

CARACTERISATION D'UNE POPULATION MAROCAINE D'ISOLATS DE *MAGNAPORTHE GRISEA* PAR L'ETUDE DE LEUR NUTRITION AZOTEE

Rachid BenKirane¹, Amina Ouazzani Touhami¹, Said Boukhris², and Allal Douira¹

¹Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc

²Equipe de synthèse organique, organométallique et agrochimie, Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The influence, *in vitro*, of nitrogen sources on growth, mycelium density and sporulation of Moroccan isolates of *M. grisea* population has shown that the nitrogen substances tested have been used to various degrees by this parasite, thus allowing to differentiate between them. Results obtained with two synthetic amino acids 2-(4-methyl phenyl) 2-methoxy β -alanine methyl ester and 2-(4-methyl phenyl) 2-ethoxy β -alanine ethyle ester, show clearly that these products are less used than alanine. All the isolates, however, prefer nitric nitrogen to ammoniacal nitrogen.

KEYWORDS: Magnaporthe grisea (*Pyricularia grisea*), *Oryza sativa*, nitrogen sources.

RÉSUMÉ : L'étude *in vitro* de l'influence de la source d'azote sur la croissance, la densité mycélienne et la sporulation des isolats de la population marocaine de *Magnaporthe grisea* a montré que les substances azotées testées ont été utilisées à des degrés variables par les différents isolats testés, ce qui permet de les différencier. Les résultats obtenus en présence des 2 acides aminés synthétiques 2-(4-méthyl phényl) 2-méthoxy β -alanine méthyle ester et 2-(4-méthyl phényl) 2-éthoxy β -alanine éthyle ester, montrent clairement que ces produits sont moins utilisés que l'alanine. Cependant, tous les isolats étudiés préfèrent l'azote nitrique à l'azote ammoniacal.

MOTS-CLEFS: Magnaporthe grisea (*Pyricularia grisea*), *Oryza sativa*, sources d'azote.

1 INTRODUCTION

Pour caractériser les isolats de *Magnaporthe grisea*, les auteurs ont fait appel à des critères d'ordres morphologique et physiologique, par l'étude de la croissance et de la densité mycélienne des isolats sur différents milieux de culture (Vales *et al.*, 1986), et des critères d'ordre pathologique par confrontation des isolats testés avec une gamme de variétés différentielles de riz (Kiyosawa, 1976; Vales *et al.*, 1986 et Benkirane *et al.*, 1999).

Les isolats de *M. grisea* peuvent aussi se différencier par l'observation des différents niveaux de leurs activités cellulolytiques (Okeké *et al.*, 1992) et par leurs aptitudes à utiliser tel ou tel nutriment ou à ne pas nécessiter tel ou tel vitamine (Otsuka *et al.*, 1965; Vales *et al.*, 1986 et Benkirane *et al.*, 1995).

Les marqueurs iso-enzymatiques ont également été utilisés chez les isolats de *Magnaporthe grisea* pathogènes sur le riz, cependant la diversité pour ces marqueurs s'avère très faible (Leung et Williams, 1986). Par ailleurs, d'autres auteurs (Lebrun *et al.*, 1991 et Dioh *et al.*, 2000) ont utilisé des marqueurs moléculaires de type RFLP (Chevalier-Garcia, 1988; Lebrun *et al.*, 1991 et Dioh *et al.*, 2000), les marqueurs RAPD (Dioh *et al.*, 1995; Jorge, 1996; Sharma *et al.*, 2002 et El Guilli, 2005) et les marqueurs moléculaire SCAR (Dioh *et al.*, 1995; Naqvi et Chatoo, 1996; Soubaber *et al.*, 2000 et El Guilli, 2005). Mais, ces marqueurs nécessitent des manipulations relativement coûteuses (Jorge, 1996).

D'autre part, Benkirane (1995) a montré que trois isolats marocains de *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe grisea*) issus d'une même région où les conditions climatiques et édaphiques sont presque semblables, peuvent se différencier par l'étude de leur croissance et leur sporulation sur différents pH, températures d'incubation et sur différents milieux de cultures complexes et synthétiques. De plus, ces mêmes isolats ont été identifiés par l'étude de leur croissance, densité mycélienne et leur sporulation sur différentes sources d'azote (Benkirane *et al.*, 1995) et sur différentes sources de carbone (Benkirane, 1995 et Douira *et al.*, 1998 ; Benkirane *et al.*, 2012). En effet, l'étude *in vitro* de l'influence de la source de carbone sur la croissance, la densité mycélienne et la sporulation des isolats d'une population marocaine de *Magnaporthe grisea* isolés à partir de plantes de riz (*Oryza sativa* L.) a montré que les substances carbonées testées sont utilisées à des degrés variables par ces isolats, ce qui permet de les différencier. Les monosaccharides avec un seul groupement OH substitué ont permis une croissance mycélienne de tous les isolats testés (Benkirane, 1995). Cependant, les monosaccharides soit avec un seul, cinq ou six groupement(s) OH substitué(s) exercent une inhibition de la densité mycélienne et de la sporulation de tous les isolats de la population de *M. grisea* étudiée

Dans cette étude, nous avons étudié *in vitro* l'influence de la variation de la source d'azote sur la croissance, la densité mycélienne et sur la sporulation d'une population d'isolats marocains de *Magnaporthe grisea* issus de deux localités, le Gharb et Larache. De plus, l'étude du comportement des isolats de la population étudiée peut apporter des indications pour la différenciation entre les isolats testés, et des précisions sur les variations de l'espèce.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 ISOLATS DE MAGNAPORTHE GRISEA

Vingt isolats marocains de *Magnaporthe grisea* sont utilisés pour cette étude (Tableau1).

Tableau 1. Caractéristiques des isolats marocains de *Magnaporthe grisea*.

Isolat	Variété	Lieu d'isolement	Organe
F1-446	446	Gharb	Feuille
412	412	Larache	Feuille
F2-446	Kenz	Gharb	Feuille
FK1	Kenz	Gharb	Feuille
TS1	Taibonet	Gharb	Feuille
41	41	Larache	Feuille
Evcl3	<i>Oryza sativa</i> (?)	Larache	Feuille
TP2-1	Taibonet	Larache	Feuille
TP2-2	Taibonet	Larache	Feuille
EFZ	Elio	Gharb	Feuille
Pt	Triomphe	Gharb	Feuille
E6	<i>Oryza sativa</i> (?)	Larache	Feuille
R1	Rémo	Larache	Feuille
R2	Rémo	Larache	Feuille
RT1	Star	Gharb	Feuille
KX2	<i>Oryza sativa</i> (?)	Larache	Feuille
V2-56	56	Larache	Feuille
KX1	<i>Oryza sativa</i> (?)	Larache	Feuille
V(X)	<i>Oryza sativa</i> (?)	Larache	Feuille
V1-56	56	Larache	Feuille

(?) Non déterminé.

