

Caractérisation des isolats marocains d'*Helminthosporium oryzae* par l'étude *in vitro* de leur comportement nutritionnel

Bouslim F.¹, Ennaffah B.¹, Ouazzani Touhami A.¹, Lakhrissi B.², Massoui M.² et Douira A.¹

¹Laboratoire de botanique et de protection des plantes, Département de biologie, Université Ibn Tofail, Faculté des sciences de Kénitra, Maroc

²Laboratoire de chimie des agro-ressources, Département de chimie, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc

Résumé

*L'étude in vitro de l'influence de la source de carbone sur la croissance et la densité mycélienne a montré que les monosaccharides (glucose, fructose, galactose et mannose), les disaccharides (saccharose, lactose et maltose) ainsi que l'amidon soluble et le mannitol sont appréciés par les isolats d'*Helminthosporium oryzae*. Seul l'isolat H.O_h est capable de métaboliser le carboxyméthyl cellulose (C.M.C). Parmi les sources d'azote testées, KNO₃, NaNO₃ et NaNO₂ ont favorisé une excellente croissance des isolats d'*H. oryzae*. L'alanine n'est bien assimilée que par les isolats HO₂₀₉ et HO_e.*

*L'étude du comportement nutritionnel a mis en évidence la variabilité existante entre les isolats d'*H. oryzae* provenant de la même région. Ainsi, certains isolats testés peuvent être différenciés des autres isolats (cas des isolats H.O_h, H.O₂₀₉ et H.O_e).*

Mots clés : *Helminthosporium oryzae*, nutrition, source de carbone, source d'azote

Abstract : Carbon and Nitrogen sources, a method of characterization of *Helminthosporium oryzae* moroccan isolates

*The study in vitro of the carbon's source effect on the growth and the mycelial density has showed that the monosaccharides (glucose, fructose, galactose and mannose), the disaccharides (saccharose, lactose and maltose) as well as the soluble starch and the mannitol are appreciated by the *Helminthosporium oryzae* isolates. Only the isolate H.O_h is able to metabolize the carbon methyl cellulose (C.M.C).*

*Among the nitrogen sources tested, KNO₃, NaNO₃ and NaNO₂ have induced an excellent growth of the *H. oryzae* isolates. The alanine is well assimilated only by the H.O₂₀₉ and H.O_e isolates.*

The study of nutritive behaviour has revealed the existing variability between the *H. oryzae* isolates from the same region. Thus, some tested isolates can be differentiated from other isolates (case of the $H.O_H$, $H.O_{209}$ and $H.O_e$ isolates).

Key words : *Helminthosporium oryzae*, nutrition, carbon's source, nitrogen source

ملخص : التغذية الكربونية و الأزوتية طريقة لتعريف معزولات إيلمانتو سبوريوم أريزا المغربية

بوسليم ف.1، النفاح إ.1، وزاي تهامي أ.1، لخريسي إ.2، مسوي م.2 و ادويرة ع.1

1 مختبر علم وقاية النباتات، كلية العلوم القنيطرة، جامعة ابن طفيل، المغرب

2 مختبر الكيمياء و الموارد الفلاحية، كلية العلوم القنيطرة، جامعة ابن طفيل، المغرب

أظهرت هذه الدراسة أن مركبات أحادية التسكر : كليكوز، فركتوز، غلكتوز و مانوز (glucose, fructose, ga- lactose et mannose) و ثنائية التسكر : سكروز، لكتوز و مالتوز (saccharose, lactose maltose) و النشا القابل للذوبان (amidon soluble) و المانيتول (mannitol) من بين منابع الكربون التي تساعد على نمو وإبراز كافة عزلات *Helminthosporium oryzae* المسبب لمرض التبقع البني لأوراق الأرز. كما تعد $H.O_H$ من بين العزلات التي أظهرت قدرة على استقلاب الكاربوكسيل ميثيل سليلوز (carboxyméthyl cellulose (CMC) و من بين منابع الأزوت، تعد $NaNO_3$ و $NaNO_2$ و KNO_3 من بين منابع التي يستعملها الفطر في نموه. بينما للانين (l'alanine) لم تستعمل إلا من طرف بعض العزلات $H.O_H$ و $H.O_e$ و $H.O_{209}$. لقد أظهرت دراسة السلوك الإقتياتي التغيرات الموجودة بين عزلات الفطر المستأصلة من نفس المنطقة : مثلا بين $H.O_e$ و $H.O_H$ و $H.O_{209}$.

