

Effet *in vitro* de différents niveaux NPK sur la croissance mycélienne et la sporulation de cinq pathogènes foliaires du riz : *Helminthosporium* sp. et *Curvularia lunata*

Nawal IMRANI, Abdellatif OUZZANI CHAHDI, Mohamed CHLIYEH, Jihane TOUATI, Amina OUZZANI TOUHAMI, Rachid BENKIRANE et Aïlal DOUIRA

Université Ibn Tofaïl, Faculté des Sciences, Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes, B.P. 133, Kenitra, Maroc.

*Auteurs correspondants, E-mail : nawalimrani@yahoo.fr ; douiraallal@hotmail.com

Original submitted in on 21st August 2014. Published online at www.m.elewa.org on 30th September 2014. <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v81i1.10>

RÉSUMÉ

Objectif : Le principal but de cette étude est d'examiner *in vitro* l'effet d'azote, de phosphore et de potassium, à différents niveaux, sur deux séquences biologiques de cinq pathogènes foliaires du riz (*Oryza sativa*) : *Helminthosporium oryzae*, *H. sativum*, *H. australiensis*, *H. spiciferum* et *Curvularia lunata*, notamment la croissance mycélienne et la sporulation.

Méthodologie et résultats : Trois milieux de culture organiques sont utilisés pour tester l'effet NPK sur la croissance mycélienne et la sporulation des cinq espèces fongiques testées : PDA, Farine de riz et Extrait de malt. Les sources d'azote, de phosphore et de potassium sont incorporées séparément dans le milieu de culture à des concentrations croissantes, 0,01 M (C1), 0,025 M (C2), 0,05 M (C3), 0,1 M (C4) et 0,15 M (C5), avant la stérilisation. Deux critères de notation sont pris en considération : la croissance mycélienne et la sporulation des espèces fongiques. Les résultats obtenus ont montré que les *Helminthosporium* et *Curvularia lunata* testés ont des comportements variables, croissance mycélienne et sporulation, sur des régimes nutritionnels en azote, phosphore et potassium. Ces comportements sont fonction de milieu de culture, la dose et la source de l'élément fertilisant incorporé.

Conclusion et application de résultats : Cette étude *in vitro* sur la croissance et la sporulation a montrée une grande adaptation des pathogènes foliaires du riz (*Helminthosporium* et *C. lunata*) aux différents niveaux de NPK testés, une telle adaptation laisse croire que l'apport des nutriments a plus d'effet sur l'hôte que sur le pathogène lui-même. Ces observations seront utiles pour aborder *in vivo* l'effet de la fertilisation sur les maladies foliaires du riz.

Effect of different levels of NPK on the mycelia growth and sporulation of five rice leaves pathogens: *Helminthosporium* sp. and *Curvularia lunata*

ABSTRACT.

Objective : The main purpose of this study is to investigate *in vitro* the effect of nitrogen, phosphorus and potassium, at various levels, of two biological sequences of five foliar pathogens of rice (*Oryza sativa*):

Helminthosporium oryzae, *H. sativum*, *H. australiensis*, *H. spiciferum* et *Curvularia lunata*, including the mycelial growth and sporulation.

Methodology and Results: Three organic media cultures (PDA, rice meal and malt extract) were used to test the NPK effect on mycelia growth and sporulation of the five fungal species. The sources of nitrogen, phosphorus and potassium were incorporated separately in the culture medium at increasing concentrations, 0.01M (C1), 0.025 M (C2), 0.05M (C3), 0.1M (C4) and 0.15 M (C5), before the sterilization. Two scoring criteria were considered: mycelial growth and sporulation of the fungal species. The obtained results showed that the tested *Curvularia lunata* and *Helminthosporium* spp. have variable behaviors, mycelia growth and sporulation on nutritional diets on nitrogen, phosphorus and potassium. These behaviors depend on culture medium, the dose and source of fertilizing element incorporated.

Conclusion and results application. This *in vitro* study on the growth and sporulation has shown a great adaptation of rice foliar pathogens (*Helminthosporium* spp. and *C. lunata*) at different levels of the tested NPK. Such adaptation suggests that the nutrient intake has a greater effect on the host as in the pathogen itself. These observations will be useful to approach the *in vivo* effect of fertilization on rice foliar diseases.

INTRODUCTION

La riziculture marocaine est confrontée à plusieurs problèmes phytosanitaires : les ravageurs (Berrady, 1997), les mauvaises herbes (EL Hasnaoui, 1993) et les maladies cryptogamiques (Lakrimi, 1989). Parmi ces dernières on peut citer, la pyriculariose (Benkirane, 1995 et 2001 ; Benkirane et al., 1999), l'helminthosporiose (Ennaffah et al., 1997 et 1999 ; Ennaffah, 1999 ; Ouazzani Touhami et al., 2000 ; Zehhar et al., 2008 ; Kadri et al., 2013) et la curvulariose (Hassikou et al., 1997 et 2001) provoquées respectivement par *Magnaporthe grisea* (Figure 1), *Helminthosporium* spp. (*H. oryzae* (Figure 2), *H. sativum*, *H. spiciferum* et *H. australiensis*, *Bipolaris cynodontis*, *H. bicolor* et *Bipolaris cynodontis*) et *C. lunata* (Figure 3). Ces trois maladies fongiques sont les plus redoutables et se rencontrent dans toutes les rizières du Maroc. Cependant, certaines maladies provoquées par ces pathogènes, peuvent être dues à la grande variation dans les apports en fertilisants minéraux, tels que l'azote, le phosphore et le potassium (N, P, K). Ces éléments minéraux agissent sur ces agents pathogènes en affectant l'induction et le développement de la maladie et en favorisant la production et ou la longévité de l'inoculum, la germination des spores, le processus d'infection et le développement des champignons pathogènes (Colhoum, 1979 ; Huber, 1980). Dans les rizières, il est presque impossible de distinguer entre les pertes dues à *Helminthosporium* et celles dues aux