2.2 MILIEUX DE CULTURE

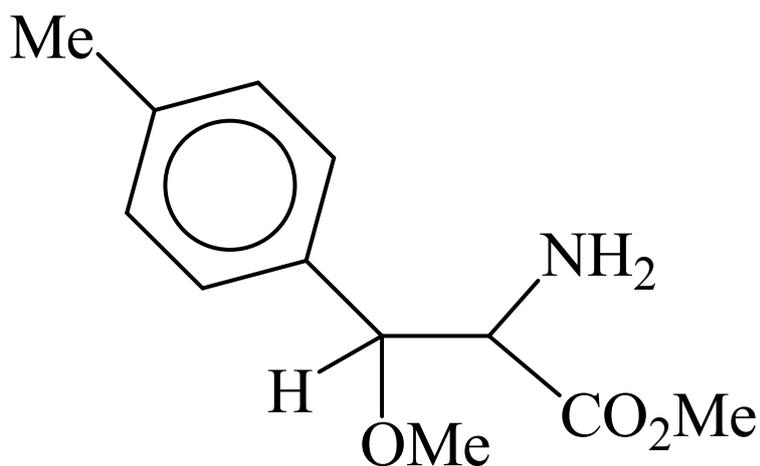
2.2.1 MILIEU DE BASE

Le milieu de base est celui de Tanaka modifié (Otsuka *et al.*, 1965 et Benkirane *et al.*, 1995a) (Glucose: 10 g; KNO₃: 3 g; KH₂PO₄: 1 g; K₂HPO₄: 1 g; MgSO₄ 7H₂O: 0,5 g; CaCl₂ 6H₂O: 0,1 g; FeSO₄ 7H₂O: 0,0075 g; MnSO₄ 7H₂O: 0,002 g; CuSO₄ 7H₂O:

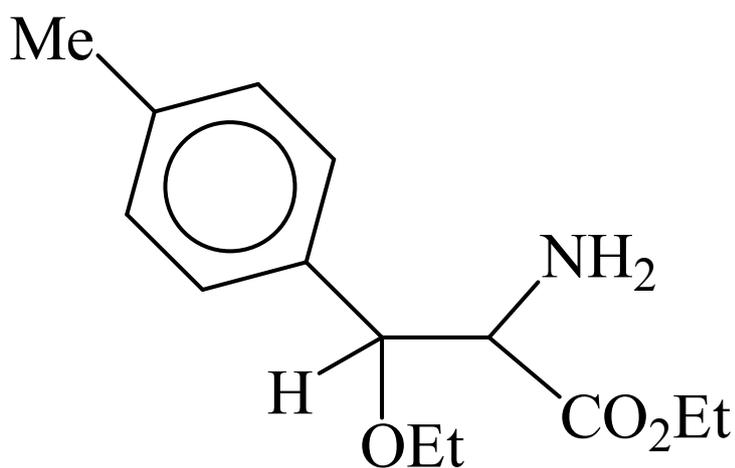
0,006 g; $ZnCl_2$: 0,075 g; H_3BO_3 : 0,009 g; $(NH_4)_2Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$: 0,009 g; Biotine: 5 μ g; Thiamine: 1 mg; Agar agar: 20 g; Eau distillée: 1000 ml).

Au milieu de base (complété avec le glucose à une concentration finale de 1%), la quantité d'équivalent d'azote contenu dans KNO_3 (0,4156 g/l) du milieu de base a été ajoutée sous des formes chimiques diverses (Otsuka *et al.*, 1965; Vales *et al.*, 1986; Okeke *et al.*, 1992 et Benkirane *et al.*, 1995a).

Les sources d'azote utilisées sont constituées d'azotes inorganiques (KNO_3 , $NaNO_3$; $NaNO_2$; NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$; Urée) et d'azotes organiques (Lasp : L Asparagine ; Gly : Glycine ; Met : Methionine ; Cys : Cysteine, Ala : Alanine ; Aa I : 2-(4-méthyl phényl)2-methoxy B-Alanine méthyle ester ; Aa II : (2-(4-méthyl phényl)2-ethoxy B-Alanine éthyle ester (Figure 1); Ade : Adénine.



2-(4-méthyl phényl)-2-méthoxy β -alanine méthyl ester



2-(4-méthyl phényl)-2-éthoxy β -alanine éthyl ester

Figure 1. Structure des acides aminés synthétiques

Le pH des milieux est ajusté à 6,5 avant autoclavage; 1 mg de thiamine, 5 µg de biotine et 500000 UI de pénicilline G sont ajoutés par litre après autoclavage.

Pour chaque milieu et chaque isolat, quatre boîtes de Petri sontensemencées en plaçant en leur centre un explant de 5 mm de diamètre des cultures antérieures sur milieu gélosé à base de farine de riz (farine de riz: 14 g, extrait de levure: 4 g, Aga-agar: 20 g et eau distillée: 1000 ml). Les cultures sont laissées dans une étuve à une température de 28°C.

2.3 LECTURE DES RÉSULTATS

Après quatorze jours d'incubation, la croissance diamétrale des différentes cultures est évaluée par la mesure de la croissance selon deux diamètres perpendiculaires.

La densité apparente du mycélium est notée selon le tableau (tableau 2)

Tableau 2. Echelle de notation de la densité mycélienne sur milieu de culture gélosé.

Note	Densité			
	TPD	PD	D	TD
	0	1	2	3

TPD: très peu dense; PD: peu dense; D: dense et TD: très dense

Pour l'estimation de l'intensité de la sporulation, 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 1ml d'eau stérile. Avant l'opération du comptage, les tubes sont agités au Vortex pendant 20 secondes ce qui permet le détachement des conidies des conidiophores.

Pour chaque essai, le comptage du nombre total de conidies libérées par les quatre rondelles est effectué à l'aide d'un hématimètre du type cellule de Malassez à raison de dix comptages par suspension. Le nombre moyen de spores compté est ensuite exprimé par unité de surface de thalle considéré (nombre moyen de spores par mm²).

2.4 ANALYSE STATISTIQUE

2.4.1 ANALYSE DE LA VARIANCE

Les résultats obtenus de la croissance diamétrale, de la densité mycélienne et de la sporulation des différents isolats de *M. grisea* sur les différents milieux de culture, sont traitées par un logiciel de traitement de données. Une analyse de la variance a été portée sur chaque donnée. Les interactions entre les différents facteurs étudiés ont été également établies. Quand le résultat de l'analyse de la variance enregistre au moins une différence significative au seuil de probabilité de 5%, un test statistique de la comparaison de moyennes (test de Duncan) est appliqué sur ces valeurs.

2.4.2 CLASSIFICATION ASCENDANTE HIÉRARCHIQUE

La méthode d'analyse hiérarchique des groupements par agrégation (cluster analysis), cité par Lebeda et Jendrulek (1987) et Sebei (1995), permet de grouper les différents éléments sur la base de leur ressemblance.

Le principe de la méthode de classification ascendante hiérarchique est le suivant:

- Recherche parmi tous les éléments à classer, des deux éléments les plus proches selon une distance préalablement définie.
- Agrégation en un nœud de ces deux éléments selon un certain critère d'agrégation. C'est le critère d'agrégation qui donne les règles de calcul des distances entre le nouveau nœud et les autres éléments.
- Répétition du processus jusqu'à ce que tous les individus soient au sein du même nœud.

Les différentes étapes de calcul sont résumées sur un diagramme en forme d'arbre binaire qui schématise les agrégations successives.

3 RESULTATS

3.1 ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA SOURCE D'AZOTE

3.1.1 CROISSANCE DIAMÉTRALE

L'analyse de la variance indique que les facteurs isolat et source d'azote, sont des facteurs explicatifs de la croissance des isolats testés et que l'interaction est également significative

La comparaison des moyennes de la croissance diamétrale des isolats sur différentes sources d'azote utilisées est effectuée par le test statistique de Duncan (Tableau 3).

L'assimilation de l'azote sous différentes formes par les différents isolats de *M. grisea* est testée en présence de glucose. Le résultat du tableau 3 montre que les isolats de *M. grisea* utilisent différemment les diverses sources d'azote. Parmi les azotes inorganiques testés, le meilleur résultat est obtenu avec KNO_3 , NaNO_3 , NaNO_2 et l'urée (croissance diamétrale varie de 59,25 à 88,50mm). Le NH_4NO_3 est moins utilisé par les différents isolats de *M. grisea*, le diamètre final des colonies varie de 34,75 à 57,25 mm, alors que le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est beaucoup moins utilisé avec une croissance moyenne qui varie de 24,43 à 38,50 mm de diamètre.