الكلمات المفتاحية : إيلمانتو سبوريوم أريزا، التغذية، السكريات، الأزوت

Introduction

Au Maroc, la culture du riz est localisée dans la plaine du Gharb. Dans cette région où les conditions climatiques et édaphiques sont presque semblables, la recherche de techniques d'identification des isolats marocains de l'*Helminthosporium oryzae*, ayant la même morphologie, s'avère nécessaire.

Pour ce faire, plusieurs techniques peuvent être envisagées, El Kowkgy et al. (1987) a fait appel à des critères d'ordre physiologiques (activité cellulotique) et pathologiques pour séparer entre les isolats d'*Helminthosporium oryzae*.

Pour d'autres espèces fongiques dermatophytes, Merz et al. (1970) ont utilisé des milieux avec " pH indicateur " permettant de révéler le pouvoir de certains isolats à dévier le pH du milieu de culture. De leur côté, Engelhard et al. (1972) et Goudert et al. (1973) ont étudié les critères thermiques pour séparer entre différents isolats de champignons dermatophytes. De même,

certaines caractéristiques morphologiques et pathologiques ont été utilisées pour différencier entre les isolats de *Colletotricum gloesporioides* (Agostini et al., 1992).

Pour la séparation entre des isolats de *Pyricularia oryzae*, plusieurs critères ont été utilisés : des critères d'ordre pathologiques (Vales et al., 1986), des critères d'ordre physiologiques (Vales et al., 1986 ; Okeke et al., 1992) et la technique d'électrophorèse. D'après Vales et al. (1986), les résultats obtenus par cette dernière technique sont fiables. Pour ce même champignon, d'autres auteurs (Otsuka et al., 1965 ; Benkirane, 1995) ont noté que l'étude des besoins nutritionnels peut aussi différencier entre les isolats de *Pyricularia oryzae*. Du fait que cette technique est facile à mettre en œuvre et du fait de sa fiabilité (s'il ne se produit pas de variations chez les souches, notamment à cause des mutations qui pourraient faire apparaître des auxotrophies) (Vales et al., 1986), nous avons envisagé de l'utiliser dans cette étude.

Nous avons noté différents caractères culturaux des isolats de *Helminthosporium oryzae* lorsqu'on fait varier la source de carbone ou la source d'azote. L'observation de la croissance et de la densité mycélienne peut renseigner sur leurs exigences nutritionnelles et, en outre, peut apporter des précisions sur les variations de l'espèce.

Matériel et méthodes

Agents pathogènes

Cinq isolats de *Helminthosporium oryzae* ont été étudiés : H.O_t, H.O_a, H.O₂₀₉, H.O_e et H.O_h, isolés respectivement des lésions foliaires des variétés Triomphe, Arsh, 209, Elio, et Hayat. Ils sont placés dans des boîtes de Petri sur milieu à base farine de riz (Farine de riz : 14 g ; Extrait de levure : 4 g ; Agar-Agar : 15 g ; Eau distillée : 100 ml). Après 7 jours d'incubation, des isolements monospores sont effectués directement sous microscope à l'aide d'un capillaire en verre étiré, préalablement stérilisé à la flamme et refroidi dans le milieu.

Les spores transférées sont déposées et étalées à la surface du milieu à base de farine de riz fraîchement préparée (Benkirane, 1995). 72 heures après, un clone est choisi et multiplié par repiquage sur le même milieu.

Milieux de culture

Milieu de base

Le milieu de base est celui de Czapeck'dox (Leander et Elroy, 1972) modifié dans notre laboratoire : Saccharose : 15g ; NaNO₃ : 2g ; K₂HPO₄ : 1g ; MgSO₄, 7H₂O : 0.5 ; KCl : 0.5g ; FeSO₄, 7H₂O : 0.01 g ; Agar-Agar : 15 g ; Eau distillée : 100 ml.

Milieu de base additionné de différentes sources de carbone et d'azote

La source de carbone, du milieu de base, a été remplacée à la même concentration par 15 autres composés carbonés, afin de déterminer leur efficacité (Benkirane, 1995).

Douze sources d'azote ont substitué le NaNO_4 du milieu de base. Les différentes sources d'azote sont ajoutées à la même quantité d'équivalent d'azote présente dans NaNO_3 (0,33g/l) (Benkirane, 1995).

