

## Identification des isolats marocains de *Pyricularia oryzae*

Allal DOUIRA<sup>1</sup>□, Rachid BENKIRANE<sup>1</sup>, Brahim LAKHRISSTI<sup>2</sup>,  
Amina OUAZZANI Touhami<sup>1</sup>, Souad LEBBAR<sup>3</sup>,  
Nour Eddine EL HALOUI<sup>2</sup> & Mohamed MASSOUI<sup>2</sup>

(Reçu le 02/10/1996 ; Révisé le 13/05/1997 ; Accepté le 23/12/1997)

### التغذية الكربونية، طريقة لتعريف معزولات بيريكولاريا أريزا المغربية

تمكنا من خلال دراسة نمو العفن و الأبواغ على مختلف أنواع السكريات من فرز معزولات بيريكولاريا أريزا المغربية، هذه الأنواع تستعمل أحادي أو متعدد السكري بمعدلات مختلفة، لكن السكر البسيط ذا تركيب OH محجوز يمنع نمو بيريكولاريا أريزا.

الكلمات المفتاحية : أرز - بيريكولاريا أريزا - السكريات

### Identification des isolats marocains de *Pyricularia oryzae*

L'étude de la croissance mycélienne et de la sporulation sur différentes sources de carbone permet de différencier les isolats marocains de *Pyricularia oryzae*. Ces derniers utilisent les monomères et les polymères glucidiques à des degrés variables, alors que les monosaccharides à groupement(s) OH bloqué(s) semblent être des inhibiteurs de la croissance de ce parasite.

**Mots clés:** Riz - *Pyricularia oryzae* - Sources de carbone

### Identification of moroccan isolates of *Pyricularia oryzae*

The study of mycelium growth and sporulation on different sources of carbon allows to differentiate the moroccan isolates of *Pyricularia oryzae*. This parasite uses glucidic monomers and polymers to various degrees; while monosaccharids with grouping (s) blocked OH (s) seems to inhibit its growth.

**Key words:** Rice - *Pyricularia oryzae* - Source of carbon

<sup>1</sup> Laboratoire de Botanique, Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc

<sup>2</sup> Laboratoire de Chimie des Agroressources, Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc

<sup>3</sup> Laboratoire de Biochimie et de Génétique, Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc

<sup>4</sup> Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc

□ Auteur correspondant

## INTRODUCTION

La Pyriculariose est une maladie des parties aériennes du riz causée par *Pyricularia oryzae* Cav. Cette maladie est répertoriée dans tous les pays producteurs de cette céréale (Ou, 1985). En cas d'épidémies sévères, elle peut causer une baisse de 100% du rendement (Okeke, 1993).

Au Maroc, la culture de riz est pratiquée exclusivement dans la région du Gharb (nord-ouest). Dans cette région, où les conditions climatiques et édaphiques sont presque semblables, la recherche de techniques d'identification des isolats marocains de *Pyricularia*, de même morphologie, est nécessaire.

Pour la séparation des isolats de *Pyricularia oryzae*, plusieurs critères ont été utilisés : des critères d'ordre pathologique (Vales *et al.*, 1986 ; Benkirane *et al.*, 1995 ; El Oirdi *et al.*, 1995), des critères d'ordre physiologique (Vales *et al.*, 1986 ; Okeke *et al.*, 1992) et la technique d'électrophorèse (Vales *et al.*, 1986).

Dans ce travail, on a comparé *in vitro* le comportement de certains isolats marocains de *Pyricularia oryzae* avec celui d'autres isolats d'origines géographiques différentes. L'observation de la croissance, de la densité mycélienne et de la sporulation traduisent certaines caractéristiques des isolats étudiés. Leurs exigences nutritionnelles peuvent apporter des précisions sur les variations de l'espèce et de ses formes.

## MATÉRIEL & MÉTHODES

### 1. Agent pathogène

Les prélèvements ou observations des pieds des différentes variétés du riz cultivées dans différentes parcelles ont été effectués au hasard dans la région du Gharb (Maroc) selon la technique d'échantillonnage en diagonale décrite par Matsushima (1966). Des plantes de riz, présentant différents types de lésions sont ramenées au laboratoire pour analyse.

Des fragments de feuilles sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant deux rondelles de papier filtre stériles, humidifiées par l'eau distillée. Après 24 heures à 48 heures d'incubation, les fragments découpés sont examinés sous microscope pour apprécier la présence ou l'absence de champignons. Le transfert des spores à la surface d'un milieu gélosé sous microscope se fait

également à l'aide de capillaires en verre étiré (Mackill & Bonman, 1986).