Tableau 3. Effet de la variation de la source d'azote sur la croissance mycélienne (en mm) de 20 isolats de *Magnaporthe grisea*

Isolats	Azote inorganique						Azote organique							
	KNO_3	NaNO_3	NaNO_2	NH_4NO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Urée	L Asp	Gly	Ala	Cys	Met	Ade	Aa I	Aa II
F1-446	74,25 e	79,75 c	75,62 d	42,50 h	33,75 i	60,00 g	81,37 b	81,25 b	84,62 a	22,50 k	79,62 c	25,62 j	73,75 e	72,87 f
412	86,12 b	86,25 b	84,25 c	45,75 h	29,75 i	79,75 e	87,75 a	87,75 a	87,87 a	21,25 k	83,62 d	25,75 j	64,25 f	62,62 g
F2-446	80,87 a	79,62 b	77,68 d	47,00 g	36,43 i	78,87 bc	80,68 a	78,56 c	80,50 a	38,93 h	74,62 f	28,50 j	76,06 e	78,06 cd
FK1	87,25 a	86,12 a	73,75 c	57,25 e	38,00 f	59,25 e	80,25 b	79,87 b	86,75 a	32,12 g	75,75 c	23,37 h	74,87 c	65,75 d
TS1	86,37 b	83,87 c	76,62 d	45,62 g	26,25 i	70,87 f	83,75 c	84,25 c	87,25 a	26,12 i	76,25 d	32,25 h	71,00 f	73,12 e
41	84,37 d	85,12 bc	84,62 cd	34,75 h	29,50 j	82,12 e	85,87 a	85,87 a	85,50 ab	30,75 i	82,37 e	25,37 k	72,62 f	70,00 g
Evcl3	80,62 e	82,25 d	71,87 i	45,62 k	24,75 n	73,75 h	85,37 b	86,62 a	83,62 c	34,62 l	79,62 f	30,87 m	61,12 j	75,37 g
TP2-1	84,87 a	78,62 b	71,75 e	52,62 h	23,62 i	65,62 g	75,62 c	72,62 d	84,62 a	00,00 j	68,62 f	23,00 i	65,62 g	52,62 h
TP2-2	87,12 a	85,75 b	75,18 e	54,56 i	26,68 j	67,56 g	84,62 c	83,93 d	86,68 a	22,62 l	72,56 f	25,56 k	67,81 g	58,56 h
EFZ	87,93 a	87,37 ab	84,62 e	42,62 j	27,62 k	85,62 d	86,50 c	85,75 d	87,25 b	26,75 l	77,75 f	66,37 i	76,37 g	71,87 h
Pt	86,68ab	85,62 cd	85,18 d	43,43 i	24,87 j	85,43 cd	87,12 a	86,12 bc	87,12 a	23,12 k	77,87 e	62,62 h	71,50 f	69,62 g
E6	85,75 b	84,62 c	77,87 e	52,25 i	24,62 j	65,81 g	83,62 d	84,43 c	86,62 a	18,43 k	76,18 f	24,00 j	66,00 g	63,00 h
R1	88,43 a	87,31 b	77,62 c	54,37 g	38,50 h	74,37 d	87,37 b	87,06 b	87,62 b	32,87 i	72,12 e	23,00 j	72,12 e	68,87 f
R2	88,50 a	86,37 c	80,62 d	56,00 i	36,62 j	74,62 f	87,56 b	87,75 b	87,93 ab	34,62 k	75,37 e	25,62 l	73,50 g	68,25 h
RT1	88,18 a	86,50 b	85,00 c	40,68 h	24,43 i	84,93 c	87,00 b	86,37 b	86,56 b	23,81 i	77,93 d	64,50 g	75,68 e	72,12 f
KX2	87,62 a	86,18 b	84,06 d	37,56 i	27,62 j	85,93 b	86,18 b	85,37 c	83,68 d	22,50 k	69,18 g	74,18 f	63,93 h	75,75 e
V2-56	88,50 a	86,81 b	84,62 cd	52,62 i	35,25 j	85,18 c	86,43 b	84,06 d	86,75 b	32,93 k	73,81 f	58,68 h	69,93 g	80,25 e
KX1	87,37 a	85,81 c	84,31 e	48,56 j	26,06 l	85,06 d	86,06 bc	84,31 e	86,50 b	43,75 k	77,68 f	59,87 i	71,18 h	74,06 g
V(X)	87,75 a	86,31 b	78,68 d	46,06 i	25,62 l	75,00 f	86,62 b	84,81 c	86,81 b	26,50 k	77,50 e	34,93 j	60,43 h	73,93 g
V1-56	87,12 a	86,62 a	85,62 b	57,00 g	31,93 i	86,75 a	86,75 a	84,87 c	87,12 a	22,62 j	77,50 e	46,62 h	68,50 f	79,25 d

Sur la même ligne, deux résultats diffèrent significativement au seuil de probabilité de 5% (test de Duncan) s'ils ne sont affectés d'aucune lettre en commun.

L Asp: L Asparagine

Ala: Alanine

Gly: Glycine

Aa I: 2-(4 -méthyl phenyl) 2- méthoxy β - Alanine méthyle ester

Met: Methionine

Aa II: 2-(4 -méthyl phenyl) 2- éthoxy β - Alanine éthyle ester

Cys: Cysteine

Ade: Adénine

Les acides aminés, L asparagine, la glycine et l'alanine permettent également la meilleure croissance de tous les isolats testés de *M. grisea* (croissance diamétrale varie entre 72,62 et 87,93 mm). La méthionine est utilisée mais à moindre degré et ceci pour tous les isolats testés (croissance diamétrale varie entre 68,62 et 83,62 mm). Les résultats sur cystéine ne sont pas satisfaisants. En effet, la croissance moyenne de tous les isolats est très faible et même nulle pour l'isolat TP2-1.

Les isolats EFZ, Pt, RT1 et KX2 ont une préférence pour l'adénine (la croissance diamétrale est de 62,62mm à 74,18mm), et a moindre degré pour les autres isolats de *M. grisea* testés (le diamètre des colonies varie de 23,00 mm à 59,87mm).

Les résultats sur les acides aminés synthétiques 2-(4-méthyl phenyl) 2-méthoxy β-alanine méthyle ester et 2-(4-méthyl phenyl) 2-éthoxy β-alanine éthyle ester (planche 1), montrent clairement que la croissance diamétrale de tous les isolats testés est nettement inférieure devant celle obtenue en présence de l'alanine. En effet, la croissance moyenne varie entre 60,43mm et 80,25mm de diamètre (planche 2).

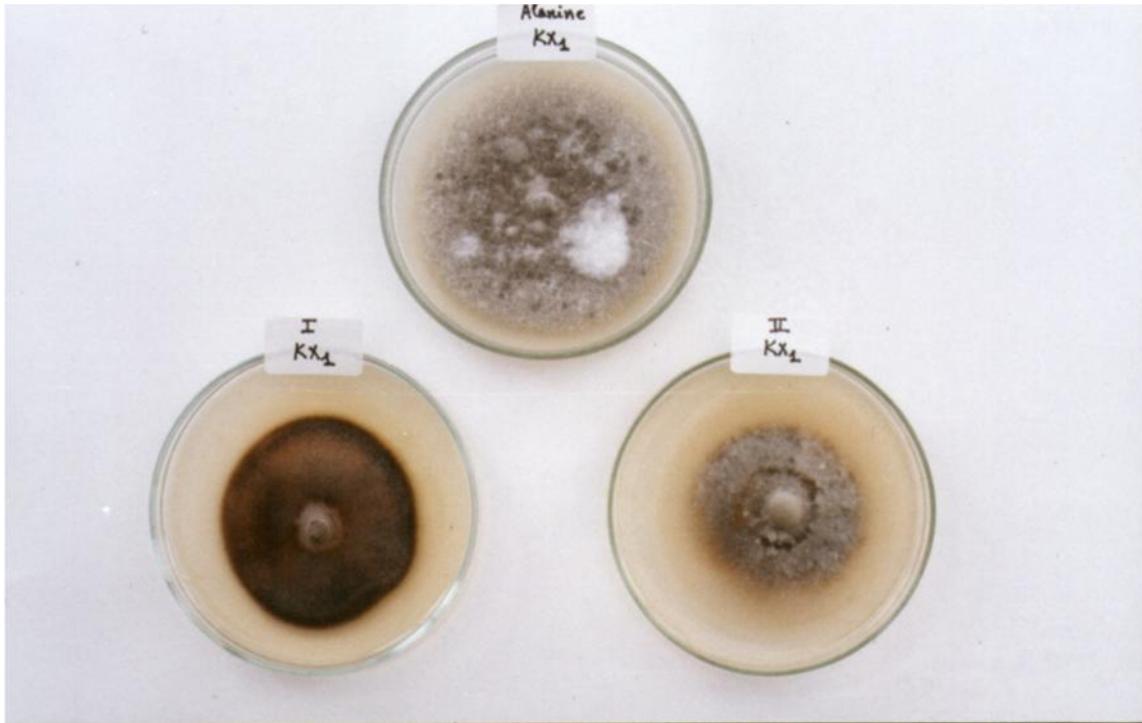


Planche 2. Croissance de l'isolat KX1 sur milieu Tanaka modifié, en présence de l'Alanine et de 2 acides aminés synthétiques testés.