Le pH des milieux est ajusté à 6 avant autoclavage. Pour chaque milieu et chaque isolat, dix boîtes de Pétri sontensemencées en plaçant en leur centre un explant de 5 mm de diamètre des cultures antérieures sur le milieu P.D.A. Les cultures sont mises en incubation à une température de 28 °C et à l'obscurité.

Lecture des résultats

Après 7 jours d'incubation, les différentes cultures sont notées en fonction de leur diamètre et de leur densité apparente du mycélium, selon le tableau suivant :

Diamètre (en mm)	Densité			
	T.P.D	P.D	D	T.D.
90				
60	1	2	3	4
30	0	1	2	3
0	0	0	1	2

Echelle de notation de la croissance mycélienne sur milieu solide gélosé (Vales et al., 1986), modifiée dans notre laboratoire (Benkirane, 1995).

T.P.D.: très peu dense ; P.D : peu dense.; D : dense.; T.D : très dense.

Résultats

Etude de l'influence de la source d'azote

L'assimilation de l'azote sous différentes formes par les isolats de *Helminthosporium oryzae* est testée en présence du saccharose. Les résultats obtenus, formulés sous forme de notes attribuées à la croissance et à la densité mycélienne des différents isolats sont groupés dans le tableau 1. Il ressort de ce tableau que les isolats de *H. oryzae* utilisent différemment les diverses sources d'azotes. Le meilleur résultat est obtenu avec KNO_3 , NaNO_3 et NaNO_2 (note varie entre 3 et 4).

L'urée, la méthionine, la cystéine et la L-asparagine sont beaucoup moins utilisées par les différents isolats de *H. oryzae*. En effet, la croissance et la densité mycélienne sont faibles sur ces sources d'azote (note varie entre 0 et 2).

L'alanine est bien assimilée par les deux isolats H.O_e et H.O₂₀₉ (note : 3), mais ce n'est pas le cas pour les trois autres isolats qui ont une croissance et une densité mycélienne moins importante (note : 2).

En général, les sources d'azote organique n'atteignent pas les performances des sources d'azote sous forme de nitrate ou nitrite.

Tous les isolats marocains de l'*H. oryzae* ont un comportement identique dans les essais relatifs à la source d'azote (NH₄)₂SO₄ et NH₄NO₃, avec une croissance et une densité mycélienne très faible (note : 1).

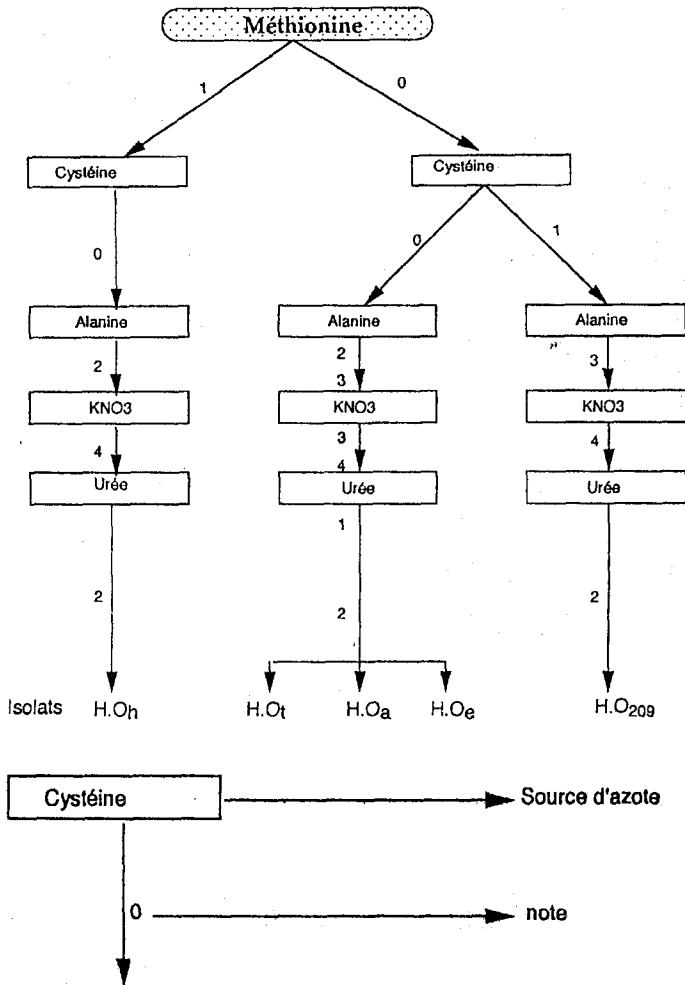


Figure 1. Dendrogramme de la croissance et de la densité mycélienne des isolats d'*Helminthosporium oryzae* sur différentes sources d'azote

Pour construire un dendrogramme à partir du tableau 1, 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 représentés sur le dendrogramme de la figure 1, car ils ne permettent aucune distinction entre les isolats. Ainsi, des 12 sources d'azote testées, seuls les milieux avec méthionine, cystéine, alanine, KNO_3 et l'urée permettent une différenciation entre les isolats étudiés. La dichotomie se fait par la distinction de la note 0 des autres notes.

