de 2 facteurs :

- L'effet d'inhibition relative ("relative inhibitory effect" ou RIE) étant quantifié par la relation

$$M_i = \text{RIE} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

toute augmentation du rapport $\frac{R - r}{R}$ élève le pourcentage d'inhibition correspondant ; à mesure qu'augmente le délai d'incubation (passage de 5 à 7 jours), l'accroissement de r s'amenuise voire s'annule du fait de la proximité du germe "antagoniste" ; à la limite, r devient constant puisque dans notre cas, le parasite ne croît pas par-dessus la colonie antagoniste ; parallèlement, la croissance de R se poursuit même faiblement du côté distal ; la résultante de ces deux phénomènes explique -partiellement du moins- l'accroissement de l'inhibition lorsqu'on passe de 5 à 7 jours.

Dans le cas particulier du *T₅.viride* à pH 3,50, nous observons une RIE constante (55,8) du fait que le *Trichoderma* enveloppe entièrement la colonie parasite et empêche toute possibilité d'épanouissement.

• Le pH intervient fondamentalement ; ainsi, à pH 5,55, le *P₁. oryzae* se trouvant relativement avanta-gé se développe rapidement, notamment le long du rayon distal ; parallèlement, le développement du côté proximal de la colonie du parasite se trouve limité par la présence de *T₅. viride*, d'où l'augmentation du pourcentage d'inhibition observée lorsqu'à 7' jours, nous passons de pH 3,50 (55,8 %) à pH 5,55 (73,7 %) ; il est évident que cet accroissement est fortement influencé par le développement de la colonie parasite le long du rayon distal.

Or, nous avons déjà établi que le *T₅. viride* se complait mieux à pH bas (3,50) qu'à pH élevé (5,55) ; d'où lui viendrait donc cette subite capacité d'inhiber plus intensément le parasite à pH élevé (5,55) qu'à pH bas (3,50) ?

Le seul fait de poser la question pose le problème de la représentativité de la relation

$$M_i = RIE = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100$$

telle qu'elle a été jusqu'ici définie et utilisée.

D'un autre côté, lorsque le parasite est confronté avec l'un quelconque des germes antagonistes, nous avons observé que dans TOUS LES CAS, le rayon de la colonie de *P₁.oryzae* opposé au site d'inoculation du germe antagoniste était INFÉRIEUR à celui de *P₁.oryzae* sur "TEMOIN FRANC" ; cela signifie que sur la boîte de confrontation, la colonie de *P₁. oryzae* dans sa GLOBALITE est PLUS ou MOINS affectée par le voisinage de l'antagoniste et qu'il serait erroné de considérer le rayon distal de la colonie parasite (par rapport au site d'inoculation de l'antagoniste) comme représentatif de la croissance normale de *P₁. oryzae*.

La croissance NORMALE doit être évaluée sur la seule boîte de Petri "TEMOIN FRANC".

De plus, en raison de la déformation de la colonie du parasite, le phénomène sera certainement mieux apprécié sur la base de la colonie de *P₁. oryzae* confronté ou non ("TEMOIN FRANC") avec le ou les germes antagonistes.

Les surfaces sont évaluées au planimètre.

2.2 - Appréciation de l'inhibition (%) exercée par les germes "antagonistes" sur la croissance en surface (cm²) de *P1. oryzae*

Le tableau 25 récapitule l'ensemble des résultats afférents à cette étude.

2.2.1 - Résultats

Age (j)	Evaluations Se ₁ x A _i	3,50			5,55		
		M ₀ et M (cm ²)	Signifi- cation	M _i (%)	M ₀ et M (cm ²)	Signifi- cation	M _i (%)
3	T = Se ₁ x 0	4,43		-	4,63		-
	<i>T₅. viride</i>	2,35	s (U ₀ = 0)	46,9	3,94	s (U ₀ = 10)	14,9
	<i>C₁. globosum</i>	3,66	s (U ₀ = 0)	17,4	4,78	NS	Stimulat. ? (-3 %)
	<i>M₁. verrucaria</i>	3,76	s (U ₀ = 0)	15,1	5,58	NS	Stimulat. ? (-20,5 %)
4	T = Se ₁ x 0	5,38		-	5,50		-
	<i>T₅. viride</i>	2,51	s (U ₀ = 0)	53,3	4,29	s (U ₀ = 0)	22,0
	<i>C₁. globosum</i>	4,44	S (U ₀ = 0)	17,5	5,76	NS(U ₀ =37,5)	Stimulat. ? (-4 %)
	<i>M₁. verrucaria</i>	4,20	s (U ₀ = 0)	21,9	5,30	NS	3,6
5	T = Se ₁ x 0	7,70		-	9,58		-
	<i>T₅. viride</i>	2,18	s (U ₀ = 0)	71,7	7,06	s (U ₀ = 0)	26,3
	<i>C₁. globosum</i>	6,11	s (U ₀ = 0)	20,6	8,14	S (U ₀ = 6,5)	15,0
	<i>M₁. verrucaria</i>	7,01	NS	8,9	6,79	S	29,1
6	T = Se ₁ x 0	11,40		-	14,14		-
	<i>T₅. viride</i>	2,08	S (U ₀ = 0)	81,7	9,85	s (U ₀ = 0)	30,3
	<i>C₁. globosum</i>	8,80	S (U ₀ = 0)	22,8	11,79	S	16,6
	<i>M₁. verrucaria</i>	9,84	VS(U ₀ =26,5)	13,7	10,03	S	29,1
7	T = Se ₁ x 0	15,78		-	29,62		-
	<i>T₅. viride</i>	2,24	s (U ₀ = 0)	85,8	13,25	s (U ₀ = 0)	46,2
	<i>C₁. globosum</i>	11,33	S (U ₀ = 0)	28,1	15,89	S	35,4
	<i>M₁. verrucaria</i>	13,41	s (U ₀ = 0)	17,0	13,40	S	45,6

Tableau 25 - *P1. oryzae* : inhibition (% par rapport au "témoin franc") exercée par les germes antagonistes sur la croissance en surface (cm²) pour 2 valeurs de pH et en fonction du délai d'incubation ; PCA/25°/obscurité.

Remarques : • Chaque mesure de surface est une **moyenne calculée** à partir de 10 boîtes de Petri.

- T = Sel x 0 désigne le "TEMOIN FRANC" et correspond au parasite développés isolément.

2.2.2 - Expression numérique des résultats

Le pourcentage d'inhibition est évalué sur la base de la relation

$$M_i = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100 \quad \text{où}$$

M_0 = croissance mycélienne du parasite en surface (cm^2) sur "TEMOIN FRANC"

M = croissance mycélienne du parasite en surface (cm^2) sur boîte de Petri essai

M_i = pourcentage d'inhibition exercé par les germes "antagonistes" sur la croissance du parasite.

Pour chaque pH, pour chaque délai d'incubation de chaque type de confrontation, le pourcentage d'inhibition est calculé et consigné à la place qui lui correspond dans le tableau 25.

2.2.3 - Signification

Le problème est de savoir si les pourcentages d'inhibition observés nous autorisent à conclure à une action significative des germes "antagonistes" sur le parasite ; en clair, nous devons voir si les différences observées entre le développement du parasite seul ("TEMOIN FRANC") et celui du parasite confronté à un "antagoniste" donné (ESSAI) ne sont pas dues aux seules fluctuations d'échantillonnage.

Pour un pH (ex : 5,55) et un délai d'incubation (ex : 3 jours) donnés, chaque valeur (ex : 3,94 cm^2 pour la confrontation Sel x *T₅. viride*) est comparée au témoin qui lui correspond (en l'occurrence 4,63 cm^2) non pas sur la base des moyennes mais des 10 composantes de chaque moyenne ; ainsi, pour juger du degré de signification de 3,94 par rapport à 4,63, nous comparerons les 2 séries statistiques :

x (témoin) $\rightarrow 4,1/5,0/4,8/4,9/4,3/5,0/5,0/4,9/4,3/4,0 \rightarrow \bar{x} = 4,63$

y (essai) $\rightarrow 3,9/3,9/3,5/4,1/4,4/3,4/4,0/3,9/4,4/3,9 \rightarrow \bar{y} = 3,94$

Appliquant le Test U de MANN et WHITNEY à ces deux séries statistiques, nous trouvons :

$U_0 = 10$ (valeur inférieure)

La table nous donne $U_{0,05} = 23$ avec $\left\{ \begin{array}{l} dd_1 = 10 \\ dd_2 = 10 \end{array} \right.$

Nous avons bien $U_0 < U_{0,05} \rightarrow$ nous pouvons affirmer avec un risque de 5 % que les deux séries x et y sont significativement différentes au seuil de 5 % ; en d'autres termes, le pourcentage d'inhibition **14,9 %** exprimé sur la base des valeurs **4,63** et **3,94** traduit concrètement une action **significative** de *T₅. viride* sur *P₁. oryzae*.

Il est évident, par ailleurs, que DE PAR LA STRUCTURE MEME DU TEST utilisé, le fait d'avoir chacun des caractères de la série (y) inférieur à chacun des caractères de la série (x) nous autorise d'emblée à conclure à une différence significative entre les séries (x) et (y) puisque $U_0 = 0 < U_{0,05}$ qui vaut, soit 23 (pour un effectif de 10) soit 2 (pour un effectif de 5).

Dans cette expérience et celles qui suivent, nous exprimons la différence significative par (S) et celle non significative par (NS) sur le tableau des résultats.

2.3 -- Expression graphique des résultats : discussion

2.3.1 - Analyse comparative des pourcentages d'inhibition relative des croissances radiale et en surface de *P₁. oryzae* confronté durant 5 et 7 jours aux germes "antagonistes" (cf fig. 16 : diagrammes A-C et 8-D respectivement)

- *C₁. globosum* et *M₁. verrucaria* : lorsque nous considérons le pourcentage d'inhibition de *P₁. oryzae* calculé sur la base de la croissance radiale du parasite **confronté** avec les "antagonistes" **précédents** (de même que *T₅. viride* pour le seul pH 5,55), nous attribuons de fait aux germes concernés un pouvoir **inhibiteur** supérieur à celui établi sur la base de croissance en surface du parasite confronté avec ces **mêmes** microorganismes ; ce qui serait absolument erroné

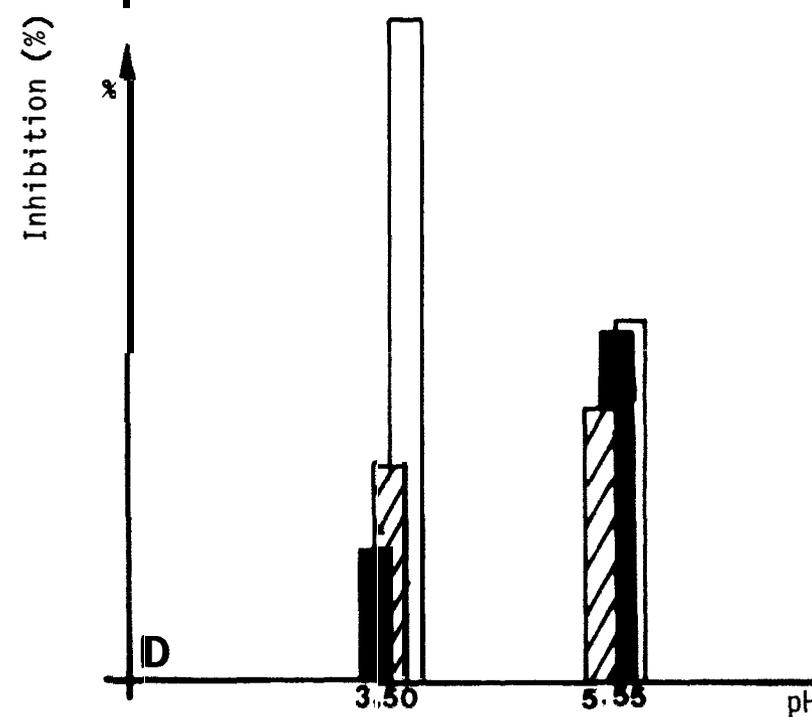
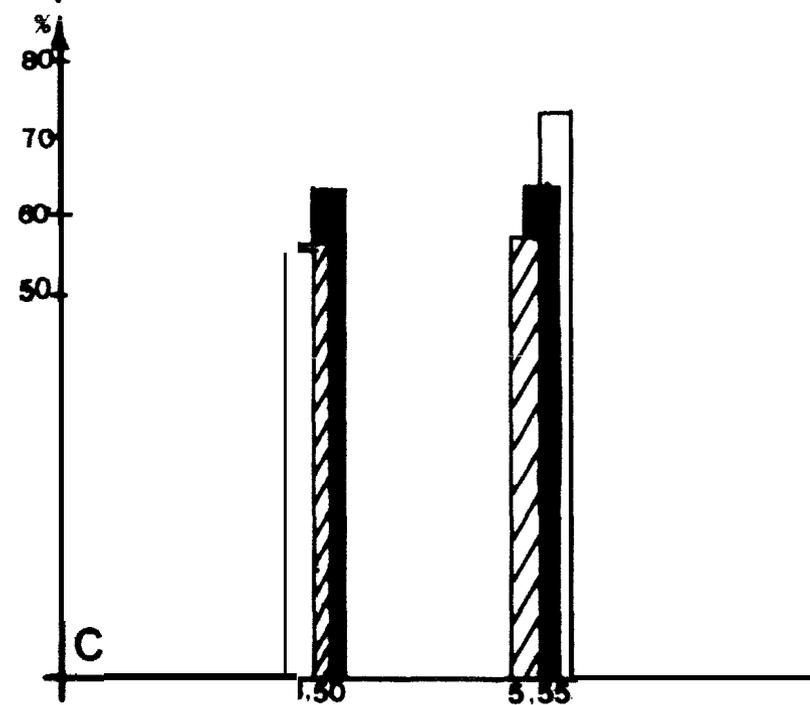
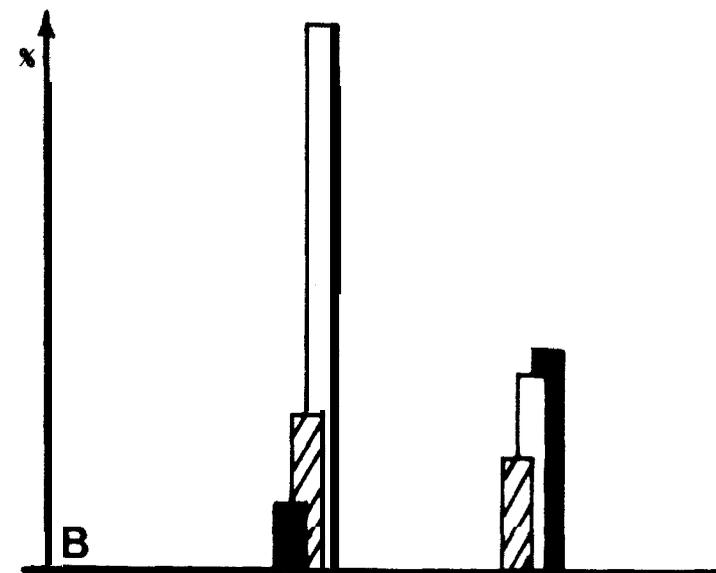
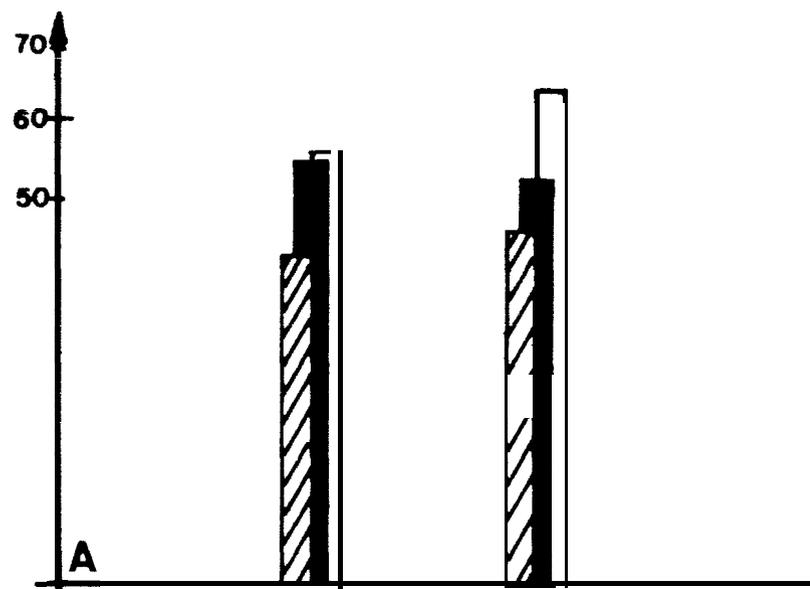


Fig. 16 - Diagrammes comparatifs des pourcentages d'inhibition relative de la croissance radiale (mm ; cf A et C) et de la croissance en surface (cm² ; cf B et D) de *P1. oryzae* confronté pendant 5 jours (A et B) et 7 jours (C et D) aux *T5. viride* ; *C1. globoswn* ; *M1. verrucaria* et pour 2 pH/PCA/25°C/obscurité.

puisque à nos yeux la deuxième méthode reflète plus fidèlement le comportement du parasite dans sa globalité (contrairement à la première qui ne rend compte du phénomène que le long d'une dimension).

- Deux comportements se dessinent lorsque le parasite est confronté avec *T₅. viride*

pH bas (3,50) : le pourcentage d'inhibition exercée par l'antagoniste est constant au-delà d'un certain délai d'incubation lorsque l'évaluation se fait sur la base de la croissance radiale (le pourcentage observé est ainsi de 55,84 % aussi bien au bout de 5 que 7 jours d'incubation) ; par contre, le pourcentage d'inhibition est CROISSANT avec le temps lorsque l'évaluation se fait sur la base de la croissance en surface ET PAR RAPPORT à un "TEMOIN FRANC" (le pourcentage observé varie de 71,88 à 85,80 % lorsque le délai d'incubation passe de 5 à 7 jours).

Dans le premier cas, le *T₅. viride* favorisé par les conditions expérimentales (pH notamment, cf à ce propos les tableau 23 et fig. 15) parvient très précocement à englober totalement la colonie du parasite dont les 2 dimensions R (= M_0) et r (= M) deviennent fixes ; d'où la constance du pourcentage d'inhibition.

Dans le second cas, la surface de la colonie du parasite en boîte de Petri essai est constante comme précédemment à partir d'un certain délai d'incubation tandis que se poursuit le développement de la colonie du parasite sur boîte de Petri "TEMOIN FRANC" ; la différence $M_0 - M$ s'amenuise ^{peu} et le rapport $\frac{M_0 - M}{M_0} \longrightarrow 1$ ce qui explique que $\frac{M_0 - M}{M_0} \times 100$ augmente et à la limite tend vers 100% si la surface offerte au parasite était infinie.

Ce qui permet également d'expliquer que, pour un même délai d'incubation (5 ou 7 jours), le pourcentage d'inhibition soit plus élevé dans le deuxième cas (croissance en cm^2) que dans le premier cas (croissance en mm).

pH 5,55 : cette valeur peu convenable pour *T₅. viride* est favorable au parasite, qui se développe bien, avant de subir l'action inhibitrice de *T₅. viride* ; à aucun moment donc, la croissance de la zone distale de la colonie du parasite n'est définitivement bloquée, d'où l'augmentation moins prononcée du pourcentage d'inhibition observé dans les deux cas lorsque nous passons de 5 à 7 jours d'incubation.

2. 3. 2 - Evolution du pourcentage d'inhibition de la croissance en surface (cm²) de *P₁. oryzae* exercée par les germes "antagonistes" en fonction du temps, PCA/25°/pour 2 valeurs de pH/obscurité continue

L'expression graphique (fig. 17 et 18) des résultats figurant au tableau 25 permet pour ce type de confrontation, de visualiser l'efficacité **relative** des germes "antagonistes" ; *T₅. viride* manifeste une nette supériorité sur les autres germes à pH **3,50** notamment ; l'interprétation de ces courbes impose que l'on tienne compte de 2 facteurs :

- d'une part, l'activité **intrinsèque** du germe "antagoniste" à l'encontre du parasite,
- d'autre part, le caractère plus ou moins favorable des conditions expérimentales (substrat nutritif, pH, etc...) vis-à-vis des germes confrontés.

En réalité, ces 2 facteurs sont indissolublement liés tant il est vrai que le comportement physiologique de l'un quelconque des 2 champignons est dépendant des conditions expérimentales.

2. 3. 3 - Représentativité de chacune des méthodes

L'appréciation du pourcentage d'inhibition du parasite par le germe "antagoniste" sur la base d'une évolution de la surface qui tient compte de l'évolution GLOBALE de la colonie du parasite nous **paraît** plus valable que celle fondée sur l'évaluation de la croissance radiale.

C'est à la **lumière** de ce CONSTAT que dans la suite de nos expériences, toute confrontation donnant lieu à une colonie du parasite **déformée** sous quelque influence que ce soit, nous conduira **à** apprécier ladite influence sur la base d'une mesure de surface ; l'évaluation fondée sur la croissance radiale sera cependant retenue toutes les fois que la colonie mesurée **croît** de façon **régulière**.

2. 4 - Remarques

- Repiquant sur PCA frais des disques **inoculum** prélevés **à** l'intérieur des limites définissant la colonie de *P₁. oryzae* âgée de 10 jours et englobée par *T₅. viride* à pH **3,50**, nous observons le seul **développement** de *T₅. viride* ; cela

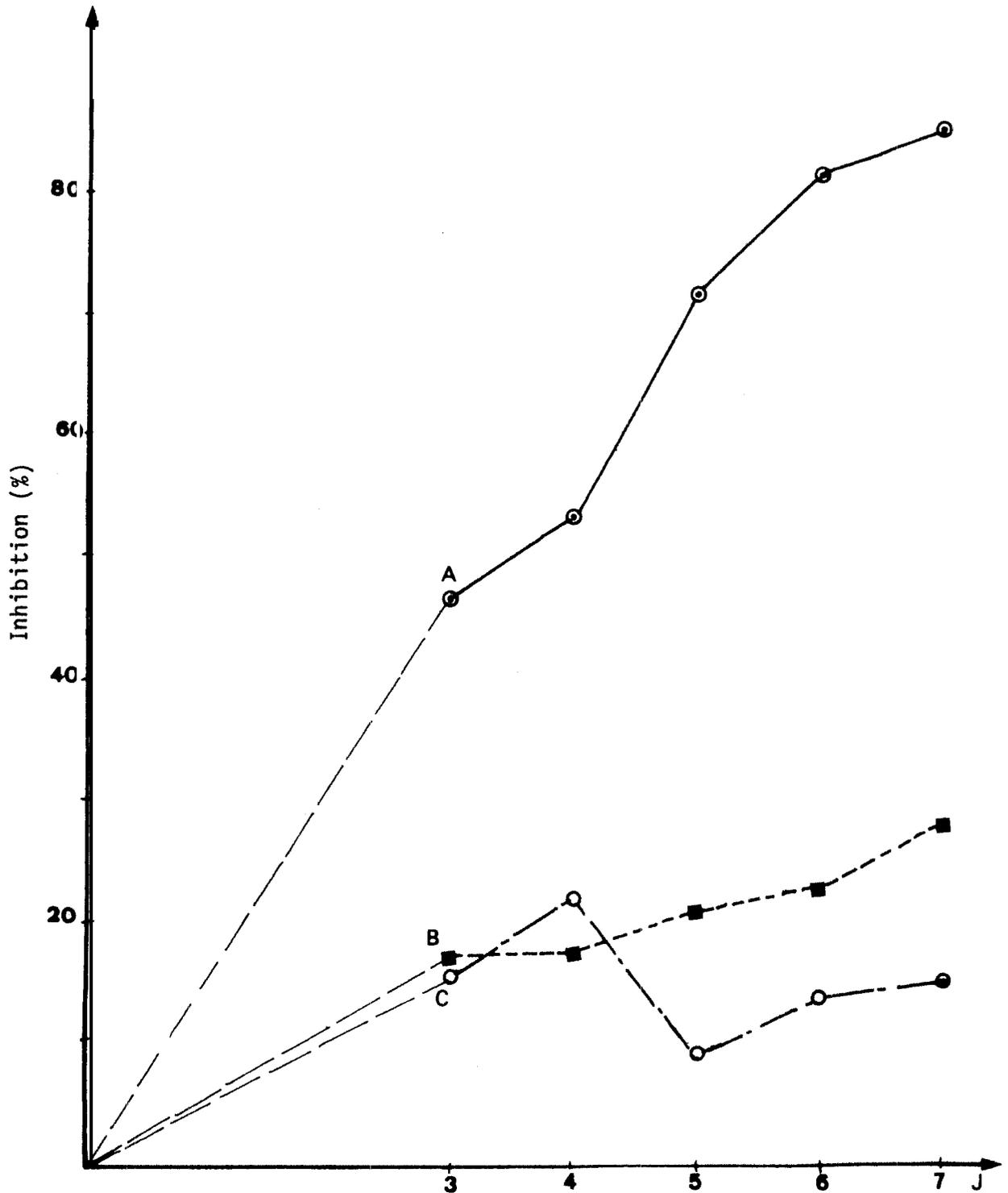


Fig. 17 - Evolution du pourcentage d'inhibition de la croissance en surface (cm²) de *P1. oryzae* par *T5.viride* (A) ; *C1.gtoboswn* (B) ; *M7.verrucaria* (C) au cours d'une confrontation simultanée et en fonction du temps ; PCA/ 25°/pH₀ 3,50/obscurité.

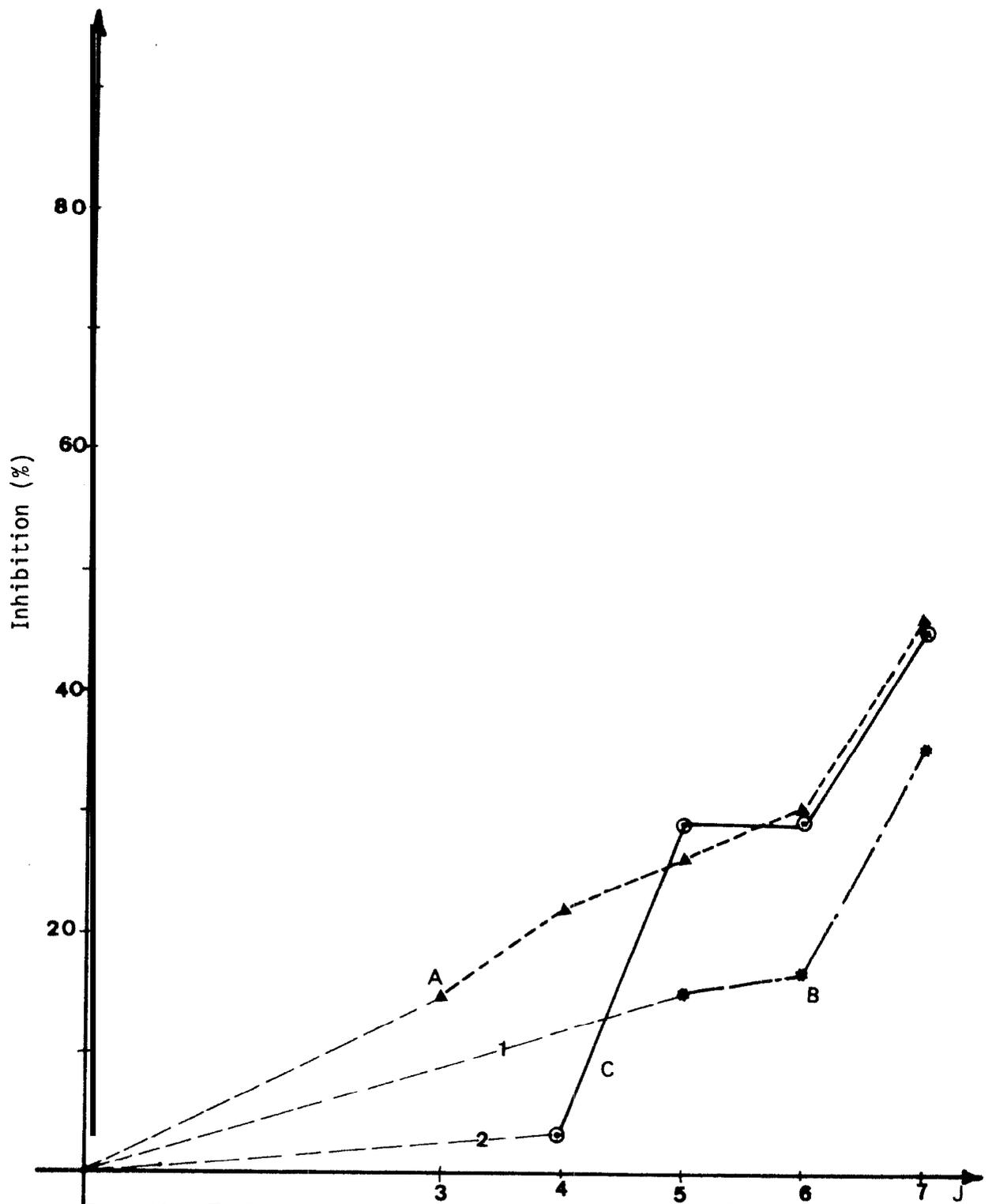


Fig. 18 - Evolution du pourcentage d'inhibition de la croissance en surface (cm^2) de *P1. oryzae* par *T5. viride* (A) ; *C1. globosum* (B) ; *M1. verrucaria* (C) au cours d'une confrontation simultanée et en fonction du temps ; PCA/25°C/pH₀ 5,55/obscurité.

signifie qu'à pH 3,50, le parasite a été très précocement bloqué et envahi par *T₅. viride* dont la vitesse de croissance, la précocité et l'intensité de conidiogénèse sont peu ou pas modifiées par le voisinage parasite ; *T₅. viride* exerce en retour une action radicale sur *P₁. oryzae*.

A ce même pH 3,50, l'inoculum suppose de *P₁. oryzae* se développe normalement s'il est issu d'une confrontation avec *M₁. verrucaria* cependant que, dans le cas de *C₁. globosum* on voit se développer une colonie dont un secteur correspond au parasite et un autre au *C₁. globosum*.

▪ A pH 5,55, l'inoculum engendre un développement normal de *P₁. oryzae* sauf dans le cas d'une confrontation avec *C₁. globosum* où nous observons une évolution sectorielle comme à pH 3,50.

▪ Evaluation de l'intensité de la conidiogénèse de *P₁. oryzae* confronté simultanément avec les germes "antagonistes".

Nous prélevons 7 disques inoculum de diamètre standard (6 mm) que nous introduisons dans 4 ml d'eau distillée stérile ; nous ajoutons une quinzaine de billes de verre et agitons vigoureusement ; l'appréciation de l'intensité de la conidiogénèse se fait à l'hématimètre de MALASSEZ tant du côté proximal de la colonie de *P₁. oryzae* que du côté distal par rapport à la colonie "antagoniste".

Chaque valeur du tableau 26 chiffrant les résultats observés est une moyenne de 3 mesures.

Souches croisées avec <i>P₁. oryzae</i>	<i>P₁. oryzae</i> x 0=T		<i>T₅. viride</i>		<i>C₁. globosum</i>		<i>M₁. verrucaria</i>		
	pH	3,50	5,55	3,50	5,55	3,50	5,55	3,50	5,55
Conidiogénèse nb/ml									
Proximal		17 600	12 000	-	26 600	21 300	18 600	3 000	7 300
Distal		17 600	12 000	-	23 300	12 000	72 000	6 000	8 000

Tableau 26 - *P₁. oryzae* : intensité de la conidiogénèse au cours d'une confrontation simultanée avec les germes "antagonistes" ; PCA/25°/16 jours/obscurité continue.

L'absence de conidies de *P₁. oryzae* englobé par *T₅. viride* à pH 3,50 traduit la destruction précoce du parasite ou la perte **définitive** de sa capacité de se reproduire **après** invasion par le germe "antagoniste".

CHAPITRE TROISIEME

ESSAI D'INTERPRETATION DU PHENOMENE D'ANTAGONISME *in vitro*

I - REMARQUE PRELIMINAIRE

A la lumière des expériences de base, nous avons établi une RESTRICTION imposée à la croissance du parasite par les germes que désormais, nous appellerons ANTAGONISTES (suppression des guillemets) puisque s'opposant à la croissance du parasite ; les observations réalisées nous permettent à priori, d'affirmer que l'inhibition exercée par les germes antagonistes implique au moins deux mécanismes :

- une action à distance intervenant très **précocement** dans le cas de conditions expérimentales favorables au *M₁. verrucaria* ou au *C₁. globosum* et qui serait due à la production par les germes **précités**, de substances **très** diffusibles pouvant migrer depuis leur site de production pour aller agir à distance sur la colonie du parasite avant **même** que le contact ne soit établi entre les 2 **inoculats**,

- une action par contact due à une barrière physique **édifiée** par deux germes dont les mycelia ne sont pas miscibles ; ce type d'action qui prédomine chez *T₅. viride* s'expliquerait partiellement aussi par la production de composés **inhibiteurs** peu ou pas diffusibles, ne se manifestant donc que **très** tardivement,

- enfin, **une** action régie par la conjugaison des 2 modes d'actions précédents ; les substances produites ayant chacune ses **caractères** et son pouvoir "mi grateur" propres.

Dans ce qui suit, nous nous proposons d'établir l'existence de telles substances sur la base d'expériences réalisées en milieux solide et liquide.

II - CONFRONTATION DU PARASITE ET DES GERMES ANTAGONISTES SUR MILIEU SOLIDE

2.1 - Confrontation différée du parasite avec les germes antagonistes

Le principe repose sur le fait que l'inhibition exercée par les germes antagonistes est régie par la production de facteurs inhibiteurs de la croissance du parasite ; ainsi, lorsque le germe antagoniste se développe sur un substrat nutritif gélosé préalablement tapissé d'une feuille de cellophane (cf annexe technique n° 5), lesdits facteurs sont sensés diffuser à travers cette paroi "sélective" et migrer dans le milieu nutritif ; l'élimination de la feuille de cellophane ainsi que celle de la colonie antagoniste après 48 heures d'incubation et l'inoculation immédiate du parasite permet de révéler, par mesure de la croissance radiale mycélienne du parasite, l'implication ou la non implication de facteurs inhibiteurs vis-à-vis du parasite et ce, par rapport à un témoin.

Dans cette expérience, les inoculats sont issus de cultures sur PCA âgées de 3 à 4 jours/25°C/obscurité continue ; les 2 valeurs de pH sont de 3,65 et 6,20.