L'analyse du dendrogramme de la figure 2 a permis de grouper les 20 isolats de *M. grisea* testés en 3 groupes si on prend une distance égale à 100. En effet, un premier groupe est formé de 5 isolats (F1-446, FK1, TP2-2, E6 et TP2-1), un deuxième groupe avec 8 isolats (412, 41, TS1,V(X), Evcl3, F2-446, R1 et R2) alors que les isolats qui restent constituent le 3^{ème} groupe.

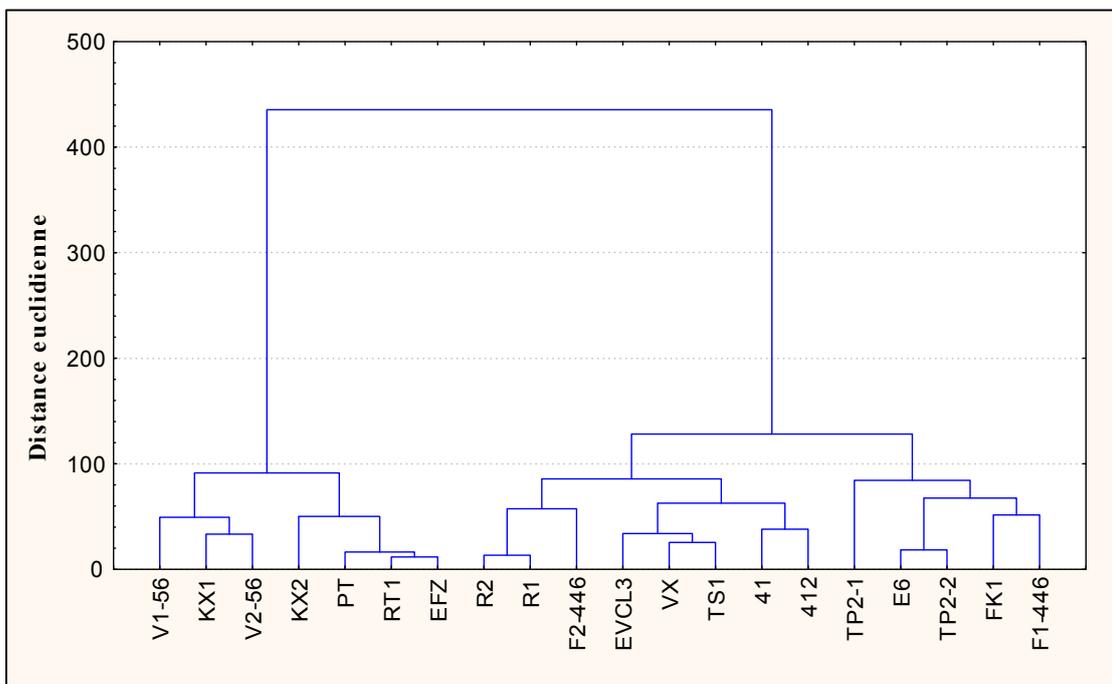


Figure 2. Groupement de 20 isolats marocains de *M. grisea* en fonction de leur croissance mycélienne sur différentes sources d'azote.

3.1.2 DENSITÉ MYCÉLIENNE

Les résultats de l'analyse de la variance indiquent que les deux facteurs statistiques étudiés sont significatifs et que l'interaction est également significative

Le classement de la densité mycélienne des isolats de *M. grisea* testés sur différentes sources d'azote montre que KNO₃, NaNO₃, l'urée, l'asparagine, la glycine et l'alanine favorisent le développement du mycélium (note varie entre 2 et 3) à l'exception de l'isolat E6 (note =1) et de l'isolat Evcl3 sur urée (note =1) (tableau 4). Les résultats obtenus en présence de NaNO₂, NH₄NO₃, la cystéine, l'adénine, 2-(4-méthyl phenyl) 2-méthoxy β-alanine méthyle ester et 2-(4-méthyl phenyl) 2-éthoxy β-alanine éthyle ester indiquent que ces produits ont été utilisés par les différents isolats testés, avec un degré très variable (note variant de 0 à 3).

Tableau 4. Effet de la variation de la source d'azote sur la densité mycélienne de 20 isolats de *M. grisea*

Isolats	Azote inorganique						Azote organique							
	KNO ₃	NaNO ₃	NaNO ₂	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	Urée	L Asp	Gly	Ala	Cys	Met	Ade	AaI	AaII
F1-446	3 a	3 a	3 a	2 b	0 c	2 b	3 a	3 a	3 a	0 c	0 c	2 b	0 c	2 b
412	2 b	3 a	3 a	3 a	1 c	3 a	3 a	3 a	3 a	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
F2-446	3 a	3 a	3 a	2 b	1 c	3 a	3 a	3 a	3 a	0 d	0 d	2 b	1 c	2 b
FK1	3 a	3 a	2 b	2 b	1 c	3 a	3 a	3 a	3 a	1 c	0 d	3 a	2 b	2 b
TS1	2 b	2 b	1 c	2 b	2 b	2 b	2 b	2 b	3 a	2 b	0 d	0 d	1 c	2 b
41	3 a	3 a	2 b	0 d	0 d	3 a	3 a	3 a	3 a	1 c	0 d	2 b	2 b	2 b
Evcl3	3 a	3 a	3 a	2 b	2 b	1 c	3 a	3 a	2 b	2 b	0 d	2 b	0 d	2 b
TP2-1	3 a	3 a	3 a	3 a	2 b	3 a	3 a	3 a	3 a	0 d	1 c	1 c	3 a	3 a
TP2-2	3 a	3 a	3 a	3 a	1 b	3 a	3 a	3 a	3 a	0 c	0 c	1 b	3 a	3 a
EFZ	3 a	3 a	3 a	2 b	1 c	3 a	3 a	3 a	3 a	2 b	0 d	2 b	2 b	2 b
Pt	3 a	3 a	3 a	2 b	2 b	3 a	3 a	3 a	3 a	2 b	0 d	1 c	1 c	2 b
E6	1 a	1 a	0 b	1 a	1 a	1 a	1 a	1 a	1 a	1 a	0 b	1 a	1 a	0 b
R1	3 a	3 a	2 b	3 a	1 c	3 a	3 a	3 a	3 a	1 c	0 d	0 d	0 d	2 b
R2	3 a	3 a	2 b	3 a	1 c	3 a	3 a	3 a	3 a	1 c	1 c	0 d	1 c	2 b
RT1	3 a	3 a	1 c	2 b	2 b	3 a	3 a	3 a	3 a	3 a	0 d	2 b	1 c	2 b
KX2	3 a	3 a	3 a	2 b	1 c	3 a	3 a	2 b	3 a	2 b	0 d	2 b	0 d	1 c
V2-56	3 a	3 a	3 a	2 b	1 c	3 a	3 a	3 a	2 b	3 a	0 d	3 a	2 b	2 b
KX1	3 a	3 a	1 c	2 b	1 c	2 b	3 a	3 a	3 a	0 d	0 d	2 b	0 d	0 d
V(X)	3 a	3 a	2 b	2 b	2 b	3 a	3 a	3 a	3 a	2 b	0 d	1 c	1 c	2 b
V1-56	3 a	3 a	3 a	2 b	1 c	3 a	3 a	3 a	3 a	2 b	1 c	1 c	2 b	3 a

Sur la même ligne, deux résultats diffèrent significativement au seuil de probabilité de 5% (test de **Duncan**) s'ils ne sont affectés d'aucune lettre en commun.

