



HAL
open science

Helminthosporiose du riz en Afrique de l'Ouest : identification des espèces responsables et diversité génétique de *Bipolaris oryzae* et *Exserohilum rostratum*

Kouka Hilaire Kabore

► **To cite this version:**

Kouka Hilaire Kabore. Helminthosporiose du riz en Afrique de l'Ouest : identification des espèces responsables et diversité génétique de *Bipolaris oryzae* et *Exserohilum rostratum*. Génétique des populations [q-bio.PE]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASB035 . tel-03722955

HAL Id: tel-03722955

<https://theses.hal.science/tel-03722955v1>

Submitted on 13 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Helminthosporiose du riz en Afrique de l'Ouest : identification des espèces responsables et diversité génétique de *Bipolaris oryzae* et *Exserohilum rostratum*

Brown spot of rice in West Africa : identification of causal species and genetic diversity of *Bipolaris oryzae* and *Exserohilum rostratum*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°567 : Sciences du Végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)
Spécialité de doctorat : Sciences Agronomiques

Graduate School : BioSphERA – Biologie, Société, Ecologie & Environnement,
Ressources, Agriculture & Alimentation
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans les unités de recherche : BIOGER (Université Paris-Saclay, INRAE) et PHIM (CIRAD), sous la direction de **Marc-Henri Lebrun**, Directeur de Recherche, la co-direction de **Didier Tharreau**, Chercheur en Phytopathologie

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 31 mai 2022, par

Kouka Hilaire KABORE

Composition du Jury

Jacqui SHYKOFF

Directrice de Recherche, UPS, ESE, Orsay

Présidente

Bruno LE CAM

Directeur de Recherche, INRAE, UMR IRHS, Angers

Rapporteur et
Examineur

Lydia BOUSSET-VASLIN

Chargée de Recherche, INRAE, UMR IGEPP, Rennes

Rapporteuse et
Examinatrice

Anne Sophie WALKER

Ingénieure de Recherche, INRAE, UMR BIOGER, Thiverval-Grignon

Examinatrice

Irénée SOMDA

Professeur titulaire, UNB, Bobo-Dioulasso

Examineur

Marc-Henri LEBRUN

Directeur de Recherche, CNRS, UMR BIOGER, Thiverval-Grignon

Directeur de thèse

In memorium

A mon Père KABORE Saga Michel et à ma grande sœur

KABORE Bernadette qui ont quitté ce monde

respectivement le 31 juillet 2021 et le 06 septembre

2021. Que vos âmes reposent en paix !

Remerciements

Ce travail, qui marque une étape importante de ma passion pour la protection des végétaux, a été possible grâce à la contribution de plusieurs personnes physiques et morales. Qu'il me soit permis de leur exprimer toute ma profonde reconnaissance.

J'adresse mes sincères remerciements :

-A la Banque Islamique du Développement pour avoir financé ma thèse ;

-Aux Directions des UMR PHIM et BIOGER pour m'avoir accueilli et pour avoir travaillé en synergie pour le meilleur déroulement de mes travaux ;

-Aux Pr Claire NEEMA, Dr Charlotte TOLLENAERE et Dr Renaud IOOS qui durant les 3 ans m'ont orienté dans mes travaux à travers le comité individuel de suivi ;

-A mes encadrants Dr Marc-Henri LEBRUN et Dr Didier THARREAU pour avoir mis leurs expériences solides en protection des végétaux et en management des relations humaines à mon profit pour que cette thèse soit une belle expérience professionnelle et sociale pour moi. Je voudrais personnellement dire à Dr Didier THARREAU que lorsque je l'approchais en 2014 suite à sa présentation sur les maladies fongiques du riz pour lui manifester mon intérêt de travailler sur un de ses sujets, j'étais convaincu qu'un jour ça serait une réalité. Nous avons tous cru, ça pris tout le temps qu'il fallait, mais comme le dit une sagesse, la nuit a beau duré elle n'empêchera pas l'arrivée du jour.

-Aux Pr Jacqui SHYKOFF, Dr Bruno LE CAM, Dr Lydia BOUSSET-VASLIN, Dr Anne Sophie WALKER et Pr Irénée SOMDA pour avoir accepté sans hésitation d'évaluer mes travaux de thèse. Pr Jacqui SHYKOFF, votre appui a été inestimable pour les démarches administratives de mon projet de thèse dès sa genèse et vous avez encore accepté d'être là pour l'évaluer et apporter votre touche scientifique. Soyez-en remerciée. Pr Irénée SOMDA, vous avez posé la fondation de cette noble discipline qu'est la phytopathologie en moi en 2006. Je crois l'avoir consolidée et je suis content que vous soyez là 16 ans après pour contribuer à l'évaluation de ce que vous avez initié.

-A tous les chercheurs, Ingénieurs, Techniciens et Doctorants de l'UMR PHIM pour la collaboration. Je voudrais citer spécialement Dr Pierre GLADIEUX, Elisabeth FOURNIER, Jean CARLIER, Stephane DE MITA et Michel DUCAMP pour leurs apports scientifiques à mes travaux. Henri ADREIT, Joëlle MILAZZO, Sonia GUILLOU et Laurence BLONDIN qui

m'ont accompagné dans mes différentes manipes. Vous m'avez démontré que le savoir est l'une des richesses que l'on ne diminue pas en la partageant. Henri 'Chef' je me rappellerai sans cesse de nos échanges au quotidien sur l'actualité africaine. Nous avons mangé et bu africain. Je serai content de réaliser un jour avec toi des collectes de *brown spot* au Burkina Faso. Nous l'avons fait en France (Camargue) et celle du Burkina Faso reste un défi pour toi. A Marie LEYS, Florian CHARRAT et Sébastien RAVEL pour leurs appuis inestimables en bio-informatique. A Rémi PELISSIER pour son partage d'expérience en phénotypage. A Alexandre LASSAGNE pour les bons moments de manipes au laboratoire et de rédaction au bureau. Prends bien soin du 'Big boss', du 'Chef' et de la 'Cheffe' car se sont des trésors humains. A Oumaima, Matilde, Valentin, Lucas et Marie pour le partage de la joie quotidienne ;

-A Dr Abalo KASSANKOGNO pour la franche collaboration. Vos appuis ont été énormes pour la collecte des échantillons ainsi que pour la production et la valorisation des données ;

-A l'ensemble du personnel de l'AMVS et de BAGREPOLE qui m'a accompagné dans la collecte des échantillons ;

-A mes amis et collègues Dr Diariatou DIAGNE, Dr Mariam BARRO, Dr Alassane OUATTARA, Dr Inoussa SANANE, René SANOU, Ghislaine SAGNA et Françis NOUFE pour vos encouragements et les efforts consentis pour la lecture de certains de mes chapitres ;

-A Geneviève BOURELLY pour l'anticipation et la gestion des dossiers administratifs ;

-A Laurie CHOPIN avec qui j'ai eu du plaisir à travailler ;

-A Dr Elisabeth ZIDA pour les encouragements et les soutiens divers ;

-A tous mes collègues du ministère en charge de l'agriculture ;

-A mes amis KAFANDO Jean-Baptiste, KABORE Tasséré, ZIDA Arnaud et OUATTARA Yaya pour tout ce qu'ils ont fait pour moi et pour ma famille ;

-A mon épouse NARE Mireille et à mes enfants Dalia et Darel qui ont supporté mon absence pendant plus de 3 ans ;

- A toute ma famille et particulièrement à ma mère. Que Dieu te console et te comble de ses grâces !

Table des matières

In memorium.....	i
Remerciements.....	ii
Table des matières	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	viii
Introduction générale	1
I. Le contexte de la thèse	2
II. Le riz.....	4
II.1. Origine, taxonomie et cultivars	4
II.2. Morphologie et stades de développement	5
II.3. Ecosystèmes rizicoles	7
II.4. Production et consommation du riz.....	8
III. L'helminthosporiose du riz.....	10
III.1. Genre <i>Helminthosporium</i> et helminthosporiose du riz	10
III.1.1. <i>Bipolaris oryzae</i> (Breda de Haan) Shoemaker	11
III.1.2. <i>Bipolaris cynodontis</i> (Marignoni) Shoemaker	13
III.1.3. <i>Bipolaris victoriae</i> (F. Meehan & H.C. Murphy) Shoemaker.....	14
III.1.4. <i>Bipolaris zeicola</i> (G.L. Stout) Shoemaker	14
III.1.5. <i>Exserohilum rostratum</i> (Drechsler) Leonard & Suggs.....	15
III.2. Méthodes de diagnostic de l'helminthosporiose du riz	16
III.2.1. Diagnostic par observations des symptômes et des structures fongiques.....	16
III.2.2. Diagnostic par analyse d'images des symptômes.....	17
III.2.3. Diagnostic par amplification PCR des champignons isolés de symptômes.....	18
III.3. Facteurs favorables à l'helminthosporiose du riz	19
III.4. Méthodes de lutte contre l'helminthosporiose du riz	20
III.4.1. Résistance variétale.....	20
III.4.2. Lutte biologique.....	23
III.4.2.1. Microorganismes antagonistes	23
III.4.2.2. Extraits de plantes	23
III.4.2.3. Sous-produits animaux	24

III.4.3. Lutte chimique	24
III.4.4. Lutte intégrée.....	25
Article 1 : Brown spot of rice review: worldwide disease impact, and phenotypic and genetic diversity of the causal fungal pathogen <i>Bipolaris oryzae</i>	26
IV. Les objectifs de la thèse.....	62
Chapitre 1 : Identification des espèces fongiques associées aux lésions de l'helminthosporiose du riz.....	65
Article 2 : Caractérisation par <i>genotyping-by-sequencing</i> (GBS) et pathogénie des espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz.....	66
Article 3 : Morphological, molecular and pathological characterization of <i>Bipolaris oryzae</i> isolates causing rice brown spot in Camargue, France	107
Article 4 : First Report of Rice Brown Spot Caused by <i>Exserohilum rostratum</i> in Mali.....	130
Chapitre 2 : Structure et diversité génétique des populations de <i>Bipolaris oryzae</i> et <i>Exserohilum rostratum</i> principaux agents responsables de l'helminthosporiose du riz.....	132
Structure génétique des populations de <i>Bipolaris oryzae</i> issues des pays d'Afrique, d'Amérique, d'Asie et d'Europe.....	133
Article 5 : Genetic diversity and structure of <i>Bipolaris oryzae</i> and <i>Exserohilum rostratum</i> populations causing Brown spot of rice in Burkina Faso based on genotyping-by-sequencing.....	143
Chapitre 3 : Développement d'amorces pour la détection spécifique par PCR des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz.....	172
Article 6 : Développement d'amorces pour la détection spécifique par PCR de <i>Bipolaris</i> spp. et <i>Exserohilum rostratum</i> responsables de l'helminthosporiose du riz.....	173
Conclusion générale et perspectives.....	196
Références bibliographiques.....	205
Annexes.....	224
Résumé	282
Abstract.....	283

Liste des figures

Introduction générale

Figure 1 : Différentes phases du cycle du riz.....	6
Figure 2 : Principaux types de rizicultures (IRRI, 1993)	8
Figure 3 : Superficie et production mondiale de riz paddy de 2015 à 2019.....	9
Figure 4 : Conidiophores et conidies de <i>Bipolaris oryzae</i> (Marin-Felix et al., 2017).....	12
Figure 5 : Cycle de vie de <i>Bipolaris oryzae</i> (De Bruyne, 2015)	12
Figure 6 : Conidies de tailles variables de <i>B. cynodontis</i> (Manamgoda et al., 2014)	13
Figure 7 : Différentes tailles de conidies de <i>B. victoriae</i> (Manamgoda et al., 2014).....	14
Figure 8 : Conidiophores et conidies de <i>B. zeicola</i> (Manamgoda et al., 2014)	15
Figure 9 : Conidies de tailles variables de <i>E. rostratum rostratum</i>	16

Article 1 : Brown spot of rice review: worldwide disease impact, and phenotypic and genetic diversity of the causal fungal pathogen *Bipolaris oryzae*

Figure 1 (A) : Tiny brown spots caused by <i>Bipolaris oryzae</i> on rice leaves in Camargue (France).....	56
Figure 1 (B) : Brown lesions with grey center and yellow margin caused by <i>Bipolaris oryzae</i> on rice leaves in Yunnan (China).....	57

Article 2 : Caractérisation par *genotyping-by-sequencing* (GBS) et pathogénie des espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz

Figure 1 : Arbre phylogénétique obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance basée sur l'alignement des séquences ITS	85
Figure 2 : Arbre phylogénétique obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance basée sur l'alignement des séquences du gène GAPDH.....	86
Figure 3 : Arbre phylogénétique obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance basée sur l'alignement des séquences ITS et GAPDH concaténées.....	87
Figure 4 : Arbre phylogénétique obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance basée sur les marqueurs SNPs des isolats de <i>Bipolaris</i>	92
Figure 5 : Lésions foliaires causées par différentes espèces de <i>Bipolaris</i> et <i>Exserohilum</i> isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz.	94
Figure 6 : Corrélation entre la racine carrée du nombre moyen de lésions par surface foliaire et la racine carrée de la proportion foliaire malade.....	97

Figure 7 : Comparaison du nombre de lésions induites par les espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose sur les variétés de riz FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, Kitaake et TS2 en condition contrôlée 98

Figure 8 : Comparaison de la proportion foliaire malade par les espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose sur les variétés de riz FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, Kitaake et TS2 en condition contrôlée 98

Figure 9 : Comparaison de la sensibilité (nombre de lésions par unité de surface) de 6 variétés de riz aux infections des espèces de *Bipolaris* (*B. bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae* et *B. sorokiniana*), de *Curvularia* (*C. spicifera*) et de *Exserohilum* (*E. rostratum*) isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz 99

Figure 10 : Comparaison de la sensibilité (proportion de surface foliaire malade) de 6 variétés de riz à se faire coloniser par les espèces de *Bipolaris* (*B. bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae* et *B. sorokiniana*), de *Curvularia* (*C. spicifera*) et de *Exserohilum* (*E. rostratum*) isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz 99

Article 3 : Morphological, molecular and pathological characterization of *Bipolaris oryzae* isolates causing rice brown spot in Camargue, France

Fig. 1: Colours mycelial, growth pattern and conidia characteristics (200 x) of *B. oryzae* strains collected from Camargue 14 days after culture on PDA 115

Fig. 2 : Sequence Demarcation Tool analysis showing the level of similarity of sequences of *B. oryzae* strains from Camargue with *Bipolaris* spp. sequences obtained from GenBank for A) ITS, B) GAPDH, and C) TEF1- α genomic regions. 119

Fig. 3: Phylogenetic tree obtained from a maximum likelihood analysis based on the combined ITS and GAPDH alignment. 120

Fig. 4: Disease symptoms after inoculation of leaves of the rice variety Gines with a *B. oryzae* strain from Camargue (FR9046) 5 days after inoculation with a conidial suspension of 10^4 conidia/mL 121

Fig. 5: Correlation between the average number of lesions per cm^2 of leaf and the average diseased area 123

Article 5 : Genetic diversity and structure of *Bipolaris oryzae* and *Exserohilum rostratum* populations causing Brown spot of rice in Burkina Faso based on genotyping-by-sequencing

Figure 1: Schematic location of collection sites for infected rice samples 146

Figure 2: Population structure analysis of *B. oryzae* (panel A) and *E. rostratum* (panel B) using DAPC and K=4. 154

Figure 3: Population structure analysis of <i>B. oryzae</i> and <i>E. rostratum</i> . Ancestry coefficient for each isolate calculated by using sNMF with K=4. A) <i>B. oryzae</i> ., B) <i>E. rostratum</i>	155
Figure 4: Phylogenetic tree of <i>B. oryzae</i> and <i>E. rostratum</i> populations made by RaxML from a maximum likelihood analysis.....	157
Figure 5: Geographic distribution of the four genetic clusters of <i>B. oryzae</i> in Burkina Faso.....	158
Figure 6: Geographic distribution of the four genetic clusters of <i>E. rostratum</i> in Burkina Faso.....	158
Figure 7: Estimated linkage disequilibrium decay (LD-decay) of <i>B. oryzae</i> and <i>E. rostratum</i> isolates	165
Figure 8: Neighbor-net phylogenetic network of <i>B. oryzae</i> and <i>E. rostratum</i> isolates from Burkina Faso estimated with SPLITSTREE	166

Article 6 : Développement d’amorces pour la détection spécifique par PCR de *Bipolaris* spp. et *Exserohilum rostratum* responsables de l’helminthosporiose du riz

Figure 1 : Illustration de la spécificité des amorces	190
Figure 2 : Seuil de détection des amorces pour les espèces <i>B. oryzae</i> , <i>E. rostratum</i> et <i>B. maydis</i>	191
Figure 3 : Détection de <i>B. oryzae</i> à partir de grains de riz infectés avec le couple d’amorces Bof/R.....	193

Liste des tableaux

Introduction générale

Tableau 1 : Production du riz par continent lors de la campagne agricole 2019	9
Tableau 2 : Consommation annuelle de riz par habitant.....	10
Tableau 3 : Cultivars et lignées de riz résistants à l’helminthosporiose du riz	22

Article 1 : Brown spot of rice review: worldwide disease impact, and phenotypic and genetic diversity of the causal fungal pathogen *Bipolaris oryzae*

Table I : Summary of the incidence, severity and loss of rice grain yield caused by brown spot	58
Table II : Summary of the prevalence and level of infection of rice seed by <i>Bipolaris oryzae</i>	59

Article 2 : Caractérisation par *genotyping-by-sequencing* (GBS) et pathogénie des espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz

Tableau 1 : Isolats de <i>Helminthosporium</i> de différents pays, de différents organes du riz et genres apparentés	70
Tableau 2 : Programme des PCR en fonction des gènes	72
Tableau 3 : Isolats utilisés pour l'évaluation de la pathogénicité.....	77
Tableau 4 : Génomes complets des espèces de <i>Bipolaris</i> spp., <i>Curvularia</i> spp. et <i>Exserohilum rostratum</i> séquencés par Illumina dans le cadre de la thèse.....	79
Tableau 5 : Espèces fongiques identifiées en fonction de la région génomique considérée sur un échantillon de 112 souches isolées du riz	82
Tableau 6 : Comparaison entre l'assignation par GBS et celle basée sur les 3 régions génomiques (ITS, GAPDH et TEF)	83
Tableau 7 : Espèces isolées sur les feuilles, panicules et grains du riz cultivé et d'autres Poacées	90
Tableau 8 : Distribution des espèces de l'helminthosporiose en fonction de l'organe de collecte	91
Tableau 9 : Distribution des espèces en fonction de l'espèce hôte.....	91
Tableau 10 : Résultat de l'analyse de variance (ANOVA) des 33 isolats inoculés aux variétés de riz FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, TS2 et Kitaake	97
Tableau 11 : Comparaison de la pathogénie des espèces sur chaque variété de riz .	101
Tableau 12 : Comparaison de la pathogénie entre différents isolats d'une même espèce	102

Article 3 : Morphological, molecular and pathological characterization of *Bipolaris oryzae* isolates causing rice brown spot in Camargue, France

Table 1: Fungal strains isolated from rice leaves and seeds with brown spot symptoms collected in Camargue, France.....	110
Table 2: Mycelial growth speed and spore characteristics of <i>B. oryzae</i> isolates from rice in Camargue, France.....	116
Table 3: Average number of lesions per cm ² of leaf and diseased leaf area (in % of total leaf) 5 days after inoculation.....	122
Table 4: Resistance/susceptibility of rice varieties towards different isolates of <i>B. oryzae</i> from Camargue	123

Article 5 : Genetic diversity and structure of *Bipolaris oryzae* and *Exserohilum rostratum* populations causing Brown spot of rice in Burkina Faso based on genotyping-by-sequencing

Table 1: Distribution of <i>B. oryzae</i> and <i>E. rostratum</i> clusters obtained by DAPC analysis in 6 rice-growing areas of Burkina Faso.....	153
Table 2: Pairwise FST estimates between <i>Bipolaris oryzae</i> isolates from 6 rice-growing zones in Burkina Faso.....	153
Table 3: Pairwise FST estimates between <i>Exserohilum rostratum</i> isolates from 6 rice-growing zones in Burkina Faso.....	153
Table 4: Analysis of molecular variance (AMOVA) of <i>Bipolaris oryzae</i> between and within 6 rice-growing zones in Burkina Faso	159
Table 5: Analysis of molecular variance (AMOVA) of <i>Exserohilum rostratum</i> between and within 6 rice-growing zones in Burkina Faso.....	159
Table 6: Genotypic and gene diversity indices of <i>B. oryzae</i> and <i>E. rostratum</i> isolates from 6 rice-growing areas of Burkina Faso.....	162
Table 7: Genotypic and gene diversity indices of <i>B. oryzae</i> and <i>E. rostratum</i> isolates from 6 rice-growing areas of Burkina Faso (after clone correction)	163
Table: 8 Distribution of mating types in <i>B. oryzae</i> and <i>E. rostratum</i> populations in the 6 rice growing areas.....	167

Article 6 : Développement d'amorces pour la détection spécifique par PCR de *Bipolaris* spp. et *Exserohilum rostratum* responsables de l'helminthosporiose du riz

Tableau 1 : Séquences GAPDH produites dans cette étude et séquences de référence (NCBI) des espèces présentes sur le riz ayant servi à la définition des amorces	184
Tableau 2 : Amorces dessinées pour la détection spécifique de <i>Bipolaris</i> spp., <i>B. oryzae</i> , <i>B. maydis</i> et <i>E. rostratum</i>	188
Tableau 3 : Programme PCR utilisé pour les différents couples d'amorces.....	188
Tableau 4 : Résultats d'amplification PCR d'une collection d'isolats de <i>Bipolaris</i> spp., <i>Curvularia</i> spp., <i>Exserohilum rostratum</i> et des espèces couramment rencontrées sur le riz.....	189

Introduction générale

Les maladies du riz réduisent les rendements et augmentent les coûts de production à travers les mesures de lutte (Yang et al., 2020). Elles mettent parfois en péril la sécurité alimentaire. La production de données scientifiques sur les maladies du riz contribue à mieux les maîtriser donc à réduire leurs effets néfastes sur la sécurité alimentaire. A titre illustratif, la pyriculariose du riz, causée par *Pyricularia oryzae* (syn. *Magnaporthe oryzae*) et considérée comme la maladie fongique la plus dévastatrice du riz, a fait l'objet de nombreuses études dont les résultats contribuent aujourd'hui à sa gestion. Par exemple, les recherches sur le rôle de la semence infectée dans l'initiation des épidémies et la propagation de la maladie ont conduit à l'homologation de nombreux fongicides pour le traitement des semences. Cependant, la grande variabilité et l'adaptabilité de l'espèce ont imposé des évaluations régulières des fongicides pour détecter les éventuelles formes de résistance. Des outils de diagnostic efficaces et rapides ont été mis en place pour contribuer à l'utilisation de semences saines et aux éventuels suivis de dynamique de la maladie. L'impact des conditions pédoclimatiques sur le développement de la pyriculariose du riz est connu d'où la recommandation de schémas de fertilisations organo-minérales adaptées (Oliveira et al., 2019 ; Sester et al., 2019). Aujourd'hui, environ 109 gènes majeurs de résistance ont été identifiés dont 25 (clonés et caractérisés) servent pour l'amélioration variétale (Dong et al., 2020 ; Deepak et al., 2022). Si nous disposons aujourd'hui de nombreuses connaissances sur la pyriculariose qui servent dans sa gestion, ce n'est pas le cas pour certaines maladies fongiques du riz tout aussi importantes.

La thèse que j'ai menée a pour but d'accroître les connaissances sur l'helminthosporiose du riz, une maladie qui demeure peu étudiée malgré son expansion dans le monde et son importance croissante, en particulier en Afrique. L'introduction de ce manuscrit est structurée en 4 parties. La première partie (I.) situe le contexte général de la thèse. La deuxième partie (II.) résume les principales informations sur le riz et la troisième partie (III.) fait la synthèse des informations

disponibles sur l'helminthosporiose du riz et sur les espèces pathogènes responsables de la maladie. Enfin, les objectifs de la thèse sont énoncés dans la dernière partie (IV.).

I. Le contexte de la thèse

Le riz est l'une des principales céréales alimentaires au monde. Il constitue la base de l'alimentation de la moitié de l'humanité et dans la plupart des pays du monde, la consommation ne cesse de croître (Alias et al., 2008; Samal et al., 2021). Selon Sharma et al. (2012), la production de riz devra augmenter de plus de 30% pour satisfaire les besoins alimentaires de base d'ici 2030. Cependant, le développement de nouvelles zones de riziculture et d'intensification est confronté à des défis, parmi lesquels figurent les maladies (Séré et al., 2013). Les maladies du riz entraînent une perte annuelle de 20 % de la production mondiale du riz (Savary et al., 2019 ; Kaushal & Prasad, 2021). La panachure jaune (causée par le *Rice Yellow Mottle Virus*), le tungro (*Rice tungro bacilliform virus*, *Rice tungro spherical virus*), le flétrissement bactérien (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), la strie bactérienne (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*), la brûlure des panicules (*Burkholderia glumae*), la pyriculariose (*Pyricularia oryzae*), l'helminthosporiose (*Bipolaris oryzae*), la brûlure de la gaine (*Rhizoctonia solani*), le faux charbon (*Claviceps oryzae*) et la cercosporiose (*Cercospora oryzae*) sont les maladies les plus importantes du riz (Kumar et al., 2017; Fahad et al., 2019; Jamaloddin et al., 2021).

Parmi ces maladies majeures, l'helminthosporiose du riz est connue pour avoir provoqué en 1942 en Inde une épidémie ayant entraîné des baisses de rendements de 40-90%, et expliquant en partie la famine du Bengale qui a causé la mort de 2 millions de personnes (Ghose et al., 1960; Padmanabhan, 1973). En 2022, l'helminthosporiose du riz est rencontrée dans la quasi-totalité des pays producteurs de riz (CABI, 2022; Farr & Rossman, 2022). C'est une maladie préoccupante particulièrement au Burkina Faso (Ouédraogo, 2008 ; Barro et al., 2021), aux Etats-Unis (Castell-Miller & Samac, 2019), au Bangladesh (Hossain et al., 2014), en Côte d'Ivoire (Bouet et al., 2015), en Malaisie (Toher et al., 2016), en Inde (Valarmathi & Ladhalakshmi, 2018; Nayak & Hiremath, 2019) et en Europe (Tharreau, communication personnelle). L'une des

caractéristiques de l'helminthosporiose du riz dans ces pays est l'augmentation spectaculaire de son incidence lui conférant donc le statut de maladie émergente ou ré-émergente tel que défini par Milgroom (2017).

Les pertes de production globale de riz imputables à l'helminthosporiose sont estimées à 3,8% (Savary et al., 2019) et en font la 3^{ème} maladie la plus dommageable de cette culture. De plus, des études de simulation prévoient l'augmentation des épidémies dans certains pays producteurs de riz à l'horizon 2030 et 2050 dans le contexte des changements climatiques (Bregaglio et al., 2013).

Bipolaris oryzae (Breda de Haan) Shoemaker est le champignon le plus associé à l'helminthosporiose du riz. Il cause des taches brunes circulaires ou ovales sur les coléoptiles, les feuilles, les glumelles et les épillets. Cependant, ces symptômes peuvent être confondus avec ceux de la pyriculariose, de la curvulariose, de la cercosporiose ou de la ramulariose, surtout en début d'infection (Archana, 2014 ; Majeed et al., 2016a,c ; Aslam et al., 2020 ; Terensan et al., 2021 ; Zhou et al., 2021 ; Imran et al., 2022). En outre, de nombreuses espèces de *Bipolaris* ont été isolées à partir de lésions foliaires brunes du riz (Gnancadja-André et al., 2005 ; Motlagh & Kaviani, 2008 ; El-Shafey et al., 2011 ; Nazari et al., 2015). Les caractères morphologiques ne sont pas assez distincts entre ces différentes espèces, pour permettre leur identification précise à partir des observations microscopiques (Archana, 2014).

Pour Barnwal et al. (2013), l'helminthosporiose du riz demeure une maladie peu maîtrisée à cause des multiples facteurs qui influencent les épidémies et les dégâts. Les outils de la biologie moléculaire peuvent contribuer à approfondir davantage les connaissances sur l'helminthosporiose (Sunder et al., 2014). Par exemple, les marqueurs moléculaires devront apporter plus de précision dans le diagnostic de la maladie et améliorer les connaissances sur son épidémiologie (Archana, 2014). L'identification des loci quantitatifs associés à la résistance à l'helminthosporiose du riz constitue une importante perspective à la sélection assistée par marqueurs en vue de l'amélioration de la résistance des cultivars du riz à l'helminthosporiose (Sato et al., 2008, 2015 ; Ota et al., 2021). La connaissance de la diversité et de la structure génétique des populations, ainsi que du mode de reproduction sont nécessaires pour le

développement de cultivars résistants et la conception de stratégies de lutte chimique contre l'helminthosporiose du riz (Castell-Miller & Samac, 2012 ; Barnwal et al., 2013). La plupart des études réalisées en Asie et aux Etats-Unis rapportent un niveau élevé de diversité génotypique et génétique, et l'absence de structure de populations de *B. oryzae* à l'échelle des rizières (Castell-Miller & Samac, 2012 ; Archana et al., 2014a,b ; Kandan et al., 2015 ; Nazari et al., 2015 ; Ahmadpour et al., 2018). Cependant, ces données restent limitées et, bien que l'helminthosporiose du riz soit en expansion en Afrique, les études de diversité phénotypique et génétique restent quasi-inexistantes sur ce continent. A cela s'ajoute l'absence d'outils de diagnostic précis.

II. Le riz

II.1. Origine, taxonomie et cultivars

Le riz appartient à la division des *Magnoliophyta*, à la classe des *Liliopsida*, à l'ordre des *Cyperales*, à la famille des *Poaceae* et au genre *Oryza*. Le genre *Oryza* comprend plus de 20 espèces dont seulement *Oryza sativa* (L.) et *Oryza glaberrima* (Steud.) sont cultivées (Bennett et al., 1997). *Oryza sativa* (riz asiatique) a été domestiqué en Asie entre 8 000 et 10 000 ans avant notre ère (Khush, 2000 ; Doebley et al., 2006 ; Fuller, 2011). Au sein de cette espèce, de nombreuses études ont révélé la présence de 5 groupes génétiques que sont les groupes indica, japonica tropical ou javanica, japonica tempéré, aus et aromatique (Garris et al., 2005 ; Agrama et al., 2010 ; Wang et al., 2014).

L'espèce *O. glaberrima* (riz africain), quant à elle, aurait été domestiquée indépendamment du riz asiatique il y a environ 2 000 à 3 000 ans dans le delta central du Fleuve Niger (Portères, 1962, 1976 ; Sweeney & McCouch, 2007 ; Cubry et al., 2018). Des analyses phylogénétiques récentes ont confirmé les hypothèses selon lesquelles *O. rufipogon* est l'ancêtre de *O. sativa*, tandis que *O. barthii* est l'ancêtre de *O. glaberrima* (Wei & Huang, 2019). Ces espèces sont toutes diploïdes et appartiennent au même groupe génomique AA ($2n = 24$).

Le riz est riche en diversité génétique avec plus de 40 000 cultivars dans le monde et plus de 132 000 accessions (riz cultivés, sauvages et des genres apparentés) dans la collection de l'Institut international de recherche sur le riz (IRRI) aux Philippines (<https://www.irri.org/international-rice-genebank>). Les variétés issues de *O. sativa* sont cultivées partout où il y a du riz, contrairement à celles de *O. glaberrima* qui sont restreintes à de petites régions de l'Afrique de l'Ouest (Maiti et al., 2021). En termes de distribution géographique des groupes génétiques de riz, les cultivars du groupe japonica tropical se trouvent en Asie du Sud-Est, dans le sud de la Chine, le sud des États-Unis, les zones de moyenne altitude d'Amérique latine et en Afrique (Glaszmann, 1987). Le groupe japonica tempéré est cultivé en Asie du Nord-Est, en Europe, dans l'ouest des États-Unis et en Australie (Glaszmann, 1987). Le groupe indica est adapté aux régions chaudes d'Asie du Sud, de Chine du Sud, d'Asie du Sud-Est, du Pacifique Sud, d'Amérique Latine et d'Afrique, tandis que le groupe des aus et le groupe aromatique se concentrent au Bangladesh et en Inde (Agrama et al., 2010). Si l'espèce *O. sativa* est connue pour avoir de bons rendements, *O. glaberrima* présente de bonnes capacités d'adaptation à la sécheresse, à la salinité et aux bio-agresseurs. Ces avantages spécifiques à chacune des deux espèces de riz cultivé ont conduit au développement par AfricaRice (Ex ADRAO) de variétés hybrides *sativa* x *glaberrima* appelées NERICA (nouveau riz pour l'Afrique) (Jones et al., 1997 ; Dingkuhn et al., 1999 ; Wei & Huang, 2019). La variété NERICA 4 adaptée à la riziculture pluviale de plateau et la variété NERICA-L 19 destinée à la riziculture de bas fond sont les plus cultivées en Afrique subsaharienne (Futakuchi et al., 2021).

II.2. Morphologie et stades de développement

Le riz est une graminée annuelle caractérisée par des chaumes ronds, creux et articulés, des limbes plats et sessiles, et une panicule terminale (Chang & Bardenas, 1965). Le fruit ou paddy est constitué d'un caryopse protégé par 2 glumelles (Chang & Bardenas, 1965; Dizès et al., 1988). Il s'agit d'un ovule fécondé et mûr contenant un embryon vivant capable de germer pour produire une nouvelle plante (Panesar & Kaur, 2016). Le

Le riz possède des différences morphologiques liées à l'espèce, au groupe génétique ou à la variété. Par exemple, l'espèce *O. glaberrima* a des feuilles et des épillets glabres, et de petites ligules (1,5 à 13 mm) comparativement à *O. sativa* (Morishima et al., 1962; Nayar, 2014). La taille de la plante peut varier de 0,3 m pour les variétés naines, à plus de 7 m pour les variétés flottantes et entre 1 à 2 m pour la majorité des variétés commerciales.

Le cycle du riz, du semis à la récolte, varie de 90 à plus de 200 jours en fonction des variétés et du climat. Il comprend une phase végétative, une phase reproductive et une phase de maturation (Figure 1). Chaque phase est divisée en stades de développement. La phase végétative s'étale de la germination à l'initiation paniculaire et sa durée est fonction de la variété. La phase reproductive débute de l'initiation paniculaire à la floraison avec une durée relativement fixe variant de 30 à 35 jours. La phase de maturation va de la floraison à la maturité complète avec une durée fixe de 30 jours.

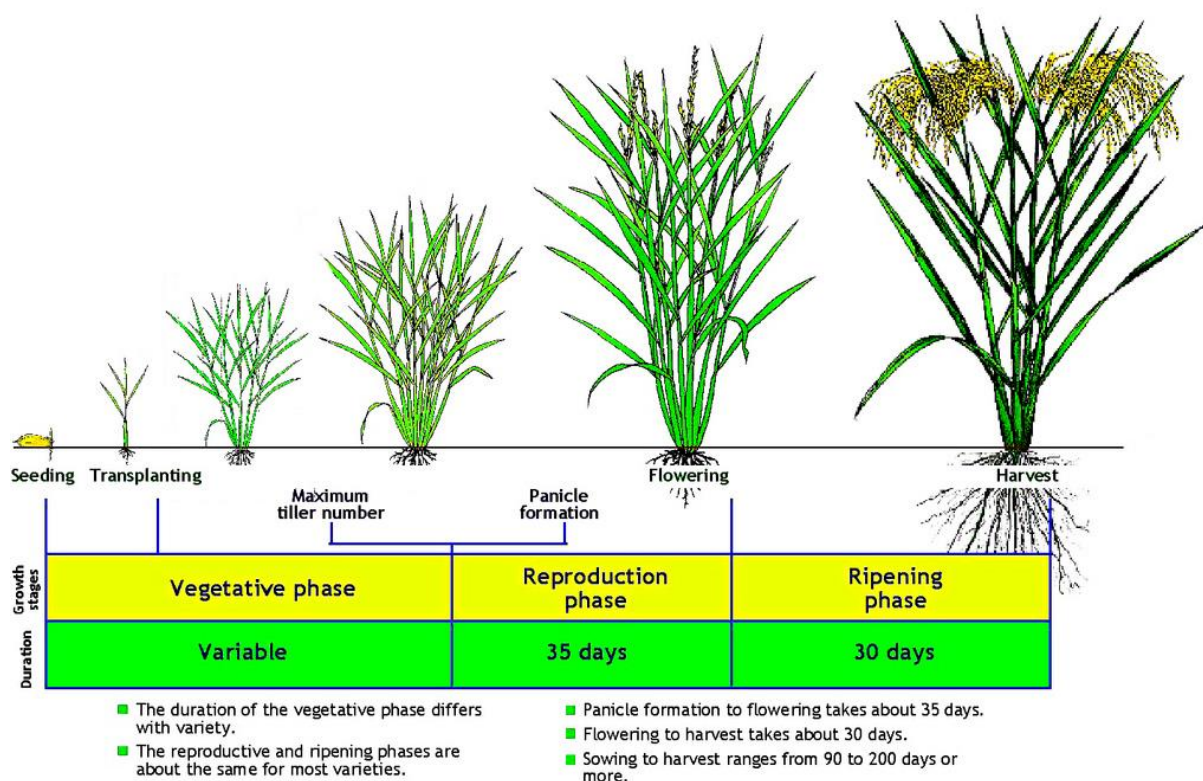


Figure 1 : Différentes phases du cycle du riz

Source : IRRI (<https://www.flickr.com/photos/ricephotos/13596607373/>)

II.3. Ecosystèmes rizicoles

L'Institut international de recherche sur le riz (IRRI) a regroupé les écosystèmes rizicoles en riziculture irriguée (« irrigated »), inondée (« flood prone »), pluviale de bas fond (« rainfed lowland ») et pluviale stricte ou de plateau (« rainfed upland » ; Figure 2). La riziculture irriguée représente plus de la moitié des superficies mondiales emblavées en riz et contribue à plus de 75% de la production globale de riz (Maclean et al., 2002 ; GRiSP, 2013). C'est l'écosystème rizicole le plus productif avec des rendements moyens variant de 3 à 9 t/ha et la possibilité de réaliser plus d'un cycle de culture par an dans certaines régions (Maclean et al., 2002). La riziculture irriguée est exclusive aux USA, en Europe et en Australie. Elle est dominante en Asie, tandis qu'en Afrique elle ne représente qu'environ 15% des surfaces cultivées en riz (<https://www.irri.org/high-yielding-rice>).

La riziculture pluviale représente environ 34% des superficies mondiales de riz (Maclean et al., 2002). Ce type de riziculture est dominant en Afrique et est également rencontré en Asie. La riziculture pluviale de bas-fonds produit 20% du riz mondial et la riziculture pluviale de plateau contribue à 4 % de la production mondiale totale de riz. Les écosystèmes de riz pluvial sont très hétérogènes et sont sujets à de multiples stress abiotiques (Chivenge et al., 2020). Ce système est le moins productif avec des rendements moyens de 2,3 t/ha pour la riziculture pluviale de bas fond et 1 t /ha pour la riziculture pluviale de plateau (GRiSP, 2013). La riziculture inondée couvre 8% des superficies mondiales en riz (Prasad et al., 2017).

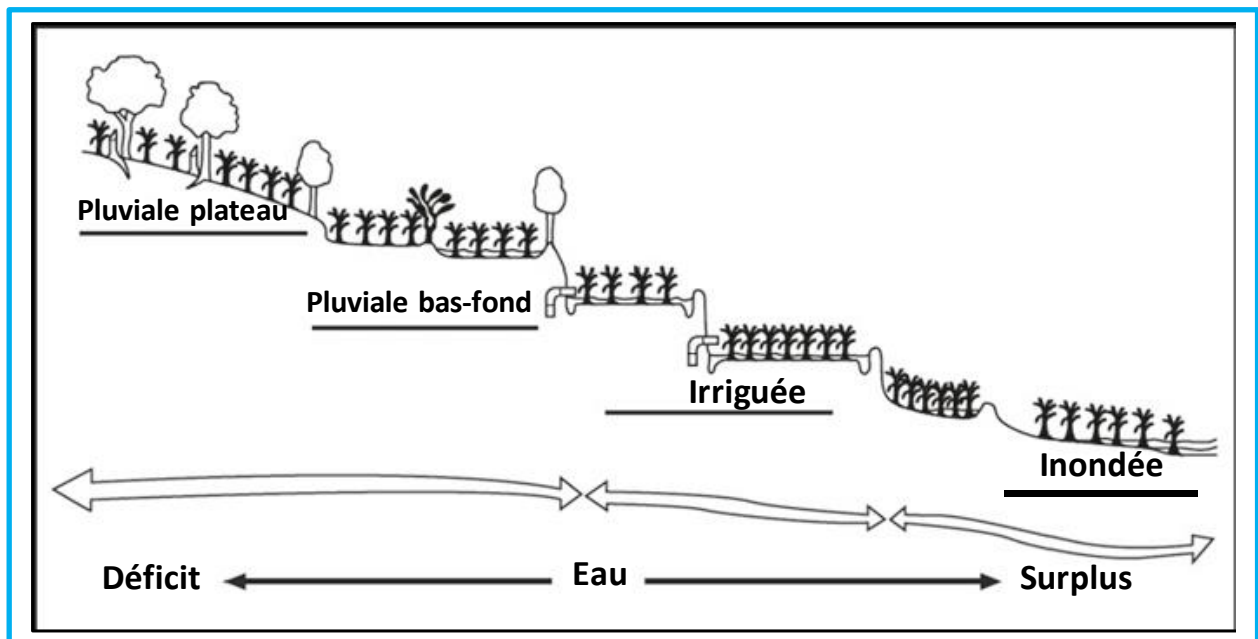


Figure 2 : Principaux types de rizicultures (IRRI, 1993)

II.4. Production et consommation du riz

La superficie mondiale annuelle de 2015 à 2019 a toujours dépassé 160 millions d'hectares avec une production supérieure à 730 millions de tonnes du riz paddy (Figure 3 ; FAOSTAT, 2021, <https://www.fao.org/faostat/fr/#home>). Il s'agit de la deuxième culture après le blé en termes de superficie et de production (Panesar & Kaur, 2016). En 2019, l'Asie a fourni près de 90% de la production mondiale (Tableau 1). Elle a été suivie de l'Afrique avec 5%, l'Amérique 4% et l'Europe 0,5%. De tous les continents, l'Afrique a le plus faible rendement moyen (2,3 t/ha ; Tableau 1).

Les consommateurs majeurs de riz sont rencontrés dans les pays d'Asie et d'Afrique (Tableau 2). La consommation moyenne par habitant de 2017-2019 du continent africain a été 26,9 kg avec une estimation de 30 kg/habitant en 2029. Dans certains pays africains comme le Madagascar (Raboin et al., 2012 ; Fahad et al., 2019), la Guinée-Bissau et la Sierra Leone (Wopereis, 2013), la consommation annuelle par habitant est supérieure à 100 kg. La demande en riz en Afrique croît à un taux de 6%,

plus rapidement que partout ailleurs dans le monde (<https://www.africanrice.org/why-rice-matters-for-africa>).

En Asie une augmentation des besoins en riz est aussi attendue compte tenu de l'augmentation de la population (Alias et al., 2008; Samal et al., 2021). Cependant, la consommation par habitant pourrait rester stable voire baisser à cause de la diversification des régimes alimentaires des populations induite par la prospérité économique du continent (Alias et al., 2008 ; Samal et al., 2021).

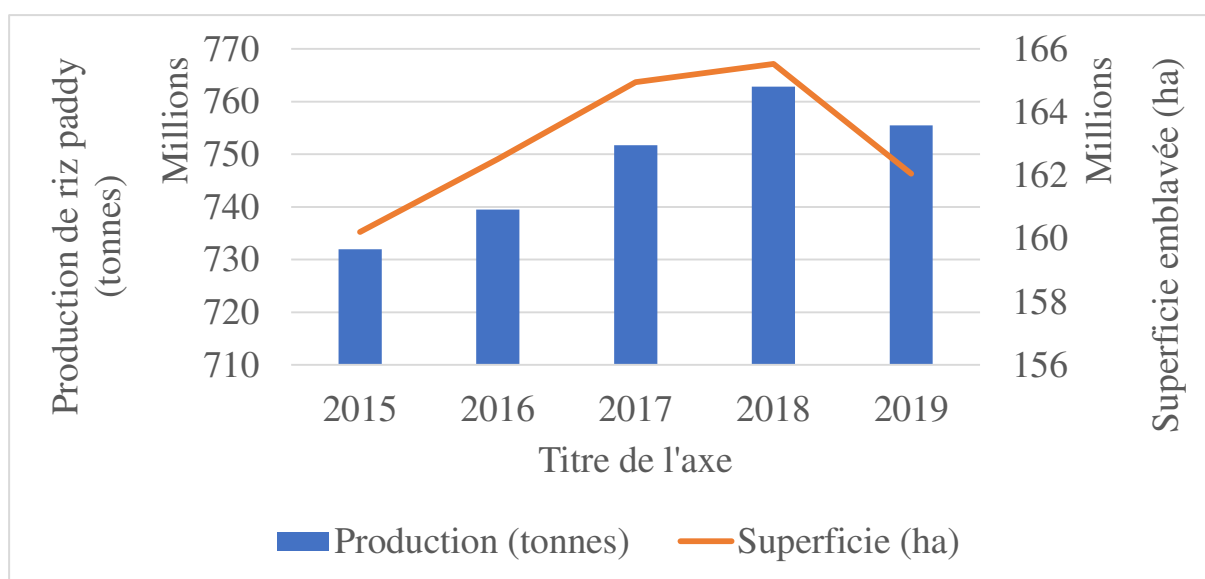


Figure 3 : Superficie et production mondiale de riz paddy de 2015 à 2019

Tableau 1 : Production du riz par continent lors de la campagne agricole 2019

Continents	Superficies (ha)	Productions paddy (t)	Rendements (t/ha)	Part dans la production mondiale (%)
Afrique	17 110 769	38 771 392	2,27	5,13
Amérique	5 704 659	35 325 593	6,19	4,68
Asie	138 605 217	677 276 789	4,89	89,65
Europe	623 432	4 023 638	6,45	0,53
Océanie	11 861	76 388	6,44	0,01
Monde	162 055 938	755 473 800	4,66	100

Source : <https://www.fao.org/faostat/fr/#home> (les données sont compilées par les structures officielles des différents pays ou estimées par FAOSTAT)

Tableau 2 : Consommation annuelle de riz par habitant

Régions	Quantité moyenne annuelle de riz consommé par habitant (en kg)	
	Moyenne 2017-2019	Prévision 2029
Afrique	26,9	30,8
Asie et Pacifique	77,6	78,1
Amérique du Nord	13,1	13,1
Amérique latine et Caraïbes	28,2	28,3
Europe	6,4	6,7

Source : OECD/FAO, 2020

III. L'helminthosporiose du riz

III.1. Genre *Helminthosporium* et helminthosporiose du riz

Le genre *Helminthosporium* a été défini par Link en 1802. Après sa création, Drechsler (1923) a décrit sur les graminées des espèces de champignon qui avaient des conidies solitaires à l'apex de conidiophores géniculés bruns. Ces espèces ont été scindées du genre *Helminthosporium* au sens strict pour former le genre *Helminthosporium* « graminicole » (Nisikado, 1928). Les réorganisations taxonomiques se sont poursuivies jusqu'à la séparation de ce genre en 4 genres dont *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* et *Exserohilum* (Shoemaker, 1959 ; Luttrell, 1963, 1964 ; Sivanesan, 1987 ; Manamgoda et al., 2011, 2014). Les analyses génétiques multilocus donnent aujourd'hui des informations phylogénétiques conduisant parfois à des transferts de certaines espèces entre ces différents genres (Manamgoda et al., 2014).

Des espèces des genres *Curvularia*, *Bipolaris* et *Exserohilum* ont été décrites comme agents responsables du 'rice brown spot disease' (Motlagh & Kaviani, 2008a), 'rice brown spot' (Toher et al., 2016; Kaboré et al., 2021), 'brown leaf spot in rice' (Majeed et al., 2016a, b, c ; Nur Ain Izzati et al., 2019 ; Aslam et al., 2019, 2021 ; Imran et al., 2022). Toutes ces appellations désignent l'helminthosporiose du riz (CABI, 2022 ; EPPO, 2022).

Cependant, leurs utilisations dans la littérature scientifique anglophone peuvent entraîner des confusions. Bien que les symptômes de la curvulariose du riz soient assez similaires à ceux de l'helminthosporiose du riz, ces deux maladies sont bien distinctes (Bahous et al., 2010 ; Soura et al., 2019).

Les caractéristiques morphologiques des principales espèces responsables de l'helminthosporiose du riz sont décrites comme suit. Compte tenu des nombreuses réorganisations taxonomiques, nous indiquerons tous les synonymes dans la description des espèces associées à l'helminthosporiose du riz.

III.1. 1. *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker

Bipolaris oryzae (Breda de Haan) Shoemaker appartient au phylum des *Ascomycota*, à la classe des *Dothideomycetes*, à l'ordre des *Pleosporales* et à la famille des *Pleosporaceae* (GBIF, 2021, www.gbif.org/fr/species/2615973). L'espèce a été décrite pour la première fois comme *Helminthosporium oryzae* par Breda de Haan (1900). Il s'agit de l'espèce la plus associée à l'helminthosporiose du riz.

Bipolaris oryzae présente des conidiophores groupés ou isolés, simples ou ramifiés portant des conidies généralement incurvées de tailles variables (Figure 4). Le cycle pathogène de *B. oryzae* peut se résumer en 4 principales étapes (Figure 5). Lorsque les conidies entrent en contact avec le riz, elles émettent des tubes germinatifs qui adhèrent à la surface des feuilles grâce à une substance mucilagineuse. Il s'en suit la formation d'un appressorium qui permet la pénétration directe des cellules foliaires (Hau & Rush, 1982; Ou, 1985). Les hyphes mycéliens envahissent le mésophylle et produisent des conidies qui sont propagées par le vent et/ou par l'eau de pluie.

Bipolaris zizaniae, anciennement distinguée de *B. oryzae* sur la base des caractères morphologiques est maintenant conspécifique (Manamgoda et al., 2014 ; Xiao et al., 2015). *Drechslera oryzae*, *Luttrellia oryzae*, *Ophiobolus miyabeanus* et *Cochliobolus miyabeanus* sont également des synonymes de *B. oryzae*. L'adoption de la seule appellation *Bipolaris oryzae* pour désigner l'espèce est souhaitable (Manamgoda et al., 2012, 2014 ; Xiao et al., 2015).



Barre d'échelle : A-C = 10 μm ; D-J = 5 μm

Figure 4 : Conidiophores et conidies de *Bipolaris oryzae* (Marin-Felix et al., 2017)

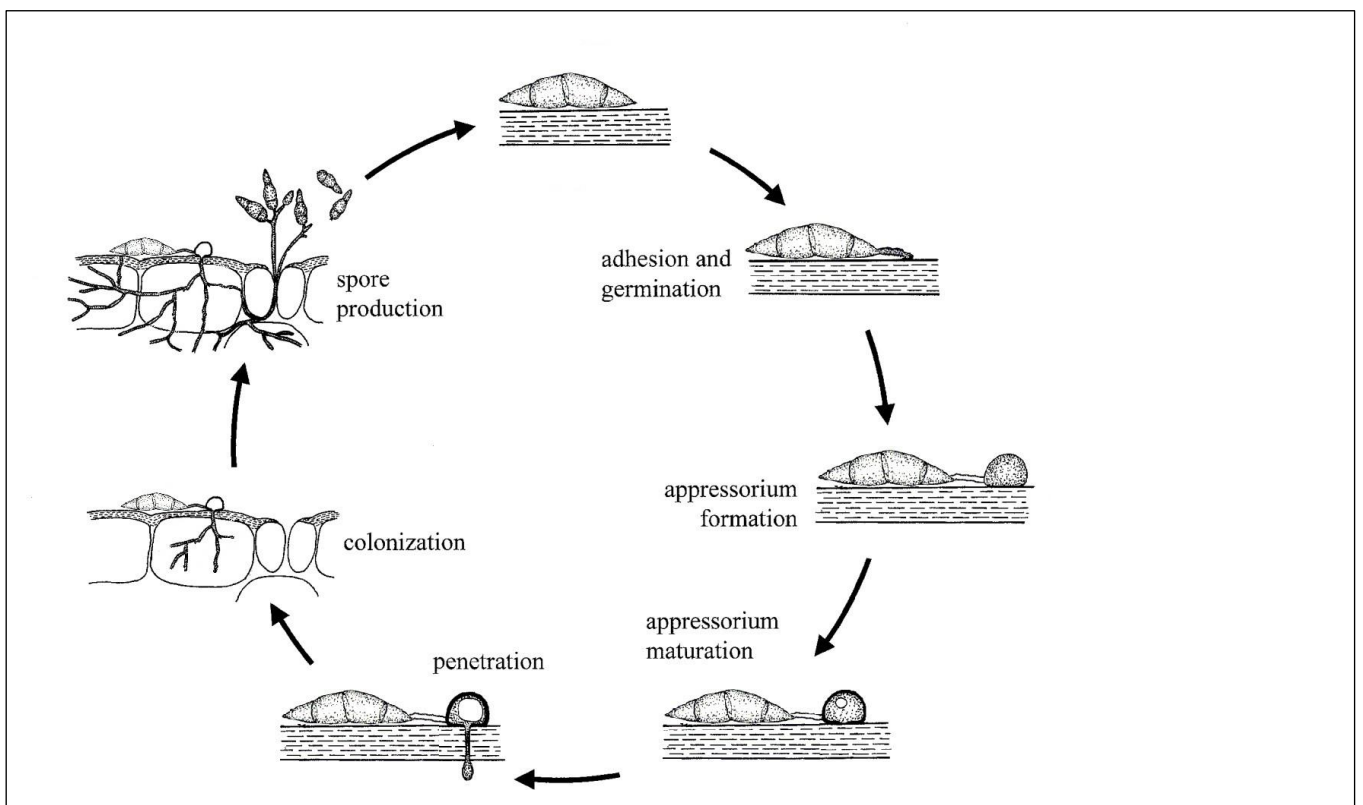
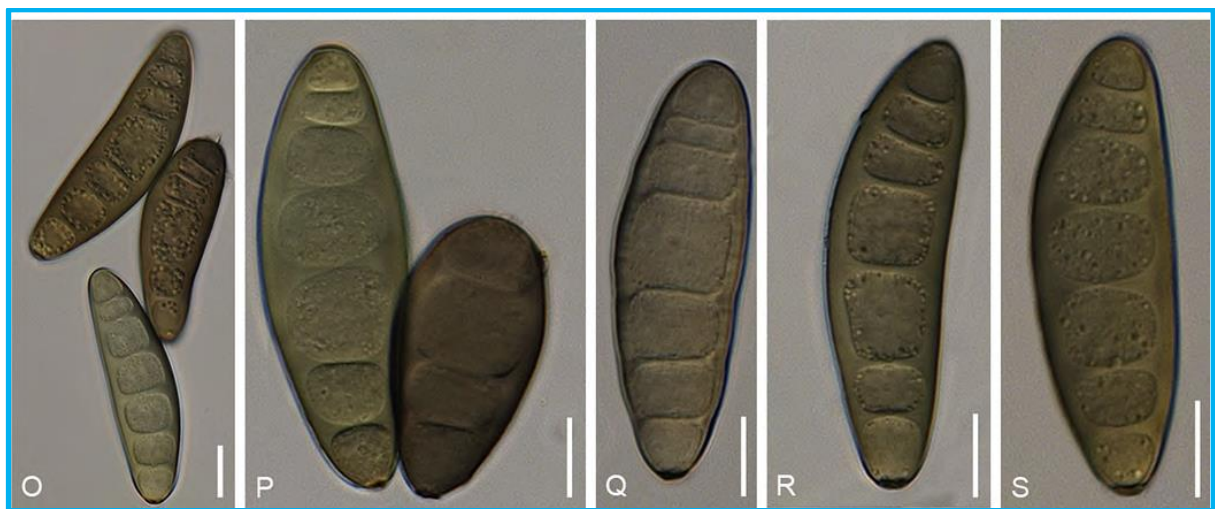


Figure 5 : Cycle pathogène de *Bipolaris oryzae* (De Bruyne, 2015)

Bipolaris oryzae étant l'espèce décrite le plus souvent comme l'agent responsable de l'helminthosporiose du riz et étant l'espèce la plus étudiée nous avons réalisé une synthèse bibliographique sur l'impact de l'helminthosporiose, et sur la diversité morphologique, pathologique et génétique de *Bipolaris oryzae*. Ce travail fait l'objet de l'article 1, « Brown spot of rice review : worldwide disease impact, and phenotypic and genetic diversity of the causal fungal pathogen *Bipolaris oryzae* », resoumis à *Plant Pathology* après révision. La version soumise de l'article est fournie à la page 27.