2.1.1 - Résultats

Traitements	Γ = Sel x C		<i>T₅. viride</i>		<i>C₁. globosum</i>		<i>M₁. verrucaria</i>		
	pH	3,65	6,20	3,65	6,20	3,65	6,20	3,65	6,20
Age (j)									
3		20,5	20,2	15,5 (S)	19,5 (NS)	16,8 (S)	15,5 (S)	9,0 (S)	14,5 (S)
4		27,9	27,6	22,0 (S)	27,0 (NS)	22,9 (s)	24,3 (S)I	14,8 (S)	20,8 (S)
5		35,7	34,7	28,2 (S)	33,5 (NS)	29,9 (s)	30,7 (s)	21,5 (S)	27,4 (S)
6		41,3	40,3	34,6 (S)	39,2 (NS)	36,7 (S)	37,1 (NS)	26,7 (S)	3397 (S)
7		49,1	47,7	41,7 (S)	47,4 (NS)	44,0 (s)	44,8 (NS)	33,6 (S)	4196 (S)
Précocité conidiogénèse		4e et 5e j	4e et 5e j	4e et 5e j	4e et 5e j	4e et 5e j	4e et 5e j	4e et 5e j	4e et 5e j

Tableau 27 - *P₁. oryzae* : croissance radiale (mm) au terme d'une confrontation différée avec les germes antagonistes ; PCA/25°C/obscurité continue ; moyennes établies à partir de 5 boîtes de Petri.

La signification relative de ces résultats est matérialisée par (S) ou (MS) conformément à la convention établie ; afin de ne pas surcharger ce tableau, nous avons volontairement omis d'inscrire chacune des valeurs de U observée et comparée à $U_{0,05}$: 2.

2. 1. 2 - Observations

2. 1. 2. 1 - Examen macroscopique : (Planche n° IV)

Après élimination de la cellophane et de la colonie antagoniste, nous observons que le substrat est coloré en fonction du germe antagoniste et du pH ; ainsi :

- le substrat est teinté en brun **rôsatre pâle** à ocre jaune sur PCA (a pH 6,20 notamment) pour *T₅. viride*,
- *C₁. globosum* engendre une teinte jaunâtre à pH 3,65 et d'un blanc crémeux à pH 6,20,
- *M₁. verrucaria* laisse une teinte d'un blanc cendré plus ou moins verdâtre pour les deux valeurs de pH.

En dehors des différences de vitesses, de croissance des colonies du parasite en fonction de la nature du "précédent" nous n'observons aucun caractère particulier concernant la colonie de *P₁. oryzae*.

2. 1. 2. 2 - Examen microscopique (après 6 jours d'incubation) (Planche n° V)

- *P₁. oryzae* x *T₅. viride* : à pH bas, nous observons un épaissement mycélien ainsi que des filaments mycéliens fortement entrelacés donnant par endroit des "pelotes isolées" formées par l'**enchevêtrement** plus ou moins **globoïde** du **filament**.
- *P₁. oryzae* x *C₁. globosum* : certains filaments mycéliens sont fortement épaissis ; d'autres le sont **moins** mais sont soit agglomérés longitudinalement, soit contournés.
- *P₁. oryzae* x *M₁. verrucaria* : filaments mycéliens fortement entrelacés longitudinalement ou **contournés** sur **eux-mêmes** ; parfois, nous observons des cellules mycéliennes fortement épaissies se désarticulant facilement et **inten-**

sément **colorables** par le bleu coton ; nous avons enfin observe des torsades.

2.1.3 - Expression numérique des résultats

Sur la base du tableau 27, nous avons évalué les pourcentages d'inhibition correspondants exercés par les germes antagonistes sur le parasite en fonction du temps et par rapport au témoin ; les **résultats** sont **consignés** dans le tableau 28.

Traitements		<i>T₅. viride</i>		<i>C₁. globosum</i>		<i>M₁. verrucaria</i>	
Age (j)	pH	3,65	6,20	3,65	6,20	3,65	6,20
	3		24	3	18	23	56
4		21	2	17	11	46	24
5		21	3	16	11	39	21
6		16	2	11	7	35	16
7		15	0,6	10	6	31	12

Tableau 28 - *P₁. oryzae* : pourcentage d'inhibition **exercée** par les germes antagonistes au cours d'une confrontation **différée**, par rapport au témoin et en fonction du délai d'incubation ; PCA/25°/obscurité continue.

2.1.4- Expression graphique : discussion

Il nous faut préciser que la compréhension de ces **résultats** exige que nous tenions compte de la nature du substrat nutritif : la production d'antibiotiques serait plus importante sur milieu riche que sur milieu pauvre (WRIGHT, 1952) ; de plus, il y aurait une **corrélation** entre action restrictive des antibiotiques et **compétition** trophique ; cela signifierait qu'une inhibition partielle de la croissance du parasite serait imputable à un épuisement de **nutriments** du milieu ; il semble que l'implication d'une compétition trophique soit peu probable en raison d'abord de la richesse relative du milieu (PCA), ensuite des périodes d'incubation relativement courtes (48 heures) du germe **an-**

tagoniste. Cette hypothèse serait à fortiori à écarter quand on sait que la stimulation de la croissance du parasite a été observée dans certains cas.

L'inhibition de la croissance du parasite serait donc le fait des seuls facteurs diffusibles produits par les antagonistes et ayant **migré** au travers de la "paroi sélective" qu'est la feuille de cellophane (facteurs de croissance dans le cas d'une stimulation).

Cela dit, nous allons tenter d'interpréter le tableau 28 et les courbes (fig. 19) matérialisant les résultats établis expérimentalement :

Dans tous les cas, nous observons une décroissance du pourcentage d'inhibition en fonction du temps ; cela signifie que le parasite, fortement bloqué au départ finit avec le temps par acquérir une croissance meilleure, quasi normale ; la différence de croissance observée par rapport au **témoin** relevant à la limite du seul retard de croissance imposé par les facteurs antagonistes **diffusibles imprégnant** le substrat trophique.

Nous pensons que cette réduction du pourcentage d'inhibition est en relation avec le délai d'incubation (48 heures) du germe antagoniste : les facteurs diffusibles produits par les germes antagonistes au bout de 48 heures n'imprégnant le substrat nutritif que dans une aire définie et **fonction** de la vitesse de migration propre aux substances impliquées à condition par ailleurs, que chacun de ces facteurs soit doté d'une stabilité satisfaisante ; autrement dit, des délais d'incubation progressivement plus importants des germes antagonistes auraient probablement eu pour corollaire, une répartition plus importante des facteurs diffusibles sur le milieu nutritif et partant, **auraient** engendré une décroissance moins prononcée du pourcentage d'inhibition de la croissance du parasite :

M₁. verrucaria manifeste une très nette **supériorité** sur les autres germes ; ce germe qui nous est apparu secondaire (probablement en raison de sa vitesse de croissance faible) au cours d'une confrontation simultanée, se révèle ici des plus efficace et partant serait celui qui produit la ou les substances les plus actives contre le parasite qui nous préoccupe ; à moins toutefois que les facteurs diffusibles engendrés par *M₁. verrucaria* ne soient relativement plus stables (donc plus viables) que ceux liés à *T₅. viride* ou *C₁. globosum*.

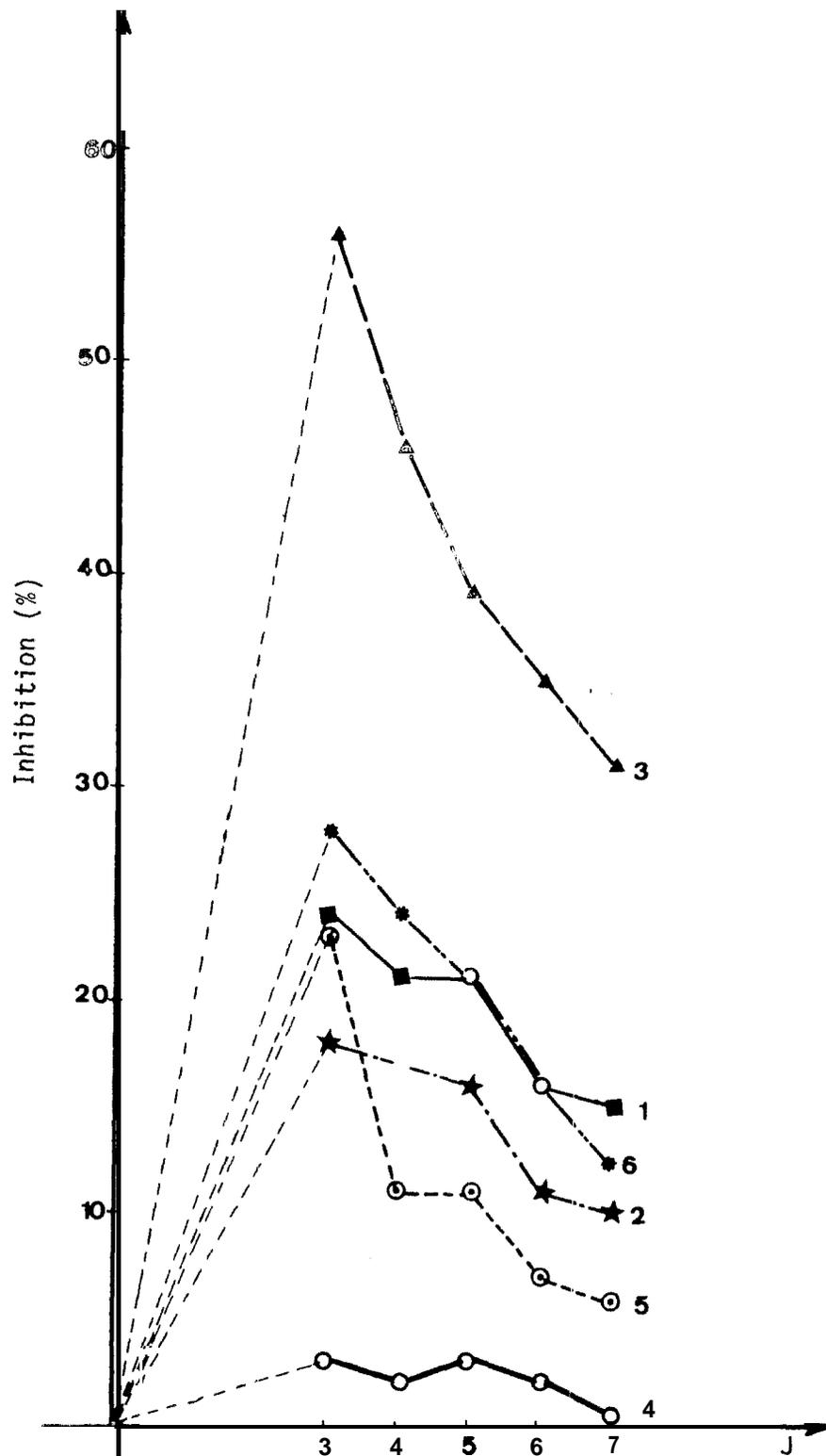


Fig. 19 - Evolution du pourcentage d'inhibition exercée par *T5. viride* (1 et 4) ; *C. globosum* (2 et 5) ; *M₁. verrucaria* (3 et 6₃) au cours d'une confrontation différée par rapport au témoin et en fonction du temps ; PCA/25°C/obscurité. pH₀ = 3,65 pour (1), (2) et (3) ; pH₀ = 5,20 pour (4), (5) et (6).

2.2 - Conjugaison des confrontations simultanée et différée (CS x CD) du parasite avec les germes antagonistes (Planches n° VI et VII)

A la lumière des expériences **précédemment** rapportées, nous nous proposons d'étudier le cas d'une association entre les 2 techniques de confrontations ; ainsi *P₁. oryzae* est confronté en différé à *M₁. verrucaria* et en simultané à *C₁. globosum* et/ou *T₅. viride* (cf annexe technique n° 5) ; l'appréciation des résultats se fait par rapport à 2 témoins, l'un (T₁) correspond au développement de *P₁. oryzae* seul ; l'autre (T₂) représente le développement de *P₁. oryzae* en différé avec *M₁. verrucaria*.

2.2.1 - Résultats

Traitements	T ₁ =Se ₁ x0="FRANC"		T ₂ =(3)λSe ₁		(3)λ[Se ₁ x(1)]		(3)λ[Se ₁ x(2)]		(3)λ[Se ₁ x(1)(2)]	
pH	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0
Age (j)										
3	2,10	2,14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	3,38	3,44	0,0	0,64	0,0	0,0	0,0	0,60	0,0	0,48
5	5,32	5,46	0,54	1,42	0,0	0,0	0,0	0,90	0,0	0,62
6	7,44	7,82	1,06	2,44	0,0	0,78	0,2	1,06	0,0	0,76
7	10,413	10,62	1,45	3,76	0,0	1,58	0,21	1,10	0,0	0,94

Tableau 29 - *P₁. oryzae* : croissance en surface (cm') au cours de la conjugaison des confrontations différée (=λ) [par rapport à *M₁. verrucaria* (3)] et simultanée (=x) [par rapport à *T₅. viride* (1) et/ou *C₁. globosum* (2)] ; PCA/25°C/obscurité continue.

Chacune de ces valeurs moyennes est calculée sur la base de 5 boîtes de Petri.

L'expression numérique des résultats, ayant été faite par rapport à T₁ et par rapport à T₂, la signification statistique des résultats ci-dessus est rattachée aux tableaux 30 et 31.

2. 2. 2 - Expression numérique des résultats

292. 2. 1 - Relativement au témoin : $T_1 = P_1. \text{oryzae} \times 0$

Traitements		(3) λ [Se ₁ x(1)]		(3) λ [Se ₁ x(2)]		(3) λ [Se ₁ x(1)(2)]	
Age (j)	pH	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0
	3		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4		100,0	100,0	100,0	82,5	100,0	86,0
5		100,0	100,0	100,0	83,5	100,0	88,6
6		100,0	90,0	97,3	86,4	100,0	90,3
7		100,0	85,1	98,0	89,6	100,0	91,1

Tableau 30 - *P1. oryzae* : évolution du pourcentage d'inhibition de la croissance en surface (cm²) par les germes antagonistes au cours d'une conjugaison des confrontations différée (=λ) [par rapport à *M1. verrucaria* (3)] et simultanée (=x) [par rapport à *T5. viride* (1) et/ou *C1. globosum* (2)] et par rapport au témoin T₁ (*P1. oryzae* λ 0) ; PCA/25°/obscurité continue.

Toutes les valeurs de U₀ calculées d'après le test U de MANN et WITHNEY sont nulles ; U_{0,05} étant égale à 2 → toutes les différences observées par rapport à T₁ sont significatives et traduisent une action significative des germes antagonistes dans ce type de confrontation.

2.2.2.2. - Relativement à T₂ = Se₁ λ (3)

Traitements		(3) λ [Se ₁ x(1)]		(3) λ [S ₂ x(2)]		(3) λ [Se ₁ x(1)(2)]	
Age (j)	pH	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0
	3		-	-			-
4		-	100,0 (S)		6,2 (NS)	-	25,0 (NS)
5		100,0 (S)	100,0 (S)	100,0 (S)	36,6 (S)	100,0 (S)	56,3 (S)
6		100,0 (S)	68,0 (S)	81,1 (S)	56,5 (S)	100,0 (S)	68,4 (S)
7		100,0 (S)	58,0 (S)	85,5 (S)	70,7 (S)	100,0 (S)	75,0 (S)

Tableau 31 - *P1. oryzae* : Evolution du pourcentage d'inhibition de la croissance en surface (cm²) par les germes antagonistes au cours d'une conjugaison de confrontations différée (=λ) [par rapport à *M1. verrucaria* (3)] et simultanée (=x) [par rapport à *T5. viride* (1) et/ou *C1. globosum* (2)] et relativement au témoin T₂ [*P1. oryzae* A (3)] ; PCA/25°/obscurité continue.

Remarques : - Les cases matérialisées par des tirets (-) correspondent à des valeurs indéterminées puisque ni T_2 ni l'essai ne se développent ; ce qui donne le rapport $\frac{0}{0}$.

- Seuls deux pourcentages d'inhibition ne correspondent pas à des valeurs significativement différentes ; le pourcentage de 6,2 % correspond à un $U_0 = 9,5$ et celui 25,0 à $U_0 = 9$; d'où la non signification qui se rattache à ces deux valeurs.

- Partout ailleurs, $U_0 = 0$.

2. 2. 3 - Expression graphique (fig. 20) : discussion

2. 2. 3. 1 - Par rapport à T_1

Les diagrammes A, B et C comparés au témoin T_1 révèlent l'action globale des germes antagonistes ; cette action est plus vigoureuse à pH 4,10 qu'à 6,0.

Relativement à pH 4,10, le diagramme (A) montre qu'aucune croissance du parasite n'est perceptible pendant toute la durée de l'expérience (100 % d'inhibition) ; cela tient à la conjugaison de deux facteurs :

- une action retardatrice de la croissance du parasite exercée par les substances inhibitrices produites par *M₁. verrucaria*,

- une action régie par *T₅. viride* qui, agissant avant démarrage de la croissance du parasite intervient très précocement (en raison de sa vitesse de croissance notamment) pour annihiler complètement toute velléité de développement de la colonie du parasite.

Ceci est à fortiori valable dans le cas du diagramme (C) puisqu'à celle de *T₅. viride*, semble s'ajouter l'action de *C₁. globosum* ; ce diagramme comparé à (A) et (B) révèle une action de *C₁. globosum* plus faible que celle de *T₅. viride* intervenant seul (A) ou en association simultanée avec *C₁. globosum* (C).

En toute rigueur, nous devrions parler de l'action exercée sur *P₁. oryzae* par la RESULTANTE des interactions de tous les germes associés (aussi bien en différé qu'en simultané) y compris le parasite.

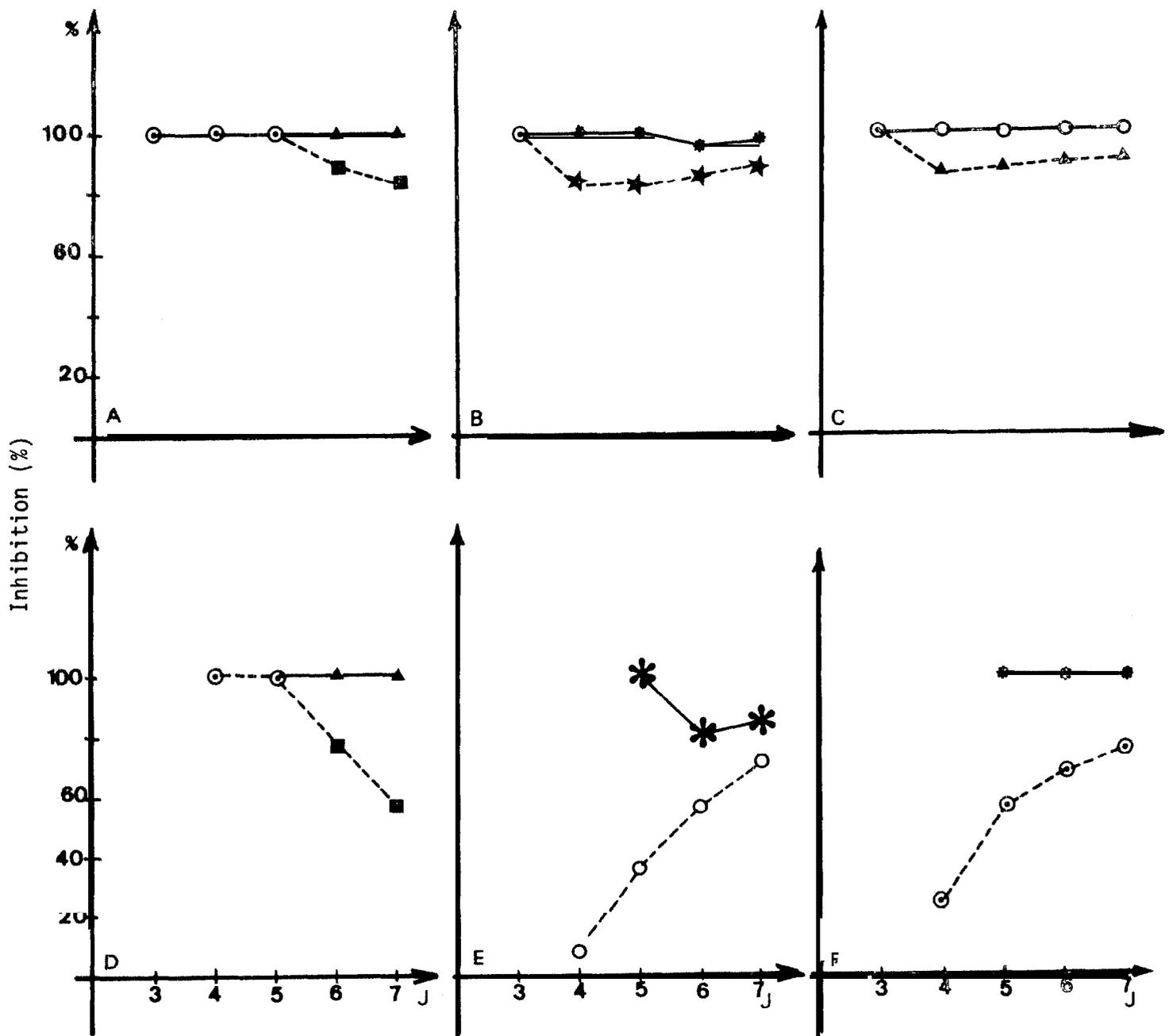


Fig. 20 - *P. oryzae* : Inhibition (%) de la croissance en surface (cm^2) par les germes antagonistes intervenant en confrontations différée ($=\lambda$) [par rapport à *M1. verrucaria* (3)] et simultanée ($=x$) [par rapport à *T5. viride* (1) et/ou *C1. globosum* (2)] ;

A et D = (3) λ [*P1. oryzae* x (1)]
 B et E = (3) λ [*P1. oryzae* x (2)]
 C et F = (3) λ [*P1. oryzae* x (1)(2)]

A, B, C exprimés par rapport au témoin Franc T1 = Sel $\lambda 0$
 D, E, F exprimés par rapport au témoin T2 = Se1 λ (3)

— pH₀ = 4,10
 - - - - - pH₀ = 6,0

2. 2. 3. 2 - Par rapport à T₂

- En raison des valeurs indéterminées du pourcentage d'inhibition **en-deça** d'un certain délai d'incubation (4 et 5 jours pour pH 6,0 et pH 4,10 respectivement), nous n'avons pu figurer les points correspondants aux abscisses 3 et 4 jours sur les **diagrammes** D, E et F.

- L'inhibition constante de 100 % observée en (D) et (F) pour pH 4,10 témoigne de la supériorité de l'action conjuguée des germes correspondants sur l'action isolée exercée par *M₁. verrucaria* en T₂ sur le parasite : ~~le~~ dernier poussant en T₂ alors qu'il demeure bloqué à 100 % dans les cas précités.

Quant à la chute de pourcentage d'inhibition manifestée en (E) pour le pH 4,10 en présence de *C₁. globosum*, nous pensons qu'elle traduit soit un phénomène d'accoutumance du parasite, soit plus probablement, **qu'au-delà** d'un certain délai d'incubation, la synergie préalablement établie s'estompe en raison du caractère relativement fugace des métabolites propres à *M₁. verrucaria* ; *C₁. globosum*, agissant alors seul, devient relativement moins efficace ; cette hypothèse nous **paraît** la plus probable puisque **déjà** nous avons observé une telle tendance sur le diagramme B.

- pH 6,0 : le diagramme (D) montre une décroissance du pouvoir inhibiteur des germes antagonistes associés ; mieux que nulle autre, cette observation prouve encore une fois la supériorité de *M₁. verrucaria* sur les autres pour ce type de confrontation : au 5e jour, l'action des métabolites caractéristiques de *M₁. verrucaria* s'estompant, *T₅. viride* ne parvient pas à maintenir l'action antagoniste au seuil de 100 %.

Par contre, les diagrammes (E) et (F) correspondent à un pouvoir inhibiteur initialement faible mais qui va croissant ; cela tient à plusieurs éléments :

, d'abord du fait que *P₁. oryzae* possède ici une croissance plus *vigoureuse* qu'à pH 4,10,

, ensuite en raison du pH élevé qui exclut pratiquement toute intervention efficace de *T₅. viride*,

, enfin, nous observons que la conjugaison de tous ces facteurs parvient à **imposer** une restriction de la croissance du parasite.

Remarque : la comparaison **des diagrammes** établis par rapport à T₁ et ceux **établis** par rapport à T₂ devrait nous permettre d'apprécier l'action conjuguée des germes *C₁. globosum* et *T₅. viride* au cours d'une confrontation simultanée ; nous aborderons ce problème par le biais de l'action du **mélange** des filtrats de culture des germes antagonistes sur le parasite en milieu gélosé ; encore qu'on puisse nous objecter qu'intervient ici non pas la somme arithmétique des actions des germes antagonistes mais l'action résultant des germes **précités** agissant en conjonction avec *M₁. verrucaria*.

2.3 - Essai de mise en évidence de la production d'antibiotiques en milieu liquide croissance **radiale** (mm) **mycélienne** du parasite confronté au filtrat ou mélange de filtrats de cultures liquides des germes antagonistes

Le principe consiste pour chaque pH à confronter, en milieu solide, le parasite avec le filtrat brut ou autoclave et au mélange de filtrats de cultures des germes antagonistes ; la méthode est décrite dans l'annexe technique n° 5.

Les cultures liquides des germes antagonistes sont **préalablement** incubées à 25°/obscurité continue pendant 13 jours sur PC tamponné à pH 3,65 et 5,90.

Les cultures sont alors préfiltrées et **filtrées** stérilement avant de servir aux diverses préparations.

La croissance radiale (mm) du parasite est évaluée en fonction du temps à 25°/PCA tamponné à pH 3,65 et 5,90 au bout de 4, 6 et 10 jours à l'obscurité continue.

2.3.1 - Résultats

Tableaux 32 et 33.

Traitements	zero = 1				<i>T5. viride</i> (1)				<i>C1. globosum</i> (2)				<i>M1. verrucaria</i> (3)				Traitements
pH ₀ cult. antagon.	3,65		5,90		3,65		5,90		3,65		5,90		3,65		5,90		pH ₀ cult. antagon.
Type filtrat pH ₀ PCA(=SC)	FB	FA	FB	FA	FB	FA	FB	FA	FB	FA	FB	FA	FB	FA	FB	FA	Type filtrat Age (j)
4,10	27,9	27,8	27,6	29,4	28,2	28,4	27,0	29,1	25,1	28,0	27,6	28,3	22,7	25,8	21,0	24,9	4
6,0	26,5	30,0	27,7	28,4	26,8	29,6	28,2	28,2	24,6	28,8	27,7	29,2	22,4	25,2	23,6	29,2	
4,10	49,1	48,6	49,7	49,6	49,2	48,3	49,4	50,2	47,8	48,9	47,7	48,9	44,9	45,3	44,6	44,5	6
6,0	44,1	52,2	50,4	48,8	48,2	50,3	47,2	50,0	49,3	50,4	50,0	51,6	45,3	46,9	49,2	50,5	
4,10	70,4	71,2	72,4	72,2	71,0	68,8	70,2	71,9	70,6	70,3	71,2	69,8	69,2	67,4	66,8	66,4	10
6,0	73,2	75,0	74,2	70,6	70,1	71,7	67,8	72,0	71,0	74,0	73,2	74,0	70,2	70,0	69,0	74,0	

Tableau 32 - *P1. oryzae* : croissance radiale (mm) au cours d'une confrontation avec les filtrats bruts (FB) ou autoclavés (FA) des germes antagonistes préalablement incubés sur milieu liquide à 25°C pendant 13 j/pH 3,65 et 5,90/obscurité continue. Le substrat de confrontation est le PCA ajusté à pH 4,10 et 6,0 et placé à 25°C/obscurité continue.
Chaque valeur est une moyenne établie à partir de 5 boîtes de Petri.

Traitements	Zéro = T		(1)+(2)		(1)+(3)		(2)+(3)		(1)+(2)+(3)	
cult. antagon. pH ₀	3,65	5,90	3,65	5,90	3,65	5,90	3,65	5,90	3,65	5,90
pH ₀ PCA	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0
Age (j)										
4	27,8	28,4	20,0	25,2	20,0	25,5	20,0	23,8	20,8	25,0
6	48,6	48,8	39,0	44,8	38,4	45,0	38,6	43,4	39,0	43,6
10	71,2	70,6	60,0	68,4	58,8	69,0	59,0	65,0	60,0	66,1

Tableau 33 - *P₁. oryzae* : croissance radiale (mm) au cours d'une confrontation avec le mélange (volume à volume) des filtrats de culture autoclavés des germes antagonistes préalablement incubés sur milieu liquide à 25°C pendant 13 j/pH 3,65 et 5,90/obscurité continue : (1) = *T₅.viride* ; (2) = *G. globosum* ; (3) = *M₁. verrucaria*.
Le substrat de confrontation est le PCA ajusté à pH 4,10 et 6,0 et placé à 25°C/obscurité continue.
Chaque valeur est une moyenne établie à partir de 5 boîtes de Petri.

2.3.2 - Discussion

- L'examen direct des résultats ne révèle à priori aucune différence manifeste au cours de l'action des filtrats de culture simples par rapport au témoin ; nous n'avons pas, pour cette raison, jugé utile d'évaluer les pourcentages d'inhibition et la signification correspondants.

Cependant, étant donné l'action très nette précédemment établie des germes antagonistes sur le parasite (CS ; CD ; CD A CS) nous nous posons la question de l'adéquation de la technique utilisée pour le type de matériel biologique dont nous sommes partis ; expérimentant en milieu solide, nous ne pouvons déposer qu'un volume limité de filtrats de cultures antagonistes dans la cavité aménagée au milieu du substrat de confrontation ; ce volume étant fixé de manière à ce que le disque inoculum du parasite, une fois déposé dans cette cavité, le liquide préalablement introduit ne déborde que très légèrement de son site, d'où un retard de croissance très bref ou nul qui explique que des différences notables ne soient pas observables par rapport au témoin.

- Quant aux mélanges de filtrats autoclavés (mélange après autoclavage), ils semblent induire une inhibition appréciable mais leur action est difficile

à interpréter ; nous ignorons en effet tout des 'actions et interactions pouvant exister entre les composantes d'un type de filtrat et à fortiori du mélange de filtrats.

Outre l'action inhibitrice qui devrait se manifester dans les **filtrats de cultures**, nous devrions, pour la compréhension du **phénomène**, tenir compte des **modifications, notamment** de pH, imposées au milieu par les germes inoculés : nous avons **déterminé** les pH **après** 13 jours d'incubation dans les conditions expérimentales et avons observé une notable évolution (cf tableau 34).

pH ₀ = 3,65	Germes antagonistes	pH ₀ = 5,90
4,20	Zéro = T	6,10
6,20	<i>T₅. viride</i>	6,95
3,80	<i>C₁. globosum</i>	5,65
6,50	<i>M₁. verrucaria</i>	7,15

Tableau 34 ▪ Devenir des pH initiaux du milieu de culture (PC) inoculé par *T₅. viride*, *C₁. globosum*, *M₁. verrucaria* et incubé 13 jours à 25°/obscurité continue.

Le faible taux d'inhibition apparaissant sur le tableau 32 relèverait donc simultanément du pH₀ et de la nature qualitative et quantitative (concentration) des produits dérivés du métabolisme des germes concernés.

Dans l'expérience qu'à présent nous envisageons, nous allons inoculer directement le parasite sur le filtrat ou mélange de filtrats de cultures liquides des germes antagonistes.

III - CONFRONTATION DU PARASITE ET DES GERMES ANTAGONISTES SUR MILIEU LIQUIDE : croissance pondérale (mg) du parasite incubé sur filtrat ou mélange de filtrats de cultures des germes antagonistes

Par l'expérience précédente, nous voulions expliquer le mode d'ac-

tion des antagonistes par la production de principes actifs inhibiteurs de *P₁. oryzae* et juger de l'efficacité relative des différents traitements ; au vu des résultats, la technique ne nous a pas parue adéquate ; nous allons tenter dans le même esprit, d'aborder le même problème par une autre voie.

L'idéal aurait probablement été de réaliser une culture liquide simultanée des germes à confronter par l'usage d'un système d'ermeneyer jumelés communiquant par une tubulure latérale comportant une paroi sélective perméable aux seuls métabolites produits par l'un quelconque des microorganismes (cf annexe technique n° 6) ; en raison de contraintes matérielles, nous avons réalisé la culture du parasite sur le filtrat ou mélange de filtrats de cultures des germes antagonistes (méthode décrite dans l'annexe technique n° 6) ; afin de déterminer l'âge optimum des cultures antagonistes induisant l'inhibition maximum, nous avons expérimenté à partir de filtrats de cultures âgées de 5, 9 et 29 jours.

Le tableau 35 rend compte des résultats observés.

3.1 - Résultats

Age (j) Cult. liq. antago.	5		9		29	
pH_0 Cult. antago. Traitements	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0
Zéro = T	23,966	42,500	32,050	42,000	30,300	43,300
(1)	20,733	21,900	10,100	14,366	7,833	38,766
(1)+(2)	16,200	16,100	9,133	14,133	16,000	51,566
(1)+(3)	31,633	30,533	12,500	26,450	33,233	11,266
(1)+(2)+(3)	27,833	50,100	8,500	41,300	23,833	21,366
(2)	17,866	13,133	8,450	14,366	40,400	21,600
(2)+(3)	25,900	23,000	7,500	7,033	39,300	12,966
(3)	18,266	31,866	6,066	25,100	14,466	8,100

Tableau 35 - *P₁. oryzae* : croissance mycélienne pondérale (mg) en fonction de l'âge et du type de filtrat ou mélange de filtrats de cultures liquides de *T₅. viride* (1), *C₁. globosum* (2) et *M₁. verrucaria* (3) ; les cultures antagonistes sont âgées de 5, 9 et 29 jours, à 25°C/obscurité continue ; le milieu de culture est le PC dont le pH_0 après autoclavage est de 4,10 et 6,0 ; *P₁. oryzae* inoculé sur les diverses préparations est incubé 10 jours à 25°C/obscurité continue.

Chaque valeur de ce tableau est une moyenne établie à partir de 3 erlenmeyer renfermant **chacun** environ 30 ml de préparation (mélange volume à volume).

3.2 - Expression numérique des résultats

Age (j)		5		9		29	
Cult. liq.	antago.						
Traitements	pH ₀	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0
	Cult. antago.						
(1)		13,4	48,4	68,4	66,6	74,1	10,4
(1)+(2)		<u>32,4</u>	62,1	71,5	66,3	47,1	(-) <u>19,0</u>
(1)+(3)		(-) <u>31,9</u>	28,1	<u>60,9</u>	37,0	(-) 9,6	73,9
(1)+(2)+(3)		(-) 16,1	(-) <u>17,8</u>	73,4	<u>1,6</u>	21,3	50,6
(2)		25,4	<u>69,0</u>	73,6	65,7	(-) <u>33,3</u>	50,1
(2)+(3)		(-) 8,0	45,8	76,5	<u>83,2</u>	(-) 29,7	70,0
(3)		23,7	25,0	<u>81,0</u>	40,2	52,2	<u>81,2</u>

Tableau 36 - *P₁. oryzae* : pourcentage d'inhibition de la croissance **mycélienne** pondérale en fonction de l'âge et du type de filtrat ou **mélange** de filtrats de cultures liquides de *T₅. viride* (1), *C₁. globosum* (2) et *M₁. verrucaria* (3).