Tableau 1. Effet de la variation de la source d'azote sur la croissance et la densité mycélienne des isolats d'*Helminthosporium oryzae*

Isolats	Azote inorganique						Azote organique					
	NaNO_3	KNO_3	NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaNO_2	Urée	Adénine	Asp	Gly	Ala	Cystéine	Méthionine
H.Oh	4	4	1	1	4	2	1	2	2	2	0	1
H.Ot	3	3	1	1	4	2	1	2	2	2	0	0
H.O209	4	4	1	1	4	2	2	2	2	3	1	0
H.Oa	4	4	1	1	4	1	1	2	2	2	0	0
H.Oe	4	4	1	1	4	2	1	2	2	3	0	0

Asp : asparagine ; Gly : glycine ; Ala : alanine

Etude de l'influence de la source de carbone

L'efficacité des différentes sources de carbone est étudiée en présence de nitrate de sodium. Comme pour les sources d'azote, les substances carbonées testées sont utilisées à des degrés variables par les différents isolats marocains de l'*H. oryzae* (tableau 2).

Tableau 2. Effet de la variation de la source de carbone sur la croissance et la densité mycélienne des isolats d'*Helminthosporium oryzae*

Isolats	Monosaccharides						Disaccharides		
	Glu	Fruct	Gala	Man	D-Aglu	M- α -Dglu	Sacc	lac	Malt
H.O _h	3	3	3	3	0	2	3	3	4
H.O _t	2	3	3	3	0	1	2	3	4
H.O ₂₀₉	3	3	2	3	1	2	3	3	4
H.O _a	3	3	3	3	0	2	3	3	4
H.O _c	3	3	3	3	1	2	3	3	4

Tableau 2. Suite

Isolats	Polysaccharides			Alcools		Acides organiques
	C.M.C	Amidon soluble	Mann	Sorb	A.citr	T.Na.K
H.O _h	3	4	3	3	1	1
H.O _t	1	3	3	1	1	1
H.O ₂₀₉	1	4	3	1	1	1
H.O _a	1	4	3	1	1	1
H.O _c	1	4	3	3	1	1

Glu : glucose

Man : mannose

M- α -Dgluc : méthyl- α -D-glucopyranoside

Lac : lactose

Sorb : sorbitol

Malt : maltose

Gala : galactose

Sacc : saccharose

C.M.C : carboxyméthyl-cellulose

A-citr : acide citrique

Mann : mannitol

D-Aglu : diacétone glucose

Fruct : fructose

Les monosaccharides (glucose, fructose, galactose et mannose) ont favorisé une importante croissance mycélienne des 5 isolats (note : 3), à l'exception des isolats H.O_t et H.O₂₀₉ dont la croissance est moins importante respectivement sur le glucose et le galactose (note : 2). En revanche, les autres monosaccharides à groupement OH bloqué (le diacétone glucose et le méthyl-D-glucopyranoside) semblent exercer une inhibition plus ou moins marquée sur la croissance et la densité de tous les isolats (note varie entre 0 et 2).

Les milieux avec les disaccharides testés (saccharose, lactose et maltose) sont de très bons substrats pour la croissance des isolats de l'*H. oryzae* (note varie entre 3 et 4). Ceci n'est pas le cas pour l'isolat H.O_t, qui montre une croissance et une densité mycélienne faibles sur le saccharose (note : 2).

L'amidon soluble est également une source de carbone très favorable pour la croissance des isolats marocains de l'*H. oryzae* (note varie entre 3 et 4). Les performances sont élevées et peuvent être comparables à celles des disaccharides ou des monosaccharides. Par contre, le carboxyméthyle-cellulose n'atteint pas les performances de l'amidon soluble pour la plupart des isolats, excepté l'isolat H.O_h, pour lequel on a enregistré une croissance et une densité mycélienne élevées (note : 3).