Trois isolats marocains de *Pyricularia oryzae* EFZ, Pt et RT1 ont été obtenus respectivement à partir des lésions foliaires des variétés Elio, Triomphe et Star. Deux isolats ES1 (d'origine espagnole) et FR2 (d'origine française) ont été fournis par le laboratoire de phytopathologie du C.I.R.A.D./I.R.A.T de Montpellier. L'isolat P2b, d'origine japonaise, a été fourni par le Laboratoire de Biochimie et de Pathologie végétale de l'Université Pierre & Marie -Curie (Paris).

Des clones ont été extraits des isolats testés par transfert de conidies une à une. Les isolats sont entretenus en culture sur milieu nutritif à base de farine de riz.

### 2. Milieux de culture

Le milieu de base est celui de Tanaka modifié (Otsuka *et al.*, 1965) (Glucose : 10 g ; KNO<sub>3</sub> : 3 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1 g ; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0,5 g ; CaCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O : 0,1 g ; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0,0075 g ; MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0,002 g ; CuSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0,006 g ; ZnCl<sub>2</sub> : 0,075 g ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 0,009 g ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Mo<sub>7</sub> O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O : 0,009 g ; Biotine : 5 µg ; Thiamine : 1 mg ; Agar agar : 20 g ; Eau distillée stérile : 1000 ml).

Partant du milieu de base, la source de carbone (glucose 1%) a été remplacée à la même concentration (Otsuka *et al.*, 1965 ; Vales *et al.*, 1986) par 19 autres composés carbonés afin d'apprécier leur utilisation.

Le pH des milieux est ajusté à 6,5 avant autoclavage ; 1 mg de thiamine, 5 µg de biotine et 500 000 UI de pénicilline G sont ajoutés par litre après autoclavage.

Pour chaque milieu et chaque isolat, dix boîtes de Pétri sont ensemencées en plaçant en leur centre un explant de 5 mm de diamètre des cultures antérieures sur milieu gélosé à base de farine de riz. Les cultures sont laissées dans une étuve à 28°C.

### 3. Lecture des résultats

Après quatorze jours d'incubation, les différentes cultures sont notées en fonction de leur diamètre et de la densité apparente de leur mycélium selon le tableau 1.

L'intensité de la sporulation est estimée après dix jours d'incubation. Quatre rondelles de 5 mm de diamètre sont découpées à l'aide d'un emporte-

pièce le long du diamètre du thalle. Elles sont placées ensuite dans un tube à vis contenant 1 ml d'eau stérile. Avant l'opération de comptage, les tubes sont agités au Vortex pendant 20 secondes ce qui permet le détachement des conidies des conidiophores.

**Tableau 1. Échelle de notation de la croissance et de la densité mycélienne sur milieu gélosé (Valès *et al.*, 1986) modifiée**

Diamètre (en mm)	Densité			
	TPD	PD	D	TD
90	1	2	3	3
60	0	1	2	3
30	0	0	1	2
0				

TDP : très peu dense ; PD : peu dense ; D : dense ; TD : très dense

Pour chaque essai, le comptage du nombre total de conidies libérées par les quatre rondelles est effectué avec un hématimètre à raison de dix comptages par suspension. Le nombre moyen de conidies compté est ensuite exprimé par unité de surface du thalle considéré (nombre moyen de spores par mm<sup>2</sup>), auquel on a attribué des notes selon l'échelle de notation (Tableau 2).

**Tableau 2. Échelle de notation de l'intensité de la sporulation**

Nombre moyen de conidies par mm <sup>2</sup>	Note
0 à 100	0
101 à 500	1
501 à 1000	2
1001 à 5000	3
5001 à 10000	4
10001 à 15000	5
> à 15000	6

## RÉSULTATS

### 1. Croissance et densité mycélienne des isolats de *P. oryzae*

L'étude de l'influence de la source de carbone sur la croissance et la densité mycélienne des isolats de *P. oryzae* testés est réalisée en présence de nitrate de potassium. Ainsi, les substances carbonées testées ont été utilisées à des degrés variables par les différents isolats de *P. oryzae* (Tableau 3A). En effet, les monosaccharides (glucose, mannose et fructose) ont permis une croissance importante de tous les isolats quelque soit leur origine

géographique. Sur le galactose, seul l'isolat marocain Pt a montré une croissance relativement notable. Par contre, les autres monosaccharides à groupement(s) OH bloqué(s) exercent une inhibition presque totale de la croissance et de la densité mycélienne de tous les isolats de *P. oryzae* testés (note variant entre 0 et 1).