Les caractéristiques et valeurs ayant servi à la confection des présents résultats, sont **consignés** dans le tableau 35.

3.3 - Expression graphique (fig. 21 et 22) : discussion

3.3.1 - Relativement au pH₀ 4,10 : (fig. 21)

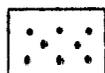
- De façon générale, les préparations issues de cultures **antagonis-**tes âgées de 9 jours manifestent une remarquable inhibition (supérieure à 60 % quel que soit le traitement) ; cet âge correspond donc dans notre expérience, à l'optimum pour lequel les germes antagonistes ont élaboré et rejeté dans le

Légende des fig. 21 (pH₀ = 4,10) et 22 (pH₀ = 6,0)

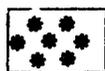
Pyricularia oryzae : pourcentage d'inhibition de la croissance pondérale en fonction de l'âge et du type de filtrat ou mélange de filtrats de cultures liquides de *T₅. viride* (1) ; *C₁. globosum* (2) ; *M₁. verrucaria* (3).



(1)



(2)



(3)



(1)+(2)+(3)



(1)+(2)



(1)+(3)



(2)+(3)

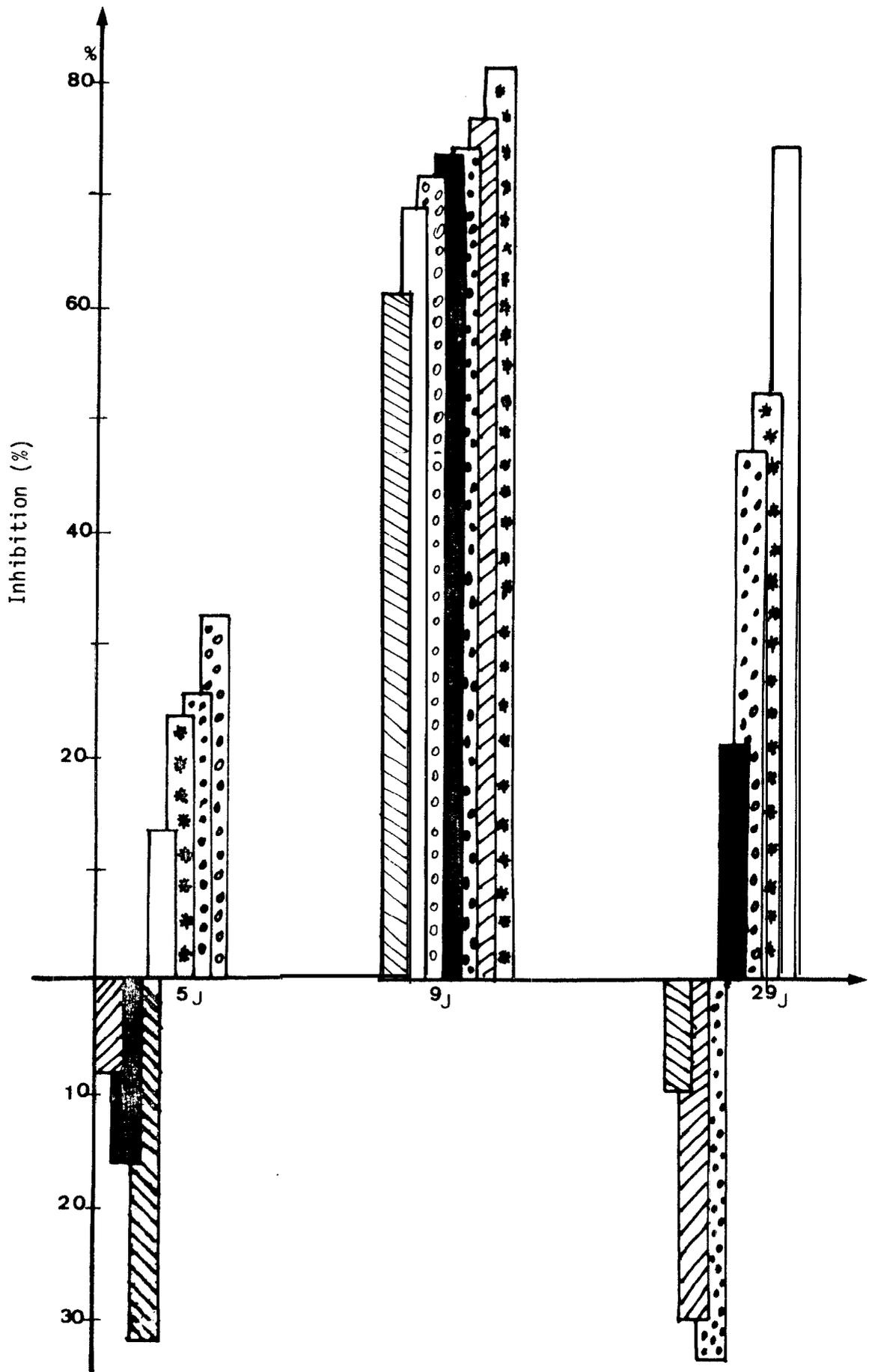


Fig. 21 - *P. oryzae*: pourcentage d'inhibition de la croissance pondérale (mg) en fonction de l'âge et du type de filtrat ou mélange de filtrats de cultures Y liquides de *T5. viride* (1) ; *C1. g lobosum* (2) ; *M1. verrucaria* ; $pH_0 = 4,10$; cf légende ci-contre.

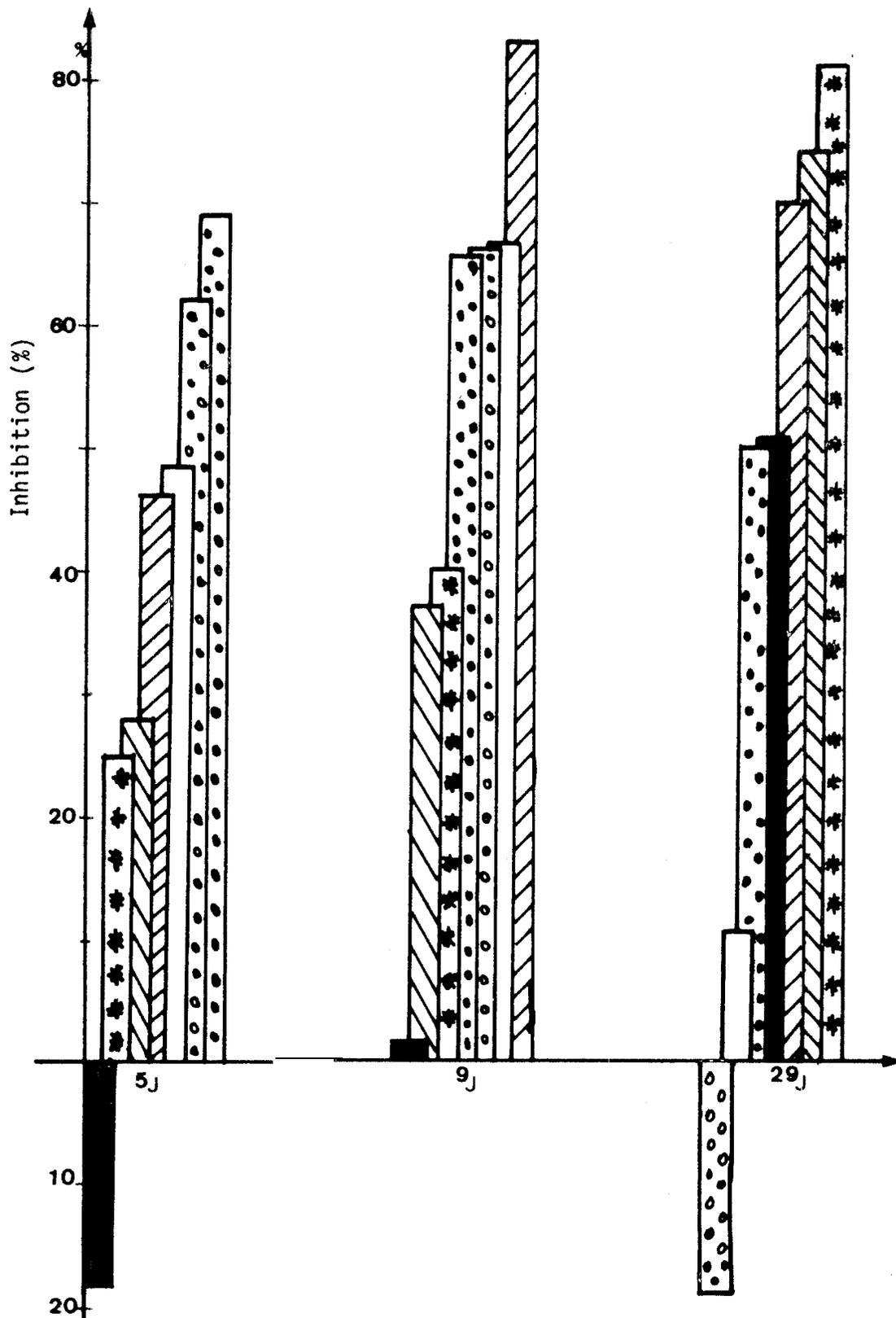


Fig. 22 - *P. oryzae* : Pourcentage d'inhibition de la croissance pondérale (mg) en fonction de l'âge et du type de filtrat ou mélange de filtrats de cul tures liquides de *T₅. viride* (1) ; *C₁. globosum* (2) ; *M₁. verrucaria* (3) ; pH₀ = 6, 0. Prière de se reporter à la légende de la figure 21.

milieu des produits qui, qualitativement et quantitativement, induisent le maximum de restriction de la croissance du parasite.,

Ici également, *M₁. verrucaria* manifeste sa supériorité par rapport à tous les autres traitements.

▪ A l'âge de 5 jours, nous observons une action faible mais positive des germes intervenant isolément ; cependant, une légère synergie se manifeste lorsque nous opérons avec le mélange *T₅. viride* + *C₁. globosum* ; par contre, une baisse notable d'efficacité se révèle dans tous les mélanges impliquant *M₁. verrucaria*; nous pensons expliquer cette neutralisation mutuelle du pouvoir inhibiteur de substances individuellement actives (phénomène d'antagonisme entre les produits considérés) soit par la formation de complexe inactif constitué au terme des interactions des produits mélangés!, soit par une altération partielle résultant de cette **coexistence**, soit à la limite, par l'apparition de nouveaux composés métabolisables par le parasite ; de là l'effet bénéfique concrétisé par une stimulation de la croissance du parasite : c'est ce que nous observons dans le cas du traitement (1)+(3) incluant *T₅. viride* et *M₁. verrucaria* (taux d'inhibition de -31,9 %).

▪ Quant aux traitements issus de cultures âgées de 29 jours, nous observons une action encore "spectaculaire" de *T₅. viride* (74,1 % d'inhibition) par rapport aux autres ; cette "remanence" serait probablement à lier soit au vieillissement très différé des cultures liquides du *Trichoderma*, soit à une relative stabilité des substances inhibitrices propres à ce germe ; à moins que n'intervienne la superposition des deux phénomènes.

Les activités de *M₁. verrucaria* (52,2 %) et du mélange *T₅. viride* + *C₁. globosum* (47,1 %) demeurent encore très satisfaisantes tandis que celles de *C₁. globosum* (-33,3 %) et des mélanges 2 à 2 faisant intervenir *M₁. verrucaria* semblent complètement perdues puisque les préparations correspondantes stimulent la croissance du parasite.

3.3.2 - Relativement au pH₀ 6,0

▪ Pris isolément, les germes antagonistes montrent 2 types de comportements :

• le type *T₅. viride* ou *C₁. globosum* dont l'activité, bonne à 5 jours, pré-

sente un optimum à 9 jours pour ensuite **décroître**,

. le type *M₁. verrucaria* qui **présente** un maximum d'inhibition pour 29 jours.

- L'association *T₅. viride* + *C₁. globosum* induit une inhibition équivalent **à priori à la résultante** des actions isolées des composantes **âgées** soit de 5, soit de 9 jours ; par contre, **à 29 jours**, cette association détermine une chute du pouvoir inhibiteur voire une stimulation de la croissance du parasite (**-19,0 %** pour 29 jours).

- Alors qu'il détermine une perte du taux d'inhibition par rapport à l'action individuelle de *T₅. viride* et *M₁. verrucaria* à 5 et 9 jours, le traitement impliquant ces 2 germes manifeste un effet synergique très puissant à l'âge de 29 jours ; il y aurait là **comme** un effet non pas d'addition mais de "**facilitation**" mutuelle au **sein** du mélange.

- Quant au **binôme** *C₁. globosum* + *M₁. verrucaria*, il extériorise une synergie **à l'âge** de 9 jours et une résultante **très** satisfaisante pour les autres délais d'incubation.

- Enfin, l'action conjuguée de filtrats issus des 3 germes évolue considérablement puisqu'elle passe de (**-16,1 %**) **à (+50,6 %)** lorsque nous allons de 5 à 29 jours.

• Précisons pour terminer, que ces interprétations, comme celles qui suivent, se fondent sur les seuls **résultats** établis par nos **expériences**, sans préjuger du comportement des germes pour d'autres délais d'incubation qu'il aurait certainement été intéressant de tester (notamment entre 9 et 29 jours).

3.3.3 - Remarques

La seule vue GLOBALE des **diagrammes** matérialisant ces résultats suggère le choix du type de **traitement** en fonction de son efficacité relative ; ainsi, nous dirions par **exemple**, qu'à pH₀ **4,10**, l'utilisation de *T₅. viride*, *M₁. verrucaria* ainsi que de l'association *T₅. viride* + *C₁. globosum*, assure une excellente couverture contre le parasite entre 9 et 29 jours notamment ; par contre, toutes les autres combinaisons ne constituent une garantie contre le développement du parasite que pour un délai d'incubation peu différent de 9 jours.

A pH₀ 6,0, *C₁. g loboswn* et l'association *C₁. globosum* t *M₁. verrucaria* et à la limite *T₅. viride* t *M₁. verrucaria* sont efficaces pendant toute la durée de l'expérience tandis que *T₅. viride* et le mélange *T₅. viride* + *C₁. globosum* joueraient un rôle antagoniste remarquable lorsque les cultures sont âgées de moins de 9 jours.

Enfin, l'utilisation du mélange des 3 germes n'est envisageable qu'à partir du 29e jour.

• A la lumière des expériences préliminaires, toute compréhension de ces résultats doit tenir compte de l'évolution observée des pH de base ; le tableau 37 rend compte de cette modification engendrée par les germes antagonistes pour les 3 délais d'incubation.

Germes	Age (j)	5		9		29	
	Cult. antago.						
<i>T₅. viride</i>		4,45	6,20	6,40	6,90	6,65	7,05
<i>C₁. globosum</i>		4,35	6,20	4,50	6,50	4,35	6,30
<i>M₁. verrucaria</i>		5,05	6,35	7,50	7,50	7,35	7,65
Germes	pH ₀	4,10		6,0		4,10	
	Cult. antago.						

Tableau 37 - Evolution du pH de base du milieu liquide sous l'influence des germes antagonistes et en fonction du temps ; PC/pH₀ 4,10 et 6,0/25°C/obscurité continue.

• A l'âge de 29 jours, le vieillissement des cultures antagonistes et partant le déclenchement du phénomène d'autolyse mycélienne doivent introduire des modifications telles qu'il nous est difficile voire impossible de cerner l'origine réelle de la restriction observée ; à ce propos donc, les résultats correspondant à l'âge de 9 jours nous paraissent plus fiables que ceux correspondant à 29 jours.

• Après incubation de 10 jours du parasite sur les filtrats (FC) ou mélange de filtrats de cultures (MFC) des germes antagonistes, nous avons testé le

pH occasionne par le développement de *P₁. oryzae* ; le tableau 38 donne les nouvelles valeurs de pH.

Nature FC ou MFC	Age	5		9		29	
		(1)	4,65	6,65	4,75	6,90	7,35
(1)+(2)		4,65	6,80	4,60	6,90	6,45	7,25
(1)+(3)		4,65	6,70	5,15	6,80	7,80	7,65
(1)+(2)+(3)		4,90	6,75	4,90	6,80	7,55	7,15
(2)		4,50	6,65	4,55	6,90	5,90	6,65
(2)+(3)		4,55	6,70	5,15	6,50	6,80	7,25
(3)		4,80	6,90	5,80	6,80	8,00	8,05
Nature FC ou MFC	pH ₀ Cult. antago.	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0

Tableau 38 - Evolution du pH après 10 jours d'incubation de *P₁. oryzae* sur les filtrats ou mélange de filtrats de cultures antagonistes âgées de 5, 9 et 29 jours et donne les pH₀ sont de 4,10 et 6,0 ; PC/25°/obscurité continue.

IV - INFLUENCE DE L'ANTAGONISTE SUR LA GERMINATION DES CONIDIES DU PARASITE

Le blocage du développement du parasite peut également être occasionné par une inhibition affectant soit l'émission et/ou le développement du tube germinatif, soit la différenciation de l'appressorium dont on sait qu'il joue un rôle primordial dans le processus infectieux ; c'est à ce titre que nous nous proposons d'examiner l'action des germes antagonistes sur la germination ; pour ce faire, nous avons procédé à une confrontation des conidies de *P₁. oryzae* avec des préparations établies à partir soit de suspensions conidiennes, soit de filtrats de cultures des germes antagonistes.

La relation
$$G_i = \frac{G_0 - G}{G_0} \times 100$$
 o ù

G_0 = germination sur témoin (%)
 G = germination sur essai (%)
 G_i = inhibition de la germination (%)

permet d'exprimer les résultats en pourcentages d'inhibition de la germination des conidies du parasite par les préparations antagonistes et par rapport aux témoins respectifs.

4.1 - Action de la suspension conidienne (SC) et du mélange de SC (dans l'eau distillée) des antagonistes sur la germination du parasite

4.1.1 - Préliminaire

Les conidies (du parasite ou des antagonistes) mises en suspension dans l'eau distillée stérile sont ici issues de cultures sur PCA incubées à **25°C/obscurité** continue pendant 12 jours.

Avant d'examiner les résultats établis sur la base de ce type de confrontation, nous voudrions attirer l'attention du lecteur sur ce que nous avons convenu d'appeler "EFFET DE MASSE" : de façon générale, l'étude de la germination de conidies en fonction de la concentration montre qu'au-delà d'une certaine valeur, le pourcentage de germination décroît progressivement jusqu'à s'annuler ; ainsi donc, des conidies en nombre très élevé seraient **auto-inhibitrices** de leur propre germination ; cela signifie que lorsque nous confrontons un volume de la suspension conidienne de l'antagoniste A_i avec un volume de la SC du parasite (la concentration conidienne de chacun de ces germes étant préalablement ajustée à 180 000 conidies/ml), nous aurons 90 000 conidies de *P1. oryzae* par ml de ce mélange ; nous testerons le pourcentage de germination du parasite par rapport à un témoin T_1 appelé "FRANC" de concentration égale à 90 000/ml ; or, de façon globale (sans distinguer les conidies antagonistes de celles du parasite), nous avons en réalité un nombre de conidies ou encore une masse (d'où le terme d'effet de masse que nous avons adopté) **globale** de 180 000/ml dont il faut que nous tenions compte pour prouver quel pourcentage de "non germination" (= pourcentage d'inhibition) est imputable à l'auto-inhibition ; nous faisons donc un deuxième témoin T_2 renfermant 180 000 conidies de

P₁. oryzae/ml d'eau distillée stérile.

Encore nous faut-il ajouter qu'en toute rigueur, une réserve s'impose par le fait que l'inhibition endogène engendrée par 180 000 conidies de *P₁. oryzae*/ml n'est pas nécessairement comparable à celle régie par le mélange 90 000 conidies de *Pyricularia oryzae* et 90 000 conidies de l'antagoniste Ai.

Cela dit, les divers essais Ei (i = 1 à 7) et témoins (T₁ ; T₂ ; T₃ ; TG pour l'effet de masse) sont élaborés à partir de suspensions conidiennes ajustées à 180 000 conidies/ml d'eau distillée pour toutes les catégories de microorganismes et conformément au diagramme suivant ; étant entendu qu'en cas de mélange ou d'addition d'eau distillée stérile, ces opérations se font toujours volume à volume.

- Action isolée des germes antagonistes

Essai n° 1 = *P₁. oryzae* t *T₅. viride*

Essai n° 2 = *P₁. oryzae* t *C₁. globosum*

Essai n° 3 = *P₁. oryzae* t *M₁. verrucaria*

Dans ces trois essais et pour chaque type de confrontation, il y a globalement (= G) 180 000 conidies/ml et individuellement (= I) 90 000 conidies/ml pour chaque germe ; nous réaliserons donc deux témoins :

T₁ = *P₁. oryzae* de concentration 90 000 conidies/ml

T₂ = *P₁. oryzae* de concentration 180 000 conidies/ml

- Action combinée de 2 germes antagonistes

E₄ = *P₁. oryzae* t (*T₅. viride* t *C₁. globosum*)

E₅ = *P₁. oryzae* + (*T₅. viride* t *M₁. verrucaria*)

E₆ = *P₁. oryzae* + (*C₁. globosum* + *M₁. verrucaria*)

soit

T₂ = *P₁. oryzae* de concentration 60 000 conidies/ml

- Action combinée des 3 germes antagonistes

E₇ = *P₁. oryzae* t (*T₅. viride* t *C₁. globosum* t *M₁. verrucaria*)

soit

T₃ = *P₁. oryzae* de concentration 45 000 conidies/ml

- E₁, E₂, E₃ sont appréciés par rapport à T₁
- E₄, E₅, E₆ par rapport à T₂
- E₇ par rapport à T₃

L'implication de l'effet de masse est dosée par intervention du témoin masse T_G.

4.1.2 ◦ Résultats et expression numérique

Tableau n° 39.

4.1.3 ◦ Expression graphique (fig. 23 et 24) : discussion

L'analyse des pourcentages de germination ou celle d'inhibition de la germination du parasite par les antagonistes et par rapport aux témoins respectifs conduisent à la même compréhension du phénomène ; pour cette raison, nous avons choisi de matérialiser graphiquement les résultats par référence au taux de germination, par rapport aux témoins francs.

- L'expression du témoin "MASSE" par rapport aux témoins "FRANCS" T₁, T₂, T₃ révèle un pourcentage de germination relativement plus élevé que les témoins eux-mêmes (93,7 ; 105,7 et 123,3 % pour T₁, T₂ et T₃ respectivement d'après le tableau 39 et les diagrammes A, B et C de la figure 23) ; ce constat nous autorise à affirmer que le phénomène d'inhibition endogène n'est pas impliqué dans la réduction éventuelle du taux de germination des conidies du parasite ; sur cette base, toute réduction du taux de germination des conidies de *P₁. oryzae* doit trouver son explication dans l'intervention du traitement appliqué.

- *M₁. verrucaria* (qui inhibe à 36,7 % la germination des conidies du parasite) est le germe le plus intéressant encore une fois ; de plus, il induit un léger retard dans la croissance du tube mycélien (30,8 μ) par rapport au témoin T₁ (42,0 μ).

- Le mélange des conidies des trois germes détermine également une réduction du taux de germination des conidies du parasite par rapport au témoin T₃ (le pourcentage d'inhibition du tube mycélien est supérieur à 30 % (33,4 μ pour T₃ et 19,6 μ pour E₇).

Essais / Evaluations	T _G	T ₁	E ₁	E ₂	E ₃	T ₂	E ₄	E ₅	E ₆	T ₃	E ₇
Nb conidies	74	79	72	64	50	70	57	65	64	60	44
Nb conidies non germées	26	21	28	36	50	30	43	35	36	40	56
(i germination) (0)	13,3 123,3	79,0	91,1	81,0	63,3	70,0	81,4	92,8	91,4	60,0	73,3
% inhibition (1) par rapport T _i (2) (i = 1, 2, 3) (3)	6,32 STIMULAT. STIMULAT.	21,0	8,9	19,0	36,7	30,0	18,6	7,1	8,6	40,0	<u>26,7</u>
% germination par rapport MASSE	74,0	-	97,3	86,5	67,6	-	77,0	87,8	86,5	-	59,4
% inhibition par rapport MASSE	26,0	-	2,7	13,5	32,4	-	23,0	12,2	13,5	-	40,5
Long. moy. (μ) tube germ. (30 conidies)	31,3 (±4,8)	42,0 (±6,3)	32,5 (±6,0)	21,0 (±3,3)	30,8 (±5,6)	33,6 (±4,6)	24,3 (±4,7)	35,9 (±7,1)	21,5 (±3,1)	33,4 (±5,6)	19,6 (±3,9)

Tableau 39 - *P₁. oryzae* : action de la suspension conidienne ou du mélange de SC (dans eau distillée) des antagonistes sur la germination des conidies du parasite.
Incubation pendant 5 heures/25°C/ obscurité continue.

Léaende des. fia. 23 et 24

Pourcentage de germination et longueur moyenne (μ) des conidies de *P₁. oryzae* soumises à l'action des suspensions ou mélange de suspensions conidiennes des germes antagonistes.
Incubation de 5 h/25°/obscurité continue.

DIAGRAMME A : Intervention isolée des germes antagonistes

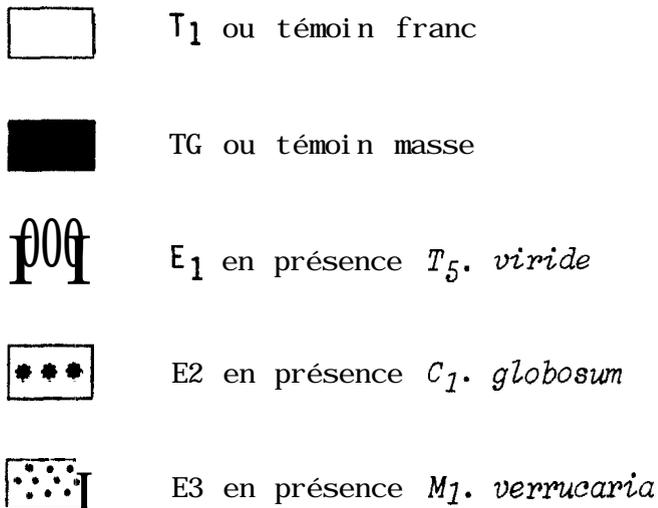


DIAGRAMME B : Intervention simultanée de 2 germes antagonistes

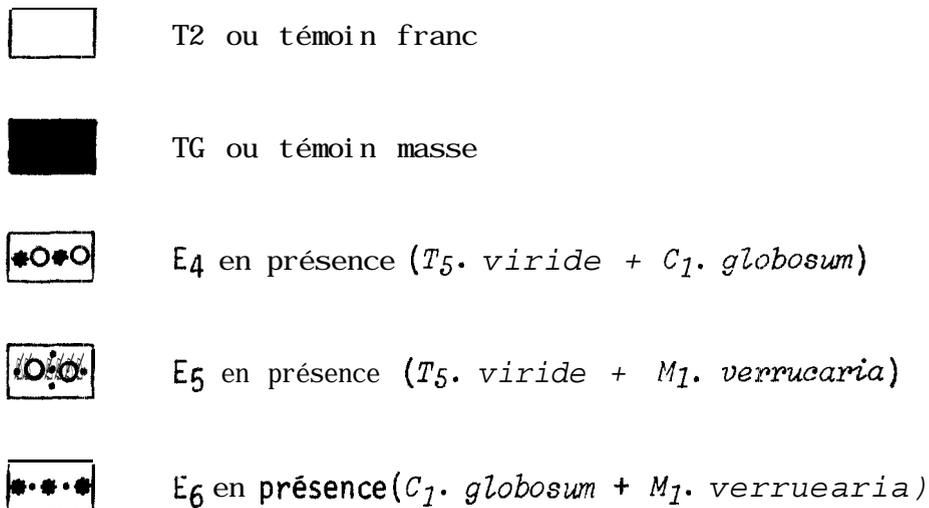
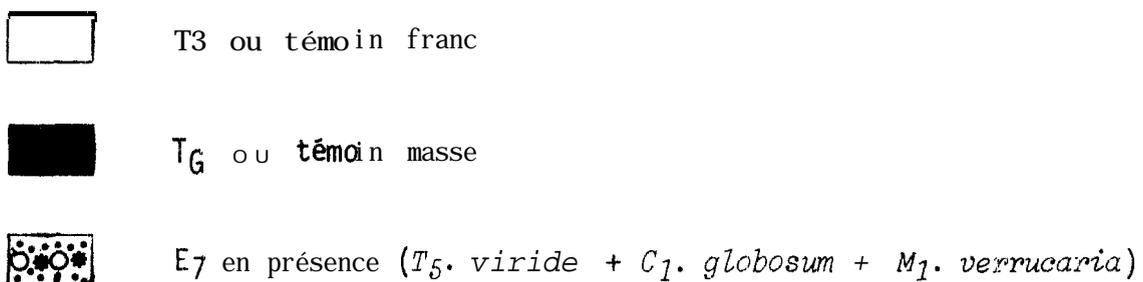


DIAGRAMME C : Implication combinée des 3 antagonistes



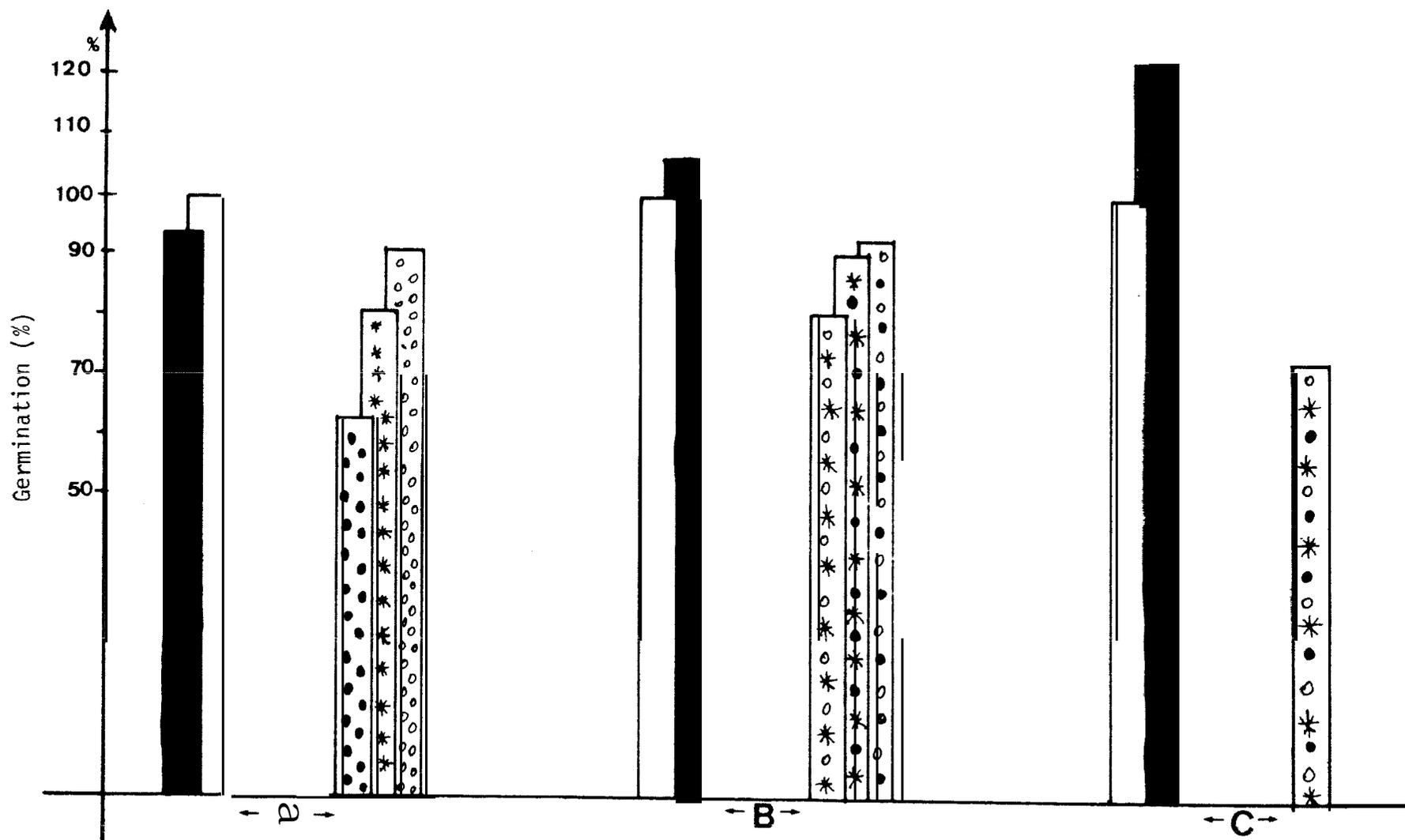


Fig. 23 - Pourcentage de germination des cnidies de *P1. oryzae* confrontées 5 h/25°C/obscurité avec la suspension conidienne (S) ou mélange de suspension conidienne (MSC) des germes antagonistes ; légende ci-contre.