III.1.2. *Bipolaris cynodontis* (Marignoni) Shoemaker

Bipolaris cynodontis (Syn. *Helminthosporium cynodontis*, *Drechslera cynodontis*, *Cochliobolus cynodontis*) a des conidies de tailles variant entre 27-100 x 10-20 µm (Figure 6). Elle produit sur les feuilles de riz des lésions initialement à centre brun et des marges décolorées. Les lésions deviennent par la suite elliptiques de 2 à 4 mm avec des centres décolorés et des marges brun-foncé (Zehhar et al., 2008). *Bipolaris cynodontis* a été isolée des feuilles de riz (Motlagh & Kaviani, 2008 ; Zehhar et al., 2008) et des semences de riz (Farias et al., 2011 ; Meneses et al., 2014).



Barre d'échelle : 10 µm

Figure 6 : Conidies de tailles variables de *B. cynodontis* (Manamgoda et al., 2014)

III.1.3. *Bipolaris victoriae* (F. Meehan & H.C. Murphy) Shoemaker

Bipolaris victoriae (Syn. *Helminthosporium victoriae*, *Drechslera victoriae*, *Cochliobolus victoriae*) connue comme l'agent responsable de l'helminthosporiose de l'avoine, cette espèce représente 85% des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz dans le nord de l'Iran (Motlagh et Kaviani, 2008). Les conidies de *B. victoriae* sont droites ou courbées avec 4-11 septas et mesurent 25-110 x 10-19 µm (Sivanesan, 1987 ; Manamgoda et al., 2014) (Figure 7).

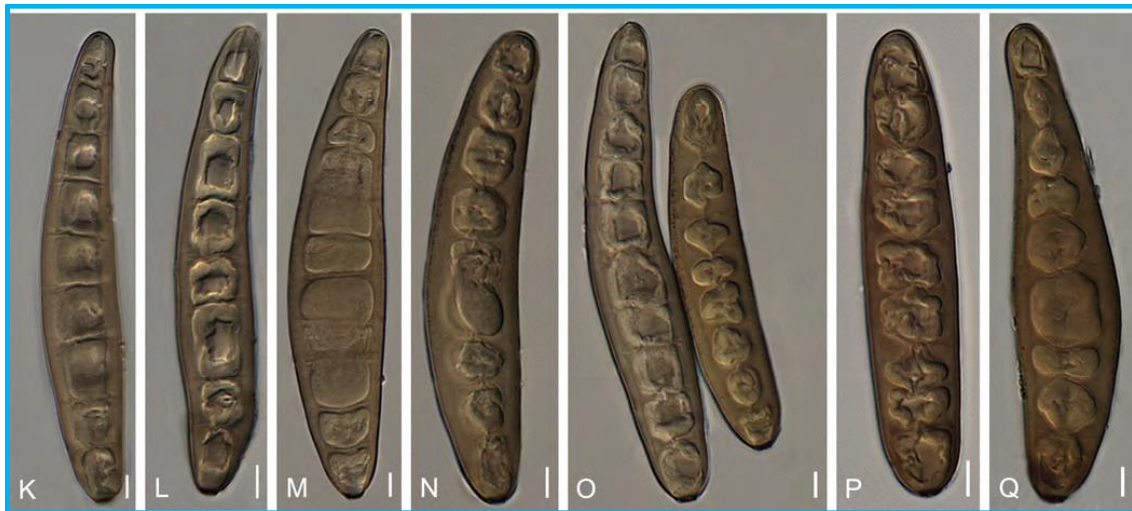


Figure 7 : Différentes tailles de conidies de *B. victoriae* (Manamgoda et al., 2014)

III.1.4. *Bipolaris zeicola* (G.L. Stout) Shoemaker

Bipolaris zeicola (Syn. *Helminthosporium zeicola*, *Drechslera zeicola*, *Helminthosporium carbonum*, *Drechslera carbonum*, *Cochliobolus carbonum*) est connue comme l'agent responsable de l'helminthosporiose mouchetée du maïs. Cependant, la race 3 de l'espèce a été signalée comme fortement pathogène au riz (Xiao et al., 1990; 1991). *Bipolaris zeicola* a été à l'origine de l'helminthosporiose de cultivars aromatiques de riz au Pakistan (Aslam et al., 2021). En Egypte, des brûlures de plantules de différents cultivars de riz par *B. zeicola* ont été observées (El-Shafey et al., 2018). *Bipolaris zeicola* est caractérisée par des conidies droites ou modérément incurvées, cylindriques, généralement larges au milieu et effilées vers les extrémités (Manamgoda et al., 2014 ;

El-Shafey et al., 2018). Les dimensions des conidies varient dans la gamme 45-105 x 10-22 µm avec 6-12 distoseptas (Manamgoda et al., 2014) (Figure 8).



Barre d'échelle : 5 µm

Figure 8 : Conidiophores et conidies de *B. zeicola* (Manamgoda et al., 2014)

III.1.5. *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard & Suggs

Exserohilum rostratum (Syn. *Drechslera rostrata*, *Setomelanomma rostrata*, *Bipolaris rostrata*, *Luttrellia rostrata*, *Setosphaeria rostrata*, *Helminthosporium rostratum*) possède une niche écologique large et une diversité considérable dans la nature (Lin et al., 2011). Elle infecte les plantes et peut causer des infections chez les animaux (Wu & Turgeon, 2013 ; Sharma et al., 2014). L'injection de corticostéroïdes contaminée par *E. rostratum* a entraîné aux USA une méningite (Andes & Casadevall, 2013 ; Lutwick, 2014 ; Sharma et al., 2014).

Exserohilum rostratum est caractérisée par des conidies droites ou légèrement courbées mesurant 15-200 x 7-29 µm (Figure 9). Les conidies sont pourvues d'un hile proéminent, des septas sombres et épais au niveau des cellules terminales (Sivanesan, 1987 ; Hernández-Restrepo et al., 2018). Il est admis aujourd'hui que l'espèce *E. rostratum* est conspécifique à *E. longirostratum*, *E. macginnisii*, *E. prolatum* et *H. leptochloae* (Hernández-Restrepo et al., 2018). *Exserohilum rostratum* a été associée à l'helminthosporiose du riz dans différents pays (Toher et al., 2016 ; Kaboré et al., 2021). Cette espèce a été également associée à des brûlures foliaires de riz au Sri-Lanka

(Ferdinandez et al., 2020). Elle est couramment isolée de la semence de riz (Cardona & Gonzáles, 2007 ; Ouédraogo et al., 2016 ; Imrani et al., 2019). La germination de semences de riz infectées peut être réduite de plus de 50% (Silva et al., 2016).

Exserohilum rostratum est un ascomycète hétérothallique, dont la reproduction sexuée a été démontrée par des croisements *in vitro* entre des isolats qui ont des allèles de compatibilité différents (Sivanesan, 1987 ; Kusai et al., 2016). Cependant, elle n'a jamais été observée dans la nature (Kusai et al., 2016).



Source : H. K. Kaboré, CIRAD, 2021 ; Barre d'échelle : 50 μm

Figure 9 : Conidies de tailles variables de *E. rostratum*

III.2. Méthodes de diagnostic de l'helminthosporiose du riz

III.2.1. Diagnostic par observations des symptômes et des structures fongiques

Le diagnostic de l'helminthosporiose du riz dans les parcelles se fait généralement par l'observation à l'œil nu des symptômes sur les feuilles et les grains. Considéré comme

la première étape d'une méthode basique, ces observations sont complétées par des caractérisations culturelles et morphologiques de *B. oryzae* suivant le protocole établi depuis 1964 et mis à jour régulièrement par l'Association Internationale d'Essais de Semences (ISTA, 2021). Les feuilles ou les grains de riz infectés sont disposés dans des boîtes de Petri contenant des papiers Wathman humidifiés. Les boîtes sont incubées à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 7 jours sous 12h de lumière alternée à 12h d'obscurité. Le mycélium et les conidies du champignon sont observés à la loupe binoculaire puis au microscope pour plus de précisions sur les structures.

L'incubation des grains de riz infectés sur du milieu *Potato Dextrose Agar* (PDA) permet une meilleure détection de *B. oryzae* (Habib et al., 2012). Selon Faruq (2016), cette technique favorise l'émergence de l'inoculum contenu à l'intérieur des grains. Yamaguchi & Mutsunobu (2010) ont mis en place des milieux de culture sélectifs pour *Bipolaris* et *Exserohilum*.

Le diagnostic de l'helminthosporiose du riz par l'observation des symptômes et la caractérisation morphologique de l'agent pathogène a été utilisé depuis longtemps et continu d'être utilisé surtout dans les pays du Sud. Cependant, cette méthode a de nombreuses limites. Par exemple, aux premiers stades de développement de l'helminthosporiose du riz, les symptômes peuvent être confondus avec ceux de la pyriculariose (Archana, 2014), de la cercosporiose, de la curvulariose (Imran et al., 2022) ou de la ramulariose (Zhou et al., 2021). De plus, les caractères morphologiques des espèces du genre *Bipolaris* ne sont pas assez distincts pour les identifier. Par ailleurs, l'identification basée sur la morphologie des conidies est parfois impossible du fait que, dans les conditions de laboratoire, certains isolats ne sporulent pas (Archana, 2014).

III.2.2. Diagnostic par analyse d'images des symptômes

Le développement rapide des technologies de traitement d'image et de reconnaissance de forme a ouvert une nouvelle voie pour le diagnostic des maladies des plantes (Chen et al., 2020 ; Kumar et al., 2021). Cette méthode de diagnostic par traitement d'image comprend le filtrage d'une image d'entrée, la séparation de la

région malade de la région saine, l'extraction et le tri de caractéristiques (Kumar et al., 2021). Ces travaux visent à terme, l'intégration de ces technologies dans les appareils mobiles pour surveiller et identifier automatiquement un large éventail de maladies des plantes en général et du riz en particulier (Chen et al., 2020).

Bien que cette technologie soit récente, elle a été beaucoup expérimentée sur l'helminthosporiose du riz. Les tests réalisés sur les feuilles de riz ont montré des taux d'identification réussie variant de 94 à 100% en fonction du matériel et des algorithmes utilisés (Ihsan et al., 2020 ; Ramesh & Vydeki, 2020 ; Bari et al., 2021). Ces travaux demeurent actuellement à l'étape d'expérimentation.

III.2.3. Diagnostic par amplification PCR des champignons isolés de symptômes

Le développement de plateformes spécialisées dans l'amplification PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la conception des sondes, de code-barres ADN et, plus récemment, le séquençage de nouvelle génération ont réduit les coûts des outils basés sur la biologie moléculaire faisant de ces techniques un pilier solide pour le diagnostic des maladies (Kumar et al., 2021).

Le diagnostic de l'helminthosporiose du riz par amplification PCR peut se faire par l'utilisation d'amorces universelles ou par l'utilisation d'amorces spécifiques. La caractérisation par des amorces universelles nécessite un séquençage suivi d'une comparaison des séquences obtenues avec celles contenues dans des bases de données (Faruq, 2016). Les régions de l'espaceur interne transcrit (ITS) de l'ADN ribosomique, la grande sous unité (LSU) de l'ARN ribosomique, le gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et le gène du facteur d'élongation alpha (EF1) ont permis de distinguer *Bipolaris oryzae* des autres espèces morphologiquement similaires (Manamgoda et al., 2014 ; Sobanbabu et al., 2018 ; Chaijuckam et al., 2019 ; Mohamed & Gomaa, 2019 ; Nayak & Hiremath, 2019 ; Liu et al., 2021).

Contrairement aux amorces universelles, les amorces spécifiques ne nécessitent pas d'isolement du champignon, ni de séquençage. A partir des régions ITS, Archana (2014) a conçu un couple d'amorces BoVf/BoVr qui permet d'identifier et de détecter *B. oryzae* sur les grains et les feuilles de riz. A partir du gène de scytalone déshydratase, Su'udi et al. (2012) ont défini le couple d'amorces CmSCD1_44F / CmSCD1_302R qui permet de détecter *B. oryzae* dans les feuilles de riz un jour après l'inoculation. Les méthodes moléculaires surmontent certaines limites des méthodes conventionnelles et sérologiques dans le diagnostic des champignons (El-Abbasi et al., 2020; Hariharan & Prasannath, 2021). Cependant, elles ne renseignent pas sur la viabilité de l'inoculum détecté.

III.3. Facteurs favorables à l'helminthosporiose du riz

Le stade de développement du riz, la température, la lumière, l'humidité et la fertilisation sont déterminants dans les épidémies d'helminthosporiose. Van et Sangchote (2006) ont rapporté que les infections de l'helminthosporiose du riz étaient plus importantes au stade grains pâteux qu'aux stades grains laiteux et floraison. Ouédraogo (2008) a observé des pics de la maladie aux stades plein tallage, montaison et épiaison. Il a également noté une corrélation significative entre les infections foliaires, la température et l'hygrométrie. Selon Biswas et al. (2018), des températures minimales situées entre 23 et 26°C, maximales variant de 32 à 34°C, accompagnées d'une humidité relative de 80 à 85% avec des précipitations modérées et un ensoleillement moyen favorisent l'helminthosporiose du riz.

L'helminthosporiose du riz a été qualifiée de maladie des riziculteurs pauvres par Zadoks (1974) : "In rice, the poor man's disease was *Helminthosporium oryzae*;... the rich man's disease, *Pyricularia oryzae*...". En effet la maladie se manifeste surtout dans les conditions de déséquilibre en éléments minéraux du sol et de mauvaise alimentation en eau du riz (Ou, 1985 ; Barnwal et al., 2013 ; Sunder *et al.*, 2014). Dariush et al. (2020) ont observé que des variétés résistantes en condition d'irrigation normale perdaient leurs capacités à résister à l'helminthosporiose lorsqu'elles se retrouvaient

dans les conditions de stress hydriques. Les dégâts de l'helminthosporiose du riz sont sévères dans les sols pauvres en silice (Datnoff et al., 1991 ; Santos et al., 2011 ; Rivera et al., 2021). Une variation croissante des doses d'azote (0-180 kg/ha) entraîne une diminution de l'helminthosporiose indépendamment de la variété de riz utilisée (Sunder et al., 2005).

III.4. Méthodes de lutte contre l'helminthosporiose du riz

De nombreux articles de revues résument les méthodes de lutte contre l'helminthosporiose du riz par la résistance variétale, les techniques culturales, l'utilisation d'extraits de plantes, des organismes antagonistes et des fongicides de synthèse (Sattari et al., 2015 ; Pandey & Sharma, 2019 ; Imran et al., 2020 ; Surendhar et al., 2021). Dans cette synthèse, nous reprenons les principales méthodes de lutte contre l'helminthosporiose du riz.

III.4.1. Résistance variétale

La résistance variétale est, pour les producteurs, un moyen efficace et économique de lutte contre l'helminthosporiose du riz (Sattari et al., 2015). Elle devrait permettre de réduire les pertes de rendement et l'utilisation des fongicides (Hossain et al., 2014). Les criblages variétaux dans différents pays ont permis d'identifier des lignées et des cultivars résistants (Tableau 3). Cependant, les efforts de sélection n'ont pas été aussi actifs que pour d'autres maladies du riz comme la pyriculariose et le flétrissement bactérien du riz (Savary et al., 2011). Les premières analyses génétiques ont débuté en 2008 et 3 QTL (Quantitative Trait Loci) ont été identifiés sur les chromosomes 2, 9 et 11 des lignées issues des croisements entre 'Tadukan' (résistant) et 'Hinohikari' (sensible) (Sato et al., 2008). Sur les chromosomes 2, 7, 9 et 11 des lignées issues des croisements entre 'CH45' (résistant) et 'Koshihikari' (sensible) 4 QTL ont été identifiés (Mizobuchi et al., 2016 ; Matsumoto et al., 2017). Quatre QTL ont été également

identifiés sur les chromosomes 3, 6 et 7 des lignées issues des croisements entre 'Dawn' (résistant) et 'Koshihikari' (sensible) (Ota et al., 2021).

La résistance à l'helminthosporiose du riz semble donc quantitative et il a été montré qu'elle est sujette à l'interaction avec l'environnement (Sato et al., 2008, 2015). Selon Dariush et al. (2020), sur 13 variétés classées résistantes après un criblage en condition d'irrigation normale, une seule a exprimé sa résistance une fois dans des conditions de stress hydrique. A l'influence de l'environnement physique s'ajoute la diversité des souches de *Bipolaris oryzae*. L'inoculation de différentes variétés de riz originaire d'Afrique de l'Ouest avec de multiples souches de *B. oryzae* a montré des interactions entre isolats et variétés (Boka et al., 2018). La variabilité du comportement des variétés de riz en fonction des souches a été aussi observée en Egypte (Bekheet et al., 2021). Selon Pantha et al. (2017), les variétés identifiées comme résistantes lors des criblages contre l'helminthosporiose du riz doivent être réévaluées périodiquement à cause de l'apparition probable de nouvelles souches plus virulentes. Bien que les cultivars et les lignées résistants ne soient pas dotés d'une immunité totale, ils guident déjà le choix variétal des producteurs et constituent une base pour les programmes de sélection variétale.

Tableau 3 : Cultivars et lignées de riz résistants à l'helminthosporiose du riz

Pays	Nom de la lignée ou du cultivar résistant	Type d'exposition à l'inoculum	Références
Côte d'ivoire	Wita9, Bouaké-am, NIL130, WAS63-22-5-1-7-7, JT2, CK801	Champ, inoculum naturel	Bouet et al., 2015
Inde	NDR-359, CR-1, CR-2, N-18, PR-103, IR-36, Prasd, Narendra-2, IR-597, OC-1339, Cross-116 Rasi, JGL-1798, BR-2655, Raksha, KMP-201, BI-33, Sagbatta, Honnekattu, Klame, Kavekantak, Togarshi, IET-23403, IET-22876, IET-23392	Milieu contrôlé et Champ	Alam et al., 2016 ; Channakeshava & Pankaja, 2018; Hosagoudar et al., 2019
Iran	Gharib-Siyah-Reihani	Champ, inoculum naturel	Dariush et al., 2020
Népal	Kabeli Radha-4, Sabitri	Milieu contrôlé et champ	Aryal et al., 2016 Pantha et al., 2017
Nigeria	ITA 123, Suakoko	Champ, inoculum naturel	Nneke, 2012
Pakistan	HHZB, IR80416-B-32-3, IR84677-34-1-B, HHZ11-Y6-Y1-Y1, RSP-4, IRRI-43, PARC-1, PARC-7, PARC-8, PARC-13,	Milieu contrôlé, inoculation artificielle Champ, inoculum naturel	Yaqoob et al., 2011 Arshad et al., 2013 Ashfaq et al., 2021

III.4.2. Lutte biologique

L'une des définitions courantes de la lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes causées par un organisme nuisible à une production végétale (Suty, 2010). La lutte biologique contre l'helminthosporiose du riz se fait par l'utilisation de champignons et bactéries antagonistes, les extraits de plantes et des sous-produits animaux. De nombreux tests *in vitro* ont montré l'efficacité des microorganismes et des extraits de plantes sur *B. oryzae* (Nguefack et al., 2013 ; Jatoi et al., 2015 ; Nikiéma et al., 2017 ; Dorneles et al., 2018). Dans cette synthèse sur les méthodes nous avons choisi de nous focaliser sur les tests réalisés *in vivo* car le potentiel d'application au champ est plus élevé.

III.4.2.1. Microorganismes antagonistes

Des formulations à base du champignon *Trichoderma harzianum* appliquées à 20g/l au 60, 70 et 80^{ème} jour après repiquage ont réduit de moitié le niveau de la maladie et augmenté de plus de 13% le poids de grains par panicule comparativement aux parcelles non traitées (Dey & Monjil, 2016). Le traitement de la semence de riz avec *Trichoderma viride* associé aux traitements foliaires avec *Pseudomonas fluorescens* a réduit la sévérité de l'helminthosporiose de 23% et a entraîné un gain de rendement en grain de 9 q/ha par rapport aux parcelles non traitées (Kumar et al., 2015).

III.4.2.2. Extraits de plantes

Le neem (*Azadirachta indica*) est l'une des plantes dont l'extrait a montré une efficacité contre l'helminthosporiose du riz (Harish et al., 2008 ; Kumar & Simon, 2016). Lorsqu'il est appliqué dès l'apparition des symptômes et renouvelé 15 jours après, il peut réduire l'incidence de l'helminthosporiose du riz de 75% et induire une augmentation de rendement en grains de 23% (Harish et al., 2008). Suivant le même protocole, l'extrait des feuilles de *Nerium oleander* a réduit l'incidence de l'helminthosporiose de 53% avec une augmentation du rendement en grain de 18% (Harish et al., 2008). L'huile essentielle de *Callistemon citrinus* en traitement des semences, associée aux traitements foliaires avec des extraits éthanoliques et aqueux

de la même plante ou de *Cymbopogon citratus*, réduisent significativement l'helminthosporiose du riz en augmentant les rendements en grains de 25-55% en riziculture irriguée et de 54–137% en riziculture pluviale (Nguefack et al., 2013).

III.4.2.3. Sous-produits animaux

L'application foliaire d'urine pure de vache compostée pendant 7 jours à raison de 600 l/ha du 30^{ème} jour après repiquage au 90^{ème} jour après repiquage du riz à intervalle de 20 jours a réduit de 57% la sévérité de l'helminthosporiose du riz (Sadhukhan et al., 2018).

III.4.3. Lutte chimique

La lutte contre l'helminthosporiose du riz par les fongicides de synthèse se fait par des traitements de la semence et des feuilles ou uniquement par des traitements foliaires. Il ressort des différents tests d'efficacité que le propiconazole (triazoles) est le produit le plus efficace en traitement foliaire (Sunder et al., 2005 ; Gupta et al., 2013 ; Kumar et al., 2017 ; Shrestha et al., 2017 ; Poudel et al., 2019 ; Kamei et al., 2020). Cependant, la dose et la période d'application sont importantes. Selon Gupta et al. (2013), l'application foliaire du propiconazole à la dose de 0,1% dès l'apparition des symptômes a permis de réduire la sévérité de l'helminthosporiose de plus de 60% et entraîné une augmentation des rendements en grains de plus de 10% comparativement aux parcelles non traitées. Lorsque les applications de propiconazole se font jusqu'à l'émergence de la moitié des panicules, la réduction de l'incidence foliaire atteint 86 % avec une amélioration du rendement en grains de plus de 14% (Sunder et al., 2005). L'efficacité du propinèbe (dithiocarbamates) sur l'helminthosporiose du riz est proche de celle du propiconazole (Kamei et al., 2020). Les traitements foliaires au propinèbe (70% à la dose de 2,5 kg/ha) effectués à partir du 20^{ème} jour après semis au stade épiaison engendrent des gains en rendement en grains de 80% comparativement aux parcelles sans protection (Bouet et al., 2020). Pour Kumar et al. (2017), le traitement de semence au carbendazime (benzimidazoles, carbamates) à la dose de 2g/kg associé au traitement foliaire au propiconazole à la

dose de 1ml/L réduit la sévérité de 37% en induisant une augmentation des rendements en grains de 55% (Kumar et al., 2017). Les mélanges azoxystrobine (triazole) + tébuconazole (triazoles ; Poudel *et al.*, 2019), carbendazime + mancozèbe (dithiocarbamates ; Shrestha et al., 2017), azoxystrobine +difénoconazole (triazoles ; Barúa et al., 2019), trifloxystrobine (strobilurines) + tébuconazole (Boka & Denezon, 2020) ont réduit significativement la sévérité de l'helminthosporiose du riz et induit des gains de rendements. Bien que de nombreuses formulations soient efficaces contre l'helminthosporiose du riz, leurs utilisations doivent être raisonnées compte tenu des conséquences potentiellement néfastes sur l'homme et l'environnement, et la possibilité d'apparition de souches résistantes.

III.4.4. Lutte intégrée

La lutte intégrée contre l'helminthosporiose du riz est la combinaison de différentes méthodes de lutte compatibles. La désinfection du sol de la pépinière, sa fertilisation avec du DAP et le traitement de la semence avec de la carbendazime combinée à la fertilisation (N:P:K:Zn 90:450:30:18) de la rizière assurent un contrôle efficace de l'helminthosporiose du riz et, en même temps, de la pyriculariose du riz (Chelak et al., 2019). Pour limiter les impacts de l'helminthosporiose du riz et d'autres maladies entraînant la décoloration des grains de riz, Balgude & Gaikwad (2016) recommandent la réalisation de la pépinière de riz sur des planches surélevées et l'incorporation de cendre de paille de riz (riche en silice), le traitement de la semence avec du bénomyl (carbamates) suivi de *Pseudomonas fluorescens* associés à des traitements foliaires du riz au propiconazole. La pulvérisation de difénoconazole à 315 mL/ha combinée à une fertilisation foliaire (NPK 20 20 20 à la dose de 500 g/ha) atténue l'incidence de l'helminthosporiose du riz et donne le meilleur revenu à l'hectare (Asghar et al., 2019).

Article 1 : Brown spot of rice review: worldwide disease impact, and phenotypic and genetic diversity of the causal fungal pathogen *Bipolaris oryzae*

Resoumis à *Plant Pathology* après corrections (Manuscript ID PP-22-065)

Kouka Hilaire Kaboré * ^{1,2,3}, Abalo Itolou Kassankogno ⁴, Didier Tharreau ^{2,3}

¹ UMR BIOGER, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon, France

² CIRAD, UMR PHIM, 34398 Montpellier, France

³ PHIM, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, IRD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

⁴ INERA, Laboratoire de Phytopathologie, LMI PathoBios, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Corresponding author, E-mail: koukas2@yahoo.fr



Brown spot of rice review: worldwide disease impact, and phenotypic and genetic diversity of the causal fungal pathogen *Bipolaris oryzae*

Journal:	<i>Plant Pathology</i>
Manuscript ID	PP-22-065
Manuscript Type:	Review Article
Date Submitted by the Author:	09-Feb-2022
Complete List of Authors:	Kaboré, Hilaire; CIRAD BIOS, Kassankogno, Abalo; INERA Tharreau, Didier; CIRAD, UMR BGPI
Topics:	population genetics, epidemiology
Organisms:	fungi
Other Keywords:	Brown spot, rice, <i>Bipolaris oryzae</i> , diversity, reproduction, population genetics

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Brown spot of rice review: worldwide disease impact, and phenotypic and**
2 **genetic diversity of the causal fungal pathogen *Bipolaris oryzae***

3 Kouka Hilaire Kaboré * ^{1,2,3}, Abalo Itolou Kassankogno ⁴, Didier Tharreau ^{2,3}

4 ¹ UMR BIOGER, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, 78850 Thiverval-
5 Grignon, France

6 ² CIRAD, UMR PHIM, 34398 Montpellier, France

7 ³ PHIM, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, IRD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

8 ⁴ INERA, Laboratoire de Phytopathologie, LMI PathoBios, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

9 Corresponding author, E-mail: koukas2@yahoo.fr

10

11 **Abstract**

12 Rice brown spot caused by *Bipolaris oryzae* (*syn. Cochliobolus miyabeanus*) is a re-
13 emerging disease worldwide. Previous studies have individually estimated losses
14 caused by this pathogen on rice. Morphological, pathological, and genetic diversity
15 characterizations of the pathogen were done in several countries. Under natural
16 conditions the disease causes approximately 4% in grain yield losses, ranging from
17 1% to 34 % in different countries in Africa and Asia. Rice seeds can be infected at
18 relatively low (0.5%) to a high (76%) rate. *Bipolaris oryzae* colonies show a wide range
19 of colors from black to white, and olive, when grown on standard culture media. Strains
20 isolated from rice are generally virulent with diverse aggressiveness, even within
21 populations from the same geographic area. Clonal reproduction is predominant during
22 epidemics. However, low clonal fraction and balanced mating types suggest that
23 sexual reproduction could take place in some areas. Most field studies reported high
24 level of genetic diversity of the pathogen and with low population structure, suggesting
25 that gene flow occurs between and among populations. The review of literature on *B.*

26 *oryzae* shows that the impact of brown spot on rice yield was seldom assessed
27 quantitatively and precisely. It also points out that the knowledge of the population
28 biology and structure of the pathogen is scarce. So, both field work to assess the
29 impact of the disease, its epidemiology and the population studies (taking advantage
30 of genomic tools) need to be investigated to determine the importance of rice brown
31 spot and to improve its control.

32

33 **Keywords:** *Brown spot*, rice, *Bipolaris oryzae*, diversity, reproduction, population
34 genetics

35

36 **Introduction**

37 Many species of the genus *Bipolaris* infect a wide range of crops around the world
38 (Manamgoda et al., 2014; Sun et al., 2020). *Bipolaris* fungi causing brown lesions such
39 as Spot blotch of wheat (caused by *Bipolaris sorokiniana*), Southern corn blight of
40 maize (caused by *B. maydis*) and Brown spot (BS) of rice (caused by *B. oryzae*) have
41 strong socio-economic impacts due to the importance of these crops in human and
42 animal food chains (Bengyella et al., 2018). BS of rice can occur at any plant
43 phenological stage, reducing grain germination, increasing seedling mortality, and
44 reducing the photosynthetic leaf area due to the occurrence of lesions leading to poor
45 plant development and poor grain filling (Kumar et al., 2017).

46 Currently, BS of rice is found in most countries where rice is cultivated in Africa, Asia,
47 Americas, Oceania and Europe (CABI, 2020; Farr & Rossman, 2020), and of concern
48 in Burkina Faso (Ouédraogo, 2008; Barro et al., 2021), United States (Castell-Miller &
49 Samac, 2019), Bangladesh (Hossain et al., 2014), Côte d'Ivoire (Bouet et al., 2015),
50 Malaysia (Mahmad Toher et al., 2016) and India (Valarmathi & Ladhalakshmi, 2018;

51 Nayak & Hiremath, 2019). Worldwide losses in rice can reach 4% and BS is in the top
52 five list of the most damaging pests and diseases of the crop (Savary et al., 2019). It
53 is known as “The poor farmers’ rice disease” (Zadoks, 1974), where mineral
54 deficiencies in the soil have long been considered to be a major factor contributor in its
55 occurrence (Ou, 1985; Moletti et al., 1997; Barnwal et al., 2013; Pantha & Yadav, 2016;
56 Kumar et al., 2017). However, the disease re-emergence (sensu Milgroom, 2017) in
57 several rice-cultivated areas in the last decade has led to identify other factors, such
58 as high temperatures (e.g. global warming) and poor water supply (Savary et al., 2005;
59 Savary et al., 2011; Pantha & Yadav, 2016; Kumar et al., 2017) that not only cause
60 plant stress but also they could accelerate fungal growth and reproduction (Bregaglio
61 et al., 2013; Mizobuchi et al., 2016).

62 Among the different species of *Bipolaris* that were isolated from lesions attributed to
63 BS of rice (Gnancadja-André et al., 2005; Motlagh & Kaviani, 2008; El-Shafey et al.,
64 2011; Nazari et al., 2015), *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker (syn.
65 *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, teleomorph, *Cochliobolus miyabeanus* (Ito
66 and Kuribayashi) Drechsler) is considered as the most important. It is frequently
67 encountered in rice seed lots from Sub-Saharan Africa, Latin America, East Asia,
68 South East Asia, South Asia and Europe (Mew & Gonzáles, 2002). In addition, artificial
69 inoculation tests showed that *B. oryzae* is the most pathogenic *Bipolaris* species
70 (Motlagh & Kaviani, 2008; El-Shafey et al., 2011).

71 Early reports of BS symptoms in rice date back to 1892 in Japan (Ohata 1989 cited by
72 Mizobuchi et al., 2016). However, it was not until 1900 that *Helminthosporium oryzae*
73 (*Bipolaris oryzae*) was identified as the causative agent (Breda de Haan, 1900). This
74 was followed by reports of the disease in The Philippines in 1918, the United States in
75 1920 (Louisiana; Ocfemia, 1924), India in 1922 (Chakrabarti, 2001), Australia in 1952

76 (Shivas, 1989), Madagascar in 1957 (Dadant et al., 1960) and most recently in 2017
77 in Paraguay (Quintana et al., 2017). Nowadays, BS is present in almost all rice-
78 producing countries (CABI, 2020; Farr & Rossman, 2020).

79 *Bipolaris oryzae* isolates are morphological, pathological and molecular diverse. They
80 exhibit a large range of variation of color, growth capacity and spore size (Ocfemia,
81 1924; Chang, 1978; Sivanesan, 1987; Nayak & Hiremath, 2019; Jaiganesh & Kannan,
82 2019), as well as genetic diversity as measured in different studies (Kamal & Mia, 2009;
83 Motlagh & Anvari, 2010; El-Shafey et al., 2011; Burgos et al., 2013; Kandan et al.,
84 2013; Archana et al., 2014a,b; Ahmadpour et al., 2018; Chaijuckam et al., 2019).
85 Understanding diversity and the mechanisms that influence genotypic changes in the
86 pathogen population is a fundamental step in disease management strategies (Sunder
87 et al., 2014). The aim of this paper is to provide a state-of-the-art review of the socio-
88 economic impact of BS disease caused by *B. oryzae* on rice and of its morphological,
89 pathologic and genetic diversity.

90

91 **BS symptoms on rice**

92 *Bipolaris oryzae* is a necrotrophic fungus that infects coleoptiles, leaf blades, sheath,
93 stems, glumes and seeds (Ou, 1985; Sunder et al., 2014). Node and internodes are
94 rarely infected (Ou, 1985). However, when they occur mainly on panicle stalk at the
95 junction of leaf to stalk resulting in partially filled to chaffy grains and occasional
96 hanging down of panicles due to the development of wet rot (Sunder *et al.*, 2004).

97 The most visible lesions appear on the leaves and glumes. In leaves, infections start
98 as small circular or oval brown spots with a near uniform distribution (Figure 1A),
99 lesions enlarge with grey or whitish centers (Figure 1B, Burgos et al., 2013). In
100 susceptible varieties, the lesion sizes can reach more than 1 cm in diameter (Ou,

101 1985). Lesions are often surrounded by a yellow halo thought to be caused by toxins
102 produced by the fungus (Vidhyasekaran *et al.*, 1986; De Bruyne *et al.*, 2016).
103 Infected rice seeds are spotted, and the fungus may localize only to the sterile lemmas
104 or cover the entire surface of the grain (Mew & Gonzáles, 2002). The embryo and
105 endosperm are sometimes infected (Van Ba & Sangchote, 2006).

106

107 **Other host plants of *B. oryzae***

108 In addition to Asian (*Oryza sativa*) and African (*O. glaberrima*) cultivated rice, *B. oryzae*
109 has been described on many wild species of the genus *Oryza* such as *O. australiensis*,
110 *O. latifolia*, *O. rufipogon*, but also on species of the *Zizania* genus: *Z. aquatica*, *Z.*
111 *caduciflora*, *Z. latifolia* and *Z. palustris* (Nyvall & Percich, 1999; Manamgoda *et al.*,
112 2014; Farr & Rossman, 2020; Liu *et al.*, 2021). The symptoms described on wild rice
113 leaves are similar to those described on cultivated rice.

114 *Bipolaris oryzae* was also reported on *Alopecurus aequalis*, *A. geniculatus*, *Arachis*
115 *hypogaea*, *Chikusichloa aquatica*, *Cordia trichotoma*, *Cosmos bipinnatus*,
116 *Cunninghamia lanceolate*, *Brachypodium distachyon*, *Echinochloa crus-galli*, *Eleusine*
117 *indica*, *Leersia hexandra*, *Ischaemum rugosum*, *Panicum colonum*, *P. maximum*, *P.*
118 *virgatum*, *Setaria italica*, *Strelitzia nicolai*, *Triticum aestivum*, *Typha orientalis*, *Zea*
119 *mays* (Krupinsky *et al.*, 2004; Sunder *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018; Kaspary *et al.*,
120 2018, 2019; Wang *et al.*, 2019; Farr & Rossman, 2020). Some of these plants species
121 are found in rice fields and may act as alternative hosts (Chakrabarti, 2001; Kumar *et*
122 *al.*, 2017).

123

124 **BS disease and its worldwide socio-economic impact**

125 Epidemiological studies have estimated the socio-economic impact of BS on rice
126 (Table I), which largely depends on the type of varieties, plant age at the time of
127 infection and environmental conditions (Hossain et al., 2014; Choudhury et al., 2019).
128 During the 1942 epidemic in Bengal, grain field losses were estimated between 40%
129 to 90% and contributed to the great famine of 1943 and to a staggering number of 2
130 million human deaths (Ghose et al., 1960; Padmanabhan, 1973).

131 In the United States, the severity of fungal brown spot (FBS) in *Zizania* grain production
132 can reach 52%, and estimations indicated that FBS caused the State of Minnesota
133 annual losses of \$2.5 million (Nyvall et al, 1995). In Nepal, depending on the cultivars,
134 average leaf severity is estimated to range from 20% to over 50% (Magar, 2015;
135 Pantha et al., 2017), and 45% to 77% in Bangladesh with incidence values of 40% to
136 80% (Rashed et al., 2002). In Africa, average grain yield losses of 12% to 24%
137 (Awoderu, 1974), 8% to 23% (Fomba & Singh, 1990) and 10% to 16% (Ouédraogo,
138 2008) were recorded in Nigeria, Sierra Leone and Burkina Faso, respectively.

139 Prevalence (percentage of infected seed lots) and rates of rice seed infection by *B.*
140 *oryzae* (percentage of infected seed) are summarized in Table II. Seed health
141 assessments have shown that, depending on the rice-growing area in Burkina Faso,
142 prevalence vary from 77% to 97% (Ouédraogo et al., 2016), 38% to 100% in Ghana
143 (Sadia, 2012) and 37% to 90% in Brazil (Meneses et al., 2014). Levels of infected
144 seeds are high to moderate reaching 76% in Burkina Faso, 72% in Nepal, 45% in
145 Pakistan, 41% in Bangladesh and 35% in National Wildlife Refuge in Minnesota (USA).
146 The average rate of rice seeds infected by *B. oryzae* in some regions of Brazil is higher
147 than the 5% rate tolerated by seed regulations (Meneses et al., 2014). Depending on
148 the level of infection, *B. oryzae* can reduce rice grain germination by 20% to 84%
149 (Kamal & Mia, 2009). Infected rice grains mostly develop rotten coleoptiles and young

150 roots (Nghiep & Gaur, 2004). This rotten coleoptiles and young roots leads to seedling
151 damping-off , which can be very detrimental especially to the success of the crop year,
152 especially in rainfed rice cultivation because of its exclusive dependence on rain water.
153 Grains infected with *B. oryzae* have direct consequences for their postharvest
154 transformation and grains heavily infected have a sour taste after cooking, making
155 them unfit for human consumption and even animal feed (Chakrabarti, 2001).

156 157 **Reproduction of *B. oryzae* in the field and disease cycle**

158 The sexual and asexual cycles of the fungus can be induced under controlled
159 environmental conditions. In the field, asexual reproduction is the predominant
160 reproduction mode. Hyphae in the lesions produce asexual spores (conidia). The
161 conidia emit germ tubes that adhere to the leaf surface thanks to a mucilaginous
162 substance. In most cases, the fungus forms an appressorium that allows direct
163 penetration of leaf cells (Hau & Rush, 1982; Ou, 1985). In some rare cases (2%), germ
164 tubes penetrate through stomata (Horino & Akai, 1966 cited by Ou, 1985). The mycelial
165 hyphae invade the mesophyll. Lesions appear 18 to 36 hours post-infection (Tullis,
166 1935; Johnson & Percich, 1992; Dallagnol et al., 2009). It is thought that 10 to 14 days
167 is sufficient for *B. oryzae* in wild rice (*Zizania palustris*) to complete a cycle and produce
168 conidia (Johnson & Percich, 1992), while in cultivated rice the peak of production of
169 new conidia from lesions is about 6 days after infection (Ou, 1985; Barnwal et al.,
170 2013).

171 *Bipolaris oryzae* is a heterothallic fungus, that is, its sexual reproduction requires
172 strains of opposite mating types idiomorphs (MAT1-1 and MAT1-2) (Ueyama & Tsuda,
173 1976). Structurally and functionally, the mating types Idiomorphs are completely
174 different (Turgeon *et al.*, 1995). There are not able to recombine with each other and
175 are therefore inherited uniparentally (Turgeon, 1998). Molecular characterization of

176 isolates from the same rice fields indicates coexistence of MAT1-1 and MAT1-2
177 isolates in nearly equal proportions and a small group of isolates were capable of
178 sexual reproduction *in vitro* (Shamsi et al., 2010; Castell-Miller & Samac, 2012;
179 Ahmadpour et al., 2018). The coexistence of MAT1-1 and MAT1-2 is necessary but
180 not sufficient for sexual reproduction to take place. In addition to the presence of both
181 mating types, sexual reproduction requires a complex process from the production of
182 gametes to the production of sexual spores (Leslie & Klein, 1996). In fungi, fertility
183 determinants are sometimes lost, making sexual reproduction impossible (Leslie &
184 Klein, 1996).

185 High genotypic diversity, low clonal fractions, and alleles in linkage equilibrium are
186 indications of sexual reproduction in heterothallic fungi (Milgroom, 1996). High
187 genotypic diversity and low clonal fraction were observed in several *B. oryzae*
188 populations from Bangladesh, India, Iran, Japan and the USA (Ahmadpour et al., 2018;
189 Castell-Miller & Samac, 2012; Kamal & Mia 2009; Kumar et al., 2011; Kumar, 2016;
190 Motlagh & Anvari, 2010; Nazari et al., 2015). A collection of 168 *B. oryzae* isolates
191 isolated from cultivated *Z. palustris* in the USA, produced 102 haplotypes (Castell-
192 Miller & Samac, 2012). In *O. sativa*, Ahmadpour et al. (2018) observed 278 haplotypes
193 within 288 strains from three countries in Asia (Iran, Philippines and Japan). In both
194 studies, in some fields *B. oryzae* isolates had balanced mating types but linkage
195 disequilibrium (LD) tests (i.e. index of association) rejected the hypothesis of random
196 mating. High genotypic diversity and low LD can alternatively be explained by a high
197 frequency of migration (Milgroom, 1996) and sampling in several differentiated
198 populations (De Meeûs & Balloux, 2004).

199 From genetic diversity studies, it can be concluded that *B. oryzae* populations can be
200 clonal or recombinant. Although sexual reproduction was rarely observed in rice fields,

201 (only one unconfirmed report in the USA by Dickson (1956) cited by Castell-Miller &
202 Samac, 2012), population genetics indices do not reject the hypothesis that it actually
203 occurs in some areas.

204

205 **Morphological diversity of *B. oryzae***

206 For this part of the review we have retained the studies of morphological descriptions
207 made after a molecular identification of the species. *Bipolaris oryzae* is a fungal species
208 with morphological variability. A wide range of colony colors has been observed
209 between samples within and from different countries. Isolates from India grown on
210 Potato Dextrose Agar (PDA) medium exhibited a variety of colors such as black, grey,
211 white, olive or ranges of those colors (Kumar et al., 2011, 2016; Nayak & Hiremath,
212 2019). Thailand strains ranged from pale to dark grey and from grey to olive (Marin-
213 Felix et al., 2017; Chaijuckam et al., 2019), while strains from Egypt were olive or olive-
214 white (El-Shafey et al., 2011).

215 Conidia are slightly curved with a bulge in the middle and tapering towards the
216 extremities (Ou, 1985). Conidia vary in size depending on the strain and geographic
217 location where they were collected. Length of 63 μm to 99 μm long were reported in
218 North Central Thailand (Chaijuckam et al. 2019), and of 112 μm to 116 μm (Kumar et
219 al., 2016) in India, where also sizes from 50-155 μm x 10-22 μm , with the majority of
220 populations between 68-108 x 14-20 μm and 6 –12 distoseptate, were reported
221 (Manamgoda et al. 2014). The sizes of conidiophores vary from 150 - 625 μm x 6 - 8
222 μm .

223 Sexual structures of *B. oryzae* are produced on Sach agar + sterilized rice stem
224 (Ueyama & Tsuda, 1975; Ahmadpour *et al.*, 2018). The globose, black ascomata have
225 dimensions of 370-760 μm x 360-780 μm (Sivanesan, 1987; Manamgoda *et al.*, 2014).

226 Asci 140-235 μm \times 21-26 μm , most often containing 4 or 8 spores, clavate or broadly
227 fusoid. The ascospores are filiform or flagelliform, 235-470 μm \times 4-9 μm with 8-12
228 septa (Sivanesan, 1987; Manamgoda *et al.*, 2014).

229 Both asexual and sexual structures of *B. oryzae* vary greatly in morphology.

230

231 **Pathological diversity of *B. oryzae***

232 Pathology tests of *B. oryzae* strains is usually done on rice varieties with different levels
233 of BS resistance and fungal pathogenicity classifications are based on disease
234 incidence and severity. Inoculation of 20 varieties of rice with 24 *B. oryzae* isolates
235 from Egypt revealed 8 strains capable of infecting all varieties (El-Shafey *et al.*, 2011).
236 Based on the level of aggressiveness and range of infected varieties, *B. oryzae* isolates
237 from Côte d'Ivoire, Burkina Faso and Togo were divided into 3 groups regardless of
238 their geographical origin (Boka *et al.*, 2018). Kamal & Mia (2009), found no agreement
239 between strain pathogenicity and their genetic variation. For example, the BO 423
240 strain belonging to the FPT1 genetic group induces a level of post-emergence
241 damping-off similar to the BO 021 strain of the FPT12 genetic group. On the other hand,
242 strains BO 617 and BO 019, both belonging to the genetic group FPT10, did not have
243 the same level of aggressiveness. Inoculation on rice variety IR72 of 15 strains from
244 haplotype CQ-E112 in the Philippines also showed pathogenic variability within the
245 same genetic group of *B. oryzae* (Burgos *et al.*, 2013). Geographic origin and genetic
246 groups do not appear to explain the pathological variability of *B. oryzae* strains.

247

248 **Genetic diversity of *B. oryzae***

249 Genetic diversity studies allow to compare individuals or populations in relation to other
250 individuals or populations (Milgroom, 1996; Grünwald *et al.*, 2003; Mukhopadhyay &

251 Bhattacharjee, 2016). In crop protection, the amount of genetic diversity and its
252 distribution are used to characterize the biology (e.g. reproduction mode) and
253 epidemiology (e.g. migration rate) of the pathogen and also to improve control
254 strategies (e.g. management of varietal resistances).

255 Studies on the genetic diversity of *B. oryzae* have been carried out using several
256 molecular tools in different parts of the world. Most populations show high genotypic
257 diversity with the exception of isolates from Thailand (Chaijuckam et al., 2019).
258 Populations from Bangladesh (Kamal & Mia, 2009), India (Archana et al., 2014a,b;
259 Kandan et al., 2015), Iran (Nazari et al., 2015) and the USA (Castell-Miller & Samac,
260 2012) were diverse with none or little geographic structure within the areas under
261 study. A possibility is that sexual reproduction and long-distance dispersal of
262 propagules could explain the genotypic diversity and population structures observed.
263 Alternatively, seed exchanges between producers in different regions of India was
264 proposed as the potential cause of dispersal of genotypes of *B. oryzae* in the entire
265 territory (Archana et al., 2014a). Microsatellite (SSR) analysis of *B. oryzae* isolates
266 from three Asian countries (Iran, Philippines and Japan) revealed a diversity between
267 isolates within the same site and a population structure in 3 groups (Ahmadpour et al.,
268 2018) partially explained by geography. In Iran, the absence of a significant correlation
269 between cultivars of origin and haplotypes seem to indicate that the pathogen structure
270 is not determined by the host (Motlagh & Anvari, 2010). By contrast, a study conducted
271 with repeated tandem sequences (VNTR) by Burgos et al. (2013) showed that, in the
272 Philippines, the diversity of the *B. oryzae* population at the field scale was very limited
273 and that geography and varieties could explain the observed structure.

274 The distribution of the genetic diversity of *B. oryzae* populations is generally not
275 associated with their geographic origin nor with the rice variety they were isolated from.

276

277 Integrated management of BS

278 Management strategies of BS of rice were reviewed recently (Barnwal et al., 2013;
279 Sattari et al., 2015; Imran et al., 2020; Surendhar et al., 2021). Below some integrated
280 BS management strategies are presented. Organo-mineral fertilization (farm yard
281 manure, diammonium phosphate, muriate of potash and NPK) of the soil, chemical
282 treatment (Carbendazim) of the seed combined with foliar treatments (tricyclazole,
283 carbendazim and mancozeb) at grain of rice filling stage provide effective control of
284 both BS and blast diseases (Chelak et al., 2019). Difenoconazole spray at 315 ml/ha
285 combined with foliar fertilization (NPK 20:20:20 at the rate of 500 g/ha) lowers the
286 incidence of BS and gives the best revenue per hectare (Asghar et al., 2019). In
287 Florida, the greatest reduction in BS development was obtained by integrating Silicon
288 fertilization with propiconazole (Datnoff et al., 1997). The absence of water stress
289 increases the tolerance of rice genotypes (Dariush et al., 2020).

290 A combination of soil fertility management, water supply, use of tolerant varieties, seed
291 disinfection and plant treatments can reduce the impact of BS of rice.

292

293 Conclusion and recommendations for future studies

294 Brown spot of rice is a fungal disease that impacts rice productivity worldwide and
295 recent decades have witnessed a significant resurgence in several countries.
296 Morphological characterization studies carried out on *B. oryzae*, the main agent of
297 brown spot of rice, have shown that its asexual and sexual structures are highly
298 variable. This variability may be a limitation to the accurate identification of the species
299 responsible for brown spot. Using molecular tools, other fungal species in combination
300 with *B. oryzae* or individually were isolated from typical brown spot symptoms (H.

301 Kaboré, CIRAD, Montpellier, France, personal communication). The role of these
302 species in epidemics of rice brown spot needs to be elucidated in future studies.

303 In many rice-growing countries, the incidence and severity of brown spot has been
304 measured with powerful tools such as those of International Rice Research Institute.
305 The pathological diversity of *B. oryzae* isolates has also been demonstrated. However,
306 more needs to be done in quantifying rice grain yield losses, and the financial impact
307 for farmers and on food security. Epidemiological approaches on BS of rice must be
308 combined with socio-economic approaches.

309
310 Biology and genetics show that populations of *B. oryzae* can be clonal or recombinant.
311 Recombination is likely due to sexual reproduction which was not observed in rice
312 fields but is suspected to be frequent. It is therefore necessary to develop methods to
313 investigate the sexual reproduction structures of *B. oryzae* in rice fields, as is the case
314 with *Mycosphaerella graminicola* on wheat (Eriksen & Munk, 2003; Suffert et al., 2011).
315 Most studies on the genetic diversity of *B. oryzae* have been conducted in Asia.
316 However, since large outbreaks have also been reported in Africa, South America and
317 Europe, similar phenotypic and genetic diversity studies should be carried out in these
318 continents. In addition, a better characterization of the structure of *B. oryzae*
319 populations on a continent-wide or even on a worldwide scale is necessary to improve
320 our knowledge of the biology of the pathogen. This step may prove invaluable in
321 managing the disease through more efficient regulatory measures. Next generation
322 sequencing technologies such as genotyping by sequencing offer the possibility today
323 to process even thousands of isolates (Bhatia, 2013).

324 To date, genomics studies of *B. oryzae* are limited. The reference genome of *B. oryzae*
325 was obtained from the WK1C strain (ATCC 44560) isolated from rice in Taiwan

326 (Condon et al., 2013). It has a size of more than 31 Mb. The whole genome of the
327 TG12bL2 strain isolated from wild rice (*Zizania palustris*) was also sequenced (Castell-
328 Miller et al., 2016). Deng et al. (2019), recently sequenced the mitochondrial genome
329 of *B. oryzae*. Producing whole genome sequence data for more strains and for
330 phylogenetically close species would be useful for conducting population genomics
331 studies and developing diagnostic tools for species-specific detection of fungus.

332

333 **References**

334 Ahmadpour, A., Castell-Miller, C., Javan-Nikkhah, M., Naghavi, M. R., Dehkaei, F. P.,
335 Leng, Y. et al. (2018) Population structure, genetic diversity, and sexual state of
336 the rice brown spot pathogen *Bipolaris oryzae* from three Asian countries. *Plant*
337 *Pathology* 67, 181–192.

338 Archana, B., Kini, K. R. & Prakash, H. S. (2014a) Genetic diversity and population
339 structure among isolates of the brown spot fungus, *Bipolaris oryzae*, as revealed
340 by inter-simple sequence repeats (ISSR). *African Journal of Biotechnology* 13,
341 238–244.

342 Archana, B., Kini, K. R. & Prakash, H. S. (2014b) Study of genomic fingerprints profile
343 of Indian *Bipolaris oryzae* from rice (*Oryza sativa*) by RAPD-PCR. *International*
344 *Journal of Life Sciences, Biotechnology and Pharma Research* 3, 83–92.

345 Aryal, L., Bhattarai, G., Subedi, A., Subedi, M. & Sah, G. K. (2016) Response of rice
346 varieties to brown spot disease of rice at Paklihawa, Rupandehi. *Global Journal*
347 *of Biology, Agriculture & Health Sciences* 5, 50–54.

348 Awoderu, V. A. (1974) Rice diseases in Nigeria. *PANS* 20, 416–424.

349 Barnwal, M. K., Kotasthane, A., Magculia, N., Mukherjee, P. K., Savary, S., Sharma,
350 A. K. et al. (2013) A review on crop losses, epidemiology and disease

- 351 management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge
352 gaps. *European Journal of Plant Pathology* 136, 443–457.
- 353 Barro, M., Kassankogno, A. I., Wonni, I., Sérémé, D., Somda, I., Kaboré, H. K. et al.
354 (2021) Spatiotemporal Survey of Multiple Rice Diseases in Irrigated Areas
355 Compared to Rainfed Lowlands in the Western Burkina Faso. *Plant Disease*,
356 PDIS-03-21-0579-RE.
- 357 Bengyella, L., Yekwa, E. L., Nawaz, K., Iftikhar, S., Tambo, E., Alisoltani et al. (2018)
358 Global invasive *Cochliobolus* species: cohort of destroyers with implications in
359 food losses and insecurity in the twenty-first century. *Archives of Microbiology*
360 200, 119-135.
- 361 Bhati, D. (2013) Genotyping by sequencing, its implications and benefits. *Crop Improv*
362 40, 101-111.
- 363 Boka, A., Bouet, A., Tiendrebeogo, A., Kassankogno, A. I., Ouedraogo, I., Nda, G. N.
364 E. et al. (2018) Pathogenic variability of *Bipolaris oryzae* causing leaf spot
365 disease of rice in West Africa. *International Journal of Phytopathology* 7, 103–
366 110.
- 367 Bouet, A., Gbedie, N. A., Boka, A. & Kouassi, N. (2015) Evaluation des variétés de riz
368 prometteuses pour la résistance à quelques contraintes biotiques majeures et
369 pour leurs performances agronomiques en Côte d'Ivoire. *International Journal*
370 *of Biological and Chemical Sciences* 9, 2041–2056.
- 371 Breda de Haan, J. V. (1900) Vorläufige Beschreibung von Pilzen, bei tropischen
372 Kulturpflanzen beobachtet. *Bulletin de l'Institut Botanique de Buitenzorg* 6, 11–
373 13.

- 374 Bregaglio, S., Donatelli, M. & Confalonieri, R. (2013) Fungal infections of rice, wheat,
375 and grape in Europe in 2030–2050. *Agronomy for Sustainable Development* 33,
376 767–776.
- 377 Burgos, M. R. G., Katimbang, M. L. B., Dela Paz, M. A. G., Beligan, G. A., Goodwin,
378 P. H., Ona, I. P. et al. (2013) Genotypic variability and aggressiveness of
379 *Bipolaris oryzae* in the Philippines. *European Journal of Plant Pathology* 137,
380 415–429.
- 381 CABI (2020) Brown leaf spot of rice, *Cochliobolus miyabeanus*.
382 <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/datasheet/14691#>. [Accessed 25
383 Janvier 2020].
- 384 Castell-Miller, C. V., Gutierrez-Gonzalez, J. J., Tu, Z. J., Bushley, K. E., Hainaut, M.,
385 Henrissat, B. et al. (2016) Genome Assembly of the Fungus *Cochliobolus*
386 *miyabeanus*, and Transcriptome Analysis during Early Stages of Infection on
387 American Wildrice (*Zizania palustris* L.). *PLoS ONE* 11, 1-31.
- 388 Castell-Miller, C. V. & Samac, D. A. (2012) Population genetic structure, gene flow and
389 recombination of *Cochliobolus miyabeanus* on cultivated wildrice (*Zizania*
390 *palustris*). *Plant Pathology* 61, 903–914.
- 391 Castell-Miller, C. V. & Samac, D. A. (2019) Sensitivity of *Bipolaris oryzae* Isolates
392 Pathogenic on Cultivated Wild Rice to the Quinone Outside Inhibitor
393 Azoxystrobin. *Plant Disease* 103, 1910–1917.
- 394 Chaijuckam, P., Songkumarn, P. & Guerrero, J. (2019) Genetic Diversity and
395 Aggressiveness of *Bipolaris oryzae* in North-Central Thailand. *Applied Science*
396 *and Engineering Progress* 12, 116–125.