conditions du sol. Ainsi, les taches foliaires causées par une déficience en potassium, sont assez similaires aux lésions provoquées par *Helminthosporium oryzae* (Golo, 1958 ; Lucas et al., 1985). El Mourid (1976) et Hebert (1960) ont rapporté que l'application des doses importantes d'azote est nécessaire pour l'obtention de haut rendement, malheureusement ces doses élevées augmentent parallèlement les risques des maladies parasitaires, notamment l'helminthosporiose (Chattopadhey et Dickson, 1960). Par contre, les plantes de riz sont moins sensibles à l'helminthosporiose dans un sol pauvre en phosphore (Ou, 1985). De même, les déficiences en azote dans la solution nutritionnelle peuvent conduire à l'apparition de l'helminthosporiose plus que la déficience en phosphate et en potassium (Missawa, 1955). Lockwood (1986) a montré Bien qu'il est difficile de séparer l'effet d'un nutriment sur un pathogène du sol de celui sur son hôte, l'inoculum potentiel serait, foi et raison, marqué par les modifications des conditions telluriques, en l'occurrence par l'apport des nutriments. En conséquence, il serait très intéressant d'éclaircir la conduite d'*H. Oryzae*, *H. sativum*, *H. australiensis*, *H. spiciferum* et *C. lunata*, et d'élucider les différentes facettes de leur biologie, sous différents états nutritionnels particulièrement en relation avec les variations des niveaux de N, P et K qu'ils devraient subir dans les conditions du champs. A la

lumière de ces données, il serait intéressant d'examiner *in vitro* l'effet d'azote, de phosphore et de potassium à différents niveaux sur deux séquences

biologiques de *H. Oryzae*, *H. sativum*, *H. australiensis*, *H. spiciferum* et *C. lunata*, notamment la croissance mycélienne et la sporulation.

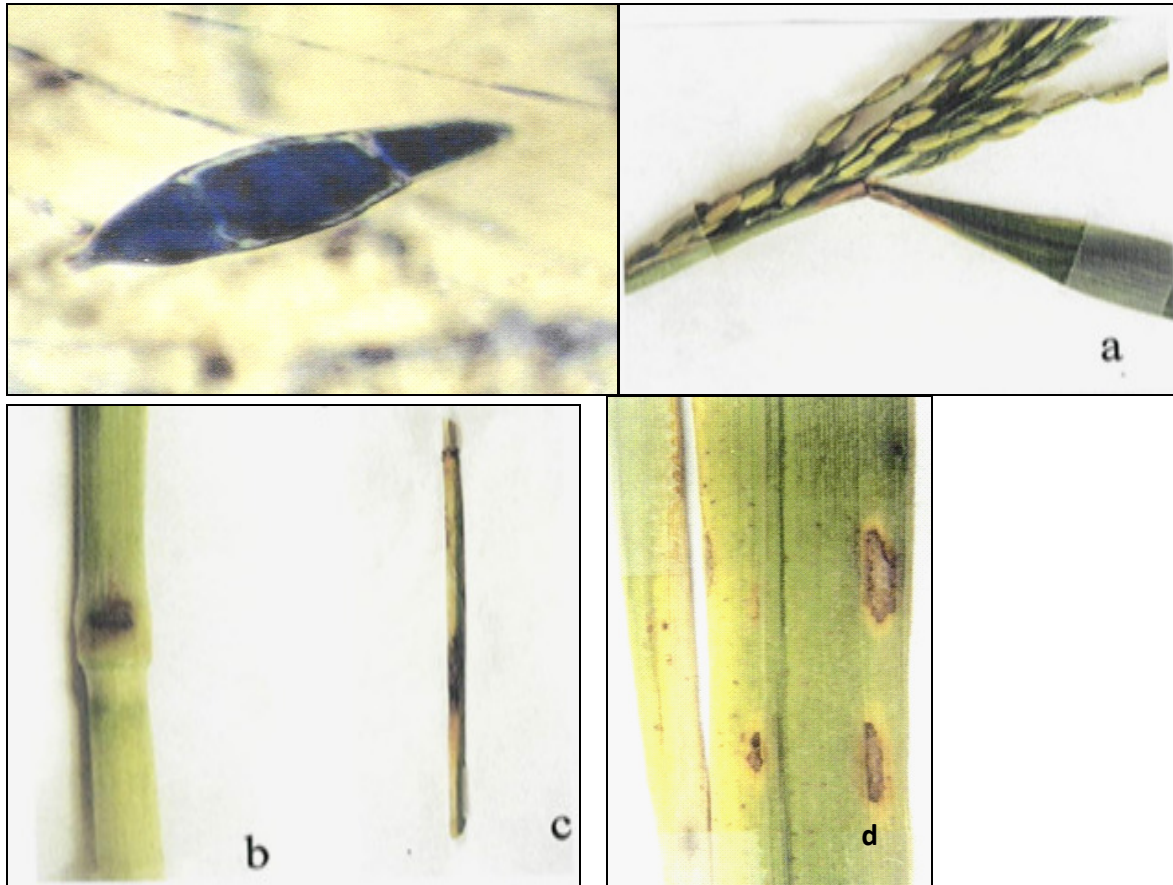


Figure 1 : Symptômes développés sur la gaine (a), nœud (b), tige (c) et feuille (d) , des plantes de riz inoculées par *Magnaporthe grisea* (Benkirane,2001)