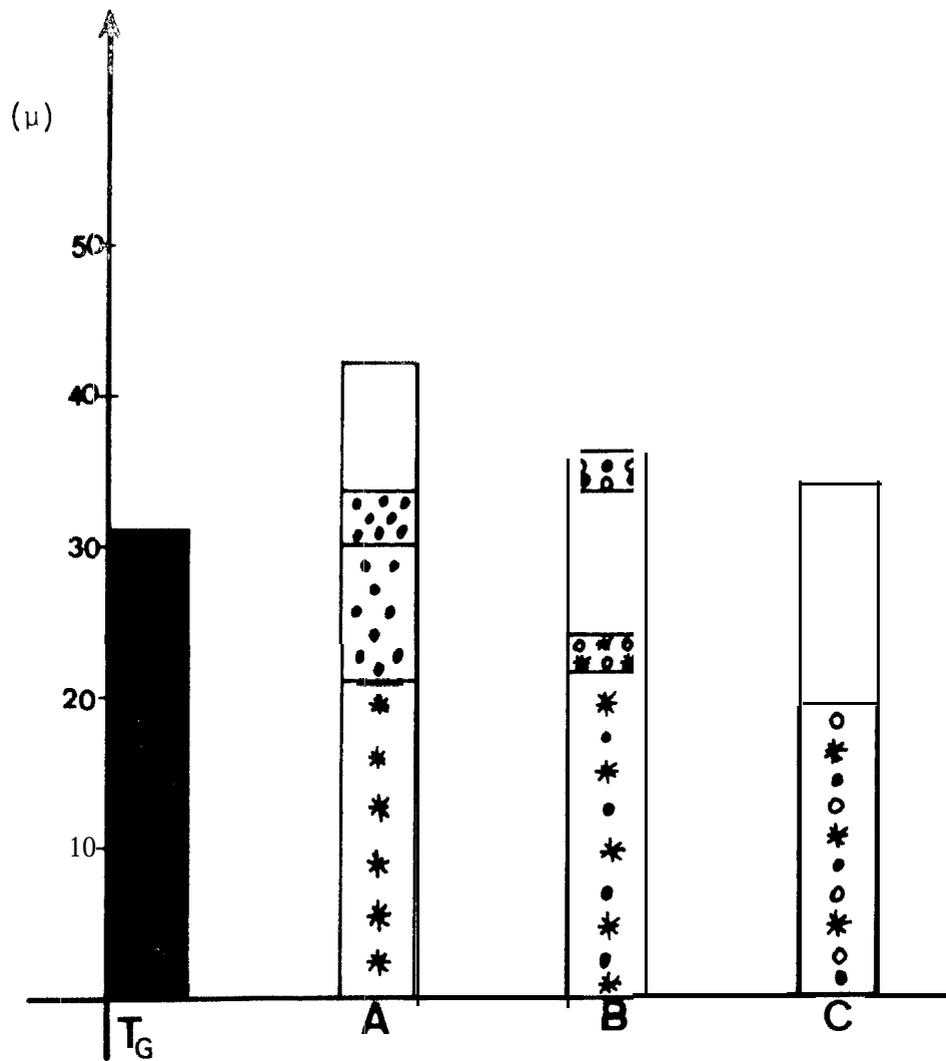


Fig. 24 - Longueur moyenne (μ) du tube germinatif émis par les conidies de *P₁. oryzae* confrontées aux SC et MSC des germes antagonistes ; 5 h d'incubation à 25°C/obscurité ; cf légende de la figure 23.

▪ Citons enfin les restrictions moyennes induites par *C₁. globosum* et par le mélange *T₅. viride* + *C₁. globosum* (19,0 et 18,6 % d'inhibition respectivement) qui contrarient également le **développement** du tube germinatif.

4.2 - Action des filtrats "naturels" (FCN) et filtrats autoclaves de cultures (FCA) des germes antagonistes sur la germination des conidies de *P₁. oryzae*

Les germes antagonistes sont inoculés sur PC ajusté à pH 4,10 et pH 6,0 par le tampon Mc Ilvaine ; l'incubation est faite pendant 10 jours à 25°C/obscurité continue ; les filtrats de cultures sont obtenus grâce à la méthode décrite dans l'annexe technique n° 5.

Dans un souci de synthèse et pour faciliter la comparaison des résultats ci-dessus et ceux matérialisant l'action des conidies maintenues en suspension dans le liquide de culture (§ 4.4), nous avons groupé toutes les observations concernées dans les figures 25 et 26.

4.2.1 - Résultats et expression numérique

Tableau n° 40.

4.2.2 - Expression graphique : discussion

▪ Excepté pour *T₅. viride*, les FCN ou FCA issus des cultures de pH₀ 4,10 exercent une action plus efficace que celle observable pour les traitements issus de cultures de pH₀ 6,0 ; cette même efficacité relative se retrouve au niveau de la longueur moyenne du tube germinatif.

L'action des filtrats de *C₁. globosum* et de *M₁. verrucaria* issus de cultures de pH₀ 4,10 semble ici confirmer des résultats analogues établis par STEWART et HILL (1965) : ces auteurs avaient alors montré que les filtrats de culture d'*Helminthosporium sativum* renfermaient une substance non phytotoxique mais capable d'inhiber la germination d'urédospores ou la formation de pustules de rouille à Puccinia.

▪ Le FCN de *C₁. globosum* (exerçant 97,6 % d'inhibition de la germination des conidies du parasite pour pH₀ 4,10) est nettement supérieur au FCN de *M₁. verrucaria* (70,7 %) ; les longueurs moyennes correspondantes du tube germi-

	Traitements	Zéro = T (PC vierge)		<i>T5. viride</i>		<i>C1. globosum</i>		<i>M1. verrucaria</i>	
		pH ₀	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10
	Evaluations								
F.C.N.	Nb conidies germées	82	83	79	70	2	50	24	43
	Nb conidies non germées	18	17	21	30	98	50	76	57
	% germination par rapport T	82,0	83,0	96,3	84,3	2,4	60,2	29,3	51,8
	% inhibition germination	18,0	17,0	3,6	15,6	97,6	39,7	70,7	48,2
	λ moyenne tube mycélien (50 conidies)	50,4 (±6,8)	49,0 (±9,3)	35,0 (±5,2)	29,4 (±5,9)	14,0 (±0,0)	19,6 (±4,0)	21,0 (±3,3)	25,2 (±5,4)
F.A.	Nb conidies germées	93	95	89	80	0	77	33	56
	Nb conidies non germées	7	5	11	20	100	23	67	44
	% germination par rapport T	93,0	95,0	95,7	84,2	0,0	81,0	35,5	58,9
	% inhibition germination	7,0	5,0	4,3	15,8	100,0	18,9	64,5	41,0
	λ moyenne tube mycélien (50 conidies)	46,2 (±5,6)	45,5 (±9,4)	36,4 (±7,7)	45,5 (±5,9)	0,0	29,4 (±4,1)	24,5 (±5,1)	30,1 (±7,1)

Tableau 40 - *P1. oryzae*: germination des conidies sous l'influence des filtrats naturel (FCN) et autoclavé (FCA) de cultures des germes antagonistes ; incubation 5 heures/25°C/obscurité continue.

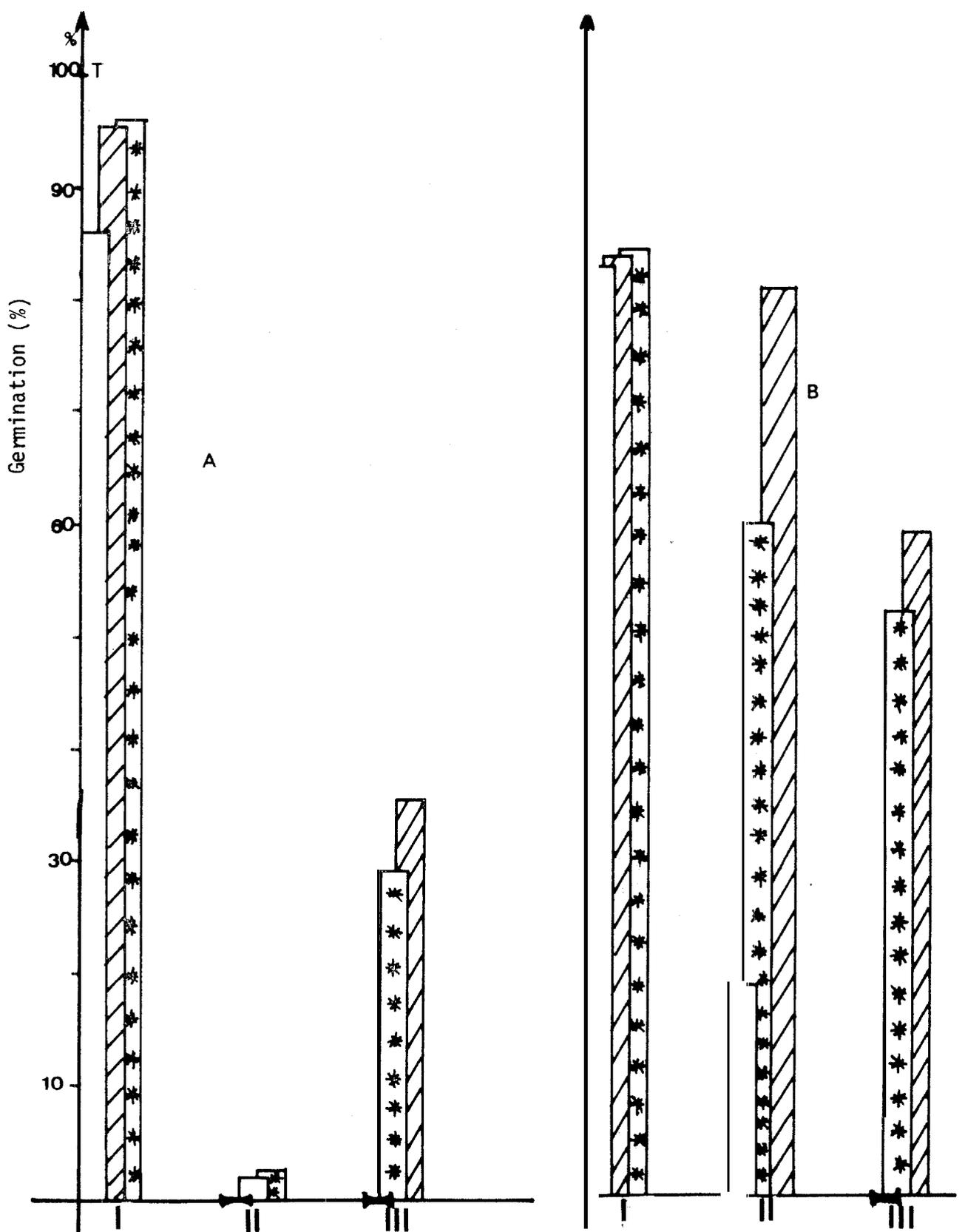


Fig. 25 - Germination (%) des conidies de *P1. oryzae* incubées pendant 5 h/25°C/obscurité en présence des conidies maintenues en suspension dans le liquide de culture (CMS) ; filtrat naturel de cultures (FCN) ; filtrat, autoclavé de cultures (FCA) des germes antagonistes incubés sur PC/25°C/obscurité/10 j.
 A - pH₀ des cultures liquides antagonistes = 4,10
 B - pH₀ des cultures liquides antagonistes = 6,0

Témoin = 100 %

I = *T5. viride*

II = *C1. globosum*

III = *M1. verrucaria*

□ CMS

■ C N

▨ FCA

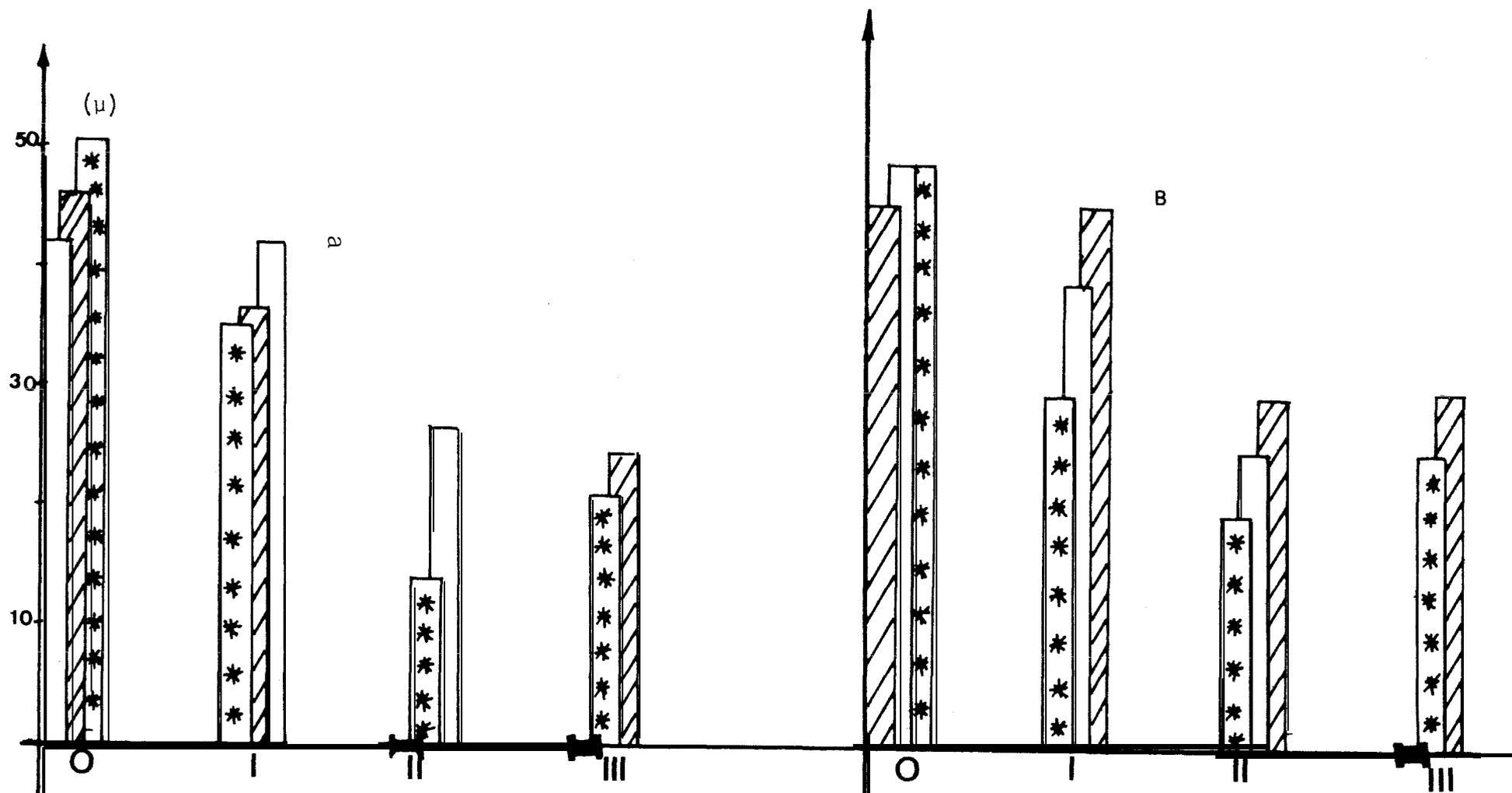


Fig. 26 - Longueur (μ) du tube germinatif au cours de la germination de *P1. oryzae* incubé 5 h/25°C/obscurité/en présence de CMS ; FCN ; FCA de *T5. viride* (I) ; *C1. globosum* (II) ; *M1. verrucaria* (III) et par rapport au témoin (=0).

CMS
 FCN
 FCA

natif sont de 14,0 et 21,0 μ respectivement.

- Le FCA de *C₁. globosum* issu de cultures à pH₀ 4,10 bloque à 100% la germination du parasite ; il convient cependant de préciser à ce propos que, dans cette action spectaculaire, nous ne saurions attribuer aux métabolites de *C₁. globosum* ce pouvoir inhibiteur puisque l'autoclavage aura **très** certainement introduit de nombreuses modifications et altérations des substances de base.

- Dans l'expérience qui suit, nous allons rechercher l'aptitude à la combinaison (**synergie**) efficace de ces divers types de filtrats.

4.3 - Influence du mélange de filtrats "naturels" (MFCN) ou autoclavés (MFCA) des cultures antagonistes dgées de 10 j/25°/obscurité continue sur la germination des conidies de *P₁. oryzae*

4.3.1 - Résultats et expression numérique

Tableau N° 41.

4.3.2 - Expression graphique (fig. 27 et 28) : discussion

- De même que précédemment, les préparations non autoclavées sont plus efficaces lorsqu'elles sont issues de cultures antagonistes liquides de pH₀ 4,10 que lorsqu'elles proviennent de cultures de pH₀ 6,0.

- Nous référant à ce pH₀ 4,10, nous observons que les mélanges de FCN les plus inhibiteurs sont ceux impliquant *C₁. globosum* (cf diagrammes X, Z et T de la figure 27).

L'association *M₁. verrucaria* + *C₁. globosum* manifeste une synergie décisive (**diagramme Z**) à l'encontre des conidies du parasite alors que pris isolément, les pourcentages respectifs d'inhibition sont de 70,7 et 97,6 % ; il n'y a donc pas d'antagonisme entre les métabolites propres aux **germes** concernés.

L'action très satisfaisante de *M₁. verrucaria* agissant seul (diagramme III, fig. 25) semble masquée voire réduite lorsque ce germe est en combinaison avec *T₅. viride* (**diagramme Y** de la figure 27), le taux d'inhibition passant de 70,7 à 15,1 %.

Par contre, le taux d'inhibition de la germination des conidies du

Traitements		Zéro = T		(1)+(2)		(1)+(3)		(2)+(3)		(1)+(2)+(3)	
Evaluations	pHo Cult. antago.	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0	4,10	6,0
		M.F.C.N.									
Nb conidies germées		99	92	4	87	84	79	0	91	4	85
Nb conidies non germées		1	8	96	13	16	21	100	9	96	15
% germination par rapport T		99	100	4,0	94,6	84,8	85,9	0	98,9	4,0	92,4
% inhibition par rapport T		1	0	95,9	5,4	15,1	14,1	100	1,1	95,9	7,6
Long. tube germinatif (μ)(50 conidies)		71,4 (±7,5)	63,7 (±8,2)	39,9 (±39,9)	35,7 (±5,4)	32,2 (±4,7)	34,3 (±3,9)	0,0	60,2 (±5,0)	16,8 (±2,7)	32,2 (±6,7)
M.F.C.A.											
Nb conidies germées		83	85	0	83	84	90	17	94	75	73
Nb conidies non germées		17	15	100	17	16	10	83	6	25	27
% germination par rapport T		83	100	0,0	97,6	101,2	105,9	20,5	110,6	90,4	85,9
% inhibition par rapport T		17	0	100	2,3	STIM.!	STIM.!	79,5	STIM.!	9,6	14,1
Long. tube germinatif (μ)(50 conidies)		45,5 (±5,5)	51,8 (±6,7)	0,0 (-)	32,9 (±4,4)	41,3 (±3,9)	25,2 (±4,0)	15,4 (±8,0)	31,5 (±4,8)	32,9 (±4,8)	25,9 (±4,4)

Tableau 41 • Influence du MFCN et MFCA des germes antagonistes sur la germination des conidies de *P₁. oryzae*;
 (1) = *T₅. viride* ; (2) = *C₁. globosum* ; (3) = *M₁. verrucaria* ; incubation 5 heures/25°C/obscurité continue.

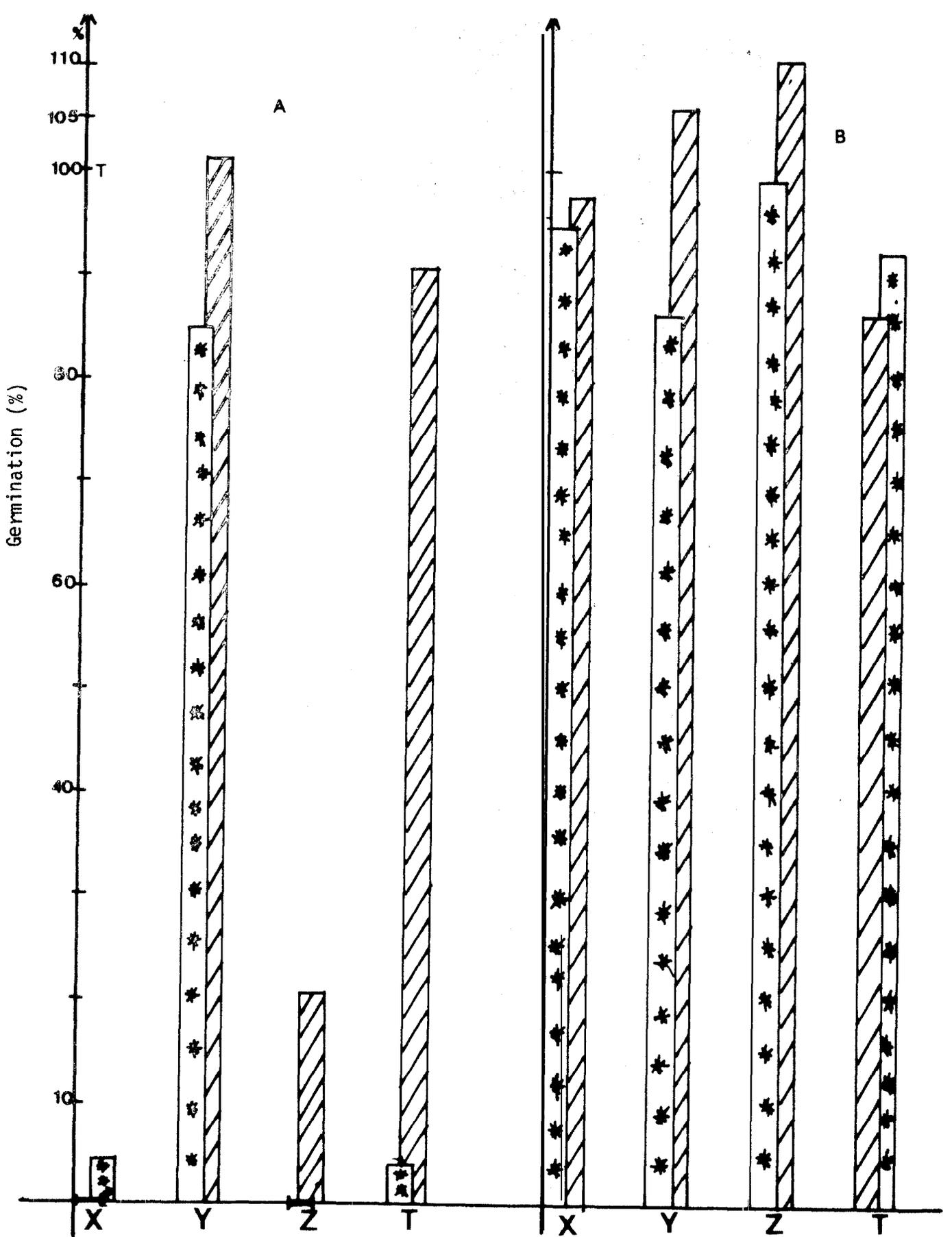


Fig. 27 - Germination (%) des conidies de *P1. oryzae* incubé 5 h/25°C/ obscurité en présence de MFCN et MFCN de *T5. viride* (1) ; *C1. globosum* (2) ; *M1. verrucaria* (3) incubés sur PC/25°C/ obscurité/10 j.

X = (1)+(2) ; Y = (1)+(3) ; Z = (2)+(3) ; T = (1)+(2)+(3).

A = pH₀ cultures liqui des antagonistes = 4,10

B = pH₀ cultures liqui des antagonistes = 6,0



FCN



MFCN

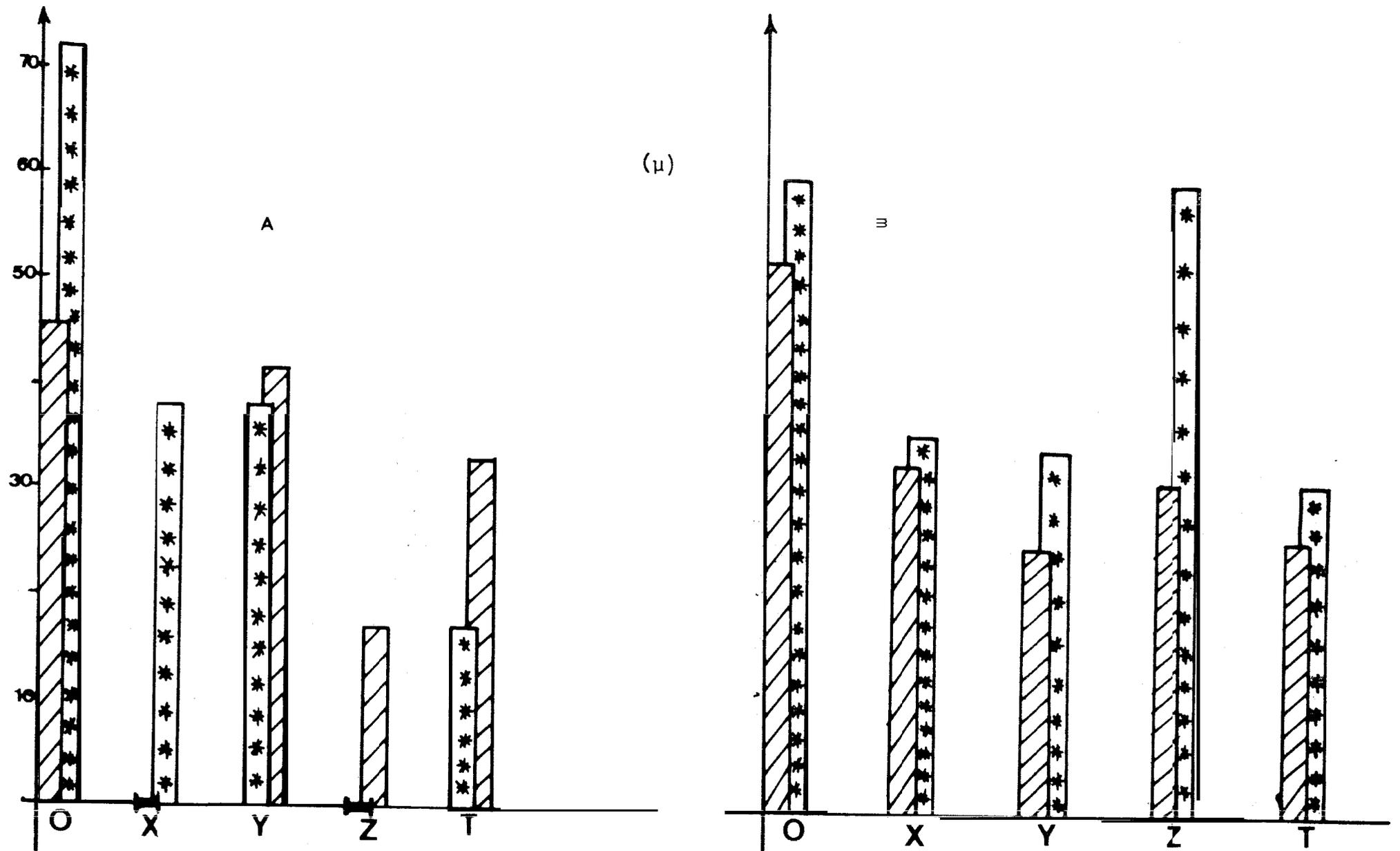


Fig. 28 - Longueur moyenne (μ) du tube germinatif de *P1. oryzae* incubé 5 h/25°C/obscurité/en présence de MFCN et MFCA de *T5. viride* (1) ; *C1. globosum* (2) ; *M1. verrucaria* (3) incubés sur PC/25°C/obscurité/10 j ; O = Témoin ; X = (1)+(2) ; Y = (1)+(3) ; Z = (2)+(3) ; T = (1)+(2)+(3).
 A = pH₀ cultures liquides antagonistes = 4,10 ; B = pH₀ cultures liquides antagonistes = 6,0.

*** MFCN

MFCA

parasite passe de **3,6 %** pour *T₅.viride* et **97,6 %** pour *C₁.globosum* à **95,9 %** lorsque ces deux germes interviennent en association ; le **phénomène** de masquage induit par *T₅.viride* sur *M₁.verrucaria* n'est donc pas inductible par *T₅.viride* sur *C₁.globosum* ; nous serions à priori autorisés à conclure que, dans ce dernier type de combinaison, persiste l'action **prépondérante** de *C₁.globosum* dont les métabolites n'auraient pas une aptitude **élevée** à la combinaison avec ceux de *T₅.viride* ou ne subirait aucune **altération** grave de la part de ceux-ci.

L'association de *C₁.globosum* + *M₁.verrucaria* (100 % d'inhibition, cf **diagramme Z**) est **légèrement** plus active que celle faisant intervenir les 3 germes (**95,5 %** conformément au **diagramme T**).

- A **pH₀ 6,0**, l'autoclavage, outre qu'il semble supprimer toute **activité** inhibitrice des **préparations**, **détermine** parfois une certaine stimulation (ex. le **taux** de germination passe de **98,9 %** à **110,6 %** selon que le mélange de filtrats de cultures de *C₁.globosum* + *M₁.verrucaria* est naturel ou **autoclavé**).

- Quant à la longueur du tube germinatif (fig. 28) elle est en relation directe avec l'aptitude du type de préparation à s'opposer à son **émission**.

4.4 - Influence des conidies antagonistes maintenues en **suspension** dans le liquide de culture (CMS) sur la germination des conidies du parasite

Les cultures **liquides** des antagonistes ont **été réalisées** dans des erlenmeyer de 100 renfermant environ 25 ml de PC tamponne (tampon Mc **Ilvaine**) à **pH₀ 4,10** et **6,0** ; l'inoculation est constituée par 2 rondelles de diamètre **6 mm** ; l'ensemble est **incubé** 10 jours à **25°/obscurité** continue.

Les conidies du parasite sont issues d'une culture sur PCA incubée à **25°/obscurité** continue pendant 12 jours ; la concentration de base est de **180 000 conidies/ml** d'eau **distillée** stérile.

A la date de confrontation, les concentrations conidiennes des germes antagonistes (nombre de **conidies/ml**) étaient les suivantes :

pH ₀ 4,10	Germes	pH ₀ 6,0
0	Zéro	0
463 000	<i>T₅. viride</i>	373 000
0 (α)	<i>C₁. globosum</i>	0 (α)
2 980 000	<i>M₁. verrucaria</i>	2 370 000

(α) A la date de confrontation, les cultures de *C₁. globosum* étaient dépourvues de conidies dont l'apparition est souvent différée en culture liquide.

4.4.1 - Résultats et exoression numérique

Traitements Cult. pH ₀ antago.	Zéro = T		<i>T₅. viride</i>		<i>C₁. globosum</i>		<i>M₁. verrucaria</i>	
	4,10	6,0	4, 10	6, 0	4,10	6,0	4,10	6, 0
Evaluations								
Nb conidies germées	86	90	75	75	2	17	0	0
Nb conidies non germées	14	10	25	25	98	83	100	100
% germination par rapport T	86	90	87,2	83,3	2,33	18,9	0	
% inhibition par rapport T	14	10	12,8	16,7	97,7	81,1	100	100
Long. tube germinatif (μ) (20 conidies)	42,0 (±8,9)	49,0 (±6,8)	42,0 (±4,7)	39,2 (±8,0)	26,6 (±4,7)	19,6 (±3,3)	0,0 (-)	0,0 (-)

Tableau 42 - Influence des conidies des germes antagonistes maintenues en suspension dans le liquide de culture sur la germination des conidies de *P₁. oryzae* ; incubation 5 h/25°/obscurité continue.

4.4.2 - Expression graphique : discussion

Dans un but d'analyse comparative, ces résultats sont rassemblés dans les diagrammes I, II et III des figures 25 et 26 avec la légende qui leur est attribuée (CMS).

- *M₁. verrucaria* induit un blocage total (100 % d'inhibition) de la germination des conidies du parasite et ce, pour les 2 valeurs de pH₀.

- *C₁. globosum*, très efficace à pH₀ bas (97,7 % d'inhibition), demeure très satisfaisant à pH₀ élevé (81,1 %).

- *T₅. viride* par contre, ne contrariant que très peu (12,8 % et 16,7 % d'inhibition à pH₀ 4,10 et 6,0 respectivement) la germination du parasite ne présente pas un intérêt particulier pour ce type de contrôle.

- Parallèlement, l'examen de la figure 26 finit de nous convaincre de la supériorité incontestable de *M₁. verrucaria*, de l'intérêt minime de *T₅. viride* (42,0 et 39,2 μ pour la longueur du tube germinatif à pH₀ 4,10 et 6,0 respectivement), de la position intermédiaire de *C₁. globosum* qui, quoiqu'il réduise considérablement le taux de germination, ne limite que moyennement la longueur du tube germinatif (36,7 et 48,9 % de réduction du tube germinatif par rapport aux témoins respectifs).

Les travaux réalisés à ce jour, en dépit de la disparité de leurs conclusions, nous autorisent néanmoins à ne pas sous-estimer la concentration conidienne des germes antagonistes impliqués dans une méthode de lutte biologique ; ainsi, pour *Aureobasidium pullulans* agissant contre *Alternaria zinniae*, le maximum d'inhibition de la formation des lésions a été observé pour les concentrations les plus élevées ; par contre, la restriction maximale des manifestations du parasite est obtenue à partir d'une concentration optimale ($7,5 \times 10^6$ spores/ml) lorsque l'auxiliaire utilisé est *Alternaria tenuissima* (VAN DEN HEUVEL) ; ces observations devraient également, dans le cas particulier qui nous préoccupe, permettre une meilleure appréciation relative des actions de *T₅. viride* et de *M₁. verrucaria*.

4.5 - Remarques

La connaissance des mécanismes impliqués dans la réduction de la

croissance mycélienne ainsi que du taux de germination des conidies du parasite par les germes antagonistes est une composante fondamentale dans l'élaboration d'une **méthode** de lutte biologique :

- Des recherches nombreuses permettent désormais d'affirmer que la germination des **saprophytes** foliaires est un préalable à toute manifestation de propriété antagoniste ; la seule **germination** ne conférant pas nécessairement cette propriété.

- La capacité d'un antagoniste à s'opposer à "l'épanouissement" du parasite serait **également** en étroite relation avec la vitesse de germination ; ainsi, l'isolat A-133 de *Cladosporium*, germant plus vite que celui A-55 est **corrélativement plus** efficace pour réduire les lésions foliaires inducibles par *A. zinniae* sur fève (VAN DEN HEUVEL, 1970).

En outre, le nombre de spores de l'antagoniste en germination (donc la concentration sporale) jouerait un **rôle** significatif ; les isolats *Phoma* A-105 et *Cladosporium* A-55 inhibent aussi bien la germination *in vivo* que la germination et la croissance mycélienne de *A. zinniae* *in vitro* ; seul cependant le premier inhibe la formation des lésions foliaires de la **fève** en raison probablement de sa concentration 4 fois **plus** élevée (VAN DEN HEUVEL, 1970).

- Certes, l'état actuel des recherches ne permet pas de cerner le mécanisme intime de l'**inhibition** de la germination ou de la croissance **mycélienne** du parasite ; l'expérimentation *in vivo*, de par les actions et **interactions** inhérentes au **matériel** biologique, n'est pas pour faciliter la définition des mécanismes impliqués ; cependant, de nombreux résultats nous autorisent à dire tout l'intérêt des recherches *in vitro* : deux exemples suffisent pour nous en convaincre :

. *Rhizopus nigricans*, qui réduit *in vivo* le nombre de lésions foliaires provoquées par *Alternaria sotani* sur pomme de terre, inhibe **également** *in vitro* la germination des spores ainsi que la croissance mycélienne du parasite (DAS et al., 1968).

. La formation de lésions foliaires par *Puccinia penniseti* sur le millet perlé est **réduite** par des saprophytes dont *C. globosum*, *Aspergillus japonicus*, *Fusarium oxysporum* qui inhibent également *in vitro*, la germination des urédospores du parasite.

CHAPITRE QUATRIÈME

ELEMENTS DE REFERENCE : ACTION DE QUELQUES FONGICIDES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DU PARASITE

Le but de ce chapitre n'est pas l'étude approfondie de l'action des fongicides sur *P₁. oryzae* ; de nos jours, la chimiothérapie demeure encore une arme **très** étudiée et très usitée contre la pyriculariose ; en conséquence, nous nous proposons de donner seulement un élément de **référence** permettant aux utilisateurs des fongicides de se faire une idée sur **l'efficacité relative** de ces produits par rapport aux auxiliaires naturels.