L Asp: L Asparagine

Ala: Alanine

Gly: Glycine

Aa I: 2-(4 -méthyl phenyl) 2- méthoxy β- Alanine méthyle ester

Met: Methionine

Aa II: 2-(4 -méthyl phenyl) 2- éthoxy β- Alanine éthyle ester

Cys: Cysteine

Ade: Adénine

Sur (NH₄)₂SO₄, l'importance du mycélium est variable selon les isolats de *M. grisea* testés (note varie entre 0 et 2).

La méthionine reste en générale l'acide aminé le moins favorable pour le développement du mycélium aérien pour tous les isolats testés (note varie de 0 à 1).

L'observation du dendrogramme de la figure 3 permet de distinguer plusieurs groupes. A une distance égale à 7, les isolats sont groupés en 10 groupes. Un 1^{er} groupe contenant les isolats F1-446 et F2-446; un 2^{ème} formé des isolats 412 et

KX1; un 3^{ème} groupe contenant l'isolat TS1; un 4^{ème} groupe renfermant les isolats Evcl3 et KX2; le cinquième groupe constitué des isolats Evcl3 et KX2, alors que le 6^{ème}, 7^{ème}, 8^{ème}, 9^{ème} et le 10^{ème} groupe sont formés respectivement de 3 (Pt, V(X) et RT1), 1 (E6), 2 (FK1 et 41), 3 (EFZ, V2-56 et V1-56) et 2 isolats (TP2-1et TP2-2).

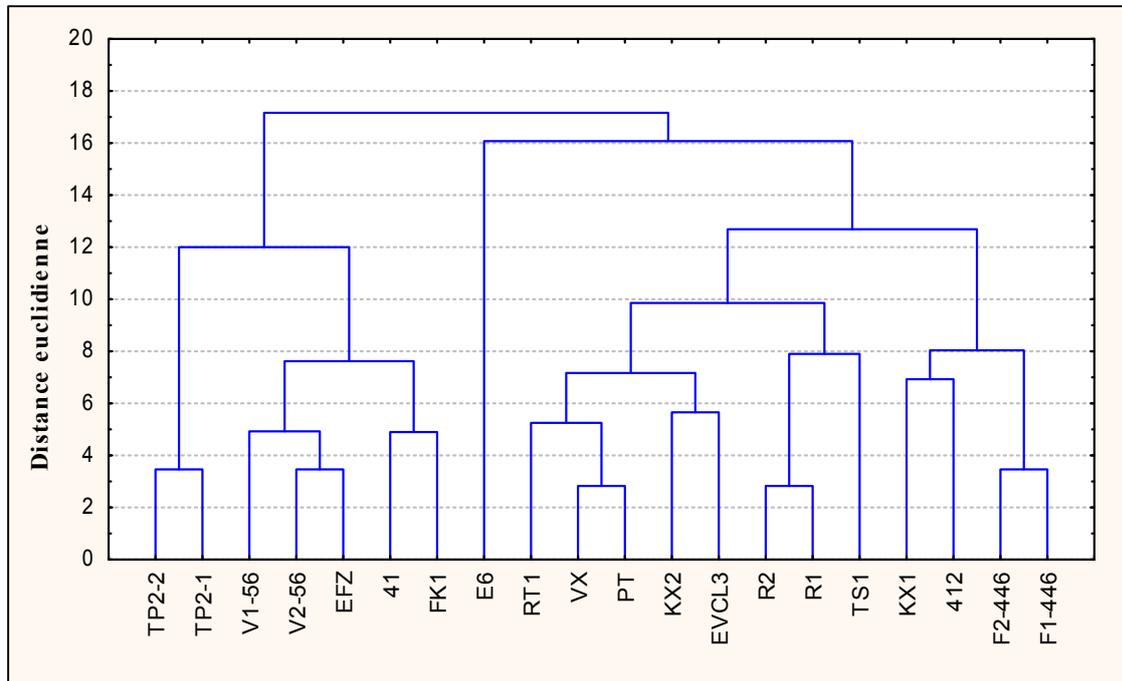


Figure 3. Groupement de 20 isolats marocains de *M. grisea* en fonction de leur densité mycélienne sur différentes sources d'azote.

3.1.3 SPORULATION

Comme pour la croissance et la densité mycélienne, l'analyse de la variance de l'influence de la source d'azote sur la sporulation des différents isolats de *M. grisea* testés indique que les deux facteurs étudiés ainsi que l'interaction sont significatives.

Le classement de la sporulation des isolats étudiés sur différentes sources d'azote est effectué selon le test statistique de Duncan (tableau 5).

Les milieux incorporés d'azote sous forme de KNO_3 , NaNO_3 , l'asparagine, la glycine et l'alanine semblent avoir un effet stimulant de la sporulation des 20 isolats de *M. grisea* testés. Le nombre moyen de spores produites par unité de surface varie de 1613,59 spores par mm^2 à 25690,00 spores par mm^2 .

Tableau 5. Effet de la variation de la source d'azote sur la sporulation (nombre moyen de spores/mm²) de 20 isolats de *Magnaporthe grisea*

Isolats	Azotes inorganiques						Azotes organiques							
	KNO ₃	NaNO ₃	NaNO ₂	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	Urée	L Asp	Gly	Ala	Cys	Met	Ade	Aal	Aall
F1-446	5690,02 b	5010,62 c	1868,37 f	1188,96 g	00,00 h	2377,92 e	5774,95 b	4246,28 d	10360,90 a	00,00 h	00,00 h	1953,29 f	00,00 h	00,00 h
412	2929,94 ab	2505,30 abc	934,20 e	594,50 ef	00,00 f	1613,60 d	2377,90 bc	2080,70 cd	3014,90 a	424,60 ef	467,10 ef	934,20 e	00,00 f	00,00 f
F2-446	7133,76 b	6539,28 c	2972,40 f	1443,74 h	00,00 k	2590,23 g	6072,19 d	5010,62 e	11040,30 a	169,85 j	00,00 k	721,87 i	00,00 k	00,00 k
FK1	3057,32 d	2632,70 e	1316,35 i	1783,44 g	00,00 k	1571,13 h	3481,95 c	3694,27 b	10658,10 a	00,00 k	00,00 k	1019,11 j	2123,14 f	00,00 k
TS1	16050,90 a	13036,10 b	6581,74 f	6284,50 g	00,00 j	4925,69 h	12144,30 d	11549,89 e	12653,90 c	552,02 i	00,00 j	00,00 j	00,00 j	00,00 j
41	5859,87 b	5690,02 c	679,41 g	00,00 h	00,00 h	1613,59 f	4670,91 d	4585,99 e	9639,07 a	00,00 h				
Evcl3	3991,51 d	3906,58 d	2845,01 f	934,18 h	424,63 i	3269,64 e	4798,30 b	4585,99 c	9002,12 a	00,00 j	00,00 j	1231,42 g	00,00 j	00,00 j
TP2-1	9936,31 a	7813,20 c	3906,60 f	1825,90 h	00,00 k	3142,30 g	7133,80 d	6709,10 e	8959,70 b	00,00 k	679,41 i	212,31 j	00,00 k	00,00 k
TP2-2	10063,70 a	9469,21 b	4458,60 e	2123,14 g	00,00 i	3736,73 f	7473,46 c	7261,15 d	9511,68 b	00,00 i	00,00 i	382,17 h	00,00 i	00,00 i
EFZ	3354,56 b	2972,40 d	2377,92 f	00,00 h	00,00 h	2420,38 f	3269,64 c	2632,70 e	4033,97 a	00,00 h	00,00 h	1613,59 g	00,00 h	00,00 h
Pt	2547,77 c	2590,23 c	1528,66 f	00,00 h	00,00 h	2420,38 d	6581,74 b	1613,59 e	7983,01 a	00,00 h	00,00 h	1231,42 g	00,00 h	00,00 h
E6	2420,38 d	2250,53 f	764,33 i	1273,89 h	127,39 j	1358,81 g	3397,03 b	3014,86 c	4968,15 a	00,00 k	00,00 k	2335,46 e	00,00 k	00,00 k
R1	2547,77 c	2420,38 d	1995,75 e	382,17 h	00,00 j	1188,96 f	2632,70 b	2377,92 d	6454,35 a	297,24 i	00,00 j	1953,29 e	00,00 j	509,55 g
R2	2929,94 e	2845,01 e	2165,61 g	2335,46 f	00,00 i	4033,97 d	8322,72 b	7940,55 c	11252,60 a	509,55 h	00,00 i	2080,68 g	00,00 i	467,09 h
RT1	3439,49 c	2377,33 e	382,16 h	00,00 i	00,00 i	1740,82 f	6326,67 a	2504,67 d	3778,67 b	00,00 i	00,00 i	721,87 g	00,00 i	00,00 i
KX2	7643,31 b	7303,61 c	2250,53 f	00,00 i	00,00 i	7558,39 b	7940,55 a	2377,92 e	5562,63 d	00,00 i	00,00 i	382,17 h	00,00 i	1825,90 g
V2-56	2377,92 e	2165,61 f	1953,29 g	00,00 k	00,00 k	2462,85 e	16305,70 b	8450,11 c	17749,40 a	169,85 j	00,00 k	339,70 i	594,48 h	2887,47 d
KX1	10191,10 c	9808,90 cd	8365,20 e	3524,40 g	00,00 i	9129,50 de	11762,20 b	9639,10 cd	25690,00 a	382,20 i	00,00 i	4670,90 f	339,70 i	2123,10 h
V(X)	16050,90 b	13418,20 c	7176,22 f	6072,19 g	00,00 i	5435,24 h	11719,70 d	11337,50 e	16220,80 a	00,00 i				
V1-56	7898,10 b	7558,39 d	4543,52 f	2760,08 h	00,00 j	4755,84 e	7770,70 c	7515,92 d	9171,97 a	00,00 j	00,00 j	3524,42 g	00,00 j	1953,29 i