- 397 Chakrabarti, N. K. (2001) Epidemiology and disease management of brown spot of rice
398 in India. In: Sreenivasaprasad, S. and Johnson, R. (Eds.) *Major Fungal*
399 *Diseases of Rice*. Kluwer Academic Publishers, pp. 293-306.
- 400 Chang, H-S. (1978) An elongated conidium strain and mating type distribution of
401 *Cochliobolus miyabeanus*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 19, 139–144.
- 402 Chelak, Y. K., Tripathi, S. K., Jain, A. K., Kumar, A. & Kumar, B. (2019) Integrated
403 disease management of rice in Madhya Pradesh. *International Journal of*
404 *Chemical Studies* 7, 374-376.
- 405 Choudhury, F. A., Jabeen, N., Haider, M. S. & Hussain, R. (2019) Comparative
406 analysis of leaf spot disease in Rice Belt of Punjab, Pakistan. *Advancements in*
407 *Life Sciences* 6, 76–80.
- 408 Condon, B. J., Leng, Y., Wu, D., Bushley, K. E., Ohm, R. A., Otilar, R. et al. (2013)
409 Comparative Genome Structure, Secondary Metabolite, and Effector Coding
410 Capacity across *Cochliobolus Pathogens*. *PLoS Genetics* 9, 1-29.
- 411 Dadant, R., Rasolofo, R. & Baudin P. (1960) Liste des maladies des plantes cultivées
412 à Madagascar. *Tananarive: IRAM, 94 p. (In French)*
413 [https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers12-](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers12-04/11684.pdf)
414 [04/11684.pdf](https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers12-04/11684.pdf)
- 415
- 416 Dallagnol, L. J., Rodrigues, F. Á., Mielli, M. V. B., Ma, J. F. & Datnoff, L. E. (2009)
417 Defective Active Silicon Uptake Affects Some Components of Rice Resistance
418 to Brown Spot. *Phytopathology* 99, 116–121.
- 419 Dariush, S., Darvishnia, M., Ebadi, A., Padasht-Dehkaei, F. & Bazgir, E. (2020)
420 Screening brown spot resistance in rice genotypes at the seedling stage under
421 water stress and irrigated conditions. *Archives of Phytopathology and Plant*
422 *Protection* 53, 247-265.

- 423 Datnoff, L. E., Deren, C. W., and Snyder, G. H. (1997) Silicon fertilization for disease
424 management of rice in Florida. *Crop Protection* 16, 525-531.
- 425 De Bruyne, L., Van Poucke, C., Di Mavungu, D. J., Zainudin, N. A. I. M., Vanhaecke,
426 L., De Vleeschauwer, D. et al. (2016) Comparative chemical screening and
427 genetic analysis reveal tentoxin as a new virulence factor in *Cochliobolus*
428 *miyabeanus*, the causal agent of brown spot disease on rice. *Molecular plant*
429 *pathology* 17, 805–817.
- 430
- 431 Deng, G., Zou, Q., Chen, Y., Wang, L., Huang, G., Cui, Y. et al. (2019) The complete
432 mitochondrial genome of *Cochliobolus miyabeanus* (*Dothideomycetes*,
433 *Pleosporaceae*) causing brown spot disease of rice. *Mitochondrial DNA Part B*
434 4, 2832–2833.
- 435 De Meeûs, T. & Balloux, F. (2004) Clonal reproduction and linkage disequilibrium in
436 diploids: a simulation study. *Infection, Genetics and Evolution* 4, 345–351.
- 437 El-Shafey, R. A. S., Elamawi, R. M., El-Wahsh, S. M., Abdlkhalek, A. F., Badr, E. A. S.
438 & El-Refae, Y. Z. A. (2011) Morpho-Pathological and Molecular Variation
439 Studies among different Pathotypes of *Helminthosporium* Fungus Causing
440 Brown Spot Disease of Rice. *Egyptian Journal of Phytopathology* 39, 135–153.
- 441 Eriksen, L. & Munk, L. (2003) The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its
442 anamorph *Septoria tritici* in winter wheat during the growing season. *European*
443 *Journal of Plant Pathology* 109, 253– 259.
- 444 Farr, D. F. & Rossman, A. Y. (2020) Fungal databases, systematic mycology and
445 microbiology laboratory. ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
446 [Accessed 25 Janvier 2020].
- 447 Faruq, A. N., Rahman, M. M., Akhtar, N., Islam, M. T., Uddin, M. M. & Ora, N. (2015)
448 Evaluation of Imported Hybrid Rice Varieties against Three Field Diseases

- 449 under Natural Epiphytic Conditions of Bangladesh. *Advance in Agriculture and*
450 *Biology* 4, 1–7.
- 451 Fomba, S. N. & Singh, N. (1990) Crop losses caused by rice brown spot disease in
452 mangrove swamps of northwestern Sierra Leone. *Tropical Pest Management*
453 36, 387–393.
- 454 Ghose, R. L. M., Ghatge, M. B. & Subrahmanyam, V. (1960) *Rice in India*. New Delhi,
455 India Council of Agricultural Research.
- 456 Gnancadja-André, L. S., Touhami, A. O., Badoc, A. & Douira, A. (2005) Impact de la
457 mycoflore de la feuille paniculaire du riz sur le rendement en grains. *Bulletin de*
458 *la Société de Pharmacie de Bordeaux* 114, 225–236.
- 459 Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G. & Fry, W. E. (2003) Analysis of
460 Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. *Phytopathology*
461 93, 738-746.
- 462 Habib, A., Javed, N., Sahi, S. T. & Waheed, M. (2012) Detection of seed borne
463 mycoflora of different coarse and fine rice varieties and their management
464 through seed treatments. *Pakistan Journal of phytopathology* 24, 133–136.
- 465 Hau, F. C. & Rush, M. C. (1982) Preinfectious interaction between *Helminthosporium*
466 *oryzae* and resistant and susceptible rice plants. *Phytopathology* 72, 285–292.
- 467 Hossain, M. M., Sultana, F. & Rahman, A. A. H. B. (2014) A comparative screening of
468 hybrid, modern varieties and local rice cultivar for brown leaf spot disease
469 susceptibility and yield performance. *Archives Of Phytopathology And Plant*
470 *Protection* 47, 795–802.
- 471 Huang, L., Zhu, Y. N., Li, D. W., Li, Y., Bian, L. M. & Ye, J. R. (2018) Shoot Blight on
472 Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*) is Caused by *Bipolaris oryzae*. *Plant*
473 *Disease* 102, 500-5006.

- 474 Imran, M., Sahi, S. T., Atiq, M. & Rasul, A. (2020) Brown Leaf Spot: An Exacerbated
475 Embryonic Disease of Rice: A Review. *Journal of Innovative Sciences* 6, 108-
476 125.
- 477 Jaiganesh, V. & Kannan, C. (2019) Studies on the cultural characters and
478 pathogenicity studies of brown leaf spot of rice caused by *Helminthosporium*
479 *oryzae* (Syn: *Bipolaris oryzae*). *Plant Archives* 19, 585–587.
- 480 Johnson, D. R. & Percich, J. A. (1992) Wild Rice Domestication, Fungal Brown Spot
481 Disease, and the Future of Commercial Production in Minnesota. *Plant Disease*
482 76, 1193–1198.
- 483 Kakoly, M. K. J., Rashib, M. M., Shamim Hasan, M. & Nurealam Siddiqui, Md. (2014)
484 Study of seed-borne fungal pathogens of Kataribhog aromatic rice and
485 comparison of field intensity with laboratory counts. *International Journal of*
486 *Biosciences* 4, 66-74.
- 487 Kamal, M. M. & Mia, M. A. T. (2009) Diversity and pathogenicity of the rice brown spot
488 pathogen, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem. in Bangladesh assessed
489 by genetic fingerprint analysis. *Bangladesh Journal of Botany* 38, 119-125.
- 490 Kandan, A., Akhtar, J., Singh, B., Dixit, D., Chand, D., Agarwal, P.C. et al. (2013)
491 Population genetic diversity analysis of *Bipolaris oryzae* fungi infecting *Oryza*
492 *sativa* in India using URP markers. *The Ecoscan* 7, 123–128.
- 493 Kandan, A., Akhtar, J., Singh, B., Dixit, D., Chand, D., Roy, A. et al. (2015) Molecular
494 diversity of *Bipolaris oryzae* infecting *Oryza sativa* in India. *Phytoparasitica* 43,
495 5–14.
- 496 Kasparý, T. E., Bellé, C., Moccellini, R., Cutti, L., Rigon, C. A. G., Merotto Junior, A. et
497 al. (2018) Occurrence of *Bipolaris oryzae* Causing Leaf Spot on *Brachypodium*

- 498 *distachyon* in Brazil. Plant Disease 102.
499 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-11-17-1806-PDN>
- 500 Kasparý, T. E., Bellé, C., Rigon, C. A. G., Casarotto, G., Gallon, M. & Merotto Junior,
501 A. (2019) *Bipolaris oryzae* Causing Brown Leaf Spot on *Echinochloa crus-galli*
502 in Southern Brazil. Plant Disease 103. [https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-](https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-2057-PDN)
503 2057-PDN
- 504 Kumar, P., Anshu, V. & Kumar, S. (2011) Morpho-pathological and Molecular
505 Characterization of *Bipolaris oryzae* in Rice (*Oryzae sativa*). *Journal of*
506 *Phytopathology* 159, 51–56.
- 507 Kumar, S., Prakash, N., Arzoo, K. & Erayya (2017) Biological and Biotechnological
508 Approaches to Manage Brown Spot (*Helminthosporium oryzae*) Disease of
509 Rice. In: Shamim, Md. and Singh, K. N. (Eds.) *Biotic Stress Management in*
510 *Rice. Molecular Approaches*. Apple Academic Press Inc., pp. 175–196.
- 511 Kumar, A., Solanki, I. S., Akhtar, J. & Gupta, V. (2016) Morpho-molecular diversity of
512 *Bipolaris oryzae* causing brown spot of paddy. *Indian Journal of Agricultural*
513 *Sciences* 86, 615–20.
- 514 Krupinsky, J. M., Berdahl, J. D., Schoch, C. L. & Rossman, A. Y. (2004) Leaf spot on
515 switch grass (*Panicum virgatum*), symptoms of a new disease caused by
516 *Bipolaris oryzae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26, 371-378.
- 517 Leslie, J. F. & Klein, K. K. (1996) Female Fertility and Mating Type Effects on Effective
518 Population Size and Evolution in Filamentous Fungi. *Genetics* 144, 557-567.
- 519 Liu, Y. L., Tang, J. R. & Zhou, H. K. (2021) First report of *Bipolaris oryzae* causing leaf
520 spot on cultivated wild rice (*Oryzae rufipogon*) in China. *Plant Disease* 105,
521 1857.

- 522 Magar, P. B. (2015) Screening of Rice Varieties against Brown Leaf Spot Disease at
523 Jyotinagar, Chitwan, Nepal. *International Journal of Applied Sciences and*
524 *Biotechnology* 3, 56–60.
- 525 Mahmud Toher, A. S., Mior Ahmad, Z. A. & Wong, M. Y. (2016) First Report of
526 *Exserohilum rostratum* as Pathogen of Rice Brown Spot in Malaysia. *Plant*
527 *Disease* 100, 226.
- 528 Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Madrid, H.,
529 Chukeatirote, E. et al. (2014) The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79, 221–
530 288.
- 531 Marin-Felix, Y., Senwana, C., Cheewangkoon, R. & Crous, P. (2017) New species
532 and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere* 8, 1556–
533 1574.
- 534 Mau, Y. S., Ndiwa, A. & Oematan, S. (2020) Brown spot disease severity, yield and
535 yield loss relationships in pigmented upland rice cultivars from East Nusa
536 Tenggara, Indonesia. *Biodiversitas* 21, 1625–1634.
- 537 Meneses, P. R., Farias, C. R. J. de., Caniela, A. R. de A., Schwanck, A. A., Deibler, A.
538 N., Funck, G. D. et al. (2014) Regional and varietal differences in prevalence
539 and incidence levels of *Bipolaris* species in Brazilian rice seedlots. *Tropical*
540 *Plant Pathology* 39, 349–356.
- 541 Mew, T. W. & Gonzáles, P. (2002) *A handbook of rice seedborne fungi*. Los Baños,
542 (Philippines): International Rice Research Institute, and Enfield, N.H. (USA):
543 Science Publishers, Inc.
- 544 Milgroom, M. G. (1996) Recombination and the multilocus structure of fungal
545 populations. *Annual Review of Phytopathology* 34, 457–477.

- 546 Milgroom, M. G. (2017) Emerging and Reemerging Plant Diseases. In: Milgroom, M.
547 G. (Ed.) *Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology, and*
548 *Evolution*. St Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, pp.
549 275-311.
- 550 Mizobuchi, R., Fukuoka, S., Tsushima, S., Yano, M. & Sato, H. (2016) QTLs for
551 Resistance to Major Rice Diseases Exacerbated by Global Warming: Brown
552 Spot, Bacterial Seedling Rot, and Bacterial Grain Rot. *Rice* 9, 1-23.
- 553 Moletti, M., Giudici, M. L. & Villa, B. (1997) Rice Akiuchi-brown spot disease in Italy:
554 agronomic and chemical control. In: Chataigner J. (Ed.) *Maladies du riz en*
555 *région méditerranéenne et les possibilités d'amélioration de sa résistance.*
556 *Cahiers Options Méditerranéennes* 15, 79–85.
- 557 Motlagh, M. R. S. & Anvari, M. (2010) Genetic variation in a population of *Bipolaris*
558 *oryzae* based on RAPD-PCR in north of Iran. *African Journal of Biotechnology*
559 9, 5800–5804.
- 560 Motlagh, M. R. S. & Kaviani, B. (2008) Characterization of New *Bipolaris Spp.*: The
561 Causal Agent of Rice Brown Spot Disease in the North of Iran. *International*
562 *Journal of Agriculture and Biology* 10, 638–642.
- 563 Mukhopadhyay, T. & Bhattacharjee, S. (2016) Genetic Diversity: Importance and
564 Measurements. In Mir, A. H. & Bhat, N. A. (Eds.) *Conserving Biological*
565 *Diversity: A Multiscaled Approach*. New Delhi, India: Research India
566 Publications, pp. 251-295.
- 567 Mwakasege, L. D. (2015) Assessment of rice diseases and yield under system of rice
568 intensification (SRI) in Morogoro, Tanzania. Master thesis, Tanzania, Sokoine
569 University of Agriculture.

- 570 Naveenkumar, R., Muthukumar, A. & Mohanapriya, R. (2016) Survey of seed-borne
571 fungi associated with seeds of rice in Tamil Nadu. *Oryza* 53, 106–110.
- 572 Nayak, M. S. & Hiremath, S. V. (2019) Cultural, morphological and molecular
573 characterization of *Bipolaris oryzae* causing brown leaf spot of rice in Northern
574 Karnataka. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8, 1235-1239.
- 575 Nazari, S., Javan-Nikkhah, M., Fotouhifar, K-B., Khosravi, V. & Alizadeh, A. (2015)
576 *Bipolaris* species associated with rice plant: pathogenicity and genetic diversity
577 of *Bipolaris oryzae* using rep-PCR in Mazandaran province of Iran. *Journal of*
578 *Crop Protection* 4, 497-508.
- 579 Nghiep, H. V. & Gaur, A. (2004) Role of *Bipolaris oryzae* in producing abnormal
580 seedling of rice (*Oryza sativa*). *Omonrice* 12, 102–108.
- 581 Nyvall, R. F. & Percich, J. A. (1999) Development of Fungal Brown Spot and Spot
582 Blotch on Cultivated Wild Rice in Minnesota. *Plant Disease* 83, 936-938.
- 583 Nyvall, R. F., Percich, J. A., Porter, R. A. & Branter, J. R. (1995) Comparaison of Fungal
584 Brown Spot Severity to Incidence of Seedborne *Bipolaris oryzae* and *B.*
585 *sorokiniana* and Infected Floral Sites on Cultivated Wild Rice. *Plant Disease* 79,
586 249–250.
- 587 Ocfemia, G. O. (1924) The *Helminthosporium* Disease of Rice Occurring in the
588 Southern United States and in the Philippines. *American Journal of Botany* 11,
589 385–408.
- 590 Ou, S. H. (1985) *Rice Diseases*. Second Edition, Commonwealth Mycological Institute,
591 Kew.
- 592 Ouédraogo, I. (2008) Incidence de l'helminthosporiose du riz au Burkina Faso et
593 caractérisation des populations de l'agent pathogène [*Bipolaris oryzae* (Breda

- 594 de Haan) Shoemaker]. Thèse de doctorat, Burkina Faso, Université de
595 Ouagadougou.
- 596 Ouédraogo, I., Wonni, I., Sérémé, D., Kaboré, K. B. (2016) Survey of Fungal Seed-
597 Borne Diseases of Rice in Burkina Faso. *International Journal of Agriculture
598 Innovations and Research* 5, 476–480.
- 599 Padmanabhan, S. Y. (1973) The Great Bengal Famine. *Annual Review of
600 Phytopathology* 11, 11–24.
- 601 Pannu, P. P. S., Chahal, S. S., Sharma, V. K., Kaur, M. & Bagga, P. S. (2006)
602 Occurrence of brown leaf spot of rice in Punjab, its effect on grain yield and its
603 control. *Indian Phytopathology* 59, 190–193.
- 604 Pantha, P., Shrestha, S. M., Manandhar, H. K., Gaire, S. P., Aryal, L. & Yadav, D. R.
605 (2017) Evaluation of rice genotypes for resistance against brown spot disease
606 caused by *Bipolaris oryzae*. *International Journal of Current Research* 9,
607 48562–48569.
- 608 Pantha, P. & Yadav, D. R. (2016) Assessment of Seed Infestation Level of Brown Spot
609 (*Bipolaris Oryzae*) in Different Rice Genotypes under Natural Epiphytotic
610 Conditions. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology* 4,
611 294–297.
- 612 Quintana, L., Gutiérrez, S., Arriola, M., Morinigo, K. & Ortiz, A. (2017) Rice brown spot
613 *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker in Paraguay. *Tropical Plant
614 Research* 4, 419–420.
- 615 Rashed, R., Hossain, M., Islam, M. R., Akter, N., Mazumder, A. R. & Zakaria, M. (2002)
616 Effect of Brown Spot on the Yield and Yield Contributing Characters of Different
617 Hybrid Varieties/Lines of Boro Rice. *Pakistan Journal of Plant Pathology* 1, 58–
618 60.

- 619 Sadia, O. A. (2012) Seed health testing of rice and the comparison of field incidence
620 and laboratory counts of *Drechslera oryzae* (*Bipolaris oryzae*) and *Pyricularia*
621 *oryzae* in Ghana. Master thesis, Ghana, Kwame Nkrumah university of science
622 and technology.
- 623 Sattari, A., Moradi, K. & Noorozi, M. (2015) Brown Spot Resistance in Rice: A Review.
624 *International Journal of Scientific Research in Science and Technology* 1, 175-
625 179.
- 626 Savary, S., Castilla, N. P., Elazegui, F. A. & Teng, P. S. (2005) Multiple effects of two
627 drivers of agricultural change, labour shortage and water scarcity, on rice pest
628 profiles in tropical Asia. *Field Crops Research* 91, 263–271.
- 629 Savary, S., Nelson, A., Sparks, A. H., Willocquet, L., Duveiller, E., Mahuku, G. et al.
630 (2011) International agricultural research tackling the effects of global and
631 climate changes on plant diseases in the developing world. *Plant Disease* 95,
632 1204-1216.
- 633 Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N. & Nelson, A.
634 (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature*
635 *Ecology & Evolution* 3, 430–439.
- 636 Shamsi, A., Elahinia, S. A., Khodaparast, S. A. & Moosanejad, S. (2010) Fertility status
637 and mating type of *Cochliobolus miyabeanus*, the causal agent of rice brown
638 spot disease in Guilan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 45, 25–26.
- 639 Shivas, R. G. (1989) Fungal and bacterial diseases of plants in Western Australia.
640 *Journal of the Royal Society of Western Australia* 72, 1–62.
- 641 Sivanesan, A. (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*,
642 *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158, 1–261.

- 643 Suffert, F., Sache, I. & Lannou, C. (2011) Early stages of *septoria tritici* blotch
644 epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary
645 inoculum: Primary inoculum of *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathology* 60:
646 166-177.
- 647 Sun, X., Qi, X., Wang, W., Liu, X., Zhao, H., Wu, C., Chang, X., Zhang, M., Chen, H.
648 & Gong, G. (2020) Etiology and Symptoms of Maize Leaf Spot Caused by
649 *Bipolaris* spp. In Sichuan, China. *Pathogens* 9, 1-18.
- 650 Sunder, S., Singh, R. & Agarwal, R. (2014) Brown spot of rice: an overview. *Indian*
651 *Phytopathology* 67, 201–215.
- 652 Surendhar, M., Anbuselvam, Y. & Ivin, J. J. S. (2021) Status of Rice Brown Spot
653 (*Helminthosporium oryzae*) Management in India: A Review. *Agricultural*
654 *Reviews*, 1-6.
- 655 Taylor, D. R. & Ngaujah, A. S. (2016) Seed Borne Fungi of Rice, Maize, Sorghum,
656 Fundi, Cowpea, Groundnut, Pigeon Pea and Pepper cultivated in the Kambia
657 District of Sierra Leone. *International Journal of Agricultural Research and*
658 *Review* 4, 569–578.
- 659 Tullis, E. C. (1935) Histological studies of rice leaves infected with *Helminthosporium*
660 *oryzae*. *Journal of Agricultural Research* 50, 81–90.
- 661 Turgeon, B. G. (1998) Application of mating type gene technology to problems in fungal
662 biology. *Annual Review of Phytopathology* 36, 115-137.
- 663 Turgeon, B. G., Sharon, A., Wirsal, S., Yamaguchi, K., Christiansen, S. K. & Yoder, O.
664 C. (1995) Structure and function of mating type genes in *Cochliobolus* spp. and
665 asexual fungi. *Canadian Journal of Botany* 73, 778-783.

- 666 Ueyama, A. & Tsuda, M. (1975) Formation in culture of *Cochliobolus miyabeanus*, the
667 perfect state of *Helminthosporium oryzae*. *Annals of the Phytopathological*
668 *Society of Japan* 41, 434-440.
- 669 Ueyama, A. & Tsuda, M. (1976) Mating Type and Sexuality of *Cochliobolus*
670 *miyabeanus*, the Perfect State of *Helminthosporium oryzae*. *Annals of the*
671 *Phytopathological Society of Japan* 42, 1–6.
- 672 Valarmathi, P. & Ladhakshmi, D. (2018) Morphological Characterization of *Bipolaris*
673 *oryzae* Causing Brown Spot Disease of Rice. *International Journal of Current*
674 *Microbiology and Applied Sciences* 7, 161–170.
- 675 Van Ba, V. & Sangchote, S. (2006) Seed Borne and Transmission of *Bipolaris oryzae*,
676 the Causal Pathogen of Brown Spot of Rice. *Kasetsart Journal - Natural Science*
677 40, 353–360.
- 678 Vidhyasekaran, P., Borromeo, E. S. & Mew, T. W. (1986) Host-specific toxin production
679 by *Helminthosporium oryzae*. *Phytopathology* 76, 261–266.
- 680 Wang, H. N., Wei, S. H. & Yang, X. H. (2019) First Report of *Bipolaris* Leaf Spot
681 Caused by *Bipolaris oryzae* on *Typha orientalis* in China. *Plant Disease* 103.
682 <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0888-PDN>
- 683 Zadoks, J. C. (1974) The role of epidemiology in modern Phytopathology.
684 *Phytopathology* 64, 765–906.

685

686 **Figure legend**

687 Figure 1 (A) Tiny brown spots caused by *Bipolaris oryzae* on rice leaves in Camargue
688 (France). Source: H. Adreit, CIRAD, 2020.

689

690 Figure 1 (B) Brown lesions with grey center and yellow margin caused by *Bipolaris*
691 *oryzae* on rice leaves in Yunnan (China). Source: D. Tharreau, CIRAD, 2009.



For Peer Review



For Peer Review

Table I: Summary of the incidence, severity and loss of rice grain yield caused by brown spot

Countries	Incidence * (%)	Severity** (%)	Grain yield losses (%)	Method and evaluation period	Sample size and geographic coverage	References
USA	ND	1-52	ND	Rating, natural infection	2 Minnesota fields	(Nyvall et al., 1995)
Nepal	ND	21-69	ND	IRRI, natural infection, 66 days after transplanting	20 varieties on experimental plots of NRRP, Hardinath, Dhanusha	(Pantha et al., 2017)
Nepal	ND	24-51	ND	IRRI, natural infection	12 varieties on experimental plots of IAAS, Paklihawa Campus, Bhairahawa	(Aryal et al., 2016)
Nepal	ND	21-58	ND	IRRI, natural infection, 80 days after transplanting	14 varieties on experimental plots of KRDC, Jyotinagar, Chitwan	(Magar, 2015)
Pakistan	1-14	6-51	ND	IRRI, natural infection	4 varieties on farmers' fields in 18 districts of Punjab	(Choudhury et al., 2019)
Tanzania	35-99	5-25	ND	IRRI, natural infection	27 farmers' fields in 4 districts in the Morogoro region	(Mwakasege, 2015)
Sierra Leone	ND	ND	8.2-23	IRRI, natural infection	6 varieties produced in the mangroves of Rokupr, Kibanka and Moribaia	(Fomba & Singh, 1990)
Burkina Faso	ND	1-38	1-16	IRRI, natural infection	40 rice genotypes produced in vallée du Kou and Karfiguela	(Ouédraogo, 2008)

Bangladesh	ND	21-45	ND	IRRI, natural infection, doughy grain stage	5 varieties on experimental plots of BSMRAU Gazipur	(Hossain et al., 2014)
Bangladesh	ND	26-48	ND	IRRI, natural infection	8 varieties of aromatic rice on experimental plots in Dinajpur district	(Kakoly et al., 2014)
Bangladesh	40.5-80	45-77	ND	IRRI, natural infection, 50-70 days after transplanting	16 varieties on experimental plots from Bangladesh Agricultural University, Mymensingh	(Rashed et al., 2002)
Bangladesh	15.5-25.8	0,6-4	ND	IRRI, natural infection, maturation	15 varieties on experimental plots from Sher-e-Bangla Agricultural University, Dhaka	(Faruq et al., 2015)
Bangladesh	ND	ND	18-22	IRRI, artificial inoculation	BR24 variety in greenhouse	(Kamal & Mia, 2009)
Indonesia	ND	11-40	10-56	IRRI, artificial inoculation	24 varieties on farmers' fields, Lasiana, Kupang District	(Mau et al., 2020)
India	ND	1-16	0.8-34	IRRI, natural infection	9 varieties on farmers' fields in 15 districts of Punjab	(Pannu et al., 2006)

*Ratio of the number of diseased plants to the total number of plants observed; ** Leaf or panicle area covered by disease; ND: Not reported in study

Table II: Summary of the prevalence and level of infection of rice seed by *Bipolaris oryzae*

Countries	Prevalence* (%)	Seed infection rates** (%)	Method of evaluation	Sample size and geographic coverage	References
USA	ND	11-35	ISTA, on filter paper	Grains collected from 2 fields in Minnesota	(Nyvall et al., 1995)
Pakistan	ND	22-45	ISTA, on culture	Samples from Rice Research Institute, Kala Shah Kaku	(Habib et al. 2012)
Ghana	38-100	0.5-29	ISTA, on filter paper	33 grain lots from 4 agro-ecological zones (Sudan Savannah, Savannah, Forest Zone, Coastal Savannah)	(Sadia, 2012)
Brazil	37-90	0.6-8	ISTA, on filter paper	722 seed lots from 6 rice regions of Rio Grando	(Meneses et al., 2014)
Bangladesh	ND	18-41	ISTA, on filter paper	5 cultivars from experimental plots of BSMRAU, Gazipur	(Hossain et al., 2014)
Burkina Faso	77-97	2-76	ISTA, on filter paper	151 grain lots from 28 sites in 4 provinces (Comoé, Houet, Mouhoun, Sourou)	(Ouédraogo et al., 2016)
Nepal	ND	8-72	ISTA, on filter paper	20 rice genotypes collected by Nepal Agricultural Research Council, Hardinath, Dhanusha	(Pantha & Yadav, 2016)
India	62	6-15	ISTA, on paper and culture	30 seed lots of 7 rice varieties from Tamil Nadu (South India)	(Naveenkumar et al., 2016)
Sierra Leone	ND	4-25	ISTA, on filter paper	7 varieties from the stock of the Rokupr Agricultural Research Centre, Kambia District	(Taylor & Ngaujah, 2016)

*Ratio obtained by calculating lots infected with *B. oryzae* to the total number of lots collected; **Ratio obtained by making the number of *B. oryzae* bearing grains on the total number of grains observed; ND: Not reported in stud

For Peer Review

IV. Les objectifs de la thèse

La demande en riz en Afrique croît plus rapidement que partout ailleurs dans le monde. Cependant, le continent n'arrive pas à satisfaire ses besoins en riz à travers sa production, importe une grande partie et est dépendant des marchés internationaux du riz. Les dégâts causés par les maladies font partie des facteurs explicatifs des faibles rendements de riz enregistrés sur le continent. Une émergence de l'helminthosporiose du riz a été observée en Asie, en Europe et dans certains pays d'Afrique de l'Ouest. Pour lutter contre cette maladie, nous manquons de connaissances et d'outils. Les espèces associées à la maladie ne sont pas caractérisées. Des outils de diagnostic précis ne sont pas disponibles. La diversité génétique et la structuration des populations des agents pathogènes responsables de l'helminthosporiose du riz restent peu connues.

Dans ce contexte, les objectifs généraux de cette thèse sont de déterminer les espèces responsables de l'helminthosporiose du riz en Afrique de l'Ouest, d'analyser la diversité génétique des espèces les plus fréquentes et de développer des outils de détection.

La suite de ce manuscrit est structurée en 3 chapitres.

Le chapitre 1 présente le travail réalisé sur l'identification des espèces associées aux symptômes de l'helminthosporiose du riz, principalement avec des outils moléculaires. Il est composé de 3 articles. Le premier est en préparation et décrit la caractérisation des isolats par *genotyping-by-sequencing* (GBS) ainsi que leur pathogénie. Son but était d'utiliser le GBS pour décrire les espèces associées aux symptômes de l'helminthosporiose du riz et vérifier la capacité de ces espèces à reproduire la maladie en condition contrôlée sur différentes variétés de riz.

Le deuxième article (à soumettre à la revue *European Journal of Plant Pathology*) est consacré à une description moléculaire précise de l'helminthosporiose du riz en France. L'objectif de cet article est d'apporter des précisions sur les espèces responsables de l'helminthosporiose du riz en Camargue (France). En effet, les

premières descriptions de l'helminthosporiose du riz en Camargue remontent à 1966 et l'évolution de la maladie au cours de ces dernières années nécessite que les espèces responsables soient identifiées de façon précise, que leur pathogénie soit caractérisée en vue d'un meilleur suivi de la maladie.

Le troisième article publié dans *Plant Disease* rapporte le premier signalement de *Exserohilum rostratum* comme agent responsable de l'helminthosporiose du riz au Mali. Cet article vise à attirer l'attention des acteurs de la filière riz du Mali sur la présence de *E. rostratum* et de sa prise en compte dans les suivis épidémiologiques.

Le chapitre 2 présente le travail réalisé sur la structure et la diversité génétique des populations de *B. oryzae* et de *E. rostratum* responsables de l'helminthosporiose du riz dans de nombreux pays. Il est composé de 2 parties.

La première décrit la structure des populations de *B. oryzae* issues des pays d'Afrique, d'Amérique, d'Asie et d'Europe. Elle vise à donner une vision globale de la structuration génétique de *B. oryzae*. La seconde partie, est un article en préparation (à soumettre à *Frontiers in Plant Science*) qui décrit la diversité et la structure génétique des populations de *B. oryzae* et *E. rostratum* au Burkina Faso. Ce travail contribue à apporter des connaissances sur la structure, la diversité et le mode de reproduction des deux agents pathogènes au Burkina Faso.

Le chapitre 3 sous forme d'un article en préparation, traite du développement d'outils pour la détection spécifique (par PCR) sur la semence et les feuilles de riz des différentes espèces responsables de l'helminthosporiose. Ce travail vise à contribuer à l'amélioration du diagnostic de l'helminthosporiose du riz.

Durant cette thèse, j'ai également contribué à un travail d'épidémiologie qui a donné lieu à un article publié dans *Phytopathology* (DOI: 10.1094/PDIS-03-21-0579-RE) et qui est fourni en annexe 7. Cet article décrit et analyse la distribution de plusieurs maladies du riz (la panachure jaune, le flétrissement bactérien, la pyriculariose et l'helminthosporiose) dans les principales zones rizicoles de l'Ouest du Burkina Faso. Ma contribution dans cette publication a été ma participation à l'évaluation des

symptômes des maladies dans les rizières (2 missions), la collecte des échantillons des feuilles infectées, et la validation du diagnostic visuel de l'helminthosporiose du riz par l'isolement et la caractérisation moléculaire des espèces.

Chapitre 1 : Identification des espèces fongiques associées aux lésions de l'helminthosporiose du riz

Ce chapitre présente le travail réalisé sur l'identification des espèces associées aux symptômes de l'helminthosporiose du riz, principalement avec des outils moléculaires. Il est composé de 3 articles. Le premier est en préparation et décrit la caractérisation des isolats de champignons par *genotyping-by-sequencing* (GBS) ainsi que leur pathogénie. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux espèces responsables de l'helminthosporiose dans différents pays, sur différents organes de riz cultivé (*Oryza sativa*) et sauvage (*O. longistaminata*) et sur des Poacées (*Zizania palustris*, *Ischaemum rugosum* et *Pennisetum glaucum*) partageant les mêmes niches écologiques. Le deuxième article (à soumettre à la revue *European Journal of Plant Pathology*) a permis d'apporter des précisions sur les espèces responsables de l'helminthosporiose du riz en Camargue par une approche moléculaire. Le troisième article publié dans *Plant Disease* rapporte le premier signalement de *Exserohilum rostratum* sur le riz au Mali.

Article 2 : Caractérisation par *genotyping-by-sequencing* (GBS) et pathogénie des espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz

Kouka Hilaire Kaboré * ^{1,2,3}, **Abalo Itolou Kassankogno** ⁴, **Joëlle Milazzo** ^{2,3},
Sonia Guillou ^{2,3}, **Laurence Blondin** ^{2,3}, **Sebastien Ravel** ^{2,3}, **Florian Charriat** ^{2,3},
Henri Adreit ^{2,3}, **Marc-Henri Lebrun** ¹, **Didier Tharreau** ^{2,3}

¹ UMR BIOGER, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon, France

² CIRAD, UMR PHIM, 34398 Montpellier, France

³ PHIM, Univ. Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, L'Institut Agro Montpellier, Montpellier, France

⁴ CNRST/INERA, Laboratoire de Phytopathologie, LMI PathoBios, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Corresponding author, E-mail: koukas2@yahoo.fr

Introduction

Le riz est un aliment largement consommé en Asie et en Afrique. Un hectare de riz nourrit environ 25 personnes et devra passer à 45 personnes d'ici 2050 (Boddy, 2016). Pour répondre aux besoins humains, la production mondiale de riz cargo devrait passer d'environ 500 millions de tonnes en 2020 à 582 millions de tonnes en 2029 (OECD-FAO, 2020). Cependant, des facteurs biotiques et abiotiques impactent considérablement la productivité du riz (Fahad et al., 2019). Les pertes de rendements du riz causées par les agents pathogènes et les ravageurs sont estimées à 30% à l'échelle mondiale (Savary et al., 2019). Les pertes les plus élevées sont enregistrées dans les régions à déficit alimentaire où la croissance de la population est également rapide (Savary et al., 2019).

La pyriculariose (causée par *Pyricularia oryzae*), l'helminthosporiose (*Bipolaris* spp., *Exserohilum rostratum*), la curvulariose (*Curvularia* spp.) et la cercosporiose (*Cercospora janseana*) sont les maladies fongiques couramment rencontrées sur le riz (Ou, 1985 ; Khemmuk et al., 2016 ; Zhou, 2019). Ces maladies provoquent des lésions foliaires assez similaires pouvant apparaître du stade plantule jusqu'au stade maturation (Zhou et al., 2021). Les semences de riz sont porteuses des espèces responsables de ces maladies (Groth, 1991; Mew & Gonzáles, 2002; Ouédraogo et al., 2016) et la transmission de ces maladies par la semence infectée est connue (Ouédraogo, 2008 ; Faivre-Rampant et al., 2013). Cependant, la distinction des symptômes de ces maladies sur les feuilles de riz et la semence demeure parfois problématique.

L'helminthosporiose du riz est généralement attribuée à *Bipolaris oryzae*. Les symptômes caractéristiques de la maladie sont des taches brunes ovales ou circulaires réparties à la surface de la feuille (Ou, 1985 ; Burgos et al., 2013 ; Sunder et al., 2014). Cependant, *Exserohilum rostratum* et plusieurs espèces de *Bipolaris* dont *B. cynodontis*, *B. victoriae*, *B. zeicola* ont été également signalées comme des agents responsables de l'helminthosporiose du riz (Motlagh & Kaviani, 2008a,b ; Aslam et al., 2021 ; Kaboré et al., 2021). Dans cet article le nom générique *Helminthosporium* sera utilisé pour désigner les espèces des genres *Bipolaris*, *Curvularia* et *Exserohilum*. Ces espèces ont des caractères morphologiques similaires (Archana, 2014 ; Manamgoda et al., 2014) qui ne facilitent pas le diagnostic. La caractérisation moléculaire est l'un des moyens préconisés en vue d'une identification précise (Archana, 2014; Manamgoda et al., 2014). Récemment, les séquençages des régions de l'espaceur interne transcrit (ITS) de l'ADN ribosomique, de la grande sous unité (LSU) de l'ARN ribosomique, des gènes glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et du gène du facteur d'élongation alpha (EF1) ont été utilisés avec succès pour l'identification des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz (Archana, 2014 ; Aslam et al., 2021 ; Kaboré et al., 2021). Pour s'assurer de l'identité exacte de l'espèce présente, elles ont aussi été utilisées préalablement à des études de génétique des

populations avec des marqueurs adaptés tels que les microsatellites (Castell-Miller & Samac, 2012 ; Ahmadpour et al., 2018). Un outil permettant à la fois l'assignation taxonomique et la description de la diversité génétique permettrait un gain en temps et des économies en ressources financières, surtout dans les études qui traitent de nombreux isolats.

Le *Genotyping-by-sequencing* (GBS) ou génotypage par séquençage, né du séquençage de nouvelle génération, produit un grand nombre de marqueurs de polymorphismes mononucléotidiques (SNP) permettant les études phylogénétiques et de diversité génétique. Il permet le traitement d'un grand nombre d'isolats grâce au multiplexage et ne nécessite pas la mise au point de marqueurs spécifiques pour chaque espèce étudiée. Le GBS est une approche relativement peu coûteuse utilisée pour obtenir une séquence à complexité réduite du génome entier (Elshire et al., 2011 ; Poland et al., 2012). La capacité d'aligner ces séquences sur un génome complet de l'espèce étudiée permet d'utiliser le GBS pour discriminer les complexes d'espèces cryptiques (Wilson et al., 2015).

Les objectifs de cette étude étaient : (i) de mesurer la capacité du GBS à identifier les espèces associées à l'helminthosporiose du riz ; (ii) d'identifier les espèces dominantes associées à l'helminthosporiose et leurs distributions dans divers pays et (iii) de vérifier la pathogénicité des espèces dominantes. Pour les besoins des analyses, nous avons assemblé de novo les génomes pour les espèces de *Bipolaris bicolor*, *B. secalis*, *B. yamadae*, *Curvularia hawaiiensis*, *C. spicifera* et *Exserohilum rostratum*. Faute de temps, ces génomes n'ont pas encore pour l'instant été analysés en détail ni valorisés sous une autre forme que l'identification de SNP pour les analyses de GBS.

Matériel et méthodes

Collecte et isolement des monoconidies

Des feuilles, panicules et grains de riz cultivé (*O. sativa*), sauvage (*O. longistaminata*) et d'autres Poacées (*Ischaemum rugosum* et *Pennisetum glaucum*) présentant les

symptômes de l'helminthosporiose ont été collectés entre 2018 et 2019 au Burkina Faso, au Mali, en France, au Pakistan, en Italie et au Vietnam. Ils ont été disposés séparément dans des boîtes de Petri contenant une double couche de papier Whatman humidifié (Mathur & Kongsdal, 2003). L'incubation a été réalisée à 25 °C pendant 7 jours sous éclairage artificiel (photopériode de 12 h). Sous une loupe binoculaire et à l'aide d'une pipette pasteur étirée à la flamme, les conidies ayant les caractères morphologiques de *Helminthosporium* ont été collectées et étalées sur du milieu bacto-agar (35 g pour 1 L d'eau). Après une incubation de 24 h (25°C, 12 h de photopériode), une seule conidie germant a été transférée sur du milieu *potato dextrose agar* (PDA, 39 g/L) et incubée dans les mêmes conditions pendant 7 jours.

En plus de ces isolats, nous avons reçu des isolats de *Helminthosporium* isolés du riz cultivé au Bénin, au Ghana, au Sénégal et au Togo par AfricaRice (Dr D. Silué). Des isolats de *Helminthosporium* isolés sur un riz sauvage (*Zizania palustris*) ont été reçus des Etats-Unis (Dr Castel-Miller, Université du Minnesota) et des isolats de Chine antérieurement isolés du riz par le CIRAD ont également été inclus dans cette étude. Au total 505 isolats ont été réunis (Tableau1).

Tableau 1 : Isolats de *Helminthosporium* de différents pays, de différents organes du riz et genres apparentés

Continent	Pays	Nombre d'isolats	Espèce végétale	Organes	Ecologie
Afrique	Bénin	19	<i>Oryza sativa</i>	Feuilles et grains	Bas fond, plateau
	Burkina Faso	318	<i>O. sativa</i>	Feuilles et grains	Bas fond, irriguée
	Ghana	13	<i>O. sativa</i>	Feuilles	Bas fond
	Mali	36	<i>O. sativa</i> ; <i>O. longistaminata</i> ; <i>Ischaemum rugosum</i>	Feuilles et grains	Bas fond, irriguée
	Sénégal	9	<i>O. sativa</i> ; <i>Pennisetum glaucum</i>	Feuilles	Bas fond
	Togo	24	<i>O. sativa</i>	Feuilles	Bas fond
Amérique	Etats-Unis	20	<i>O. sativa</i> , <i>Zizania palustris</i>	Feuilles et grains	ND
	Colombie	1	<i>O. sativa</i>	Feuilles	ND
Asie	Chine	8	<i>O. sativa</i>	Panicules	Irriguée
	Pakistan	21	<i>O. sativa</i>	Feuilles	ND
	Vietnam	8	<i>O. sativa</i>	Feuilles	ND
Europe	France	21	<i>O. sativa</i>	Grains	Irriguée
	Italie	7	<i>O. sativa</i>	Feuilles	Irriguée

ND : non déterminé

Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir de mycélium frais en modifiant la méthode au bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) décrite par Doyle et Doyle (1987). Un fragment de mycélium cultivé pendant 5 jours sur du PDA a été transféré sur du milieu *Corn Meat Agar* (CMA, 18 g/L) préalablement recouvert d'un disque de cellophane stérile. Les boîtes ont été placées à 25 °C (photopériode de 12 h) pendant 7 jours. Environ 30 mg du mycélium ont été récoltés et transférés dans un tube de 2 mL contenant du sable stérile et 2 billes. Ces tubes ont été placés directement dans l'azote liquide et le mycélium a été broyé à froid avec un broyeur (Retsch MM 301) pendant 4 min à 15 Hz. Un millilitre de tampon de lyse CTAB autoclavé, additionné de

1% de polyvinyl pyrrolidone (MW. 360 000), de 1% de Na₂SO₃, de 0,2 mg/mL d'ARNase et de 1 mg/mL de protéinase K a été ajouté dans chaque tube. Les tubes ont été agités à l'aide du vortex (Vortex-Genie 2) et incubés à l'étuve à 65°C pendant 2 h. Les tubes ont été ensuite centrifugés pendant 3 min à 8 000 rpm et environ 900 µL du surnageant ont été transférés dans un nouveau tube de 2 mL. Un millilitre de chloroforme isoamilalcool (CIAA, 24/1 v/v) a été ajouté dans chaque tube et mélangé par inversion avant d'être centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 min. Après centrifugation, 700 µL de surnageant ont été transférés dans des tubes de 1,5 mL. Six cent microlitres d'isopropanol à -20°C et 210 µL de NaCl 5M ont été ajoutés et mélangés par inversion. Les tubes ont été ensuite conservés à -20 °C pendant une nuit. Les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm à 4 °C pendant 30 min et le surnageant a été éliminé. Cinq cent microlitres d'éthanol à 70% ont été ajoutés dans chaque tube et centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 5 min. L'éthanol a été éliminé et le culot a été séché pendant 10 min sous la hotte. L'ADN a été remis en suspension dans 100 µL d'eau milliQ stérile. La qualité et la quantité de l'ADN extrait ont été évaluées par spectrophotométrie au Nanodrop 2000 et par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Amplification et séquençage de régions ITS, et des gènes GAPDH et TEF

Trois paires d'amorces communément utilisées pour l'identification des champignons en général et des espèces du complexe *Helminthosporium* en particulier, ont été utilisées pour la caractérisation des isolats. Le couple d'amorces ITS5/ITS4 (ITS5-F 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' ; ITS4-R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') pour l'amplification de la région ITS1-5,8S-ITS2 (White et al., 1990), la paire GPD1/GPD2 (GPD1-F 5'-CAACGGCTTCCGTCGCATTG-3' ; GPD2-R 5'GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') pour l'amplification du gène de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Berbee et al., 1999) et la paire TEF1-983/TEF1-2218 (TEF1-983-F 5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3' ; TEF1-2218R-5'-ATGACACCRACRGCACRGTYTG-3') pour l'amplification du gène du facteur d'élongation 1α (Rehner & Buckley, 2005). Les amplifications par réaction en chaîne par polymérase (PCR) ont été réalisées à

l'aide d'un thermocycleur (Biometra) dans un volume total de 25 µL contenant 14,75 µL d'eau commerciale, 5 µL de tampon 5X (Promega GoTaq), 1 µL de dNTPs (10mM), 1 µL (10 µM) de chaque amorce sens et antisens, 0,25 µL de Taq polymérase et 2 µL d'ADN génomique (10 ng). Un contrôle négatif a été inclus dans toutes les séries de PCR, pour lequel de l'eau ultrapure a été utilisée à la place de l'ADN. Les amplifications ont été réalisées avec un programme spécifique à chaque amorce (Tableau 2). La présence d'une bande de taille attendue a été vérifiée par migration électrophorétique à 100 V pendant 35 min sur gel d'agarose à 1,5% dans du tampon TAE 0,5 X. La purification des produits PCR et le séquençage ont été effectués par Eurofins, Cologne (Allemagne).

Tableau 2 : Programme des PCR en fonction des gènes

Etapes	ITS5/ITS4		GPD1/GDP2		TEF1-983/ TEF1-2218	
	Temperature	Durée	Temperature	Durée	Temperature	Durée
1	95 °C	2 min	96 °C	2 min	95 °C	3 min
2	95 °C	30 s	96 °C	1 min	94 °C	40 s
3	55 °C	1 min	52 °C	1min	54 °C	50 s
4	72 °C	1 min	72 °C	50 s	72 °C	1 min
5	72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C	5 min
6	15 °C	infini	15 °C	infini	15 °C	infini

Les étapes 2 à 4 sont répétées 35 fois

Assignation taxonomique et analyses phylogénétiques sur la base des 3 régions génomiques amplifiées et séquencées

Les séquences nucléotidiques générées par PCR, après avoir été vérifiées et corrigées, ont été utilisées pour obtenir une séquence consensus à l'aide de Codoncode version 5.1.5 (CodonCode Corporation). Les séquences consensus ont été comparées par BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et les isolats ont été assignés à des espèces sur la base de leur similarité avec les séquences de ces dernières dans la base de données NCBI. Les séquences nucléotidiques produites et les séquences de références de *Helminthosporium* téléchargées sur NCBI ont été alignées afin de

construire des arbres phylogénétiques selon la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel MEGA-X 10.2.10 (Kumar et al., 2018). La robustesse des branches de l'arbre consensus a été testée par la méthode de bootstraps avec 1000 répétitions.

GBS : préparation des banques et séquençage

La préparation des banques pour le séquençage GBS a été réalisée en collaboration avec la plateforme de génotypage de l'UMR AGAP/CIRAD selon la méthode décrite par Elshire et al. (2011). L'ADN génomique des isolats a été normalisé à une concentration de 10 ng/μL et digéré avec l'enzyme de restriction *ApeKI* (5 U) à 75 °C pendant 2 h. La digestion de l'ADN a été suivie par la ligation à des adaptateurs dont un commun à tous les puits et un autre spécifique à chaque échantillon matérialisé par un code-barres. La ligation a été réalisée à l'aide d'une ADN ligase T4 à 22 °C pendant 30 min et la ligase a été inactivée en la maintenant à 65 °C pendant 10 min. Une purification a été effectuée avec le kit QIAquick de QIAGEN. La banque a été enrichie par PCR dans un volume de 50 μl de solution réactionnelle comprenant 25 μl de 2X Taq Master mix NEB, 19 μL d'eau, 2 μL d'ADN et 2 μL de chacune des amorces (10 μM). L'amplification a été réalisée selon le programme : 98 °C pendant 30 s, suivi de 18 cycles de 98 °C pendant 10 s, 65 °C pendant 30 s, et 72 °C pendant 30 s, en terminant par une élongation à 72 °C pendant 5 min. Les produits PCR ont été purifiés avec le kit de purification QIAquick de QIAGEN avant d'être évalués au BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies) pour la distribution de la taille des fragments. Les banques GBS ainsi produites ont été séquencées sur un séquenceur Illumina HiSeq 4000. Des séquences (« reads ») de 150 nucléotides couplés par paires d'extrémités (« pair-end ») ont été produites.

Production de génomes complets de *Bipolaris* sp., *B. bicolor*, *Curvularia hawaiiensis*, *C. spicifera* et de *Exserohilum rostratum*

L'assignation à une espèce par GBS est basée sur l'homologie avec un génome complet de référence. Pour certaines espèces du groupe *Helminthosporium*, nous ne

dispositions pas de séquences de référence. Nous avons donc réalisé des séquençages de génomes de ces espèces. Le séquençage d'un génome complet requiert de l'ADN de haute qualité. Des modifications et des étapes supplémentaires ont été apportées à la méthode d'extraction au CTAB décrite précédemment. Brièvement, 60 mg de mycélium ont été broyés dans un mortier plongé dans l'azote liquide. Le tampon de lyse CTAB a été dosé après autoclavage avec uniquement 1% de Na₂SO₃. Après rinçage à l'éthanol 70°, l'ADN a été remis en suspension dans 500 µL de TEHS 1x (NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM et EDTA 1 mM à pH=8) préchauffé à 37 °C. Dix microlitres de Rnase A à 10mg/mL ont été ajoutés et incubés pendant 30 min à 37°C. L'étape de séparation au CIAA et le rinçage à l'éthanol ont été répétés. L'ADN a été récupéré dans 100 µL d'eau milliQ stérile. La qualité et la quantité de l'ADN extrait ont été évaluées par spectrophotométrie au Nanodrop 2000 et par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Le séquençage a été effectué sur un séquenceur Illumina NovaSeq 6000 avec une profondeur supérieure à 50X. L'assemblage a été réalisé avec le logiciel ABySS (Simpson et al., 2009) pour différentes longueurs élémentaires (K-mer) de reads. La valeur N50 des séquences assemblées a été évaluée suivant les différentes valeurs de K-mers et, pour chacun des génomes, la séquence assemblée ayant la valeur de N50 la plus élevée a été retenue.

Assignment taxonomique et analyse phylogénétique à partir des données de GBS

Pour aboutir à l'assignment taxonomique de nos isolats, les outils GBSX v1.3 (Herten et al., 2015) et RattleSNP (<https://github.com/sravel/RattleSNP>) ont été respectivement utilisés pour le démultiplexage et le mapping. Le démultiplexage a consisté en une identification individuelle sur la base des code-barres des séquences des isolats multiplexés au cours de la préparation de la banque GBS. Les renseignements à fournir pour le fonctionnement de RattleSNP ainsi qu'une présentation schématique du pipeline sont résumés respectivement dans le script

fourni en annexe (Annexe 1) et la figure en annexe 2. Pour l'étape de mapping, le module BWA_MEM de RattleSNP a été utilisé pour mapper les reads produits par GBS sur les génomes complets de référence des espèces de *Helminthosporium* (Annexe 3). Les données obtenues de l'outil BWA_MEM ont été exploitées par l'outil SAMTOOLS pour produire des statistiques des taux de mapping des reads GBS sur les génomes de référence. Sur la base de ces statistiques, un isolat donné a été assigné à l'espèce sur laquelle le taux de mapping était le plus élevé et au minimum supérieur ou égal à 80%. Les isolats qui ont présenté un taux de mapping maximum inférieur à 80% n'ont pas été assignés.

Après l'identification des espèces, une analyse phylogénétique basée sur les marqueurs SNPs a été effectuée pour apprécier les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Bipolaris*. L'outil RattleSNP a été de nouveau utilisé pour mapper les reads des isolats retenus sur le génome de référence de l'isolat ATCC 44560 de *Bipolaris oryzae* (Condon et al., 2013) et pour l'identification des marqueurs SNPs (SNPCALLING). L'étape du SNPCALLING fait appel aux outils gatk (HaplotypeCaller, GenomicsDBImport et GenotypeGVCFs) pour identifier les marqueurs SNPs. Une fois les marqueurs SNPs identifiés, ils ont été soumis à un filtre à l'aide de vcftools en fixant la profondeur minimum de séquençage des marqueurs à 2X (minDP 2), la qualité minimum du génotype à 30 (minQ 30), la fréquence des allèles mineurs à 5% (maf 0,05) et les données manquantes à un maximum de 30% (max-missing 0,70) (Danecek et al., 2011). A partir des SNPs filtrés, un arbre phylogénétique basé sur la méthode du maximum de vraisemblance avec des bootstraps calculés après 1000 répétitions a été réalisé à l'aide de l'outil RaxML (Stamatakis, 2014).

Test de pathogénicité

Matériel végétal et dispositif expérimental

Les variétés de riz FKR 19, FKR 62N, TS2, Gambiaka, Manobi et Kitaake ont été utilisées pour évaluer la pathogénicité d'isolats sélectionnés pour représenter les

principales espèces rencontrées. Les variétés FKR 19, FKR 62N, TS2 et Gambiaka sont du Burkina Faso, Kitaake est une variété d'origine japonaise utilisée comme témoin au laboratoire et Manobi est une variété d'origine française cultivée en Camargue (France). Pour les tests de pathogénicité, les variétés de riz ont été cultivées sous serre pendant 25 jours (stade 3-4 feuilles) dans des pots de 9x9x9,5 cm contenant du terreau (Jiffy : 58% de tourbe blonde, 18% de fibres de coco, 10% de perlite, 9% de pierres volcaniques et 5% d'argile) et de l'engrais minéral NPK 13-5-19 (Basacote Native 6M) à 3,5 g.L⁻¹ de sol. Un dispositif en bloc complètement randomisé composé de 3 répétitions a été adopté. Pour ce faire, chaque pot a été ensemencé avec 5 grains et une répétition était constituée de 4 pots. Les 6 variétés ont été scindées dans 2 plateaux à raison de 3 variétés par plateau, soit 12 pots (60 plantes). Deux arrosages ont été effectués chaque jour.

Matériel fongique et production d'inoculum

Trente-trois isolats représentant les différentes espèces majoritaires isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz et de différentes origines géographiques ont été choisis (Tableau 3). Ces isolats monoconidiens ont été cultivés pendant 14 jours (10 jours à 25 °C et 4 jours à 28°C) sur du milieu de culture fait à base de tourteau pour lapin (50 g de tourteau alimentaire pour lapin - Kaytee Products, Inc. Chilton, WI 53014, USA et 15 g d'agar pour un litre de milieu) (Hau & Rush, 1980). Les conidies ont été recueillies et les suspensions de conidies ont été ajustées à 1 x 10⁴ conidies/mL avec 0,5% de gélatine finale.