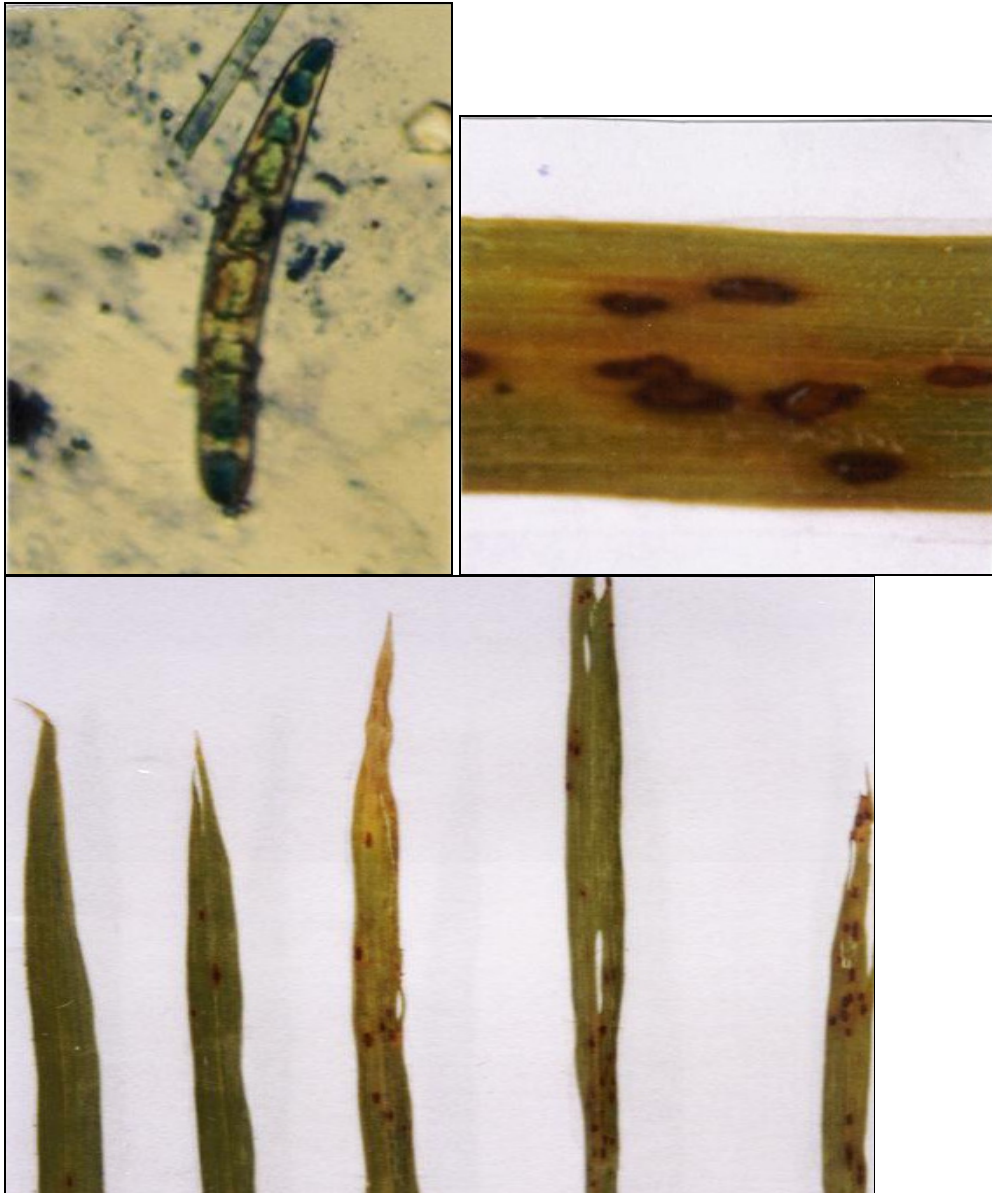


Figure 2: Symptômes foliaires développés sur les feuilles des plantes de riz inoculées par *Helminthosporium oryzae* (Ouazzani Touhami, 2001)

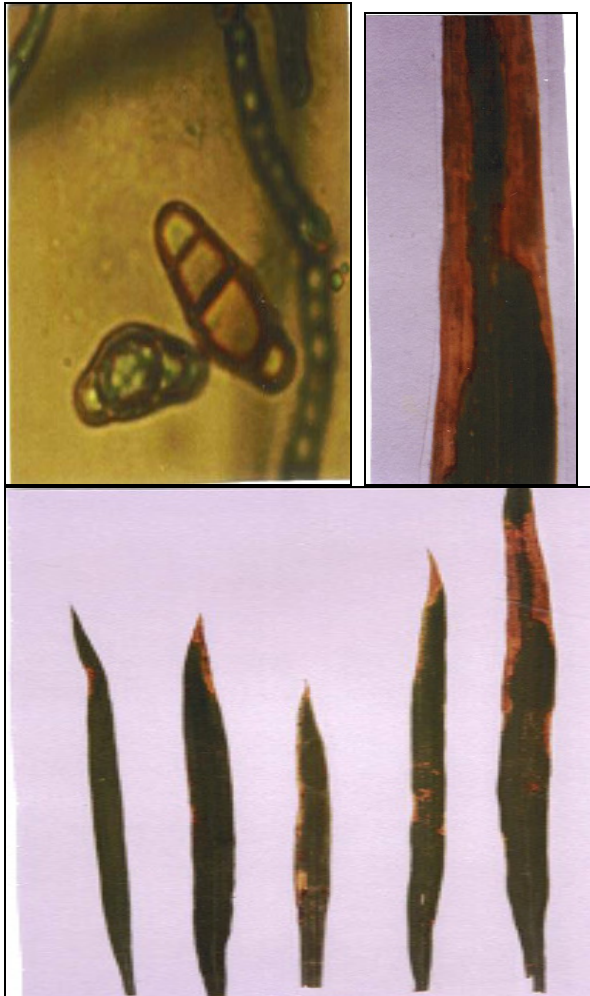


Figure 3: Symptômes foliaires développés sur les feuilles des plantes de riz inoculées par *curvularia lunata* (Ouazzani Touhami, 2001)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel fongique : Cinq espèces fongiques isolées des plantes de riz sont utilisées. *Helminthosporium oryzae* et *Helminthosporium spiciferum* sont obtenus à partir des lésions foliaires de la variété de riz Triomphe. *Helminthosporium sativum* et *Helminthosporium australiensis* sont collectés respectivement à partir de la variété Bahja et Samar. *Curvularia lunata* est obtenue à partir des lésions de la variété Kenz.