Sur la même ligne, deux résultats diffèrent significativement au seuil de probabilité de 5% (test de Duncan) s'ils ne sont affectés d'aucune lettre en commun.

L Asp: L Asparagine

Ala: Alanine

Gly: Glycine

Aa I: 2-(4 -méthyl phenyl) 2- méthoxy β- Alanine méthyle ester

Met: Methionine

Aa II: 2-(4 -méthyl phenyl) 2- éthoxy β- Alanine éthyle ester

Cys: Cysteine

Ade: Adénine

Le NaNO₂ et l'urée ont permis la sporulation de tous les isolats testés mais avec une intensité moins importante que celle obtenue sur milieu incorporé de KNO₃, NaNO₃, l'asparagine, la glycine et l'alanine. De même pour l'adénine et NH₄NO₃, mais avec une intensité encore plus faible et même nulle pour les isolats TS1, V(X) et 41 sur adénine et les isolats 41, EFZ, Pt, RT1, KX2 et V2-56 sur NH₄NO₃.

Le (NH₄)₂SO₄, cystéine et méthionine semblent être des inhibiteurs de la sporulation des isolats de *M. grisea* testés à l'exception des isolats (Evcl3 et E6), (412, F2-446, TS1, R1, R2, V2-56, et KX1) et (412 et TP2-1) qui ont montré une sporulation très faible respectivement sur (NH₄)₂SO₄, cystéine et méthionine. En effet, le nombre moyen de spores produites par unité de surface varie de 127,39 à 679,41 spores par mm².

Sur les deux acides aminés synthétiques étudiés, le nombre moyen de conidies produites par unité de surface est nulle à l'exception des isolats FK1, V2-56 et KX1 sur 2-(4-méthyl phenyl) 2-méthoxy β-alanine méthyle ester et des isolats R1, R2, KX2, V2-56, KX1 et V1-56 sur 2-(4-méthyl phenyl) 2-éthoxy β- alanine éthyle ester.

Le groupement des 20 isolats de *M. grisea*, en fonction de leur sporulation sur différentes sources d'azote testés, par la méthode de la classification ascendante hiérarchique permet de distinguer, à une distance de 4.10⁴, quatre groupes: un premier groupe formé de 10 isolats: F1-446, F2-446, 41, FK1, Evcl3, R2, TP2-1, TP2-2, V1-56 et KX2; un deuxième groupe avec 6 isolats: 412, EFZ, E6, R1, Pt et RT1; un troisième groupe constitué de 2 isolats: TS1 et V(X) et un quatrième groupe formé de 2 isolats: V2-56 et KX1 (figure 4).

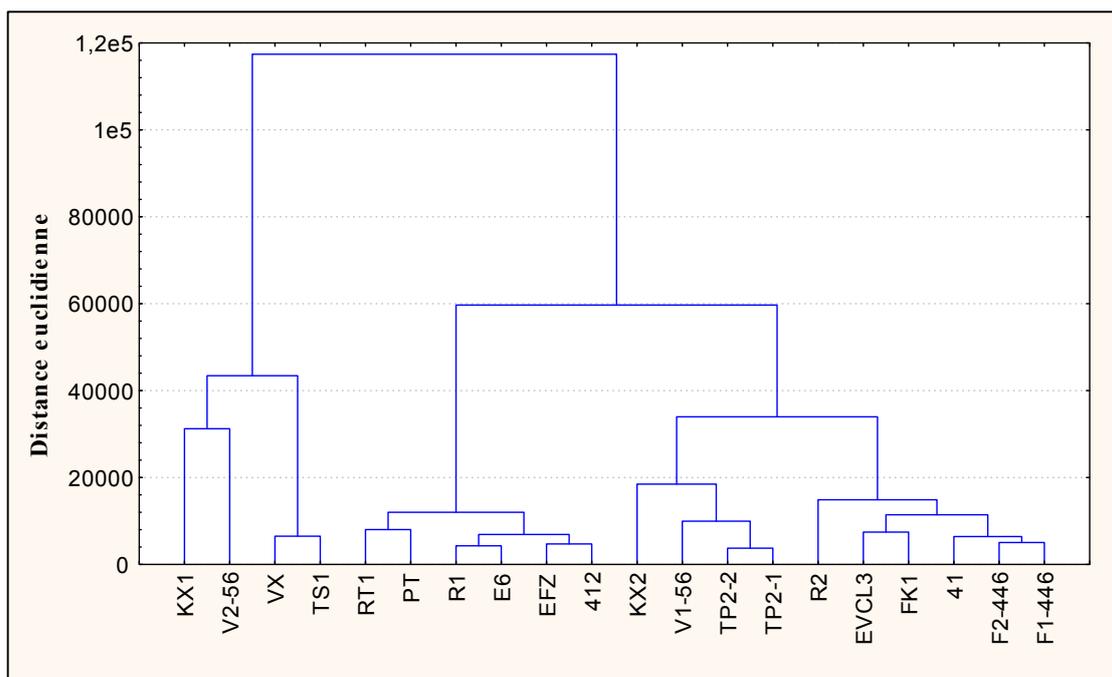


Figure 4. Groupement de 20 isolats marocains de *M. grisea* en fonction de leur sporulation sur différentes sources d'azote.

4 DISCUSSION ET CONCLUSION

Parmi les sources d'azote testées en présence de glucose 1%, le nitrate de potassium, le nitrate de sodium, la glycine, l'asparagine, l'alanine et l'urée sont les plus appréciés par les différents isolats de *M. grisea* étudiés. Otani (1953) et Otsuka *et al.* (1957 a, b et c) ont montré que ces composés sont convenables pour la croissance d'un grand nombre d'isolats testés de ce champignon. De même, Benkirane *et al.* (1995) ont montré que ces produits sont favorables pour la croissance, la densité mycélienne et la sporulation de tous les isolats de *M. grisea* testés.

