



***Helminthosporium bicolor*, un pathogène foliaire du riz et de *Stenotaphrum secundatum* au Maroc**

Oumama KADRI, Simplicie Léopold GNANCADJA-ANDRE, Mohamed CHLIYEH,
Amina OUZZANI TOUHAMI, Rachid BENKIRANE et Allal DOUIRA*

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

* Auteur correspondant, E-mail: douiraallal@hotmail.com

RESUME

Helminthosporium bicolor est isolé pour la première fois au Maroc à partir des lésions foliaires d'*Oryza sativa* et de *Stenotaphrum secundatum*. Les plantes de ces deux espèces hôtes inoculées avec deux isolats d'*Helminthosporium bicolor* ont développé des lésions sporulantes. Les réisolements du pathogène à partir des ces lésions étaient positifs. Les indices de sévérité sur les deux variétés du riz varient entre 43,62% et 52,87%, par contre sur *Stenotaphrum secundatum*, ils atteignent 65,65% sur les plantes inoculées avec l'isolat R1. La sporulation est maximale sur *S. secundatum*, elle est de $8,4.10^5$ conidies/cm² pour l'isolat R1 et varie entre $3,28.10^5$ et $4,32.10^5$ conidies /cm² sur les feuilles de deux variétés du riz.

© 2013 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: *Helminthosporium bicolor*, *Oryza sativa*, *Stenotaphrum secundatum*, inoculation, sporulation.

INTRODUCTION

L'Helminthosporiose est considérée comme une maladie cryptogamique très importante du riz (Bouslim et al., 1997). *Helminthosporium oryzae* (Bouslim et al., 1997), *H. spiciferum* (Ennaffah et al., 1999), *H. sativum* et *H. australiensis* (Ouazzani et al., 2000), sont parmi les espèces du genre *Helminthosporium* rencontrées dans les rizières marocaines.

Parfois, en plus de *Pyricularia grisea*, tous ces *Helminthosporium* peuvent être rencontrés sur les lésions d'un seul pied (Ouazzani et al., 2000). Ceci complique l'estimation des pertes dues à ces pathogènes et la part qui revient à chacun d'eux, du point de vue pathogénicité (Hannin, 2003). L'essentiel, c'est que chaque espèce arrive à

produire des lésions sporulantes sur les feuilles du riz (Bahous et al., 2003).

Les espèces du genre *Helminthosporium* et *Pyricularia grisea*, peuvent se rencontrer également dans les lésions des mauvaises herbes qui se développent dans ou autour des rizières (Serghat et al., 2005).

L'objectif de ce travail est d'étudier le pouvoir pathogène d'*Helminthosporium bicolor* (synonyme : *Bipolaris bicolor*, *Drechslera bhawanii*, *Drechslera bicolor*) (Paul et Parbery, 1966 ; Ahmadpour et al., 2011), rencontré pour la première fois dans les rizières marocaines sur les plantes de riz et sur les feuilles de *Stenotaphrum secundatum* des jardins de la ville de Kénitra. Les lésions foliaires des deux plantes hôtes sont colonisées presque par les mêmes espèces de champignons (Gnancadja-André, 2005).

MATERIEL ET METHODES

Isolement d'*Helminthosporium bicolor*

Les feuilles du riz et de *Stenotaphrum secundatum* portant différentes lésions sont découpées en petits fragments d'environ 2 cm². Ces fragments sont trempés dans l'hypochlorite de sodium pendant 5 minutes et rincés cinq fois à l'eau distillée stérile. Ils sont ensuite placés dans des boîtes de Pétri contenant chacune trois rondelles de papier filtre humidifiées avec de l'eau distillée stérile. Après 72 heures d'incubation, des isollements monosporales sont effectués sous microscope (au grossissement x 40) à l'aide d'un capillaire en verre étiré, préalablement stérilisé à la flamme et refroidie. Ces spores sont transférées dans un milieu à base de farine du riz (Farine du riz : 14 g de farine de riz ; 4 g d'extrait de levure ; 15 g d'agar-agar ; 1000 ml d'eau distillée). Après le développement des cultures, les champignons isolés sont identifiés à l'aide de la clé de détermination d'Ellis (1971).

Matériel végétal

Les grains du riz des variétés Lido et Elio sont désinfectés superficiellement par une solution d'hypochlorite de sodium à 0,6% pendant 10 minutes, puis lavés 6 fois avec de l'eau distillée stérile. Après séchage sur papier filtre stérile, ces grains sont mis à germer dans des boîtes de Pétri préalablement stérilisées et contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile. L'incubation est faite à l'obscurité à 28 °C. Après 5 jours, les plantules issues des grains prégermés sont repiquées dans des pots contenant le sable de la Mamora et la tourbe (v/v) et mises en serre.