Les disaccharides testés (saccharose, lactose et maltose) ont été métabolisés avec une croissance et une densité mycélienne très élevée (note 3) à l'exception de l'isolat FR2 sur lactose (note 1).

L'amidon soluble représente également une bonne source de carbone pour tous les isolats de *P. oryzae* testés à l'exception de l'isolat marocain RT1 (note 2). Les performances sont élevées et peuvent être comparables à celles des disaccharides ou des monosaccharides. Par contre, les autres polysaccharides testés, la carboxyméthyl-cellulose et l'inuline, ont un effet notable sur l'inhibition de la croissance et de la densité mycélienne des différents isolats de *P. oryzae* étudiés.

Les résultats obtenus avec les trois acides organiques testés (acide citrique, tartrate de sodium-potassium et disodium-succinate) sont, en général, moins satisfaisants. En effet, ces acides ne semblent pas favoriser la croissance et le développement du mycélium aérien des trois isolats marocains de *P. oryzae* (note 1), à l'exception des trois isolats étrangers qui montrent une utilisation plus ou moins notable du disodium-succinate.

Le sucre sous forme de mannitol et de sorbitol est bien utilisé. En effet, tous les isolats de *P. oryzae* testés présentent une croissance et développent correctement le mycélium aérien en présence de ces deux alcools à l'exception de l'isolat FR2 qui pousse moins bien en présence du sorbitol.

Pour construire un dendrogramme à partir du tableau 3 A, il est important de commencer par les milieux les plus discriminants, c'est-à-dire ceux qui fournissent après notation, le plus d'écart entre 0 et une autre note. Les milieux qui ont la même note ne sont pas portés sur le dendrogramme, car ils ne permettent aucune distinction entre les isolats. Ainsi, des 20 sources de carbone testées, seuls les milieux avec galactose, disodium-succinate, carboxyméthyl-cellulose et lactose permettent une différenciation entre les isolats testés. La dichotomie se fait par la distinction de la note zéro des autres (cas du milieu avec galactose).

**Tableau 3. Effet de la variation de la source de carbone sur la croissance, la densité mycélienne (A) et la sporulation (B) des différents isolats de *Pyricularia oryzae* testés**

(A)	Monosaccharides									Disaccharides			Polysaccharides		Alcools		Acides organiques			
	Glu	Man	Gal	Fru	M.D	M.D	Glu	D.A	D.A	Sacc	Lac	Mal	A.Sol	C.M.C	Inu	Mann	Sorb	Dis-	ACitr	Tar-K-Na
	Glu	Man	Gal	Fru	M.D	M.D	PA	Glu	Man											
ES1	3	3	0	3	1	1	0	0	0	3	3	3	3	2	1	3	3	2	1	1
FR2	3	3	0	3	1	1	0	0	0	3	1	3	3	2	1	3	2	2	1	1
P2b	3	3	0	3	1	1	0	0	0	3	3	3	3	1	1	3	3	2	1	1
EFZ	3	3	0	3	1	1	0	0	0	3	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1
Pt	3	3	1	3	1	1	0	0	0	3	3	3	3	1	1	3	3	1	1	1
RT1	3	3	0	3	1	1	0	0	0	3	3	3	2	1	1	3	3	1	1	1

(B)	Monosaccharides									Disaccharides			Polysaccharides		Alcools		Acides organiques			
	Glu	Man	Gal	Fru	M.D	M.D	Glu	D.A	D.A	Sacc	Lac	Mal	A.Sol	C.M.C	Inu	Mann	Sorb	Dis-	ACitr	Tar-K-Na
	Glu	Man	Gal	Fru	M.D	M.D	PA	Glu	Man											
ES1	3	3	0	2	0	0	0	0	0	3	3	3	6	3	0	6	4	5	2	0
FR2	4	3	0	3	0	0	0	0	0	3	3	3	4	3	3	4	3	4	2	2
P2b	3	3	0	2	0	0	0	0	0	3	2	2	3	3	3	3	0	3	0	2
EFZ	3	3	0	2	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	0	3	0	2
Pt	3	3	1	2	0	0	0	0	0	3	2	3	3	3	3	3	3	3	0	1
RT1	3	3	0	3	0	0	0	0	0	3	0	3	3	3	3	3	2	3	0	0