Nous nous bornerons présentement à examiner l'action de 4 fongicides **systemiques** sur la croissance **mycélienne** du parasite.

Les produits utilisés sont les suivants :

- BENOMYL = Butyl carbamoyl .1 benzimidazole carbamate de méthyle
- CHLORONEBE = Dichloro 1,4 diméthyl 2-5 benzène
- EL.291 = Tricyclazole
- TRIDEMORPHE = N tridécyl 2,6 diméthylmorpholine.

1 - EXAMEN MACROSCOPIQUE (cf planches VIII_A et VIII_B)

1.1 - Bénomyl

Aux concentrations de 10^{-6} et 10^{-7} Mole/l, les cultures **présentent** un aspect semblable à celui sur témoin ; à $10,5$ M/l ; aucun développement du pa-

rasite n'est observable pendant la durée de l'expérience.

1.2 - Chloronèbe

- 10^{-3} M/l : teinte **rosâtre** claire ; colonie recouverte d'une couche crémeuse qui s'estompe à mesure que l'on va vers la périphérie.

Nous remarquons la présence de nombreuses conidies relativement courtes (base arrondie) par rapport au témoin et à celles développées sur **bénomyl**.

-- 10^{-4} M/l : teinte **claire**, colonie moins épaisse que précédemment ; conidies comparables à celles **formées** à 10^{-3} M/l.

- 10^{-5} M/l : aucune **différence** significative n'est perceptible par rapport au témoin.

1.3 - EL-291

- 10^{-5} M/l : la **coloration** observée est nettement plus marquée que celle décrite pour le chloronèbe ; ici en effet, la zone centrale (la plus âgée) de la colonie est franchement rosâtre ; celle marginale est plus fine, se confondant pratiquement avec la couleur du PCA.

- 10^{-6} et 10^{-7} M/l : en dehors de la teinte rosâtre plus diluée, nous **n'observons** aucune particularité.

1.4 - Triémorphe

- 10^{-4} et 5×10^{-5} M/l : autour de la **rondelle inoculum** et à **même** le **substrat**, se développe un anneau épais, quasi-levuriforme et de teinte **brunâtre** ; les conidies sont très arrondies.

- 10^{-5} M/l : la colonie parasite se développe avec un retard prononcé par rapport au témoin ; la conidiogénèse ne semble pas affectée ; les conidies observées sont plus courtes et plus arrondies à leur base que **celles** observées sur **témoin**.

Fongicides Age (j)	Zéro	Bénomyl			Chl oronèbe			EL- 291			Tri démorphe		
		10^{-5} M/l	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
3	20,3	0,0	19,4	20,0	13,1	14,5	20,0	19,1	18,6	18,8	0,0	0,0	7,2
	0,5	0,0	0,6	0,0	0,5	0,0	0,0	0,8	1,0	0,9	0,0	0,0	0,3
4	27,9	0,0	26,8	27,0	19,3	20,0	27,2	25,5	24,7	25,3	0,0	0,0	16,2
	0,4	0,0	0,7	0,0	0,3	0,0	1,5	0,6	0,6	0,6	0,0	0,0	0,3
5	34,8	0,0	35,2	36,0	24,0	26,2	34,8	33,4	32,0	32,4	0,0	0,0	20,5
	0,4	0,0	1,2	0,0	0,0	0,5	0,5	0,6	0,0	0,6	0,0	0,0	0,5
6	38,9	0,0	42,2	42,0	30,0	32,2	39,5	39,8	38,6	39,0	0,0	0,0	23,5
	0,9	0,0	0,9	0,0	0,0	1,5	0,3	1,8	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	46,2	0,0	49,0	50,0	35,6	38,6	46,7	47,0	46,7	45,8	8,0	9,0	26,0
	0,3	0,0	1,6	0,0	0,6	1,7	0,3	1,8	1,0	0,5	0,0	0,0	0,6

Tableau 43 - *P1.oryzae*: croissance radiale (mm) en fonction du type et de la concentration du fongicide incorporé ; chaque valeur est une moyenne établie à partir de 8 boîtes de Petrij PCA/25°C/obscurité continue.

Fongicides Age (J)	Zéro	Bénomyl			Chl oronèbe			EL-291			Tridémorphe		
		10^{-5} M/l	10^{-6}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
3	G,G	100	4	1	35	28	1	5	8	7	100	100	64
4	0,0	100	3	3	30	28	0,7	8	11	9	100	100	41
5	G,G	100	(-1)	(-3)	31	24	G,G	4	8	6	100	100	41
6	0,0	100	(-8)	(-7)	22	17	(-1)	(-2)	(-0,7)	(-0,2)	100	100	39
7	0,0	100	(-6)	(-8)	22	16	(-1)	(-1)	(-1)	(-0,8)	82	80	43

Tableau 44 - *P₁. oryzae* : Pourcentage d'inhibition de la croissance radiale en fonction du type et de la concentration (M/l) du fongicide incorporé et par rapport au témoin ; 25°C/PCA/obscurité continue.

Dans le cadre de l'expérimentation *in vitro* et compte-tenu de la **formulation numérique** des résultats (% d'inhibition de la croissance **mycélienne** du parasite par chaque type de traitement : que ce dernier **implique** un fongicide ou un germe antagoniste), l'analyse des données relatives aux fongicides est **réalisée** de manière comparative ; cette démarche devrait nous permettre de juger l'efficacité relative **des** auxiliaires naturels par rapport aux fongicides utilisés.

- Seuls le **Bénomyl** à la concentration 10^{-5} mole/l ainsi que les traitements (*M₁. verrucaria*) λ (*P₁. oryzae* x *T₅. viride*) et (*M₁. verrucaria*) λ (*P₁. oryzae* x *T₅. viride* **et** *C₁. globosum*) exprimés par rapport à T₁ à pH₀ 4,10, garantissent à 100 % contre le parasite pendant toute la **durée** de l'expérience.

- Les autres traitements **conjugant** les confrontations **différée** et simultanée, de **même** que celui impliquant le Tridémorphe 10^{-4} et 5×10^{-5} mole/l notamment, procurent des **résultats** quasi-équivalents puisque le plus faible pourcentage d'inhibition de la croissance du parasite est de **82,5 %** (induit par l'association *M₁. verrucaria*, *P₁. oryzae* et *C₁. globosum* après 4 jours d'incubation à pH₀ 6,0).

- Le Chloronèbe et EL-291 à toutes les concentrations **usitées**, le Bénomyl à 10^{-6} et 10^{-7} mole/l, manifestent une TRES NETTE INFERIORITE vis-à-vis des **germes** antagonistes impliqués au cours d'une confrontation simultanée :

. d'abord, en raison de la DECROISSANCE CONTINUE du taux d'inhibition exerce par les fongicides **précités** alors que les antagonistes extériorient un ACCROISSEMENT CONTINU de leur pouvoir inhibiteur,

. ensuite, du fait que le taux d'inhibition réel est nettement supérieur pour les antagonistes que pour les fongicides **considérés** : ainsi par exemple, *T₅. viride* exerce un pourcentage d'inhibition MINIMAL de 46,9 après 3 jours d'incubation à pH₀ 3,50 alors que pour tous les traitements fongicides concernés, la valeur MAXIMALE observée est de 35,0 % seulement (induite par le Chloronèbe 10^{-3} mole/l au 3e jour).

- La décroissance **observée** du taux d'inhibition **exercée** par ces traitements fongicides -comme du reste celle exercée par les germes auxiliaires au cours d'une confrontation différée- tiendrait soit à un **phénomène** d'accoutumance du parasite, soit à une faible **rémanence** des produits, soit enfin, à la superposition de ces deux phénomènes.

- L'action inhibitrice exercée par les filtrats ou mélange de filtrats de cultures liquides des germes antagonistes âgés de 9 jours à 25°C/obscurité continue sur la croissance mycélienne pondérale du parasite est également SUPÉRIEURE à celle du Chloronèbe (10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5}), EL-291 (10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7}) et du Bénomyl (10^{-6} et 10^{-7}), à l'exception toutefois du mélange des filtrats des 3 germes antagonistes qui exerce un effet dépressif (puisque l'action conjuguée des 3 filtrats de cultures n'engendre qu'une inhibition de 1,6 % de la croissance mycélienne pondérale du parasite à pH₀ 6,0).

CONCLUSION GENERALE

Pyricularia oryzae peut infecter pratiquement tous les organes aériens du riz :

- Sur variété hôte réceptive, la pyriculariose foliaire **détermine** souvent la **dessiccation** de la gaine ainsi que le grillage de l'ensemble de l'appareil foliaire ; quand on sait le rôle primordial que joue la photosynthèse dans la vie des végétaux verts, on mesure toute la portée d'une telle **manifestation**.

- Les noeuds de la tige (situés au-dessus de la lame d'eau pour des rizières éventuellement inondées) sont autant de sites d'infection (pyriculariose nodale) ; lorsque c'est le dernier noeud qui est concerné, nous observons les symptômes de "NECK ROT" caractérisés par une profonde altération du **système** d'approvisionnement des grains dont la constitution est qualitativement compromise ; de plus, une attaque grave détermine une pourriture du cou, aboutissant à terme à la chute de la panicule.

- L'altération des graines peut également provenir d'une infection directe de la panicule ; comme précédemment, la fertilité du paddy se trouve **affectée** voire annulée.

Dans la première partie de la présente étude, nous avons établi une culture pure et monoconidienne du parasite à partir de la **variété** 302 G ; les observations microscopiques permettent de caractériser *P. oryzae* par la présence d'un conidiophore à base renflée, fuligineuse et dont la portion terminale est **génératrice** des conidies ; les conidies (mesurant 19 à 23 x 7 à 9 microns) de **même que** les caractères macroscopiques culturaux sont fortement influencés par les conditions du milieu.

Trois volets importants ont retenu notre attention quant à la biologie et à la physiologie du parasite :

LA CROISSANCE MYCELIENNE DU PARASITE

▪ Le substrat nutritif

Tous les milieux testés (orge/agar ; paddy/agar ; PCA ; PDA ; MISATO 6.5) ont donné des résultats satisfaisants.

▪ La température

La fourchette thermique théorique étant bornée par les valeurs 8-9°C et 37°C avec un optimum à 28°C, nous avons expérimenté sur PCA entre 10,5°C et 37°C.

L'optimum thermique expérimental est de 30°C ; à 37°C, nous observons un puissant blocage du développement de la colonie du parasite qui manifeste une reprise d'activité après 4 jours d'incubation à 25°C/obscurité.

▪ L'héméropériode

L'alternance lumière-obscurité présente un léger avantage ; la lumière continue est moins favorable que l'obscurité continue.

▪ Le pH

Excepté pH_0 2,35 et à la limite pH_0 2,95, toutes les valeurs de pH expérimentées (milieu PC tamponné à 20 % par le McIlvaine) procurent une bonne croissance pondérale de *P₁.oryzae* ; cependant, il est difficile, voire impossible de dissocier l'action strictement imputable au pH de base (pH_0) de celle matérialisant la régulation du pH sous l'action du parasite ; en effet, hormis le pH_0 2,35, peu favorable au parasite, tous les autres pH_0 sont rehaussés vers une valeur limite voisine de 8,20 à 8,30 ; cette régularisation du pH est d'autant plus intense que le pH_0 est voisin de l'optimum qui se situe entre 3,95 et 5,95 ; parallèlement, l'autolyse mycélienne (qui traduit le vieillissement des cultures) est d'autant plus précoce que pH_0 est favorable.

LA CONIDI OGENESE

La variété **hôte**, le type de lésion, l'humidité relative, la température, la nature du substrat nutritif, le pH, etc..., autant de paramètres affectant la morphologie et sans doute la physiologie du parasite ; sous cet aspect, nous avons examiné l'action du milieu, de la température et du pH sur la conidiogénèse.

▪ Le PCA, le MISATO 6.5 induisent l'apparition **précoce** (5e jour) d'organes de fructification ; le PDA, l'**ORGEOSE**, en raison de leur richesse, favorisent une végétation luxuriante au détriment de la conidiogénèse perceptible au 12e jour seulement.

▪ La température : l'optimum expérimental est de 30°C tant pour la **précocité** que pour l'intensité de la **conidiogénèse**.

▪ Le pH : la bande optimale des pH est encadrée expérimentalement par les valeurs pH_0 4,60 et pH_0 6,45 ; nous avons observé une forte corrélation négative ($r = -0,73$) entre le pH et la longueur moyenne des conidies de *P₁. oryzae* ; aucune variation significative n'affecte la largeur moyenne des conidies.

LA GERMINATION DES CONIDIES

▪ La réduction du taux de germination observée aux fortes concentrations conidiennes (30 125 conidies/ml) est liée au **phénomène** d'auto-inhibition.

▪ La température optimale expérimentale est de 25°C ; l'incubation à 40°C détermine la mort des conidies.

▪ La zone optimale des pH est comprise entre 4,60 et 5,45,

▪ La lumière continue est défavorable (8 % contre 90 % de germination sous alternance **lumière-obscurité**) à la germination des conidies.

Sur la base de ce PREALABLE PROSPECTIF, nous avons envisagé la neutralisation *in vitro* du parasite par le biais soit d'auxiliaires naturels, soit de 4 fongicides systémiques ; pour ce faire, nous avons, au terme d'un criblage sélectif, retenu les 3 germes *Trichoderma₅ viride*, *Chaetomium₁ globosum*, *Myrothecium₁ verrucaria* dont il a fallu cerner les exigences par rapport à celles du parasite ; c'est à la **lumière** de cette étude préliminaire que nous avons fixé

les **paramètres** expérimentaux pour la suite de nos travaux : milieu à base de carotte-pomme de terre ; température de 25°C ; obscurité continue ; pH compris soit entre 3,0 et 4,10 soit entre 5,55 et 6,0.

De plus l'analyse comparative des pourcentages d'inhibition **relative des** croissances radiale (mm) et en surface (cm^2) de *P₁. oryzae* confronte simultanément pendant 5 et 7 jours avec les germes antagonistes nous a conduit à admettre une meilleure représentativité du taux d'inhibition évalué sur la base de la croissance en surface que celui évalué en fonction de la croissance radiale et ce, en raison principalement de la déformation affectant la colonie du parasite dont l'épanouissement est contrarié par la contiguïté avec le germe antagoniste ; cependant, les deux méthodes gardent toute leur valeur lorsque le type de confrontation n'altère en rien la régularité de la colonie du parasite (confrontation différée ; confrontation avec les fongicides).

Portées ces **précisions**, nous avons tenté **d'interpréter** le phénomène d'antagonisme préalablement mis en évidence en faisant appel aux influences **exercées** par les germes antagonistes soit sur la multiplication végétative, soit sur le **phénomène** physiologique qu'est la germination des conidies du parasite.

INFLUENCE DES GERMES ANTAGONISTES SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DU PARASITE

Le test U de MANN et WHITNEY nous a permis de juger de la signification des différences de croissance observées par rapport au **témoin**.

-- D'excellents résultats (100 % d'inhibition de la **croissance mycélienne** pendant toute la durée de l'expérience) sont obtenus avec les traitements effectués à pH₀ 4,10 et associant le **binôme** *P₁. oryzae* λ *M₁. verrucaria* avec *T₅.viride* seul ou en conjugaison avec *C₁.globosum* (évaluations **réalisées** par rapport au témoin II) ; ces **mêmes** résultats sont observés avec le seul **bénomyl** 10^{-5} mole/l (cf tableaux 28, 30, 36, 40).

-- le tridémorphe 10^{-4} et 5×10^{-5} mole/l, de **même** que les autres traitements associant le **binôme** *P₁. oryzae* λ *M₁. verrucaria* avec l'un ou les deux autres germes antagonistes procurent également de très bons résultats (les plus faibles taux d'inhibition sont en effet de **82,5 %** et **80,0 %** pour les germes auxiliaires et le fongicide respectivement).

- Les résultats fournis par les germes antagonistes au **cours** d'une confrontation **simultanée s'avèrent nettement supérieurs** à ceux **observés** avec : le bénomyl 3.0'6 et 10^{-7} , les 3 concentrations du chloronèbe et du EL-291. Cette meilleure efficacité **revêt** une double signification :

• La valeur du taux d'inhibition induite par les germes auxiliaires est plus **élevée** que celle **engendrée** par les fongicides concernés ;

• Le taux d'inhibition **exercée** par les germes **antagonistes** est CROISSANT avec le temps (excepté pour la confrontation **différée** en raison probablement soit de la **faible rémanence** des substances **caractéristiques** des germes antagonistes, soit d'une ACCOUTUMANCE du parasite, soit enfin de la superposition de ces deux phénomènes) ; ce qui leur confère une aptitude **prolongée** de **contrôle** du parasite ; par contre, les fongicides (comme les substances **inhibitrices** impliquées au cours d'une confrontation **différée**) **exerçant** une action qui s'estompe **à** mesure, ne parviennent plus **à** restreindre la croissance du parasite.

Les germes antagonistes interviennent par une action soit **à distance** (production de substances inhibitrices diffusibles agissant sur le parasite), soit **par contact** (les substances **éventuellement** émises ayant alors une faible vitesse de migration **et/ou** une faible stabilité) soit enfin, **à (distance et par contact**.

INFLUENCE: DES GERMES ANTAGONISTES SUR LA GERMINATION DES CONIDIES DU PARASITE

- **Sept** traitements ont **été utilisés** : suspensions et mélange de suspensions conidiennes des **germes** antagonistes dans l'eau **distillée** stérile : filtrats et mélange de filtrats naturels de cultures ; filtrats et mélange de filtrats auto-clavés de cultures ; conidies antagonistes maintenues en suspension dans le **liquide** de culture.

• Les traitements suivants : le filtrat autoclave issu d'une culture liquide de *C₁. globosum* pH₀ 4,10 (cf tableau 40) ; le mélange de filtrats non **autoclavés** de *C₁. globosum* t *M₁. verrucaria* pH₀ 4,10 (cf tableau 41) ainsi que celui autoclave impliquant *T₅. viride* t *C₁. globosum* pH₀ 4,10 (cf tableau 41) ; les conidies de *M₁. verrucaria* maintenues en suspension dans le liquide de culture pH₀ 4,10 et pH₀ 6,0 (cf tableau 42), inhibent **à 100 %** la germination des **conidies** de *P₁. oryzae*.

• De très bons résultats sont également observés avec les filtrats non au-

toclavés de *C₁. globosum* pH₀ 4,10 (97,6 % d'inhibition de la germination des conidies du parasite) et *M₁. verrucaria* pH₀ 4,10 (70,7 %) ; les mélanges de filtrats naturels de culture du binôme *T₅. viride* t *C₁. globosum* pH₀ 4,10 (95,9 % d'inhibition) ainsi que du trinôme *T₅. viride* t *C₁. globosum* t *M₁. verrucaria* (95,9 % d'inhibition).

Au terme de nos investigations, nous pensons avoir **démontré** la **validité du contrôle** in vitro de *P. oryzae* par des germes antagonistes ; cependant, cet acquit, s'il permet d'évaluer l'importance du chemin parcouru, n'a d'inter& pratique qu'au travers de ses prolongements in *vivo* ; à ce **propos**, toute tentative de vulgarisation de la lutte biologique devra nécessairement tenir compte de deux principes fondamentaux :

- maintien de l'auxiliaire dans le milieu naturel,
- **compatibilité** des exigences culturales du parasite et des germes antagonistes.

C'est à ce titre et à la lumière des **résultats** établis par nos expériences que nous qualifierons de RELATIVE, l'efficacité de chacun des germes sélectionnés : chaque germe pouvant manifester sa supériorité pour peu que les conditions qui prédominent dans le milieu **coïncident** avec ses exigences propres ; en l'**occurrence**, nous préconiserons l'emploi de *M₁. verrucaria* pour circonscrire le parasite lorsque le facteur de **référence** est le pH ; il est **évident** par ailleurs, **que** *T₅. viride* qui requiert un pH relativement bas est inapte à garantir une couverture satisfaisante contre le parasite dont on sait qu'il rehausse **très** précocement le pH₀ vers des valeurs optimales défavorables au *Trichoderma*.

Lorsque l'ensemble des conditions de milieu **coïncident** avec les optima requis par le parasite (ex. 30°C ; pH moyens de 3,95 à 7,0, etc...), *M₁. verrucaria* serait très certainement le germe dont l'usage individuel induirait le meilleur **contrôle** du parasite.

Cependant, eu **égard** à la persistance et au développement "convenables" de *P. oryzae* lorsque les paramètres du milieu fluctuent au sein d'une fourchette relativement large (pH₀ 2,95 à 7,50 ; température de 20 à 30°, etc...), seule l'association *T₅. viride* t *C₁. globosum* t *M₁. verrucaria* permet de juguler le parasite ; le germe antagoniste le plus favorisé sur le moment parvenant à **suppléer** Ci la déficience du ou des autres : *T₅. viride* joue le rôle **prépondérant** à pH bas (3,50 ; 4,10) puis sera relayé par *C₁. globosum* et/ou *M₁. verrucaria*

à mesure que le pH est **rehaussé** vers **6,20** et **7,50**.

De même, *T₅. viride* sera relayé par *C₁. globosum* et/ou *M₁. verrucaria* lorsque la température passe de **20-25°C** à **28-30°C** ou inversement ; l'association des germes antagonistes permettant d'exploiter le **phénomène** de recouvrement du spectre d'action caractéristique de chaque germe auxiliaire.

Au vu des résultats obtenus avec les **préparations** fournies par les germes antagonistes (filtrats de cultures, **mélange** de filtrats de cultures, **conidies** maintenues en suspension dans le liquide de culture, etc.) sur la **croissance mycélienne** et la germination des conidies de *P. oryzae*), compte tenu par ailleurs de la synthèse bibliographique **réalisée**, nous serions autorisés à **préconiser** -dans une perspective **pratique**- soit un trempage de semences **ou** de jeunes plants de riz, soit une pulvérisation au niveau de l'appareil foliaire, étant entendu que l'application **PREALABLE** des germes antagonistes **PREMUNIT l'hôte** et partant; lui **confère** une meilleure **résistance** vis-à-vis du **parasite**.

SYNTHESE DES ABREVIATIONS

- CD = Confrontation différée du parasite avec les germes antagonistes
- CD λ cs = Conjugaison des confrontations différée et **simultanée** du parasite avec les germes antagonistes
- CMI = Commonwealth **Mycological Institute**
- CMS = Conidies (antagonistes) Maintenues en Suspension (dans le liquide de **culture**)
- (Y; = Confrontation Simultanée du parasite avec les germes **antagonistes**)
- D = Distal (**e**)
- FC = Filtrat de Cultures des germes antagonistes (= FCN)
- FCA = Filtrat **autoclavé** de cultures des germes antagonistes
- FCN = Filtrat naturel (**par** opposition à autoclavé) de cultures des germes antagonistes
- H₂ODS = Eau distillée stérile
- IKP = variété IKONG-PAO
- IRAT = Institut de Recherches Agronomiques Tropicales et de Cultures Vivrières
- IRRI = International Rice Research Institute
- j = Jour
- L = LUM = lumière
- MFA = Mélange (volume à volume) de FCA
- MFCN = Mélange (volume à volume) de FCN
- M/l = mole/litre
- MSC = Mélange de SC dans l'eau distillée stérile
- o = OBS = obscurité
- ORGEJA = Orge-Agar (cf annexe technique n° 1)
- P = Proximal (**e**)
- PADDY/A = Paddy-Agar (cf annexe technique n° 1)
-

PC = Pomme de terre-Agar (cf annexe technique n° 1)

PCA = Pomme de terre-Carotte-Agar (cf annexe technique n° 1)

PDA = Potatoe-Dextrose-Agar (cf annexe technique n° 1)

pH₀ = pH initial, observe après autoclavage.

φ₀ = Diamètre de la rondelle inoculum (6 mm)

Se = Variété Sefa

Se₁ = *P. oryzae* (souche 1 de *P. oryzae* provenant de la variété Se 302 G)

T = Témoin (ZERO)

T_G = Témoin Global (traduisant l'effet de masse)

NB - RESISTANCE VERTICALE : regroupement de gènes choisis de façon à conférer à la variété hôte une RESISTANCE ELEVEE vis-à-vis d'un nombre RESTREINT de races phytopathogènes.

- RESISTANCE HORIZONTALE : regroupement de gènes choisis de manière à conférer à la variété hôte un LARGE SPECTRE DE TOLERANCE vis-à-vis d'un nombre ELEVE de races phytopathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN, PAUL J., (1966). The **role** of host in the development of disease **symp-**
toms. Review of Phytopathology, vol. 56, 255-260.
- ALUKO M.O., (1969). Relative prevalence of **blast** and brown leaf spot on upland
rice in Nigeria. Plant Disease Reporter, 53 (11), 875-877.
- AKAI, KURAMOTO T., (1968). Microorganisms existing on leaves of **rice** plants
and the **occurrence** of brown leaf spot. **Annals** of the Phytopathological
society of Japan, vol. 34, 313-316.
- ANDERSON A.L., HENRY B.W., (1946). The use of wetting and adhesive agents **to**
increase the effectiveness of conidial suspension for plant inoculation.
Phytopathology, 36, 1056-1057.
- ANGLADETTE. Le riz : maladies cryptogamiques, 612-634.
- AWODERU V.A., (1970). Identification of races of *Pyricularia oryzae* in Nigeria.
Plant Disease Reporter, vol. 54, 6, 520-523.
- AZEEMUDDIN, SORAYA, PONCHET J., (1961). Isolement de *P. oryzae* (Br. - Cav.) et
H. oryzae (BREDA de HAAN) à partir de semences de riz *Oryza sativa* L..
Ann. des Epiphyties, 12, 141-147.
- BAILEY J.A., (1971). Phytoalexins and the ability of leaf **tissues** to inhibit
fungal growth. **Ecology** of Leaf Surface microorganisms, 519-529.
- BAIN D.C., PATEL B.N., PATEL M.V., (1972). Blast of rye-grass in Mississippi.
Plant Disease Reporter, vol. 56, 3, 210.
- BARDER S. (I), NAVARRO L. (II), TORTOSA E. (III), (1972). **Hi stoqui mica** del
germen de arroz. I. Hidratos de **carbono**. Instituto de Agronomica y
Tecnologia de Alimentos, vol. 12, 4, 597-608.
- BEECH F.W., DAVENPORT R.R., (1971). A survey of methods for the quantitative
examination of the **yeast** flora of apple and grape leaves. **Ecology** of
Leaf surface microorganisms, 139-158.
- BEECH F.W., DAVENPORT R.R., GOSWELL R.W., BURNETT J.K., (1968). Identification
methods for microbiologists. Part B, 151-175.
-

- BEGA, (1957). The use of detached Ribes and **Pine** leaves in studies with *Cronartium ribicola*. *Phytopathology*, 47, 516.
- BEIER, ROBERT D., PANZER J. D., TULLUIS E. C., (1959). The interrelationship of **nitrogen** and other factors affecting the blast **disease** of **rice** caused by *P. oryzae*. *Plant Disease Reporter*, 43, 477-482.
- BERDUCQU J., (1957). Mécanismes de la formation des chancres à *Nectria* du pommier, 19-60.
- BIDAUX J. M., NOTTEGHEM J.L., (1973). Nature and stability of virulence factors of *P. oryzae* in the Ivory Coast and Madagascar. *Agronomie Tropicale*, 28 (12), 1135-1144.
- BÖHNER B., HARDI E., FETZ E.,, SIGH. P., STOLL Ch., TAMM Ch., (31965). Über die **isolerung** von verrucarín H, verrucarín J, roridin D und roridin E **aus** *Myrothecium. Arten*. *Helvetica Chimica Acta*, vol. 48, 3, 118, 1079-1087.
- BOOSALIS M. G., (1964). Hyperparasitism. *Ann. Rev. of Phytopathology*, vol. 2, 363.
- BOUHOT D., (1975). Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. V. Une technique simple d'estimation du potentiel infectieux des sols, terreaux et substrats infestés par *Pythium* sp. **Etudes** qualitatives. *Annales de Phytopathologie*, vol. 7, 1, 9-18.
- BOUHOT D., (1975). Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. VI. Une technique sélective de détermination du potentiel infectieux des sols, terreaux et substrats infestés par *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. *Annales de Phytopathologie*, vol. 7, 1, 19-25.
- BOUHOT, MALLAMAIRE, (1965). Les maladies des plantes cultivées **au Sénégal**. Tomes I et. II.
- BOUSQUET J.F., (1973). Variation du taux de production de pyriculol dans les filtrats de culture **des** souches saines et **virosées** de *P. oryzae* Cav.. *Annales de Phytopathologie*, 5 (3), 285-288.
- BROWDER L. E., (1964). A modified detached leaf culture technique for study of cereals rusts. *Plant Disease Reporter*, vol. 48, 11, 906-908.
- BROWN J.F., SHIPTON W. A., WHITE N. H., (1966). The relationship between **hyper-sensitive** tissue and **resistance** in wheat seedlings **infected** with *Puccinia graminis tritici*. *Annals of Applied Biology*, vol. 58, 2, 279-290.
- BURELL M. M., RESS T. Ap., (1974). Carbohydrate **metabolism** of **rice** leaves **infected** by *P. oryzae*. *Physiological Plant Pathology*, 4, 489-496.
- CHANG I. P., KOMMEDAHL T., (1968). Biological control of seedlings of **corn** by coating kernels with Antagonistic microorganisms. *Phytopathology*, vol. 58, 1395-1401.
-

- CHIEN C.C., CHU C.L., (1973). Studies on the control of **rice blast** and sheath blight of **rice** with benlate. Journal of Taiwan Agricultural Research, 22 (1) , 41-46.
- CLARK W.A., LOEGERING W.Q., (1967). **Functions** and maintenance of a type-culture collection. Ann. Rev. Phytopathology, vol. 5, 319.
- C.M.I., (1968). Plant **Pathologist's** Pocketbook.
- COLE J.S., FERNANDES D.L., (1970). Changes in the **resistance** of tobacco leaf to *Erysiphe cichoracearum*DC induced by topping, cytokiinins and **anti-**biotics. Ann. Appl. Biology n° 66, 239-243.
- CDLE A.L.J., (1970). The **infection** of orange by *Trichoderma viride* and mixed infection by *Trichoderma viride* and *Penicillium digitatum*. Ann. Appl. Biol., n° 66, 75-82.
- CRUICKSHANK A.M., (1963). Phytoalexins. Ann. Rev. of Phytopathology, vol. 1, 351-374.
- CSUTX E., LEMAIRE J.M., PONCHET J., RAPILLY F., (1965). Exemples d'interactions fongiques au niveau de plantules de blé contaminées par *Helminthosporium sativum*. Ann. Epiphyties, 16 (1), 37-44.
- CURT LEBEN, (1965). Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. Ann. Rev. of Phytopathology, vol. 3, 209-230.
- DEACDN J.W., (1973). **Factors** affecting occurrence of *Ophiobus* Patch Disease of Turf and its control by *Phialophora radiciicola*. Plant Pathology, 22, 149-155.
- DENNIS C., WEBSTER J., (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. soc., 57 (1), 25-39.
- DENNIS' C., WEBSTER J., (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. SOC.) 57 (1), 41-48.
- DIBYA D.B., VAUGHAN E.K. (1962). Preliminary investigations on biological control of gray mold (*Botrytis cinerea*) of strawberries. Plant Disease Reporter, 342-345.
- DICKINSON C.H., (1971). Cultural studies of leaf saprophytes. Ecology leaf surface microorganisms, 129-139.
- DIEM H.G., (1969). Microorganismes de la surface foliaire. II, Interaction entre quelques champignons parasites et divers saprophytes **filamenteux** de la phyllosphère de l'orge. Bulletin ENSA-Nancy, 11, 12-17.

- DIEM H.G., (1969). Microorganismes de la surface des feuilles. III. Effet de la compétition nutritive sur la germination des spores d'une souche d'*H.sativum*. Bulletin de l'ENSA-Nancy, 11, 18-25.
- DIEM H.G., (1971). Effects of low humidity on the survival of clerminated spores commonly found in the phyllosphère. Ecology of leaf surface microorganisms, 211-219.
- DIEM H.G., (1974). Microorganisms on the leaf surface : estimation of the mycroflora of the barley phyllosphere. Journal of General Microbiology, 80, 77-83.
- EHRLICH M.A., EHRLICH H.G., (1971). Fine structure of the host-parasite interfaces in mycoparasitism. Ann. Rev. of Phytopathology, vol. 9, 155-184.
- ELLINGBOE A.H., (1968). Inoculum production and infection by foliage pathogens. Ann. Review of Phytopathology, vol. 6, 317-330.
- ENDO R.M., (1966). Mycologia, 58, 336-343.
- FADDOUL J., (1973). Contribution à l'étude du *Coryneum cardinale* Wag. : morphologie, biologie, physiologie.
- FARAS G.L., KIRALY, (1962). Role of phenolic compounds in the physiology of plant disease resistance. Phytopathology, Zeitschr, 44, 105-150.
- FERAULT A.C., SPIRE D., RAPILLY F., BERTRANDY J., SKAJENNIKOFF M., BERNAUX P., (1971). Observation de particules virales dans des souches de *P. oryzae* Briosi et Cav.. Ann. Phytopathologie, 3 (2), 267-268.
- FERAULT A.C., BERTRANDY J., SPIRE D., (1972). Particules de type viral associées à *P. oryzae* Cav., agent de la pyriculariose du riz. C.R. Acad. Sc., 7/72.
- FETZ E., BÖHNER B., TAMM Ch., (1965). Die Konstitution von verrucarín J. Helvetica Chimica Acta, vol. 48, 181, 1669-1679.
- FETZ E., TAMM Ch., (1966). Die Konstitution von verrucarín E.. Helvetica Chimica Acta, vol. 49, Fasc. Emile Cherbuliez, 40, 349-359.
- FOKKEMA N.J., (1971). The effect of pollen in the phyllosphère of rye on colonization by saprophytic fungi and on infection by *Helminthosporium sativum* and other leaf pathogens. Netherlands Journal Plant Pathology, vol. 77, 1.
- FOKKEMA N.J., (1968). The influence of pollen on the development of *Cladosporium herbarum* in the phyllosphere of rye. Netherlands Journal Plant Pathology, 74, 159-165.
- FOKKEMA N.J., (1973). The rôle of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* on agar plates and on rye with pollen. Physiological Plant Pathology, vol. 3, 2, 195-206.