Milieux de culture : Trois milieux organiques sont utilisés pour tester l'effet NPK sur la croissance mycélienne et la sporulation des cinq espèces fongiques testées. Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar: 40g; eau distillée: 1000 ml) le milieu Farine de riz (farine de riz : 14 g ; Extrait de levure :4 g; Agar-Agar: 15 g; eau distillée :1000 ml) et Extrait de malt : 20 g ; Aga-agar: 15 g, eau distillée: 1000 ml).

Sources NPK utilisées : Le nitrate d'Ammonium (NH_4NO_3) est utilisé comme source d'azote, le di sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) comme source de phosphore et le chlorure de potassium comme source de potassium.

Effet des niveaux croissants du N, P, K additionnés séparément au milieu de culture : Les sources d'azote, de phosphore et de potassium sont incorporées séparément dans le milieu de culture à des concentrations croissantes (0,01 M, 0,025 M, 0,05 M, 0,1 M et 0,15 M) avant la stérilisation. Ces milieux, stérilisés à 120°C pendant 30 min, sont coulés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre à raison de 20 ml par boîte. Une fois le milieu est solidifié, les boîtes sont ensemencées par un explant de 5 mm de diamètre prélevés à partir de la marge des différentes cultures

âgées de 8 jours (trois répétitions sont réalisées pour chaque concentration). Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C à l'obscurité pour l'*H. spiciferum*, *H. australiensis* et *C. lunata* et à la lumière continue pour *H. oryzae* et *H. sativum*.

Notation des résultats : Après 8 jours d'incubation, la croissance mycélienne des différentes espèces est mesurée selon deux diamètres perpendiculaires. L'intensité de la sporulation est estimée après 15 jours d'incubation pour *H. oryzae* et 10 jours pour les autres champignons étudiés. Pour chaque traitement, quatre

rondelles de l'espèce étudiée sont placées ensuite dans des tubes à essai contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Avant l'opération de comptage, les tubes sont agités au vortex pendant 1 mn, ce qui permet le détachement des conidies des conidiophores. Pour chaque espèce et pour chaque traitement, le comptage du nombre total de conidies libérées est effectué avec une lame de Malassez à raison de 10 comptages par suspension. Le nombre moyen de conidies comptées est exprimé par unité de la surface du thalle considéré (nombre moyen de conidies par mm²).

RÉSULTATS

L'addition de l'azote, phosphore et potassium à des concentrations croissantes à différents milieux de culture a eu des effets variables sur la croissance mycélienne et la sporulation des espèces fongiques testées. Ainsi, l'apport de l'azote sous forme de nitrate d'ammonium au milieu farine de riz n'a eu aucun effet sur la croissance mycélienne de *Helminthosporium sativum* et *H. australiensis*, il stimule celle de *H. spiciferum* (90 mm) et réduit celles de *H. oryzae* (86,66 mm) à partir de la C4 et de *Curvularia lunata* à partir de la concentration C3 par

rapport aux témoins respectivement 80,9 et 77,6 mm. Sur milieu PDA, l'azote a stimulé la croissance mycélienne de *H. spiciferum*, celle de *H. sativum* aux concentrations C1 et C2, respectivement 85 et 73,5 mm. L'addition de l'azote au milieu extrait de malt a permis de réduire la croissance mycélienne des espèces fongiques testées au fur et à mesure que la concentration en azote augmente, comme c'est l'exemple de *C. lunata* dont la croissance mycélienne est de 54,33 mm à C1 et de 25,66 mm à C5 par rapport au témoin égale à 90 mm (Tableau 1).

Tableau 1: Effet du nitrate d'ammonium incorporé, à des concentrations croissantes, à différents milieux de culture sur la croissance mycélienne des *Helminthosporium* et *Curvularia lunata* testés (exprimée en mm).

		Espèces fongiques testées				
		<i>H.oryzae</i>	<i>H.Sativum</i>	<i>H.spiciferum</i>	<i>H.australiensis</i>	<i>C.lunata</i>
Farine de riz	T	90,00 a	80,00 a	77,66 b	90,00 a	90,00 a
	C1	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C2	88,33ab	9000 a	9000 a	9000 a	90,00 a
	C3	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	83,33 ab
	C4	86,66 bc	81,66 a	90,00 a	90,00 a	85,00 ab
	C5	85,00 c	85,00 a	86,66 a	90,00 a	79,66 b
PDA	T	75,66 b	65,83 bc	74,66 b	90,00 a	80,33 ab
	C1	86,66 a	85,00 a	90,00 a	88,3 a	90,00 a
	C2	75,00 b	73,50 ab	90,00 a	61,66 e	87,33 ab
	C3	40,16 b	82,50 ab	86,66 a	73,00 bc	80,00 b
	C4	72,33 b	55,00 e	90,00 a	90,00 a	81,66 ab
	C5	72,00 b	65,00 bc	85,33 a	80,66 ab	79,66 b
Extrait de malt	T	90,00 a	60,33 ah	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C1	82,50 a	72,00 a	77,16 ab	81,16 b	54,33 b
	C2	60,00 b	47,33 bc	47,83 c	67,50 e	55,66 b
	C3	50,33 bc	36,66 e	46,16 e	55,66 d	54,00 b
	C4	31,66 d	51,66 bc	60,00 be	57,83 d	43,66d
	C5	45,33 c	52,00 bc	55,33 bc	58,33 d	25,66 d

Pour un même milieu de culture, deux résultats lus sur la même colonne et accompagnés de la même lettre ne diffèrent significativement au seuil de 5%, test de P. P. D. S.

T= 0 M ; C1 = 0.01 M = 0,8 g/l ; C2 = 0,025M = 2 g/l ; C3 = 0.5 M = 4 g/l ; C4 = 0,1M = 8 g/l ; C5 = 0,15 M = 12 g/l

L'incorporation du phosphore sous forme de dis sodium hydrogénophosphate aux trois milieux de culture a permis de réduire la croissance mycélienne de tous les agents pathogènes testés au fur et à mesure que la concentration du produit augmente. Cette inhibition peut être totale pour les concentrations élevées. Ainsi sur le milieu extrait de malt, la croissance mycélienne de *H.*

spiciferum est nulle à C5 et elle est de 90 mm pour le témoin à (Tableau 2). L'addition de chlorure de potassium aux différents milieux de culture n'a eu aucun effet sur la croissance mycélienne maximale. En effet, il stimule croissance des espèces qui n'ont pas atteint un maximum pour le témoin, cas de *H. oryzae*, *H. sativum* et *H. spiciferum* sur milieu farine de riz.