Les rhizomes de *Stenotaphrum secundatum*, sont aussi repiqués en pots contenant le même substrat, puis mis en serre. Le dispositif expérimental pour cet essai est un 'Split Plot' avec trois répétitions. Les pieds sont arrosés avec de l'eau de robinet jusqu'au stade requis pour l'inoculation, soit 4 à 5 feuilles.

Préparation de l'inoculum

Les deux isolats d' *Helminthosporium bicolor* R1 et S1, isolés respectivement des feuilles du riz et de *Stenotaphrum*

secundatum, sont repiqués sur milieu à base de farine du riz. Les cultures sont incubées pendant 20 jours à une température de 20 °C, à la lumière continue.

La surface des cultures chargées de spores est raclée stérilement à l'aide d'une spatule métallique stérile, le mycélium est mis en suspension dans l'eau distillée stérile puis agité pendant une minute. La suspension sporale obtenue est filtrée à l'aide d'une mousseline pour éliminer les débris et séparer ainsi les conidies des fragments mycéliens. Cette suspension est ensuite ajustée avec de l'eau distillée stérile contenant 0,05% de Tween 20 et 0,5% de gélatine de façon à avoir une concentration finale de 10⁵ conidies/ml.

Inoculation et notation

L'inoculation est faite par pulvérisation de la surface foliaire des plantules du riz et de *Stenotaphrum secundatum* au stade 4 à 5 feuilles par 60 ml de la suspension conidienne préparée. Les plantes inoculées sont placées pendant 72 heures sous une housse en plastique noire afin de maintenir une humidité relative de 100%. A la fin de cette période, les plantes sont ramenées dans une serre de culture à une température de 18 à 25 °C et une photopériode de 12 h lumière: 12 h obscurité pour le développement des symptômes.

L'indice de sévérité de la maladie est déterminé par le pourcentage de la surface foliaire malade (SFM), estimé par l'échelle de notation de Notteghem et al. (1980).

Sporulation sur hôte

La sporulation sur hôte est évaluée suivant la technique de Hill et Nelson (1983) par l'estimation du nombre moyen de conidies produit par unité de surface des feuilles de l'hôte portant les lésions (nombre de conidies/cm²).

Analyse statistique

Le traitement des données a porté sur l'analyse de la variance et le test PPDS (plus petite différence significative).

RESULTATS

Sur PSA, l'*Helminthosporium bicolor* présente un mycélium peu cotonneux, olivacé gris clair puis gris fuligineux ou noir (Figure

1). Parfois, des touffes de mycélium blanc, noir sont observées sur le milieu de culture, avec des bords olivacés gris lumière, tandis que le revers de la colonie devient progressivement brun noir.

Les conidiophores (300-400 μm de long et 5-10 μm de large) sont brunâtres, cloisonnés, solitaires et géciculés dans la partie supérieure (Figure 2A). Ils présentent des pores associés aux cicatrices qui indiquent le lieu de l'attachement des conidies.

Les conidies de *H. bicolor* sont droites ou légèrement courbées, à aspect brun moyen à brun foncé, avec deux cellules terminales sub-hyalines (Figure 2B). Cet aspect bicolor est un critère qui fait de cette espèce une espèce à part (Mitra, 1930). En stades plus avancés du développement, les cellules centrales prennent une coloration brun foncé qui empêche l'estimation des cloisons, tandis que les cellules de l'extrémité deviennent hyalines. Un assombrissement est observé au niveau des cloisons de l'extrémité supérieure et de la base des conidies. Ces conidies ont une taille plus ou moins petite, de 38,8-66,2 μm de large x 12,8-18,4 μm de longueur, de 5-9 septes, le plus souvent 6 cloisons.

Les symptômes observés sur les feuilles du riz sont représentés par différents types de lésions. Certaines lésions ont un centre blanchâtre avec une bordure rouge. D'autres taches sont brunes à noire, allongées

ou circulaires. L'infection commence à partir de la périphérie et devient considérable vers le centre. Sur *S. secundatum*, les feuilles les plus atteintes se décolorent à plusieurs endroits, alors que sur certains pieds du riz, les feuilles sévèrement touchées finissent par se faner. Les taches sur la tige sont rares et moins prononcées. Les réisolements du champignon à partir des différentes lésions développées sont positifs.