Tableau 3 : Isolats utilisés pour l'évaluation de la pathogénicité

N°	Espèces	Isolats	Hôte/organe	Pays de provenance
1	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9010	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
2		BF9083	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
3		BN9007	<i>O. sativa</i> /grain	Benin
4		GH9012	<i>O. sativa</i> /feuille	Ghana
5		ML9025	<i>O. longistaminata</i> /feuille	Mali
6		TG9010	<i>O. sativa</i> /feuille	Togo
7	<i>Bipolaris maydis</i>	BF9046	<i>O. sativa</i> /panicule	Burkina Faso
8		BF9100	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
9		GH9009	<i>O. sativa</i> /feuille	Ghana
10		ML9030	<i>O. sativa</i> /feuille	Mali
11		ML9032	<i>O. sativa</i> /feuille	Mali
12		TG9018	<i>O. sativa</i> /feuille	Togo
13	<i>Bipolaris bicolor</i>	BF9094	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
14		BF9152	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
15		BF9156	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
16		BF9159	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
17		BF9322	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
18		BF9324	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
19	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	ML9004	<i>O. sativa</i> /feuille	Mali
20		ML9005	<i>O. sativa</i> /feuille	Mali
21		ML9006	<i>O. longistaminata</i> /feuille	Mali
22		ML9007	<i>O. longistaminata</i> /feuille	Mali
23	<i>Curvularia spicifera</i>	FR9030	<i>O. sativa</i> /grain	France
24		FR9045	<i>O. sativa</i> /grain	France
25		FR9067	<i>O. sativa</i> /feuille	France
26		PK9024	<i>O. sativa</i> /feuille	Pakistan
27		PK9034	<i>O. sativa</i> /panicule	Pakistan
28	<i>Exserohilum rostratum</i>	BF9006	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
29		BF9038	<i>O. sativa</i> /feuille	Burkina Faso
30		ML9044	<i>O. sativa</i> /feuille	Mali
31		ML9046	<i>O. sativa</i> /feuille	Mali
32		SN9008	<i>O. sativa</i> /feuille	Sénégal
33		TG9001	<i>O. sativa</i> /feuille	Togo

Inoculation et évaluation des symptômes

L'inoculation des plantes de riz a été faite par pulvérisation de 30 mL de suspensions conidiennes ou de l'eau à 0,5% de gélatine (contrôle négatif) sur 60 plantes. Les plantes ont été maintenues à l'humidité maximale (100%) à 21°C pendant une nuit puis transférées dans un phytotron à 27 °C. Sept jours après l'inoculation, 20 feuilles (1 par plante) ont été prélevées par variété et par isolat, soient 60 feuilles pour les 3 répétitions. Elles ont été collées sur du papier adhésif et scannées à 600 points par pouce ou DPI (Epson Scan V370).

Analyse de données

Les images ont été analysées à l'aide du paquet R LeAFtool (Lesion Area Finding tool ; <https://github.com/sravel/LeAFtool>), qui mesure la surface des feuilles et le nombre de lésions. Les paramètres d'analyse d'image étaient réglés pour un minimum de surface foliaire de 1000 pixels et 10 pixels pour la surface minimale d'une lésion.

Pour évaluer la pathogénicité des isolats, nous avons utilisé un modèle linéaire (package stats) où le nombre de lésions par feuille était fonction de l'effet de l'isolat fongique (espèce et isolat) et de la variété. Ce modèle a été utilisé pour calculer les moyennes des moindres carrés (LSmeans) en utilisant le package 'lsmeans' de R. La transformation en racine carrée a été utilisée pour obtenir une variable avec une distribution normale et des variances égales (homoscédasticité). Les différences d'impact d'un isolat fongique sur les différentes variétés et les différences de sensibilité des différentes variétés à un isolat fongique ont été testées par ANOVA (package stats) sur le modèle présenté ci-dessus. Par la suite, afin d'identifier et de calculer des groupes statistiques entre les variétés ou les isolats, un test de Tukey HSD a été appliqué pour comparer les LSmeans issues du modèle (package *multcomp*, *stats*) au seuil de 5%.

Résultats

Nouveaux génomes produits

L'assignation par GBS est basée sur l'homologie avec un génome de référence. Les génomes complets de référence n'étant pas disponible pour les espèces de *E. rostratum* et certaines espèces de *Bipolaris* et *Curvularia*, nous avons séquencé et assemblé les génomes de 6 isolats. Les isolats ML9021, FR9030, PK9021 et BF9006 ont été choisis pour représenter respectivement les espèces *Bipolaris bicolor*, *Curvularia spicifera*, *C. hawaiiensis* et *Exserohilum rostratum*. Les isolats BF9003 et PK9029 ont été choisis car ils étaient respectivement proches des espèces *B. secalis*, et *B. yamadae* ou *B. maydis*, leur assignation à ces espèces n'étant confirmée que par 2 des 3 séquences utilisées (Figures 1, 2 et 3).

Les résultats ont montré un bon niveau d'assemblage. Le nombre de contigs (moyenne = 258) est relativement faible et la contiguïté est forte (N50 variant entre 168 033 pb et 1 163 278 pb ; Tableau 4) ce qui témoigne d'une faible fragmentation. La taille des génomes est comprise entre 31 et 35 Mb (Tableau 4) ce qui correspond aux tailles attendues pour ces espèces. Les assemblages n'ont pas été analysés plus en détail, ce travail n'étant pas une priorité pour la thèse, mais ils ont pu être utilisés pour l'assignation à partir des données GBS.

Tableau 4 : Génomes complets des espèces de *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. et *Exserohilum rostratum* séquencés par Illumina dans le cadre de la thèse

Espèces	Isolats	Caractéristiques métriques des génomes			
		Nombre de contigs	Taille du génome (pb)	Scaffold N50 (pb)	Taille du contig le plus grand
<i>Bipolaris bicolor</i>	ML9021	198	35290802	965535	1842129
<i>Bipolaris secalis</i>	BF9003	611	34536598	547899	1440574
<i>Bipolaris yamadae</i>	PK9029	122	33529792	1077338	2114826
<i>Curvularia spicifera</i>	FR9030	160	31802399	714116	2117616
<i>C. hawaiiensis</i>	PK9021	370	31471389	168033	763367
<i>Exserohilum rostratum</i>	BF9006	90	34712417	1163278	2896553

N50 : taille du scaffold tel que 50% des bases de l'assemblage sont comprises dans des scaffolds de taille supérieure à ce scaffold. Cet indice mesure la fragmentation du génome assemblé en contigs ; plus il est élevé moins le génome est fragmenté.

Comparaison de l'assignation taxonomique par séquence de gènes (ITS, GAPDH et TEF) et par GBS

Pour évaluer l'intérêt d'utiliser le GBS pour l'assignation des isolats à une espèce, nous avons comparé l'assignation de 112 isolats caractérisés à la fois par le séquençage des 3 régions génomiques utilisées classiquement pour l'assignation et par le GBS.

La recherche de similarité par BLAST entre les séquences ITS, GAPDH et TEF produites et celles disponibles dans les bases de données NCBI ont permis d'assigner les isolats aux genres *Bipolaris*, *Curvularia* et *Exserohilum* (Tableau 5). Pour les espèces *B. bicolor* (1 isolat), *B. maydis* (3), *B. oryzae* (54 isolats) et *E. rostratum* (19 isolats), l'assignation a été identique pour les 3 régions génomiques. Par contre, des différences d'assignation ont été observées pour les autres espèces. L'assignation des isolats (12) à *Curvularia spicifera* a été identique par les gènes GAPDH et TEF. Tous les isolats assignés par GAPDH et TEF à *C. spicifera* n'ont pas pu être assignés avec précision par la région génomique ITS. Un constat similaire a été fait avec *B. cynodontis* où la majorité des isolats assignés (9) à cette espèce l'ont été grâce au gène GAPDH. Les 2 isolats assignés à *B. secalis* avec ITS et GAPDH ont été assignés à *B. shoemakeri* avec TEF. Ceux qui ont été assignés à *C. americana* (2) avec ITS et GAPDH ont été assignés à *C. spicifera* avec TEF. L'isolat assigné à *B. zeicola* par GAPDH et TEF a été assigné à *B. victoriae* avec la séquence ITS. Pour tous les isolats dont l'identification par les 3 régions génomiques n'a pas été identique, l'assignation taxonomique finale de ces isolats a été limitée au genre.

Pour l'assignation taxonomique par GBS, les séquences produites par GBS des 112 isolats analysés ci-dessus ont été alignées sur les génomes complets de 18 isolats représentant 15 espèces de *Helminthosporium* (Annexe 3). Un isolat a été assigné à une espèce lorsque le taux de similarité avec cette espèce était le plus élevé et supérieur ou égal à 80%. Sur les 112 isolats, 8 n'ont pas pu être assignés du fait d'un taux de similarité maximum inférieur à 80%. Les taux de similarité maximum retenus

pour l'assignation des isolats varient de 80% à 114%. Les valeurs supérieures à 100% sont dues à la présence d'éléments transposables sur les génomes de référence. Pour les 104 isolats présentant des taux de mapping supérieurs ou égaux à 80%, les espèces identifiées sont *Bipolaris bicolor* (1), *B. maydis* (4), *B. oryzae* (50 isolats) *B. secalis* (2), *B. sorokiniana* (8), *B. yamadae* (1), *Curvularia hawaiiensis* (2), *C. spicifera* (17) et *E. rostratum* (19). Pour les 77 isolats assignés avec certitude c'est-à-dire identiquement par les 3 marqueurs (ITS, GPD, TEF), 73 isolats soit 94,8% ont eu la même assignation par GBS (les 4 isolats non assignés par GBS l'ont été par un taux de mapping inférieur à 80%). Pour les 35 isolats dont l'assignation aux espèces par les 3 régions génomiques n'étaient pas unanime, l'identification s'est limitée aux genres (15 isolats du genre *Bipolaris* et 20 isolats du genre *Curvularia*). Le GBS a apporté plus de précision dans l'identification de ces 35 isolats assignés aux genres *Bipolaris* (15) et *Curvularia* (20) par les 3 régions génomiques (Tableau 6). Au sein des 15 isolats du genre *Bipolaris*, le GBS a permis d'identifier *B. sorokiniana* (8), *B. maydis* (1), *B. secalis* (2) et *B. yamadae* (1). Trois isolats n'ont pas pu être identifiés pour un taux de mapping inférieur à 80%. Pour les 20 isolats du genre *Curvularia*, le GBS a assigné 2 isolats à *C. hawaiiensis* et 17 isolats à *C. spicifera*. Un seul isolat n'a pas pu être assigné pour un faible taux de mapping.

Tableau 5 : Espèces fongiques identifiées en fonction de la région génomique considérée sur un échantillon de 112 souches isolées du riz

Espèce	Assignation taxonomique en fonction de la région génomique			Assignation par GBS
	ITS	GAPDH	TEF	
<i>Bipolaris bicolor</i>	1	1	1	9
<i>B. coffeana</i>	0	1	2	0
<i>B. cynodontis</i>	4	9	1	0
<i>B. maydis</i>	4	4	5	4
<i>B. oryzae</i>	54	54	54	50
<i>B. secalis</i>	2	2	0	0
<i>B. setariae</i>	1	0	0	0
<i>B. shoemakeri</i>	0	0	2	0
<i>Bipolaris</i> sp.	5	1	6	3
<i>B. sorokiniana</i>	0	0	0	8
<i>B. victoriae</i>	1	0	0	0
<i>B. zeicola</i>	0	1	1	0
<i>Curvularia americana</i>	1	1	0	0
<i>C. hawaiiensis</i>	0	2	2	2
<i>C. nodosa</i>	2	0	0	0
<i>Curvularia</i> sp.	17	5	5	0
<i>C. spicifera</i>	0	12	12	17
<i>E. rostratum</i>	19	19	19	19

En gras les espèces identifiées de façon identique avec ITS, GAPDH, TEF et le GBS. Les écarts entre le nombre total d'isolats séquencés (112) et les nombres totaux des isolats assignés par régions génomique résultent du fait qu'un isolat n'a pas pu être assigné par ITS c'est-à-dire que sur la base de la région ITS ni l'espèce, ni le genre de cet isolat n'ont été identifiés, 2 isolats non identifiés par TEF et 8 isolats non assignés par GBS (pour taux de mapping inférieur à 80%)

Tableau 6 : Comparaison entre l'assignation par GBS et celle basée sur les 3 régions génomiques (ITS, GAPDH et TEF)

		Assignation par GBS									Non assigné (Taux mapping <80%)	Total	
		<i>B. bicolor</i>	<i>B. maydis</i>	<i>B. oryzae</i>	<i>B. secalis</i>	<i>B. sorokiniana</i>	<i>B. yamadae</i>	<i>C. hawaiiensis</i>	<i>C. spicifera</i>	<i>E. rostratum</i>			
Assignati on par 3 gènes (ITS, GAPDH et TEF)	<i>B. bicolor</i>	1											1
	<i>B. maydis</i>		3										3
	<i>B. oryzae</i>			50								4	54
	<i>Bipolaris</i> sp.		1		2	8	1					3	15
	<i>Curvularia</i> sp.							2	17			1	20
	<i>E. rostratum</i>									19		19	
Total		1	4	50	2	8	1	2	17	19	8	112	

Phylogénie

Pour évaluer la relation phylogénétique entre les espèces, nous avons réalisé une analyse phylogénétique pour chacune des régions séquencées (ITS, GAPDH et TEF) de 133 isolats dont 112 de notre étude et 21 de Genbank (Annexe 4). *Alternaria alternata* a été utilisée pour enraciner l'arbre. Des arbres phylogénétiques ont été également réalisés à partir des séquences ITS, GAPDH et TEF concaténées, ainsi que les séquences ITS et GAPDH concaténées. L'arbre obtenu avec les séquences TEF ne permet pas une bonne discrimination des espèces. Nous avons donc décidé de présenter ceux réalisés avec les séquences ITS, GAPDH, et ITS et GAPDH concaténées. Tous les phylogrammes réalisés présentent 3 clades regroupant chacun les isolats des 3 genres identifiés (*Bipolaris*, *Curvularia* et *Exserohilum*) (Figures 1, 2 et 3). Le phylogramme obtenu à partir des séquences ITS et GAPDH concaténées (Figure 3), montre que les isolats BF9003 et PK9029 dont l'assignation par les 3 régions génomiques n'a pas été identique sont respectivement proches de *B. secalis* et *B. yamadae*.

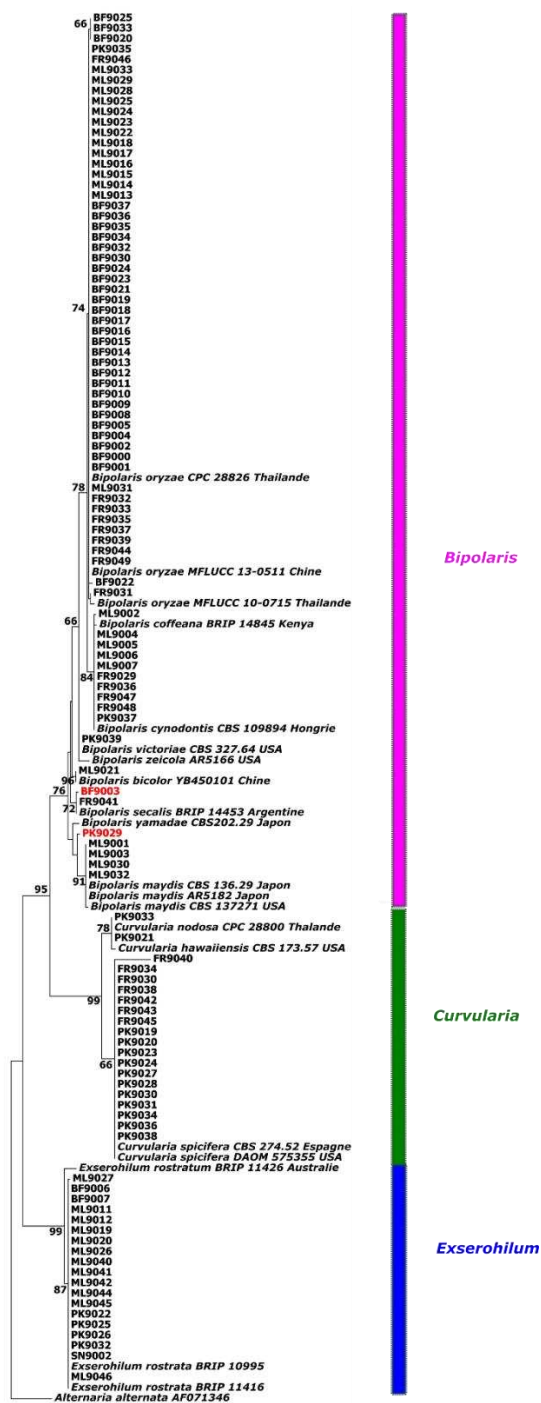


Figure 1 : Arbre phylogénétique obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance basée sur l'alignement des séquences ITS

Les valeurs de support aux nœuds représentent les pourcentages de bootstrap avec des valeurs $\geq 60\%$ sont indiquées au-dessus des branches. Les isolats de GenBank sont en gras et en italique. Les isolats en rouge sont ceux dont l'assignation par les 3 régions génomiques n'a pas été identique et dont nous avons séquencé leurs génomes complets. L'arbre est enraciné avec *Alternaria alternata* (EGS 34-016).

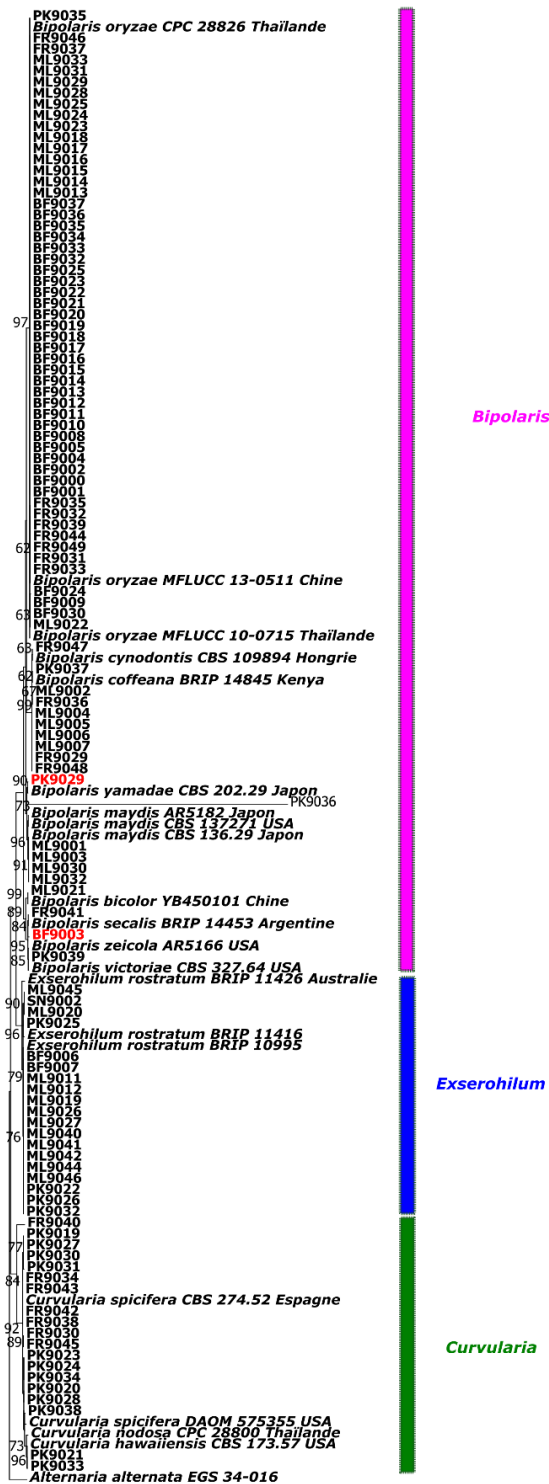


Figure 2 : Arbre phylogénétique obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance basée sur l'alignement des séquences du gène GAPDH

Les valeurs de support aux nœuds représentent les pourcentages de bootstrap avec des valeurs $\geq 60\%$ sont indiquées au-dessus des branches. Les isolats de GenBank sont en gras et en italique. Les isolats en rouge sont ceux dont l'assignation par les 3 régions génomiques n'a pas été identique et dont nous avons séquencé leurs génomes complets. L'arbre est enraciné avec *Alternaria alternata* (EGS 34-016).

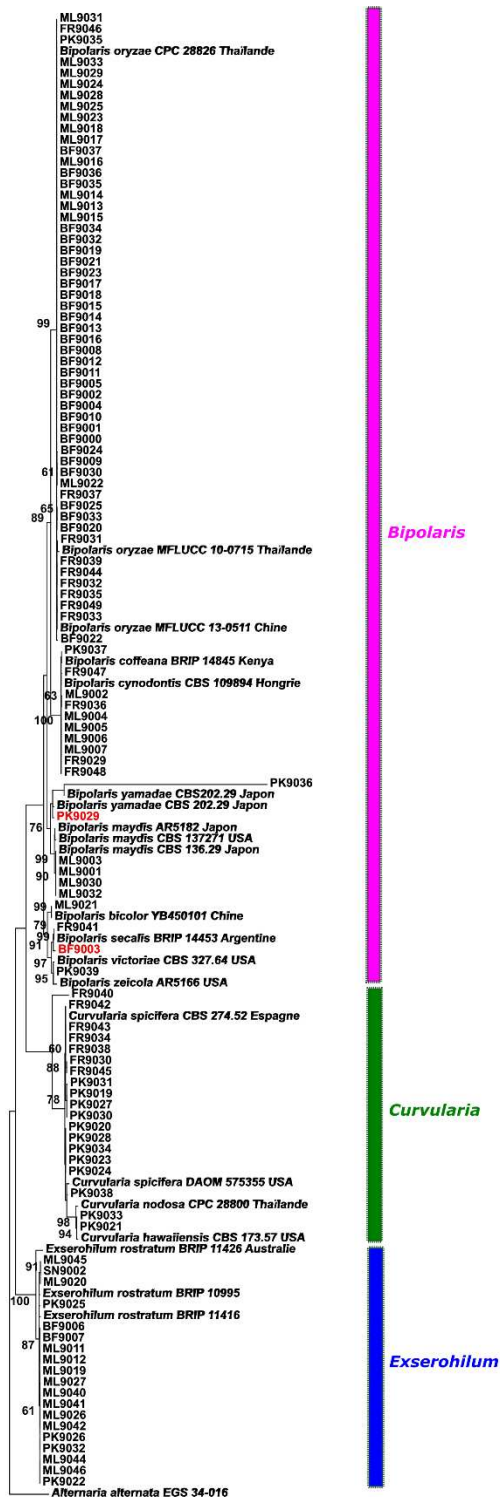


Figure 3 : Arbre phylogénétique obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance basée sur l'alignement des séquences ITS et GAPDH concaténées. Les valeurs de support aux nœuds représentent les pourcentages de bootstrap avec des valeurs $\geq 60\%$ sont indiquées au-dessus des branches. Les isolats de GenBank sont en gras et en italique. Les isolats en rouge sont ceux dont l'assignation par les 3 régions génomiques n'a pas été identique et dont nous avons séquencé leurs génomes complets. L'arbre est enraciné avec *Alternaria alternata* (EGS 34-016).

Assignment taxonomique par GBS

Cinq cent cinq isolats (y compris les 112 décrits précédemment) provenant de 13 pays ont été séquencés par GBS. Quatorze isolats non mappés à aucun génome de référence (problèmes liés aux code-barres certainement) ont été observés. Après application des filtres (taux de mapping sur un génome de référence $\geq 80\%$), 22 isolats ont été exclus. Les isolats exploitables (469) soient 93% des données produites, ont été assignés aux différentes espèces de *Helminthosporium* (Annexe 5). Les espèces identifiées appartiennent aux genres *Bipolaris* (240/469), *Exserohilum* (194/469) et *Curvularia* (35/469). Ces 3 genres ont été déclinés en 7 espèces dont *B. bicolor* (19/240), *B. maydis* (16/240), *B. oryzae* (172/240), *B. sorokiniana* (8/240), *C. hawaiiensis* (8/35), *C. papendorfii* (3/35), *C. spicifera* (24/35), *E. rostratum* (191/194) et *E. turcicum* (3/194) (Tableau 5). Pour chaque genre, on observe qu'une espèce est majoritaire. Ainsi *B. oryzae* représente 72 % des isolats de *Bipolaris*, *E. rostratum* 98 % des isolats de *Exserohilum* et *C. spicifera* 69 % des isolats de *Curvularia*.

Bien que les séquences ITS, GAPDH et TEF n'aient pas permis une assignation taxonomique unique des isolats BF9003 et PK9029, le séquençage de leurs génomes complets a permis d'identifier par GBS 25 isolats qui présentaient des forts taux de similarités avec ces isolats. Il s'agissait de 20 isolats qui ont montré des taux de mapping de 88 à 105% avec le génome de l'isolat PK9029 qui appartient probablement à *B. yamadae* ou *B. maydis*, et 5 isolats qui ont montré une similarité de 99% avec le génome de l'isolat BF9003 qui appartient probablement à *B. secalis*.

Distribution des espèces en fonction des pays, des organes malades et des hôtes

L'analyse sur la distribution des espèces en fonction des pays, de l'organe malade et des hôtes est descriptive et préliminaire. En effet les nombres d'isolats par pays, par organe et par espèce hôte ne sont pas identiques (et parfois faibles).

A l'exception du Sénégal, *Bipolaris oryzae* a été isolée dans tous les pays (Tableau 7). Cette espèce est majoritaire au sein des isolats du Bénin, de la Chine, du Ghana, des

USA et du Vietnam. *Exserohilum rostratum* est l'espèce dominante au Burkina Faso (51,3%), tandis que *C. spicifera* (57,9%) l'est dans l'échantillon du Pakistan.

L'analyse de la distribution des espèces en fonction des parties végétales infectées a révélé que *B. bicolor*, *B. oryzae*, *E. rostratum* et *C. spicifera* sont présentes sur les feuilles, les panicules et les grains (Tableau 8). En outre, la distribution des espèces en fonction de l'espèce végétale, a montré qu'à l'exception de *C. spicifera* isolée uniquement sur *O. sativa*, *B. bicolor* et *B. oryzae* en plus de *O. sativa* infectaient *O. longistaminata* (Tableau 9). *E. rostratum* quant à elle, a été isolée de *O. sativa*, *O. longistaminata*, *I. rugosum* et de *P. glaucum*.

Tableau 7 : Espèces isolées sur les feuilles, panicules et grains du riz cultivé et d'autres Poacées

Pays	Distribution des espèces											Total
	<i>B. bicolor</i>	<i>B. maydis</i>	<i>B. oryzae</i>	<i>B. sorokiniana</i>	<i>B. secalis</i>	<i>B. yamadae</i>	<i>C. hawaiiensis</i>	<i>C. papendorffii</i>	<i>C. spicifera</i>	<i>E. rostratum</i>	<i>E. turcicum</i>	
Bénin	0	0	18 (94,7%)	0	0	0	0	0	0	1 (5,3%)	0	19
Burkina Faso	16 (5,3%)	10 (3,3%)	87 (28,8%)	0	3 (0,9%)	18 (5,9%)	5 (1,7%)	2 (0,7%)	4 (1,3%)	155 (51,3%)	2 (0,7%)	302
Chine	0	0	7 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Colombie	0	0	1 (100%)	0	0	0	0	0	0	0	0	1
France	0	0	7 (41,2%)	3 (17,7%)	1 (5,88%)	0	0	0	6 (35,3%)	0	0	17
Ghana	0	0	7 (58,3%)	0	0	1 (8,3%)	0	1 (8,3%)	0	3 (25%)	0	12
Italie	1 (16,7%)	0	1 (16,7%)	0	1 (16,67%)	0	0	0	3 (50%)	0	0	6
Mali	1 (2,8%)	4 (11,4%)	13 (37,1%)	5 (14,3%)	0	0	0	0	0	12 (34,3%)	0	35
Pakistan	0	0	1 (5,3%)	0	0	1 (5,3%)	2 (10,5%)	0	11 (57,9%)	4 (21,1%)	0	19
Sénégal	1 (12,5%)	0	0	0	0	0	1 (12,5%)	0	0	6 (75%)	0	8
Togo	0	2 (11,1%)	7 (38,9%)	0	0	0	0	0	0	9 (50%)	0	18
USA	0	0	18 (94,7%)	0	0	0	0	0	0	1 (5,3%)	0	19
Vietnam	0	0	5 (83,3%)	0	0	0	0	0	0	0	1 (16,7%)	6
Total	19	16	172	8	5	20	8	3	24	191	3	469

Le chiffre avant la parenthèse représente le nombre d'isolats et le chiffre entre la parenthèse représente le pourcentage de l'espèce au sein des isolats du pays

Tableau 8 : Distribution des espèces associées aux symptômes de l'helminthosporiose en fonction de l'organe de collecte

Espèces fongiques	Organes infectés			Total
	Feuilles	Panicules	Grains	
<i>B. bicolor</i>	19 (100%)	0	0	19
<i>B. maydis</i>	15 (93,8%)	1 (6,2%)	0	16
<i>B. oryzae</i>	119 (69,2%)	19 (11%)	34 (19,8%)	172
<i>B. sorokiniana</i>	5 (62,5%)	0	3 (37,5%)	8
<i>B. secalis</i>	4 (80%)	0	1 (20%)	5
<i>B. yamadae</i>	19 (95%)	1 (5%)	0	20
<i>C. hawaiiensis</i>	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0	8
<i>C. papendorffii</i>	3 (100%)	0	0	3
<i>C. spicifera</i>	15 (62,5%)	3 (12,5%)	6 (25%)	24
<i>E. rostratum</i>	180 (94,2%)	5 (2,6%)	6 (3,1%)	191
<i>E. turcicum</i>	3 (100%)	0	0	3

Le chiffre hors des parenthèses représente le nombre d'isolats et le chiffre entre les parenthèses représente la part de l'espèce sur un organe.

Tableau 9 : Distribution des espèces en fonction de l'espèce hôte

Espèces fongiques	Espèces hôtes					Total
	<i>Ischaemum rugosum</i>	<i>Oryza longistaminata</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Pennisetum glaucum</i>	<i>Zizania palustris</i>	
<i>B. bicolor</i>	0	0	19 (100%)	0	0	19
<i>B. maydis</i>	0	1 (6,3%)	15 (93,7%)	0	0	16
<i>B. oryzae</i>	0	2 (0,1%)	152 (89,4%)	0	18 (10,5%)	172
<i>B. sorokiniana</i>	0	2 (25%)	6 (75%)	0	0	8
<i>B. secalis</i>	0	0	5 (100%)	0	0	5
<i>B. yamadae</i>	0	0	20 (100%)	0	0	20
<i>C. hawaiiensis</i>	0	0	8 (100%)	0	0	8
<i>C. papendorffii</i>	0	0	3 (100%)	0	0	3
<i>C. spicifera</i>	0	0	24 (100%)	0	0	24
<i>E. rostratum</i>	1 (0,5%)	2 (1,1%)	187 (97,9%)	1 (0,5%)	0	191
<i>E. turcicum</i>	0	0	3 (100%)	0	0	3

Le chiffre hors des parenthèses représente le nombre d'isolat et le chiffre entre les parenthèses représente la part de l'espèce sur un hôte donné

Phylogénie de *Bipolaris* spp. avec les données GBS

Pour comprendre les relations phylogénétiques entre les espèces de *Bipolaris*, les 240 isolats assignés au genre *Bipolaris* par les taux de mapping ont été alignés au génome de référence de *B. oryzae*. Les marqueurs SNPs identifiés (553 008 SNPs) ont permis de construire un arbre phylogénétique. Cet arbre phylogénétique a montré une répartition des isolats en 6 groupes majeurs (Figure 4). Ces groupes correspondent aux espèces du genre *Bipolaris* telles qu'identifiées par mapping sur les génomes de références. Cependant, au niveau du groupe de *B. oryzae*, l'isolat US9009, et les isolats BF9116, BF9225 et BF9251 sont différenciés du groupe majeur pour former 2 sous-groupes.

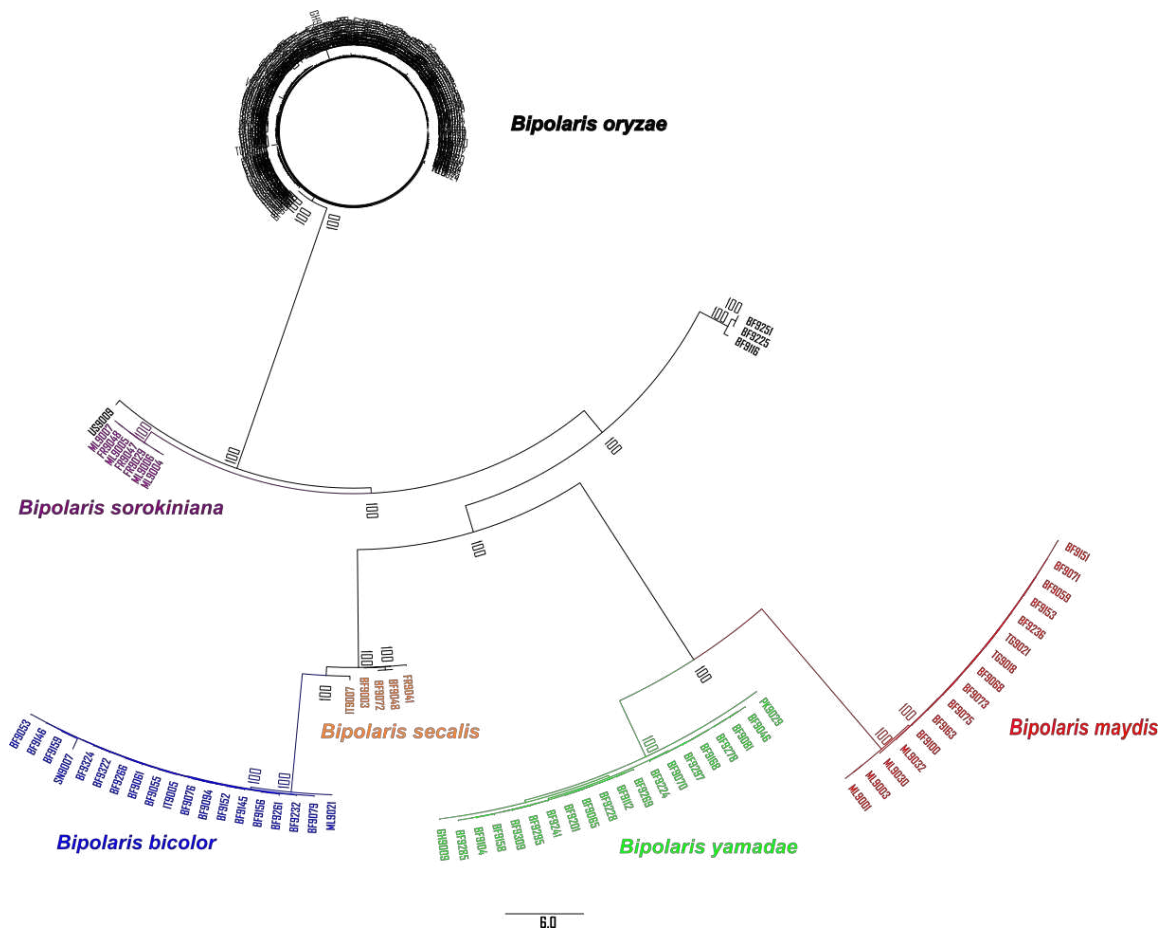


Figure 4: Arbre phylogénétique obtenu à partir d'une analyse de maximum de vraisemblance basée sur les marqueurs SNPs des isolats de *Bipolaris*

Sur la base des taux de mapping sur les génomes de références les isolats en bleu correspondent à l'espèce *Bipolaris bicolor* ; isolats en rouge à *Bipolaris maydis* ; isolats en noir à *Bipolaris oryzae* ; isolats en violet à *Bipolaris sorokiniana* ; isolats en orange à *Bipolaris secalis* ; isolats en vert : à *Bipolaris yamadae*

Pathogénie

Description des symptômes

Pour apprécier la pathogénicité, des isolats de *Bipolaris bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae*, *B. sorokiniana*, *Curvularia spicifera* et *Exserohilum rostratum* ont été inoculés par pulvérisation de suspension conidiennes sur les variétés de riz FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, TS2 et Kitaake. Trois jours après l'inoculation, les feuilles de riz inoculées avec *B. oryzae* présentaient des lésions brunes. A ce moment, les lésions étaient invisibles au niveau des feuilles inoculées avec *B. bicolor*, *B. maydis*, *B. sorokiniana*, *C. spicifera* et *E. rostratum*. A sept jours après inoculation, les lésions brunes causées par *B. oryzae* avaient des tailles variant de 0,5 à 4 mm. Les lésions entourées d'un halo jaune et densément réparties à la surface des feuilles fusionnent (Figure 5). Les lésions causées par *E. rostratum* sont moins nombreuses à la surface de la feuille, de tailles plus petites (<0,5 mm) et dépourvues de halo jaune. *Bipolaris maydis* a montré des taches brunes allongées (moins de 1 mm de longueur) et/ou circulaires de très petites tailles.

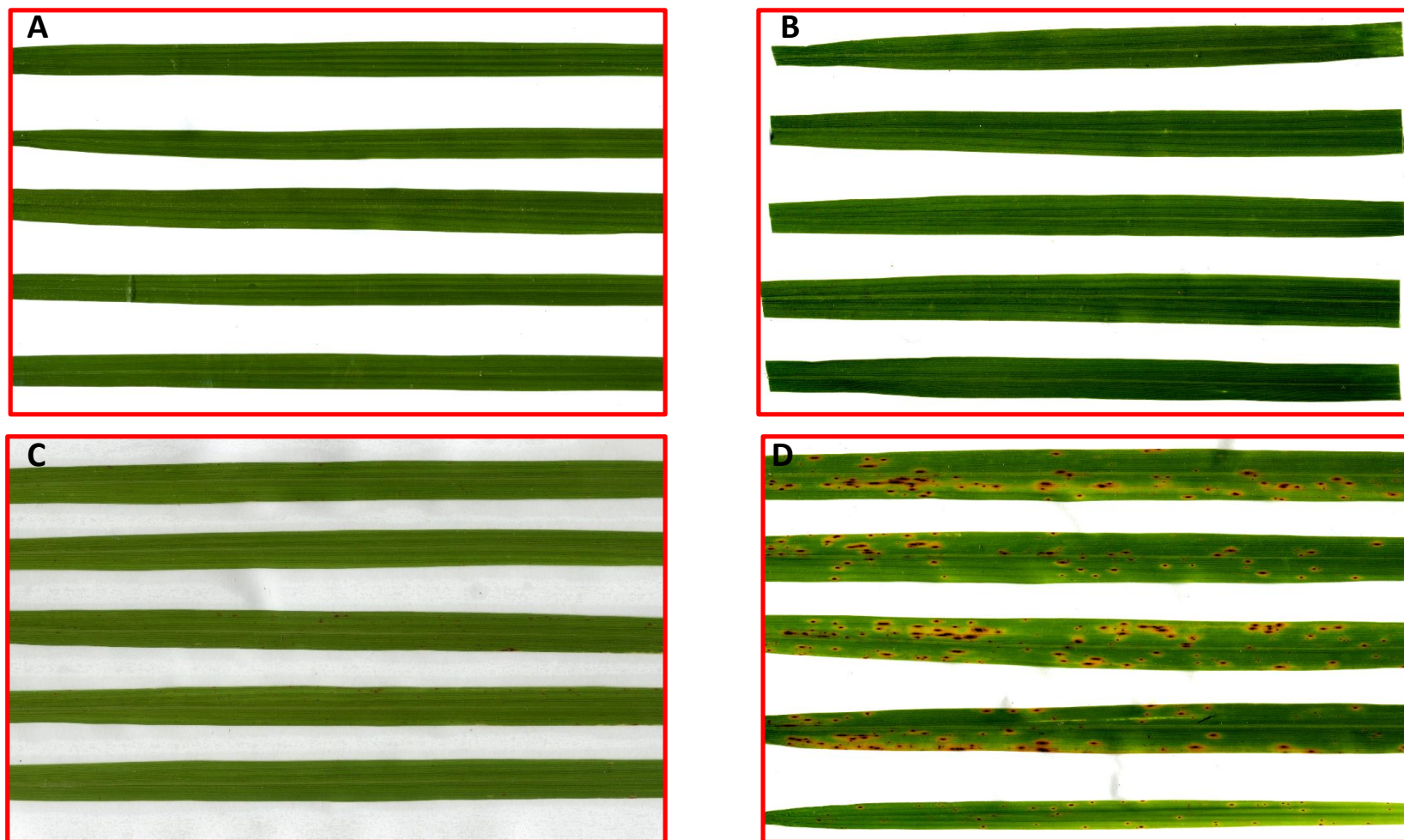


Figure 5 : Lésions foliaires causées par différentes espèces de *Bipolaris* et *Exserohilum* isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz.

A) Symptômes de *C. spicifera* 7 jours après inoculation avec une suspension de 1×10^4 conidies/mL ; B) Symptômes de *E. rostratum* 7 jours après inoculation avec une suspension de 1×10^4 conidies/mL ; C) Symptômes de *B. maydis* 7 jours après inoculation avec une suspension de 1×10^4 conidies/mL ; D) Symptômes de *B. oryzae* 7 jours après inoculation avec une suspension de 1×10^4 conidies/mL

Comparaison entre espèces fongiques et entre variétés de riz

Pour apprécier la pathogénicité (nombre de lésions induites et proportion de surface foliaire malade) des espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz en milieu contrôlé, des analyses de variance et un test de corrélation ont été réalisés. Les conditions nécessaires pour la validité des analyses de variances (distribution normale et homoscedasticité) ont conduit à une transformation en racine carrée des variables qui traduisent la pathogénicité que sont le nombre de lésions par feuille et la proportion de surface foliaire malade (%). Cependant pour faciliter la lecture, dans tout le document nous adopterons les appellations nombre de lésions et proportion foliaire malade pour faire allusion aux valeurs transformées en racine carrée. Des rappels seront faits là où nous estimons que c'est nécessaire.

Les analyses statistiques ont montré des effets significatifs des variétés, des espèces fongiques ainsi que de leurs interactions sur le nombre moyen de lésions et la proportion foliaire malade (Tableau 10). Le test de corrélation de Pearson a montré une corrélation linéaire positive, forte ($R = 0,79$) et statistiquement significative ($p < 2,2e-16$) entre le nombre moyen de lésions par feuille et la proportion foliaire malade (Figure 6).

L'espèce *Bipolaris oryzae* a causé le plus de lésions par unité de surface foliaire (1,73 lésions/cm²) et couvert le plus de surface foliaire (0,98%) (Figures 7 et 8). Elle a été suivie par *B. maydis* (0,8 lésion/cm² et 0,27% de surface foliaire couverte par la maladie). *Curvularia spicifera* a induit le moins de lésions (0,13 lésion/cm²) et couvert le moins de surface foliaire (0,02%). Sur la base des lésions induites, *B. bicolor* (0,17 lésion/cm²) ne diffère pas statistiquement de *C. spicifera* (0,13 lésion/cm²). Par contre, en termes de surface foliaire couverte par les lésions, son impact a été plus important que celui de *C. spicifera* (0,02%). Elle a été classée dans le même groupe statistique que *B. sorokiniana* (0,09%) et *E. rostratum* (0,1%).

L'analyse du nombre moyen de lésions causées par chaque espèce fongique sur chacune des variétés a montré que *Bipolaris oryzae* suivie de *B. maydis* ont été les

espèces les plus pathogènes indépendamment de la variété (Tableau 11). A l'exception de la variété Manobi, le nombre moyen de lésions causées *Bipolaris oryzae* a été plus du double de ceux causés par *B. maydis*, la deuxième espèce fongique la plus pathogène dans notre expérimentation. L'impact de ces 2 espèces fongiques est statistiquement supérieur chez toutes les variétés de riz testées (Tableau 11). La variété FKR 19 a été la seule variété où le nombre moyen de lésions causées par *B. maydis* (0,52 lésion/cm²) n'a pas été statistiquement différent de ceux causés par les isolats de *B. sorokiniana* (0,39 lésion/cm²).

En termes de proportion de surface foliaire malade, les isolats de *B. oryzae* ont causé le maximum de surface foliaire malade quelle que soit la variété de riz. Leur impact diffère significativement des autres espèces fongiques chez toutes les variétés. *B. maydis* est la deuxième espèce fongique causant une surface foliaire malade élevée après *B. oryzae*. Cependant, la proportion foliaire malade de *B. maydis* ne diffère pas statistiquement des isolats de *B. sorokiniana* et de *E. rostratum* chez les variétés de riz FKR 19, FKR 62 N et Gambiaka.

Les différences entre les variétés sur la base du nombre de lésions et la proportion foliaire malade sont respectivement très significatives et peu significatives (Figure 7). Les variétés les plus infectées ont été la variété Kitaake (0,8 lésion/cm²) suivie de la variété Manobi (0,6 lésion/cm²). La variété FKR 19 a été la moins malade (0,5 lésion/cm²).

Tableau 10 : Résultat de l'analyse de variance (ANOVA) des 33 isolats inoculés aux variétés de riz FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, TS2 et Kitaake

Source	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F value	P value
Analyse basée sur la racine carrée du nombre moyens de lésions					
Variété	49,2	5	9,85	26,68	< 2.2e-16 ***
Espèce fongique	2499,8	5	499,95	1354,52	< 2.2e-16 ***
Variété : espèce fongique	55	25	2,20	5,96	< 2.2e-16 ***
Analyse basée sur la racine carrée de la proportion foliaire malade					
Variété	2,73	5	0,55	3,01	0,01 *
Espèce fongique	872,75	5	174,55	963,88	< 2.2e-16 ***
Variété : espèce fongique	15,94	25	0,64	3,52	< 2.2e-16 ***

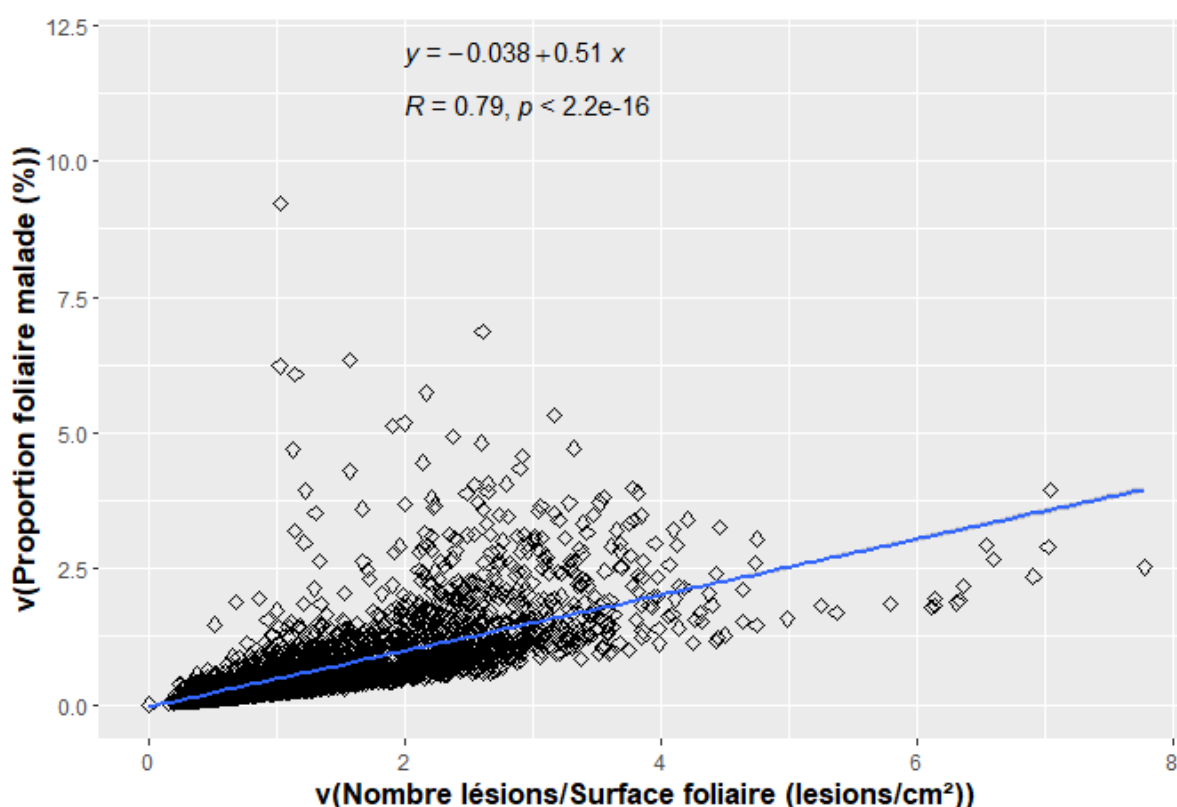


Figure 6 : Corrélation entre la racine carrée du nombre moyen de lésions par surface foliaire et la racine carrée de la proportion foliaire malade

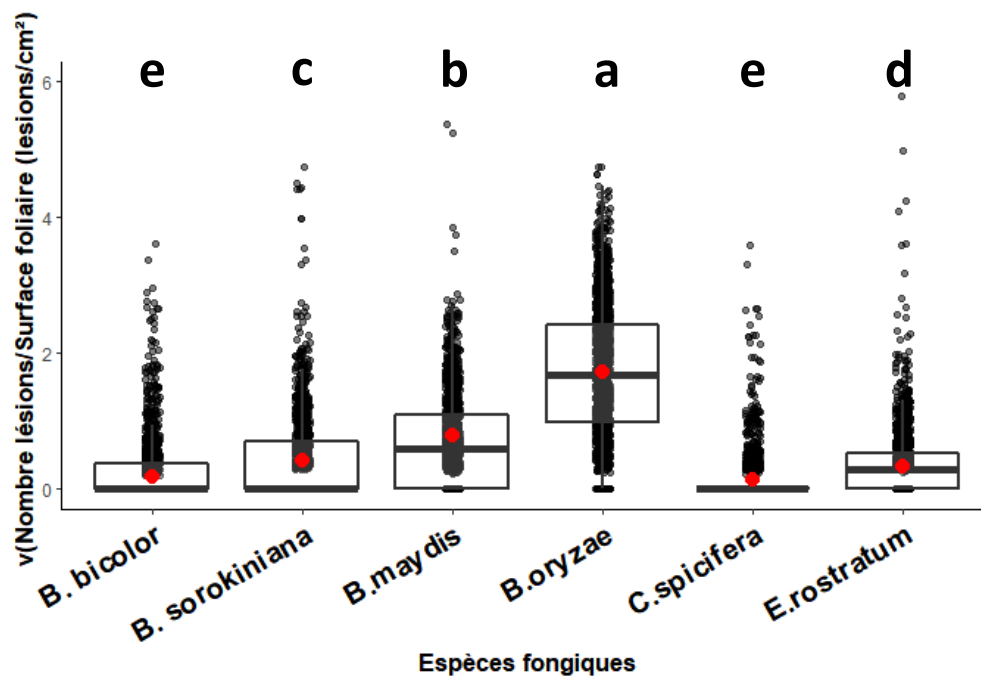


Figure 7 : Comparaison du nombre de lésions induites par les espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose sur les variétés de riz FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, Kitaake et TS2 en condition contrôlée

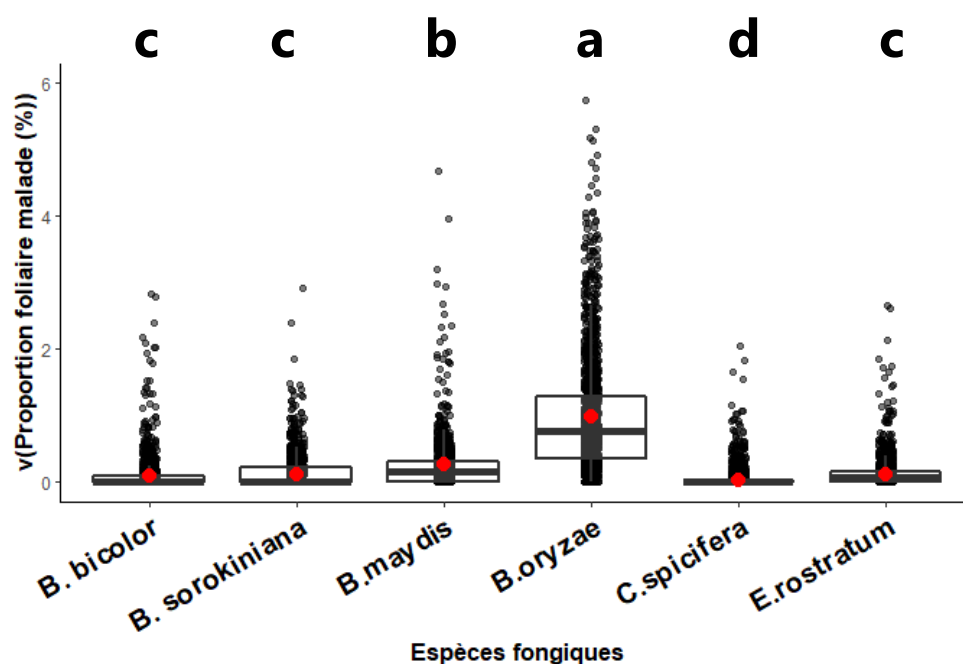


Figure 8 : Comparaison de la proportion foliaire malade par les espèces fongiques isolées des symptômes de l'helminthosporiose sur les variétés de riz FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, Kitaake et TS2 en condition contrôlée

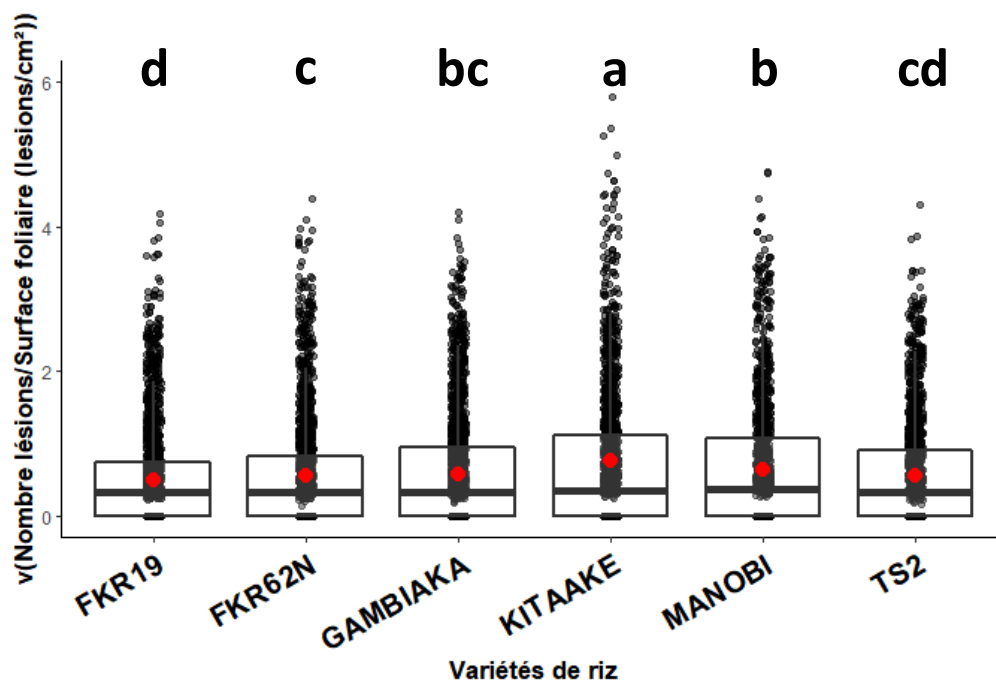


Figure 9 : Comparaison de la sensibilité (nombre de lésions par unité de surface) de 6 variétés de riz aux infections des espèces de *Bipolaris* (*B. bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae* et *B. sorokiniana*), de *Curvularia* (*C. spicifera*) et de *Exserohilum* (*E. rostratum*) isolées des syntômes de l'helminthosporiose du riz

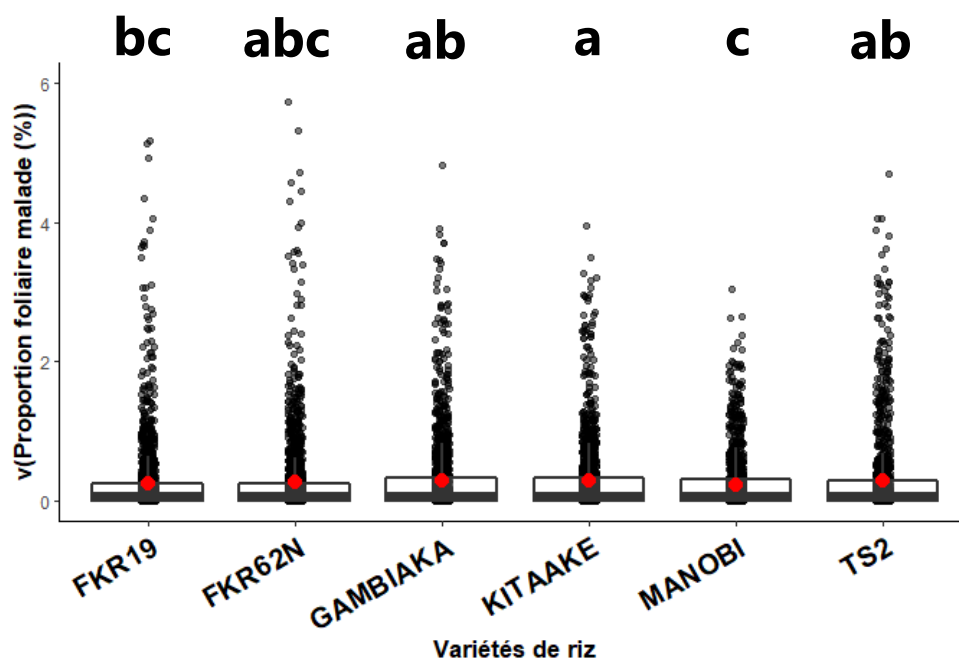


Figure 10 : Comparaison de la sensibilité (proportion de surface foliaire malade) de 6 variétés de riz à se faire coloniser par les espèces de *Bipolaris* (*B. bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae* et *B. sorokiniana*), de *Curvularia* (*C. spicifera*) et de *Exserohilum* (*E. rostratum*) isolées des syntômes de l'helminthosporiose du riz

Comparaison au sein des espèces

Au sein de chaque espèce fongique, le nombre moyen de lésions et de la proportion de surface foliaire malade induits par chaque isolat ont été calculés sur l'ensemble des variétés. L'analyse a montré des différences significatives entre les isolats au niveau du nombre de lésions comme au niveau de la proportion de surface foliaire malade (Tableau 12). Pour chaque espèce, nous avons 1 à 2 isolats qui ont présenté des nombres de lésions et de proportions foliaires malades les plus importants.