Tableau 2 : Effet du disodium hydrogénophosphate, additionné à des concentrations croissantes, à différents milieux de culture sur la croissance mycélienne des *Helminthosporium* et *Curvularia lunata* testés (exprimée en mm).

		Espèces fongiques testées				
		<i>H.oryzae</i>	<i>H.Sativum</i>	<i>H.spiciferum</i>	<i>H.australiensis</i>	<i>C.lunata</i>
Farine de riz	T	90,00 a	80,00 a	77,66 a	90,00a	90,00 a
	C1	81,66 a	74,83 a	68,50 b	90,00 a	90,00 a
	C2	69,66 h	31,83 b	41,00 c	75,00 b	70,00 b
	C3	45,00 c	23,16 b	26,50 d	75,00 b	75,00 b
	C4	7,3 d	0,00 c	24,83 de	45,66 c	51,66 c
	C5	0,00 d	0,00 c	20,16 e	45,66 d	41,66 d
PDA	T	75,66 a	65,83 a	74,66 a	90,00 a	80,33 ab
	C1	38,33 b	65,00 a	57,00 ab	90,00 a	85,66 a
	C2	30,00 c	66,66 a	55,00 ab	80,00 b	73,33 bc
	C3	28,33 c	35,00 b	36,66 bc	75,00 b	64,00 cd
	C4	20,00 d	6,66 c	16,66 c	55,66 c	50,00 e
	C5	16,66 d	0,00 c	10,66 c	0,00 d	55,00 de
Extrait de malt	T	90,00 a	60,33 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C1	38,33 bc	40,00 b	90,00 a	90,00 a	86,00 b
	C2	35,00 bc	42,83 ab	74,00 b	70,00 b	70,00 c
	C3	42,33 b	32,50 bc	52,33 e	75,00 b	70,00 c
	C4	32,00 bc	20,83 c	16,66 d	36,55 e	36,00 d
	C5	26,66 c	0,00 d	0,00 e	0,00 d	23,33 e

Pour un même milieu de culture deux résultats lus sur la même colonne et accompagnés de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5%, test de P. P. D. S.

T = 0 M ; C1 = 0,01 M = 0,56 g/l ; C2 = 0,025M = 1,4 g/l ; C3 = 0,5 M = 2,8 g/l ; C4 = 0,1M = 5,6 g/l ; C5 0,15 M = 8,4 g/l

Sur les trois milieux utilisés, la sporulation d'*Helminthosporium spiciferum* est importante suite à un apport croissant du nitrate d'ammonium jusqu'à la concentration C4 (pouvant atteindre 11 973,72 conidies/mm²), pour laquelle un début de diminution de la sporulation est remarqué (900 conidies/mm²). Le même résultat a été observé pour *H. sativum* (3125 conidies/mm²) et pour *H. oryzae* (3689,77 conidies/mm²), à la différence de *Helminthosporium spiciferum*, la réduction a commencé à la concentration C3 (respectivement 551 et 2925 conidies/mm² sur le milieu farine de riz et à la concentration C4 pour le milieu extrait de malt (110,39 et 1 537 conidies/mm²); alors que sur le milieu PDA, l'azote n'a pas d'effet sur la croissance mycélienne de ces deux champignons. L'incorporation de

l'azote sur le milieu farine de riz est également favorable à la sporulation d'*Helminthosporium australiensis*, elle atteint 43249 conidies/ mm² à la concentration C4; cependant, sur le milieu PDA, elle a donné une réduction importante de la sporulation à partir de la concentration C1 (3057 conidies/ mm²) par rapport au témoin (8186 conidies/ mm²). Par contre, sur le milieu extrait de malt il n'y a pas de différence avec le témoin. Une inhibition de moitié de la sporulation de *Curvularia lunata* est obtenue sur les milieux PDA et extrait de malt (respectivement de 26940 et 1 2551 conidies/ mm²) pour le témoin à (7787 et 6649 conidies/ mm²) a partir de la concentration C1, alors que sur milieu farine de riz aucune différence significative par rapport au témoin n'est observée (Tableau 4).

Tableau 3 : Effet du chlorure de potassium, additionné à des concentrations croissantes, à différents milieux de culture sur la croissance mycélienne des *Helminthosporium* et *Curvularia lunata* testés (exprimée en mm).

		Espèces fongiques testées				
		<i>H.oryzae</i>	<i>H.Sativum</i>	<i>H.spiciferum</i>	<i>H.australiensis</i>	<i>C.lunata</i>
Farine de riz	T	75.66 b	65,83 b	77.66 b	90,00 a	90,00 a
	C1	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C2	90.00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C3	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C4	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C5	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
PDA	T	90,00 a	80,00 a	74,66 b	90,00 a	90,00 a
	C1	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C2	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C3	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C4	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C5	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
Extrait de malt	T	90,00 a	60,33 b	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C1	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C2	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C3	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C4	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a
	C5	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a	90,00 a

Pour un même milieu de culture, deux résultats lus sur la même colonne et accompagnés de la même lettre ne diffèrent significativement au seuil de 5%, test de P. P. D. S.