- FOKKEMA N.J., (1971). Influence of pollen on saprophytic and pathogenic fungi on rye leaves. *Ecology of leaf surface microorganismes*, 277-282.
- FOKKEMA N.J., VAN DER LAAR A.J., NELIS-BLOMBERG, SCHIFFERS B., (1975). The buffering capacity of the natural mycoflora of rye leaves to infection by *Cochliobolus sativus* and its susceptibility to benomyl. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 81, 176-186.
- FOKKEMA N.J., VAN DER MEULEN, (1976). Antagonism of yeast like phyllosphere fungi against *Septoria nodorum* on wheat leaves. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 132, 13-16.
- FREEMAN T.E., (1964). Influence of nitrogen on severity of *Fyricularia grisea* infection of St Augustine grass. *Phytopathology*, 54, 1187-1189.
- GALVES G.E., LOZANO T.J.C., (1967). Identification of races of *P.oryzae* in Colombia. *Phytopathology*, vol. 58, 3, 294-296.
- GILBERT C., DAFT, CURT LEBEN, (1966). A method for bleaching leaves for microscope investigation of microflora on the leaf surface. *Plant Disease Reporter*, vol. 50, 7, 493.
- GODTFRESEN W.O., WANGEDAL S., (1964). Trichodermin, a new antibiotic, related to trichothecin. *Proc. of the Chemical Soc.*, 188-189.
- GOTO K., YAMAKANA S., (1960). Studies on races of *P.oryzae*; production of new races by mixed inoculation with two isolates. *Ann. Phytopathol. Sac. Japan*, 25, 4.
- GOTTLIEB D., SHAW P.D., (1970). Mechanisms of action of antifungal antibiotics. *Ann. Rev. of Phytopathology*, vol. 8, 371-402.
- GRAHAM J.H., DEVINE T.E., Mc PURTREY J.E., FLECK D.L., (1975). Agar plate method for selecting Alfalfa for resistance to *Colletotricum trifolii*. *Plant Disease Reporter*, vol. 59, 5, 382-384.
- GRIFFITHS D.A., (1969). Rice blast disease in Malaya : spore germination and host-penetration. *Plant Disease Reporter*, vol. 53, 6, 490-493.
- GRILLARD M., SEGUY S.L., (1971). Effet d'une attaque de pyrale (*Chilo suppressalis*) sur la qualité du grain de riz. *Les riziculteurs de France*, 15-18.
- GROSCLAUDE C., DUBOS B., RICARD J.L., (1974). Antagonism between ungerminated spores of *Trichoderma viride* and *Stereum purpureum*. *Plant Disease Reporter*, vol. 58, 1, 71-76.
- GUTZWILLER J., MAULI R., SIGG H.P., TAMM Ch., (1964). Die Konstitution von verrucarol und roridin C. *Helvetica Chimica Acta*, vol. 47, 250, 2235-2262.
- GUTZWILLER J., TAMM Ch., (1965). Über Die Struktur von verrucarol B. *Helvetica Chimica Acta*, vol. 48, 17, 177-182.

- HALLAM N. D., (1971). The **anatomy** of the leaf surface. Ecology of Leaf Surface microorganisms, 3-37.
- HALMOS S., (1969). Rice blast in Honduras and host-specificity of *P. oryzae*, *P. grisea*. Plant Disease Reporter, 53 (11), 878-881.
- HANDBOOK. Laboratory **methods** used in the culture collection. **Methods** in use at the C.M.I., 40.
- HÄRRI E., LOEFFLER W., SIGG H.P., STAHELIN H., STDLL Ch., TAMM Ch., WIESINGER D., (1962). Über die Verrucarin und Roridin, Eine Gruppe von Cytostatisch Hochwirksamen antibiotica aus *Myrothecium* Arten. Helvetica Chimica Acta, vol. 45, 98-99, 839-853.
- HASHIOKA Y., (1952). Annual and local variation of the **varietal resistance** of rice to the blast disease. Taiwan Agr. Res., 3 (3), 40-55.
- HAWKER L. E., (1950). **Factors** influencing the survival and germination of spores. Physiology of Fungi, 209-234.
- HAWKER L. E., (1950). Interactions between fungi and Higher Plants. Physiology of Fungi, 235-265.
- HAWKER L. E., (1950). Interaction with Algae. Physiology of Fungi, 266-268.
- HAWKER L. E., (1950). Interaction with other Fungi and **Bacteria**. Physiology of Fungi, 269-277.
- HEIM J.M., GRIES A., (1953). The culture of *Erysiphe cichoracearum* on sunflower tumor tissue. Phytopathology, vol. 43, 343-344.
- HELEN J.O., BROWN J.F., (1971). Quantitative studies of the post penetration phase of infection by *Puccinia graminis tritici*. Ann. Appl. Biol., n° 67, 309-319.
- HENRY B. W., ANDERSEN A. L., (1948). Sporulation by *P. oryzae*. Phytopathology, 38, 265-278.
- HOANG, DIEM G., (1969). Microorganisms de la surface des feuilles* 1. Observations préliminaires de la population microbienne de l'orge. Bulletin ENSA-Nancy, 102-108.
- HOLLOWAY P.J., (1969). The **effect** of **superficial** wax on leaf wettability. Ann. of Appl. Biology, n° 63, 145-153.
- HOLLOWAY P. J., (1971). The chemical and physical characteristics of leaf surfaces. Ecology of leaf surface microorganisms, 39-54.
- HOWARD H., (1975). **Effect** of pH and **sucrose** concentration on conidium size and septation in four *Bipolaris* species. Can. J. Bot., vol. 53, 1457-1464.
- HUBERT D. M., ANDERSEN A. L., FINLEY A. M., (1966). Mechanisms of biological control in a bean root rot soil. Phytopathology, vol. 56, 8, 953.

- I.R.A.T.-C.N.R.A. Bambey, (1970). Compte-rendu des travaux de pathologie végétale réalisés en Casamance pour la campagne 1969.
- I.R.A.T., (1970). Synthèse des activités et résultats de l'I.R.A.T. au Sénégal et sur la rive mauritanienne du fleuve Sénégal.
- IWATA K., ABE Y., YAOITA J., ENDO K., (1971). Studies on panicle blast damage and its investigation method. Journal of Niigata Agricultural Experiment Station, n° 21, 81-100.
- IZARD C., CHILTZ P., (1961). Quelques précisions concernant la méthode de culture de *Peronospora tabacina* Adam, sur des disques découpés dans le limbe des feuilles et premières observations *in vivo*. Annales de Bergerac, vol. 111, 4, 659-663.
- JAILLOUX F., (1974). Identification de la Pyriculariose du *Digitaria decumbens* var. *Pangola* aux Antilles françaises. Annales de Phytopathologie, vol. 6, 1, 55-70.
- JENKYN J.F., PREW R.D., (1973). The effect of fungicides on incidence of *Sporobolomyces* spp. and *Cladosporium* spp. on flag leaves of winter wheat. Ann. Appl. Biology, n° 75, 253-256.
- JEREBZDFF S., (1961). Thèse, n° d'ordre 495.
- JUNG H.F., SCHEINPFLUG H., (1970). La riziculture et ses problèmes phytosanitaires au Japon. Pflanzenschutz-rachrichten Bayer ; année XXIII (4), 239-267.
- KERLING L. C. P., (1958). The microflora on the leaf of *B. vulgaris*. Netherlands Journal of Plant Pathology, 64, 408-410.
- KIYOSAWA S., FUJIMAKI H., Studies on mixture inoculation of *Puccinia oryzae* on rice. Bull. Nat. Inst. Agr. Sci., ser. D, n° 17, 1-21.
- KO W.H., HSIN-HSIUNG LIN, KUNIMOTO R.K., (1975). Simple method for determining efficacy and weatherability of fungicides on foliages. Phytopathological notes, vol. 65, 1023-1024.
- KOCHMAN J.K., BROWN J.F., (1976). Effects of temperature, light and host on prepenetration development of *Puccinia graminis* avenae and *Puccinia coronata* avenae. Ann. of Appl. Biology, vol. 82, 2, 241-249.
- KOCHMAN J.K., BROWN J.F., (1976). Effects of penetration of oats by *Puccinia graminis* avenae and *Puccinia coronata* avenae. Ann. of Appl. Biology, vol. 82, 2, 251-258.
- KOLAKA T., (1963). Control of rice blast disease by cultivation practices in Japan. Rice Blast Disease, C.M.I. ; I.R.R.I., 421-438.
- KOMMEDAHL T., PIN CHANG MEW I., (1975). Biocontrol of corn Root infection in the field by Seed Treatment with Antagonists. Phytopathology, vol. 65, 296-299.
-

- KUWATSUKA S., OSHIMA Y., (1961). Studies on polyphenols of rice plant. 1. Separation and identification of Phenol carboxylic acids. J. Agr. Chem. Soc. Japan, 35, 67-71.
- KUC J., (1970). Phytoalexins. Ann. Rev. Phytopathology, vol. 10, 207-232.
- KUNZE, SCHMIDT, (1954). 4. *Chaetomium* Kunze. Mycol. Hefte, 1 (15) 1817 ; Band 11, 152-154.
- LAJUDIE J., (1974). Mise en évidence de réactions antagonistes chez les Rhizobium. Ann. Phytopathologie, 6 (1), 109-111.
- LALLMAHOMED G.M., (1973). Attaques et nouveaux ennemis signalés ; apparition de la pyriculariose du riz. Maurice. Bull. Phytosanitaire de la F.A.O., Italie, 21, 4, 91-92.
- LAMEY H.A., (1965). A technique for laboratory evaluation of seed treatment to control rice seed rot. Plant Disease Reporter, vol. 49, 736-738.
- LAMEY H.A., (1970). *Pyricularia oryzae* on rice seed in U.S.A. Plant Disease Reporter, vol. 54, 11, 931-935.
- LAMEY H.A., WILLIAMS R.J., (1972). Leaf scald of rice in West Africa. Plant Disease Reporter, vol. 56, 106-107.
- LANGCAKE P., WICKINS S.G.A., (1975). Studies on the action of the dichlorocyclopropane fungicides : effects of 2,2 Dichloro-3,3-Dimethyl-cyclopropane Carboxylic Acid on the growth of *Pyricularia oryzae* Cav. Journal of General Microbiology, 88, 295-306.
- LANGCAKE P., WICKINS S.G.A., (1975). Studies on the action of the dichlorocyclopropanes on the host-parasite relationship in the rice blast disease. Physiological Plant Pathology, vol. 7, 2, 113-126.
- LANGERON M., VANBREUSEGHEM R., (1952). Précis de Mycologie ; Mycologie générale ; Mycologie humaine et animale ; Techniques. Collection de Précis médicaux, éd. Masson et Cie.
- LAST F.T., (1955). Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. Trans. Brit. Mycol. Soc., 38 (3) 221-239.
- Letters to the Editor, (1974). Effect of certain phenolic compounds on the growth of three isolates of *Pyricularia oryzae*. Current Science, vol. 43, 19, 612-614.
- LILLY, BARNETT, (1951). Fungi as test organism. Physiology of Fungi, 208-225.
- LILLY, BARNETT, (1951). Metabolic antagonists. Physiology of Fungi, 266-244.
- LILLY, BARNETT, (1951). Action of fungicides. Physiology of Fungi, 245-265.

- LILLY, BARNETT, (1951). Spores germination. *Physiology of Fungi*, 355-371.
- LILLY, BARNETT, (1951). **The physiology of Parasitism and Resistance.** *Physiology of Fungi*, 372-399.
- LILLY, BARNETT, (1951). Physiology of variation and inheritance of **physiological** characterers. *Physiology of Fungi*, 400-418.
- LINGK K.C., OU S.H., (1968). Standardization of the international races Numbers of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, vol. 59, 339-342.
- LOCKWOOD J.L., (1964). **Soil Fungistasis.** *Ann. Rev. of Phytopathology*, vol. 2, 341.
- MAGNE C., AUBIN J.P., GRACHTEN F., DELAFON G., (1972). Les variétés de riz cultivées au Sénégal. M.D.R. ; I.R.A.T. ; C.N.R.A. Bambey.
- MAHDI M.T., (1968). Comparative study for evaluating methods of detecting *P. oryzae* Cav. on **rice** seeds. *Proc. int. seed test Assoc.*, 33 (4), 603-607.
- MANI BHUSHANRAO K., DAY P.R., (1972). Low night temperature and blast disease development on **rice**. *Phytopathology*, vol. 62, 9, 1005-1007.
- MARIE R., (1969). Mutation et Riziculture. *Les riziculteurs de France*, n° 123, 10-16.
- MARIE R., GRILLARD M., (1970). Deux nouvelles variétés de riz pour la France. *Les riziculteurs de France*, n° 126, 11-15.
- MARIE R., (1970). L'amélioration variétale du riz en France. *Les riziculteurs de France*, n° 130, '9-13.
- MARIE R., (1972). **Intérêt de la mutation induite pour lutter contre les ennemis des plantes.** *Bulletin des riziculteurs de France*, n° 138, 12-13.
- MARTIN J.T., (1964). Role of cuticule in the defense against plant disease, *Ann. Rev. of Phytopathology*, vol. 2, 81-100.
- MAS P.M., MOLOT P.M., (1974). Atténuation de la sensibilité du melon (*Cucumis-melo*) au *Fusarium oxysporwn* SCHL. f. sp *Melonis* Six et Hans. **1. Rôle** des filtrats de milieux de germination de spores. *Ann. Phytopathologie*, vol. 6, 3, 237-245.
- MATHUR R.S., BAJPAI G.K., CHAUHAN L.S., VERMA S.C., (1964). Assesement of **losses caused** by paddy blast. *Plant Disease Reporter*, 48, 9, 711-713.
- MATHUR B.L., MATHUR R.L., (1972). Taches des feuilles du mil à chandelle hybride. *Bulletin phytosanitaire de la F.A.O.*, 20, 142.
- MESSIAEN C.M., LAPON R., (1970). Les maladies des plantes maraîchères. I.N.R.A..

- MEYER J. A., (1972). The ecological significance of Toxin production by **micro-organisms**. Phytotoxins in plant disease, 331-341.
- MICHAEL HOLLINGS, OLWEN, STONE M., (1971). **Viruses** that infect fungi. Ann. Rev. of Phytopathol., vol. 9, **93-118**.
- MIRROCHA C.J., CHRISTENSEN C. M., (1974). Fungus metabolites **toxic** to animals. Ann. Rev. of Phytopathol., vol. 12, 303-325.
- MISHRA D., SAMAL B., (1973). Benzimidazol in the regulation of plant growth and metabolism. J. Scient. Ind. Res., vol. 32, 343-348.
- MITCHELL R., HURWITZ E., (1964). Suppression of *Pythium debaryanum* by lytic rhizosphere bacteria. Phytopathology, vol. 55, 156-158.
- MOLOT P. M., MAS P. M., (1974). Atténuation de la sensibilité du melon (*Cucumis-melo*) au *Fusarium oxysporum* SCHL. f. sp. *Melonis* Six et Hans. Rôle de l'acide fusarique. Ann. Phytopathologie, vol. 6, 3, 245-265.
- MOWER R. L., SNYDER W. C., HANCOCK J.G., (1975). Biological control of Ergot by *Fusarium*. Phytopathology, vol. 65, 5-10.
- MUNSELL COLOR CO, (1963). Munsell **color charts** for plant tissues 2nd ed., Baltimore.
- MYRA CHU CHOU, PREECE T. F., (1968). The **effect** of pollen grains on infections caused by *Botrytis cinerea* Fr.. Ann. Appl. Biol., vol., 62, 11-22.
- NAGDY G. A., MAHDY T., (1965). Structure of **rice** leaves in relation to varietal **susceptibility** to rice blast, *P. oryzae*. Plant Disease Reporter, 49 (2), 170.
- NICHOLSON J.F., GRAY G. G., SINCLAIR J. B., (1971). **Excised** grass blades for fungicidal evaluation against *Helminthosporium sorokinianum*. Plant Disease Reporter, vol. 55, **959-960**.
- OU S.H., NUQUE F. L., EBRON T. T., AWODERU V., (1970). Pathogenic races of *P. oryzae* derived from monoconidial cultures. Plant Disease Reporter, vol. 54, 12, **1045-1049**.
- OU S.H., (1972). **Rice** diseases, 6-355. C.M.I., Kew Surrey, **England**.
- PARRIS G. K., (1971). Practical control of two lawn grass diseases without **fungicides** by **Removal** of mower clippings. Plant Disease Reporter, vol. 55, 9, **778**.
- PELHATE J., (1968). Etude expérimentale des interactions de moisissures **caractéristiques** des graines. Revue de Mycologie, tome 33, 1, 43-70.
- PONCHET J., (1960). Influence de la désinfection des semences. Comptes-rendus de l'Association internationale d'essais de semences, vol. 25, 1, 548-549.
- PURNELL T.J., PREECE T. F., (1971). **Effects** of foliar washing on subsequent infection of leaves of swede (*Brassica napus*) by *Erysiphe*. Physiological Plant Pathology, **1**, 123-132.

- PURUSHOTHAMAN D., RAGUNATHAN V., MAHADEVAN A., (1968). A new medium for sporulation of *P. oryzae*. Plant Disease Reporter, vol. 52; 9, 703.
- RAPILLY F., (1968). Techniques de mycologie en pathologie végétale. Ann. des épiiphyties, vol. 19, n° hors série.
- RAPILLX F., LEMAIRE J.M., CASSINI R., (1971). Les maladies des céréales (principales maladies cryptogamiques). I.N.R.A., I.T.C.F., 1-186.
- RICARD J.L., GROSCLAUDE C., ALE-AGHA N., (1974). Antagonism between *Eutypa ameniaca* and *Gliocladium roseum*. Plant Disease Reporter, vol. 58, 11, 983-984.
- ROBERTSON N. F., (1968). The growth process in fungi. Ann. Rev. of Phytopathology, vol. 6, 115-136.
- ROHRINGER R., SAMBORSKI D.J., (1967). Aromatic compounds in the host-parasite interaction. Ann. Rev. Phytopathology, vol. 5, 77-86.
- RUSCH V., LEBEN C., (1967). Epiphytic microflora ; the balloon print isolation technique. Canadian Journal of microbiology, vol. 14, 486-487.
- RUSH M.C., GRIFFORD J.R., (1972). Enhancement of fungicidal control of seed rot and seedling disease of rice by an insecticidal seed treatment. Plant Disease Reporter, vol. 56, 2, 154.
- RUSSEL G.E., (1965). The control of *Alternaria* species on leaves of sugar beet infected with yellowing viruses. Ann. Appl. Biol., 56, 111-118.
- SANTAMARIA P.A., BENOIT A., MATHUR R., (1971). *Curvularia cymbopogonis* a hitherto unreported species pathogenic to rice in the Philippines. Plant Disease Reporter, vol. 55, 4, 349.
- SCHREURS J.S., (1964). A technique for preserving leaf samples with cellophane tape. Neth. J.Pl. Path., 70, 90-91.
- SCOTT M.A., (1971). Studies on the physiology of some leaf saprophytes. Ecology of leaf surface microorganisms, 203-210. Academic Press, London.
- SHIGEYASU, AKAI, TAKESHI, KURAMOTO, (1968). Microorganisms existing on leaves of rice plants and the occurrence of brown leaf spot. Ann. Phytopathology Soc. Japan, 34, 313-316.
- SHU YEN L., VAUGHAN E.K., (1965). Control of *Pythium* infection in table beet seedlings by antagonistic microorganisms. Phytopathology, vol. 55, 986-989.
- SINKA A. K., DAS N. C., (1972). Induced resistance in rice plants to *Helminthosporium oryzae*. Physiological Plant Pathology, 2, 401-410.
- SMITH I.M., (1971). The induction of antifungal inhibitors in pods of tropical legumes. Physiological Plant Pathology, 1, 85-94.

- SPIRE D., FERAULT A.C., BERTRANDY J., RAPILLY F., SKAJENNIKOFF, (1972). Particules de type viral dans un champignon hyperparasite, *Gonatobotrys* sp. **Société de Phytopathologie**, 16/5/72.
- SPIRE D., (1967). Contribution à l'étude sérologique des virus végétaux par la technique de **microélectrophorèse** en milieu **gélifié**. Ann. des Epiphyties, 18, n° hors série, 47-63.
- SRIDHAR R., (1969). Physiology of the **rice** plants as influenced by *P. oryzae* and **nitrogen** fertilization. Ph. D. Thesis, **Annamalai University, T. AMIL, Nadu India**, 443.
- SRIDHAR R., (1970). Fertilisation azotée et pyriculariose. Plant Disease Reporter, vol. 54, 7, 632.
- SRIDHAR R., (1972). Influence of **nitrogen** fertilization and *P. oryzae* development on some oxidases, their substrate and respiration of **rice** plants. **Acta phytopathol.**, **Acad. Sci. Hungar, Hongrie**, 7, 1-3, 57-70.
- SRIDAR R., OU S.H., EBRON S.P., (1972). **Lesion** development on a **rice cultivar** by different races of the blast pathogen. Plant Disease Reporter, vol. 56, 11, 960-963.
- STANLEY M.J., STANTON J.R., KOOGLE K. D. L., (1974). Deleterious effects of Tobacco smoke on **germination** and infectivity of spores of *Puccinia graminis tritici* and on germination of spores of *Puccinia striiformis*, *Pyricularia oryzae* and *Alternaria* species. Phytopathology, vol. 64, 1143-1147.
- STOTT M.A., (1971). Studies on the physiology of some leaf saprophytes. Ecology of leaf surface **microorganisms**, 203-210.
- SUZUKI H., (1967). B. Studies on media for sporulation and stock cultures of *P. oryzae* Cav.. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 33 (extra issue), 89-100 ; 101-114.
- SUZUKI H., (1965). Histochemistry of foliage diseases. Ann. Rev. of Phytopathol., vol. 3, 265-286.
- TAKAHASHI Y., (1956). Studies on the mechanism of the **resistance** of **rice** plant to *P. oryzae*. II. Pathological changes microscopically observed in host **cells** in which fungus hyphae **don't grow well**. Bull. YAMAGATA, Uni v. Agr. Sci., vol. 2, 83-97.
- TAKAHASHI Y., (1958). A method for forecasting blast disease using the leaf sheath inoculation technique. Plant Protection, vol. 12, 339-345.
- TAYLOR J.B., (1974). Biochemical tests for identification of mycelial cultures of basidiomycetes. Ann. of Appl. Biology, vol. 78, 113-123.
- TSAO P.T., (1970). **Selective** media for isolation of pathogenic fungi. Ann. Rev. of Phytopathol., vol, 8, 157-187.

- TURKEY H. B., (1969). Implication of allelopathy in agricultural plant science. The Botanical Review, vol. 1, 1-16.
- US and Japan cooperative study, (1967). An international set of rice varieties for differentiating races of *P. oryzae*. Phytopathology, vol. 57, 3, 297-301.
- UESUGX Y., KATAGIRI M., NODA O., (1974). Joint action of chemicals with phosphorothiolate fungicides on rice blast fungus. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, vol. 40, 252-260.
- UMETSU N., KAJI J., TAMARI K., (1973). Isolation of Tenuazonic acid from blast-diseased rice plants. Agr. Biol. Chem., vol. 37, 2, 451-452.
- UNTERSTENHÖFER G., (1970). La protection des plantes intégrée vue sous l'angle de la recherche sur les pesticides dans l'industrie chimique. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, année XXIII, n° 4, 268-277.
- VAN HEUVEL J., (1969). Effects of *Aureobasidium pullulans* on numbers of lesions on dwarf bean leaves caused by *Alternaria zinniae*. Neth. J. Plant Path., vol. 75, 300-307.
- VAN DEN HEUVEL J., (1970). Antagonistic effects of epiphytic microorganisms on infection of dwarf bean leaves by *Alternaria zinniae*. Phytopathologisch Laboratorium Willie Commelin Scholten Baarn Mededeling, n° 84.
- VAN DEN HEUVEL J., (1971). Antagonism between pathogenic and saprophytic *Alternaria* species on bean leaves. Ecology of Leaf Surface microorganisms, 537-544.
- VAN DER PLANK J.E., (1963). Plant diseases : Epidemics and control. Academic Press, New-York and London, 171-203 ; 223-274 ; 285-310..
- VASIL T., PANASENKO, (1967). Ecology of microfungi, The Botanical Review, vol. 33, 3, 189-210.
- VASIL T., PANASENKO, (1967). Antagonistic interactions of fungi. The Botanical Review, vol. 33, 3, 206-215.
- VERHOEFF K., (1974). Latent infections by fungi. Ann. Review of Phytopathol., vol. 12, 99-110.
- VIENNOT-BOURGIN G., (1949). Les champignons parasites des plantes cultivées, tomes I et II, Masson et Cie.
- VIENNOT-BOURGIN G., (1974). Déclaration d'ouverture de l'Assemblée générale du 18 mars 1974. Phytiairie, Phytopharmacie, tome 23, n° 4, 263-267.
- WAKIMOTO S., YOSHI H., (1958). Relation between polyphenols contained in plants and phytopathogenic fungi. 1. Polyphenols contained in rice plants. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, vol. 23, 78-84.

- WAKSMAN A., (1948). Antagonismes **microbiens** et substances antibiotiques.
Traduction de Jacques DUCHE.
- WARREN R.C., (1972). Attempts to **define** and mimic the **effects** of pollen on the development of **lesions caused** by *Phoma betae* inoculated **onto** sugar beet leaves. Ann. of Appl. Biology, vol. 71, 193-200.
- WARREN R.C., (1972). The **effect** of pollen on the fungal leaf microflora of *Beta vulgaris* L. and on infection of leaves by *Phoma betae*. Netherlands Journal of Plant Pathology, vol. 78, 3, 89-98.
- WARREN R.C., (1972). **Interference** by **common** leaf saprophytic fungi with the development of *Phoma betae* on sugar beet leaves. Ann. of Appl. Biology, vol. 72, 137-144.
- WOOD, (1967). Factors **affecting** infection : interaction between pathogen and other microorganisms. Latent infections. Physiological Plant Pathology, Blackwell scientific **Publications**, Oxford and Edimbourg, 88-122.
- YATEGASHI, HEBERT T.T., (1976). Perithecial development and nuclear behavior in *Pyricularia*. Phytopathology, vol. 66, 122-126.
- YASUDA Y., NOGUCHI, (1972). Incorporation of ¹⁴C-Thiophanatemethyl into the germ tubes of *P. oryzae* spores. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, vol. 38, 252-253.
- YASUDA Y., NAKATA A., NOGUCHI T., (1973). **Effect** of thiophanatemethyl on the infection process of some plant pathogenic fungi. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, vol. 39, 3, 246-250.

A N N E X E S

ANNEXE TECHNIQUE n° 1

COMPOSITION DES SUBSTRATS NUTRITIFS UTILISES POUR LA CULTURE DES GERMES CRYPTOGAMIQUES

1.1 - LE MISATO pH 6.5

- Amidon soluble.....	10 g
- Extrait de levures.....	3 g
- Gélose (éventuellement).....	15 g
- Eau distillée q. s. p.....	1 000 ml

Le pH observé **après** autoclavage est de **6,5**.

1.2 - MILIEU A BASE D'ORGEOSE

- Orgéose.....	15 g
- Gélose (éventuellement).....	15 g
- Eau distillée q. s. p.....	1 000 ml

L'orgéose est un produit **commercialisé** par JAMMET et dont les composantes sont : orge, **dextrine**, **maltose**, malt, germes de blé, levure, sel.

1.3 - MILIEU A GRAINS D'ORGE CUIITS A LA VAPEUR

Sa préparation est rigoureusement identique **à** celle du milieu **à** base de paddy que nous décrivons au paragraphe suivant.

1.4 - PADDY/AGAR

A défaut de chaume de riz, le milieu spécifique par excellence **de-**

vrait **être** celui fabriqué avec du paddy ; l'essentiel des substances nutritives étant fourni par les grains de riz enveloppes par les **pièces** florales (glumes et glumelles) ; l'ensemble portant le nom de paddy.

Le paddy est trempé une dizaine de minutes et lavé **abondamment** à l'eau **distillée** afin d'en **éliminer** les traces de fongicides de conservation.

Il est alors réparti à raison de 150 grains par **boîte** de Petri de **diamètre** intérieur 110 mm.

Parallèlement, nous préparons de l'eau gélosée (20 g de **gélose** par litre d'eau distillée). Après gonflement, l'eau gélosée est coulée dans la **boîte** de Petri jusqu'au niveau supérieur des grains. Nous portons alors les **boîtes** de Petri dans l'autoclave **réglée** à 120° pendant 20 minutes.

L'inoculation des **boîtes** a lieu **après** refroidissement et solidification de la **gélose**.

1.5 - POMME DE TERRE-CAROTTE-AGAR ou PCA

- Pulpe **rapée** de carotte..... 20 g
- Pulpe **rapée** de pomme de terre. 20 g
- **Gélose** (éventuellement)..... 20 g
- Eau distillée q.s.p..... 1 000 ml

Ce milieu est **préconisé** par LANGERON ainsi que le C.M.I. (Commonwealth Mycological Institute).

1.6 - "POTATOE-DEXTROSE-AGAR" ou PDA

- Pulpe rapée de **pomme** de terre. 200 g
- Glucose 20 g
- Agar (eventuellement) 20 g
- Eau distillée q. s. p..... 1 000 ml

1.7 - EXTRAIT DE PADDY

- 20 g de paddy à cuire pendant 30 mn ; broyer et filtrer,
 - ajuster le volume à 1 000 ml par de l'eau distillée,
 - ajouter 1.5 g de glucose,
-

- agar = 15 g (éventuellement).

Stériliser 20 mn à 120°C.

1.8 - FORMULE A DU MILIEU SYNTHETIQUE DE TANAKA et KATSUKI (1965)

- Sucrose	15,0 g
- NH ₄ NO ₃	1,0 g
- KH ₂ PO ₄	0,5 g
- K ₂ H PO ₄	0,5 g
- MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,25 g
- CaCl ₂ . 6 H ₂ O.....	0,05 g
- FeSO ₄ . 7 H ₂ O.....	0,75 mg
- MnSO ₄ . 5 H ₂ O.....	0,22 mg
- CuSO ₄ . 5 H ₂ O.....	0,60 mg
- ZnCl ₂	7,50 mg
- (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O.....	0,06 mg
- H ₃ BO ₄	0,09 mg
- Biotine.....	5,0 µg
- Thi amine	2,5 mg
- H ₂ O.....	1 000 g

Au début de nos expériences seulement, nous avons dû utiliser ce milieu qui, outre sa complexité, ne présente aucun avantage **exceptionnel** par rapport aux milieux naturels ; pour cette raison et compte-tenu du fait que notre travail n'est pas spécifiquement axé sur la **détermination** qualitative et quantitative des exigences **trophiques** du parasite, nous n'avons pas jugé utile de le garder.

1.9 - AUTRES MILIEUX PRECONISES DANS LA BIBLIOGRAPHIE

- Solution de TOCHINAI à 1 % de décoction de chaume de riz
- Feuilles de *Brachiaria mutica*
- Milieu de OGASA-WARA **glucosé**
- feuilles **stérilisées** de *Pennisetum typhoides* STAPT. et HUBBARD

ANNEXE TECHNIQUE n° 2

COMPOSITION DE LA SOLUTION NUTRITIVE DE KIMURA

SO ₄ (NH ₄) ₂	48,2 mg
SO ₄ K ₂	15,2 mg
SO ₄ Mg.....	65,9 mg
NO ₃ K.....	18,5 mg
(NO ₃) ₂ Ca.....	59,9 mg
PO ₄ H ₂ K.....	24,8 mg
Sesqui citrate de Fe.....	15,0 mg en paillettes
B.....	0,20 ppm
Mn.....	0,40 ppm
Zn.....	0,01 ppm
CU.....	0,01 ppm
Mo.....	0,01 ppm

Remarques : - il est possible d'ajouter du silicate de sodium,
- 100 plants de riz bons à repiquer exportent environ 1,20 g
d'azote, 0,19 g de phosphore et 0,94 g de potassium.

[cf travaux de la station d'Agronomie de Montfavet, cités par le Professeur MARIE ;
station d'amélioration des plantes, I.N.R.A. Montpellier].

ANNEXE TECHNIQUE n° 3

TEMPERATURE, HUMIDITE RELATIVE ET HEMEROPERIODE MOYENNES
RELEVES EN SERRE

Mois / Paramètres	Novembre	Déc: embre	Janvi er	Février	Mars	Mois / Mini Maxi
Température	25,8°	25,6°	25,7°	27,6°	31,8°	Maxima
	18,3°	17,4°	13,8°	15,4°	16,1°	Minima
Humidité relative	68,4 %	69,8 %	58,6 %	64,3 %	79,8 %	Maxima
	49,2 %	49,0 %	37,1 %	41,2 %	44,8 %	Minima
Intensité héméropériode (16 heures) 4h à 20 h	35 000 lux	Intensité héméropériode (16 heures) 4 h à 20 h				

ANNEXE TECHNIQUE n° 4

TECHNIQUE D'ISOLEMENT DES GERMES CRYPTOGAMIQUES DU RIZ

4.1 - ISOLEMENT DIRECT

4.1.1 - Sans désinfection préalable

La **méthode** consiste à placer les fragments **végétaux** (feuille, cou, grain) en chambre humide disposée à **25°C** ou à la température ambiante de laboratoire ; l'examen direct à la loupe binoculaire permet de détecter des colonies que l'on repique isolément et que l'on purifie progressivement.

4.1.2 - Avec désinfection préalable

Avant incubation en chambre humide, le matériel végétal est désinfecté soit par le chlorure mercurique 1 ‰ pendant 3 mn, soit par l'**hypochlorite** de sodium 10 % pendant 10 mn, soit enfin par immersion dans l'alcool éthylique 50 % pendant 3 mn, puis rincé abondamment à l'eau distillée stérile avant **d'être séché dans une double épaisseur** de papier filtre stérile ; l'incubation est alors réalisée sur substrat nutritif gélosé à **25°C/obscurité** continue.

L'obtention de cultures pures se fait comme **précédemment**.

4.2 - METHODE DE LAVAGE

Le matériel végétal est agité pendant une heure dans une quantité définie d'eau distillée stérile ; les organes végétaux serviront à isoler les germes non détachés par lavage, ; la fraction liquide est diluée plusieurs fois, chacune de ces dilutions est étalée sur substrat nutritif solide que l'on incube

à 25°C/obscurité continue.

Il suffit alors d'en suivre l'évolution pour isoler les colonies pratiquement pures au tout début de leur développement. Il nous faut signaler l'inconvénient que constitue pour cette méthode, la présence de germes bactériens difficiles à éliminer.

4.3 METHODE D'IMPRESSION

Les organes végétaux sont disposés au fond d'une **boîte** de Petri stérilisée dans laquelle le milieu gélosé ramené à 40°C est coulé. Après solidification du milieu, les portions de gélose porteuses d'échantillons sont prélevées aseptiquement par découpage et incubées 2 heures à 25°C ; les fragments sont alors éliminés et le milieu ainsi inoculé est maintenu à 25°C.