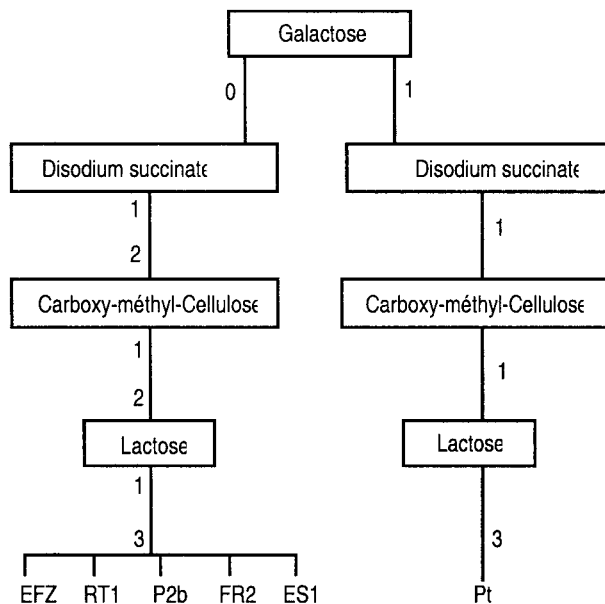
Glu : Glucose ; Man : Mannose ; Gal : Galactose ; Fru : Fructose ; M.D Glu : Methyl-  $\alpha$ -D- glucopyranoside ; M.D Man : Methyl- -D- Mannopyranoside ; Glu PA : Glucose péracétylé ; D.A Glu : Diacétone glucose ; D.A Man : Diacétone mannose ; Sacc : Saccharose ; Lac : Lactose ; Mal : Maltose ; A.Sol : Amidon soluble ; C.M.C : Carboxy-méthyl-cellulose ; Inu : Inuline ; Mann : Mannitol ; Sorb : Sorbitol ; Dis Succ : Disodium-succinate ; ACitr : Acide citrique ; Tar-K-Na : Tartrate-potassium-sodium

L'analyse du dendrogramme de la figure 1 permet de distinguer 2 groupes parmi les 6 isolats étudiés. Ainsi, seul l'isolat marocain Pt est à différencier des autres isolats (EFZ, RT1, P2b, FR2 et ES1) qui forment un même groupe.

**2. Sporulation des isolats de *P. oryzae***

Les milieux additionnés de méthyle  $\alpha$ -D- glucopyranoside, de méthyle  $\alpha$ -D- mannopyranoside, de diacétone glucose, de diacétone mannose et de glucose péracétylé semblent ne pas être favorables à la sporulation de tous les isolats de *P. oryzae* testés (Tableau 3 B). Le même résultat est obtenu sur milieu incorporé d'acide citrique pour les trois isolats marocains (EFZ, Pt et RT1) et pour l'isolat japonais P2b, sur milieu renfermant le sorbitol pour les isolats EFZ et P2b et sur milieu additionné de tartrate de sodium-potassium pour les isolats ES1 et RT1. De même, le carbone sous forme d'inuline inhibe la sporulation de l'isolat ES1.

Sur milieu avec galactose, seul l'isolat marocain Pt a pu sporuler (note 1). De même, tous les isolats sporulent avec une intensité presque similaire sur les milieux avec glucose (à l'exception de l'isolat



**Figure 1. Dendrogramme de croissance et de la densité mycélienne des isolats de *P. oryzae* étudiés sur différentes sources de carbone**

FR2: note 4), saccharose, maltose, mannose, fructose et carboxyméthyl-cellulose (note variant entre 2 et 3).

Sur milieux avec amidon soluble, mannitol et dissodium-succinate la sporulation de l'isolat ES1 est la plus élevée (note 5 et 6). Cependant, en présence de chacun de ces sucres dans le milieu de culture, la sporulation de l'isolat FR2 est aussi importante (note 4), inférieure à celle de l'isolat ES1 (note 5 et 6), mais supérieure à celle des autres isolats.

L'étude de la sporulation des isolats de *Pyricularia oryzae* sur différentes sources de carbone a permis de distinguer six groupes parmi les six isolats testés. Alors que l'étude de leur croissance et de leur densité mycélienne sur différentes sources de carbone n'a permis de séparer que deux isolats parmi les six isolats testés (Figure 2).