Le nombre moyen de lésions induites par les isolats de *B. oryzae* varie de 1,26 à 2,05 lésions/cm² avec une valeur moyenne de 1,67 lésion/cm². La proportion foliaire infectée varie de 0,65% à 1,1% avec une valeur moyenne de l'espèce *B. oryzae* à 0,77%. Les isolats BF9083, ML9025 ont induit les nombres de lésions d'environ 1,2 fois à la moyenne et des proportions foliaires malades avoisinant le double de la proportion foliaire malade moyenne de l'espèce *B. oryzae*. Ces 2 isolats sont les plus pathogènes et leur capacité à induire les lésions et à coloniser la surface foliaire du riz ne diffèrent pas statistiquement. A l'opposé, les isolats BF9010 et TG9010 ont été les moins pathogènes de l'espèce *B. oryzae* en termes de nombre de lésions (<1,67) comme en termes de proportion de surface foliaire infectée (<0,77).

Pour les isolats de *B. maydis*, le nombre de lésions varie de 0,32 à 1,15 lésions/cm² (moyenne = 0,66 lésion/cm²) et la proportion de surface foliaire infectée varie de 0,08% à 0,34% (moyenne = 0,21%). L'isolat ML9032 a induit le nombre de lésions le plus élevé (1,15), soit 2 fois la valeur moyenne de nombre de lésions induites par l'espèce *B. maydis*. Les isolats les moins pathogènes ont été ML9030, TG9018 et BF9046 (non significativement différents entre eux pour les 2 phénotypes mesurés).

Pour *E. rostratum*, le nombre de lésions induites varie de 0,17 à 0,49 lésion/cm² avec une valeur moyenne de 0,34 lésion/cm². La proportion foliaire malade varie de 0,05% à 0,15% avec une moyenne de 0,64%. L'isolat TG9001 a été le plus dommageable avec respectivement 0,49 lésion/cm² et 0,15% de surface foliaire malade. Son impact est statistiquement similaire à ceux de SN9008 et de BF9038. L'isolat le moins pathogène a été BF9006. Cependant sur le plan du nombre de lésions induites et de

la proportion foliaire malade cet isolat est statistiquement similaire à ML9046 et ML9044.

Tableau 11 : Comparaison de la pathogénie des espèces sur chaque variété de riz

Variété	Espèce fongique	Racine carrée du nombre moyen de lésion/cm ² de feuille	Racine carrée de proportion foliaire malade
FKR 19	<i>Bipolaris oryzae</i>	1,52 a (±0,03)	0,97 a (±0,03)
	<i>Bipolaris maydis</i>	0,52 b (±0,03)	0,16 b (±0,03)
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,39 bc (±0,03)	0,14 b (±0,03)
	<i>Exserohilum rostratum</i>	0,31cd (±0,03)	0,12 b (±0,03)
	<i>Bipolaris bicolor</i>	0,24 de (±0,03)	0,09 b (±0,03)
	<i>Curvularia spicifera</i>	0,11 e (±0,03)	0,05 b (±0,03)
FKR 62N	<i>Bipolaris oryzae</i>	1,71 a (±0,03)	1,04 a (±0,03)
	<i>Bipolaris maydis</i>	0,66 b (±0,03)	0,22 b (±0,03)
	<i>Exserohilum rostratum</i>	0,36 c (±0,03)	0,11 bc (±0,03)
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,35 cd (±0,04)	0,11 bc (±0,03)
	<i>Bipolaris bicolor</i>	0,21 de (±0,03)	0,09 c (±0,03)
	<i>Curvularia spicifera</i>	0,10 e (±0,03)	0,03 c (±0,03)
Gambiaka	<i>Bipolaris oryzae</i>	1,74 a (±0,04)	1,05 a (±0,03)
	<i>Bipolaris maydis</i>	0,68 b (±0,04)	0,23 b (±0,03)
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,4 c (±0,04)	0,15 bc (±0,03)
	<i>Exserohilum rostratum</i>	0,38 c (±0,04)	0,15 bc (±0,03)
	<i>Bipolaris bicolor</i>	0,28 cd (±0,04)	0,13 bc (±0,03)
	<i>Curvularia spicifera</i>	0,15c (±0,04)	0,06 c (±0,03)
Kitaake	<i>Bipolaris oryzae</i>	1,96 a (±0,06)	0,96 a (±0,03)
	<i>Bipolaris maydis</i>	1,15 b (±0,06)	0,35 b (±0,03)
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,78 c (±0,06)	0,24 c (±0,03)
	<i>Exserohilum rostratum</i>	0,37 d (±0,05)	0,11 d (±0,03)
	<i>Bipolaris bicolor</i>	0,27 d (±0,06)	0,08 d (±0,03)
	<i>Curvularia spicifera</i>	0,24 d (±0,06)	0,08 d (±0,03)
Manobi	<i>Bipolaris oryzae</i>	1,87a (±0,04)	0,81 a (±0,02)
	<i>Bipolaris maydis</i>	0,78 b (±0,05)	0,22 b (±0,02)
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,36 c (±0,06)	0,09 c (±0,02)
	<i>Exserohilum rostratum</i>	0,40 c (±0,04)	0,12 c (±0,02)
	<i>Bipolaris bicolor</i>	0,27 cd (±0,05)	0,09 c (±0,02)
	<i>Curvularia spicifera</i>	0,15 d (±0,05)	0,05 c (±0,02)
TS2	<i>Bipolaris oryzae</i>	1,65 a (±0,04)	1,11 a (±0,03)
	<i>Bipolaris maydis</i>	0,75 b (±0,04)	0,3 b (±0,03)
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,41 c (±0,04)	0,14 c (±0,03)
	<i>Exserohilum rostratum</i>	0,29 cd (±0,04)	0,09 c (±0,03)
	<i>Bipolaris bicolor</i>	0,23 de (±0,03)	0,1 c (±0,03)
	<i>Curvularia spicifera</i>	0,10 e (±0,03)	0,04 c (±0,03)

La comparaison a été faite au sein des isolats d'une même espèce sur 6 cultivars de riz et lorsque 2 isolats portent la même lettre cela signifie qu'en termes de pathogénicité ils n'ont pas de différence statistiquement significative

Tableau 12 : Comparaison de la pathogénie entre différents isolats d'une même espèce

N°	Espèces	Isolats	Racine carrée du nombre moyen de lésions/cm ² de feuille	Racine carrée de la proportion foliaire infectée
1	<i>Bipolaris bicolor</i>	BF9324	0,49 a (±0,02)	0,23 a (±0,01)
2		BF9156	0,29 b (±0,05)	0,10 b (±0,03)
3		BF9094	0,27 b (±0,02)	0,08 b (±0,01)
4		BF9152	0,17 bc (±0,02)	0,06 b (±0,01)
5		BF9322	0,13 bc (±0,04)	0,04 b (±0,02)
6		BF9159	0,10 c (±0,02)	0,03 b (±0,01)
7	<i>Bipolaris maydis</i>	ML9032	1,15 a (±0,04)	0,34 a (±0,02)
8		BF9100	0,81 b (±0,04)	0,29 ab (±0,02)
9		GH9009	0,74 b (±0,04)	0,25 bc (±0,02)
10		BF9046	0,51 c (±0,05)	0,17 cd (±0,02)
11		TG9018	0,45 c (±0,09)	0,16 bcd (±0,04)
12		ML9030	0,32 c (±0,07)	0,08 d (±0,03)
13	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9083	2,05 a (±0,05)	1,1 b (±0,05)
14		ML9025	1,95 ab (±0,06)	1,1 b (±0,06)
15		GH9012	1,75 bc (±0,06)	1,49 a (±0,06)
16		BN9007	1,60 cd (±0,05)	0,82 c (±0,05)
17		BF9010	1,40 d (±0,05)	0,65 c (±0,05)
18		TG9010	1,26 d (±0,16)	0,94 bc (±0,14)
19	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	ML9004	1,01 a (±0,03)	0,3 a (±0,01)
20		ML9006	0,39 b (±0,03)	0,13 b (±0,01)
21		ML9005	0,20 c (±0,03)	0,06 c (±0,01)
22		ML9007	0,14 c (±0,03)	0,07 c (±0,01)
23	<i>Curvularia spicifera</i>	FR9030	0,22 a (±0,02)	0,08a (±0,01)
24		PK9024	0,15 ab (±0,02)	0,07 ab (±0,01)
25		FR9045	0,15 ab (±0,02)	0,05) abc (±0,01)
26		FR9067	0,12 bc (±0,02)	0,04) bc (±0,01)
27		PK9034	0,06 c (±0,02)	0,02) c (±0,01)
28	<i>Exserohilum rostratum</i>	TG9001	0,49 a (±0,03)	0,15 a (±0,01)
29		SN9008	0,47 a (±0,03)	0,14 a (±0,01)
30		BF9038	0,38 ab (±0,04)	0,16 a (±0,01)
31		ML9044	0,27 bc (±0,03)	0,09 b (±0,01)
32		ML9046	0,24 c (±0,03)	0,09 b (±0,01)
33		BF9006	0,17 c (±0,04)	0,05 b (±0,01)

La comparaison a été faite au sein des isolats d'une même espèce sur 6 cultivars de riz et lorsque 2 isolats portent la même lettre cela signifie qu'en termes de pathogénicité ils n'ont pas de différence statistiquement significative

Discussion

L'helminthosporiose du riz est une maladie à symptômes susceptibles d'être confondus avec ceux d'autres maladies fongiques. Un diagnostic précis s'obtient avec les outils moléculaires. Les caractérisations moléculaires réalisées à partir des régions génomiques ITS, GAPDH et TEF ont permis d'identifier unanimement *Bipolaris bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae* et *Exserohilum rostratum*. Ces espèces ont déjà été identifiées dans des études similaires (Motlagh & Kaviani, 2008a ; Kusai et al., 2016). Cependant, dans cette étude une fraction d'isolats (35/112) n'a pas pu être assignée avec certitude par les 3 régions génomiques. Pour le genre *Bipolaris*, une assignation au niveau de l'espèce aurait été possible pour 11 isolats sur 17 en considérant que deux gènes donnant la même assignation suffisent pour identifier l'espèce. De la même manière, pour le genre *Curvularia*, l'assignation au niveau de l'espèce aurait été possible pour 13 isolats sur 20. La proportion relativement importante d'isolats non assignés de manière congruente, pourrait s'expliquer par le fait que les régions génomiques ne sont pas assez discriminantes entre les différentes espèces des genres *Bipolaris* et *Curvularia* (présence probable de régions assez conservées) ou la possibilité que nous ayons des espèces nouvelles dont les séquences n'existent pas dans les bases de données. La dissimilarité nucléotidique entre certaines espèces du genre *Bipolaris* est assez faible. L'alignement des séquences (ITS, GAPDH et TEF) de *Bipolaris cynodontis* et *B. coffeana*, ainsi que de *B. oryzae* et de *B. panici-miliacei* ne révèle que quelques caractères variables. Il se pourrait donc que de tels marqueurs ne soient pas suffisants pour discriminer les espèces. Il serait donc souhaitable de disposer d'un plus grand nombre de gènes séquencés pour délimiter les espèces de *Bipolaris* et *Curvularia*. Alternativement, le GBS semble très prometteur pour l'identification des espèces de ces genres. En effet, cette technique permet de disposer d'un grand nombre de marqueurs distribués sur les génomes et donc pouvant être utilisés pour de l'assignation à une espèce.

Selon Condon et al. (2014), les génomes de *Bipolaris victoriae* et *B. oryzae* s'alignent à 75% sur le génome de *B. maydis*. Le GBS qui fournit une représentation réduite des génomes a montré dans notre étude une très bonne corrélation avec les 3 régions génomiques ITS, GAPDH et TEF dans l'assignation des espèces de *Helminthosporium*. En outre, il a permis l'assignation d'un grand nombre d'isolats et une meilleure discrimination des isolats de *Curvularia*. Le GBS a confirmé la diversité des espèces associées aux symptômes foliaires et des grains de l'helminthosporiose du riz par l'identification de *B. bicolor*, *B. oryzae*, *B. maydis*, *B. sorokiniana*, *Curvularia hawaiiensis*, *C. papendorfii*, *C. spicifera*, *Exserohilum rostratum* et *E. turcicum*. Ces résultats concordent avec ceux de différentes études (Motlagh & Kaviani, 2008a ; Kusai et al., 2016 ; Majeed et al., 2016b ; Aslam et al., 2020, 2021 ; Kaboré et al., 2021 ; Imran et al., 2022). Cependant, dans notre étude, le GBS n'a pas permis d'identifier les souches de l'espèce *B. cynodontis*. Les isolats assignés à cette espèce par ITS, GAPDH ou TEF (jamais les 3 à la fois) ont été assignés à *B. sorokiniana* par GBS. L'assignation par GBS étant basé sur le taux de mapping avec un génome de référence, la non disponibilité du génome de l'espèce *B. cynodontis* serait à l'origine de sa non identification et de son assignation probable à *B. sorokiniana* (espèce proche de *B. cynodontis*). Le GBS est donc un outil d'ores et déjà opérationnel pour l'identification des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz.

Les isolats de BF9003 et PK9029 n'ont pas été assignés avec certitude sur la base des séquences ITS, GAPDH et TEF. Cependant, les analyses phylogénétiques réalisées sur la base des 3 régions génomiques ont montré que les isolats BF9003 et PK9029 se rapprocheraient respectivement de *B. secalis* et de *B. maydis*. L'analyse phylogénétique des isolats du genre *Bipolaris* basée sur les marqueurs SNPs a montré la séparation des isolats assignés à l'isolat PK9029 et des isolats assignés à l'espèce *Bipolaris maydis* en 2 clades soutenus par une valeur de bootstrap de 100%. L'isolat PK9029 serait donc d'une espèce bien différente de *B. maydis*. Dans les études futures, les génomes complets de ces espèces doivent être exploités par une comparaison des génomes annotés des différentes espèces de *Helminthosporium* en vue d'une identification précise des isolats BF9003 et PK9029, ainsi que les isolats assignés à ces derniers.

Trois espèces de *Curvularia* (*C. hawaiiensis*, *C. papendorfii* et *C. spicifera*) ont été identifiées dans cette étude. Leur présence dans notre échantillon résulterait de la similarité des symptômes de l'helminthosporiose avec la curvulariose. Cette similarité a déjà été signalée par de nombreux auteurs (Archana, 2014 ; Zhou et al., 2021 ; Imran et al., 2022).

Bipolaris oryzae a été majoritaire au sein des isolats du Bénin, de Chine, du Ghana, des USA et du Vietnam, tandis que *E. rostratum* a été l'espèce dominante au Burkina Faso et *C. spicifera* au Pakistan. Ces données préliminaires sur la distribution des espèces incitent à aller plus loin. Il se pourrait que la distribution des espèces soit différente en fonction des pays ou des espèces hôtes. En effet, pour l'helminthosporiose du maïs, une maladie similaire à l'helminthosporiose du riz par la multitude d'agents responsables, une distribution préférentielle aux zones montagneuses fraîches de *B. zeicola* a été observée en Chine (Sun et al., 2020).

Les tests de phénotypage des espèces de *Bipolaris* (*B. bicolor*, *B. oryzae*, *B. sorokiniana*), de *Curvularia* (*C. spicifera*) et de *Exserohilum* (*E. rostratum*) isolées majoritairement des symptômes de l'helminthosporiose du riz ont montré des niveaux de pathogénicité différents. *Bipolaris oryzae* est l'espèce la plus pathogène. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés dans de nombreux travaux (Touhami et al., 2000 ; Motlagh & Kaviani, 2008a ; El-Shafey et al., 2011). *Bipolaris maydis* s'est aussi montrée pathogène sur différentes variétés de riz. Selon les travaux de Amorio et Cumagun (2017), *B. maydis* isolée du maïs arrivait à germer en contact avec les feuilles de riz, mais elle était incapable de produire des appressoria pour l'infecter. Il se pourrait que les isolats provenant du riz et utilisés dans cette étude appartiennent à un pathotype capable d'infecter le riz.

Bien que les isolats de *E. rostratum* aient été modérément ou faiblement virulents dans les tests de pathogénicité de cette étude, en particulier en comparaison de *Bipolaris oryzae*, *E. rostratum* est l'espèce rencontrée majoritairement au Burkina Faso. Au Burkina Faso où l'helminthosporiose du riz est émergente, une forte pathogénicité

n'est donc pas la condition du succès invasif de cette espèce qui est en interaction avec *B. oryzae*, les deux espèces ayant été échantillonnées dans les mêmes parcelles. Les conditions des tests de pathogénicité notamment la quantité d'inoculum (10^4 conidies/mL) pourrait être moins adaptée à *E. rostratum*. Les lésions observées avec des inoculations de 10^5 conidies/mL étaient plus nombreuses (Kaboré et al., 2021). Cette espèce pourrait avoir un seuil d'inoculum nécessaire pour déterminer l'intensité de la maladie lors de l'interaction avec le riz. Par exemple, chez l'ascomycète *Plectosphaerella cucumerina*, il a été démontré qu'une infection à partir de fortes densités de spores active des défenses dépendantes de l'acide jasmonique avec une mort cellulaire excessive, tandis que l'infection à partir de faibles densités de spores induit des défenses dépendantes de l'acide salicylique avec des niveaux plus faibles de mort cellulaire (Pétriaccq et al., 2016). La mort excessive des cellules entraîne des symptômes plus importants. Par conséquent, dans les travaux futurs, nous suggérons de tester différentes quantités d'inoculum pour comparer la pathogénicité de *B. oryzae* et de *Exserohilum rostratum* ainsi que leur compétitivité en mélange. Il serait également intéressant d'étudier la pathogénicité de souches de *B. oryzae* et de *Exserohilum rostratum* isolées de différentes espèces hôtes (riz sauvage et mauvaises herbes des rizières). En effet, *B. oryzae* et *E. rostratum* ont été isolées de plusieurs espèces présentes dans les rizières et le rôle de ces espèces comme hôte alternatif se pose.

Les variétés de riz testées ont montré différents comportements vis-à-vis des espèces de *Helminthosporium*. Les cultivars FKR 19 et FKR 62N du Burkina Faso ont développé moins de lésions suite aux inoculations avec *B. oryzae*, *B. maydis*, *B. sorokiniana*, *C. spicifera* et *E. rostratum* comparativement à la variété de riz Kitaake d'origine japonaise et la variété française Manobi. Le caractère tolérant des cultivars du Burkina Faso surtout, aux isolats de *B. oryzae* en milieu contrôlé ou de l'helminthosporiose du riz au champ ont été également constaté dans des travaux antérieurs (Ouédraogo, 2008 ; Dembélé, 2014 ; Boka et al., 2018). En plus de leur tolérance à *B. oryzae*, cette étude a montré leur tolérance à d'autres espèces (*B. maydis*, *E. rostratum*, *C. spicifera*, *B. bicolor*) du complexe *Helminthosporium*.

Article 3 : Morphological, molecular and pathological characterization of *Bipolaris oryzae* isolates causing rice brown spot in Camargue, France

Kouka Hilaire Kaboré^{1,2,3}, **Rémi Péliissier**^{2,3}, **Henri Adreit**^{2,3}, **Joëlle Milazzo**^{2,3},
Marc-Henri Lebrun¹, **Didier Tharreau**^{1,2,3}

¹ UMR BIOGER, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon, France

² CIRAD, UMR PHIM, TA A 120/K, 34398 Montpellier, France

³ PHIM, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

Abstract

Brown spot of rice is a threat to rice production worldwide. It is caused by a complex of fungi of which only the molecular characterization can allow a precise identification of the causal species. Symptomatic seed and leaf collections conducted in the Camargue rice growing region (France) in 2018 and 2019 led to the isolation of 19 fungal strains. On the basis of the growth rate on potato dextrose agar and the morphology of the conidia, the strains were split into 2 groups. With 1 exception, the strains growing faster had larger conidia than the strains growing slower. Molecular characterization based on Internal transcribed spacer (ITS) rDNA region, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and translation elongation factor 1 alpha (TEF1- α) genes showed that, despite morphological differences, all the strains belonged to the species *Bipolaris oryzae*.

Although pathogenicity test data showed strain x variety interactions, some strains were globally more aggressive and some varieties were globally more susceptible.

This is the first study in which the causing agent of brown spot disease from Camargue, the main rice-growing site of Metropolitan France, is characterized molecularly and phenotypically.

Keywords: *Rice, Brown spot, Bipolaris oryzae, Molecular diagnostic, Camargue*

Introduction

Rice is a staple food for more than half of the world's population. The ability of rice to achieve high production is reduced by biotic factors such as fungal species causing brown spot disease (Fahad et al., 2019). This disease leads to losses estimated to 3.8% of the global rice production (Savary et al., 2019). Brown spot reduces the number of grains per panicle and the weight of the grains (Picco & Rodolfi, 2002). Since a few years, it is perceived as an emerging or re-emerging disease of concern in many rice growing countries (Hossain et al., 2014 ; Bouet et al., 2015 ; Toher et al., 2016 ; Valarmathi & Ladhakshmi, 2018 ; Nayak & Hiremath, 2019). The emergence of the disease is thought to be due to climatic conditions (De Bruyne, 2015; Nayak & Hiremath, 2019) and agricultural practices. Indeed, high temperatures (25-30°C), poor water supply and a lack of mineral elements in the soil are favourable conditions for the expression of the disease (Ou, 1985; Moletti et al., 1997; Barnwal et al., 2013; Pantha & Yadav, 2016; Kumar et al., 2017). *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker (syn. *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, syn. *Cochliobolus miyabeanus* (Ito et Kuribayashi) Drechsler) has been described since 1900 as the causal agent of rice brown spot (Breda de Haan, 1900). However, additional species have been identified as causal agents of the disease. Motlagh & Kaviani (2008), identified *B. oryzae*, *B. victoriae*, *B. indica* and *B. bicolor* as responsible for rice brown spot in Guilan province in northern Iran. *Bipolaris oryzae*, *H. carbonum* and *H. hawaiiensis* were characterised from brown spot symptomatic leaves and grains in Egypt (El-Shafey et al., 2011). The identification of species of the genus *Bipolaris* by morphological characters is delicate because the dimensions of conidia and

conidiophores of different species overlap (Sonavane et al., 2015). Molecular characterisation is necessary for accurate identification (Manamgoda et al., 2014).

In France, rice brown spot was encountered in overseas territories and mainland (Bernaux, 1981; Sivanesan, 1987; Kohler & Pellegrin, 1992). In Camargue, the rice growing area in France mainland, brown spot has been reported since 1966 on the basis of observation of disease symptoms (Bernaux, 1981). *Bipolaris oryzae* was determined as the causal agent based on morphological characterization (Bernaux, 1981). Brown spot was rarely encountered in Camargue until 2015 but is now observed each year and seems widespread. The aim of this article was to identify by molecular tools the species responsible for recent epidemics of brown spot of rice in Camargue and to characterize its morphology and pathogenicity.

Materials and methods

Sample collection and isolation of fungi

Rice leaves with brown spot symptoms were collected in the Camargue rice growing area in September 2019. Seeds from the 2018 harvest were also collected. These leaves and seeds were arranged separately in Petri dishes containing a double layer of moistened blotting paper (Mathur & Kongsdal, 2003). Incubation was carried out at 20 °C for 7 days under alternating 12 h of white light and 12 h of darkness. Using a flame-stretched pasteur pipette, fungal conidia with morphological characteristics of *Bipolaris* sp. spores were collected and spread on bacto-agar medium. After incubation during 24 h (25 °C, 12 h white light and 12 h darkness), a single germinating conidium was transferred with a sterile scalpel onto potato dextrose agar (PDA, 39 g/L) medium and incubated under the same conditions for 7 days. Nineteen isolates, 9 from seeds and 10 from leaves, were selected for our study (Table 1).

Table 1: Fungal strains isolated from rice leaves and seeds with brown spot symptoms collected in Camarge, France

Isolates	Host variety	Source	GPS coordinates of collection place		Years of collection
FR9031	Gageron	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9032	Gageron	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9033	Gageron	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9035	Manobi	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9037	Line	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9039	Manobi	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9044	Manobi	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9046	Manobi	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9049	Manobi	Seed	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2018
FR9055	Gines	Leaf	43°34'50.29"N	4°26'2.17"E	2019
FR9056	Gines	Leaf	43°34'50.29"N	4°26'2.17"E	2019
FR9057	Line	Leaf	43°34'50.29"N	4°26'2.17"E	2019
FR9058	Line	Leaf	43°34'50.29"N	4°26'2.17"E	2019
FR9069	Line	Leaf	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2019
FR9070	Line	Leaf	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2019
FR9071	Line	Leaf	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2019
FR9072	Line	Leaf	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2019
FR9075	Line	Leaf	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2019
FR9076	Line	Leaf	43°42'14.28"N	4°33'39.47"E	2019

Line = Breeding line

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fresh mycelium with modifications to the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method described by Doyle and Doyle (1987). A 5-day-old fragment of mycelium was transferred onto Corn Meat Agar (CMA, 18 g/L) medium previously covered with a sterile cellophane disc. The plates were incubated at 25 °C (12 h photoperiod) for 7 days, the mycelium was scraped off with a scalpel and approximately 30 mg of the mycelium was transferred to a 1.5 mL tube containing sterile sand and 2 beads. These tubes were placed directly into liquid nitrogen and the mycelium was cold ground using a Retsch mill (Retsch MM 301) for 4 min at 15 Hz. After grinding, each tube received 1 mL of CTAB lysis buffer with 1% polyvinyl pyrrolidone (MW. 360 000), 1% Na₂SO₃, 0.2 mg/mL RNAase and 1 mg/mL proteinase K. The tubes were vortexed (Vortex-Genie 2) and incubated in the oven at

65°C for 2 h. The tubes were then centrifuged for 3 min at 8000 rpm and approximately 900 µL of the supernatant was transferred to a new 2 mL tube. One millilitre of chloroform isoamylalcohol (CIAA, 24/1 v/v) was placed in each tube and mixed by inversion before being centrifuged at 10000 rpm for 10 min. After centrifugation, 700 µL of the supernatant was transferred to 1.5 mL tubes. Six hundred µL of isopropanol cooled to -20 °C and 210 µL of 5M NaCl were added and mixed by inversion. The tubes were kept at -20 °C overnight. They were then centrifuged at 4 °C for 30 min at 13000 rpm and the supernatant was removed by inverting the tubes. Five hundred microlitres of 70% ethanol was added to each tube and centrifuged at 4 °C for 5 min at 13000 rpm. Ethanol was removed by inverting the tubes and draining on absorbent paper. The tubes were dried for 10 min in the fume cupboard. DNA was re-suspended in 100 µL of sterile milliQ water. The quality and quantity of the extracted DNA was assessed by Nanodrop 2000 and on a 1% agarose gel.

PCR amplification and sequencing of isolates

Three primer pairs, corresponding to three genomic regions commonly chosen for the identification of fungi in general and of *Bipolaris* species in particular, were used to amplify different intergenic regions or genes. The ITS5/ITS4 primer pair (ITS5-F 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' ; ITS4-R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') for the ITS1-5,8S-ITS2 region (White et al., 1990), the GPD1/GPD2 pair (GPD1-F 5'-CAACGGCTTCCGTCGCATTG-3' ; GPD2-R 5'GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (Berbee et al., 1999) and the TEF1-983/TEF1-2218 pair (TEF1-983-F 5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3' ; TEF1-2218R-5'-ATGACACCRACRGCRACRGTYTG-3') for the elongation factor 1 α gene (Rehner & Buckley, 2005). Polymerase chain reaction amplifications were performed using a thermocycler (Biometra) in 25 µL total volume containing 14.75 µL commercial water, 5 µL buffer 5X (Promega GoTaq), 1 µL dNTP (10 mM), 1 µL (10 µM) of each forward and reverse primer, 0.25 µL Taq polymerase and 2 µL genomic DNA (10 ng). A negative control was included in all PCR, for which ultrapure water was used instead

of DNA. Amplifications were performed with an initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, 30 s primers annealing at 52 °C, 1 min extension at 72 °C, and a 10 min extension at 72 °C for ITS. To amplify the GAPDH gene the program included an initial denaturation step at 96 °C for 2 min, followed by 35 cycles with 1 min at 96 °C, 1 min at 52 °C and 45 s at 72 °C. With each cycle, time was extended at 72 °C by 4 s with a final 10 min extension at 72 °C. The TEF1- α amplification program included an initial denaturation step at 95 °C for 3 min followed by 35 cycles of 40 s denaturation at 94 °C, 50 s primer annealing at 54 °C, 1 min extension at 72 °C. Amplification products were checked by electrophoresis in 1.5% agarose in 0,5 X TAE buffer at 100 V for 35 min. DNA Ladder was used as a molecular-weight marker and visualisation of the amplified DNA sequences was done under UV light. Purification of PCR products and sequencing was done by Eurofins (Cologne, Germany).

Molecular and phylogenetic analyses

The nucleotide sequences generated by the forward and reverse primers, after being checked and corrected were used to obtain a consensus sequence using Codoncode aligner version 5.1.5 (CodonCode Corporation). Consensus sequences were entered into the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to find the closest species. Reference strains of *Bipolaris* spp. (Supplementary Table 1) whose ITS regions, GAPDH and TEF1- α genes are available on Genbank were used to compare their level of similarity with Camargue strains using the Sequence Demarcation Tool (SDT) version 1.2 software with default settings resulting in a colour-coded score matrix (Muhire et al., 2014). These reference strains were also used to establish phylogenetic relationships using the maximum likelihood (ML) method after alignment of their sequences with those of the Camargue isolates using MUSCLE in MEGA-X 10.2.10 software (Kumar et al., 2018). Branch stability was estimated with 1000 bootstrap replicates and sequences of *Curvularia lunata* served as the outgroup taxon.

Morphological characterization

The isolates were grown on PDA at 25 °C for 5 days. A 4 mm mycelial disc was transferred to the centre of each 145 mm petri dish containing PDA. Petri dishes were sealed with tape and incubated at 25 °C f under 12 h photoperiod or 14 days. Four replications were maintained for each isolate. The radial growth of the mycelium was measured at 3, 7 and 10 days of incubation. Colony colour were also recorded. On day 14, the mycelium was covered with sterile water and scraped off. The resulting suspension was filtered and for each strain, the dimensions of 10 randomly selected conidia were measured under the microscope (Olympus BH2) using LAS 3.7.0 software.

Pathogenicity test

Four strains (FR9046, FR9055, FR9058 and FR9072) representative of the 2 main morphological groups observed (Table 2) were selected for pathogenicity test. These strains were grown on rabbit food agar (50 g/L steeped filtrate of rabbit food pellets Kaytee Products, Inc. Chilton, WI 53014 USA and 15 g agar) during 14 days at 25 °C and with a 12 h photoperiod (Hau & Rush, 1980). Conidia were collected, filtered as described early and conidial suspensions adjusted to 10^4 conidia/mL with 0.5% gelatin final. The rice varieties Gines and Manobi commonly grown in Camargue, and the reference varieties Nipponbare and Kitaake all belonging to *Oryzae sativa* subsp. *japonica*, were grown for 28 days in pots containing peat soil and NPK 13-5-18 at 3.5 g/L of soil. Three pots of each variety (5 seedlings/pot) were placed in a tray (60 plants per tray) and the leaves were sprayed with 30 mL of the conidial suspensions or water (negative control) with 0.5% gelatin. Plants were kept at maximum humidity (100%) at 21 °C for one night and then transferred to a phytotron at 27 °C. Five days after inoculation, 12 leaves were collected per strain and per variety, i.e. 48 leaves for the 4 repetitions. They were laid out on sticky paper and scanned at 600 DPI (Epson Perfection V370 Photo scanner). The images were analysed using the R package

LeAFtool (Lesion Area Finding tool; <https://github.com/sravel/LeAFtool>), which measures leaf area and lesion number. The parameters used for the analysis were at least 1000 pixels for leaves and 10 pixels for lesion areas, with the blur value at 1. The average number of lesions per cm² of leaf and the average diseased area were calculated. Two-way analysis of variance (strain and variety) type III was calculated with the 'car' package for each variable and the comparison between treatments from the means adjusted by the 'lsmeans' package. A Bonferroni test was applied to compare the LSmeans at the 5% threshold.

Results

Colony and conidium morphology

The colonies of the 19 strains on PDA medium were grey with a brown coloration in the centre (Fig. 1). On the basis of the mycelial growth rate, the isolates were split into 2 major groups, the first had a moderate growth ranging from 0.8 to 1.12 cm/day and second group a faster growth rate between 1.31 and 1.70 cm/day. The strains also showed different conidial sizes and could be again distributed into two groups. In the largest group (2/3 of the strains), conidia were distoseptate with 6-9 septa, 12.4-19.6 µm in width, and 50-70 µm in length. In the second group, conidia were also distoseptate but with 3-6 septa, 11.6-16.3 µm in width and 72-105 µm in length.

Except for strain FR0971, strains with moderate mycelial growth correspond to strains with short conidia, and those with rapid growth correspond to strains with long conidia. The rate of mycelial growth and the size of the conidia are independent of the rice organ (leaf, seed) from which the strain was isolated.

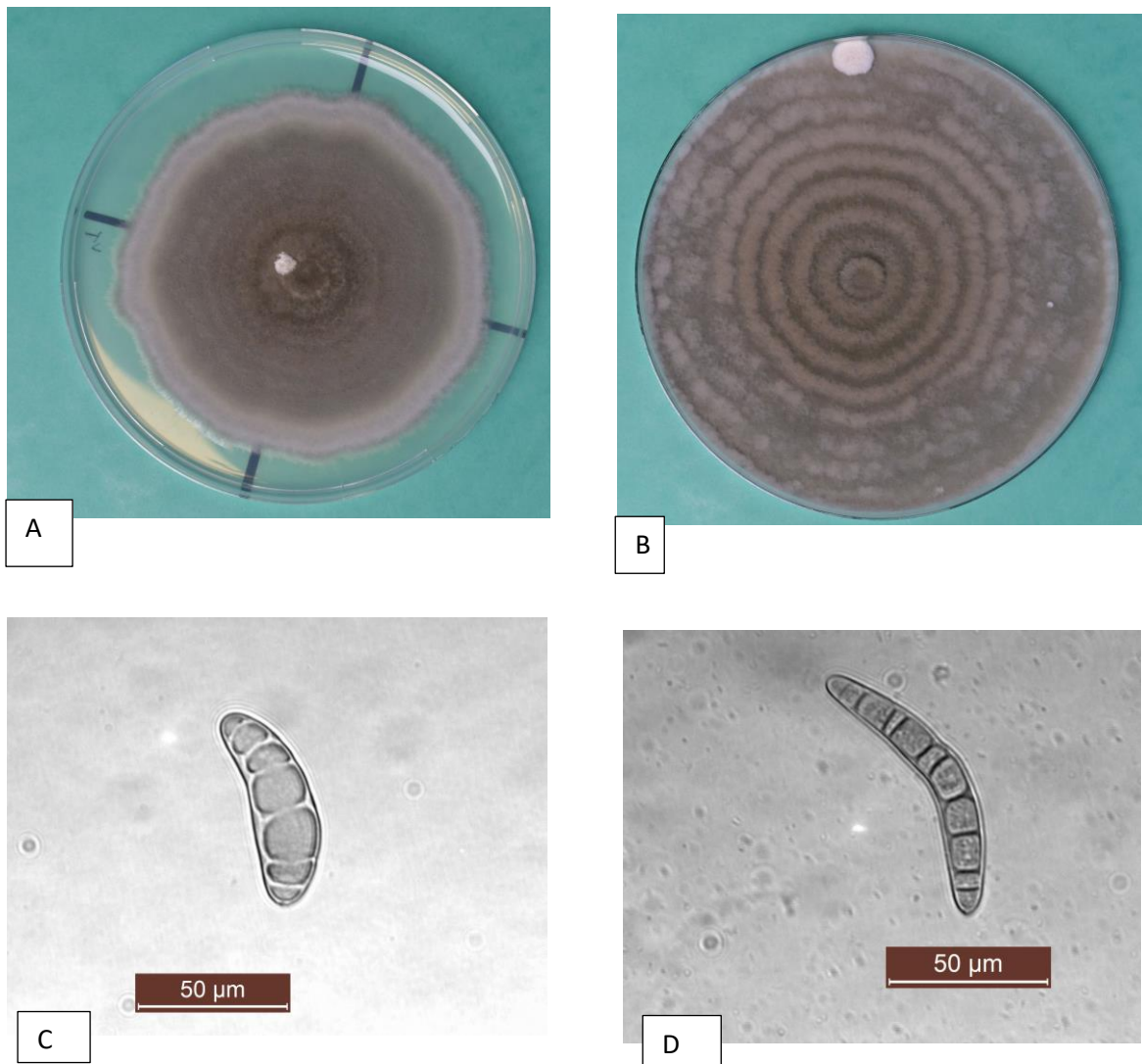


Fig. 1: Colours mycelial, growth pattern and conidia characteristics (200 x) of *B. oryzae* strains collected from Camargue 14 days after culture on PDA

A) Typical mycelial growth of group 1: moderate growing speed; B) Typical mycelial growth of group 2: fast growing; C) Typical conidium of group 1: average size 50-70 x 12.4-19.6 μm with septate number varying from 3 to 6; D) Typical conidium of group 2: average size 72-105 x 11.6-16.3 μm with septate number varying from 6 to 9.

Table 2: Mycelial growth speed and conidia characteristics of *B. oryzae* isolates from rice in Camargue, France

Group	Speed of mycelial growth (cm/day)	Conidial size (µm)		Number of septa	Isolates
		Mean length	Mean width		
1 - Moderate growth speed and short conidia	0.80 - 1.12	50 - 70	12.4 - 19.6	3 -7	FR9031, FR9032, FR9033, FR9035, FR9039, FR9044, FR9049, FR9057, FR9058, FR9070, FR9072, FR9075
2 - Fast growing and long conidia	1.31 - 1.70	72 - 105	11.6 - 16.3	6 -9	FR9037, FR9046, FR9055, FR9056, FR9069, FR9076
3 - Fast growing and short conidia	1.31	69.78	15	6	FR9071

Radial growth of the mycelium was measured at 3, 7 and 10 days of culture at 25°C on PDA medium. Measures of conidia were carried out after 14 days of culture in the same conditions.

Molecular characterization and phylogenetic analyses

Comparisons of the ITS, GAPDH and TEF1- α sequences of the Camargue strains with the sequences available for *Bipolaris* species in the GenBank database showed > 99% identity with *B. oryzae* (Supplementary 2).

For ITS sequences, similarity between Camargue strains varied between 99.3 and 100% (Fig. 2A). The highest similarity rates between the Camargue strains and the different *Bipolaris* species were observed with the reference strains *B. oryzae*. They are of the order of 99.2-100% for the sequence KJ922383 (strain MAFF 235449), 99-99.8% for the sequence KM230392 (strain AR 3797) and 99-99.6% for the sequences KM230393 (strain AR 5204) and JX256416 (strain MFLUCC 10-0715). The second most similar species is *B. coffeana* (KM230386 and KJ415525) with a similarity rate of 99%.

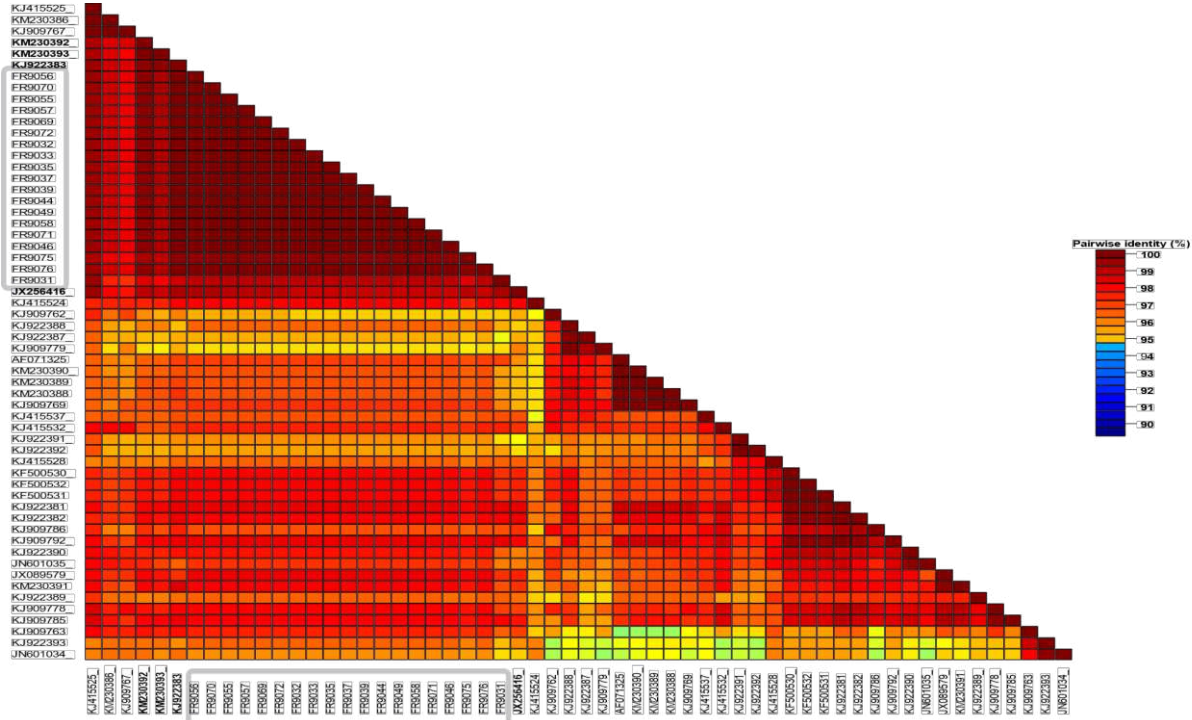
For the GAPDH sequences, the similarity between Camargue strains varied between 99.6 and 100% (Fig. 2B). Their similarity rate is 99.8-100% with the sequences JX276430 (strain MFLUCC 10-0715), KM042894 (strain AR 3797) and KM042895 (strain, AR 5204) of *B. oryzae*. *Bipolaris maydis* (KM034846, KM034844, KM034848, KM034847, KM034845) is the second most similar species to the Camargue strains with a similarity rate of 96.5%.

The similarity of TEF1- α sequences is 100% between the Camargue strains and 99.9% with the *B. oryzae* reference strain MFLUCC 10-0715 (Fig. 2C). However, the sequences KM093789 (strain MAFF 235449), KM093786 (strain AR 3797), KM093787 (strain AR 5204) of the *B. oryzae*, showed a low similarity of about 60% with the Camargue strains. The second most similar species is *B. gossypina* (KJ415467) with a similarity rate of 99.30%.

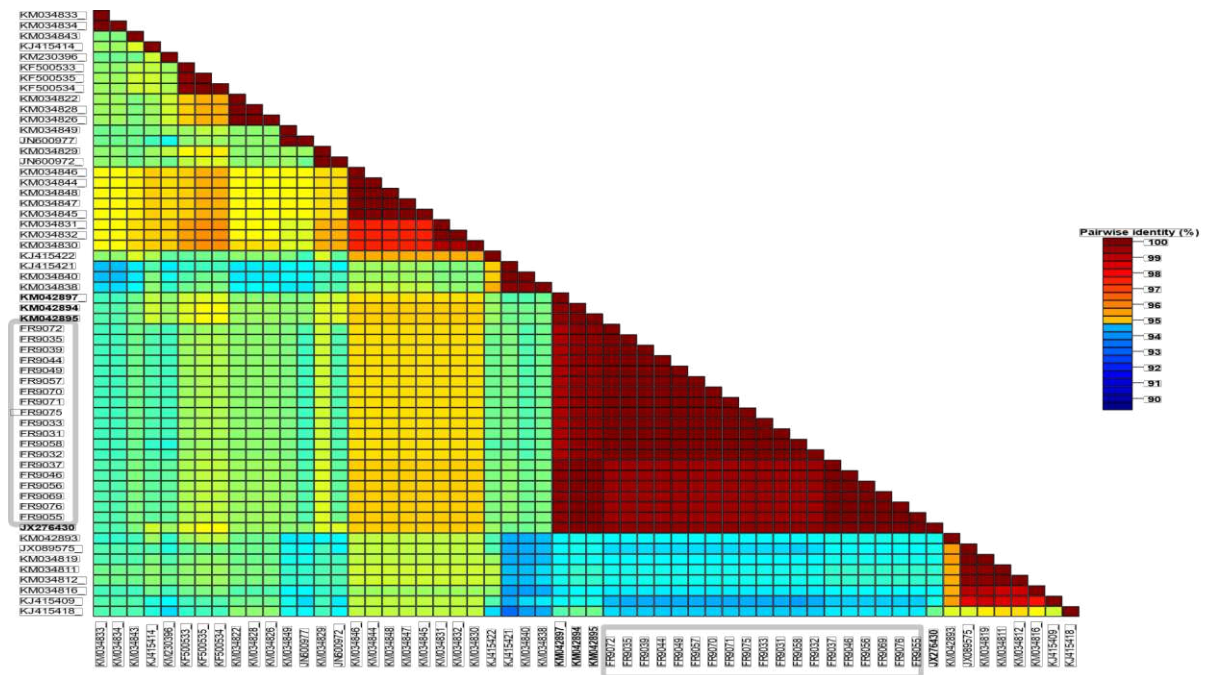
The phylogenetic trees generated with the ITS region or the GAPDH gene alone, and with the concatenated sequences of these two regions show a clustering of *Bipolaris* isolates by species. The maximum-likelihood phylogenetic tree generated with the TEF1- α gene shows some discrepancies between species and phylogenetic clustering (supplementary). For this purpose, we decided to present only the phylogenetic tree

generated by the ITS regions and the concatenated GAPDH genes. In all analyses, all Camargue strains are grouped in a single clade with the reference strains of *B. oryzae* with a bootstrap value of 99% (Fig. 3). This cluster is split into 2 sub-clusters corresponding to the 2 main groups identified on the basis of conidial morphology. Strain FR9071, which as a mixed phenotype, clusters genetically with strains of the most frequent subcluster.

A)



B)



C)

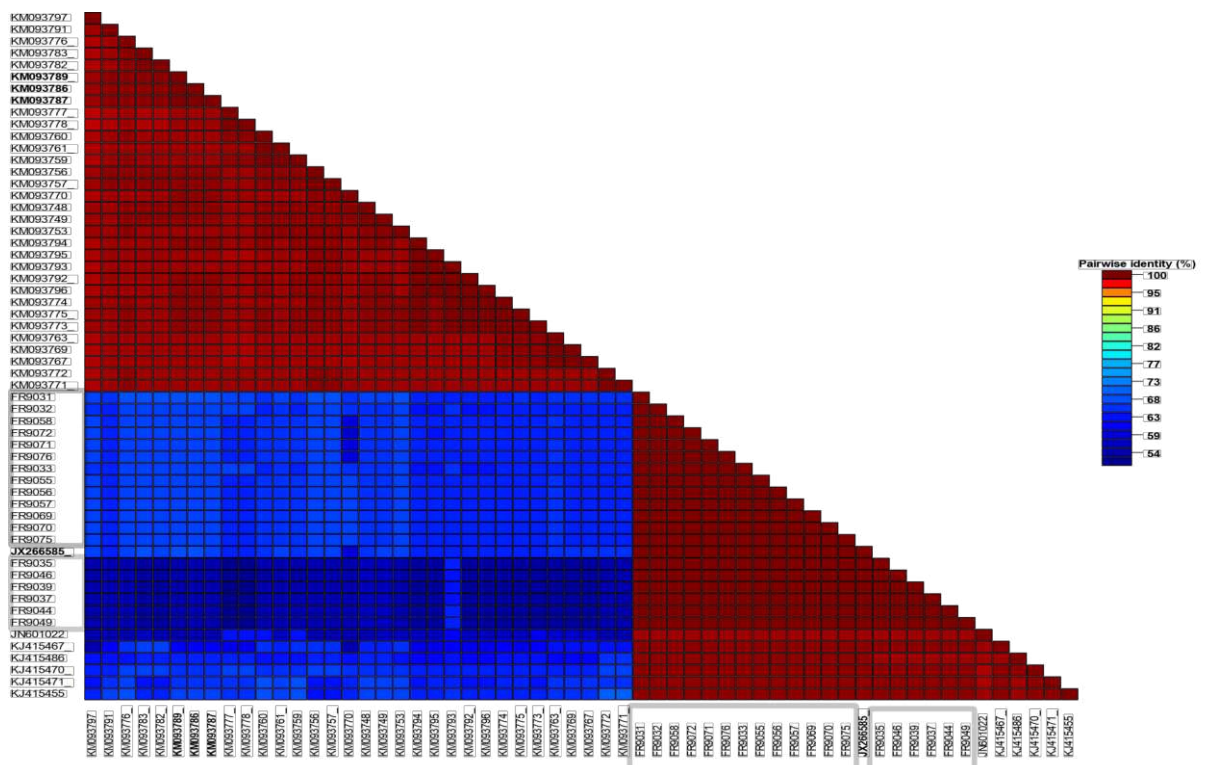


Fig. 2: Sequence Demarcation Tool analysis showing the level of similarity of sequences of *B. oryzae* strains from Camargue with *Bipolaris* spp. sequences obtained from GenBank for A) ITS, B) GAPDH, and C) TEF1- α genomic regions.

B. oryzae strains from the Camargue are framed and *B. oryzae* reference strains are in bold.



Fig. 3: Phylogenetic tree obtained from a maximum likelihood analysis based on the combined ITS and GAPDH alignment.

Support values at nodes represent bootstrap percentages with values $\geq 70\%$ are shown above the branches. Camargue strains are shown in bold and the GenBank *B. oryzae* strains in bold-italic. The tree is rooted with *Curvularia lunata* (CBS 730-96).

Pathogenicity

The first lesions in the form of brown spots appeared on the rice leaves 3 days after inoculation. At 5 days after inoculation, lesions were more pronounced (2 to 4 mm) and were surrounded by a yellow halo (Fig.4). All strains tested were virulent (Table 3). A highly significant ($p < 2e-16$) effect of isolates and varieties on lesion mean number per cm^2 of leaf and on the mean proportion of leaf area covered by the disease ($p < 2.2e-16$) were observed. The interaction between isolates and rice varieties was also significant on lesions per cm^2 of leaf ($p = 0.03$) and highly significant on the diseased leaf area ($p < 2.8e-14$). Of all the comparisons made, strain FR9046 induced the highest number of lesions per leaf in the variety Nipponbare (21 lesions per cm^2 of leaf) and the least number of lesions were observed with strain FR9058 in the varieties Gines (4.33 lesions per cm^2 of leaf) and Manobi (4.68). A positive, fairly strong ($R = 0.62$) and statistically significant ($p < 2.2e-16$) linear correlation was observed between the average number of lesions per cm^2 of leaf and the average proportion of the leaf covered by the disease (Fig. 5). Cumulating the impact of the isolates across all varieties, isolates FR9046 and FR9055 caused the most lesions (19.09 lesions per cm^2 of leaf), and the varieties Manobi and Gines are the least susceptible (Table 4).



Fig. 4: Disease symptoms after inoculation of leaves of the rice variety Gines with a *B. oryzae* strain from Camargue (FR9046) 5 days after inoculation with a conidial suspension of 10^4 conidia/mL

Table 3: Average number of lesions per cm² of leaf and diseased leaf area (in % of total leaf) 5 days after inoculation

Strains	Phylogenetic group	Varieties	Average number of lesions per cm ² of leaf	Diseased area (%)
FR9058	2	Gines	4.32 a	0.74 a
		Manobi	4.68 a	0.78 a
		Kitaake	6.30 ab	1.84 ab
		Nipponbare	8.87 bcd	2.59 abcd
		Average	6.04 w	1.49 w
FR9072	2	Gines	7.00 abc	2.14 abc
		Manobi	6.48 ab	1.30 ab
		Kitaake	9.73 cde	5.43 bcde
		Nipponbare	10.87 de	5.10 bcde
		Average	8.52 x	3.49 x
FR9055	1	Gines	8.62 bcd	3.48 abcd
		Manobi	9.30 bcde	3.56 abcd
		Kitaake	11.39 de	6.61 de
		Nipponbare	12.40 e	6.29 cde
		Average	10.49 y	4.98 x
FR9046	1	Gines	19.71 fg	17.60 g
		Manobi	17.35 f	7.88 e
		Kitaake	18.29 fg	8.37 e
		Nipponbare	21.00g	12.78 f
		Average	10.09 z	11.66 y

Values within each column followed by the same letters are not significantly different based on Bonferroni test at the 5% level. Average values over varieties were compared between strains but not with single strain x variety combinations.

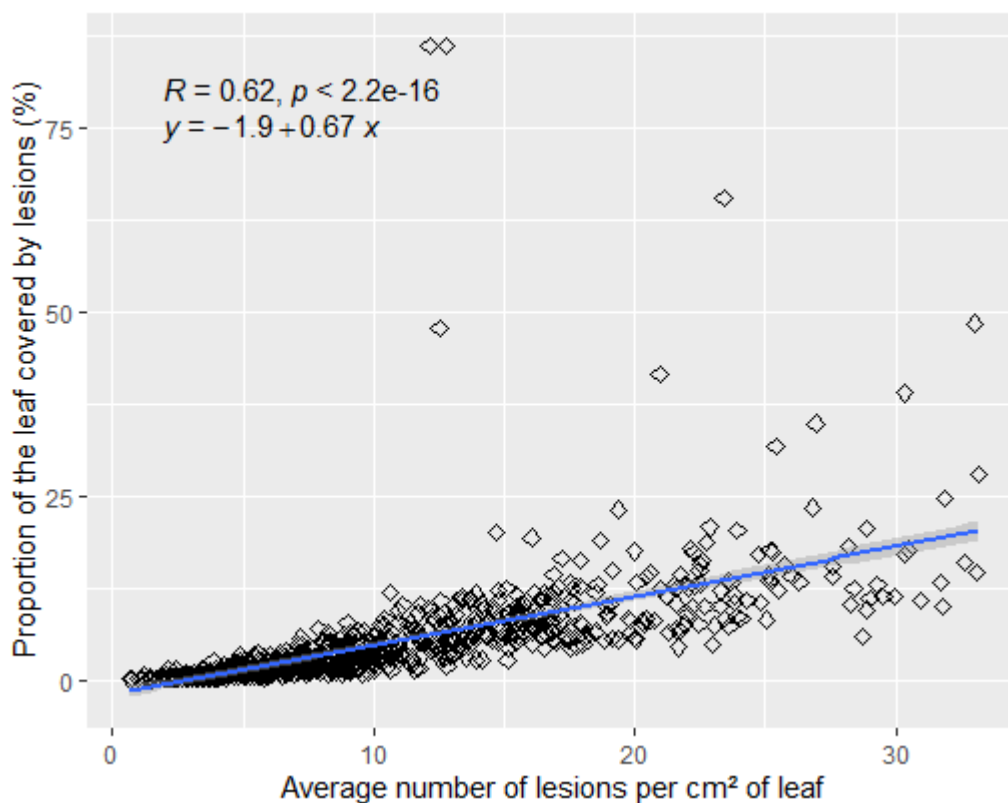


Fig. 5: Correlation between the average number of lesions per cm² of leaf and the average diseased area

Table 4: Resistance/susceptibility of rice varieties towards different isolates of *B. oryzae* from Camargue

Varieties	Average number of lesions per cm ² of leaf	Diseased leaf area (%)
Manobi	9.45 a	3.38 a
Gines	9.91 a	5.56 b
Kitaake	11.43 b	5.99 b
Nipponbare	13.29 c	6.69 b

Values within each column followed by the same letters are not significantly different based on Bonferroni test at the 5% level.

Discussion

Bipolaris oryzae isolates from Camargue were divided into 2 groups on the basis of growth rate, conidia morphology and genomic sequences.