ANNEXE TECHNIQUE n° 5

METHODES DE CONFRONTATION DE *P. oryzae* AVEC LES GERMES
ANTAGONISTES SUR SUBSTRAT GELOSE5.1 - CONFRONTATION SIMULTANEE

Le parasite **est directement** confronté avec le germe antagoniste. Dans une **boîte** de Petri renfermant environ 30 ml de milieu **gélifié**, les 2 **inoculats** sont disposés **à** la distance d l'un de l'autre [**d** = 30 mm dans le **criblage** sélectif et **d** = 20 mm dans les expériences ultérieures] et symétriquement par rapport au centre de **la boîte** de Petri.

Le degré d'inhibition de la croissance **mycélienne** du parasite par le germe antagoniste est évalué par la relation :

$$M_i = \frac{M_T - M_E}{M_T} \times 100 \quad \text{où}$$

M_T = croissance mycélienne (définie en cm^2 à l'aide du **planimètre**) du parasite sur boîte de Petri "témoin franc" (= T)

M_E = croissance mycélienne (cm^2) du parasite confronté avec le germe antagoniste

M_i = pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du parasite par le germe antagoniste et par rapport au "témoin franc".

Remarques : - Dans ce type de confrontation, l'inhibition du parasite par le germe antagoniste fait intervenir tant les dérivés métaboliques de l'antagonisme que la non miscibilité éventuelle des mycélia des germes en présence.

- Pour confronter simultanément le parasite avec 2 germes antagonistes, nous avons disposé le *P. oryzae* au centre de la boîte de Petri et les **ger-**

mes antagonistes sur un **même diamètre** et symétriquement **par rapport au parasite**.

- Pour impliquer **simultanément** les 3 germes antagonistes, nous avons disposé le parasite au centre ; les antagonistes étant placés sur 3 rayons définissant 2 à 2 un angle de **120°**.

- L'intervention simultanée de 2 ou plus de 2 germes permet de révéler un antagonisme ou une synergie dérivant de la nature des interactions **établies** entre les germes en présence.

5.2 - CONFRONTATION DIFFEREE

Le germe antagoniste n'agit que par ses dérivés métaboliques, aucun contact n'étant établi entre mycelia.

5.2.1 - Préparation du substrat

Le milieu gélosé est tapissé stérilement d'une feuille de cellophane (n° 600 du commerce) découpée à la dimension interne de la **boîte** de Petri de 90 mm. La pose de la cellophane, en dépit de sa simplicité apparente est relativement délicate ; en effet, la cellophane se contracte et s'enroule sur **elle-même** dès son contact avec le substrat gélosé ; le fait de laisser reposer l'ensemble pendant 5 à 10 mn suffit pour **homogénéiser** l'hydratation de la cellophane et partant, de parfaire l'étalement.

Il faudra **particulièrement** veiller à expulser la moindre bulle d'air entre cellophane et milieu nutritif afin d'une part, de ne pas nuire à la régularité du développement de la colonie antagoniste, d'autre part, d'assurer une répartition homogène des substances diffusibles produites par les germes antagonistes et migrant au travers de la paroi de cellophane pour imprégner le milieu **gélosé**.

5.2.2 - Inoculation par le germe antagoniste

Le substrat ainsi préparé est inoculé en son centre par le germe antagoniste. L'incubation est réalisée à **25°/obscurité** continue pendant 48 heures.

5. 2. 3 ▪ Inoculation par *P. oryzae*

Au bout de 48 heures, la cellophane ainsi que la colonie antagoniste sont éliminées aseptiquement ; l'inoculum parasite est alors disposé à l'endroit précis du site d'inoculation du germe antagoniste ; l'incubation est faite à 25°/obscurité continue.

5. 2. 4 ▪ Evaluation du pourcentage d'inhibition

L'inhibition de la croissance en surface du parasite est évaluée conformément à la relation utilisée au paragraphe 5.1 et par rapport au témoin ; cependant, étant donné la régularité des colonies, l'inhibition peut être estimée en tenant compte de la croissance radiale (mm) du parasite confronté en différé avec l'antagoniste.

5.3 ▪ CONJUGAISON DES CONFRONTATIONS DIFFEREE ET SIMULTANEE;

Cette technique permet d'associer les deux méthodes précédentes. Sur un même substrat nutritif, le parasite est confronté en DIFFERE à *Myrothecium₁ verrucaria* et en SIMULTANE à *Trichoderma₅ viride* et/ou *Chaetomium₁ gtoboswn*.

5. 4 ▪ CONFRONTATION SUR SUBSTRAT GÉLOSE DU PARASITE AVEC LE FILTRAT DE CULTURE (naturel ou autoclave) OU UN MÉLANGE DE FILTRATS DE CULTURES LIQUIDES DES GERMES ANTAGONISTES

5. 4. 1 ▪ Obtention de filtrats et mélanges de filtrats de cultures liquides des germes antagonistes

- Préfiltration : les cultures liquides des germes sont débarrassées des feutrages mycéliens par préfiltration sur papier filtre PRAT-DUMAS n° 1.

- Filtration stérilisante : le filtrat limpide précédemment obtenu est filtré sous vide soit sur BOUGIES CHAMBERLAND 5L5, soit de préférence sur un dispositif mis au point par la "GELMAN INSTRUMENT COMPANY" ; ledit système comporte d'une part un entonnoir inox, d'autre part deux membranes filtrantes dont les pores ont respectivement une dimension de 1,2 microns (membrane supérieure) et 0,2 micron (membrane inférieure). Ces membranes donnent de meilleurs résultats

lorsqu'elles sont inversées (face supérieure en bas) sur l'**entonnoir** inox.

Les conditions de travail aseptiques garantissent l'obtention d'un filtrat de culture exempt de tout germe exogène et rigoureusement **stérile**.

Les liquides recueillis sont utilisés soit isolément, (filtrat de culture ou FC) soit mélangés volume **à** volume (mélange de filtrat de culture ou MFC) ; dans tous les cas, le volume final de chaque type de **préparation** est fixe et égal **à** 12 ml ; chacune de ces préparations est utilisée sous forme naturelle ou **après** autoclavage (20 mn à **120°**).

5.4.2 - Préparation du substrat de confrontation

A l'aide d'un **emporte-pièce stérilisé** et de diamètre intérieur 6 mm, nous aménageons au site **d'inoculation** (centre de la **boîte**) une cavité dont la dimension est telle que la rondelle inoculum du parasite en épouse exactement la forme.

5.4.3 - Confrontation

Nous plaçons 2 **à** 3 gouttes du FC ou MFC dans la **cavité** que nous recouvrons par la rondelle inoculum du parasite (**mycélium** en haut) ; le liquide ne doit alors déborder que très peu autour du site d'inoculation ; l'incubation est réalisée à **25°/obscurité** continue. Nous avons suivi **l'évolution** de la croissance radiale pour divers délais d'incubation.

ANNEXE TECHNIQUE n° 6

METHODES DE CONFRONTATION DU PARASITE AVEC LES GERMES
ANTAGONISTES SUR MILIEU LIQUIDE6.1 ▪ CULTURE DU PARASITE SUR FILTRAT (FC) OU MELANGE DE FILTRATS (MFC)
DE CULTURES (C) LIQUIDES DES GERMES ANTAGONISTES

La préparation des FC ou MFC jouant le rôle de substrat liquide pour le parasite obéit aux mêmes règles que celles énoncées au paragraphe 5.4.1 (annexe n° 5) ; pour chaque type de préparation, le volume final est fixe et égal à 30 ml placés stérilement dans un erlenmeyer de 100 ml préalablement stérilisé (20 mn au Four Pasteur réglé à 180°C).

Après inoculation par le parasite, nous incubons à 25°/obscurité continue pendant 10 jours et évaluons la croissance pondérale en fonction de la composition de base du substrat liquide.

Afin de détecter l'âge optimum des cultures antagonistes correspondant au maximum d'inhibition de la croissance pondérale de *P. oryzae*, celles-ci sont incubées pendant 5, 9 et 29 jours.

6.2 ▪ TECHNIQUE DES ERLLENMEYER JUMELÉS

Il eut été intéressant de tester cette technique qui, mieux que toutes les autres, devrait révéler la dynamique du phénomène ; en raison des contraintes matérielles, nous n'avons pu l'expérimenter et nous nous bornerons à en donner le principe : les deux erlenmeyer sont jumelés par les extrémités rodées de tubulures latérales émergeant à leur base.

Un dispositif de filtres millipores occupant la section des tubulu-

res latérales joue le **rôle** de crible de sélection ne laissant transiter que des molécules de faible dimension (métabolites **notamment**).

Introduire le liquide de culture et inoculer l'un des erlenmeyer par le germe antagoniste et l'autre par le parasite ; les germes, se développent chacun dans l'erlenmeyer qui lui correspond ; les métabolites des germes antagonistes sont sensés migrer au travers des filtres millipores et imprégner le substrat de culture du parasite dont la croissance **pondérale** est plus ou moins **affectée**.

Il serait intéressant de pouvoir associer à ce dispositif un **système** d'agitation permanente pour faciliter le flux des substances diffusibles ainsi que l'**homogénéisation** du contenu de chaque erlenmeyer.

Cette **méthode** revient donc à confronter "**simultanément**" antagoniste et parasite sur milieu liquide.

6.3 - CULTURE DU PARASITE SUR FILTRAT DE CULTURE DE L'ANTAGONISTE CONFRONTE "SIMULTANEMENT" AVEC LE PARASITE SUR MILIEU LIQUIDE

Dans l'expérience **précédente**, il faut recueillir le liquide de culture du germe antagoniste ; ce liquide est **préfiltré**, filtré **stérilement** et inoculé par le parasite ; le comportement de ce dernier sur un tel substrat devrait donner une idée des modifications (bénéfiques ou non pour le parasite) exercées par le parasite sur la culture antagoniste au cours de la confrontation simultanée.

ANNEXE TECHNIQUE n° 7

COMPOSITION DU TAMPON MC ILVAINE

Aci de citrique H ₂ O M/10	Phosphate di ssodique 12 H ₂ O M/5	pH
196,00 ml	4,00 ml	2,2
158,90 ml	41,10 ml	3,0
122,90 ml	77,10 ml	4,0
106,50 ml	93,50 ml	4,6
92,80 ml	107,20 ml	5,2
79,10 ml	120,90 ml	5,8
61,50 ml	138,50 ml	6,4
35,30 ml	164,70 ml	7,0
5,50 ml	194,50 ml	8,0

ANNEXE TECHNIQUE n° 8

LISTE DES VARIETES HOTES RECOLTEES SUR LE TERRAIN

- 1 - ACORN 1
 - 2 - ARPA SALY
 - 3 - BALA
 - 4 à 26 - BOUAKE Notées Pl à P23
 - 27 - BRANSA
 - 28 - CKC
 - 29 - DELTA
 - 30 - DJIBELOR- 346 D
 - 31 - DJIBELOR 72-2-74
 - 32 - DJIBELOR 72-2-75
 - 33 - DJIBELOR 72-2-76
 - 34 - DJIBELOR 72-2-84
 - 35 - DOURADO PRECOLE
 - 36 - DUBOVSKY
 - 37 - EVIOUKOUE
 - 38 - GETU
 - 39 - IKP
 - 40 - IR 442
 - 41 - IR 528
 - 42 - KOUELOUAI
 - 43 - KPF-6
 - 44 - L-5-26
 - 45 - L-11-14
 - 46 - MMR 67-13 a1
-

- 47 - NORIN 21
- 48 - SAUNTANE
- 49 - SEMBON ASAH 1
- 50 - SEFA 302 G
- 51 - SEFA 319 G
- 52 - SEFA 319 G₂
- 53 - SEFA 319 G₇
- 54 - SEFA 322 G_{1g}
- 55 - SEFA 272 G
- 56 - SEFA 301 D
- 57 - SEFA 365 G
- 58 - SEFA 66-31-19
- 59 - SEFA 497 G
- 60 - SEFA 249 D
- 61 - SEFA 288 D
- 62 - SEFA 314 G
- 63 - SEFA 363 G
- 64 - SOAVINA
- 65 - SR-26 b
- 66 - SHINRIKI 11
- 67 - TC-1-49
- 68 - TAÏNUNG CHUEN 2 S
- 69 - TEP-TEP
- 70 - TCHAOYANG n° 1
- 71 - TTW
- 72 - UZ ROS 269
- 73 - ZEN IT
- 74 - **6044**
- 75 - **63-104 XLS/117 B**
- 76 - **63-104 YLS/160 B**
- 77 - **13 a²X IGC/334**

ANNEXE TECHNIQUE n° 9

LISTE DES 71 PAYS ET ETATS
AFFECTES PAR LA PYRICULARIOSE
D'après C.M.I. 1961

AFRIQUE (18)

Côte d'Ivoire
Ghana
Guinée
Kenya
Madagascar
Malawi
Maroc
Mauritanie *
Nigeria
Ouganda
République du Soudan
République Sud Africaine
Rhodésie
Sénégal
Sierra Leone
Tanzanie
Zaïre
Zambie

ASIE (19)

Birmanie
Bornéo
Ceylan (Sri-Lanka)
Chine
Corée
Hong-Kong
Inde
Irak
Japon
Java
Malaisie
Pakistan
Philippines
Sarawak
Taiwan (Formose)
Thaïlande
Turquie
U. R. S. S. (**Asie** Centrale)
Viet Nam

* Suite à nos observations sur le terrain, nous avons dû ajouter la République Islamique de Mauritanie.

AUSTRALASIE - OCEANIE (5)

Australie Occidentale
Australie du Nord
Queensland
Fidji
Hawaï

EUROPE (8)

Bulgarie
France
Grèce
Hongrie
Italie
Portugal
Roumanie
Yougoslavie

AMERIQUE du NORD (2)

Mexique
U. S. A.

AMERIQUE CENTRALE (10)

Costa Rica
Honduras britannique
Guatemala
Jamaïque
Nicaragua
Panama
Porto-Rico
République **dominicaine**
Salvador
Trinité et Tobago

AMERIQUE du SUD (9)

Argentine
Brésil
Colombie
Guyane britannique
Paraguay
Pérou
Surinam
Uruguay
Venezuela

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE

DISTRIBUTION MAPS OF PLANT DISEASES

Map No. 51 Edition 4

Revised to 1. xi. 1961

Pathogen: Piricularia oryzae Cav.

Hosts: rice (Oryza sativa) & other Gramineae

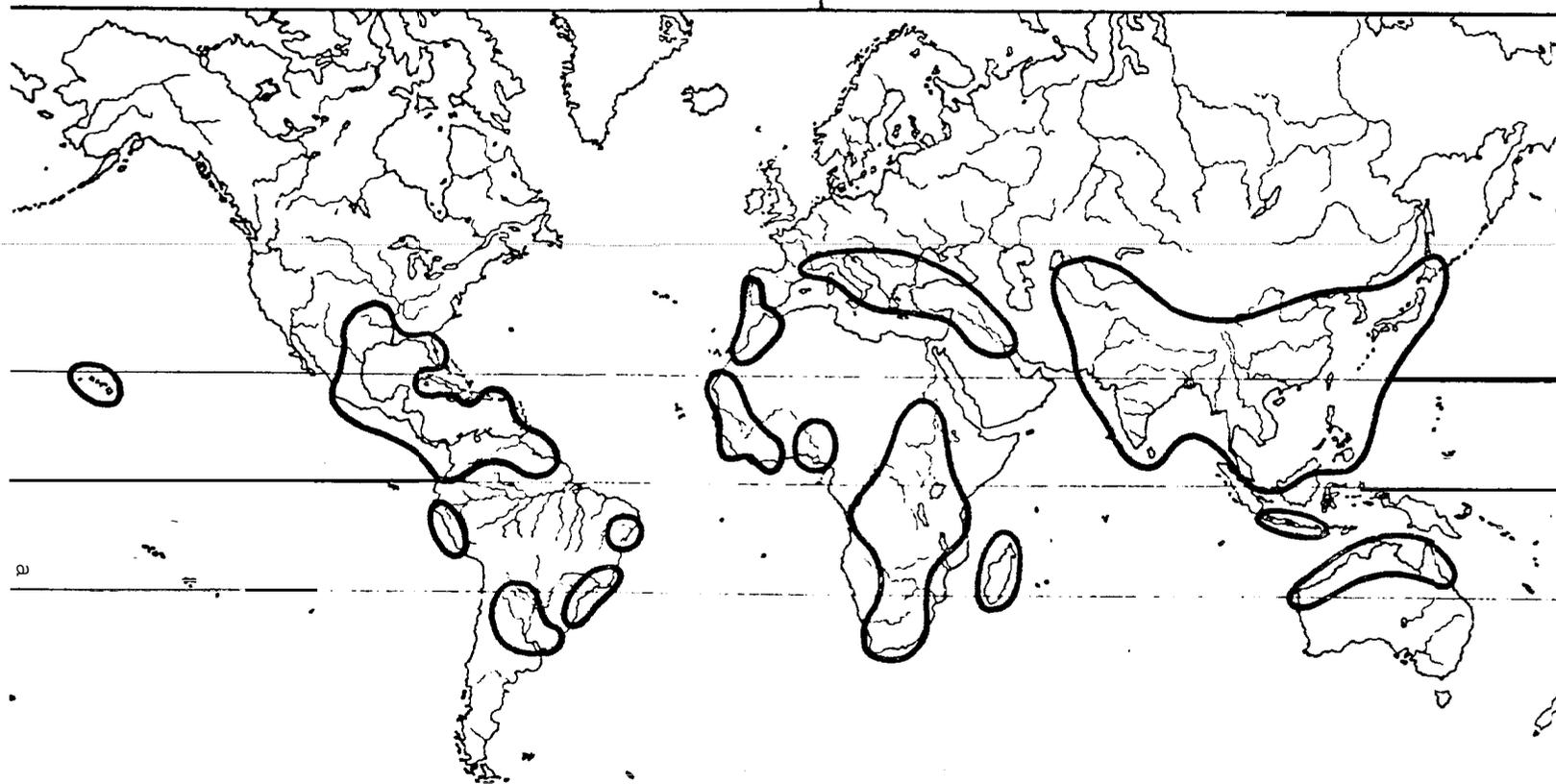


PLANCHE n° 1A - CRIBLAGE SELECTIF

Confrontation (âgée de 7 j, sur PCA/25°C/obscurité continue) de *P₁.oryzae* avec les germes dont on recherche l'activité **antagonique**.

En haut de la **boîte** de Petri, la colonie de *P₁.oryzae* ; en bas, celle du germe testé.

- 1 - *P₁.oryzae* seul = Témoin
- 2 - *P₁.oryzae* x *Chaetomium globosum*
- 3 - *P₁.oryzae* x *Trichoderma viride*

- 4 - *P₁.oryzae* x *Gonatobotrys simplex*
- 6 - *P₁.oryzae* x *Penicillium frequentans*
- 7 - *P₁.oryzae* x *Myrothecium verrucaria*

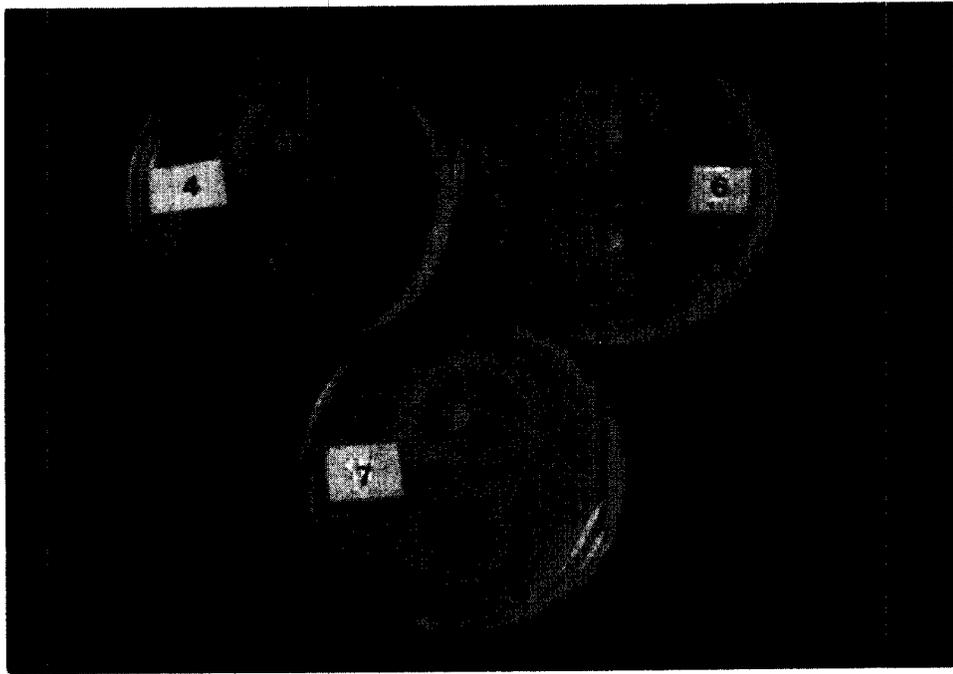
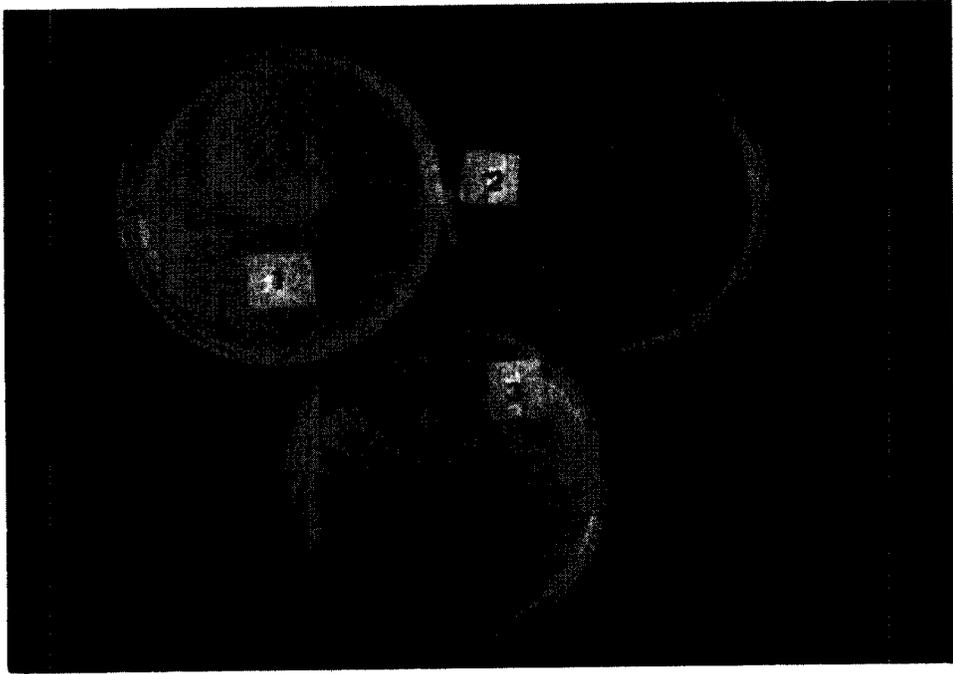


PLANCHE n° I_B - CRIBLAGE SELECTIF

Confrontation (âgée de 7 j, sur PCA/25°C/obscurité continue) de *P₁. oryzae* avec les germes dont on recherche l'activité antagonique.

En haut de la **boîte** de Petri, la colonie de *P₁. oryzae* ; en bas, celle du germe testé.

- a - *P₁. oryzae* x *Gonatobotryum maculicolum*
- 9 - *P₁. oryzae* x *Epicoccum purpurascens* (Extra.)
- 10 - *P₁. oryzae* x *Epicoccum purpurascens* (ITO.)
- 11 - *P₁. oryzae* x *Alternaria dauci*
- 12 - *P₁. oryzae* x *Gliocladium roseum*
- 13 - *P₁. oryzae* x *Pullularia (Aureobasidium) pullulans*

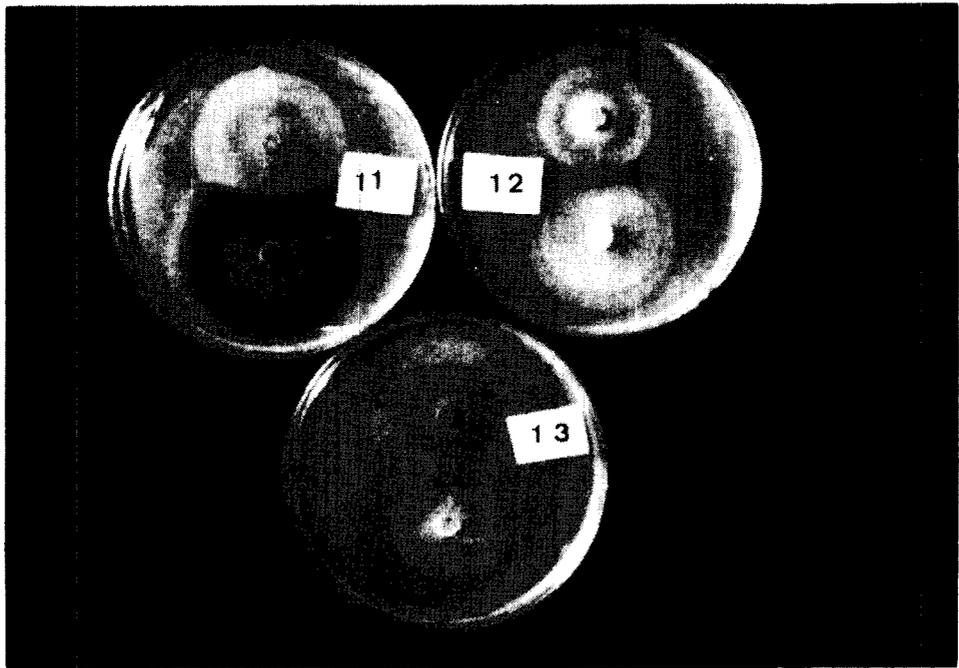
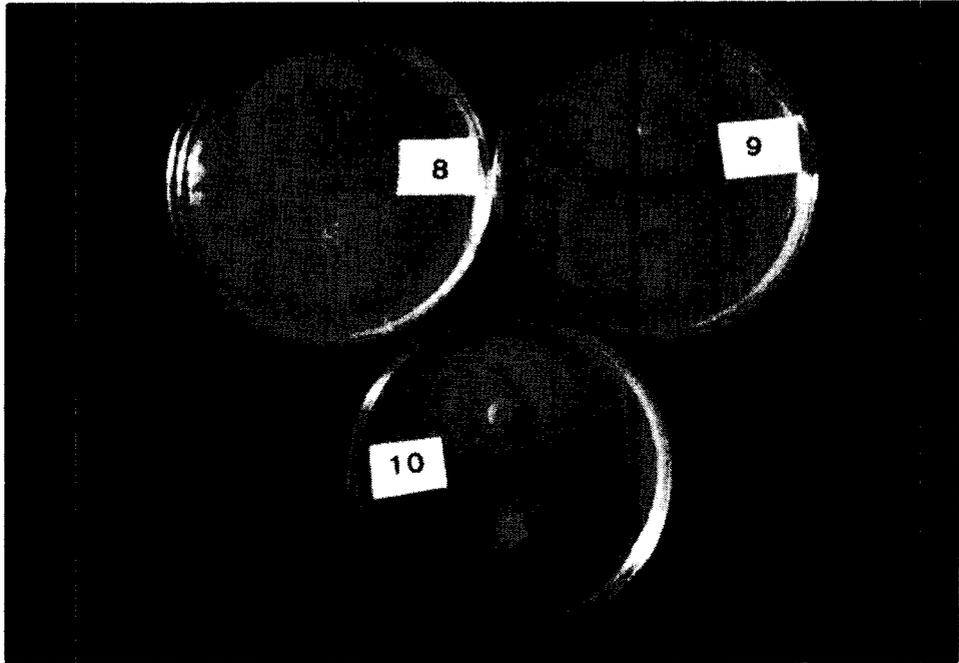


PLANCHE n° IC • CRIBLAGE SELECTIF

Confrontation (âgée de 7 j, sur PCA/25°C/obscurité continue) de *P₁. oryzae* avec les germes dont on recherche l'activité antagoniste.

En haut de la botte de Petri, la colonie de *P₁. oryzae* ; en bas, celle du germe testé.

- 1 - *P₁. oryzae* x *Curvularia lunata*
 - 2 - *P₁. oryzae* x *Curvularia clavata*
 - 3 - *P₁. oryzae* x *Fusarium roseum*
 - 4 - *P₁. oryzae* x *Coniothyrium minitans*

 - 5 - *P₁. oryzae* x *Aspergillus niger*
 - 6 - *P₁. oryzae* x *Drechslera rostrata*
 - 7 - *P₁. oryzae* x *Coniothyrium minitans*
 - 8 - *P₁. oryzae* x *Starkeyomyces koorchalomoïdes*
-

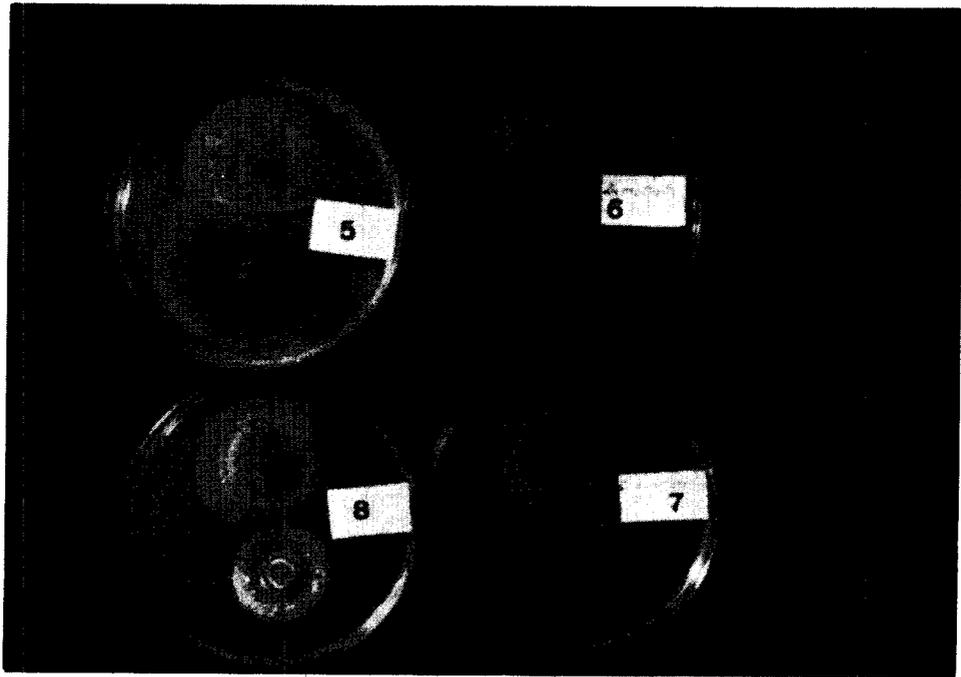
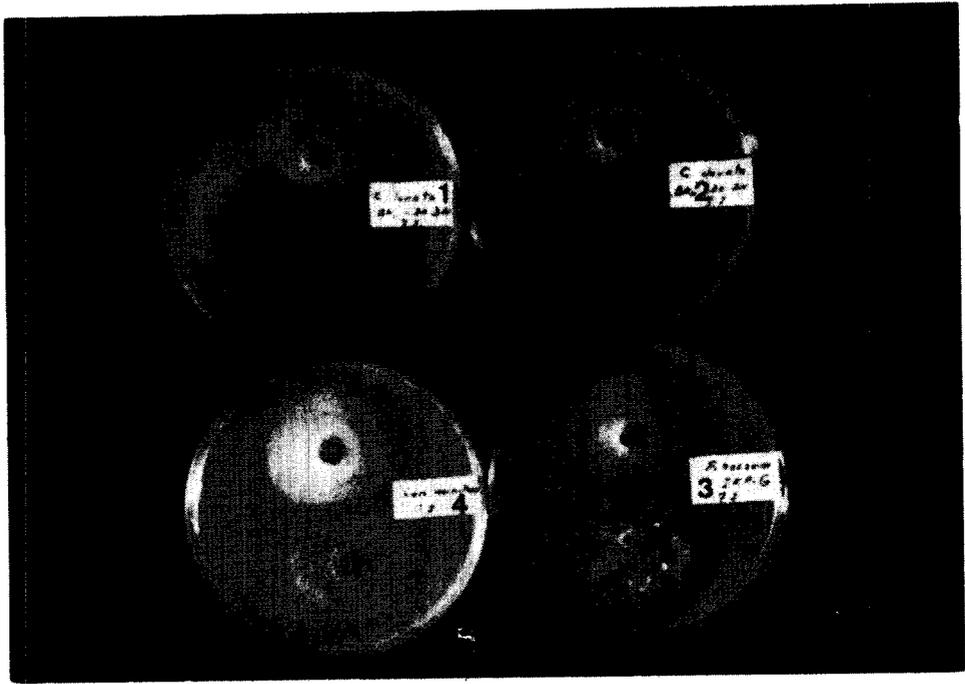


PLANCHE n° II - *Pyricularia*₁ *oryzae*

Confrontation simultanée (âgée de 7 j, sur PCA/25°C/obscurité continue) avec les germes antagonistes.
En haut de la botte de Petri, la colonie de *P*₁. *oryzae* ; en bas, celle du germe dont on évalue l'activité antagonique.