Les résultats obtenus avec les deux acides organiques testés (l'acide citrique, le tartrate de sodium potassium) sont en général moins satisfaisants. En effet, ces sucres ne sont pas favorables pour la croissance et le développement du mycélium aérien des 5 isolats de l'*H. oryzae* (note : 1).

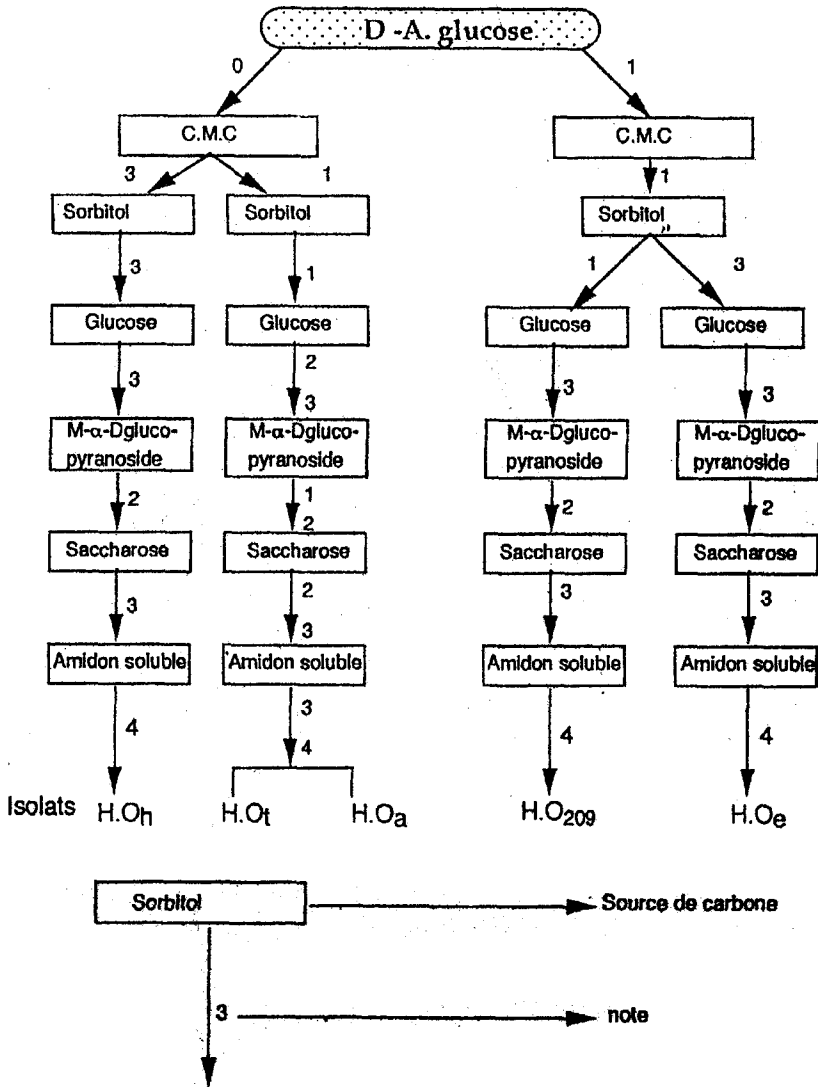


Figure 2. Dendrogramme de la croissance et de la densité mycélienne des isolats d'*Helminthosporium oryzae* sur différentes sources de carbone

Le sucre sous forme de mannitol est bien métabolisé par tous les isolats de l'*H. oryzae*. Ils présentent une croissance importante et développent correctement le mycélium aérien en présence de cet alcool (note : 3). Le sorbitol est, par contre, beaucoup moins efficace pour les isolats H.O₁, H.O₂₀₉ et H.O_a (note : 1).

Le dendogramme de la figure 2 est construit de la même façon que pour les milieux additionnés de différentes sources d'azote. La dichotomie se fait en distinguant la note 0 des autres notes. Cependant, la croissance sur les milieux avec le carboxyméthyle-cellulose et le sorbitol, qui ne permettent pas cette dichotomie, rend possible malgré cela la différenciation d'une part entre les isolats H.O₁, H.O_a et l'isolat H.O₁₁, d'autre part entre l'isolat H.O₂₀₉ et l'isolat H.O_e qui sont séparés par un écart très net de deux points.