Pour chaque critère de notation, deux résultats lus sur la même colonne diffèrent significativement au seuil de 5%, s'ils ne sont pas affectés de la même lettre.

Les deux isolats testés arrivent à induire des lésions foliaires sur les deux espèces hôtes : *Oryza sativa* et *Stenotaphrum secundatum*. Sur les deux variétés du riz, les indices de sévérité varient entre 43,62 et 52,87 ; sur *Stenotaphrum secundatum*, ils atteignent 65,65 sur les plantes inoculées avec l'isolat R1.

H. bicolor sporule aussi bien sur *S. secundatum* que sur les deux variétés du riz. La sporulation est maximale sur la première espèce ($8,4 \cdot 10^5$ conidies/cm² pour l'isolat R1) et varie entre $3,28 \cdot 10^5$ et $4,32 \cdot 10^5$ conidies /cm² sur les feuilles des deux variétés du riz. L'isolat R1 peut être considéré comme très virulent sur *S. secundatum*, malgré qu'il ait été isolé à partir des lésions foliaires du riz.



Figure 1: Colonie de *H. bicolor* sur PSA.

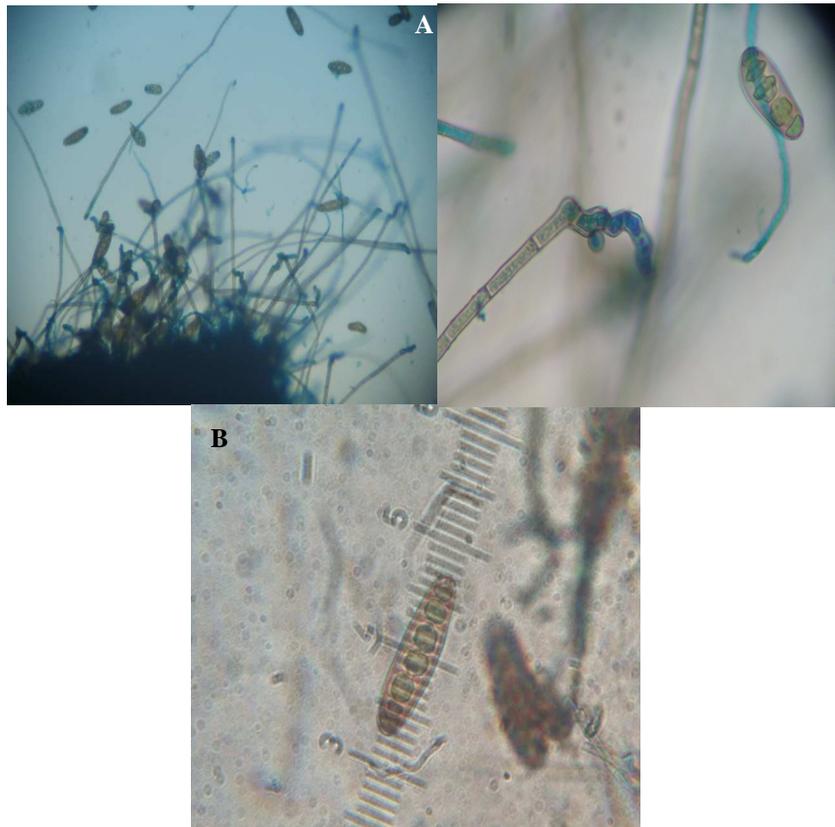


Figure 2: Conidiophore (A) et conidies (B) de *H. bicolor* isolé à partir des plantes du riz et de *Stenotaphrum secundatum*.

Tableau 1: Indice de sévérité de la maladie et sporulation des isolats testés sur *Oryza sativa* et *S. secundatum*.

	Espèce végétale	Isolats	
		R1	S2
Indice de sévérité (%)	Riz 'variété Elio'	49,45 ^a	43,62 ^b
	Riz 'variété Lido'	52,87 ^a	46,87 ^b
	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	65,65 ^a	56,25 ^b
Sporulation (nombre de conidies sur hôte /cm²)	Riz 'variété Elio'	3,94 .10 ^{5a}	3,28.10 ^{5b}
	Riz 'variété Lido'	4,32.10 ^{5a}	3,36.10 ^{5b}
	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	8,40.10 ^{5a}	6,20. 10 ^{5b}