L'asparagine est un isomère de l'amide monoamino-dicarboxylique et est considéré par les auteurs comme la source d'azote universelle pour les champignons, et ceci quelque soit la source considérée. Son catabolisme commence par une désamination par l'intermédiaire d'une amidase (=asparaginase) donnant du L-aspartate. Son bon comportement est dû à l'utilisation directe de L-aspartate par voie d'acides aminés avec très peu de libération d'ammonium (Moore-Landecker, 1982). De même, L'asparagine est la meilleure source d'azote pour la croissance d'autres agents phytopathogènes (Sharma *et al.*, 1984 et Muhammad *et al.*, 1991).

Streiberg (1942), en étudiant le processus de la formation des acides aminés chez *Aspergillus niger*, a signalé que l'acide aspartique et la glycine étaient parmi les acides aminés les mieux utilisés. Il attribue cela au fait que ces aminoacides primaires sont les premiers synthétisés par le champignon.

Par contre, la cystéine n'est pas convenable pour le développement des différents isolats de *M. grisea*. Même si la méthionine a permis la croissance mycélienne de tous les isolats testés, elle reste non favorable pour leur sporulation et leur densité mycélienne. Ce résultat est identique avec celui obtenu par Otsuka *et al.* (1965) et Benkirane *et al.* (1995). De même, l'adénine ne constitue pas une bonne source d'azote pour certains isolats de *M. grisea* ; par contre, cet acide nucléique (base purique) est bien apprécié par d'autres. Ce résultat est identique avec celui obtenu par Benkirane *et al.* (1995).

Le 2-(4-méthyl phenyl) 2-méthoxy β -alanine méthyle ester et 2-(4-méthyl phenyl) 2-éthoxy β -alanine éthyle ester ont permis une croissance mycélienne de tous les isolats testés mais avec des valeurs nettement inférieures à celles obtenues en présence de l'acide aminé simple l'alanine. Cependant, ces deux acides aminés synthétiques semblent être des inhibiteurs de la densité mycélienne et de la sporulation de certains isolats mais favorisent le développement d'autres.

L'urée a été bien utilisée par les isolats de *M. grisea* à cause peut être de son assimilation rapide par le champignon (Benkirane *et al.*, 1995).

Le nitrate de potassium et de sodium sont très bien utilisés par les isolats de *M. grisea* testés, mais ce n'est pas le cas pour le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cette observation est en conformité avec les travaux de Tanaka (1965) et d'Okeke *et*

al. (1992) qui ont noté que le nitrate est la source d'azote préférable pour la croissance de ce champignon. De leurs côtés plusieurs auteurs ont rapporté que *M. grisea* préfère l'azote nitrique à l'azote ammoniacal (Tanaka *et al.*, 1952 et 1953; Okeke, 1993 et Benkirane *et al.*, 1995). Les auteurs attribuent ce fait aux modifications de pH.

Dans nos essais, nous pourrions mettre en cause les ions K^+ et SO_4^{--} dans la modification du pH. Ainsi, dans le $(NH_4)_2SO_4$ provenant d'un acide fort, l'ion SO_4^{--} a tendance à faire baisser le pH lorsque les cations NH_4^+ sont consommés. Dans le cas de KNO_3 (base forte), on assiste à une augmentation de pH due aux cations K^+ , au fur et à mesure que les ions NO_3^- disparaissent. Dans son étude sur la nutrition azotée chez *Ascochyta pisi*, Brewer (1960) a déterminé les variations du pH en milieu liquide (des milieux à base de plusieurs composés azotés) et arrive aux conclusions suivantes: dans le cas de KNO_3 et $NaNO_3$, le pH augmente rapidement et il est alcalin à 14 jours mais la croissance reste convenable. En milieu solide, des gradients de pH se produisent, qui font que le pH dans les zones anciennes et nouvelles de la culture est très différent. Ainsi, localement, le milieu peut atteindre un pH défavorable pour une croissance abondante mais permet encore la croissance linéaire.

En présence de NH_4NO_3 , la croissance et la sporulation des isolats testés sont beaucoup moins marquées. Ce résultat peut être expliqué par la chute du pH du milieu. En effet, NH_4^+ est le premier cation absorbé alors que l'anion NO_3^- est assimilé après l'épuisement complet de NH_4^+ du milieu de culture (Okeke, 1993). L'utilisation de l'ion ammonium provoque une diminution du pH du milieu de culture. Cette utilisation préférentielle est probablement le résultat d'une répression, par lequel le produit final réprime l'activité d'une ou de plusieurs enzymes (Moore-Landecker, 1982).

Tous les isolats de *M. grisea* testés ont montré une croissance et une densité mycélienne notable en présence de $NaNO_2$ à l'exception des isolats TS1, E6, RT1 et KX1 pour leur densité mycélienne. Ce résultat est en accord avec les travaux de Benkirane *et al.* (1995a). Cependant, il est contradictoire avec celui obtenu par Otani (1952) et Vales *et al.* (1986). Ces auteurs ont noté que le $NaNO_2$ inhibe la croissance de *M. grisea* et semble avoir un effet toxique sur ce champignon. Pour d'autres auteurs (Otsuka *et al.*, 1965), le $NaNO_2$ est utilisé différemment par les isolats de *M. grisea*.

L'analyse de groupes, par la méthode de la classification ascendante hiérarchique, a permis le groupement des isolats en groupes qui varient non seulement en fonction de leur croissance et densité mycélienne mais aussi en fonction de leur sporulation sur différentes sources de carbone ou d'azote.

De plus, le nombre de groupe ainsi que le nombre d'isolats qui constituent un groupe sont variables selon la nutrition carbonée ou azotée considérée et ceci pour leur croissance, densité mycélienne ainsi que leur sporulation. Par ailleurs, quelques isolats originaires des deux régions éloignées le Gharb et Larache peuvent être groupés en un seul groupe.

L'utilisation des critères d'ordre physiologiques tels que les exigences nutritives pour la croissance, la densité mycélienne et la sporulation, ont conduit au regroupement de certains isolats de *M. grisea* en des types ayant la même affinité. Ceux-ci correspondent peut-être à des formes systématiques diverses, mal définies si l'on se réfère aux seules descriptions usuelles, mais à propos desquelles des études comparatives fondées sur des cultures sur différentes sources de carbone (Benkirane *et al.*, 2012) et d'azote, apportent des précisions qui permettent de séparer les isolats marocains de *M. grisea* entre eux. Cependant, l'identification des pathotypes de la population marocaine de *M. grisea* nécessite la confrontation des isolats avec une gamme de variétés différentielles de riz. Par ailleurs, Benkirane *et al.* (1999) ont rapporté que les résultats de l'analyse du dendrogramme de la virulence des isolats de la même population marocaine de *M. grisea* vis-à-vis de quinze variétés différentielles du riz permet de séparer les isolats R2, TP2.2, Pt, V1-56, KX1, V2-56, R1 et KX2 entre eux et avec les autres isolats. Chacun de ces isolats pourrait constituer un pathotype différent.

REFERENCES

- [1] Benkirane R. 1995. Contribution à l'étude des maladies du riz au Maroc. Cas de la pyriculariose due à *Pyricularia oryzae*. Thèse de 3^{ème} cycle. Université Ibn Tofail. Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc, 145.
- [2] Benkirane, R., El Oirdi, M., Bouslim, F., Ouazzani Touhami, A., Zidane, L., Douira, A., Karmoussi, M., EL HASSANI, N. & EL HALOUI, N. 1995. La nutrition azotée, une méthode d'identification des isolats Marocains de *Pyricularia oryzae*. *Rev. Rés. Amélior. Prod. Agr. Milieu Aride*, **7**: 117-129.
- [3] BENKIRANE, R., DOUIRA, A., SELMAOUI, K. & LEBBAR, S. 1999. Identification of pathotypes in a Moroccan population of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopath. medit.*, **38**: 126-131.