Discussion

Parmi les sources d'azote testées en présence du saccharose, celles qui sont fournies sous forme de nitrate sont préférées par les isolats marocains de l'*H. oryzae*. Cette préférence pour la forme nitrate a été rapportée par Misra et Mukherjee (1962).

Le nitrate de potassium et le nitrate de sodium sont souhaitables pour la croissance de plusieurs autres espèces fongiques (De Cal et al., 1993 ; Benkirane, 1995).

En général, un champignon qui peut réduire et assimiler le nitrate, peut bien utiliser n'importe quelle forme d'azote (tels que l'ion ammonium ou l'azote organique) (Moore landecker, 1982). Ce cas n'a pas été observé pour les isolats marocains de l'*H. oryzae*.

L'urée n'a pas été bien utilisée par les isolats de l'*H. oryzae*. Ce résultat est contradictoire avec celui obtenu par Misra et Mukherjee (1962). Ces auteurs ont noté que l'efficacité de cette source est comparable à celle du nitrate de potassium. De telles variations dans les résultats peuvent être dues aux différences entre les isolats de ce champignon. Ces différences entre les isolats sont largement observées pour d'autres espèces fongiques (Sharma et al., 1984), ainsi que pour l'*H. oryzae* (Ou, 1985).

La forme ammoniacale ((NH₄)₂SO₄ et NH₄NO₃) n'est pas appréciée par les isolats marocains de l'*H. oryzae*. D'après Chen et al. (1964), les sels d'ammonium donnent des résultats meilleurs que les nitrates. Ces variations dans les résultats, peuvent être attribuées encore une fois aux différences entre les isolats.

Dans nos essais avec le (NH₄)₂SO₄, nous pourrions mettre en cause les ions SO₄²⁻ qui sont à l'origine des modifications de pH. En effet, lorsque le (NH₄)₂SO₄ est ajouté dans le milieu, l'ion SO₄²⁻ a tendance à faire baisser le pH lorsque les cations NH₄⁺ sont consommés.

Dans le cas de NH₄NO₃, le résultat obtenu peut être expliqué par la chute de phi qui est due cette fois aux ions NH₄⁺. Quand le NH₄NO₃ est incorporé au milieu de culture, l'ion NH₄⁺ est absorbé en premier, ce qui aboutit à une acidification du milieu. L'anion NO₃⁻ est assimilé après épuisement de l'ion NH₄⁺. Cette utilisation préférentielle (règle générale) est probablement le résultat d'une répression par laquelle, le produit final réprime l'activité d'une ou plusieurs enzymes (Moore-landecker, 1982).

La croissance et la densité mycélienne des isolats de *H. oryzae* sont importantes en présence de NaNO_2 . Ce comportement ressemble à celui de *Pyricularia oryzae* sur la même forme d'azote (Benkirane, 1995). L'incapacité de se développer sur le nitrite de sodium est fréquemment observée chez plusieurs espèces fongiques. En effet, les nitrites tendent à être toxiques, spécialement s'ils s'accumulent dans le milieu et ne peuvent pas satisfaire les besoins en azote (Moore-landecker, 1982).

Le comportement des espèces fongiques varie largement sur différents acides aminés (Moore-landecker, 1982). Pour certains de nos isolats, l'alanine est très favorable à leur croissance. Ce résultat est identique à celui trouvé par Sharma et al. (1984) avec *Claviceps fusiformis*, par Job et Aragno (1992) avec *Cenococcum geophilum* et par Benkirane (1995) avec *Pyricularia oryzae*.

Les isolats de *H. oryzae* poussent faiblement sur l'asparagine, ceci est en conformité avec les travaux de Misra et Muckerjee (1962).

L'adénine, la méthionine et la cystéine ne sont pas convenables pour le développement des isolats marocains de *H. oryzae*. C'est le cas de certains isolats de *Pyricularia oryzae* (Otsuka et al., 1957 ; Benkirane, 1995).

Les sources d'azote qui inhibent la croissance du champignon peuvent être incorporées dans les programmes de lutte contre l'helminthosporiose du riz, soit par l'application de ces composés sur la plante hôte, soit par la sélection de génotypes d'hôtes ayant un contenu élevé de un ou plusieurs de ces composés (Sharma et al., 1984)

La capacité d'un organisme d'utiliser un sucre dépend de son aptitude de le convertir en un dérivé phosphorylé de glucose, capable de s'intégrer dans la chaîne respiratoire (Cochrane, 1958). Ainsi, les isolats marocains de *H. oryzae* peuvent métaboliser la plupart des composés carbonés testés mais à des degrés variables.