DISCUSSION

Helminthosporium bicolor a été découvert en Poona (Inde) en même temps que la découverte de la carie du blé (Mitra, 1930). L'espèce est signalée parmi la mycoflore des semences du riz (Neninger et

al., 2003) et du blé (Morejón et al., 2006). Mais depuis lors, aucune étude n'a été réalisée pour confirmer ou non les aptitudes pathogènes de ce champignon sur les feuilles du riz. Cependant, nombreux sont les auteurs qui ont étudié la biologie et la systématique de

H. bicolor (Paul et Parbery, 1966 ; Morejón et al., 2006).

Au Brésil, *H. bicolor* est signalé comme un pathogène capable d'induire des lésions foliaires chez *Pennisetum clandestinum* et *P. ciliare* et la vigueur des plantes infectées est très réduite (Muchorel, 1980). Ce champignon est associé également aux taches foliaires de *Bactris gasipaes* (Morejón, 1998).

H. bicolor est considéré comme un champignon véhiculé par les semences de *Capsicum annuum* (Deena et Basuchaudhry, 1984 ; Jamaluddin et al., 2004), il peut induire des lésions sur les feuilles et les fruits de cette espèce (Sapnesh et al., 2012) . En Iran, il est rencontré sur *Pennisetum clandestinum*, *Echinochloa* sp., *Setaria* sp., *Sorghum halepense* et *Cynodon dactylon* (Ahmadpour et al., 2011). Au Nicaragua, *H. Bicolor* est observé sur les feuilles mortes d'un palmier non déterminé (Delgado, 2011)

Les résultats obtenus montrent que les isolats d'*H. bicolor* testés sont capables d'altérer la surface foliaire des plantes du riz et de *Stenotaphrum secundatum* et de sporuler sur les lésions formées. Le nombre de conidies produites par un pathogène sur l'hôte peut renseigner sur sa pathogénicité et permet d'évaluer les effets de certaines composantes de la résistance de l'hôte (Johsen et Taylor, 1976). Ailleurs, Waggoner et Horsfall (1969) et Kranz et al. (1973) considèrent que les valeurs numériques de la sporulation constituent des éléments essentiels pour la simulation des programmes épidémiologiques. Les espèces les plus infectieuses dans le cas d'une épidémie sont celles qui s'attaquent à une plus grande partie du tissu de l'hôte et permettent la multiplication de l'inoculum (Rotem, 1978). Il est à noter également que les *Helminthosporium* peuvent se maintenir en activité sur les feuilles du riz conservées au laboratoire pendant deux ans (Bahous, 2006). En effet, la virulence de ces *Helminthosporium* n'a subi aucune régression au fil du temps lors de leur inoculation artificielle aux feuilles du riz (Bahous et al., 2008).

Conclusion

Helminthosporium bicolor qui n'a jamais été auparavant considéré comme parasite foliaire du riz peut bien s'attaquer aux plantes du riz et causer des dommages sur les feuilles. Les lésions induites par ce pathogène sur le riz sont sporulantes, donc capables de donner un inoculum secondaire qui peut initier la maladie sur d'autres feuilles saines des variétés sensibles du riz. Avec le temps et en absence d'un programme de lutte efficace, l'helminthosporiose, due à *H. bicolor*, deviendra probablement importante et prendra sa place parmi les autres maladies connues sur le riz.

REFERENCES

- Ahmadpour A, Donyadoost-Chelan M, Heidarian Z, Javan Nikkhah M. 2011. New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on Grass species in Iran. *Rostaniha*, **12**(1): 39-49.
- Bouslim F, Ennaffah B, Ouazzani Touhami A, Douira A, El Haloui NE. 1997. Pathogénie comparée de quelques isolats marocains d'*Helminthosporium oryzae* vis-à-vis de certaines variétés du riz (*Oryza sativa*). *Al Awamia*, **98**: 47-56.
- Bahous M, Ouazzani TA, Douira A. 2003. Interaction between *Pyricularia oryzae*, four *Helminthosporium* species and *Curvularia lunata* in rice leaves. *Phytopathol. Mediterr.*, **42**: 133-142.
- Bahous M. 2006. Contribution à l'étude de l'écologie de différents champignons sur les feuilles du riz (*Oryza sativa* L.). Mesures de lutte chimique par l'azoxystrobine. Thèse de Doctorat, Université Ibn Tofail, Fac. des Sciences, Kénitra, Maroc, p. 158.
- Bahous M, Ouazzani TA, Douira A. 2008. Survie de quelques agents pathogènes de riz au laboratoire. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie*, **30**: 13- 18.
- Deena E, Basuchaudhary K.C. 1984. Studies on seed borne mycoflora of Chilli. *Indian Phytopathol.*, **37**: 151-153.
- Delgado G. 2011. *Nicaraguan fungi: a checklist of Hyphomycetes*. *Mycotaxon*, **115**: 534.