The average dimensions of the conidia of *B. oryzae* from Camargue (50 -105 x 12 -20 µm) described in this study are similar to those characterized in Thailand by Chaijuckam *et al.* (2019). However, the length of conidia observed is less than that of *B. oryzae* strains described in India by Kumar *et al.* (2016). For Manamgoda *et al.* (2014), *B. oryzae* conidia size range from 50-155 x 10-22 µm with the majority of populations between 68-108 x 14-20 µm. Within *B. oryzae* isolates from rice mycelial colour is generally diverse (El-Shafey *et al.*, 2011; Dembélé, 2014; A. Kumar *et al.*, 2016; Valarmathi & Ladhalakshmi, 2018). But in our sample mycelial colour was relatively homogeneous between strains, as for population from North of Iran (Motlagh & Kaviani 2008). This lower morphological diversity may result from a relatively small area sampled in which the diversity of the fungus may potentially be lower.

Identifying causal species is key to develop control methods against diseases. Several species of *Bipolaris* were shown or are suspected to cause brown spot disease of rice (Gnancadja-André *et al.*, 2005; Motlagh & Kaviani, 2008a; El-Shafey *et al.*, 2011; Nazari *et al.*, 2015). Morphology traits are not sufficient to distinguish between these *Bipolaris* species. On the contrary, sequences of the -ITS1-ITS2 intergenic region of the 5-8S rDNA, and of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and TEF1-α genes have proven to be useful tools to make the difference between species of the genus *Bipolaris* (Berbee *et al.*, 1999; Manamgoda *et al.*, 2014). Sequencing of the ITS region and the GAPDH and TEF1-α genes showed that the Camargue strains are indeed *B. oryzae*. To our knowledge, this is the first time that the fungal species causing brown spot disease in Camargue is identified with molecular tools.

The phylogenetic analysis shows that Camargue isolates form two sub-clusters corresponding to the 2 groups observed on the basis of conidial morphology. The distribution of *B. oryzae* isolates into sub-clusters has also been observed in Egypt

based on intron-exon splice junction analysis (El-Shafey et al., 2011). This could be explained by the high genotypic diversity and low level of clones in *B. oryzae* populations already reported in many studies (Kamal & Mia, 2009; Motlagh & Anvari, 2010; Kumar et al., 2011; Castell-Miller & Samac, 2012; Nazari et al., 2015; Kumar et al., 2016; Ahmadpour et al., 2018). The inability of the TEF1- α genes to clearly split *Bipolaris* species phylogenetically was also observed by Priti (2016). Within an organism, each gene evolves under a different evolutionary history and time scale leading to a phylogenetic separation of species may differ depending on the gene considered (Choi & Kim, 2017).

Knowledge of pathogenicity characteristics can sometimes help to adapt control strategies. Strains FR9046 and FR9055 from group 2 (sub-cluster 2) were more aggressive than strains FR9058 and FR9072 from group 1 (sub-cluster 1). This suggests a potential correlation between morphology groups, phylogeny and pathogenicity. In future studies the number of strains from both groups should be increased to test this hypothesis. The average number of lesions per cm² of leaf and the proportion of leaf area covered by the disease were lower in the Manobi and Gines varieties commonly used in the Camargue than in the reference varieties Kitaake and Nipponbare of Japanese origin. This result explain why brown spot consequence are limited in Camargue as observed by the French rice centre (<http://www.centrefrançaisduriz.fr>). The varieties commonly used in the Camargue would have a good genetic background where present isolates would not be very aggressive. No major genes conferring immunity to brown spot were identified so far in world (Sato et al., 2008).

Acknowledgement

The authors are thankful to the Centre Français du Riz for facilitating sample collection. They also thank the RICE CRP and the Islamic Development Bank for their financial support.

Supplementary 1 : GenBank and culture collection accession numbers of isolates used in this study

Species	Isolates N°	Host	Country	GenBankK accession n°			References
				ITS	GAPDH	TEF	
<i>Bipolaris bicolor</i>	CBS 690.96			KJ909762	KM042893	KM093776	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris clavata</i>	BRIP 12530	<i>Dactyloctenium radulan</i>	Australia	KJ415524	KJ415422	KJ415471	Tan et al., 2014
<i>Bipolaris coffeana</i>	BRIP 14845	<i>Coffea arabica</i>	Kenya	KJ415525	KJ415421	KJ415470	Tan et al. 2014
<i>Bipolaris coffeana</i>	MFU0090	<i>Poaceae</i>	Thailand	KM230386	KM034840	KM093783	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris cookei</i>	AR5185 MAFF	<i>Sorghum</i> sp.	Japan	KJ922391	KM034833	KM093777	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris cookei</i>	511191	<i>Sorghum bicolor</i>	Japan	KJ922392	KM034834	KM093778	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris cynodontis</i>	CBS 109894	<i>Croton dactylon</i>	Hungary	KJ909767	KM034838	KM093782	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris drechsleri</i>	AR4841	<i>Microstegium vimineum</i>	USA	KF500530	KF500533	KM093760	Crous et al., 2013
<i>Bipolaris drechsleri</i>	MUS0028	<i>Microstegium vimineum</i>	USA	KF500532	KF500535	KM093761	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris drechsleri</i>	FIP373	<i>Ornamental grass</i>	USA	KF500531	KF500534	KM093759	Crous et al. 2013
<i>Bipolaris heveae</i>	CBS 241 92	<i>Hevea</i> sp.	Nigeria	KJ909763	KM034843	KM093791	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris gossypina</i>	BRIP 14840	<i>Gossypium</i> sp.	Kenya	KJ415528	KJ415418	KJ415467	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris maydis</i>	C5	<i>Zea mays</i>	USA	AF071325	KM034846	KM093794	Berbee et al. 1999
<i>Bipolaris maydis</i>	AR5182	<i>Sorghum bicolor</i>	Japan	KM230388	KM034844	KM093792	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris maydis</i>	AR5183	<i>Sorghum bicolor</i>	Japan	KM230390	KM034848	KM093796	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris maydis</i>	C4	<i>Zea mays</i>	USA	KM230389	KM034847	KM093795	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris maydis</i>	CBS 13629	<i>Zea mays</i>	Japan	KJ909769	KM034845	KM093793	Manamgoda et al., 2014

Supplementary 1 (Continued)

Species	Isolates N°	Host	Country	GenBankK accession n°			References
				ITS	GAPDH	TEF	
<i>Bipolaris microstegii</i>	AR4840	<i>Microlaena stipoides</i>	USA	JX089579	JX089575	KM093756	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris microstegii</i>	AR5192 MFLUCC	<i>Microstegium vimineum</i>	USA	KM230391	KM034819	KM093757	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris oryzae</i>	100715	<i>Oryza sativa</i>	Thailand	JX256416	JX276430	JX266585	Manamgoda et al., 2012
<i>Bipolaris oryzae</i>	MAFF 235449	<i>Oryza sativa</i>	Japan	KJ922383	KM042897	KM093789	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris oryzae</i>	AR3797	<i>Panicum virgatum</i>	USA	KM230392	KM042894	KM093786	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris oryzae</i>	AR5204	<i>Panicum virgatum</i>	USA	KM230393	KM042895	KM093787	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9031	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9032	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9033	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9035	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9037	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9039	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9044	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9046	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9049	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9055	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9056	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9057	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9058	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9069	<i>Oryza sativa</i>	France				This study

Supplementary 1 (Continued)

Species	Isolates N°	Host	Country	GenBank accession n°			References
				ITS	GAPDH	TEF	
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9070	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9071	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9072	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9075	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9076	<i>Oryza sativa</i>	France				This study
<i>Bipolaris peregianensis</i>	DAOM 22199	<i>C. dactylon</i>	Australia	KJ922393	KM034849	KM093797	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris peregianensis</i>	BRIP 12790	<i>C. dactylon</i>	Australia	JN601034	JN600977	JN601022	Manamgoda et al., 2011
<i>Bipolaris pluriseptata</i>	BRIP 14839	<i>E. coracana</i>	Zambia	KJ415532	KJ415414	KJ415486	Tan et al., 2014
<i>Bipolaris salviniae</i>	IMI 228224	<i>Salvinia auriculata</i>	Brazil	KJ922390	KM034829	KM093772	Manamgoda et al. 2014
<i>Bipolaris salviniae</i>	BRIP 12898	<i>Melinis minutiflora</i>	Australia	JN601035	JN600972	KM093771	Manamgoda et al., 2011
<i>Bipolaris secalis</i>	BRIP 14453	<i>Secale cereale</i>	Argentina	KJ415537	KJ415409	KJ415455	Tan et al., 2014
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	CBS 110 14	<i>Hordeum</i> sp. <i>Phalaris</i>	USA	KJ922381	KM034822	KM093763	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	FIP499	<i>arundinaceae</i>	USA	KJ922382	KM034828	KM093769	Manamgoda et al. 2014
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	MAFF 236448	<i>Z. mays</i>	Japan	KJ909792	KM034826	KM093767	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris urochloae</i>	ATCC 58317	<i>Urochloa panicoides</i>	Australia	KJ922389	KM230396	KM093770	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris victoriae</i>	CBS 327 64	<i>Avena sativa</i>	USA	KJ909778	KM034811	KM093748	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris victoriae</i>	DAOM 147449	<i>Avena sativa</i> <i>Saccharum</i>	USA	KJ909785	KM034812	KM093749	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris yamadae</i>	DAOM 147441	<i>officinarum</i>	Cuba	KJ922388	KM034831	KM093774	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris yamadae</i>	MAFF 235507	<i>Z. mays</i>	Japan	KJ922387	KM034832	KM093775	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris yamadae</i>	CBS 202 29	<i>P. miliaceum</i>	Japan	KJ909779	KM034830	KM093773	Manamgoda et al., 2014
<i>Bipolaris zeae</i>	AR3795	<i>P. virgatum</i>	USA	KJ909786	KM034816	KM093753	Manamgoda et al., 2014
<i>Curvularia lunata</i>	CBS 730 96	Human lung biopsy	USA	JX256429	JX276441	JX266596	Manamgoda et al. 2012

Supplementary 2 : Morphological data of *Bipolaris oryzae* strains from the Camargue and the closest sequences according to BLAST analyses on GenBank

Camargue strains	Mycelial growth (cm)			Conidia Size (μm)		Average number of septa	Closest related GenBank sequences					
	3 Days after inoculation	7 Days after inoculation	10 Days after inoculation	Mean length	Mean width		N° sequence ITS	% similarity ITS	N° sequence GAPDH	% similarity GAPDH	N° sequence TEF1	% similarity TEF1
FR9031	2.70	6.90	10.12	50.31	19.64	3	LC494363	100	MH412653	100	MF431724	100
FR9032	3.00	6.90	10.35	50.47	16.23	4	LC494363	100	MH412653	100	MF431724	100
FR9033	2.67	6.20	9.07	62.65	16.14	5	LC494363	100	MH412653	100	MF431724	100
FR9035	2.93	7.43	10.90	53.19	17.58	5	LC494363	100	MH412653	100	MT027093	100
FR9037	4.23	9.25	13.10	104.34	15.28	9	LC494363	100	MK051171	100	MT027093	100
FR9039	3.10	7.55	11.18	71.72	14.96	6	LC494363	100	MT757770	99.83	MT027093	100
FR9044	2.88	7.07	10.45	63.49	15.80	5	LC494363	100	MH412653	100	MT027093	100
FR9046	4.77	11.87	13.10	96.47	16.34	8	MH857291	100	MK051171	100	MT027093	100
FR9049	2.43	5.67	8.23	55.54	14.30	5	LC494363	100	MH412653	100	MT027093	100
FR9055	4.27	11.55	13.10	98.06	11.61	7	LC494363	100	MK051171	100	MF431724	100
FR9056	4.45	11.75	13.10	72.96	12.05	6	LC494363	100	MK051171	100	MF431724	100
FR9057	2.72	6.48	9.53	68.73	13.65	6	LC494363	100	MH412653	100	MF431724	100
FR9058	2.72	6.13	8.85	46.31	12.48	4	LC494363	100	MH412653	100	MF431724	100
FR9069	4.25	11.67	13.10	104.34	12.64	8	LC494363	100	MK051171	100	MF431724	100
FR9070	3.15	7.47	11.12	64.45	14.58	6	LC494363	100	MH412653	100	MF431724	100
FR9071	4.17	10.03	13.10	69.78	15.01	6	LC494363	100	MH412653	100	MF431724	100
FR9072	2.80	7.20	10.95	66.76	12.88	7	LC494363	100	MH412653	100	MF431724	100
FR9075	2.67	6.37	9.00	66.09	13.86	6	LC494363	99.82	MH412653	100	MF431724	100
FR9076	4.40	11.50	13.10	76.02	11.62	6	LC494363	100	MK051171	100	MF431724	100

Article 4 : First Report of Rice Brown Spot Caused by *Exserohilum*
rostratum in Mali

Diseases Caused by Fungi and Fungus-Like Organisms

First Report of Rice Brown Spot Caused by *Exserohilum rostratum* in Mali

Kouka Hilaire Kaboré,^{1,2,3} Diariatou Diagne,^{2,3,4} Joëlle Milazzo,^{2,3} Henri Adreit,^{2,3} Marc-Henri Lebrun,¹ and Didier Tharreau^{2,3,†}

¹UMR BIOGER, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon, France

²CIRAD, PHIM, 34398 Montpellier, France

³PHIM, Université Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

⁴Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA)/Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB), Mali

Funding: Support was provided by RICE CRP (grant to CIRAD), the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (grant to K. H. Kaboré) and the Islamic Bank of Development (Ph.D. grant to K. H. Kaboré). Plant Dis. 106:1747, 2022; published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0662-PDN>. Accepted for publication 11 November 2021.

Rice brown spot is an emerging disease of concern in many rice-growing countries. Different fungal species of the genera *Bipolaris* and *Exserohilum* were reported as the causal agents of this disease. These fungal pathogens cause similar necrotic lesions on leaves and infect grains with a significant effect on seed germination. In 2018, samples of rice seed and leaves with typical brown spot symptoms were collected from irrigated (Manikoura and Niono) and lowland (M'pegnesso and Loulouni) rice fields in Mali and incubated for 5 to 7 days on wet filter paper at 25°C with 12 h photoperiod. Conidia observed under a microscope were straight or slightly curved and light-brown or dark. They were also rostrate or obclavate and measured 31.4 to 275.6 × 7.3 to 18 µm ($n = 40$). These morphological characteristics are identical to those of *Exserohilum rostratum* (Hernández-Restrepo et al. 2018). DNA from eight single-spored isolates was extracted by a CTAB-based protocol (Doyle and Doyle 1987). Internal transcribed spacer (ITS) rDNA region, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and translation elongation factor 1 alpha (TEF1- α) genes were amplified by PCR with the primers ITS5/ITS4 (White et al. 1990), GPD1/GPD2 (Berbee et al. 1999), and EF1 983/EF1 2218 (Rehner et al. 2005), respectively. The amplicons were sequenced and deposited in NCBI GenBank. Sequence similarity between the Malian strains

was 100% for ITS and GAPDH, and 99.8 to 100% for TEF1. Similarity between sequences of Malian strains and *E. rostratum* reference strains BRIP 11417 (GenBank acc. no. LT837836, LT882553, and LT896656) and CBS 128061 (GenBank acc. no. KT265240, LT715900, and LT896658) were 99.6 to 100%. A maximum-likelihood phylogenetic tree generated with ITS, GAPDH, and TEF1- α concatenated sequences using MEGA-X 10.1.7 grouped all eight strains from Mali in the *E. rostratum* clade with a bootstrap value of 100%. For a pathogenicity test, four strains from leaves and seed were grown on rabbit food agar (50 g/liter steeped filtrate of rabbit food pellets, Kaytee Products, Chilton, WI, USA, and 15 g agar) for 14 days at 25°C with a 12 h photoperiod (Hau and Rush 1980). Spores were collected and the concentration of spore suspension adjusted to 1.5×10^5 conidia/ml with 0.5% gelatin. The rice varieties ADNY 11, ARICA 9, and Shwetasoké were grown in pots with peat soil and NPK 13-5-18 at 3.5 g/liter of soil for 21 days. Four pots of each variety (5 seedlings/pot) were placed in a tray (60 plants per tray) and the leaves were sprayed with 30 ml of the conidial suspension or water at 0.5% gelatin (negative control). Plants were kept at maximum humidity (100%) at 21°C for one night and then transferred to a phytotron at 27°C. Seven days after inoculation, circular or oval foliar lesions less than 5 mm long, either brown or dark, sometimes whitish in their centers were observed. These lesions were identical to those observed in the field. *E. rostratum* was reisolated from these lesions. *E. rostratum* affects a wide range of plant species, particularly grasses, and has been observed on rice in many countries (Cardona and González 2007; Mahmad Toher et al. 2016; Majeed et al. 2016; Silva et al. 2016). However, to our knowledge, this is the first report of *E. rostratum* causing brown spot in rice in Mali.

References:

- Berbee, M. L., et al. 1999. Mycologia 91:964.
 Cardona, R., and González, M. S. 2007. Plant Dis. 91:226.
 Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1987. Phytochem. Bull. 19:11.
 Hau, F. C., and Rush, M. C. 1980. Plant Dis. 64:788.
 Hernández-Restrepo, M., et al. 2018. Persoonia 41:71.
 Mahmad Toher, A. S., et al. 2016. Plant Dis. 100:226.
 Majeed, R. A., et al. 2016. Plant Dis. 100:2162.
 Rehner, S. A., et al. 2005. Mycologia 97:84.
 Silva, F. J. A., et al. 2016. Plant Dis. 100:2531.
 White, T. J., et al. 1990. Page 315 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA.

The author(s) declare no conflict of interest.

Keywords: cereals and grains, field crops, fungi, pathogen detection

[†]Indicates the corresponding author.
 D. Tharreau; tharreau@cirad.fr

Chapitre 2 : Structure et diversité génétique des populations de *Bipolaris oryzae* et *Exserohilum rostratum* principaux agents responsables de l'helminthosporiose du riz

Ce chapitre présente le travail réalisé sur la structure et la diversité génétique des populations de *B. oryzae* et *E. rostratum* responsables de l'helminthosporiose du riz dans de nombreux pays. Il est composé de 2 parties. La première partie fait une description de la structure des populations de *B. oryzae* issues de différents pays d'Afrique, d'Amérique, d'Asie et d'Europe. Il vise à donner une vision globale mais préliminaire de la structure génétique de *B. oryzae* sur la base des marqueurs de polymorphismes mononucléotidiques (SNP) obtenus par *genotyping-by-sequencing* (GBS). La seconde partie est sous forme d'un article en préparation (à soumettre à *Frontiers in Plant Science*) et décrit la diversité et la structure génétique des populations de *B. oryzae* et *E. rostratum* au Burkina Faso. L'article s'est intéressé à la structure et la diversité génétique des populations de *B. oryzae* et *E. rostratum* dans 6 zones rizicoles du Burkina Faso. Il vise à apporter des connaissances sur la structure, la diversité et le mode de reproduction des 2 agents pathogènes au Burkina Faso.

Structure génétique des populations de *Bipolaris oryzae* issues des pays d’Afrique, d’Amérique, d’Asie et d’Europe

Introduction

Bipolaris oryzae, ascomycète haploïde et nécrotrophe est l’espèce majeure responsable de l’helminthosporiose du riz dans le monde. Contrairement à *Pyricularia oryzae*, agent responsable de la pyriculariose du riz dont la structure et la diversité génétique mondiale ont été étudiées (Tharreau et al., 2009 ; Saleh et al., 2014 ; Gladieux et al., 2018 ; Odjo et al., 2021), *B. oryzae* n’a pas bénéficié d’études à l’échelle mondiale. Une étude réalisée sur 4 pays asiatiques (Iran, Philippines, Bangladesh et Japon) a montré 3 groupes génétiques sans lien strict avec l’origine géographique des isolats (Ahmadpour et al., 2018). Une analyse de la diversité et la structure génétique mondiale de *B. oryzae* peut permettre de :

- Identifier le centre de diversité de *B. oryzae* ;
- Identifier les éventuelles migrations de *B. oryzae* dans le monde ;
- Identifier le mode de reproduction des populations (clonale, sexuée, mixte) ;
- Identifier des sites potentiels pour les recherches de structures de reproduction sexuée dans la nature ;
- Reconstituer l’histoire de la progression de l’helminthosporiose du riz dans le monde.

Ces informations sont importantes pour la compréhension générale de l’helminthosporiose du riz et particulièrement pour le développement de variétés résistantes. L’objectif de cette étude était d’initier une analyse de la diversité et de la structure génétique d’un échantillon mondial de *B. oryzae*. Cependant, le nombre d’isolats réunis par pays/continent n’était pas homogène et parfois faible. Nous avons donc décidé de limiter notre analyse à une description globale de la structure génétique mondiale de *B. oryzae*, sans chercher à faire des comparaisons ou à calculer des indices de diversité ou de recombinaison.

Matériel et méthodes

Isolats de *B. oryzae*

Des échantillons de feuilles et de grains de riz infectés par l'helminthosporiose ont été collectés au Burkina Faso, au Mali, en France, au Pakistan, en Italie et au Vietnam. L'isolement monoconidien des isolats a été fait par la méthode d'incubation sur papier Whatman (Mathur & Kongsdal, 2003 ; ISTA, 2021) précédemment décrite au chapitre 1 à la page 68 (Collecte et isolement des monoconidies). Des isolats de Chine, du Bénin, du Ghana, du Togo et des USA ont été fournis par des collaborateurs. Au total 175 isolats de *B. oryzae* ont été réunis (Tableau1).

Extraction d'ADN, préparation des banques GBS et séquençage

L'extraction de l'ADN au CTAB (Doyle & Doye, 1987), la préparation des banques GBS (Elshire et al., 2011) et le séquençage Illumina ont été réalisés comme décrit au chapitre 1 (Extraction ADN ; GBS : préparation des banques et séquençage).

Analyses bioinformatiques et de la structure génétique

Pour des analyses de structure génétique basées sur des marqueurs de qualités, l'outil GBSV v1.3 (Herten et al., 2015) et le pipeline RattleSNP (<https://github.com/sravel/RattleSNP>) ont été utilisés respectivement pour le démultiplexage et l'identification des marqueurs SNPs tels que décrit au chapitre 1 à la page 74 (Assignment taxonomique et analyse phylogénétique à partir des données de GBS). L'identification des marqueurs SNPs a été faite après application de filtres (nombre de reads minimum de 100 000 par souche, profondeur minimum de séquençage de 3X, DP2, qualité minimum de 30, fréquence allélique minimale 0,05, 30% de données manquantes maximum).

La structure génétique des populations de *B. oryzae* a été appréciée par des outils de clustering notamment la DAPC (Jombart et al., 2010) et le programme sNMF (Frichot et al., 2014). Une phylogénie a été réalisée avec RAxML (Stamatakis, 2014). L'indice de différenciation F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) a été calculé à l'aide du package

'hierfstat' de R (Goudet, 2005) et une analyse hiérarchique de la variance moléculaire (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) a été réalisée à l'aide du package 'poppr' de R (Kamvar et al., 2014) comme décrit dans l'article 4 (*Population structure and differentiation*).

Résultats et discussion

Marqueurs SNPs identifiés

L'application des filtres (nombre minimum de 100 000 reads par souche et 3X de profondeur moyenne de séquençage) a réduit les 175 isolats de *B. oryzae* séquencés à 132 isolats exploitables, soit une perte de 24% des isolats (Tableau 1). Ces filtres ont réduit considérablement le nombre d'isolats de France (67%), du Mali (57%) et du Burkina Faso (30%). Contrairement aux isolats de ces pays, ceux des USA, Togo, Ghana, Benin et Chine ont été faiblement (5 à moins de 15% d'isolats exclus) ou même pas impacté par le filtrage.

L'alignement des séquences des isolats de *B. oryzae* sur le génome de référence de *B. oryzae* ATCC 44560 composé de 619 scaffolds a permis d'identifier 970 561 SNPs bruts que le filtrage (qualité du séquençage, fréquence minimum des allèles, nombre minimum de reads par base, pourcentage de données manquantes) a réduit à 30 187 SNPs. Les données manquantes ou inexploitablees produites par le GBS sont inhérentes à la technologie nécessitant donc un contrôle de qualité des séquences produites avant toute analyse (Scheben et al., 2017). Les pertes d'isolats observées après le filtrage de nos données GBS pourraient être dues à l'absence ou à la rareté de sites de restriction chez certains isolats et au multiplexage élevé (246 isolats). Le niveau de multiplexage détermine la distribution de la profondeur de séquençage entre les isolats et moins d'isolats sont multiplexés, plus grande sera la profondeur de séquençage par isolat (Wallace & Mitchell, 2017).

Tableau 1 : isolats de *B. oryzae* séquencés par pays et utilisés pour les analyses de structure génétique après application des filtres sur les données GBS

Pays	Nombre d'isolats	
	Séquencés par GBS	Restant après filtrage
Benin	18	18
Burkina Faso	87	61
Chine	7	7
Colombie	1	1
France	9	3
Ghana	7	6
Italie	1	1
Mali	14	6
Pakistan	1	1
Togo	7	6
USA	18	17
Vietnam	5	5
Total	175	132

Structure génétique des populations de *B. oryzae*

Pour comprendre la structure des populations des 132 isolats de *B. oryzae* issus de différents pays, des analyses DAPC, sNMF et RaxML ont été réalisées. Le critère d'information bayésien (BIC) de l'analyse DAPC a suggéré que le nombre optimal de groupes était de 5 ($K = 5$; Figure 1). De même, l'entropie croisée de l'analyse sNMF a indiqué un optimum de 5 clusters (Figure 2). Les deux méthodes ont donné un résultat strictement identique. Tous les individus assignés à un groupe par DAPC ont également été assignés à un seul et même groupe avec sNMF (Tableau 2). Le cluster 5 est spécifique aux isolats des USA et d'Europe (France et Italie). Les 4 autres clusters génétiques regroupent des isolats d'Afrique et d'Asie indépendamment de l'origine géographique. En dehors des USA et du Togo (6 individus), entre 2 et 4 groupes génétiques sont détectés dans les différents pays dès qu'un effectif de 5 individus est analysé.

L'arbre phylogénétique réalisé avec RaxML met également en évidence les 5 groupes génétiques (Figure 3). Les clusters 2, 3 et 5 sont bien distincts les uns des autres avec

une bootstrap de 83% pour chacun. L'analyse détaillée des résultats de clustering montre de l'admixture entre tous les groupes (Figure 3) et en particulier entre groupes 1 et 4.

Les valeurs de FST entre les populations de *B. oryzae* des différents pays ont varié de 0,004 à 0,617 (Tableau 3) avec une valeur moyenne de 0,274. Toutes les valeurs de FST entre les populations des USA et des autres pays (Afrique de l'Ouest et Asie) ont été supérieures à la valeur moyenne. Les valeurs de FST ont été assez faibles entre les populations des pays d'Afrique de l'Ouest, et entre celles des pays d'Afrique de l'Ouest et d'Asie. L'importante différenciation génétique observée entre les isolats des USA et de l'Afrique de l'Ouest pourrait être liée à la distance géographique mais aussi à l'espèce hôte des isolats des USA qui est le *Zizania palustris*, un riz sauvage cultivé en Amérique du nord (Johnson & Percich, 1992).

L'analyse AMOVA a révélé que la variation génétique entre les isolats est plus importante au sein des pays (69%) qu'entre les pays (31%) (Tableau 4). La structure génétique des populations de *B. oryzae*, indépendamment de leurs origines géographiques et la variation génétique importante à l'intérieur des pays qu'entre les pays ont été aussi observées chez les isolats d'Iran, Bangladesh, Philippines et Japon (Ahmadpour et al., 2018). Ce type de structuration génétique pourrait résulter de migrations à longue distance par le biais de semences infectées (Odjo et al., 2021). Cependant, l'hypothèse de migration ou d'introductions multiples entre pays ne peut être vérifiée qu'en génotypant plus d'isolats par pays et par continent.

Tableau 2 : Répartition des isolats de *B. oryzae* par clusters génétiques obtenus par analyses DAPC et sNMF

Pays	Clusters				
	1	2	3	4	5
Benin	12	4	2	-	-
Burkina Faso	22	16	5	18	-
Chine	5	-	-	2	-
Colombie	1	-	-	-	-
France	-	-	-	-	3
Ghana	1	4	1	-	-
Italie	-	-	-	-	1
Mali	-	1	-	5	-
Pakistan	-	-	-	1	-
Togo	-	-	6	-	-
USA	-	-	-	-	17
Vietnam	1	2	-	2	-
Total	42	27	14	28	21

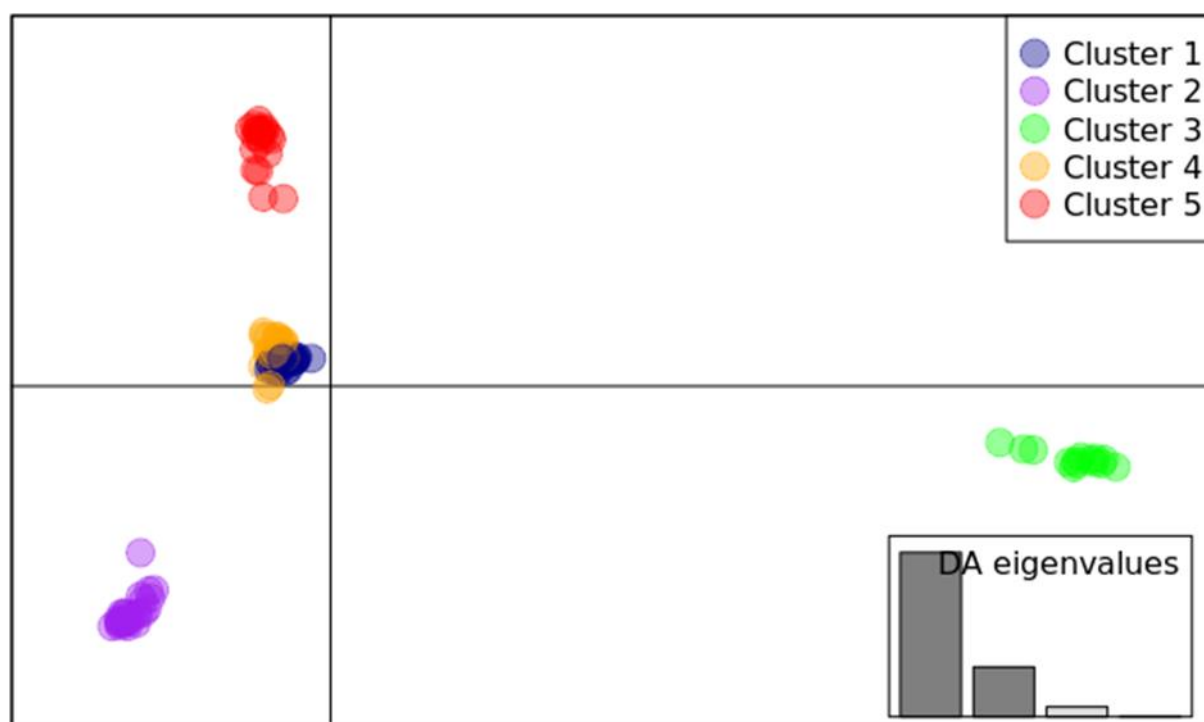


Figure 1 : Regroupement des isolats de *B. oryzae* en 5 groupes génétiques par analyse discriminante en composantes principales (DAPC)

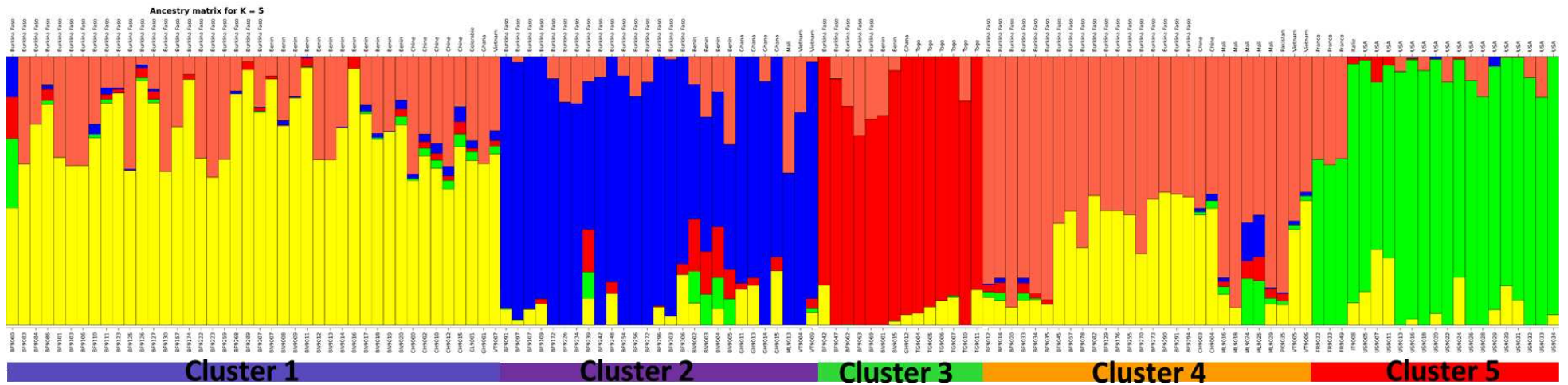


Figure 3 : Analyse d'admixture avec sNMF des 132 isolats de *B. oryzae*.

Tableau 3 : Indices de différenciation (FST) entre populations géographiques de *B. oryzae*

	Benin	Burkina Faso	Chine	France	Ghana	Mali	Togo	USA
Burkina Faso	0,025							
Chine	0,058	0,058						
France	0,369	0,305	0,457					
Ghana	0,100	0,080	0,230	0,430				
Mali	0,240	0,136	0,284	0,511	0,323			
Togo	0,236	0,249	0,416	0,617	0,195	0,550		
USA	0,348	0,322	0,414	0,158	0,385	0,437	0,485	
Vietnam	0,049	0,004	0,074	0,363	0,077	0,170	0,339	0,362

Les FST n'ont pas été calculés pour les pays qui avaient moins de 3 isolats

Tableau 4: Résultats de l'analyse AMOVA des isolats de *B. oryzae*

Source de variation	Dégré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Sigma	%	P value
Inter-pays	11	118251,5	10750,1	967,9	31	0,0001
Intra-pays	120	258416,1	2153,5	2153,5	69	
Total	131	376667,6	2875,3	3121,4	100	

Conclusion partielle et perspectives

L'objectif de cette étude était d'initier une analyse de la diversité et de la structure génétique d'un échantillon mondial de *B. oryzae*. L'analyse de 132 isolats de *B. oryzae* de 12 pays (Benin, Burkina Faso, Chine, Colombie, France, Ghana, Italie, Mali, Pakistan, Togo, USA et Vietnam) a permis d'avoir un aperçu général de la structure des populations. Les isolats ont été répartis en 5 groupes génétiques dont un (groupe 5) est spécifique aux USA et à l'Europe. Les 4 autres groupes génétiques rassemblent les isolats des pays d'Afrique et d'Asie indépendamment de leur origine géographique. Cette structure pourrait s'expliquer par des migrations d'isolats entre les pays, certainement par le biais de la semence. Les études futures devront se baser sur un plus grand nombre d'isolats par pays et inclure des échantillons des pays producteurs de riz importants comme Madagascar, l'Égypte, le Nigéria, la Côte d'Ivoire et la Guinée pour le continent africain, le Bangladesh, l'Inde, l'Indonésie, l'Iran et la

Thaïlande pour le continent Asiatique, et l'Espagne pour le continent Européen. Pour faire le lien avec les études précédentes, nous souhaitons également ajouter des isolats d'Iran, du Bangladesh, des Philippines et du Japon. Des isolats d'Iran nous ont été envoyés récemment par des collaborateurs. Grâce à un échantillon conséquent, il sera possible de mieux caractériser la structure et la diversité génétique de *B. oryzae* à l'échelle du monde et de faire des hypothèses sur le centre de diversité et l'histoire d'une des principales espèces responsables de l'helminthosporiose du riz.

Article 5 : Genetic diversity and structure of *Bipolaris oryzae* and *Exserohilum rostratum* populations causing Brown spot of rice in Burkina Faso based on genotyping-by-sequencing

Kouka Hilaire Kaboré^{1,2,3}, **Abalo Itolou Kassankogno**⁴, **Henri Adreit**^{2,3}, **Joëlle Milazzo**^{2,3}, **Sonia Guillou**^{2,3}, **Laurence Blondin**^{2,3}, **Laurie Chopin**^{2,3}, **Sebastien Ravel**^{2,3}, **Florian Charriat**^{2,3}, **Mariam Barro**^{2,3}, **Charlotte Tollenaere**^{2,3}, **Marc-Henri Lebrun**¹, **Didier Tharreau**^{2,3}

¹ UMR BIOGER, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon, France

² CIRAD, UMR PHIM, 34398 Montpellier, France

³ PHIM, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

⁴ CNRST/INERA, Laboratoire de Phytopathologie, LMI PathoBios, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Abstract

In recent years, Brown spot disease of rice (BSR) has been encountered on leaves and seeds of rice in all rice-growing areas of Burkina Faso. *Bipolaris oryzae* and *Exserohilum rostratum* are the main fungal species isolated from BSR symptoms and were frequently observed in the same field. However, we neither have information on the genetic diversity and population structure, nor on the mode of reproduction of these species in rice fields in Burkina Faso. Isolates of *B. oryzae* (n=61) and *E. rostratum* (n=151) were characterized by genotyping-by-sequencing. The genetic differentiation of *B. oryzae* and *E. rostratum* populations from different rice-growing areas was greater within populations than between populations. For both species, four genetic clusters were identified without a priori by two independent clustering methods (DAPC and sNMF). The distribution of these genetic groups was independent of the geographical origin of the isolates. Evidence of recombination

was identified in the populations of *B. oryzae* and *E. rostratum*. Balanced mating type ratios were consistent with sexual reproduction for *B. oryzae*. Over representation of Mat2 isolates in *E. rostratum* populations is not consistent with sexual reproduction of a heterothallic species. The use of GBS technique for the first time on causal agents of BSR was successful. It is also the first time that population genetics of *E. rostratum* is carried out. This study provides a basis for the orientation of future studies on the biology and genetics of *B. oryzae* and *E. rostratum* in Burkina Faso.

Keywords: *Recombination, Reproduction, rice fields*

Introduction

Rice is an important food in Africa, especially in sub-Saharan Africa (SSA) where its demand is higher than anywhere else in the world (Nwanze et al., 2006; Balasubramanian et al., 2007). It is the second most important source of calories after corn in SSA (Nigatu et al., 2017). However, in this part of the continent, rice cropping is characterized by low average yields of 1.4 t/ha, compared to over 4 t/ha in Asia (Nwanze et al., 2006). Local production cannot meet the region's needs for rice, leading to significant imports. Drought, iron toxicity, salinity, weeds, rodents, birds and diseases are the major constraints significantly reducing rice production in SSA (Diagne et al., 2013; van Oort, 2018).

Among diseases causing yield losses, Brown spot of rice (BSR) is becoming a threat in SSA. The disease is expanding, and is currently estimated to be responsible for the loss of 3.3% of the regional rice production (Savary et al., 2019). BSR occurs as brown spots on coleoptiles, leaf blades, sheaths, stems, glumes and seeds (Ou, 1985; Sunder et al., 2014). The disease is favored by mineral deficiencies in the soil, especially nitrogen, high temperatures and lack of water (Zadoks, 1974; Ou, 1985; Savary et al., 2000, 2005).

In Burkina Faso, the importance of BSR in the nursery as well as in the field was already highlighted in 1962 (Davet, 1962). An outbreak of BSR was recorded in 1994 in the most important rice-growing plain of the country (Sourou) and, since then, the

disease spread to several rice-growing areas (Ouédraogo, 2008). A recent study has shown that 80% of rice fields in western Burkina Faso show BSR symptoms (Barro et al., 2021). Furthermore, rice grains produced in Burkina Faso are infected at rates of up to 76% (Ouédraogo et al., 2016). Under natural disease pressure, grain yield losses can reach 16% (Ouédraogo, 2008).

Several fungal species of the *Bipolaris* genus and *Exserohilum rostratum* (syn. *Setosphaera rostrata*) are responsible for BSR. In Burkina Faso, *Bipolaris oryzae* (syn. *Cochliobolus miyabeanus*) and *E. rostratum*, are the two species most frequently isolated from BSR symptoms (HK Kaboré, CIRAD, Montpellier, France, personal communication). These species are found in the same rice fields or in the same seed lots (Ouédraogo et al., 2016; HK Kaboré, CIRAD, Montpellier, France, personal communication). *Bipolaris oryzae* and *E. rostratum* are heterothallic fungi, that is, their sexual reproduction requires strains of opposite mating types (MAT1-1 and MAT1-2; Ueyama & Tsuda, 1976). *B. oryzae* isolates from Burkina Faso show significant morphological and pathological variability (Ouédraogo et al., 2004; Dembélé, 2014; Boka et al., 2018). Investigations based on mitochondrial DNA RFLP markers revealed the division of *B. oryzae* isolates into 2 haplotypes (Ouédraogo et al., 2004). But, there is a lack of information on the genetic structure and diversity, as well as the mode of reproduction in the rice fields of Burkina Faso of *B. oryzae* and *E. rostratum*.

Most studies on *B. oryzae* have reported a high level of genetic and genotypic diversity and low population structure (Castell-Miller & Samac, 2012; Archana et al., 2014a; Ahmadpour et al., 2018). Sexual reproduction was suspected based on frequencies of mating types but recombination was not confirmed by analyses of linkage disequilibrium (Castell-Miller & Samac, 2012; Ahmadpour et al., 2018). Populations of *E. rostratum* were not studied yet.

Knowledge of the diversity and genetic structure of the populations, and the mode of reproduction is necessary for the development of resistant cultivars against BSR (Castell-Miller & Samac, 2012; Barnwal et al., 2013). The objectives of this study were to: (i) assess the genetic diversity, (ii) describe the genetic structure, and (iii)

determine the mode of reproduction of *B. oryzae* and *E. rostratum* populations from various rice-growing of Burkina Faso.

Materials and methods

Sample collection and isolation of strains

Leaves and seeds of cultivated rice (*Oryza sativa*) showing symptoms of BSR were collected between 2018 and 2020 in different rice fields in Bagré, Bama, Banzon, Karfiguéla, Sourou and Tengréla (Figure 1). These sites represent the main rice-growing areas of Burkina Faso. Diseased leaves and grains were arranged in Petri dishes containing a double layer of moistened blotting paper (Mathur & Kongsdal, 2003). Incubation was carried out at 25°C for 7 days under alternating 12 h of white light and 12 h of darkness. Using a flame-stretched Pasteur pipette, fungal conidia formed in the lesions were collected and spread on bacto-agar medium. After incubation for 24 h (25 °C, 12 h white light and 12 h darkness), a single germinating conidium was transferred with a sterile scalpel onto potato dextrose agar medium (PDA, 39 g/L) and incubated under the same conditions for 7 days.

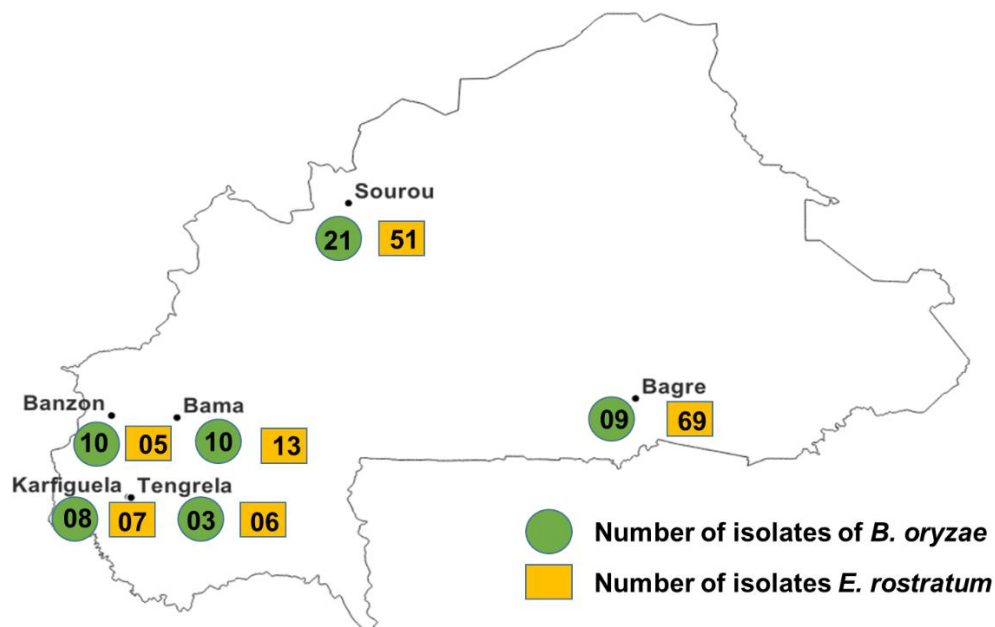


Figure 1: Schematic location of collection sites for infected rice samples

The number of isolates of *B. oryzae* and of *E. rostratum* isolated is shown in green and in orange, respectively. Names in bold refer to the localities where samples were collected.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fresh mycelium with modifications to the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method described by Doyle and Doyle (1987). A 5-day-old fragment of mycelium was transferred onto Corn Meat Agar (CMA, 18 g/L) medium previously covered with a sterile cellophane disc. The plates were incubated at 25 °C (12 h photoperiod) for 7 days, the mycelium was scraped off with a scalpel and approximately 30 mg of the mycelium was transferred to a 1.5 mL tube containing sterile sand and 2 beads. These tubes were placed directly into liquid nitrogen and the mycelium was cold ground using a Retsch mill (Retsch MM 301) for 4 min at 15 Hz. After grinding, each tube received 1 mL of CTAB lysis buffer with 1% polyvinyl pyrrolidone (MW. 360 000), 1% Na₂SO₃, 0.2 mg/mL RNAase and 1 mg/mL proteinase K. The tubes were vortexed (Vortex-Genie 2) and incubated in the oven at 65°C for 2 h. The tubes were then centrifuged for 3 min at 8000 rpm and approximately 900 µL of the supernatant was transferred to a new 2 mL tube. One mL of chloroform isoamilalcohol (CIAA, 24/1 v/v) was placed in each tube and mixed by inversion before being centrifuged at 10000 rpm for 10 min. After centrifugation, 700 µL of the supernatant was transferred to 1.5 mL tubes. Six hundred µL of isopropanol cooled to -20 °C and 210 µL of 5M NaCl were added and mixed by inversion. The tubes were kept at -20 °C overnight. They were then centrifuged at 4 °C for 30 min at 13000 rpm and the supernatant was removed by inverting the tubes. Five hundred µL of 70° ethanol was added to each tube and centrifuged at 4 °C for 5 min at 13000 rpm. Ethanol was removed by inverting the tubes and draining on absorbent paper. The tubes were dried for 1 h in the fume cupboard. DNA was re-suspended in 100 µL of sterile milliQ water. The quality and quantity of the extracted DNA was assessed with electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels and spectrophotometry (Nanodrop™ 2000).

Preparation of genotyping-by-sequencing libraries

The preparation of GBS libraries was carried out in collaboration with the genotyping platform of the UMR AGAP/CIRAD according to the method described by Elshire et al. (2011). Genomic DNA of the strains were normalized to a concentration of 10 ng/ μ l and digested with the restriction enzyme ApeKI (5 U) at 75 °C for 2 h. The restriction digestion of DNA was followed by ligation with adapters. The adapters included different barcode-containing adapters for tagging individual samples and common adapters. The ligation was performed using T4 DNA ligase at 22 °C for 30 min and the ligase was inactivated by holding at 65 °C for 10 min. Two pools of 246 strains were created. To assess the reproducibility of GBS, each pool contained 6 randomly selected and duplicated isolates. They were purified with the QIAquick purification kit from QIAGEN. The library was enriched by PCR to 50 μ L of reaction solution including 25 μ l of 2X Taq Master mix NEB, 19 μ l of water, 2 μ L of DNA and 2 μ l each of the forward and reverse primers (10 μ M). Amplification was done according to the following program: 98 °C for 30 s, followed by 18 cycles of 98 °C for 10 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, ending at 72 °C for 5 min. PCR products were purified with QIAGEN's QIAquick Purification Kit before being evaluated with BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies) for fragment size distribution. The GBS libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 4000 producing 150 bp paired-end reads.

Sequence preprocessing and SNP identification

The bioinformatics tool RattleSNP (<https://github.com/sravel/RattleSNP>) was used to process the data. The workflow performs demultiplexing, sequence mapping to the reference genome and variant calling. The sequences of *B. oryzae* isolates were mapped onto the genome of strain ATCC 44560 (Condon et al., 2013), and those of *E. rostratum* onto the genome of BF9006 sequenced by CIRAD. Prior to variant calling, strains with a mapping rate of less than 75% to the reference genome, a library size

of less than 100,000 reads and a sequencing depth of less than 3 x were considered low quality data and excluded from the dataset. SNPs from strains meeting the criteria (61 isolates for *B. oryzae* and 151 isolates of *E. rostratum*) were filtered for missing rate (--max-missing 0.70), minor allele frequency (--maf 0.05), depth (--minDP 2) and site quality (--minQ 30) using VCFtools version 01.16 (Danecek et al., 2011)

Population structure and differentiation

Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) (Jombart et al., 2010) and sNMF (Frichot et al., 2014) analysis were used to investigate the population structure. DAPC was carried out with the adegenet package of the R software. First, the find.clusters function was used to detect the number of clusters in the population (Jombart, 2008; Jombart et al., 2010). The function uses K-means clustering which decomposes the total variance of a variable into two components: inter-group and intra-group. This model maximizes the inter-group variation (Jombart et al., 2010).

sNMF of the LEA R software package was used to estimate the number of discrete genetic clusters (K) and admixture coefficients (Frichot et al., 2014). The optimal number of sNMF clusters was defined as the one corresponding to the lowest cross-entropy value.

To further characterize the genetic structure of the population described by the DAPC and sNMF analyses, a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) were performed with the poppr package of R (Kamvar et al., 2014). Pairwise genetic differentiation (F_{ST}) was calculated using the 'genet.dist' function in the hierfstat package of R (Goudet, 2005), following the method described by Weir & Cockerham (1984). RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) version 8.2.12 was used to assess phylogenetic relationships between isolates using the maximum likelihood method (Stamatakis, 2014).

Genetic and genotypic diversity analyses

Analysis of genotypic diversity and association indices of mixed or clonal populations is recommended before and after clone correction (Milgroom, 1996; Grünwald & Hoheisel, 2006; Kamvar et al., 2014). To identify clones, the dissimilarity rate between duplicates of the same isolate was calculated using the "bitwise.dis" function of the R poppr software (Kamvar et al., 2014). For a given species, the maximum dissimilarity between duplicates was measured and used as a threshold to define clones. Two isolates with a dissimilarity rate lower than the threshold were considered as clones.

To determine genotypic diversity, the poppr package of R (Kamvar et al., 2014), was used to calculate the number of multilocus genotype (MLG), Shannon-Wiener index (H) (Shannon, 1948), Stoddart and Taylor's index (G) (Stoddart & Taylor, 1988), Simpson's complement index of genotypic diversity index (λ) corrected for sample size (Simpson, 1949; Grünwald et al., 2003) and evenness (E5) (Pielou, 1975; Ludwig & Reynolds, 1988; Grünwald et al., 2003). To adjust for the population size, the raw value of the Simpson's complement index of genotypic diversity index was multiplied by $N/(N-1)$ with N being the number of isolates in the population (Grünwald et al., 2003).

To assess gene diversity, unbiased Nei genetic diversity (H_{exp}) was calculated (Nei, 1978). Nucleotide diversity (π) values were calculated with VCFtools across the genome with 10 kb windows (Danecek et al., 2011).

Linkage disequilibrium and recombination

Detection of recombination was carried out by calculating linkage disequilibrium (LD) and PHI test from genotyping data. Pairwise LD between loci was calculated based on allelic frequency correlations (r^2) over a 10 kb window using the PopLDdecay program (Zhang et al., 2019).

A FASTA file was used to generate a NeighborNet in SPLITSTREE4 and the PHI recombination test was performed to test the null hypothesis of clonality (Huson & Bryant, 2006).

Mating type characterization and *in vitro* sexual reproduction

Identification of mating types was done by amplification of MAT1-1 and MAT1-2 genes with primers specific to *B. oryzae* (Ahmadpour et al. 2018) and *E. rostratum* (Kusai et al. 2016). Each PCR reaction had a final volume of 25 μ L, containing 1 μ L of template genomic DNA (20 ng/ μ L), 1 μ L forward primer, 1 μ L reverse primer, 5 μ L de tampon phosphate 5x, 0.25 μ L Taq polymerase and 14.75 μ L sterile water. For the amplifications of *E. rostratum* MAT genes, the amount of water was 13.75 μ L and 1 μ L MgCl 5X was added. PCR cycling was performed as follows: 94 °C for 2 min; followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 52 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; plus a final extension at 72 °C for 7 min for *B. oryzae*. For *E. rostratum* initial denaturation at 95 °C for 2 min; followed by 35 cycles of denaturation at 95 C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1 min; and final extension at 72 °C for 5 min. The null hypothesis of a 1:1 ratio between mating types was tested using the chi-square goodness-of-fit.

The sexual fertility of *B. oryzae* and *E. rostratum* isolates was tested *in vitro* according to the protocol described by Tsuda & Ueyama (1976). A dry, autoclaved rice leaf of about 4 cm was placed in the center of a petri dish on Sach's culture medium. Pieces of mycelium from the pre-determined strains MAT1-1 and MAT1-2 were placed on either side of the rice leaf. The dishes were sealed with tape to prevent dehydration of the medium and then placed in an oven at 24°C for 30 days.

Results

SNPs identified

After alignment to the *B. oryzae* ATCC 44560 reference genome composed of 619 scaffolds and filtering, 28907 SNPs were identified in the *B. oryzae* samples (61 isolates). *Exserohilum rostratum* isolates (151 isolates) aligned to the BF9006 isolate reference genome (377 scaffolds) yielded 102464 SNPs.

Genetic structure of *B. oryzae* and *E. rostratum* populations

To understand the population structure of the 61 *B. oryzae* isolates and the 151 *E. rostratum* isolates of Burkina Faso, clustering by DAPC and inference of ancestry (with sNMF) analyses were performed. For *B. oryzae* populations, the bayesian information criterion (BIC) of DAPC suggested the best clustering for $K = 4$ (supplementary 1, Figure 2A). Similarly, the cross entropy of the sNMF analysis indicated an optimum of 4 clusters (supplementary 2, Figure 3A). The phylogenetic tree made with RaxML was also supporting 4 genetic groups (Figure 4A). Cluster 1 was found in all collection areas (Table 1, Figure 5). While cluster 4 was only encountered in Karfiguela and Tengrela. The sNMF analysis shows a significant admixture in all 4 clusters but particularly between cluster 1 and 2 (Figure 3A). The F_{ST} values between the *B. oryzae* isolates from the different rice-growing areas in Burkina Faso showed little differentiation between sites, ranging from 0 to 0.20 (Table 2) and with an average value of 0.08. The AMOVA analysis revealed that the variability was 88.8% within localities and 11.2% between the six rice-growing zones (Table 3).

For *E. rostratum* isolates, the bayesian information criterion (BIC) of DAPC suggested the best clustering for $K = 4$ (Supplementary 3, Figure 2B). Similarly, the cross entropy of the sNMF analysis indicated an optimum of 4 clusters (Supplementary 4; Figure 3B). The phylogenetic tree also supported 4 genetic groups (Figure 4B). Again, clustering of isolates was identical between methods.

Clusters 1 and 2 were found in all localities sampled. Cluster 3 was found in all localities (Figure 6) except Banzon, and cluster 4 was sampled in Bagré, Banzon, and

Sourou. Very low FST values ranging from 0 to 0.1 were observed between populations of different rice production zones in Burkina Faso (Table 3). The AMOVA analysis revealed that the variability was 95% within localities and 5% between the six rice-growing zones (Table 5).