T = 0 M; C1 = 0.01 M = 0,74 g/l; C2 = 0,025 M = 1,86 g/l; C3 = 0.5 M = 3,72 g/l; C4 = 0,1 M = 7,4 g/l; C5 0,15 M = 11,18g/l

Tableau 4 : Effet du nitrate d'ammonium additionné à des concentrations croissantes à différents milieux de culture sur la sporulation des différentes espèces testées (exprimée en nombre de conidies/mm²)

		Les espèces fongiques				
		<i>H.oryzae</i>	<i>H.Sativum</i>	<i>H.spiciferum</i>	<i>H.australiensis</i>	<i>C.lunata</i>
Farine de riz	T	5265.04ab	3706,75 a	4700,26 ab	4776,75 b	7842,36a
	C1	3422,27b	1154,96bc	4619,64 ab	9269,02 b	5349,96a
	C2	3689.77b	3125,03ab	5490,06 a	3915,99 b	5265,04a
	C3	2925,49bc	551,98 c	5812,77 a	20809,01 b	4670,60a
	C4	1094,83cd	382,14 c	2714,44 ab	43249,76 a	4415,84a
	C5	1571.02d	195,31 c	1392,68 b	21128,10 b	5197,10a
PDA	T	4649,37ab	895,88 a	6517,53 abc	8186,07 a	26940,86a
	C1	5897,69a	1224,73a	10339,01 ab	3057,12 b	7787,16 b
	C2	390632ab	1312,09 a	11973,72 a	2893,92 b	8801,96 b
	C3	5757,57 a	564,75 a	5222,58 bc	1486,10 b	13557,48b
	C4	1863,99ab	883,22 a	1910,70 c	1396,93 b	5562,26 b
	C5	1103.96 b	535.02 a	1736,61 c	878,92b	5775,89 b
Extrait de malt	T	5180,12 a	2581,56a	5655,65 b	2581,56 a	12551,17a
	C1	3142,04b	1328,99b	53287 b	4496,51 a	664924 b
	C2	3192,99 b	32269 c	734106 a	196165 a	373223 c
	C3	2076,29ab	2190,93 a	1876.73 bc	5957 13 a	1838 52 c
	C4	1537,05 c	110,39 c	929,87 c	420,35a	3324,62 c
	C5	1518,98 c	218,64 c	900,15 c	1036,02 a	2420,22 c

Pour un même milieu de culture, deux résultats lus sur la même colonne et accompagnés de la même lettre ne diffèrent significativement au seuil de 5%, test de P. P. D. S.

T= 0 M; C1 = 0.01 M = 0,8 g/l; C2 = 0,025M = 2 g/l; C3 = 0.5 M = 4 g/l; C4 = 0,1M = 8 g/l; C5 0,15 M = 12g/l

Tableau 5: Effet du disodium hydrogénophosphate additionné à des concentrations croissantes à différents milieux de culture sur la sporulation des différentes espèces testées (exprimée en nombre de conidies/mm²)

Espèces fongiques						
		<i>H.oryzae</i>	<i>H.Sativum</i>	<i>H.spiciferum</i>	<i>H.australiensis</i>	<i>C.lunata</i>
Farine de riz	T	5265,04 a	3706,75a	4700,26a	4776,75 a	7842,36 b
	C1	3906,20a	2122,33ab	4033,70 ab	1716,82 b	13756,33a
	C2	1375,70b	679,00 b	2038,08 c	1312,83 bc	14563,33a
	C3	934,12 b	296,66 b	2165,46bc	1113,18 bc	2674,67 c
	C4	870,43 b	0,00 b	509,5 cd	85,37c	1188,60 c
	C5	84,92 h	0,00 b	0,00 d	0,00 c	891,60 c
PDA	T	4649,37a	895,88 n	6517,53 a	8186,07 a	26940,86a
	C1	615,49 b	657,66 ab	530,75 b	1370,04 b	8661,33 b
	C2	488,20 b	594,00 ah	1019,09 b	834,6 b	1400,67 c
	C3	488,20 b	190,66 b	0,00b	0,00b	848,67 c
	C4	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b	593,67 c
	C5	0,00b	0,0b	0,00b	0,00b	381,67 c
Extrait de malt	T	5180,12 a	2581,56 a	5655,64 a	2581,56 a	12551,17a
	C1	1273,8 b	44533 b	1486,10 b	141866 b	467000b
	C2	1019,04 b	0,00h	1486,10 b	103773 bc	2547,00 c
	C3	1401,18 b	0,00b	636,9 c	560,5cd	1804,00cd
	C4	1634,68 b	0,00b	0,00c	150,23 d	615,33 d
	C5	1295,03 b	0,00b	0,00c	0,00d	402,67 d

Pour un même milieu de culture, deux résultats lus sur la même colonne et accompagnés de la même lettre ne diffèrent significativement au seuil de 5%, test de P. P. D. S.

T= 0 M; C1 = 0,01 M = 0,56 g/l; C2 = 0,025M = 1,4 g/l; C3 = 0,5 M = 2,8 g/l; C4 = 0,1M = 5,6 g/l; C5 0,15 M = 8,4g/l

Comme pour la croissance mycélienne, l'incorporation du phosphore aux trois milieux testés a donné une réduction de la sporulation de toutes les espèces, et plus la concentration est grande plus la sporulation est faible pouvant aller jusqu'à 100% de réduction, sauf pour *Curvularia lunata* pour laquelle une stimulation de la sporulation à la concentration C1 et C2 (14563 conidies/mm² par rapport au témoin (7842 conidies/ mm², sur le milieu farine de riz et par la suite une réduction importante est observé à partir de concentration C3 (2674 conidies/mm²) (Tableau 5).

Chez *H. spiciferum*, la sporulation est favorable sur les trois milieux et les concentrations en potassium testés. Alors que, pour *H. oryzae* les meilleurs résultats sont observés sur le milieu farine de riz à la concentration C4 (8419 conidies/mm²) et sur le milieu PDA à C3 (4046 conidies/ mm²). Par contre, sur le milieu extrait de malt, il y a une inhibition de la sporulation à partir de la concentration C1 (3401 conidies/ mm²). La sporulation d'*H. australiensis* est stimulée par l'incorporation de

potassium dans le milieu de culture pour atteindre un maximum à la concentration C1 (10313 conidies/mm²) par rapport au témoin (4776 conidies/ mm²) sur le milieu farine de riz et C2 sur les deux milieux PDA et extrait de malt (respectivement 14432 et 11812 conidies/mm² par rapport au témoin 8186 et 2581 conidies/mm²). L'*H. sativum* ne présente aucune différence avec le témoin sur le milieu farine de riz jusqu'à la concentration C1 (1146 conidies/mm²). De même, sur le milieu PDA, il y a une stimulation à la concentration C1 (1965 conidies/mm²) puis aucune différence significative n'est observée par rapport au témoin (895 conidies/mm²). Enfin, la sporulation de *C. lunata* sur le milieu extrait de malt contenant le potassium, ne présente aucune différence significative avec le témoin (12551 conidies/mm²). Alors sur le milieu farine de riz et PDA, une réduction de la sporulation de *C. lunata* est observée (de 7842 conidies/ mm² pour le témoin à 2900 conidies/ mm²) pour C1 (Tableau 6).