- Ellis MB. 1971. *Dematiaceous hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, England; 608.
- Ennaffah B, Ouazzani TA, Douira A. 1999. Pathogenic capacity of *Helminthosporium spiciferum*: foliar parasite of rice in Morocco. *Journal of Phytopathology*, **147**: 377-379.
- Hill JP, Nelson RR. 1983. Genetic control of two parasitic fitness attributes of *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology*, **73**: 455-457.
- Gnancadja-André LS. 2005. Etude de la mycoflore et du développement de la tennissure des grains du riz (*Oryza sativa*) au Maroc. Biologie et pouvoir pathogène de *Helminthosporium bicolor* originaire de *Stenotaphrum secundatum*. Thèse de Doctorat, Université Ibn Tofail, Fac. des Sciences, Kénitra, Maroc, p. 206.
- Hannin S. 2003. Etude de la mycoflore du riz (*Oryza sativa*): Impact et moyens de lutte. Thèse de Doctorat, Univ. Ibn Tofail, Fac. Sciences. Kenitra, Maroc, 108 p.
- Jamaluddin S, Goswami MG, Ojha BM, Bilgrani KS. 2005. *Fungi of India (1989-2001)*. Scientific Publishers: India, Jodhpur; 326 p.
- Johnsen R, Taylor RAJ. 1976. Spore yield of pathogens in investigations of the race-specificity of host resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **14**: 97-119.
- Kernkamp MF, Kroll R, Woodruff WC. 1976. Diseases of cultivated wild rice in Minnesota. *Plant Disease Reporter*, **60**(9): 771-775.
- Kranz J, Mogk M, Stumpf A. 1973. Epivenen simulator für Apfelschorf Z. *Pflanzenkrankh*, **80**: 181-187.
- Mackill DJ, Bonman J. 1992. Inheritance of blast resistance in near isogenic lines of rice. *Phytopathology*, **82**: 746-749.
- Mitra M. 1930. A comparative study of species and strains of *Helminthosporium* on certain Indian cultivated crops. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **15**: 254-293.
- Morejón KR, Kimati H, Fancelli MI. 1998. *Bipolaris bicolor* (Mitra) Shoemaker: Especie asociada a manchas foliares de la palma pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) en Brasil. *Rev. Iberoam Micol.*, **15**: 55-57.
- Morejón KR, Heloisa M, Moraes D, Bach E. 2006. Identification of *Bipolaris bicolor* and *B. soroliniana* on wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **36**: 247-205.
- Muchorel JJ. 1980. Drechslera leaf spots on *Pennisetum clandestinum* and *P. ciliare*. American Phytopathological Society, pp.1035-1036.
- Neninger LH, Hidalgo EI, Barrios LM, Pueyo M. 2003. Hongos presentes en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) en Cuba. *Fitosanidad*, **7**(3): 1-11.
- Notteghem JL, Andriatampo GM, Chatel M, Dechanet R. 1980. Techniques utilisées pour la sélection des variétés de riz possédant la résistance horizontale à la pyriculariose. *Ann. Phytopathol.*, **12**(3): 199-226.
- Ouazzani TA, Ennaffah B, El Yachoui M, Douira A. 2000. Pathogénie comparée de quatre *Helminthosporium sp.* obtenus à partir des plantes malades du riz au Maroc. *J. Phytopathology*, **148**: 221-226.
- Paul AR, Parbey DG. 1966. The perfect state of *Helminthosporium bicolor*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **49**(3): 385-386.
- Rotem J. 1978. Host and environmental influence on sporulation *in vivo*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **16**: 83-101.
- Serghat S, Ouazzani TA, Douira A. 2005. Pathogénie d'*Helminthosporium oryzae* vis-à-vis de quelques graminées cultivées au Maroc. *Cah. Rech. Université Hassan II, série A (Sciences et Techniques)*, **6**: 1-11.
- Sapnesh D, Rakesh S, Kuldeep SJ. 2012. A new disease of Bell Pepper (*Capsicum annum var. grossum*) caused by *Drechsler bicor*, its pathophysiology, efficacy of fungicides and botanicals. *Plant Pathology Journal*, **11**(2): 68-72.
- Waggoner PE, Horsfall JG. 1969. Epidem, a stimulator of plant disease written for a computer. *Connecticut Agr. Bull. Exp. Sta.*, **698**: 80.