- [4] BENKIRANE, R., DOUIRA, A., SELMAOUI, K. & LEBBAR, S. 2000. Pathogénie comparée et signe sexuel des isolats marocains de *Pyricularia grisea* (*Magnaporthe grisea*) originaires de riz et de *Stenotaphrum secundatum*. *J. Phytopathology*, **148**: 95-99.
- [5] BENKIRANE R., OUAZZANI TOUHAMI A. & DOUIRA A., 2012. Caractérisation d'une population marocaine d'isolats de *Magnaporthe grisea* par l'étude de leur nutrition carbonée. *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, **3**: 55-69
- [6] BREWER, D. 1960. Studies in *Ascochyta pisi*. *Can. J. Bot.*, **38**: 705-717.
- [7] DOUIRA, A., BENKIRANE, R., LAKHRISSI, B., OUAZZANI TOUHAMI, A., LEBBAR, S., EL HALOUI, N.E. & MASSOUI, M. 1998. Identification des isolats marocains de *Pyricularia oryzae*. *Actes Inst. Vet. (Maroc)*, **18** (1): 37-42.
- [8] DIOH, W., THARREAU, D., NOTTEGHEM, J.L., ORBACH, M., IWANO, M., LEE, J.L., LEE, C.Y. & KONG, P. 1990. Distribution of pathogenic races and changes in virulence of rice Blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav., in Yunnan province, China. *JARQ*, **23**: 241-248.
- [9] DIOH, W., THARREAU, D., GOMEZ, R., ROUMEN, E., ORBACH, M., NOTTEGHEM, J.L. & LEBRUN, M.H., 1995. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Using RFLP and RAPD markers. In rice genetics, 3. IRRI.
- [10] DIOH, W., THARREAU, D., NOTTEGHEM, J.L., ORBACH, M. & LEBRUN, M.H., 2000. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. *Mol Plant Microbe Interact*, **13** (2): 217-227.
- [11] DOUIRA, A., BENKIRANE, R., LAKHRISSI, B., OUAZZANI TOUHAMI, A., LEBBAR, S., EL HALOUI, N.E. & MASSOUI, M., 1998. Identification des isolats marocains de *Pyricularia oryzae*. *Actes Inst. Vet. (Maroc)*, **18** (1): 37-42.
- [12] EL GUILLI, M., 2005. Caractérisation de la diversité de la population marocaine de *Magnaporthe grisea* et l'étude de la résistance génétique du riz à la pyriculariose. Thèse de Docteur ès-Sciences. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc, 135.
- [13] JORGE, V., 1996. Analyse génétique de la structure des populations européennes de *Magnaporthe grisea*. DEA, Université Paris VI, France, 49.
- [14] Kimura, N., and Tsuge, T. 1993. Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *J. Bacteriol.* **175**:4427-4435.
- [15] KIYOSAWA, S. 1976. Pathogenic variations of *Pyricularia oryzae* and their use in genetic and breeding studies. *SABRAO Journal*, **8**: 53-67.
- [16] KIYOSAWA, S. 1977. Some examples of pest and disease epidemic in japan and their causes. *Ann. of N.Y. Acad. of Sc.* **287**: 35-44.
- [17] KODAMA, O. & AKATSUKA, T. 1982. In Pesticide chemistry : Human welfare and the Environment (Vol.3), ed. S. Matsnaka, D.H. Hutson and S.D. Murphy. Pergamon Press, New York, USA, 1982, 135-140.
- [18] LEUNG H., BORROMEO E.S., BERNARDO, M.A. & NOTTEGHEM J.L. 1988. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology*, **78**: 1227-1233.
- [19] LEUNG, H. & WILLIAMS, P. H. 1986. Enzyme polymorphism and genetic differentiation among geographic isolates of rice blast fungus. *Phytopathology*, **76**: 778-783.
- [20] MUHAMMAD, S., DOGAR, MA. & KHAN, M.A. 1991. Physiological studies and *in vitro* evaluation of fungicides against *Helminthosporium turcicum*. *Pass SRHAD Journal of Agriculture (Pakistan)*, **7**: 25-100.
- [21] NAQVI, N.I. & CHATTOO, B.B., 1996. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) based on indirect selection method for dominant blast resistance gene in rice. *Genome*, **39**: 26-30.
- [22] OKEKE, B., SEIGLE-MURANDI, F., STEIMAN, R. & SAGE, L. 1992. Investigation on cultural and cellulolytic activity in *Pyricularia oryzae* Cavara. *Agronomie*, **12**: 325-329.
- [23] 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 Docteur de l'Université Joseph Fourier-Grenoble I, France, 156.
- [24] OTANI, Y. 1952. Growth factors and nitrogen sources of *Pyricularia oryzae* Cavara. *Ann. phytopath. Soc. Japan*, **17**: 9-15.
- [25] OTANI, Y. 1953. Carbon sources of *Pyricularia oryzae* Cavara. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **17**: 119 - 120.
- [26] OTSUKA, H., TAMARI, K. & OGASAWARA, N. 1957a. Biochemical studies on rice blast disease. Biochemical classification of *Pyricularia oryzae* Cav (1). *J. agric. chem. Soc. Japan*, **31**: 791-794.
- [27] OTSUKA, H., TAMARI, K. & OGASAWARA, M. 1957b. Biochemical studies on rice blast disease. Biochemical classification of *Pyricularia oryzae* Cav (2). *J. Agric. chem Soc. Japan*, **31**: 794-798.
- [28] OTSUKA, H., TAMARI, K. & OGASAWARA, N. 1957c. Biochemical studies on the rice blast disease. Biochemical classification of *Pyricularia oryzae* Cav (3). *J. agric. chem. Soc. Japan*, **31**: 886-890.
- [29] OTSUKA, H., TAMARI, K. & OGASAWARA, N. 1965. Variability of *Pyricularia oryzae* in culture. In: The rice blast disease. Proceedings of a symposium held at IRRI, Manila, Philippines, July 1963, Baltimore, J. Hopkins Press, 69-109.
- [30] SHARMA, R.K., VERMA, O. & PATHAK, V.M. 1984. Some physical and Nutritional factors for Growth and sporulation of *Claviceps fusiformis* Lov. *Crytogamie, Mycol*, **5**: 269-275.

- [31] STREIBERG, R.A 1942. The process of amino acid formation from sugars by *Aspergillus niger*. *Jour. Agr. Research*, **64**: 615-633.
- [32] SOUBABERE, O., THARREAU, D., DIOH, W., LEBRUN, M. H. & NOTTEGHEM, J. L., 2000. Comparative continental variation in the blast fungus using sequence characterization amplified Region markers. In advances in rice blast Research. Ed.
- [33] THARREAU, D., LEBRUN, M. H., TALBO, N. J. and NOTTEGHEM, J.Kluyer L. Academic Publischers, 364.
- [34] TANAKA, S., KATSUKI, H. & KATSUKI, F. 1952. Biochemical studies on the blast diseases of rice plants. IV. Effet of different nitrogen sources in the culture media upon the nutritional absorption of the blast disease fungus. *Ann. phytopath. Soc. Japan*, **16**: 103-106.
- [35] TANAKA, S., KATSUKI, H. & KATSUKI, F. 1953. Biochemical studies on the blast diseases of rice plants. V. Effet of different nitrogen sources in the culture media upon the mycelia constituents and amylase activity of the blast disease fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **17**: 54-56.
- [36] TANAKA, Y., MURATA, N. & KATO, H. 1979. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus developement on the mating between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **45**: 182-191.
- [37] VALES, M., TOKPA, G. & OLLITRAULT, P. 1986. Comparaison de trois méthodes d'identification des souches de *Pyricularia oryzae* Cav. *Agronomie tropicale*, **41**: 242-249.