Tableau 6 : Effet du chlorure de potassium additionné à des concentrations croissantes à différents milieux de culture sur la sporulation des différentes espèces testées (exprimée en nombre de conidies/mm²)

		Espèces fongiques				
		<i>H.oryzae</i>	<i>H.Sativum</i>	<i>H.spiciferum</i>	<i>H.australiensis</i>	<i>C.lunata</i>
Farine de riz	T	5265,04 b	3706,75 a	4700,27 b	4776,75 b	7842,36. A
	C1	4509,24b	3176,00b	9804,01 a	10313,53a	2900,01b
	C2	3592,11 b	2611,27b	4806,47 b	3562,39 b	2415,97 b
	C3	5528,28 b	1863,99b	4156,83 b	8134,43 ab	3422,27 b
	C4	8419,81 a	1146,42 b	10411,17a	7209,7 ab	2887,28 b
	C5	5120,67 b	806,72 b	6729,91 b	7740,44 ab	1825,78 b
PDA	T	4649,17b	895,88 b	6517,53 c	8186,08 ab	26940,86a
	C1	4623,89b	1965,89 a	4500,76 c	10313,53ab	13935,33 b
	C2	4156,78b	675,11 b	10937,69 bc	14432,15 a	8031,06 b
	C3	5417,87 a	861,91 b	8245,73 bc	12873,87ab	11217,93 b
	C4	4046,43b	802,49 b	21442,80 a	9781,80 ab	10147,94 b
	C5	258584 b	636,90 b	34307,68 a	5787,30 b	8109,86 b
Extrait de malt	T	5180,12 a	2581,56 a	5655,65 c	2581,57 c	12551,17abc
	C1	3401,04 b	234804 a	1145557 a	7358,32 abc	7889,07 bc
	C2	2114,5 b	1031,77 b	691671 bc	11812,37 a	6135,46 c
	C3	2471,16 b	955,35 b	10933,44 ab	10143,36 b	591043 c
	C4	2950,96 b	976,58 b	8105,61 bc	9999,32 ab	15540,36 ab
	C5	295521 b	509,52 b	6844,55 bc	4755,52 bc	17264,25 a

Pour un même milieu de culture, deux résultats lus sur la même colonne et accompagnés de la même lettre ne diffèrent significativement au seuil de 5%, test de P. P. D. S.

T = 0 M ; C1 = 0,01 M = 0,74 g/l ; C2 = 0,025M = 1,86 g/l ; C3 = 0,5 M = 3,72 g/l ; C4 = 0,1 M = 7,4 g/l ; C5 = 0,15 M = 11,18g/l

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'incorporation de l'azote dans les milieux de culture, provoque une stimulation significative de la croissance mycélienne et de la sporulation de la majorité des espèces étudiées par rapport au témoin, caractérisé par l'absence d'azote. Il semble que l'azote est nécessaire pour un bon développement des espèces pathogènes sur le riz, ce constat est en accord avec les résultats de Lafraoui (1997) et Ben Ali (1998) qui ont constaté qu'un milieu de culture, caractérisé par l'absence d'azote, réduit d'une manière importante la croissance mycélienne de *Chocliobolus salivus* et de *Septoria tritici*. Le comportement des agents pathogènes selon le milieu de culture testé, à différents niveaux d'azote, peut expliquer les résultats obtenus. En effet, l'excès de cet élément dans le milieu de culture 'extrait de malt' diminue la croissance mycélienne des cinq pathogènes étudiés, il semble donc que la présence d'azote en excès dans le milieu de culture n'est pas nécessaire au développement des champignons testés, ceci est confirmé par Jalal et Sarhane (1988), qui ont signalé que les hauts niveaux d'azote réduisent significativement la croissance mycélienne de *Cochliobolus sativus*. En général, l'excès de potassium augmente la croissance mycélienne et la sporulation des espèces testées, donc un meilleur

développement des pathogènes est accompagné d'un haut niveau en potassium, ce constat est confirmé par Hervieux (2002) qui a noté une stimulation de la croissance mycélienne d'*Helminthosporium solani*, suite à un apport élevé de KCl sur le milieu PDA. L'apport du phosphore (Na₂HPO₄) aux différents milieux de cultures a abouti à une réduction significative de la croissance mycélienne et de la sporulation de toutes les espèces étudiées, le même résultat a été trouvé par Hervieux, (2002) sur *Helminthosporium solani*. Donc une influence directe de la composition du milieu de culture sur la séquence biologique d'*Helminthosporium sativum*, *H. spiciferum*, *H. australiensis*, et *Curvularia lunata*, dans certains cas, n'apparaît pas incontestable, mais un effet indirect des nutriments sur les deux séquences biologiques étudiées serait le plus probable. Cette étude *in vitro* a montré aussi la grande capacité des *Helminthosporium* et *C. lunata* de s'adapter aux différents niveaux de NPK testés, une telle adaptation laisse croire que l'apport des nutriments a plus d'effet sur l'hôte que sur le pathogène lui-même. Ce travail sera complété par des études *in vivo*. De même, à la lumière de ces données, il serait intéressant d'étudier également l'effet *in vitro* de différentes combinaisons possibles NPK sur les

différents stades du cycle biologiques des *Helminthosporium* et de *C. lunata*, en particulier le stade