Parmi tous les hexoses, le glucose est biologiquement la source d'énergie la plus efficace (Job et Aragno, 1992). En effet, il favorise une croissance et une densité mycélienne importantes de tous les isolats de *H. oryzae*, mais un peu moindre pour l'isolat H.Ot.

Les autres hexoses testés (fructose, galactose et mannose) sont aussi efficaces que le glucose. Tanaka (1956) a obtenu le même résultat. Le glucose, le fructose et le mannose sont les sources de carbone les plus appréciées par plusieurs espèces d'*Allomyces* (Nielsen, 1982).

Les résultats obtenus avec les disaccharides montrent le fonctionnement des enzymes hydrolysant ces composés chez les isolats marocains de *H. oryzae*. Cependant, le pouvoir hydrolysant se trouve diminué chez l'isolat H.Ot en présence du saccharose. Les travaux de Chen et al. (1964) sur *H. oryzae* ont montré des résultats similaires. Le saccharose, le maltose et le lactose sont également appréciés, à des degrés variables, par d'autres espèces d'*Helminthosporium* (Reddy, 1972 ; Pandey et Shukla, 1978).

Cependant, il faut souligner que la croissance et la densité mycélienne obtenues sur le maltose, sont nettement plus importantes pour les cinq isolats, ceci a été également observé par Chen et al. (1964) avec *H. oryzae*, par Muhammed et al. (1991) avec *H. turcicum* et par Olutiola et Nwaogwugwu (1982) avec *Aspergillus aculeatus*.

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. Ces résultats prouvent également qu'il y a une production suffisante de l'amylase par les cinq isolats.

Le carboxyméthyl cellulose est beaucoup moins utilisé que l'amidon soluble par tous les iso-

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. Ces résultats prouvent également qu'il y a une production suffisante de l'amylase par les cinq isolats.

Le carboxyméthyl cellulose est beaucoup moins utilisé que l'amidon soluble par tous les isolats de *H. oryzae* testés, à l'exception de H.O_h, résultat qui montre, peut être, l'incapacité de ces isolats de synthétiser les enzymes nécessaires en quantité suffisante. Pour certains champignons, tels que *Pyricularia oryzae*, le niveau d'activité cellulotique est vraisemblablement comparable à leur pouvoir pathogène. Cette relation semble ne pas exister pour *H. oryzae* (El Kowkgy et al., 1987).

Parmi les alcools testés, le mannitol a été la meilleure source de carbone en présence du nitrate de sodium. Ce résultat est en conformité avec celui de Misra et Mukerjee (1962). Seuls les isolats H.O_i et H.O_e ont montré une croissance importante sur le sorbitol.

Il est connu que l'utilisation du mannitol nécessite son énoilisation (tautomérie aldo-énolique) en glucose, mannose et fructose, ce qui nécessite évidemment la synthèse d'une enzyme appelée mannitol déshydrogénase. Cette synthèse peut entraîner une période de latence au début de la croissance (adaptation enzymatique).

D'après Smith et al (1969), le tréhalose et le mannitol représentent les glucides les plus abondants dans le mycélium des champignons. De leur part, Tanaka et Yoda (1952) ont montré que le mannitol peut servir comme réserve de nutriments dans le mycélium de *H. oryzae*.

Les isolats de *H. oryzae* poussent faiblement sur les acides organiques testés, ce qui semble être une règle générale pour tous les champignons (Moore-Landecker, 1982).

Les études relatives aux exigences nutritionnelles pour la croissance, ont fourni des précisions quant aux variations des isolats de la même région. Ainsi, il est possible de regrouper certains isolats en catégories ayant la même affinité.

Les sources d'azote nous ont permis de distinguer trois groupes parmi les cinq isolats étudiés, alors qu'avec les sources de carbone, nous avons défini quatre groupes.

Les isolats H.O_h et H.O₂₀₉ forment deux groupes distincts aussi bien sur les sources d'azote que sur celles de carbone. L'étude de l'influence des sources de carbone sur la croissance et la densité mycélienne, a permis de différencier l'isolat H.O_e des deux isolats H.O_a et H.O_i. Ces trois isolats forment un seul groupe sur les sources d'azote testées.