**DISCUSSION & CONCLUSION**

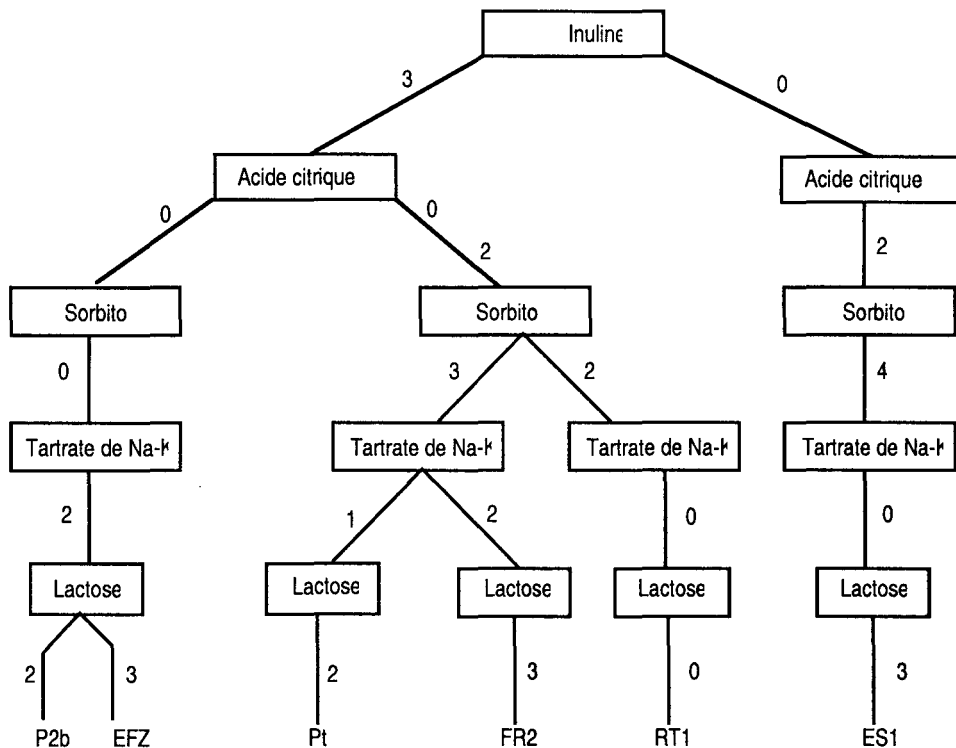
Les sources de carbone organique utilisées pour la nutrition des différents isolats de *P. oryzae* ne présentent pas toutes la même efficacité. Ceci, peut être dû à leur composition spécifique, leur structure et leur configuration. Une même source de carbone peut être utilisée à des degrés variables par différents isolats.

En présence de monosaccharides à groupements OH libre (glucose, mannose), la croissance, la

densité mycélienne et la sporulation de tous les isolats sont très élevées. Parmi tous les hexoses, le glucose constitue la source d'énergie la plus efficace pour les champignons.

La possibilité pour un organisme d'utiliser d'autres hexoses comme le fructose dépend de sa capacité à convertir ce sucre en un dérivé phosphorylé de glucose qui soit capable de s'intégrer dans la voie principale de la chaîne respiratoire. Tous les isolats testés semblent posséder cette capacité puisque les résultats obtenus avec le glucose et le fructose sont semblables. Pour Schrandt *et al.*, (1994), le fructose est le meilleur sucre pour la croissance de *Pythium violae*. Pour le galactose, cette capacité n'existe que chez l'isolat marocain Pt. Par ailleurs, Pannwar (1972) a rapporté que le galactose peut être utilisé par plusieurs champignons mais ne peut pas être une source de carbone efficace.

De même, l'utilisation de disaccharides comme le maltose, le lactose et le saccharose dénote la présence d'enzymes capables d'hydrolyser ces composés en hexoses. Les résultats obtenus montrent la réalisation de cette hydrolyse chez tous les isolats à l'exception de l'isolat FR2 qui a montré un développement faible sur le lactose.



**Figure 2. Dendrogramme de la sporulation des isolats de *P. oryzae* étudiés sur différentes sources de carbone**

Les bons résultats obtenus avec l'amidon soluble peuvent être expliqués par le fait que ce polysaccharide constituerait la forme principale de réserve chez les plantes. Les autres polysaccharides, la carboxyméthyl-cellulose et l'inuline sont beaucoup moins utilisables que l'amidon pour l'ensemble des isolats de *P. oryzae* testés. Ce résultat est identique à celui obtenu par Vales *et al.* (1986) et Okeke *et al.* (1992). Pour Otsuka *et al.* (1965), les isolats qui utilisent la cellulose comme source de carbone sont considérés comme très pathogènes vis-à-vis du riz. D'après Vales *et al.* (1986), le sorbose et l'inuline ne peuvent être utilisés comme source de carbone que par peu de souches et moins bien que le saccharose.