de la germination des conidies.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ben Ali A., 1998. Contribution à l'étude de la septoriose (*Septoria tritici*) du blé tendre (*Triticum aestivum* L.): Importance et moyens de lutte. Doctorat du 3ème cycle, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc, 109 p.
- Benkirane R., 1995. Contribution à l'étude des maladies du riz au Maroc: cas de la pyriculariose due à *Pyricularia oryzae*. Thèse de Doctorat de 3ème cycle. Faculté des Sciences, Kénitra, 189p.
- Benkirane R., 2001. Etude d'une population marocaine de *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*): Caractérisation, spécificité parasitaire et recherche de sources de résistances chez le riz (*Oryzae saliva*) à la pyriculariose. Thèse de Doctorat d'Etat es-sciences, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc, 214 p.
- Benkirane R., Douira A., Selmaoui K. and Lebbar S., 1999. Identification of pathotypes in moroccan population of the rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) originaire du riz et de *Stenotaphrum secundatum*. Journal of phytopathology, 148 : 95-99.
- Berrady K., 1997. Recherche bioécologique sur le peuplement entomologique des rizières dans la plaine du Gharb (Maroc): Coléoptères, Hétéroptères, Odonates et Diptères. Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc.
- Bouslim F., Ennaffah B., Ouazzani Touhami A., Douira A., et El Haloui N.E., 1997. Pathogénie comparée de quelques isolats d'*Helminthosporium oryzae* vis-à-vis de certaines variétés du riz. Al Awamia, 98: 47-56.
- Chattopadhyay S.B., & Dickson J.G., 1960. Relation of nitrogen to disease development in rice seedling infected with *Helminthosporium oryzae*. Phytopathology 7: 434-438.
- Colhoum J., 1979. Predisposition by the environment. p: 75-96 In J.G. Horsfall and E.B. Cowling. Plant Diseases. IV. How plant defend themselves. Academic Press, Inc.
- Colhoum J., 1973. Effects of environmental factors on plant disease. Annual Review Phytopathology 11:343-364.
- Ennaffah B., Ouazzani Touhami A. & Douira A., 1999. Pathogenic capacity of *Helminthosporium spiciferum*: Foliar parasite of rice in Morocco. Journal of Phytopathology, 147: 377-379.
- Ennaffah B., 1999. Étude des *Helminthosporium* du riz: pouvoir pathogène, interactions compétitives, contamination et mesures de lutte chimique. Thèse de Doctorat, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences de Kénitra, Maroc, 122p.
- Ennaffah B., Ouazzani Touhami A. & Douira A., 1997. *Helminthosporium spiciferum*, foliar parasite of rice in Morocco. Agronomie (Plant Genetics and Breeding), 17: 1-2
- Hassikou K., Hassikou R. & Douira A., 1997. Behaviour of some rice cultivars in relation to *Curvularia lunata*. Phytopath Med., 73: 445-457
- Hassikou K., Hassikou R. & Douira A., 2001. Etude du pouvoir pathogène de *Curvularia lunata* sur certaines variétés du riz cultivées dans la région du Gharb - Maroc. Les Cahiers de la recherche. Université Hassan II. Volume III numéro I : 19-31.
- Hebert J., 1975. Données récentes sur la fertilisation azotée du blé tendre dans la région de Méknès. Mémoire de fin d'études Ecole National d'Agriculture de Meknès, 37p.
- Hervieux V., Yaganza E. S., Arul J., & Tweddeil R. J., 2002. Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of Potato Silver Scurf. Plant diseases, (86) 9: 1014-1018.
- Huber D. M., 1980. The role of mineral nutrition in defense. P: 381-406. J. G. Hostfall et E. B. Cowling. Plant diseases. V. How plant defend themselves. Academic, Press, Inc.
- Lafraoui A., 1997. Importance de la pourriture racinaire du blé et de l'orge dans le Nord-Ouest du Maroc. Influence de la nutrition minérale sur le développement de la maladie et sur la biologie de *Cochliobolus sativus*. Doctorat de 3ème Cycle. Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc, 108p
- Lakrimi. A. 1989. Fiche technique de la riziculture au Maroc. Institut National de Recherche Agronomique, Maroc.
- Lockwood J. L., 1986. Soil borne pathogens concepts and Connections Phytopathology 76: 20-27.
- Lucas G. B., Campbel C. L. & Lucas L. T., 1985. Introduction to plant diseases. Identification and

- management. Department of plant pathology, University Realeigh, North Carolina. Brown spot of rice: 587-596.
- Missawa T., 1955. Studies on the *Helminthosporium* leaf spot of rice plant. Jubilee Publication in Commemoration of the 60th Birthdays of professors Y. Tochinai an T. Fukushi, 65-73. Sapporo, Japon.
- Ou S.H., 1985. Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 380 p.
- Ouazzani Touhami A., 2001. Relations entre différents champignons foliaires de riz : Virulence, interactions compétitives, contaminations et mesures de lutte. Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc, 183p.
- Ouazzani Touhami A., Ennaffah B., El Yachioui M et Douira A., 2000. Pathogénie comparée de 4 espèces d '*Helminthosporium* obtenues à partir des plantes malades du riz au Maroc. Journal of Phytopathology, 148: 221-226.
- Kadri O., Simplicie Léopold Gnancadja-Andre S. L., Chliyeh L., Ouazzani Touhami A., Benkirane R. et Douira A., 2013. *Helminthosporium bicolor*, un pathogène foliaire du riz et de *Stenotaphrum secundatum* au Maroc. Int. J. Biol. Chem. Sci. 7(1): 332-337
- Sarhan A.R.T. & Jalal T.K., 1988. Effect of nitrogen fertilization and potassium nutrition on leaf spot disease of barley.II. Growth of pathogen and reponse of the plants to the toxic effects of culture filtrate. Arab Journal of Plant Protection, 6: 18- 26.
- Zehhar G., Ouazzani Touhami A. et Douira A., 2008. First report of *Bipolaris cynodontis* on *Oryza sativa* in Morocco. Phytopathol. Mediterr., 47, 73–76