Références bibliographiques

- Agostini J.P., Timmer L.W. & Mitchell D.J. (1992). Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporoides* from Citrus. The American Phytopathological Society Ethiology, 82, N° 11.
- Benkirane R. (1995). Contribution à l'étude des maladies du riz au Maroc. Cas de la pyriculariose due à *Pyricularia oryzae*. Thèse de 3ème cycle. Faculté des Sciences de Kénitra. Maroc, 145 p.
- Chen Y.S., Ren H.C. & Fang C.T. (1964). Studies on the carbon and nitrogen nutrition of *Pyricularia oryzae* and *Helminthosporium oryzae*. Acta phytopath. sin. 7 : 165-174.

- Engelhard T., Zasda C. & Prochack. (1972). Influence of temperature on dermatophytes. *Mycopathologia and Mycologia applicata*, 48 : 297-301.
- Goudert J., Saez H. & Battesti M.K. (1973). Caractéristiques thermiques de quelques dermatophytes. *Bull. Soc. Fr. Myc. méd.* II (2) : 171-172.
- Job D. & Aragno M. (1992). Nutritional growth requirements for submerged cultures of the ectomycorrhizal fungi *Cenococcum geophilum* Fr. *Cryptogamie Mycol.*, 13 (2) : 72-85.
- Leander F.J. & Elroy A.C. (1972). Methods for research on the ecology of soil borne plant pathogens. 245 p.
- Merz E.W.G, Berger C.L. & Silva-hitner M. (1970). Media with phi indicators for the isolation of dermatophytes, *Arch. Derm.*, Vol. 102 : 545-547.
- Misra H. & Muckherjee A.K. (1962). Effect of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of *Helminthosporium oryzae* Breda de haan. *Indian Phytopathology*, Vol. 15 : 211-215.
- Moore Landecker E.(1982). *Fundamental of the fungi*. Second edition 578p.
- Muhammad S., Dogar M. A. & Khan M.A.(1991). Physiological studies and in vitro evaluation of fungicides against *Helminthosporium turcicum* Pass. *Sharhad Journal of Agriculture*, Vol. 7, N°1 : 95-100.
- Neilsen T.A.B. (1982). Comparative studies of the physiology of *Allomyces* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 78 (1) : 83-88.
- Okeke B., Seigle-murandi F., Steiman R. & Sage L.(1992). Investigation on cultural and cellulytic activity in *Pyricularia oryzae* Cavara. *Agronomie*, 12 : 325-329. Elsevier/ INRA. Plant pathology (note).
- OU S.H. (1985). *Rice diseases*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England. 367p.
- Olutiola P.O. & Nwaogwugwu R.I. (1982). Growth, sporulation and production of maltase and proteolytic enzymes in *Aspergillus acuceatus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 78 (1) : 105-113.
- Otsuka H., Tamari K & Agasawara N. (1965). Variability of *Pyricularia oryzae* in culture. In the rice blast disease, *Proceeding of a symposium held and IRRI, Manila, Phillipines, July 1963*, 69-109. Baltimore, John Hopkins Press.
- Otsuka H., Tamari K & Agasawara N. (1957). Biochemical studies on rice blast disease. Biochemical classification of *Pyricularia oryzae* Cav (2). *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 31 : 794-798.
- Pandey S.C. & Shukla T.M. (1978). Comparative efficaces of different carbon sources in supporting growth and sporulation of six species of *Helminthosporium*. *Indian Phytopathology*, Vol. 31 : 73-75..
- Reddy S.M. (1972). Utilization of oligosaccharides by five species of *Helminthosporium*. *Indian Phytopathology*, Vol. 25 : 200-204.
- Sharma R.K., Verma O. & Pathak V.M. (1984). Some physical and nutritional factors for growth and sporulation of *Claviceps fusiformis* lov. *Cryptogamie, Mycol.*, Tome 5 : 269-275.
- Smith D., Muscatine L. & Lewis D. (1969). Carbohydrate movement from autotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis. *Biological reviews*, 44 : 17-90.
- Tanaka S. & Yoda A. (1952). The metabolism of the organism of *Helminthosporium* disease of the rice plant. *J. Chem. Soc. Japan (Pure chem. Sect.)*, 73 : 8-10.
- Tanaka H. (1956). On the influence of carbon sources upon the growth of *Cochliobolus miyabeanus*. *Forschn Geb Pflkrankh.*, 5 : 165-170.
- Vales J.P., Tokpa G. & Ollitrault P. (1986). Comparaison de trois méthodes d'identification des souches de *Pyricularia oryzae* Cav. *Agronomie tropicale*, 41 : 242-249.