Parmi les alcools testés, le mannitol a été la meilleure source de carbone en présence de nitrate de potassium. Il est connu que l'utilisation de cet alcool nécessite son énolisation en glucose, mannose et fructose ce qui exige évidemment la synthèse d'une enzyme appelée mannito-deshydrogénase. Cette synthèse peut entraîner une période de latence au début de la croissance (adaptation enzymatique). De même, d'après Smith *et al.* (1969), le tréhalose et le mannitol représentent les glucides solubles les plus abondants dans le mycélium des champignons.

L'étude de la croissance, de la densité mycélienne et de la sporulation des isolats de *P. oryzae* sur différentes sources de carbone a révélé que le champignon est plus apte à utiliser les monomères et les polymères glucidiques. Les monosaccharides à groupement(s) OH bloqué(s) semblent être des inhibiteurs de la croissance de *P. oryzae*.

Les isolats de *P. oryzae* testés n'ont pas pu bien utiliser la carboxyméthyl-cellulose et les deux acides organiques (tartrate de sodium-potassium et acide citrique). Ceci peut être dû à leur incapacité à synthétiser les enzymes nécessaires. D'après Otsuka *et al.* (1965), les acides organiques ne constituent pas une bonne source de carbone pour *P. oryzae* à l'exception de l'acide succinique.

Ces expériences utilisant des critères physiologiques, tels que les exigences nutritives pour la croissance et la sporulation, ont conduit au regroupement de certains isolats en des types ayant la même affinité. Mais elles permettent de séparer également les isolats de *P. oryzae* et surtout les isolats marocains issus d'une même région.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Benkirane R. (1995) Contribution à l'étude des maladies de riz au Maroc. Cas de la pyriculariose due à *Pyricularia oryzae*. Thèse de 3ème cycle, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences de Kénitra, 145p.
- Benkirane R., Eloirdi M., Bouslim F., Ouazzani Touhami A., Zidane L., Douira A., Gmira N. Karmoussi M., El Hassani N. & El Haloui N.E. (1995). Un essai pour déterminer la sensibilité ou la résistance des variétés de riz vis-à-vis de quelques isolats marocains de *Pyricularia oryzae*. *Rev. Rés. Amélior. Prod. Agr. Milieu aride* 7 : 131-143
- Eloirdi M., Douira A., Benkirane R., Ouazzani Touhami A., Mouslim J., Bouslim F., Karmoussi M., El Hassani N. & El Haloui N.E. (1995) Comparaison du caractère pathogène de quelques isolats marocains de *Pyricularia oryzae*. *Rev. Rés. Amélior. Prod. Agr. Milieu aride* 7 : 231-240
- Mackill A.O. & Bonman J.M. (1986) New hosts of *Pyricularia oryzae*. *Plant Disease* 70 : 125-127
- Matsushima S. (1966) Crops science in rice theory of yield determination and its application fuji publishing 6, Tokyo, 365p.
- Okeke B., Seigle-Murandi F., Steiman R. & Sage L. (1992) Investigation on cultural and cellulolytic activity in *Pyricularia oryzae* Cavara. *Agronomie* 12 : 325-329
- Okeke B. (1993) Recherche de substances antifongiques d'origine fongique à usage agricole: contribution à la lutte contre les phytopathogènes du riz (*Oryza sativa*). Thèse de doctorat Université J. Fourier-Grenoble, (UFR de Pharmacie) 156p.
- Otsuka H., Tamari K. & Ogasawara N. (1965) Variability of *Pyricularia oryzae* in culture. In The rice blast disease. Proceedings of IRRI, Baltimore, J. Hopkins Press, pp. 69-109
- Ou S.H. (1985) Rice Diseases. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, U.K., 367p.
- Pannwar K.S. (1972) Utilization of monosaccharides by four species of *Curvularia*. *Indian Phytopathology* Vol. XXV : 225-230
- Schrandt J.K., Davis R.M. & Nunez J.J. (1994) Host range and influence of Nutrition, temperature, and pH on Growth of *Pythium violae* from Carrot. *Plant Disease* 78 (4) : 335-338
- Smith D, Muscatine L. & Lewis D. (1969) Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis. *Biological reviews* 44 : 17 - 90
- Vales M., Tokpa G. & Ollitrault P. (1986) Comparaison de trois méthodes d'identification des souches de *Pyricularia oryzae* Cavara. *Agronomie tropicale*, 41 : 242-249