Table 1: Distribution of *B. oryzae* and *E. rostratum* clusters obtained by DAPC analysis in 6 rice-growing areas of Burkina Faso

Localities	<i>Bipolaris oryzae</i> clusters				<i>Exserohilum rostratum</i> clusters			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Bagré	4	4	1	0	38	23	5	3
Bama	3	3	4	0	4	4	5	0
Banzon	8	2	0	0	2	2	0	1
Karfiguela	4	1	0	3	2	4	1	0
Sourou	7	3	11	0	10	24	14	3
Tengréla	1	0	0	2	2	3	1	0
Total	27	13	16	5	58	60	26	7

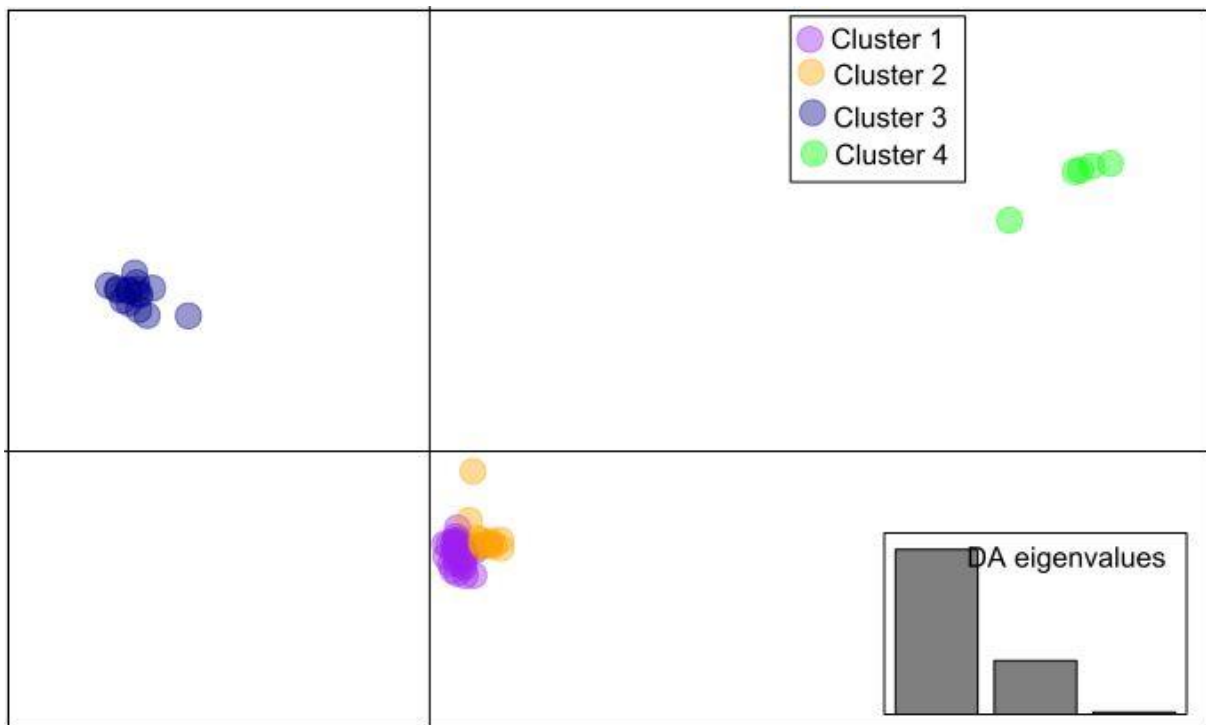
Table 2: Pairwise FST estimates between *Bipolaris oryzae* isolates from 6 rice-growing zones in Burkina Faso

	Bagré	Bama	Banzon	Karfiguela	Sourou
Bama	0.0296				
Banzon	0.0662	0.1127			
Karfiguela	0.1275	0.0996	0.1154		
Sourou	0.0641	0.0046	0.1322	0.0809	
Tengréla	0.1005	0.0438	0.2002	-0.0217	0.0601

Table 3: Pairwise FST estimates between *Exserohilum rostratum* isolates from 6 rice-growing zones in Burkina Faso

	Bagre	Bama	Banzon	Karfiguela	Sourou
Bama	0.1288				
Banzon	-0.0209	0.0107			
Karfiguela	-0.0230	-0.0005	-0.0858		
Sourou	0.0680	-0.0183	-0.0203	-0.0189	
Tengrela	-0.0066	-0.0341	-0.0847	-0.0992	-0.0387

A)



B)

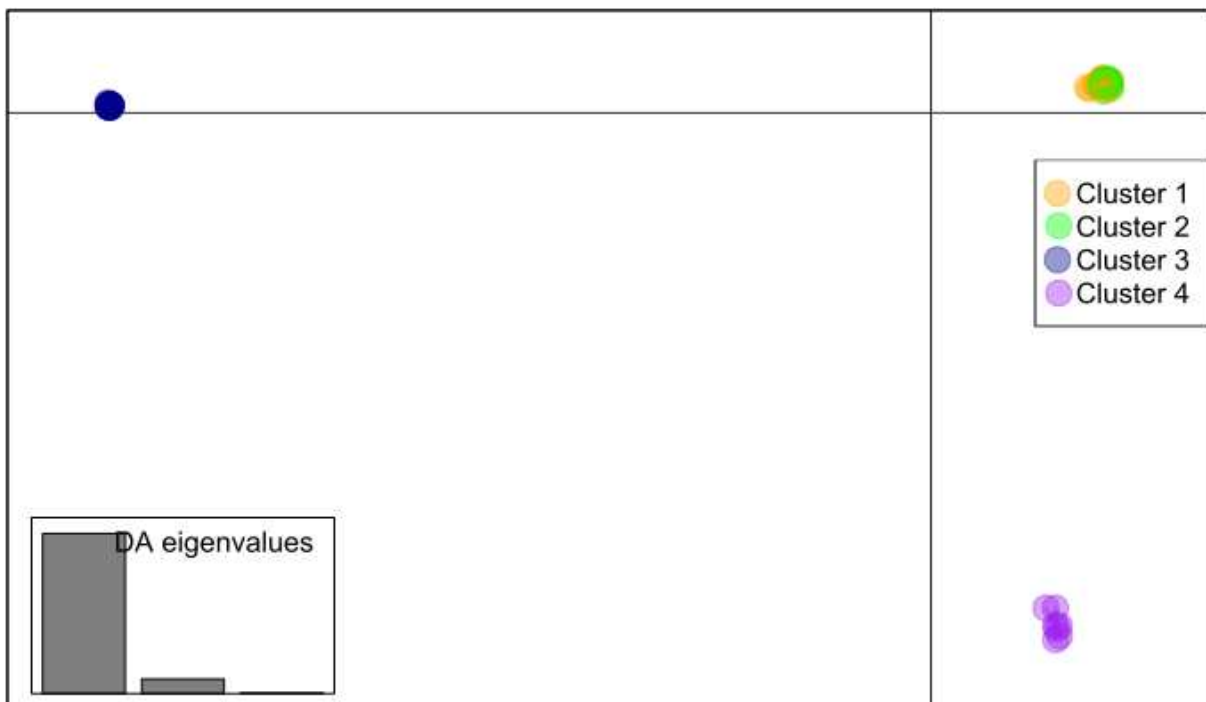
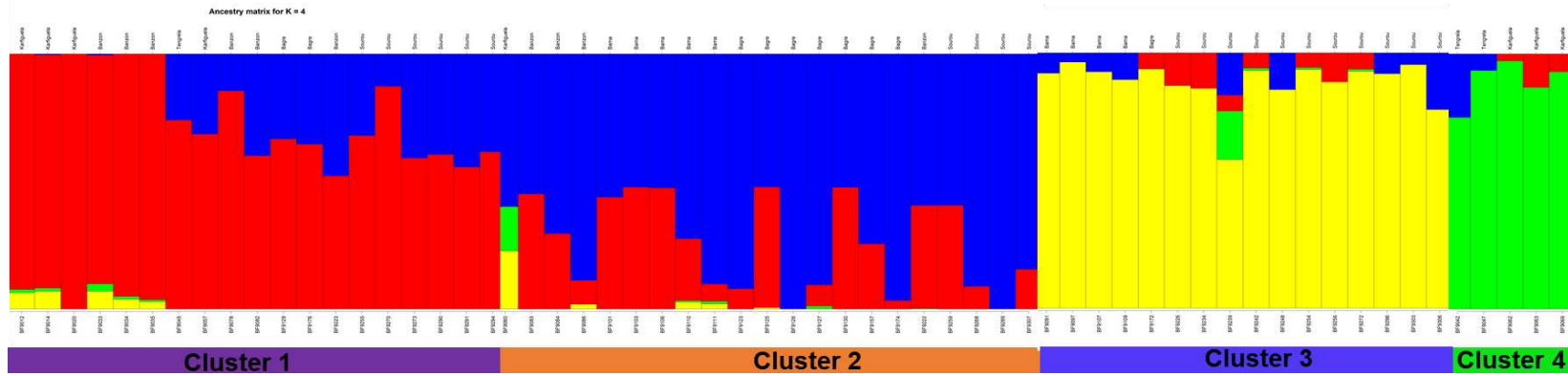


Figure 2: Population structure analysis of *B. oryzae* (panel A) and *E. rostratum* (panel B) using DAPC and K=4.

A)



B)

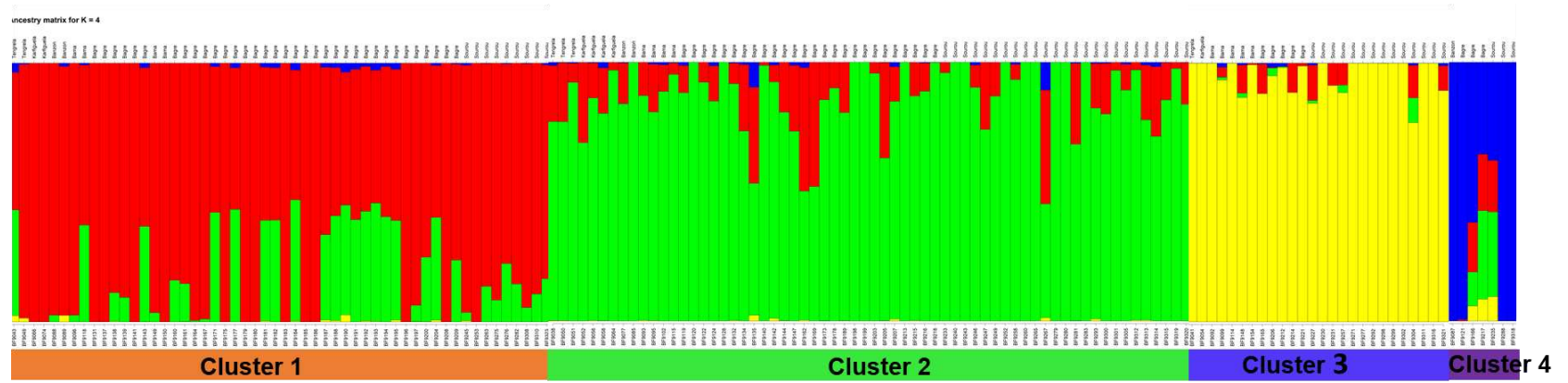


Figure 3: Population structure analysis of *B. oryzae* and *E. rostratum*. Ancestry coefficient for each isolate calculated by using sNMF with K=4. A) *B. oryzae*., B) *E. rostratum*.

B)

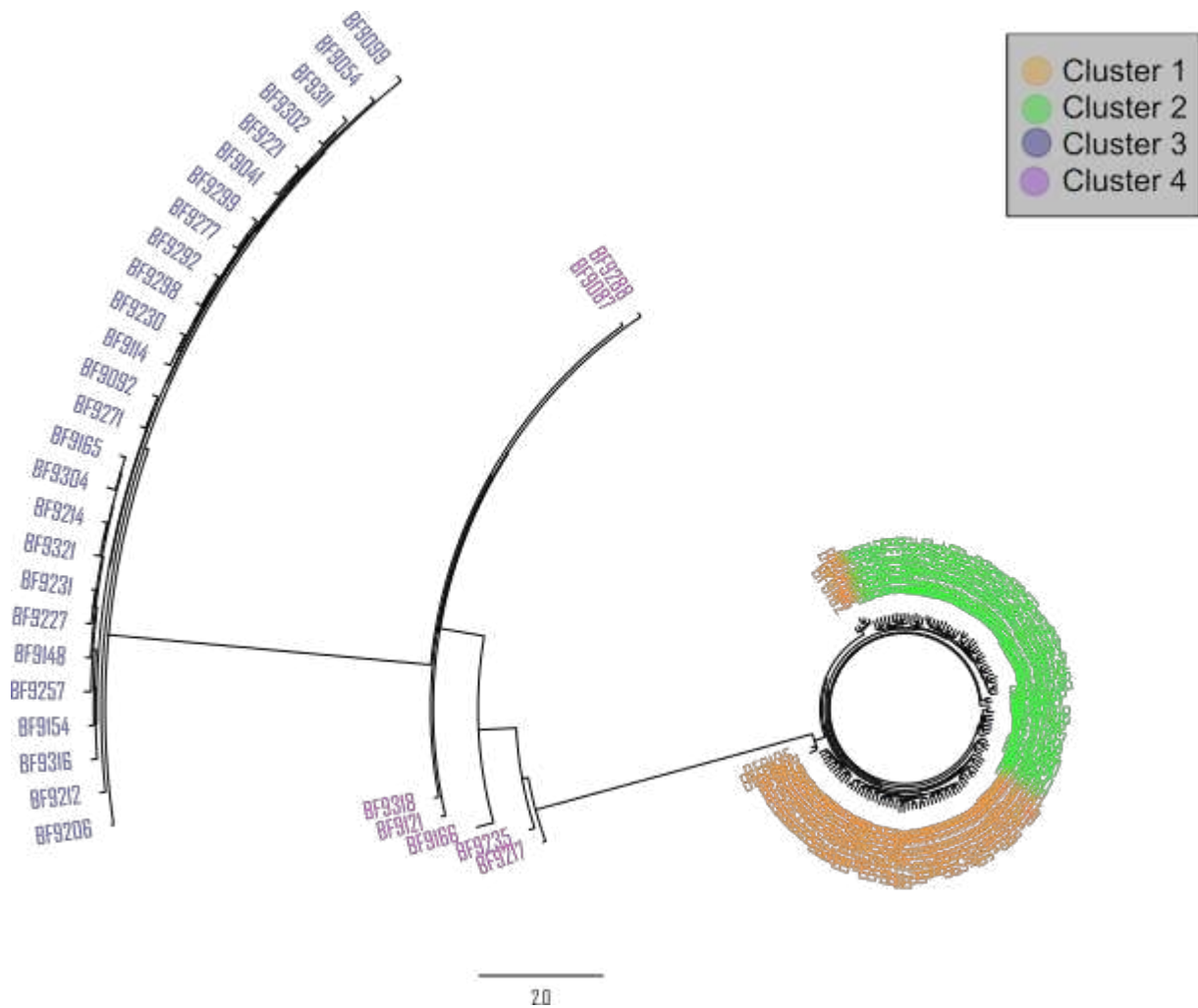


Figure 4: Phylogenetic tree of *B. oryzae* and *E. rostratum* populations made by RaxML from a maximum likelihood analysis.

Groups were determined by clustering analysis (DAPC method). A) Phylogenetic tree showing the 4 groups of *B. oryzae*; B) Phylogenetic tree showing the 4 groups of *E. rostratum*

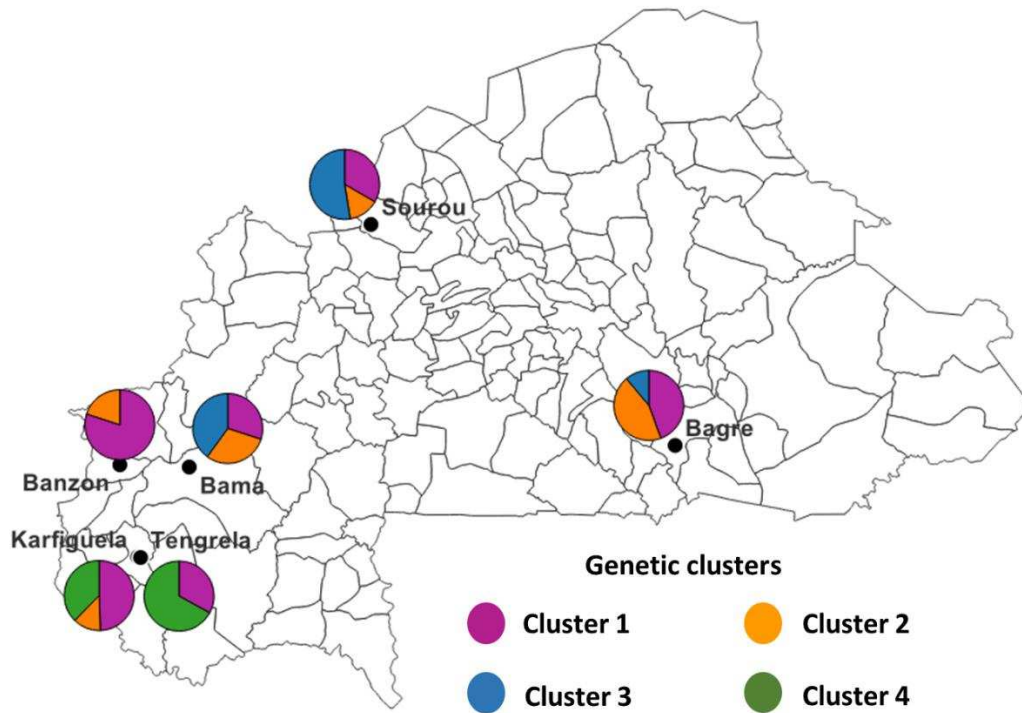


Figure 5: Geographic distribution of the four genetic clusters of *B. oryzae* in Burkina Faso

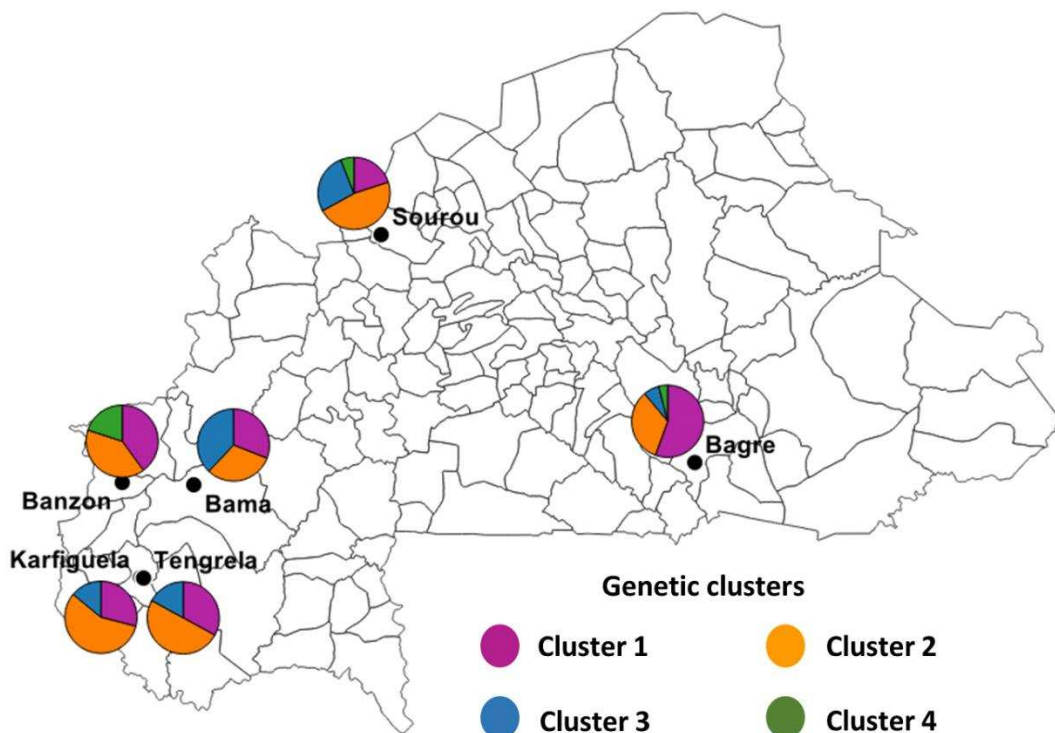


Figure 6: Geographic distribution of the four genetic clusters of *E. rostratum* in Burkina Faso

Table 4: Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Bipolaris oryzae* between and within 6 rice-growing zones in Burkina Faso

		df	Sum Sq	Mean Sq	Sigma	%	P value
Localities							
	Variation among localitie	5	28872.83	5774.57	329.85	11.2	0.0005
	Variation within localitie	55	143560.41	2610.19	2610.19	88.8	
	Total	60	172433.24	2873.89	2940.04	100	
Genetic clusters							
	Variation among cluster	3	72923.27	24277.94	1562.25	48.21	0.0001
	Variation within cluster	57	99509.97	1747.36	1745.79	51.8	
	Total	60	172433.24	2873.89	3370.4	100	

Sq: Sum of squares; %: Percentage of variation

Table 5: Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Exserohilum rostratum* between and within 6 rice-growing zones in Burkina Faso

		df	Sum Sq	Mean Sq	Sigma	%	P value
Localities							
	Variation among localitie	5	125163.9	25032.77	631.85	4.9	0.02
	Variation within localitie	145	1790106.1	12345.56	12345.56	95.1	
	Total	150	1915270	12768.47	12977.41	100	
Genetic clusters							
	Variation among cluster	3	1328106.2	442702.07	13150.78	76.7	0.0001
	Variation within cluster	147	587163.8	3994.31	3994.31	23.3	
	Total	150	1915270	12768.47	17145.09		

Sq: Sum of squares; %: Percentage of variation

Genotypic and genetic diversity

The genetic distance between replicates of *B. oryzae* isolates varied from 0.0353 to 0.087. Those of *E. rostratum* varied between 0.0149 and 0.0328. So, *B. oryzae* and *E. rostratum* isolates were considered as clones if their dissimilarity rates were less than or equal to 0.087 and 0.0328 respectively. Based on this criterion, 8 and 11 isolates of *B. oryzae* and *E. rostratum* respectively were considered as clones of one or more isolates, representing 13% (8/61) and 7% (11/151) of the isolates in each sample.

Genotypic and gene diversity indexes are presented in Table 6. For *B. oryzae*, the genotypic diversity (H) between isolates from different rice-growing areas ranged from 1.1 to 3.04 with an average value of 1.8, while the G-index varied from 3 to 21 with an average of 10. These indices are influenced by population size and do not allow comparison between different localities. The Simpson index corrected for sample size ranged from 0.999 to 1 (mean value 0.999) indicating high genotypic diversity within each population. The regularity index (E.5) was equal to 1 for all populations.

In terms of genetic diversity, Nei's unbiased gene diversity values ranged from 0.172 to 0.300 with a mean of 0.238. The Bazon population showed the lowest value of Nei's unbiased gene diversity (0.172), while the other populations showed values roughly equal to the mean value of the whole. For nucleotide diversity, values ranged from 1.3×10^{-4} to 2.4×10^{-4} with an average of 1.9×10^{-4} . The Bazon population also showed the lowest value of nucleotide diversity (1.3×10^{-4}). The Sourou population showed the highest diversity (2.4×10^{-4}). It was followed by the populations of Bama, Tengréla, Bagré and Karfiguela.

For *E. rostratum*, the genotypic diversity (H) between isolates from different rice-growing areas ranged from 1.61 to 4.23 with an average value of 2.7, while the G-index varied from 5 to 69 with an average of 25.2. The Simpson index corrected for sample size ranged from 0.999 to 1 (mean value 0.999) indicating high genotypic diversity within each population. The regularity index (E.5) was equal to 1 for all populations. The indices of unbiased Nei genetic diversity ranged from 0.250 to 0.355

with an average of 0.300. The values of nucleotide diversity varied between 5.7×10^{-4} and 9.8×10^{-4} . The average value was 7.5×10^{-4} . The isolates from Bama showed the highest value of nucleotide diversity (9.8×10^{-4}), while the lowest value was observed in Bagré (5.7×10^{-4}).

For both species, the values of the genotypic indices (H and G) calculated after the removal of the clones were lower, while the values of the genetic diversity indices (H_{exp} and π) have remained the same or have slightly increased (Table 7).

Table 6: Genotypic and gene diversity indices of *B. oryzae* and *E. rostratum* isolates from 6 rice-growing areas of Burkina Faso

	<i>B. oryzae</i> population							<i>E. rostratum</i> population						
	N	H	G	Lambda	E.5	Hexp	π	N	H	G	lambda	E.5	Hexp	π
Localities														
Bagre	9	2.20	9	1	1	0.235	1.9×10^{-4}	69	4.23	69	0.999	1	0.250	5.7×10^{-4}
Bama	10	2.30	10	0.999	1	0.285	2.2×10^{-4}	13	2.56	13	1	1	0.355	9.8×10^{-4}
Bazon	10	2.30	10	0.999	1	0.172	1.3×10^{-4}	5	1.61	5	1	1	0.237	6×10^{-4}
Karfiguela	8	2.08	8	0.999	1	0.198	1.7×10^{-4}	7	1.95	7	0.999	1	0.276	7.2×10^{-4}
Sourou	21	3.04	21	0.999	1	0.3	2.4×10^{-4}	51	3.93	51	0.999	1	0.346	9×10^{-4}
Tengrela	3	1.10	3	1	1	NA	2×10^{-4}	6	1.79	6	0.999	1	NA	7.2×10^{-4}
Genetic clusters														
Cluster 1	27	3.30	27	1	1	0.213	1.5×10^{-4}	58	4.0604	58	0.999	1	0.136	3.5×10^{-4}
Cluster 2	13	2.56	13	0.999	1	0.166	1.3×10^{-4}	60	4.0943	60	0.999	1	0.132	3.5×10^{-4}
Cluster 3	16	2.77	16	1	1	0.212	1.7×10^{-4}	26	3.2581	26	0.999	1	0.079	2.4×10^{-4}
Cluster 4	5	1.61	5	1	1	0.179	1.4×10^{-4}	7	1.9459	7	0.999	1	0.127	2.9×10^{-4}

N: Number of isolates; H: Shannon-Wiener Index; G: Stoddart and Taylor's Index ($G = 1/\{\sum [(fx)(x/n)^2]\}$), where n is the sample size, and fx is the number of genotypes observed x times.; Lambda: Simpson's Index ; E.5: Evenness ($(1/\lambda) - 1/e^H - 1$), ; Hexp ($((n/(n - 1)) * (1 - \sum(p^2)))$), p is the allele frequencies at a given locus and n is the number of observed alleles in each locus and then returning the average: Nei's unbiased gene diversity; π : nucleotide diversity, NA: Not calculated due to sample size

Table 7: Genotypic and gene diversity indices of *B. oryzae* and *E. rostratum* isolates from 6 rice-growing areas of Burkina Faso (after clone correction)

	<i>B. oryzae</i> population							<i>E. rostratum</i> population						
	N	H	G	Lambda	E.5	Hexp	π	N	H	G	lambda	E.5	Hexp	π
Localities														
Bagre	8	2.08	8	0.978	1	0.292	1.9×10^{-4}	63	4.14	63	0.999	1	0.209	5.3×10^{-4}
Bama	9	2.2	9	1	1	0.329	2.2×10^{-4}	13	2.56	13	0.999	1	0.363	9.4×10^{-4}
Banzon	7	2	7	0.999	1	0.151	1×10^{-4}	4	1.38	4	0.999	1	0.132	3×10^{-4}
Karfiguela	7	2	7	0.999	1	0.238	1.5×10^{-4}	7	1.94	7	0.999	1	0.282	7.1×10^{-4}
Sourou	20	3	20	0.995	1	0.353	2.4×10^{-4}	49	3.89	49	0.999	1	0.349	8.8×10^{-4}
Tengrela	2	0.7	2	1	1	NA	NA	4	1.38	4	0.999	1	NA	NA
Genetic clusters														
Cluster 1	23	3.14	23	1	1	0.208	1.3×10^{-4}	54	3.99	54	0.999	1	0.277	3.4×10^{-4}
Cluster 2	11	2.40	11	1	1	0.205	1.3×10^{-4}	57	4.04	57	0.999	1	0.269	3.4×10^{-4}
Cluster 3	16	2.77	16	1	1	0.250	1.7×10^{-4}	26	3.26	26	0.999	1	0.159	1.9×10^{-4}
Cluster 4	3	1.10	3	1	1	NA	NA	3	1.09	3	0.999	1	NA	NA

N: Number of isolates; H: Shannon-Wiener Index; G: Stoddart and Taylor's Index ($G = 1/\{\sum [(f_x)(x/n)^2]\}$), where n is the sample size, and f_x is the number of genotypes observed x times.; Lambda: Simpson's Index ; E.5: Evenness ($(1/\lambda) - 1/e^H - 1$) ; Hexp ($((n/(n-1)) * (1 - \sum(p^2)))$), p is the allele frequencies at a given locus and n is the number of observed alleles in each locus and then returning the average: Nei's unbiased gene diversity; π : nucleotide diversity, NA: Not calculated due to sample size

Recombination, mating type distribution and in vitro sexual reproduction

In *B. oryzae*, Linkage Disequilibrium (LD) pattern showed a rapid decay to less than 1 kb in all populations (Figure 7) suggesting high rate of recombination. The PHI test performed on populations with sufficient number of isolates, rejected the hypothesis of clonality ($p = 0.0$). Finally, a reticulated NeighborNet was observed (Figure 8), also supporting the hypothesis of recombination in populations of *B. oryzae* from Burkina Faso. Within the *B. oryzae* isolates, the mating types MAT1-1 and MAT1-2 were observed in balanced proportions (Table 8).

In *E. rostratum*, LD showed rapid decay to less than 1 kb in all populations (Figure 7) and PHI tests rejected the hypothesis of clonality ($p = 0.0$), supporting the hypothesis of recombination. The dominance of only one mating type (MAT1.2) was observed and the null hypothesis of a 1:1 ratio was rejected by statistical analysis.

To test the sexual fertility of *B. oryzae* and *E. rostratum* isolates, for each species, crosses between opposite mating type isolates from the same rice field were made *in vitro*. Out of a total of 156 *in vitro* crosses for *B. oryzae*, 2 pairs of isolates (BF9259 et BF9268; BF9294 et BF9296) produced pseudothecia containing ascospores. Concerning *E. rostratum*, out of 364 crosses made, no pseudothecia were observed.

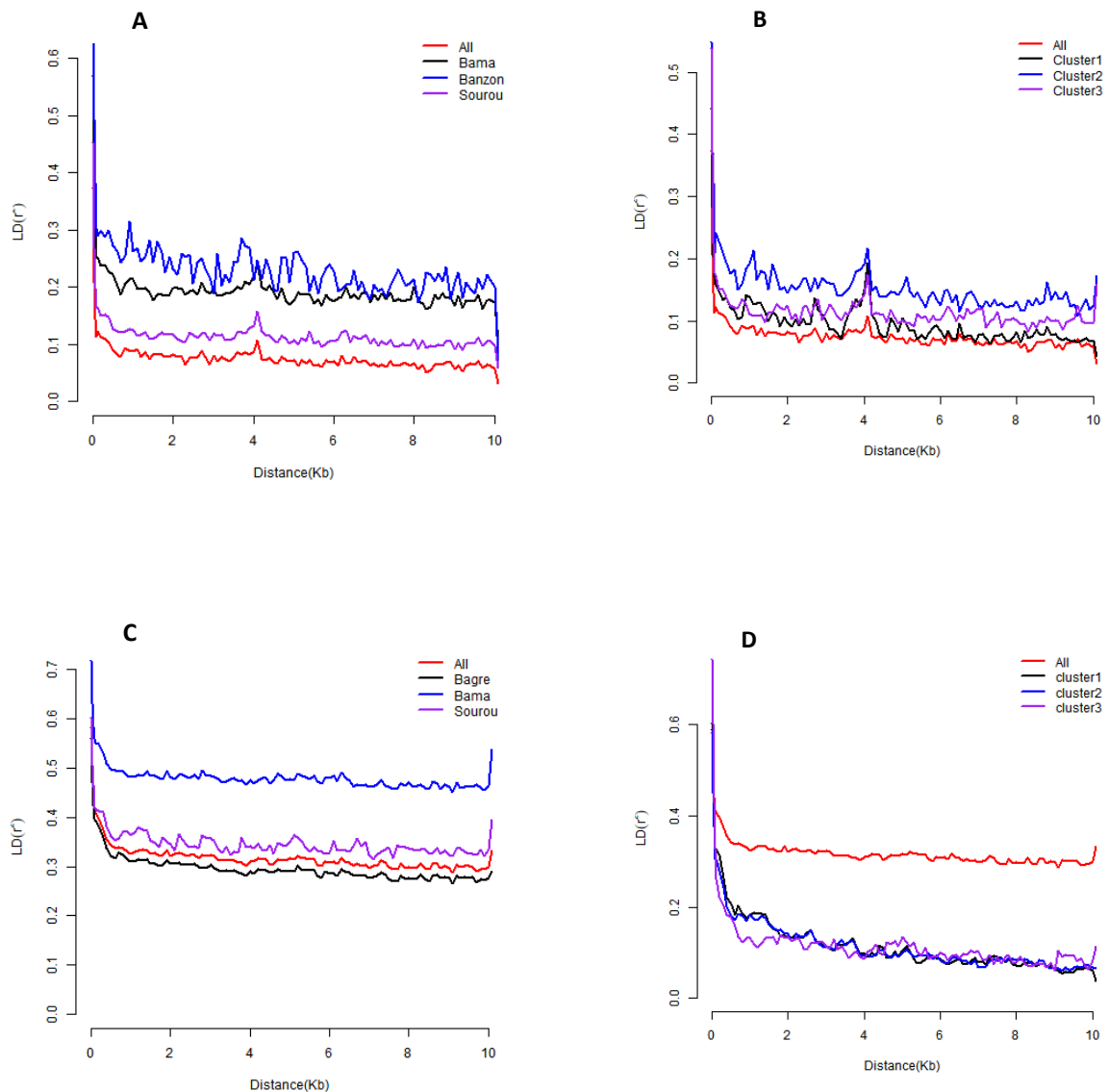


Figure 7: Estimated linkage disequilibrium decay (LD-decay) of *B. oryzae* and *E. rostratum* isolates

A) and B): respectively the LD of *B. oryzae* isolates per locality and per cluster. C) and D): respectively the LD of *E. rostratum* isolates per locality and per cluster.

Localities or clusters with less than 10 isolates were not presented individually (ie Bagré, Karfiguela and Tengrela for *B. oryzae* populations, and Banzon, Karfiguela and Tengrela for *E. rostratum* populations; cluster 4 for *B. oryzae* and *E. rostratum*).

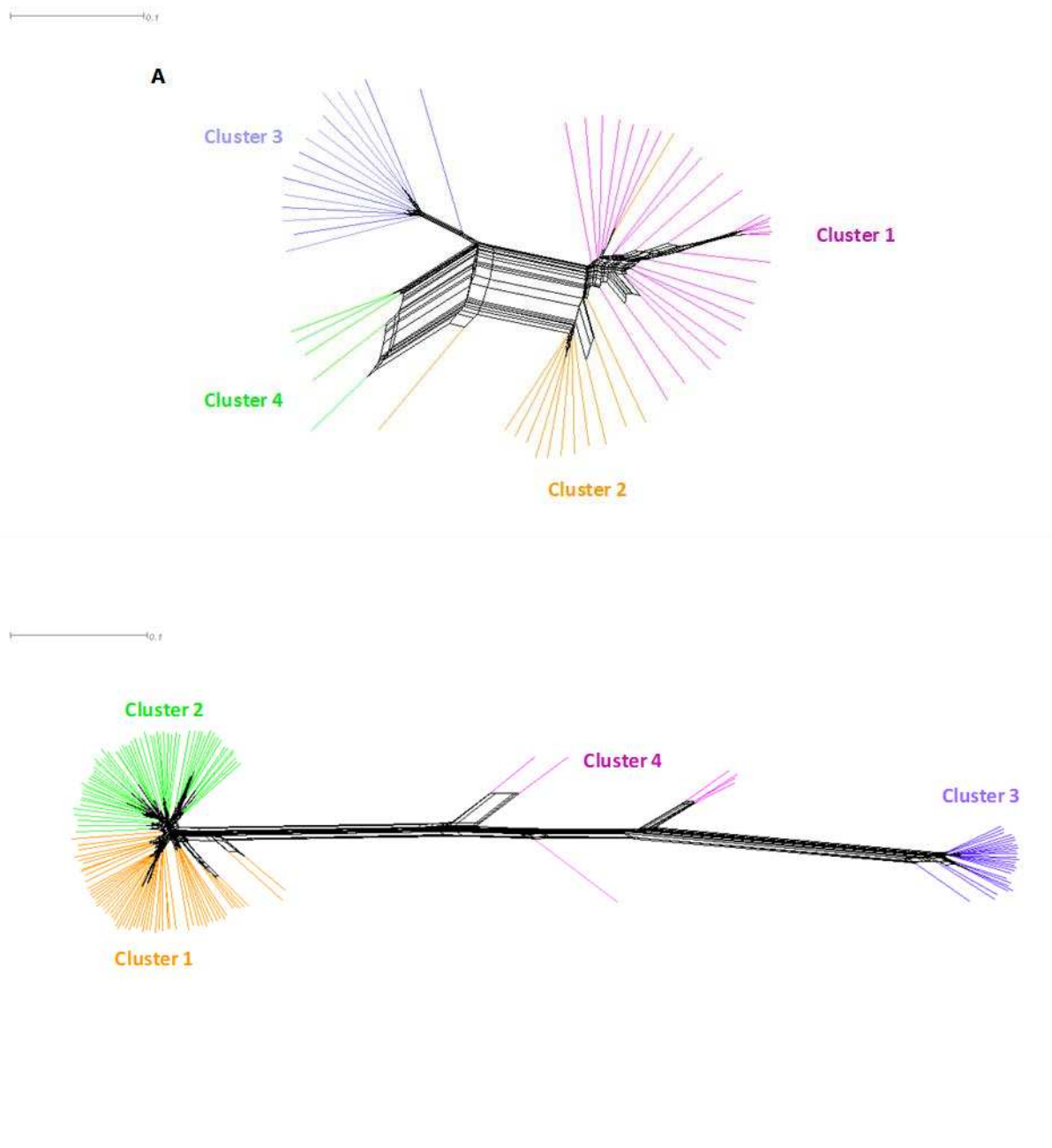


Figure 8: Neighbor-net phylogenetic network of *B. oryzae* and *E. rostratum* isolates from Burkina Faso estimated with SPLITSTREE

A: *Bipolaris oryzae*; B: *Exserohilum rostratum*. Each colour represents a genetic group previously defined by DAPC/sNMF

Table: 8 Distribution of mating types in *B. oryzae* and *E. rostratum* populations in the 6 rice growing areas

	<i>Bipolaris oryzae</i> population						<i>Exserohilum rostratum</i> population						
	N ^a	Phi test	MAT 1.1	MAT 1.2	No amplicon	p ^b	N ^a	Phi test	MAT 1.1	MAT 1.2	MAT1.1+ MAT1.2 ^c	No amplicon	p ^b
Localities													
Bagré	9	NA	4	5	0	NA	69	0.0	6	55	6	2	3.5 x10 ⁻¹⁰
Bama	10	0.0	7	3	0	0.206	13	0.0	0	12	1	0	5.3 x10 ⁻⁴
Banzon	9	0.0	4	5	0	NA	5	NA	0	5	0	0	NA
Karfiguela	3	NA	0	2	1	NA	7	NA	0	6	1	0	NA
Sourou	21	0.0	13	8	0	0.275	51	0.0	4	36	2	9	4.2 x10 ⁻⁷
Tengréla	2	NA	1	1	0	NA	6	NA	0	5	0	1	NA
Genetic clusters													
Cluster 1	22	0.0	11	11	0	1	58	0.0	4	46	7	1	2.8 x10 ⁻⁹
Cluster 2	13	0.0	7	5	1	0.564	60	0.0	3	56	1	0	5.2 x10 ⁻¹²
Cluster 3	16	0.0	11	5	0	0.134	26		2	13	1	10	4.5 x10 ⁻³
Cluster 4	3	NA	2	1	0	NA	7	NA	1	4	1	1	NA

a: Number of isolates from the same rice field whose mating type has been characterized by locality or genetic cluster ; b: Probability of chi-square value. For $p < 0.05$, the ratio of mating types deviates significantly from the null hypothesis 1:1 (ratio). C: number of isolates amplifying of both mating types. To discard the possibility of mixed isolates, a second monospore isolation of the isolates amplifying both mating types was performed. Results presented here are the amplification of the subclones. NA: Not calculated due to sample size.

Discussion

Brown spot of rice (BSR) is an emerging disease in Burkina Faso. Knowledge of the structure and genetic diversity of the fungal species predominantly responsible for the disease is an important information for disease management. This study is the first comprehensive study of the genetic diversity of *B. oryzae* isolated from rice in Burkina Faso and the first study of *E. rostratum* populations. It is also the first study using genotyping-by-sequencing based to characterize populations of *B. oryzae* and *E. rostratum*. The objectives were to: (i) assess the genetic diversity, (ii) describe the genetic structure, and (iii) determine the mode of reproduction of *B. oryzae* and *E. rostratum* populations from various rice-growing of Burkina Faso.

The analysis of *B. oryzae* and *E. rostratum* populations in 6 rice-growing areas of Burkina Faso (Bagré, Bama, Banzon, Karfiguela, Sourou and Tengrela) showed little genetic differentiation of populations between different rice-growing localities. The genetic structure was not related to geographical origin. The absence of genetic structure of *B. oryzae* within rice-growing countries was already observed in Bangladesh (Kamal & Mia, 2009), India (Archana et al., 2014a, 2014b), Iran (Nazari et al., 2015) and Thailand (Chaijuckam et al., 2019). In contrast to this situation, Burgos et al. (2013) established a relationship between the population structure and the geographical origin of isolates from different provinces in Philippines. It is possible that the migration of *B. oryzae* and *E. rostratum* isolates is carried out via seeds. In Burkina Faso there are significant exchanges of rice seed between producers. This is likely to favor dissemination of the pathogens and could account for the lack of correlation between genetic groups and geographic origin of isolates of *B. oryzae* and *E. rostratum*.

The genetic diversity of *B. oryzae* has been studied using several molecular tools in some countries (Kamal & Mia, 2009; Castell-Miller & Samac, 2012; Archana et al., 2014a, 2014b; Nazari et al., 2015; Ahmadpour et al., 2018, 2018; Chaijuckam et al., 2019). Most of them have shown significant genetic and genotypic diversity. *B.*

oryzae populations in the 6 rice-growing zones of Burkina Faso showed high genotypic diversity, equal frequencies of MAT1-1 and MAT1-2 mating types and evidence of recombination. All these genetic and biological characteristics are consistent with sexual reproduction. However, sexual reproduction of *B. oryzae* was seldom observed in the crosses we performed *in vitro* and was never observed in the field. Dating sexual reproduction phenomena remains problematic and it is difficult to know if they are still ongoing or if they occurred in the past (Castell-Miller & Samac, 2012). The hypothesis of sexual reproduction of *B. oryzae* isolates from Burkina Faso will have to be verified by repeating *in vitro* reproduction tests and searching for pseudothecia (sexual reproductive structure) in rice fields.

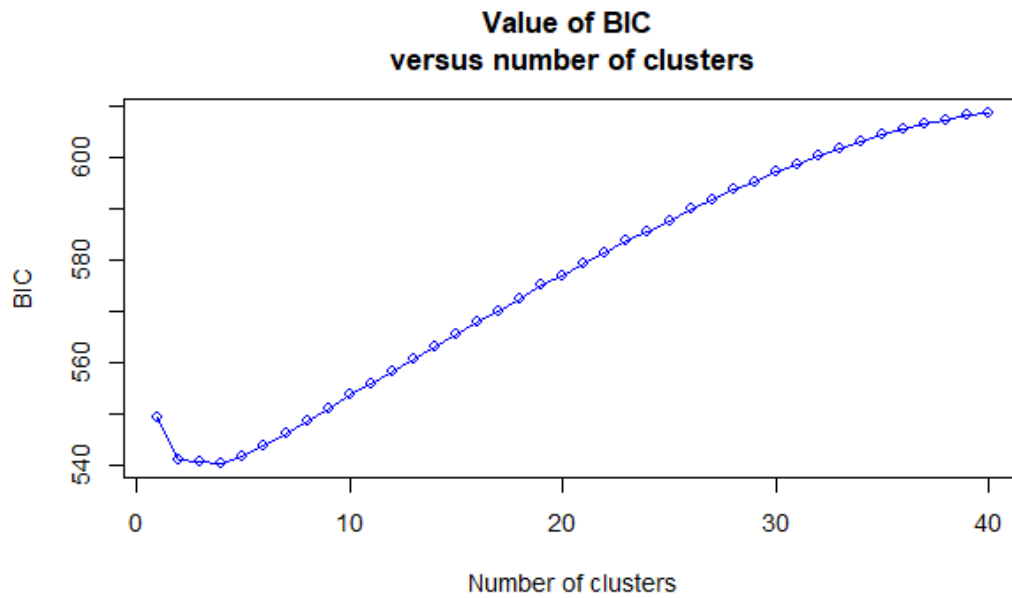
In contrast to *B. oryzae* populations, *E. rostratum* populations showed a dominant distribution of a single mating type of MAT1-2 (79%). These results are similar to those of Kusai (Kusai et al., 2016), observed on *E. rostratum* isolates from rice in Malaysia. In addition, in our study we identified 10 isolates of *E. rostratum*, i.e. 6% of our sample that have both the MAT1-1 and MAT1-2 idiomorphs. Such isolates with two mating types were also identified within *E. turcicum* populations from maize in China (Fan et al., 2007). The linkage disequilibrium and homoplasmy tests did not reject the hypothesis of recombination within the *E. rostratum* populations of Burkina Faso. The presence of isolates with both mating types and able to mate with MAT1-1/MAT1-2 strains could explain this situation. The observation of MAT1-1/MAT1-2 isolates within *E. rostratum* is described for the first time. Sequencing of the genome could be used to confirm that these isolates carry both idiomorphs.

Acknowledgements

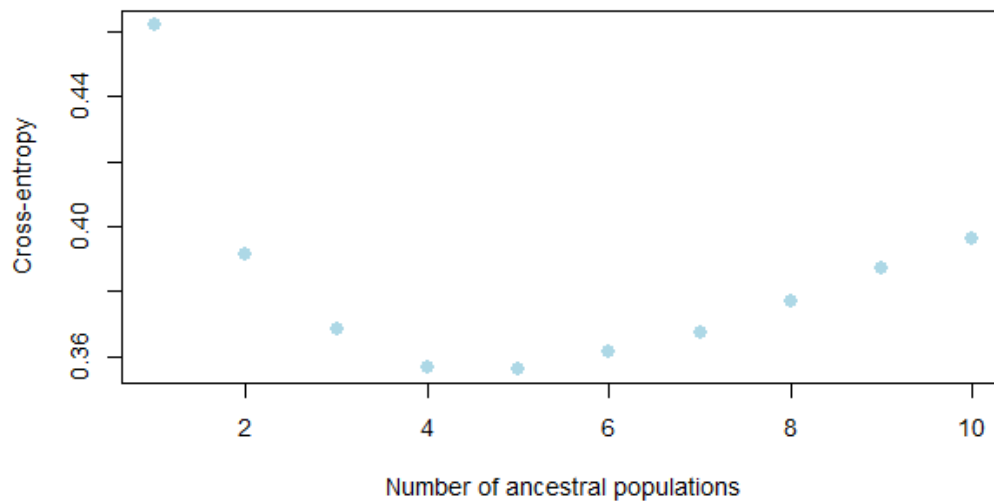
The authors are thankful to the RICE CRP and the Islamic Development Bank for their financial support. They also thank the UMR AGAP/CIRAD genotyping platform.

Supplementary

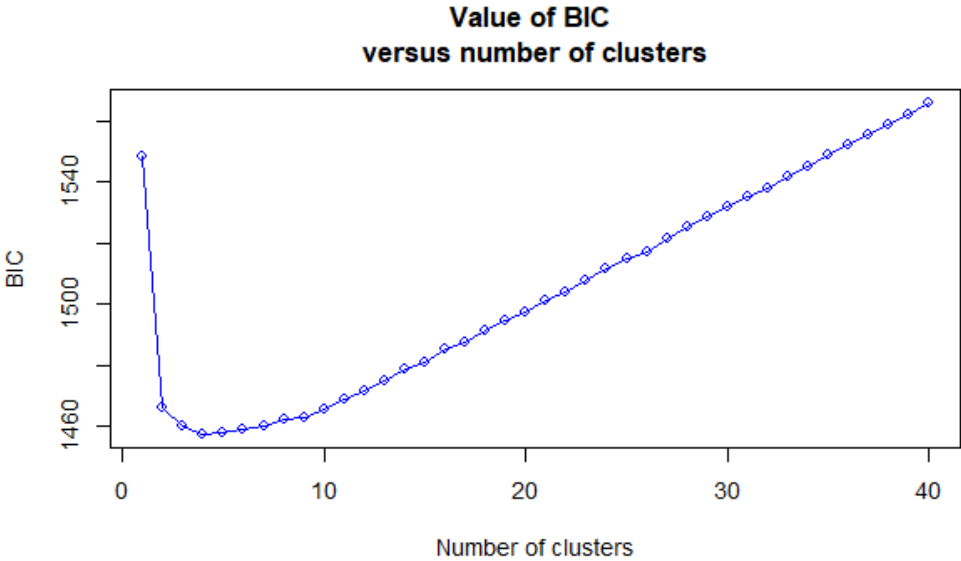
Supplementary 1: Identification of the number of genetic groups of *B. oryzae* isolates by DAPC



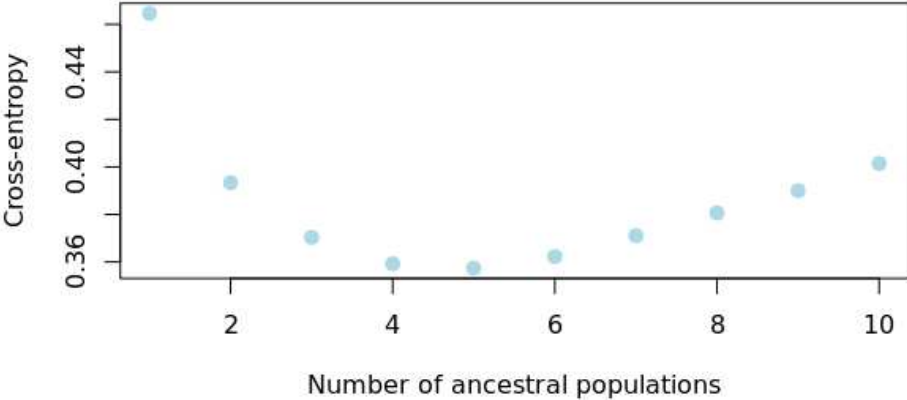
Supplementary 2: Identification of the number of genetic groups of *B. oryzae* isolates by sNMF



Supplementary 3: Identification of the number of genetic groups of *E. rostratum* isolates by DAPC



Supplementary 3: Identification of the number of genetic groups of *E. rostratum* isolates by sNMF



Chapitre 3 : Développement d'amorces pour la détection spécifique par PCR des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz

Le chapitre 3 est sous forme d'un article en préparation et traite du développement d'outils pour la détection spécifique (par PCR) sur la semence et les feuilles de riz des différentes espèces responsables de l'helminthosporiose. Ce travail vise à contribuer à l'amélioration du diagnostic de l'helminthosporiose du riz.

Article 6 : Développement d'amorces pour la détection spécifique par PCR de *Bipolaris* spp. et *Exserohilum rostratum* responsables de l'helminthosporiose du riz

Kouka Hilaire Kaboré^{1,2,3}, **Laurence Blondin**^{2,3}, **Abalo Itolou Kassankogno**⁴, **Sonia Guillou**^{2,3}, **Henri Adreit**^{2,3}, **Marc-Henri Lebrun**¹, **Didier Tharreau**^{2,3}

¹ UMR BIOGER, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon, France

² CIRAD, UMR PHIM, 34398 Montpellier, France

³ PHIM, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

⁴ CNRST/INERA, Laboratoire de Phytopathologie, LMI PathoBios, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

Résumé

L'helminthosporiose est une maladie fongique importante du riz dont les symptômes peuvent être confondus avec ceux d'autres maladies. En outre, les espèces incriminées dans la maladie ont des caractères morphologiques similaires. Un diagnostic sur la base de l'observation des symptômes et/ou de la caractérisation morphologique ne fournit donc pas de résultats fiables. Le diagnostic moléculaire est actuellement le moyen le plus efficace pour un diagnostic précis. L'objectif du travail présenté dans cet article était de mettre au point des amorces pour la détection spécifique des agents responsables de l'helminthosporiose du riz. La méthode choisie était la PCR simple pour une utilisation dans des laboratoires relativement peu équipés. Les alignements multiples réalisés à partir des séquences du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ont permis d'identifier des régions polymorphes entre les espèces responsables de l'helminthosporiose du riz. Quatre couples d'amorces ont été dessinés pour détecter respectivement les souches

du genre *Bipolaris* (*B. oryzae*, *B. maydis*, *Bipolaris* sp.), les espèces de *Bipolaris oryzae*, *B. maydis* et *Exserohilum rostratum*. Les tests d'amplification PCR réalisés à partir des isolats des espèces cibles et de diverses espèces fongiques isolées du riz ont montré des sensibilités (taux de vrais positifs) variant de 97 % à 100%. Une spécificité (taux de vrais négatifs) de 100% a été observée pour tous les couples d'amorces dessinés. Ces amorces ont permis également de détecter par PCR les espèces cibles en faible concentration (0,01 ng/ μ L d'ADN) et dans la semence de riz à partir de 0,25% de grains infectés. Des détections ont été aussi possibles sur les feuilles de riz infectées. Cette étude ouvre des perspectives pour le suivi épidémiologique de l'helminthosporiose du riz et pour une certification efficace des semences de riz au profit des producteurs.

Introduction

L'helminthosporiose est l'une des maladies fongiques importantes du riz dans le monde (Ou, 1985 ; Barnwal et al., 2013 ; Savary et al., 2019). Elle est particulièrement dommageable dans les conditions de déficit hydrique, dans les sols pauvres en fertilisant et en silice (Ou, 1985 ; Datnoff et al., 1991 ; Santos et al., 2011 ; Barnwal et al., 2013 ; Sunder et al., 2014 ; Rivera et al., 2021). Dans les conditions de pression naturelle de la maladie, des pertes de productivité en grains du riz comprises entre 1 et 34 % ont été enregistrées dans différents pays d'Afrique et d'Asie (Kaboré, communication personnelle).

Le genre *Helminthosporium* défini par Link en 1809 a été proposé par Person en 1822 pour regrouper diverses espèces fongiques pathogènes de plantes (Deshpande & Deshpande, 1966; Mukerji & Manoharachary, 2006). De nombreux travaux de classification ont conduit par la suite à la scission de ce genre en *Bipolaris* (*Cochliobolus*), *Curvularia* (*Pseudocochliobolus*), *Pyrenophora* (*Drechslera*) et *Exserohilum* (*Setosphaeria*) (Shoemaker, 1959 ; Luttrell, 1963, 1964 ; Sivanesan, 1987 ; Manamgoda et al., 2011, 2014). Cependant, le nom générique *Helminthosporium*, demeure toujours utilisé par de nombreux phytopathologistes pour désigner les

différentes espèces de *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* et *Exserohilum* (Mukerji & Manoharachary, 2006).

Bipolaris oryzae (Breda de Haan) Shoemaker est l'agent pathogène le plus associé à l'helminthosporiose du riz. Il est fréquemment présent sur les semences de riz (Mew & Gonzáles, 2002). Les grains infectés sont tachés conduisant à la réduction de leur qualité (Ou, 1985 ; Moletti et al., 1997). L'utilisation de semences infectées conduit à des fontes de semis pré ou post-germination (Ouédraogo, 2008 ; Kamal & Mia, 2009). Les semences infectées constituent l'une des principales sources d'inoculum pour le démarrage et la propagation des infections d'helminthosporiose dans les rizières (Schwanck et al., 2015).

L'identification de *B. oryzae* sur les grains de riz se fait couramment à travers les tests d'incubation sur papier Whatman ou sur milieu de culture et est basée sur la caractérisation morphologique des conidies du champignon (Farias et al., 2011 ; Meneses et al., 2014 ; Pantha & Yadav, 2016). Cependant, dans certains cas, les conidies de *B. oryzae* peuvent être difficiles à observer du fait du développement de mycélium d'espèces saprophytes à croissance plus rapide (Archana, 2014). De plus, lorsque l'inoculum de *B. oryzae* est faible, il est difficile de le détecter par les tests d'incubation (Archana, 2014). Le diagnostic de *B. oryzae* sur les semences de riz par les tests d'incubation présente donc des limites liées au test lui-même.

Bipolaris oryzae peut infecter les plantules et les plantes âgées du riz. Sur les feuilles, de minuscules taches brunes circulaires ou ovales apparaissent en début d'infection puis leurs centres deviennent gris ou blanchâtres avec le temps (Ou, 1985 ; Sunder et al., 2005 ; Burgos et al., 2013). Cependant, les symptômes foliaires de l'helminthosporiose en début d'infection peuvent être confondus avec ceux de la pyriculariose (*Pyricularia oryzae*), de la cercosporiose (*Cercospora oryzae*), de la curvulariose (*Curvularia* spp.) et de la ramulariose (*Ramularia oryzae*) (Archana, 2014 ; Zhou et al., 2021 ; Imran et al., 2022). Les risques d'erreurs de diagnostic basés sur l'observation des symptômes sur les feuilles sont donc élevés.

Exserohilum rostratum et de nombreuses espèces du genre *Bipolaris* sont aussi considérées comme des agents responsables de l'helminthosporiose du riz. Ces

différentes espèces sont couramment isolées des lésions foliaires typiques de cette maladie et des lots de semences infectés (Gnancadja-André et al., 2005 ; Motlagh & Kaviani, 2008 ; Nazari et al., 2015 ; El-Shafey et al., 2018 ; Aslam et al., 2021 ; Kaboré et al., 2021 ; Terensan et al., 2021). Ces espèces ont des caractères morphologiques similaires et des dimensions de conidies chevauchantes (Archana, 2014 ; Manamgoda et al., 2014). De ce fait, un diagnostic précis des agents responsables de l'helminthosporiose du riz ne peut être basé seulement sur la morphologie des champignons observés dans les lésions.