A - pH₀ 3,50

B - pH₀ 5,55

ω - obscurité continue

1 - *P*₁. *oryzae* x 0 - Témoin

2 - *P*₁. *oryzae* x *T*₅. *viride*

3 - *P*₁. *oryzae* x *C*₁. *gibboswn*

4 - *P*₁. *oryzae* x *M*₁. *verrucaria*

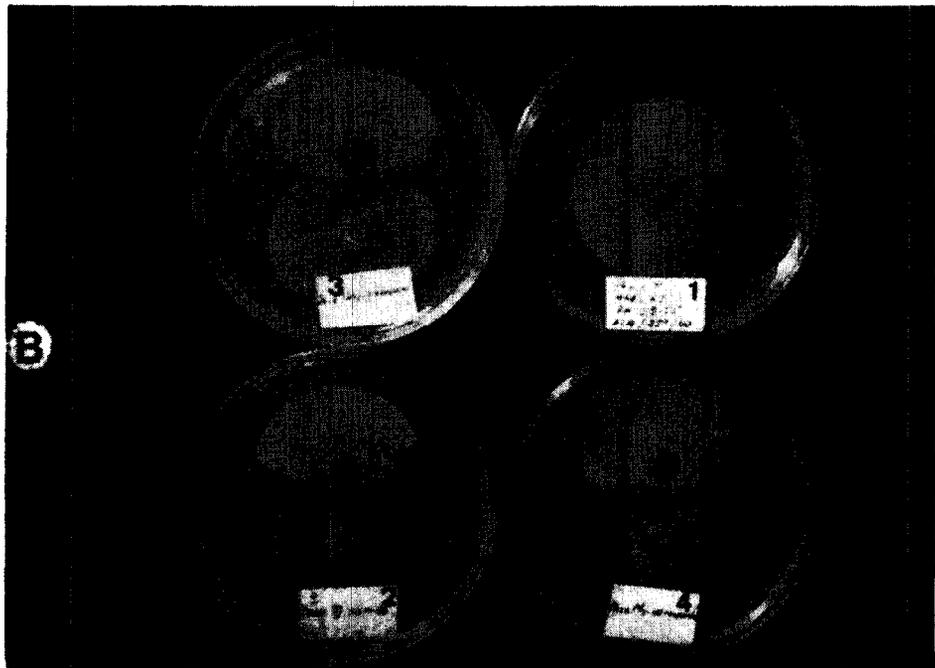
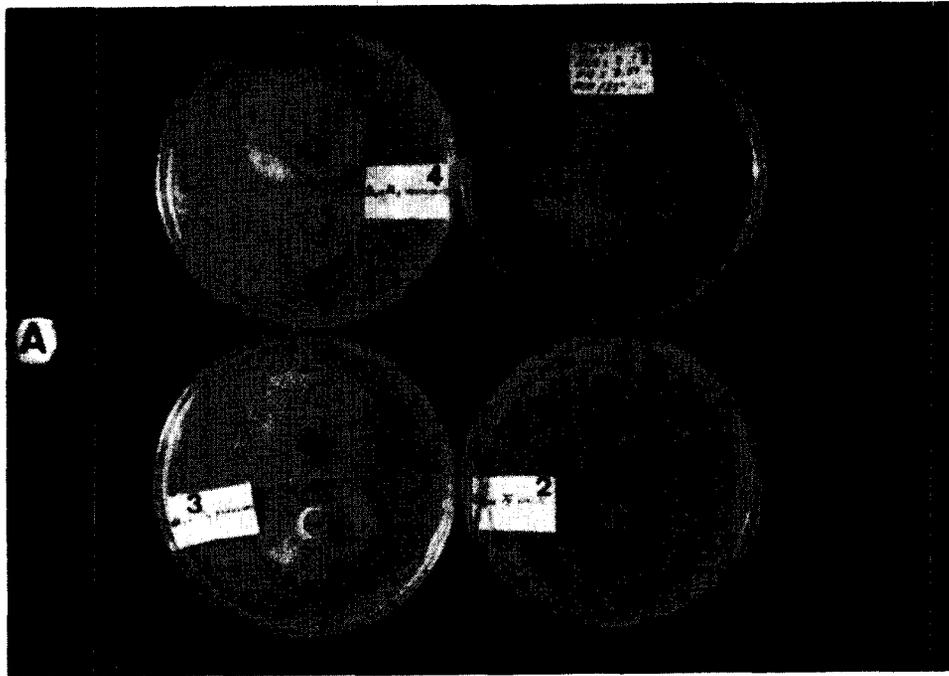


PLANCHE n° IIIA - *Pyricularia*₁ *oryzae*

Morphoses affectant le mycélium au cours d'une confrontation simultanée (dégée de 3 j/25°C/PCA/pH₀ 3,50/obscurité continue) avec les germes antagonistes ; les préparations sont issues de la région proximale de la colonie du parasite.

- A - *P*₁. *oryzae* x *T*₅. *viride* (GX 1440) : cellules **mycéliennes** fortement épaissies, se désarticulant facilement, intensément colorables par le bleu coton ; faciès global de "balai de sorcière".
- B - *P*₁. *oryzae* x *T*₅. *viride* (GX 1440) : filament **mycélien** contourné.
- C - *P*₁. *oryzae* x *C*₁. *globosum* (GX 2160) : hélice
- D - *P*₁. *oryzae* x *C*₁. *globosum* (GX 2160) : torsades

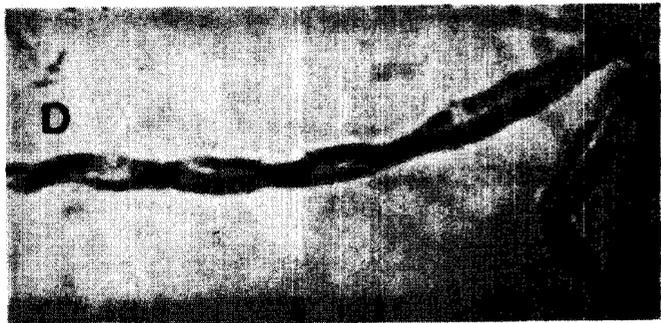
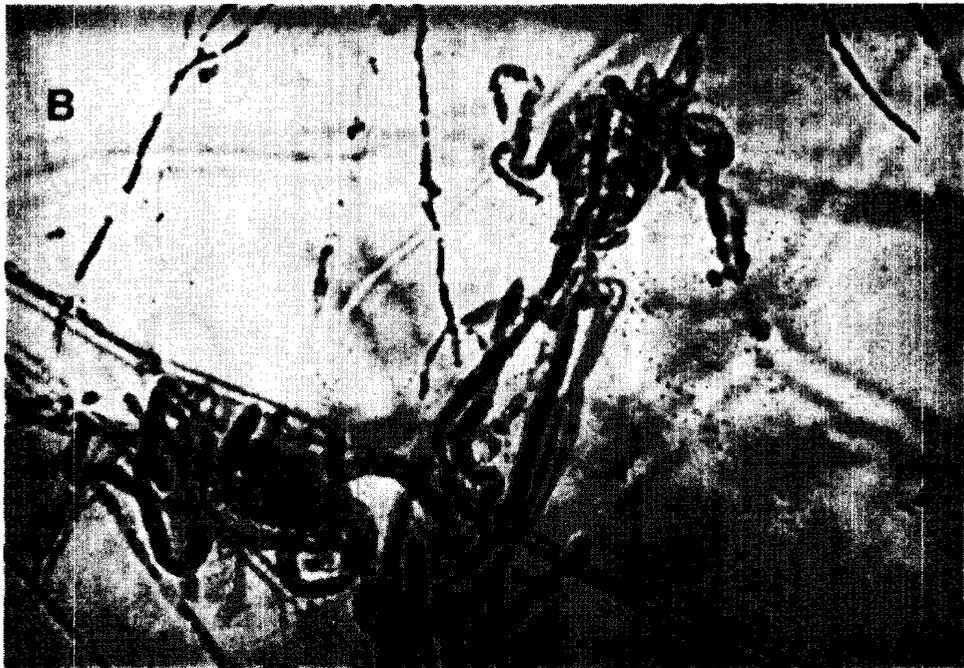
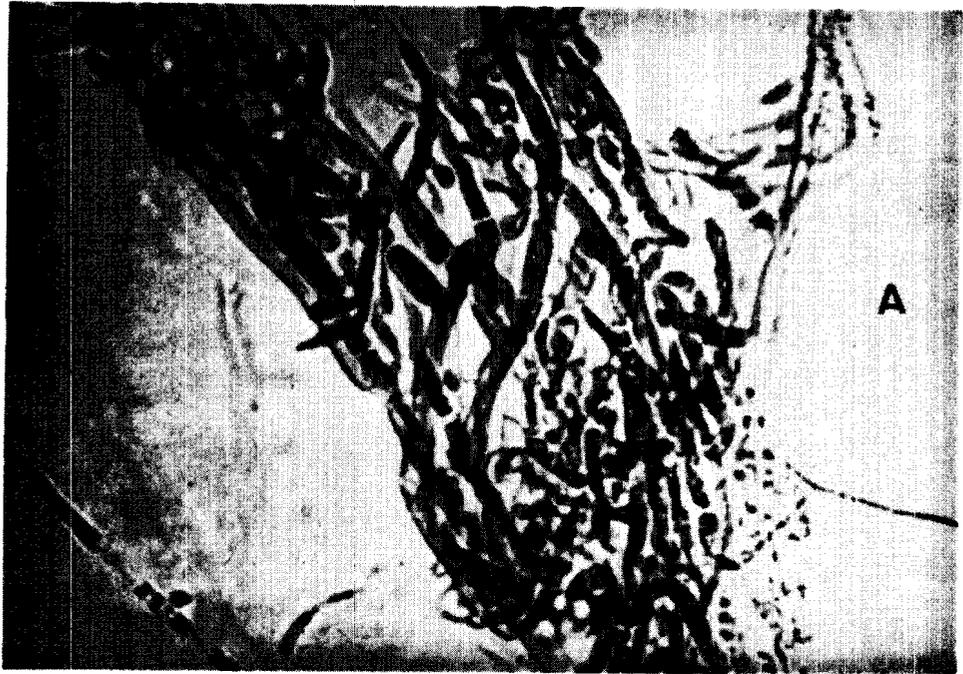


PLANCHE n° III_B - *Pyricularia*₁ *oryzae*

Morphoses affectant le mycélium au cours d'une confrontation simultanée (**âgée** de 3 j/25°C/PCA/pH₀ 5,55/**obscurité** continue) avec les germes antagonistes.

Les préparations microscopiques sont issues de la région **proximale** de la colonie du parasite (par rapport **à** celle antagoniste).

- E - *P*₁. *oryzae* x *T*₅. *viride* (GX 1440) : filament **mycélien** contourné sur **lui-même**
- F - *P*₁. *oryzae* x *T*₅. *viride* (GX 2160) : "torsades"
- G - *P*₁. *oryzae* x *T*₅. *viride* (GX 2160) : hélice
- H - *P*₁. *oryzae* x *T*₅. *viride* (GX 2160) : filament **mycélien** enroulé en pelote terminale
- I - *P*₁. *oryzae* x *M*₁. *verrucaria* (GX 2160) : filaments **mycéliens** dont la configuration rappelle étrangement les torons du DNA.



PLANCHE n° IV - *Pyricularia*₁ *oryzae*

Confrontation différée (**âgée** de 7 j/25°C°PCA/obscurité continue)
avec les germes antagonistes.

A = pH₀ 3,65

B = pH₀ 6,20

1 = *P*₁. *oryzae* seul (témoin)

2 = *P*₁. *oryzae* en **différé** avec *T*₅. *viride*

3 = *P*₁. *oryzae* en différé avec *C*₁. *globosum*

4 = *P*₁. *oryzae* en différé avec *M*₁. *verrucaria*

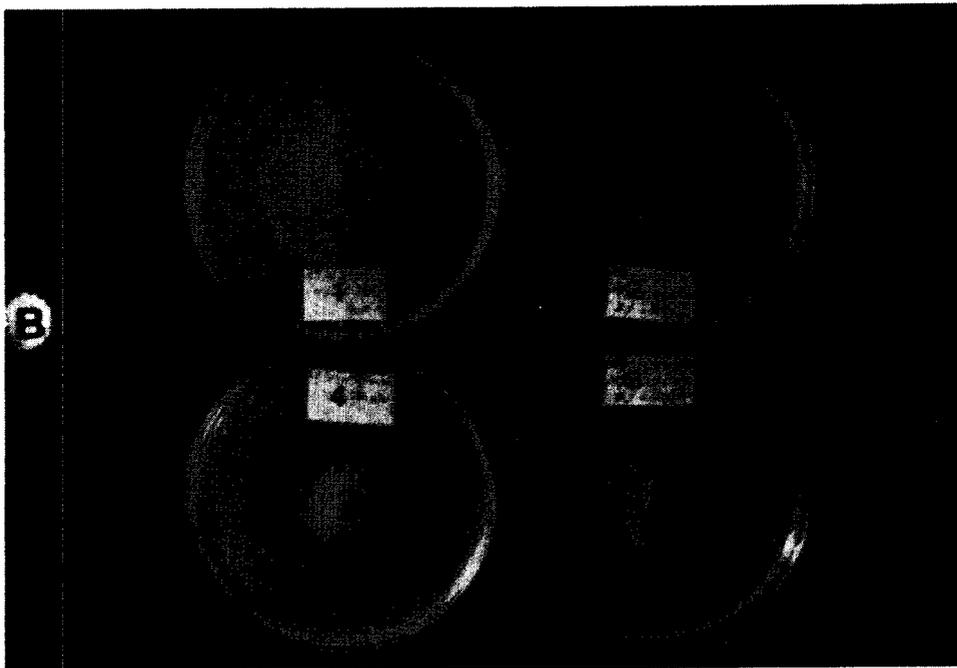


PLANCHE n° V - *Pyricularia*₁ *oryzae*

Morphoses affectant le **mycélium** au cours d'une confrontation différée (âgée de 6 j/PCA/25°C/pH₀ 3,65/obscurité continue)

- A - *P*₁. *oryzae* en **différé** avec *T*₅. *viride* (GX 1440) :
cellule **mycélienne** intermédiaire hypertrophiée.
 - B - *P*₁. *oryzae* en différé avec *C*₁. *globosum* (GX 1440) :
fillement **mycélien** contourné sur **lui-même** en "jambe de chien".
 - C - *P*₁. *oryzae* en différé avec *M*₁. *verrucaria* (GX 1440) :
faciès de "balai de sorcière".
-

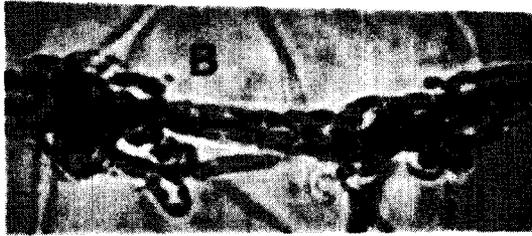


PLANCHE n° VI -

Action **conjuguée** de confrontations différée (= λ) (par rapport à *M₁. verrucaria*) et simultanée (=X) (par rapport à *T₅. viride* et/ou *C₁. globosum*) sur la croissance **mycélienne** de *P₁. oryzae*.
7 jours d'incubation sur PCA/25°C/pH₀ 4,10/obscurité continue.

T₁ = "témoin franc"

T₂ = *P₁. oryzae* en différé avec *M₁. verrucaria*

E₁ = Essai comportant (*M₁. verrucaria*) λ (*P₁. oryzae* x *T₅. viride*)

E₂ = (*M₁. verrucaria*) λ (*P₁. oryzae* x *C₁. globosum*)

E₃ = (*M₁. verrucaria*) λ (*P₁. oryzae* x *T₅. viride* et *C₁. globosum*)

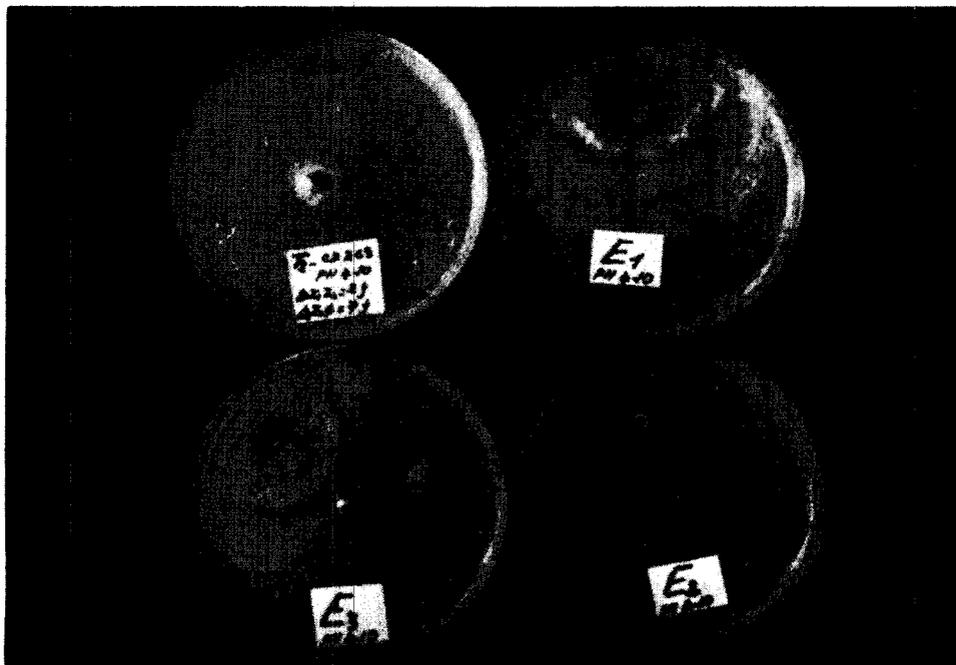
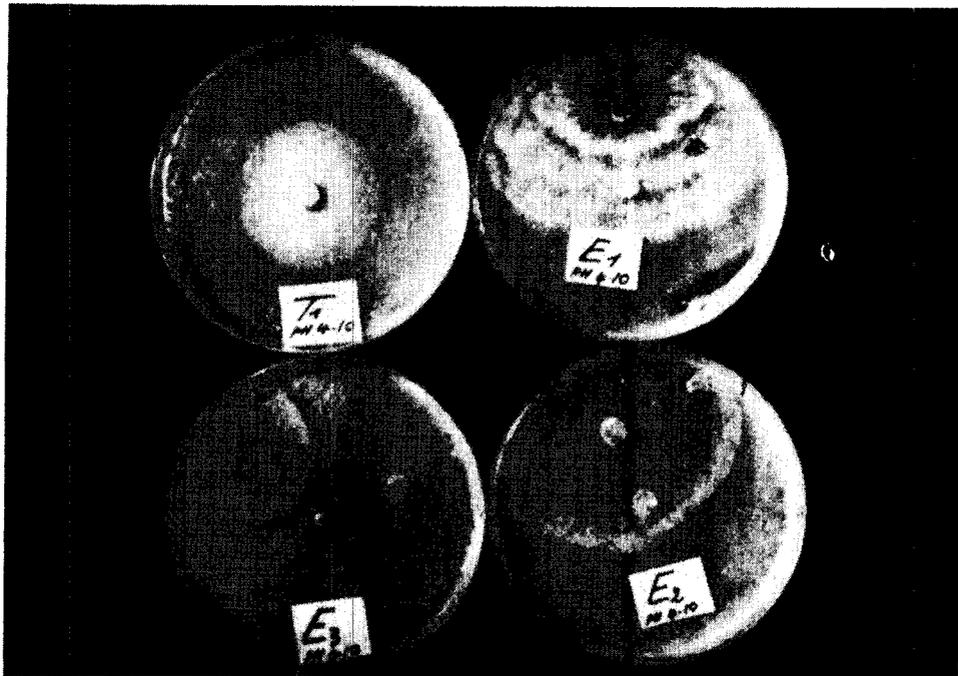
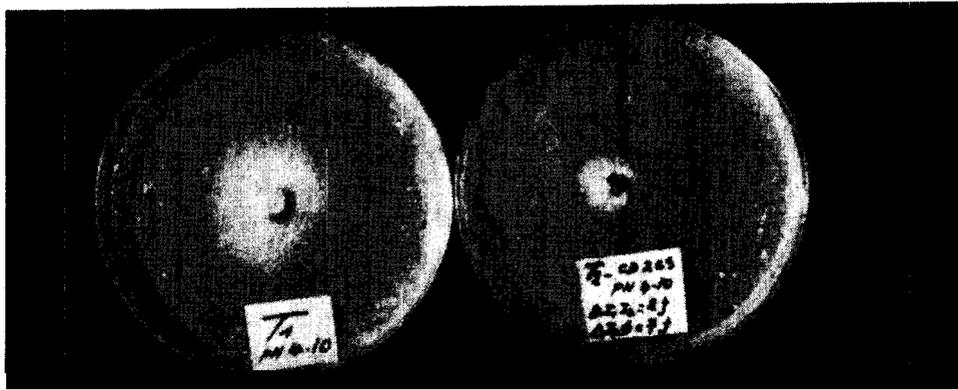


PLANCHE n° VII -

Action conjuguée des confrontations différée (= λ) (par rapport à *M₁. verrucaria*) et simultanée (= X) (par rapport à *T₅. viride* et/ou *C₁. globosum*) sur la croissance de *P₁. oryzae*.

7 jours d'incubation sur PCA/25°C/pH₀ 6,0/obscurité continue.

T₁ = "témoin franc"

T₂ = *P₁. oryzae* en **différé** avec *M₁. verrucaria*

E₁ = essai comportant (*M₁. verrucaria*) λ (*P₁. oryzae* x *T₅. viride*)

E₂ = (*M₁. verrucaria*) λ (*P₁. oryzae* x *C₁. globosum*)

E₃ = (*M₁. verrucaria*) λ (*P₁. oryzae* x *T₅. viride* et *C₁. globosum*)

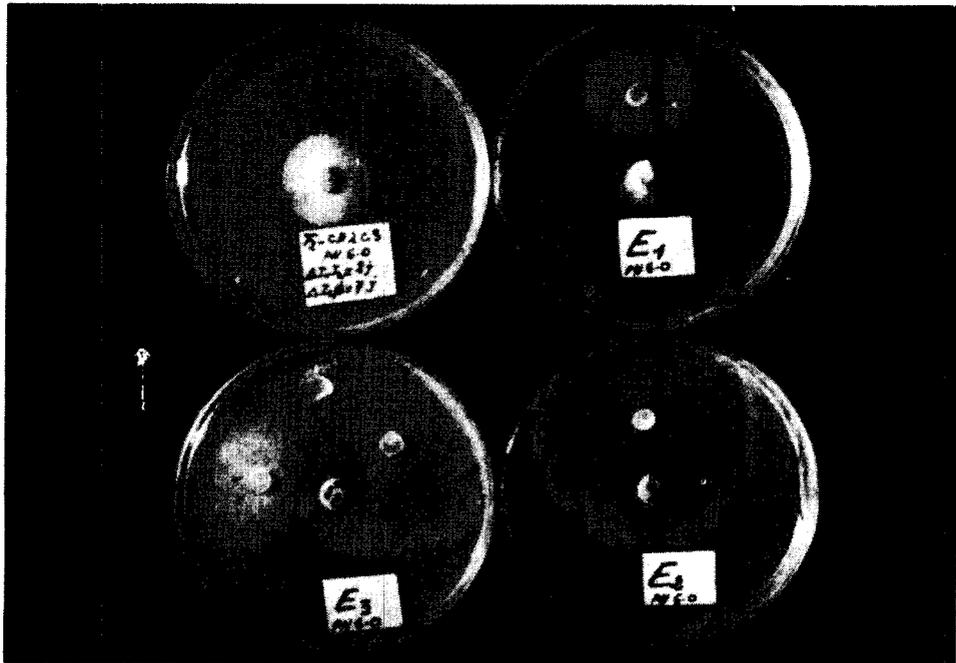
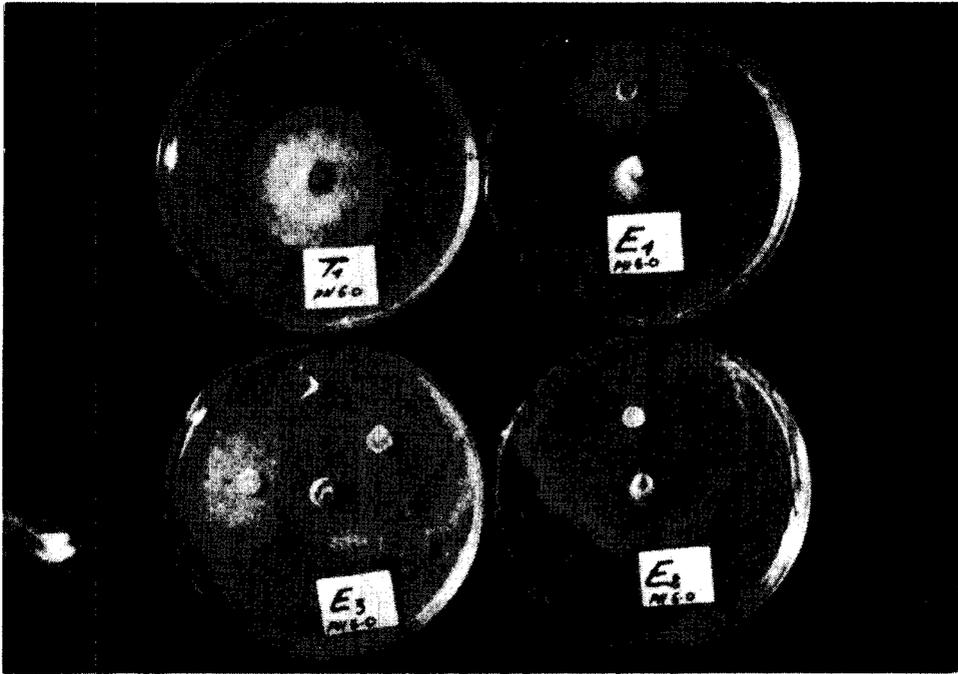


PLANCHE n° VIII A - *Pyricularia_oryzae*

Confrontation **fongicide-mycélium**; 7 jours d'incubation sur PCA/
25°C/obscurité continue.

- A - Croissance **mycélienne** en présence de BENOMYL
- B - Croissance **mycélienne** en présence de CHLORONEBE

NB - les concentrations sont **exprimées** en nombre de **mole/l**.

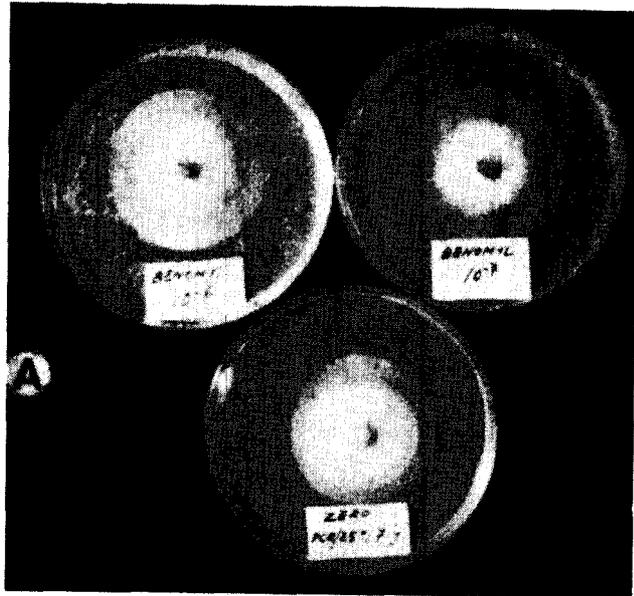


PLANCHE n° VII I_B - *Pyricularia*₁ *oryzae*

Confrontation **fongicides-mycélium** ; 7 jours d'incubation sur PCA/
25°C/obscurité continue.

A - Croissance mycélienne en **présence** de EL-291

B - Croissance mycélienne en **présence** de TRIDEMDRPHE

NB - Les concentrations sont **exprimées** en nombre mole/l.

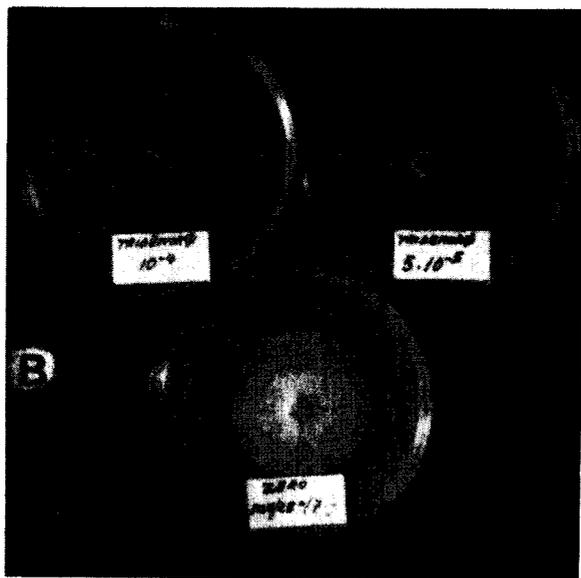
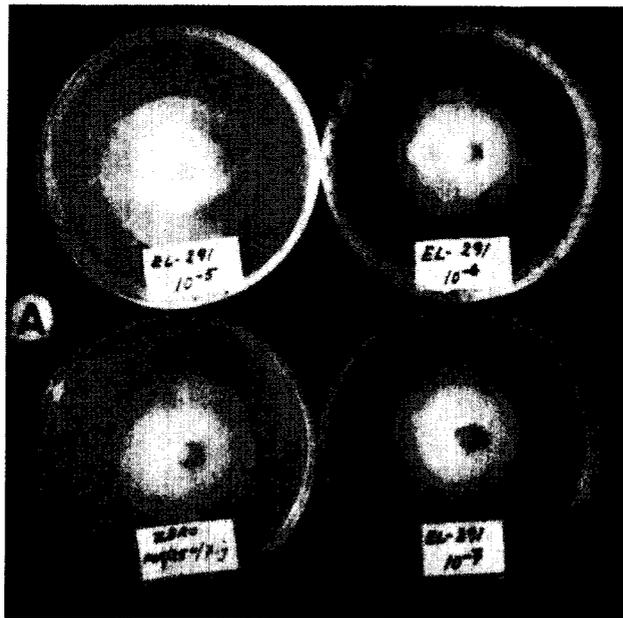


PLANCHE n° IX - PYRICULARIOSE DU COU

Une **attaque** grave de la base de la **panicule** perturbe l'approvisionnement des grains qui se trouvent soit vidés de leur contenu, soit sous-développés.

A et B - **variété** IKP
C - variété ROS 269

Remarquer l'aspect "blanc crémeux" des **panicules**.

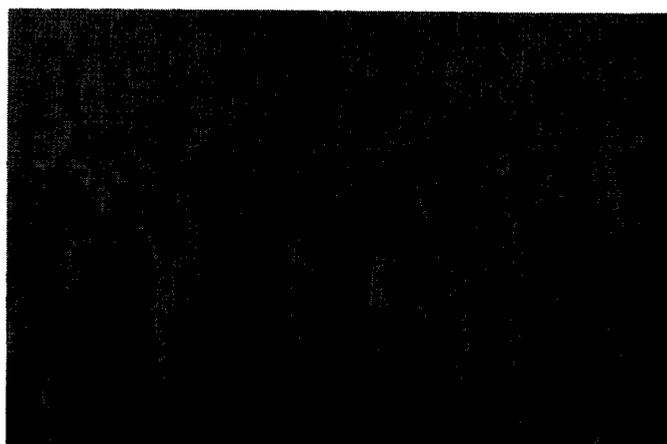
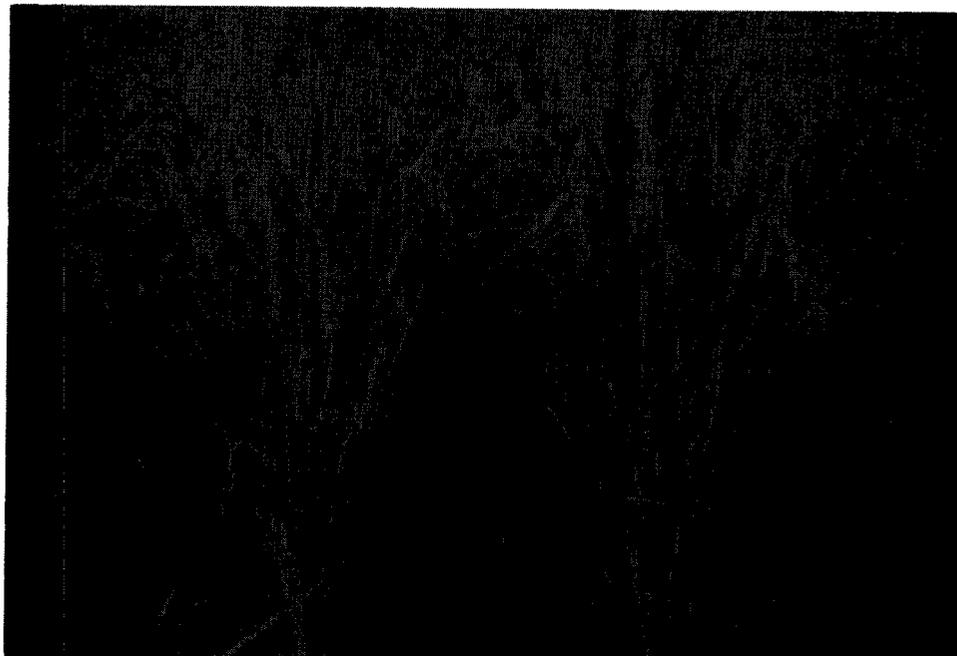


PLANCHE n° XA - D'après SH OU : "RICEDISEASES"

- A - Observation (après élimination des bordures) de pyriculariose sur variétés résistantes et sensibles plantées en pépinière.
- B - Lésions foliaires observées sur variété résistante (à gauche) moyennement résistante (au milieu) et sensible (à droite).
- C - *Pyricularia oryzae* Cav. : conidies et conidiophores (GX 500).

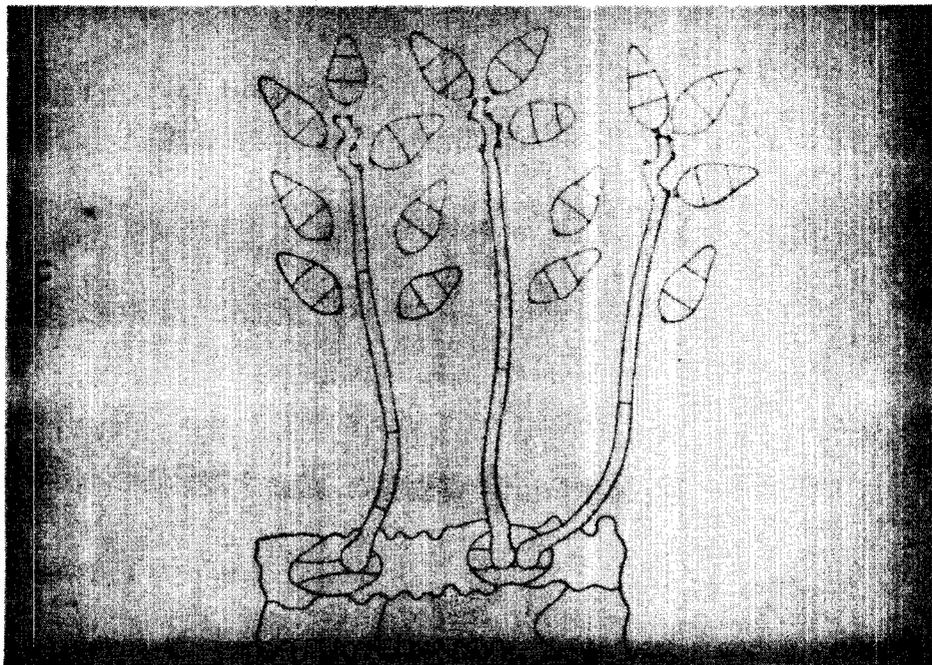


PLANCHE n° X_B • D'après S. H. OU : "RICE DISEASES"

- A - Réaction **précoce** d'une variété résistante (GINNEN) contre l'infection par *P. oryzae*.
- B • Réaction tardive d'une variété sensible (KAI RYOSHI NRI KI) contre l'infection par *P. oryzae*.
- C • Apparition de substances apparentées aux résines dans les **tissus nécrotiques** d'une variété résistante après infection.
- D • Cas des tissus d'une variété sensible.
- E - Conidie de *P. oryzae* vue au microscope électronique (GX 10 000). Chaque cellule possède un noyau comportant 2 types de granules dont le type gros correspond aux nucléoles ; le pore, les mitochondries et d'autres organites sont également visibles.