Face à ces difficultés de diagnostic, l'utilisation de marqueurs moléculaires offre une alternative utilisable dans beaucoup de contextes (Archana, 2014 ; Terensan *et al.*, 2021). Les marqueurs universels comme ITS5/ITS4 ciblant la région de l'espaceur interne transcrit de l'ADN ribosomique (White et al., 1990), GPD1/GPD2 amplifiant le gène qui code pour l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH ; Berbee *et al.*, 1999) et TEF1-983/TEF1-2218 pour le gène du facteur d'élongation de la traduction 1 α (Rehner & Buckley, 2005) ont été beaucoup utilisés pour l'identification des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz (Archana, 2014 ; Manamgoda et al., 2014 ; Kaboré et al., 2021 ; Terensan et al., 2021). Le gène GAPDH est l'un des meilleurs marqueurs génétiques permettant de délimiter les espèces du complexe *Helminthosporium* (Manamgoda et al., 2012; Bhunjun et al., 2020, Kaboré, communication personnelle). Cependant, l'utilisation d'amorces universelles implique du séquençage qui peut être long, coûteux et inapproprié pour les pays en voie de développement quasiment dépourvus de plateformes de séquençage. Les objectifs de cette étude étaient : (i) de produire des séquences du gène GAPDH et d'exploiter celles déjà disponibles pour *Bipolaris*, *Curvularia* et *Exserohilum*, (ii) de rechercher sur ce gène des régions polymorphes entre les espèces et de dessiner des amorces spécifiques pour la détection sans séquençage de *Bipolaris* spp., *B. oryzae*, *B. maydis* et *E. rostratum*, et (iii) d'évaluer la sensibilité et la spécificité des amorces.

Dans cet article, le nom générique *Helminthosporium* sera utilisé pour désigner les espèces des genres *Bipolaris*, *Curvularia* et *Exserohilum*.

Matériel et méthodes

Isolement des espèces fongiques

Des échantillons de feuilles et des grains de riz présentant les symptômes de l'helminthosporiose ont été collectés entre 2018 et 2019 dans divers pays rizicoles (Burkina Faso, Mali, France, Pakistan et Sénégal). Ils ont été disposés séparément dans des boîtes de Pétri contenant une double couche de papier Whatman humidifié (Mathur & Kongsdal, 2003). L'incubation a été réalisée à 25 °C pendant 7 jours sous alternance de 12 h de lumière et de 12 h d'obscurité. A l'aide d'une pipette pasteur étirée à la flamme, les conidies ayant les caractères morphologiques de *Helminthosporium* ont été collectées et étalées sur du milieu bacto-agar. Après une incubation de 24 h (25°C, 12 h de lumière et 12 h d'obscurité), une seule conidie germée a été transférée à l'aide d'un scalpel stérile sur du milieu *potato dextrose agar* (PDA, 39 g/L) et incubée dans les mêmes conditions pendant 7 jours.

Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir de mycélium frais en modifiant la méthode au bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) décrite par Doyle et Doyle (1987). Un fragment de mycélium cultivé pendant 5 jours sur du PDA a été transféré sur du milieu *Corn Meat Agar* (CMA, 18 g/L) préalablement recouvert d'un disque de cellophane stérile. Les boîtes ont été placées à 25 °C (photopériode de 12 h) pendant 7 jours. Environ 30 mg du mycélium ont été récoltés et transférés dans un tube de 2 mL contenant du sable stérile et 2 billes. Ces tubes ont été placés directement dans l'azote liquide et le mycélium a été broyé à froid avec un broyeur (Retsch MM 301) pendant 4 min à 15 Hz. Un millilitre de tampon de lyse CTAB autoclavé, additionné de 1% de polyvinyl pyrrolidone (MW. 360 000), de 1% de Na₂SO₃, de 0,2 mg/mL d'ARNase et de 1 mg/mL de protéinase K a été ajouté dans chaque tube. Les tubes ont été vortexés (Vortex-Genie 2) et incubés à l'étuve à 65°C pendant 2 h. Les tubes

ont été ensuite centrifugés pendant 3 min à 8 000 rpm et environ 900 µL du surnageant ont été transférés dans un nouveau tube de 2 mL. Un millilitre de chloroforme isoamilalcool (CIAA, 24/1 v/v) a été ajouté dans chaque tube et mélangé par inversion avant d'être centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 min. Après centrifugation, 700 µL de surnageant ont été transférés dans des tubes de 1,5 mL. Six cent microlitres d'isopropanol refroidis à -20°C et 210 µL de NaCl 5M ont été ajoutés et mélangés par inversion. Les tubes ont été ensuite conservés à -20°C pendant une nuit. Les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 30 min et le surnageant a été éliminé. Cinq cent microlitres d'éthanol à 70% ont été ajoutés dans chaque tube et centrifugés à 13 000 rpm à 4°C pendant 5 min. L'éthanol a été éliminé et le culot a été séché pendant 10 min sous la hotte. L'ADN a été remis en suspension dans 100 µL d'eau milliQ stérile. La qualité et la quantité de l'ADN extrait ont été évaluées par spectrophotométrie au Nanodrop 2000 et par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Amplification et production de séquences du gène GAPDH

Pour identifier les espèces fongiques isolées des lésions de l'helminthosporiose et acquérir de nouvelles séquences, le couple d'amorces GPD1/GPD2 (GPD1-F 5'-CAACGGCTTCCGTCGCATTG-3' ; GPD2-R 5'GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') décrit par Berbee et al. (1999) a été utilisé. Il cible le gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et est communément utilisé pour l'identification des espèces de *Helminthosporium*. Les amplifications par réaction en chaîne par polymérase (PCR) ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Biometra) dans un volume total de 25 µL contenant 14,75 µL d'eau commerciale, 5 µL de tampon 5X (Promega GoTaq), 1 µL de dNTPs (10 mM chaque), 1 µL (10 µM) de chaque amorce sens et antisens, 0,25 µL de Taq polymérase et 2 µL d'ADN génomique (10 ng/µL). Un contrôle négatif a été inclus dans toutes les PCR, pour lequel de l'eau ultrapure a été utilisée à la place de l'ADN. Les amplifications ont été réalisées avec une étape initiale de dénaturation à 96 °C pendant 1 min, suivie de 35 cycles avec 30 s à 96°C, 1 min à 52 °C et 50 s à 72

°C. S'en suit une extension finale de 10 min à 72 °C. La qualité (présence d'une bande de taille attendue) des amplicons a été vérifiée par migration électrophorétique à 100 V pendant 35 min sur gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TAE 0,5 X. La purification des produits PCR et le séquençage ont été effectués par Eurofins (Cologne, Allemagne).

Les séquences nucléotidiques générées par les amorces sens et antisens, après avoir été vérifiées et corrigées, ont été utilisées pour obtenir une séquence consensus à l'aide de Codoncode version 5.1.5 (CodonCode Corporation). Afin d'assigner les isolats à une espèce, les séquences consensus produites ont été comparées aux séquences disponibles dans la base de données GenBank. L'alignement a été réalisé avec le Basic Local Alignment Search Tool (BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Huit séquences du gène GAPDH produites ont été déposées sur GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sous les codes MZ029600, MZ029601, MZ029602, MZ029603, MZ029604, MZ029605, MZ029606, MZ029607. La mise en ligne du reste des séquences produites est en cours.

Définition d'amorces spécifiques sur la base du gène GAPDH

Pour dessiner les amorces, les séquences GAPDH des différents isolats ont été alignées par espèce à l'aide du logiciel MEGA-X 10.2.10 (Kumar et al., 2018). A ces séquences ont été ajoutées des séquences GAPDH de références pour les espèces du genre *Helminthosporium* (*Curvularia* spp., *Bipolaris* spp., *Exserohilum rostratum*) et *Alternaria alternata* téléchargées sur Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En fonction de la diversité nucléotidique au sein de l'espèce, 1 à 4 séquences représentatives de cette diversité ont été retenues (Tableau 1). Les séquences représentatives ont été alignées ensemble selon la méthode CLUSTAL W dans BioEdit. Les zones non codantes correspondant aux introns (souvent plus variables que les exons) ont été ciblées comme 'zone discriminante'. Les amorces ont été

dessinées avec Primer3 (Untergasser et al., 2012), en tenant compte de leur proportion en bases G et C (40-65%) et de leur température d'hybridation.

Sensibilité, spécificité et seuil de détection des amorces

La sensibilité (taux de vrais positifs) définit la capacité d'un test de détection à donner un résultat positif en présence de l'espèce cible, tandis que la spécificité (taux de vrais négatifs) renseigne sur la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence de l'espèce cible (Cardwell et al., 2018). Pour déterminer ces paramètres, des tests d'amplifications PCR ont été réalisés avec les amorces dessinées en utilisant comme matrice, de l'ADN génomique du riz, des espèces fongiques cibles et de diverses espèces fongiques pathogènes isolées du riz (préalablement caractérisées par ITS5/ITS4, *gpd1/gpd2*, TEF1-983/TEF1-2218 et/ou par génotypage par séquençage). Les PCR ont été réalisées en utilisant le kit GoTaq (Promega) selon les recommandations du fabricant : 14,75 µL d'eau stérile, 5 µL de tampon 5X, 1µL de dNTPs (10 mM chaque), 0,25 µL de Taq polymérase, 2 µL d'ADN (à 20 ng/µL), 1 µL de l'amorce sens et 1 µL de l'amorce antisens. Les produits PCR ont été soumis à une migration électrophorétique pendant 1 heure à 130 Volts sur un gel d'agarose à 1,5 %. Le gel a été ensuite incubé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à 1% durant 10 min et révélé sous rayonnement ultra-violet (UV).

Pour déterminer la limite de détection de la PCR, l'ADN génomique de 3 isolats de *B. oryzae* (BF9010, BF9037, BF9083), de 2 isolats de *B. maydis* (BF9100, ML9032) et de 3 isolats de *E. rostratum* (BF9006, BF9038, ML9044) ont été dilués dans de l'eau distillée stérile pour obtenir des concentrations finales allant de 10 ng/µL à 10⁻⁶ ng/µL. Deux microlitres d'ADN dilué ont été utilisés par réaction PCR. Les amplifications et leurs vérifications ont été effectuées comme précédemment décrites.

Détection d'ADN fongique à partir des feuilles et des grains de riz infectés

La détection sur organes contaminés a concerné les 2 espèces majoritairement rencontrées sur les symptômes de l'helminthosporiose du riz que sont *B. oryzae* et *E. rostratum*. Elle a été réalisée sur des organes inoculés et sur des organes infectés naturellement. Les feuilles de riz naturellement infectées ont été collectées en 2019 sur les parcelles nommées NI001 (13°00'33.4"N ; 3°26'27.5"W) et NI002 (13°02'09.4"N ; 3°26'59.8"W) de la plaine rizicole du Sourou au Burkina Faso. Sur chacune de ces parcelles, des grains de riz ont été prélevés après la récolte en vue de la détection à partir de grains infectés naturellement.

Evaluation de la mycoflore des grains collectés

La mycoflore des grains de riz issus des parcelles NI001 et NI002 a été évaluée selon la méthode d'incubation sur papier Whatman (Mathur & Kongsdal, 2003). Pour chaque lot, 100 grains de riz ont été disposés dans des boîtes de petri contenant 2 couches de papier Whatman humidifié. Les boîtes ont été incubées à 25 °C pendant 7 jours avec une photopériode de 12 h. Les grains ont été ensuite observés sous une loupe binoculaire et les champignons ont été identifiés sur la base de leurs caractères morphologiques. Pour chaque espèce identifiée, un taux d'infection a été calculé en divisant le nombre de grains infectés par le nombre total de grains incubés et multiplié par 100.

Inoculation foliaire du riz

Des isolats monospores de *B. oryzae* et *E. rostratum* ont été repiqués sur du milieu fait à base d'aliment pour lapin (50 g/litre de tourteau pour lapin, Kaytee Products, Inc. Chilton, WI, USA, et 15 g d'agar) pendant 14 jours à 25°C avec une photopériode de 12 heures (Hau & Rush, 1980). Les conidies ont été recueillies et la concentration de la suspension conidienne ajustée à 1×10^4 conidies/mL avec 0,5 % de gélatine. L'inoculation a été effectuée par pulvérisation de 30 mL de la suspension conidienne

sur 60 plantes de riz âgées de 25 jours. Les plantes ont été maintenues à un taux maximum d'humidité (100%) à 21°C pendant une nuit puis transférées dans un phytotron à 27°C. Sept jours après l'inoculation, les feuilles portant les lésions ont été découpées en morceau de 2 à 3 cm et conservées au congélateur à -80 °C.

Inoculation des grains de riz

Des isolats monospores de *B. oryzae* et *E. rostratum* ont été repiquées sur du milieu fait à base de tourteau pour lapin (50 g de tourteau pour lapin, Kaytee Products, Inc. Chilton, WI, USA, et 15 g d'agar pour 1 L d'eau) pendant 10 jours à 28 °C avec une photopériode de 12 heures (Hau et Rush 1980). Des grains de riz en provenance du Centre Français du Riz (CFR) collectés en Camargue en 2016 ont été désinfectés par immersion dans de l'hypochlorite de sodium à 5°DC (Degré Chlorométrique) pendant 30 min. Ils ont été ensuite rincés 3 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer l'hypochlorite de sodium avant d'être séchés pendant 3 jours à l'étuve à 30 °C. Après la désinfection, pour s'assurer de l'élimination des agents pathogènes 50 grains de riz ont été choisis et évalués par la méthode de papier Wathman (Mathur & Kongsdal, 2003).

Pour l'inoculation, 150 grains de riz désinfectés ont été disposés sur du mycélium ayant poussé pendant 10 jours. Les boîtes ont été réincubées pendant 4 jours à 28°C et sous 12 h de photopériode. Les grains ont été ensuite récupérés dans des boîtes de Pétri stériles et placés à l'étuve à 30°C pour le séchage. Des lots de semences de taux d'infection de 0%, 0,25%, 1%, 10%, 20% et 40% ont été constitués en mélangeant des grains inoculés à des grains sains dans des proportions respectives de 0/400, 1/400, 4/400, 40/400, 80/400 et 160/400.

Extraction de l'ADN fongique à partir des grains et feuilles infectés

Pour l'extraction de l'ADN fongique à partir des grains de riz, les grains inoculés ou infectés naturellement ont été réduits en poudre fine par broyage pendant 5 min au

mixeur. La poudre a été bien homogénéisée et 0,1 g a été prélevé pour l'extraction de l'ADN au CTAB. Pour l'extraction de l'ADN fongique à partir des feuilles de riz infectées, les feuilles ont été broyées au mortier dans l'azote liquide. La poudre a été homogénéisée avec une spatule et 0,1 g a été mis dans un tube de 1 mL. Trois prélèvements de 0,1 g ont été effectués par niveau d'infection (0%, 0,25%, 1%, 10%, 20%, et 40%). L'extraction de l'ADN a été réalisée au CTAB comme décrit précédemment. L'ADN a été récupéré dans 50 µL d'eau distillée stérile.

Tableau 1 : Séquences GAPDH produites dans cette étude et séquences de référence (NCBI) des espèces présentes sur le riz ayant servi à la définition des amorces

Espèces	Séquences	Hôtes	Sources
	AF081400	ND	Berbee, 1998/NCBI
<i>Alternaria alternata</i>	KP851968	<i>Boehmeria nivea</i>	Yu et al., 2015/NCBI
<i>Bipolaris bicolor</i>	ML9021	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
	KY047136	<i>Lolium perenne</i>	Xue, 2016/NCBI
<i>B. coffeana</i>	KJ415421	<i>Coffea arabica</i>	Tan et al., 2014/NCBI
	KC333443	<i>Oryza sativa</i>	Ahmadpour et Javan-Nikkhah, 2012/NCBI
<i>B. cynodontis</i>	KM034838	<i>Cynodon dactylon</i>	Manamgoda et al., 2014/NCBI
	ML9030	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
<i>B. maydis</i>	LC552295	<i>Zea mays</i>	Manzar et al., 2020/NCBI
	LC552288	<i>Zea mays</i>	Manzar et al., 2020/NCBI
	JX276430	<i>Oryza sativa</i>	Manamgoda et al., 2012/NCBI
<i>B. oryzae</i>	ML9022	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
	BF9034	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
	KC333434	<i>Oryza sativa</i>	Ahmadpour et Javan-Nikkhah, 2012/NCBI
<i>B. secalis</i>	KJ415409	<i>Secale cereale</i>	Tan et al., 2014/NCBI
<i>B. setariae</i>	MK144540	<i>Saccharum</i> sp.	Hao, 2018/NCBI
<i>B. sorokiniana</i>	MF193869	<i>Hordeum bogdanii</i>	Xue, 2017/NCBI
	BF9003	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
<i>Bipolaris</i> sp.	ML9021	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
	PK9037	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
<i>B. victoriae</i>	EF513210	ND	Andrie et al., 2007/NCBI

ND : non rapporté

Tableau 1 (suite) : Séquences GAPDH produites dans cette étude et de référence (NCBI) des espèces présentes sur le riz ayant servi à la définition des amorces

Espèces	Séquences	Hôtes	Sources
	MF193874	<i>Zea mays</i>	Xue, 2017/NCBI
<i>B. zeicola</i>	KM034813	<i>Sorghum</i>	Manamgoda et al., 2014/NCBI
<i>Curvularia americana</i>	HF565488	ND	da Cunha et al., 2102/NCBI
	MH972264	<i>Saccharum</i> sp.	Hao et Qi,2018/NCBI
<i>C. eragrostidis</i>	HG779154	ND	Madrid et al., 2014/NCBI
<i>C. geniculata</i>	HF565462	ND	da Cunha et al., 2012/NCBI
	LC552684	<i>Zea mays</i>	Manzar et al., 2020/NCBI
<i>C. hawaiiensis</i>	KT021302	Homo sapiens	Pham et al., 2015/NCBI
	JX276441	ND	Manamgoda et al., 2012/NCBI
<i>C. lunata</i>	MN217229	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	Liu et al., 2019/NCBI
<i>C. oryzae</i>	MN180225	<i>Cocos nucifera</i>	Xu, 2019/NCBI
<i>C. pallescens</i>	KM083606	ND	Manamgoda et al., 2014/NCBI
<i>Curvularia</i> sp.	PK9033	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
	KM061788	<i>Bouteloua gracilis</i>	Manamgoda et al., 2014/NCBI
<i>C. spicifera</i>	KC928089	<i>Buchloe dactyloides</i>	Amaradasa et Amundsen, 2015/NCBI
<i>Exserohilum rostratum</i>	BF9006	<i>Oryza sativa</i>	Kaboré et al., CIRAD
	MG918126	<i>Lagenaria siceraria</i>	Choudhary et al., 2018/NCBI

ND : non rapporté

Résultats

Séquences du gène GAPDH de *Bipolaris* spp. *Curvularia* spp. et *Exserohilum rostratum* produites

Le potentiel des régions génomiques permettant de discriminer les espèces est un facteur primordial dans le choix du gène qui servira à dessiner des amorces spécifiques. Au total, nous avons produits des séquences GAPDH de 112 isolats de *Helminthosporium*. Une recherche de similarité nucléotidique de chacune de ces séquences avec celles déposées dans GenBank a été effectuée en vue de l'assignation taxonomique. Une souche a été assignée à une espèce lorsque des taux de similarité élevés (99 à 100%) ont été observés entre la séquence produite pour cette souche et plusieurs isolats d'une seule espèce dans GenBank. Lorsque les taux de similarités et valeurs de scores étaient comparables pour séquences attribuées à différentes espèces dans GenBank, l'assignation a été limitée au genre.

La majorité des 112 souches séquencées (94,6%) a été assignée aux espèces *Bipolaris bicolor* (1/112), *B. coffeana* (1/112), *B. cynodontis* (9/112), *B. maydis* (4/112), *B. oryzae* (54/112), *B. secalis* (2/112), *B. zeicola* (1/112), *Curvularia americana* (1/112), *C. hawaiiensis* (2/112), *C. spicifera* (12/112) et *E. rostratum* (19/112). Pour les 6 isolats restant, l'assignation a été limitée aux genres *Bipolaris* (1/112) et *Curvularia* (5/112).

Spécificité, sensibilité et seuil de détection des amorces

Les alignements multiples effectués entre les séquences GAPDH des isolats de *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Alternaria alternata* et *E. rostratum* ont permis d'identifier des zones polymorphes au niveau des introns. Quatre couples d'amorces spécifiques (Tableau 2) ont été dessinés pour détecter spécifiquement *Bipolaris oryzae*, *B. maydis*, *E. rostratum* et toutes les espèces du genre *Bipolaris* répertoriées dans le tableau 1. Le couple d'amorces GAPDH_Bspf/GAPDH_R (Bspf/R en abrégé) a été dessiné pour détecter toutes les espèces appartenant au genre *Bipolaris*, tandis que les couples d'amorces GAPDH_Bof/ GAPDH_R, GAPDH_Bmf/ GAPDH_R et GAPDH_Erf/ GAPDH_R ont été dessinés pour détecter respectivement *Bipolaris*

oryzae, *B. maydis* et *E. rostratum*. Les températures d'hybridation utilisées pour ces différents couples d'amorces sont à 60°C pour Bof/R et Bmf/R, 55°C pour Bspf/R et 52°C pour Erf/R (Tableau 3). La spécificité des amorces a été confirmée par les résultats des PCR réalisées sur les espèces cibles et les différentes espèces fongiques rencontrées sur le riz (Tableau 4, Annexe 6, Figure 1). Au total, 86, 261, 119 et 248 isolats ont été respectivement testés avec les couples d'amorces Bspf/R, Bof/R, Bmf/R et Erf/R. Parmi ces isolats testés, 35 isolats étaient des isolats des espèces non cibles du couple d'amorces Bspf/R, 86 isolats de Bof/R, 95 isolats de Bmf/R et 69 isolats de Erf/R. Aucune amplification de ces espèces non cible n'a été observée, soit une spécificité de 100% pour chacun des couples d'amorces. L'ADN du riz n'a pas non plus été amplifié avec ces amorces. Par ailleurs, sur 175 isolats de *Bipolaris oryzae* préalablement identifiés par GBS (Chapitre 1), le couple Bof/R, a permis d'amplifier l'ADN de 174 isolats soit une sensibilité de 98,3%. Le couple d'amorces spécifique de *E. Rostratum* (Erf/R) a permis l'amplification de 174 isolats sur 179 isolats testés, soit une sensibilité de 97,2%. Le couple d'amorces Bspf/R a quant à lui permis d'amplifier l'ADN de 50 des 51 isolats de *Bipolaris* spp (24 *B. oryzae*, 24 *B. maydis* et 3 *Bipolaris* sp.), soit une sensibilité de 98%. La sensibilité du couple spécifique à *B. maydis* (Bmf/R) a été de 100% (24 souches testées).

Les amplifications des isolats de *B. oryzae*, *B. maydis* et *E. rostratum* avec respectivement les couples d'amorces Bof/R, Bmf/R et Erf/R ont montré que le seuil de détection de ces dernières variait de 0,01 ng/μL à 10 ng/μL (Figure 1).

Tableau 2 : Amorces dessinées pour la détection spécifique de *Bipolaris* spp., *B. oryzae*, *B. maydis* et *E. rostratum*

Amorces	Séquences (5' 3')	Taille Fragments* (pb)	Espèces cibles
GAPDH_Bspf	AGCACTCCCTCAACCCRGAA	296	<i>Bipolaris</i> spp.
GAPDH_Bof	TCAACCCAGAATCCTCCACT	287	<i>B. oryzae</i>
GAPDH_Bmf	AACCCAGAACCTTTGACCAC	285	<i>B. maydis</i>
GAPDH_Erf	CTTTCGTCAGGACCGTAGA	225	<i>E. rostratum</i>
GAPDH_R	TTCTCGGTGGTGGTGAAGAC	-----	<i>Bipolaris/Exserohilum</i>

* taille de l'amplificon avec l'amocre GAPDH_R

Tableau 3 : Programme PCR utilisé pour les différents couples d'amorces

Etapas	GAPDH_Bspf/R		GAPDH_Bof/R		GAPDH_Bmf/R		GAPDH_Erf/R	
	T (°C)	D	T (°C)	D	T (°C)	D	T (°C)	D
1	96	2 min	96	2 min	96	2 min	96	2 min
2	96	1 min	96	1 min	96	1 min	96	1 min
3	55	1min	60	1min	60	1min	52	1min
4	72	50 s	72	50 s	72	50 s	72	50 s
5	72	10 min	72	10 min	72	10 min	72	10 min
6	15	infini	15	infini	15	infini	15	infini

Les étapes 2 à 4 sont répétées 35 fois

T : Température ; D : Durée

Tableau 4 : Résultats d'amplification PCR d'une collection d'isolats de *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Exserohilum rostratum* et des espèces couramment rencontrées sur le riz

Espèces	Amorces			
	GAPDH_Bspf/ GAPDH_R	GAPDH_Bof/ GAPDH_R	GAPDH_Bmf/ GAPDH_R	GAPDH_Erf/ GAPDH_R
<i>Alternaria</i> sp.	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Bipolaris</i> sp.	2/3	0/3	0/3	0/3
<i>Bipolaris oryzae</i>	24/24	172/175	0/24	0/24
<i>B. maydis</i>	24/24	0/15	24/24	0/15
<i>Curvularia</i> sp.	0/4	0/13	0/13	0/4
<i>Drechslera gigantea</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Exserohilum rostratum</i>	0/8	0/32	0/32	174/179
<i>Fusarium</i> sp.	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Pyricularia oryzae</i>	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>Rhizoctonia</i> sp.	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>Rhynchosporium</i> sp.	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>Sclerotium</i> sp.	0/4	0/4	0/4	0/4
Total isolats testés	86	261	119	248

a/b : pour une espèce et un couple d'amorce donné, 'a' désigne le nombre d'isolats positifs (amplifiés) et 'b' le nombre d'isolats testés.

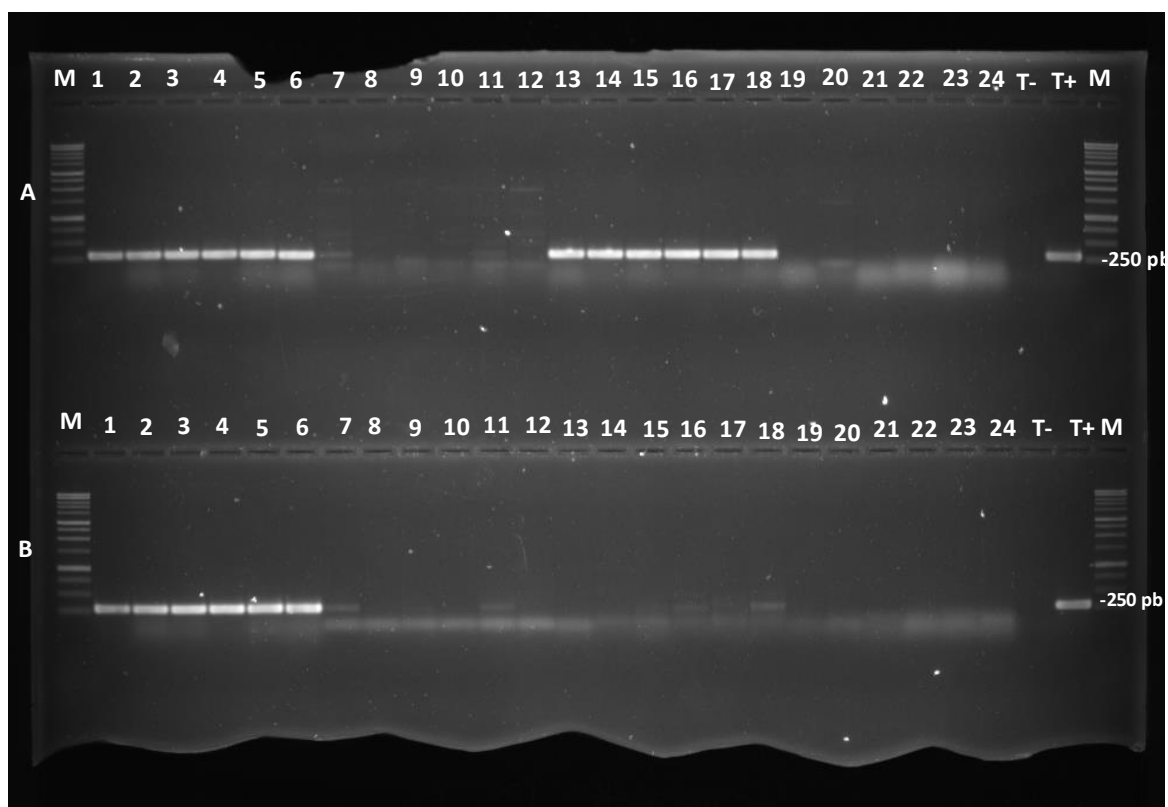


Figure 1 : Illustration de la spécificité des amorces

A : amplification spécifique des isolats du genre *Bipolaris* avec le couple d'amorces GAPDH_Bspf/ GAPDH_R ; B : amplification spécifique des isolats de *B. oryzae* avec le couple d'amorces GAPDH_Bof/ GAPDH_R ; M : Marqueurs de taille (1 kb), de 1 - 6 isolats de *B. oryzae* ; 7-12 isolats de *E. rostratum* ; 13-18 isolats de *B. maydis* ; 19-24 isolats d'espèces diverses ; T- témoin négatif PCR ; T+ témoin positif PCR

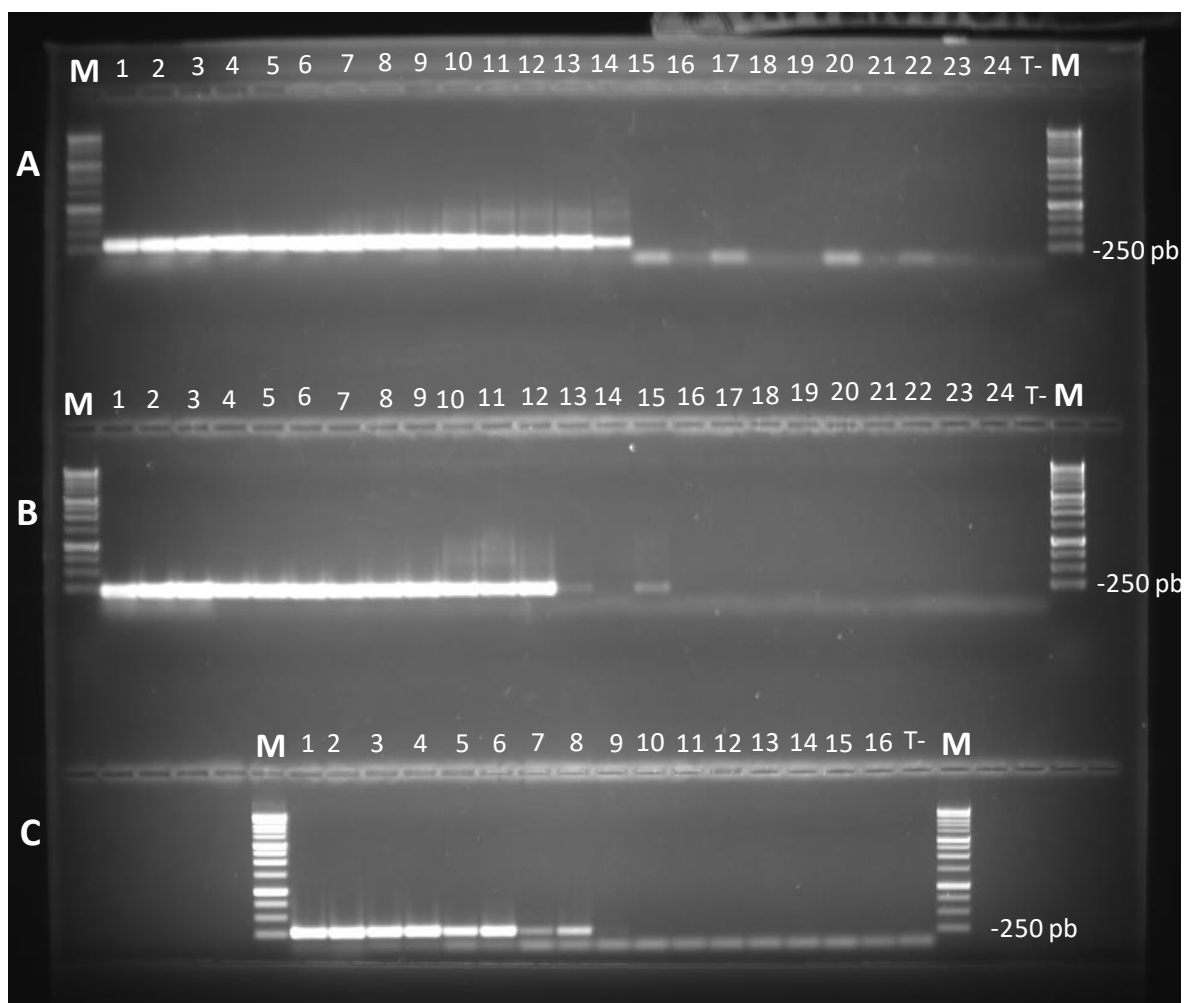


Figure 2 : Seuil de détection des amorces pour les espèces *B. oryzae*, *E. rostratum* et *B. maydis*

En fonction des amorces, les amplifications ont porté sur l'ADN de 3 ou 2 isolats qui ont été déposés, pour une même concentration, côte à côte et dans l'ordre indiqué. A : amplification des isolats BF9010, BF9037 et BF9083 de *B. oryzae* avec le couple d'amorces GAPDH_Bof/ GAPDH_R ; M : Marqueurs de taille (1 kb), de 1 - 3 ADN à 10 ng/ μ L, 4 à 6 ADN à 1 ng/ μ L ; 7 à 9 ADN à 0,1 ng/ μ L ; 10 à 12 ADN à 0,01 ng/ μ L ; 13-15 ADN à 0,001 ng/ μ L ; 16-18 ADN à 0,0001 ng/ μ L ; 19-21 ADN à 0,00001 ng/ μ L ; 22-24 ADN à 0,000001 ng/ μ L ; T- : témoin négatif PCR. B : amplification des isolats BF9006, BF9038 et ML9044 de *E. rostratum* avec le couple d'amorces GAPDH_Er/ GAPDH_R ; C : amplification des isolats BF9100 et ML9032 de *B. maydis* avec le couple d'amorces GAPDH_Bmf/ GAPDH_R. 1 - 2 ADN à 10 ng/ μ L, 3-4 ADN à 1 ng/ μ L ; 5 -6 ADN à 0,1 ng/ μ L ; 7-8 ADN à 0,01 ng/ μ L ; 9-10 ADN à 0,001 ng/ μ L ; 11-12 ADN à 0,0001 ng/ μ L ; 13-14 ADN à 0,00001 ng/ μ L ; 15-16 ADN à 0,000001 ng/ μ L.

Détection de *B. oryzae* et *E. rostratum* à partir des feuilles et des grains de riz infectés

Pour déterminer le potentiel des amorces Bof/R et Erf/R à détecter respectivement *B. oryzae* et *E. rostratum* dans les organes du riz, des feuilles et des lots de grains infectés naturellement ou inoculés, des tests PCR ont été réalisés.

L'inoculation des feuilles a été réalisée par la pulvérisation des plantes de riz avec une suspension conidienne. Sept jours après l'inoculation avec *B. oryzae* et *E. rostratum*, les feuilles ont présenté des lésions brunes circulaires ou ovales. Les lésions étaient similaires à celles observées sur les feuilles collectées dans les parcelles infectées naturellement (NI001 et NI002). Les amplifications réalisées à partir des ADN extraits directement des feuilles inoculées avec *B. oryzae* ont permis d'obtenir des amplicons de tailles attendues (287 pb) et les feuilles inoculées avec *E. rostratum* ont permis d'observer des amplicons de 225 pb attestant la présence de *E. rostratum*. Aucun amplicon n'a été obtenu à partir des feuilles témoins non inoculées.

Pour la détection de *B. oryzae* et *E. rostratum* dans les semences, des grains ont été collectés dans les parcelles NI001 et NI002 au Burkina Faso. Un autre lot de semences de riz provenant de Camargue a été désinfecté à l'hypochlorite de sodium et inoculé par la mise en contact de la semence avec le mycélium du champignon. Pour s'assurer que les grains étaient réellement contaminés, ils ont été incubés sur du papier Whatman. Les observations de ces grains à la loupe binoculaire ont montré que tous les grains inoculés étaient infectés. Quant aux grains de riz récoltés dans les parcelles NI001 et NI002, leur incubation sur le papier Whatman a révélé la présence de *Bipolaris* spp., *Exserohilum* sp. et *Curvularia* sp.. Compte tenu de la ressemblance morphologique entre ces trois genres un taux d'infection unique a été calculé. C'est ainsi que les grains issus des parcelles NI001 et NI002 ont montré respectivement des taux d'infection de 82% et 37%. Les tests PCR réalisés à partir des ADN extraits des grains infectés naturellement (NI001 et NI002) avec les couples d'amorces Bof/R et Erf/R ont détecté respectivement *B. oryzae* et *E. rostratum*. Des bandes plus intenses ont été observées pour le lot de la parcelle NI001 (Figure 3). Les tests PCR réalisés avec les couples d'amorces Bof/R et Erf/R à partir des ADN extraits des grains

inoculés, ont permis la détection sur les lots de grains avec des taux d'infection variant de 0,25 à 40% (Figure 3). Cependant, des amplifications d'ADN ont été également observées chez les lots de grains témoins non inoculés. Les extractions d'ADN du témoin négatif ainsi que les amplifications PCR ont été reprises 2 fois mais ont abouti au même résultat.

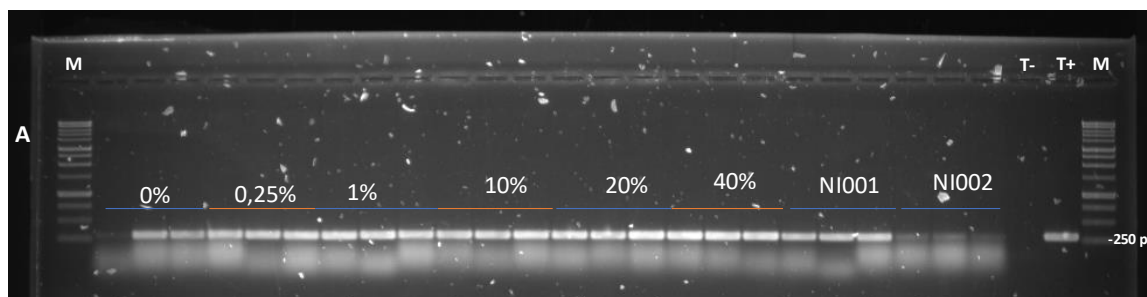


Figure 3 : Détection de *B. oryzae* à partir de grains de riz infectés avec le couple d'amorces Bof/R

NI001 : grains de riz issus de la parcelle NI001 infectés à 82% par *Helminthosporium* selon la méthode d'incubation sur papier Whatman, NI002 : grains de riz issus de la parcelle NI002 infectés à 37% par *Helminthosporium* selon la méthode d'incubation sur papier Whatman

Discussion

L'objectif de cette étude était de développer des amorces PCR pour détecter les principales espèces responsables de l'helminthosporiose du riz. Pour cela nous avons : (i) produit et exploité les données de séquences GAPDH de *Bipolaris*, *Curvularia* et *Exserohilum* disponibles, (ii) recherché sur ce gène des régions polymorphes entre les espèces et dessiné des amorces spécifiques pour la détection sans séquençage de *Bipolaris* spp., *B. oryzae*, *B. maydis* et *E. rostratum*, et (iii) évalué la sensibilité et la spécificité de ces amorces.

Le niveau de polymorphisme d'une région génomique entre les espèces, et entre les isolats d'une espèce est un facteur primordial pour la conception d'amorces spécifiques. Dans notre étude, les amorces définies à partir de la séquence du gène GAPDH ont permis de discriminer les espèces *Bipolaris oryzae*, *Bipolaris maydis* et *E. rostratum*, toutes les 3 associées à l'helminthosporiose du riz. Aucune amplification croisée n'a été observée. Ces résultats concordent avec les observations faites dans

d'autres études qui ont montré l'intérêt de ce gène pour discriminer les espèces de *Cercospora* spp. (Bakhshi & Zare, 2020), de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* sur les graines du cotonnier (Almeida et al., 2020) et de *Bipolaris sorokiniana* sur le blé (Alkan et al., 2022). La limite de détection des amorces dessinées a été de 0,01 ng/μL. Cette limite de détection est similaire à celle des amorces spécifiques de *B. oryzae* dessinée sur la base de la région ITS (Archana, 2014).

La performance des amorces dessinées a également été démontrée par la détection de *B. oryzae* et *E. rostratum* dans les semences de riz infectées à 0,25%, soit un seul grain infecté dans un lot de 400 grains. Des amorces spécifiques conçues sur la base des séquences du gène mif23 de *Pyricularia oryzae* et sur la base des genomes complets de la lignée *Triticum* de *P. oryzae* ont détecté l'ADN à des taux d'infection comparables respectivement dans la semence de riz et de blé (Chadha & Gopalakrishna, 2006; Thierry et al., 2020).

L'incubation et l'observation des grains désinfectés à l'hypochlorite de sodium a révélé l'absence de conidies et de mycélium sur les grains. Cependant, des amplicons ont été observés à partir des grains désinfectés non inoculés (témoin) avec le couple d'amorces ciblant *B. oryzae* (GAPDH_Bof/GAPDH_R). Cette observation pourrait s'expliquer par une infection naturelle interne des grains ne pouvant pas être révélée par les tests d'incubation sur papier Wathman du riz paddy. Van Ba & Sangchote (2006), en disséquant la semence de riz ont montré la présence de mycélium de *B. oryzae* dans l'endosperme et l'embryon.

Les amplicons obtenus avec les lots de grains de riz contaminé naturellement à 82% (parcelle NI001) avaient une intensité plus importante que ceux obtenus avec le lot contaminé à 37% (parcelle NI002). Ce résultat, à confirmer sur une gamme plus large de pourcentage d'infection, laisse penser que le test pourrait être semi quantitatif.

Cette étude ouvre des perspectives pour une certification efficace des semences de riz au profit des producteurs et du suivi épidémiologique de l'helminthosporiose au

Burkina Faso. L'obtention de tests négatifs sur des lots indemmes de champignon sera la première étape à franchir. Des tests sur des lots non exposés aux champignons responsables de l'helminthosporiose devront être réalisés (lots récoltés en serre). Des tests de validation sur un plus grand nombre de lots de semences et de feuilles infectées naturellement sont également nécessaires pour valider la méthode. Inclure une étape d'enrichissement biologique (incubation de la semence 48 h à 72 h dans du milieu potato dextrose broth) dans la méthode d'extraction de l'ADN génomique fongique à partir des organes infectés pourrait permettre d'augmenter le seuil de détection des amorces. Développer des outils permettant la détection simultanée de *Bipolaris* spp. et des espèces aux symptômes similaires comme *Curvularia* spp., *Pyricularia oryzae* et *Ramularia oryzae* serait également très utile. Pour ce faire, il sera possible d'utiliser les séquences de génomes entiers de ces espèces pour identifier les séquences d'intérêt et dessiner des amorces pour des PCR en multiplexes. Une autre perspective de ce travail est de mettre au point la PCR quantitative (qPCR) pour réaliser des suivis épidémiologiques de l'helminthosporiose.

Conclusion générale et perspectives

L'helminthosporiose du riz est une maladie fongique émergente à l'échelle mondiale. En Afrique de l'Ouest elle est particulièrement importante en Côte d'Ivoire (Bouet et al., 2015), au Burkina Faso (Ouédraogo, 2008 ; Barro et al., 2021), au Ghana (Nutsugah & Twumasi, 2001) et au Nigéria (Nneke, 2012). L'impact de l'helminthosporiose sur la culture du riz a été démontré dans de nombreux pays. Au Burkina Faso, la maladie peut induire des pertes de rendements allant jusqu'à 16% (Ouédraogo, 2008). Les grains de riz en parcelle paysanne sont fortement infectés, et dans la partie Ouest du pays 80% des rizières présentent des symptômes de l'helminthosporiose (Barro et al., 2021). Pour lutter contre cette maladie et comprendre sa ré-émergence, nous manquons de connaissances et d'outils. Les espèces associées à la maladie n'ont pas été caractérisées en détail dans différents pays. Des outils de diagnostic précis utilisables à moyen débit (quelques centaines d'échantillons) ou utilisables avec des techniques de PCR classique, ne sont pas disponibles. La biologie, la diversité génétique et la structuration des populations des agents pathogènes responsables de l'helminthosporiose du riz restent peu connues.

Les objectifs de cette thèse étaient donc de déterminer les espèces responsables de l'helminthosporiose du riz, en particulier en Afrique de l'Ouest, et de caractériser leur pathogénicité en milieu contrôlé, d'analyser la diversité génétique des espèces les plus fréquentes au Burkina Faso et de développer des outils de détection.

Identification des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz par GBS

Pour l'identification des espèces fongiques responsables ou associées aux symptômes de l'helminthosporiose du riz en Afrique de l'Ouest, nous avons appliqué la technique de *Genotyping-by-sequencing* (GBS) à des isolats issus d'Afrique (Burkina Faso, Bénin, Togo, Ghana, Mali et Sénégal), d'Asie (Chine, Pakistan et Vietnam), d'Amérique (USA et Colombie) et d'Europe (France et Italie). Le GBS est une technologie née du

séquençage de nouvelle génération qui produit de multiples marqueurs dispersés sur l'ensemble du génome et qui peuvent être utilisés pour des études de phylogénie et de diversité génétique. Le principe de l'utilisation du GBS pour l'assignation taxonomique est basé sur l'homologie des séquences produites avec les génomes entiers d'espèces potentiellement responsables de la maladie. Pour avoir une vision globale des espèces incriminées dans l'helminthosporiose du riz et pour s'assurer de la disponibilité des génomes de référence nécessaires pour le GBS, 112 isolats issus des symptômes de l'helminthosporiose du riz ont d'abord été caractérisés avec les amorces universelles ITS5/ITS4, GPD1/GPD2 et TEF1-983/TEF1-2218. A travers cette analyse les isolats appartenant aux espèces *Bipolaris bicolor* (1/112), *B. maydis* (3/112), *B. oryzae* (54/112) et *Exserohilum rostratum* (19/112) ont été assignées sans ambiguïté par les 3 couples d'amorces. L'assignation taxonomique des 35 isolats restants s'est limitée au genre car l'assignation au niveau de l'espèce variait en fonction de la région génomique considérée. Dans un tiers des cas, le séquençage des trois gènes n'est donc pas suffisant pour assigner les isolats à une espèce. Les outils de séquençage des génomes offrent la possibilité de contourner ce problème. Mais pour cela il faut disposer de génomes complets assemblés de référence pour les espèces suspectées. La recherche dans les bases de données, a montré que pour les espèces *B. bicolor*, *B. secalis*, *B. yamadae*, *C. hawaiiensis*, *C. spicifera* et *E. rostratum* les génomes complets n'étaient pas disponibles. **Dans cette étude nous avons donc produit de nouvelles ressources en séquençant et assemblant les génomes complets d'isolats de ces espèces.** Notre étude a montré que des souches de l'espèce *B. cynodontis* peuvent être isolées du riz. Il serait donc utile de séquencer le génome d'une de ces souches pour continuer à compléter la gamme des génomes de référence disponibles.

La comparaison des résultats des isolats assignés par les 3 régions génomiques et l'assignation par le GBS montre une concordance de 94% validant l'intérêt du GBS pour l'assignation taxonomique des espèces aussi complexes. La technologie du GBS a permis de multiplexer 505 isolats, de les séquencer en une seule fois et de pouvoir

assigner 469 d'entre eux soit 93% des isolats analysés. Le GBS a même permis d'assigner à une espèce une majorité (86%) des 35 isolats pour lesquels l'identification par les 3 régions génomiques (ITS, GAPDH et TEF) n'avait pas été concordante.

Au cours de ce travail nous avons donc pour la première fois appliqué le GBS pour l'assignation d'isolats aux espèces responsables de l'helminthosporiose du riz et démontré l'intérêt de cette technique pour identifier l'espèce d'un grand nombre d'isolats.

Coexistence d'espèces et émergence de l'helminthosporiose du riz

L'alignement des séquences GBS des 469 isolats aux génomes de référence, produits dans cette étude ou disponibles dans les bases de données, a montré que les isolats des symptômes de l'helminthosporiose du riz sont des espèces de *Bipolaris* (*B. bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae*, *B. sorokiniana*, *B. secalis* et *B. yamadae*), de *Curvularia* (*C. hawaiiensis*, *C. papendorfi* et *C. spicifera*) et de *Exserohilum* (*E. rostratum* et *E. turcicum*). Dans notre échantillon, *B. oryzae* et *E. rostratum* sont les 2 espèces majoritairement isolées des symptômes de l'helminthosporiose du riz. *Bipolaris oryzae* était déjà connue pour être un des principaux agents responsables de l'helminthosporiose du riz. Mais **l'analyse de notre échantillon (Afrique, Asie, Amérique et Europe) a montré que *E. rostratum* est également très largement distribuée** puisque nous avons pu l'isoler à partir des symptômes de riz malade du Bénin, Burkina Faso, Ghana, Mali, Pakistan, Sénégal, Togo et USA. Si on en juge par les publications de premier signalement de *E. rostratum* sur le riz (Venezuela : Cardona et Gonzalez, 2007 ; Brésil : Silva et al., 2016 ; Pakistan : Majeed et al., 2016b ; Malaisie : Toher et al., 2016 ; Mali : Kabore et al., 2021), l'expansion de cet agent pathogène pourrait être récente. **En outre, les analyses que nous avons conduites au Burkina Faso ont montré que les deux espèces coexistent très fréquemment dans la même parcelle. Nos travaux soulèvent donc deux nouvelles questions :**

1) la présence de *E. rostratum* en plus de *B. oryzae* pourrait-elle expliquer

**l'émergence de la maladie observée au cours de ces dernières décennies, 2)
Quelles sont les interactions entre ces deux espèces à l'échelle de la plante et de la parcelle ?**

Ce travail sur la distribution géographique de *E. rostratum* doit être approfondi en équilibrant (nombre) et homogénéisant (type de prélèvement) les échantillons de collecte entre les pays. Un échantillonnage spécifique devra également être conduit pour déterminer si *B. oryzae* et *E. rostratum* coexistent sur la même plante et à quelle échelle (sur la même feuille ? sur un grain ? dans une lésion ?).

Comparaison de la pathogénicité des principales espèces responsables de l'helminthosporiose

Les tests de pathogénicité des espèces de *B. oryzae*, *B. bicolor*, *B. maydis*, *B. sorokiniana*, *C. spicifera* et *E. rostratum* ont été réalisés par pulvérisation de suspensions conidiennes sur 6 cultivars de riz. Aucune interaction espèce x variété ou isolat x variété n'a été observée. Ce résultat, qu'il faudra confirmer sur un panel plus large de variétés, semble montrer que la résistance du riz aux espèces testées est non spécifique. Les cultivars de riz du Burkina Faso (FKR 19 et FKR 62N) ont été moins infectés par les différentes espèces responsables de l'helminthosporiose comparativement à la variété de riz Kitaake d'origine Japonaise et la variété Française Manobi. La tolérance des variétés FKR 19 et FKR 62N à l'helminthosporiose du riz a été également constaté dans d'autres études (Ouédraogo, 2008 ; Dembélé, 2014 ; Boka et al., 2018). Il serait intéressant d'utiliser ces variétés dans des analyses génétiques (analyse de Quantitative Trait Loci par exemple) en vue d'identifier de potentiels gènes de résistance contre l'helminthosporiose du riz.

Il ressort également des analyses de pathogénicité comparée que *B. oryzae* est l'espèce la plus pathogène. Elle est suivie de *B. maydis*. *Exserohilum rostratum* est peu pathogène en conditions contrôlées mais très présente au champ surtout au Burkina Faso. Il serait donc intéressant de mesurer la valeur sélective (« fitness ») de cette espèce. Pour cela, il faudra développer des outils qui permettent d'évaluer en milieu

contrôlé, en particulier, l'interaction ou la co-infection des espèces de *B. oryzae* et *E. rostratum*.

Structure et diversité génétique de *Bipolaris oryzae* et *Exserohilum rostratum*

L'étude de la structure et la diversité génétique des populations de *B. oryzae* et *E. rostratum*, s'est basée sur les marqueurs SNPs obtenus par GBS. Les analyses de clustering (DAPC et sNMF) ont toutes suggéré que l'échantillon mondial de *B. oryzae* (Bénin, Burkina Faso, Mali, Ghana, Togo, Chine, Pakistan, Vietnam, USA, Colombie, France, Italie) était constitué de 5 groupes génétiques. Les isolats de *B. oryzae* des USA et d'Europe (France et Italie) ont formé un seul groupe génétique. Les isolats de *B. oryzae* des pays d'Afrique et d'Asie étaient repartis entre les 4 autres groupes génétiques indépendamment de leur origine géographique. Du fait d'un nombre d'isolats par pays/continent parfois faible et déséquilibré, ces résultats doivent être interprétés avec prudence et ne sont utilisés que pour avoir un aperçu global de la structure des populations. **Mais, malgré les limites de l'échantillon, ils viennent déjà compléter les études antérieures en montrant qu'il y a plus de 3 groupes à l'échelle mondiale (Ahmadpour et al., 2018).** Pour approfondir la question de la structure à l'échelle mondiale, les études futures devront se baser sur un plus grand nombre d'isolats par pays et inclure des échantillons des pays producteurs de riz importants comme le Madagascar, l'Egypte, le Nigéria, la Côte d'Ivoire et la Guinée pour le continent africain, le Bangladesh, l'Inde, l'Indonésie, l'Iran et la Thaïlande pour le continent asiatique, et l'Espagne pour le continent européen. Avec un échantillon élargi, il sera possible de mieux caractériser la structure et la diversité génétique de *B. oryzae* à l'échelle du monde et de faire des hypothèses sur le centre de diversité et l'histoire des migrations de cette espèce.

La diversité génétique des populations de *B. oryzae* a été étudiée dans des pays asiatiques (Kamal & Mia, 2009 ; Kandan et al., 2013 ; Archana et al., 2014a ; Kumar et al., 2016 ; Ahmadpour et al., 2018 ; Chajjuckam et al., 2019) et aux USA (Castell-Miller & Samac, 2012). Ces études ont montré une forte diversité génotypique et génétique

de *B. oryzae*. Au niveau du Burkina Faso, la diversité de *B. oryzae* dans les 6 zones rizicoles échantillonnées (Bagré, Bama, Banzon, Karfiguela, Sourou et Tingréla) a montré 4 groupes génétiques. Aucun groupe génétique spécifique à une zone rizicole n'a été identifié. Les populations étaient faiblement structurées (valeur moyenne de $F_{ST} = 0,008$) ce qui suggère des échanges génétiques entre populations distantes géographiquement et confirme les études conduites dans d'autres pays. La caractérisation des types sexuels MAT1-1 et MAT1-2 de *B. oryzae* a montré une distribution quasi-équilibrée à un niveau local (rizières). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus aux USA pour des populations isolées de *Zizania palustris* et en Iran pour des populations isolées sur le riz. En outre, **l'analyse avec un grand nombre de marqueurs distribués sur l'ensemble du génome vient apporter une information nouvelle sur la recombinaison chez *B. oryzae*. En effet, le test de clonalité (PHI test) significatif et la décroissance rapide du déséquilibre de liaison le long du génome suggèrent des recombinaisons fréquentes. Ces caractéristiques génétiques et biologiques sont compatibles avec l'existence de la reproduction sexuée.**

A notre connaissance, la caractérisation de la structure et de la diversité de populations de *E. rostratum* isolées du riz que nous avons conduite au Burkina Faso est une première pour cette espèce. Les travaux de Kusai et al. (2016) ont mesuré les fréquences des deux signes de compatibilité sexuelle de 45 isolats de Malaisie mais n'ont pas décrit la diversité et la structure des populations. Chez les populations de *E. rostratum* du Burkina Faso, comme pour *B. oryzae*, nous avons observé une faible différenciation entre 4 groupes génétiques et une très faible différenciation entre populations géographiques.

Par ailleurs, la décroissance rapide du déséquilibre de liaison en fonction de la distance physique entre marqueurs et le rejet de l'hypothèse de clonalité par un test Phi, suggèrent de la recombinaison et donc potentiellement de la reproduction sexuée. Par contre, la distribution des types sexuels à l'échelle des rizières n'est pas équilibrée. Une dominance du type sexuel MAT1-2 a été observée, ce qui n'est pas

compatible avec l'hypothèse de reproduction sexuée d'une espèce décrite comme hétérothallique. Les données génétiques sont donc compatibles avec l'hypothèse de la reproduction sexuée mais pas les données biologiques. Il se pourrait que cette situation soit expliquée par un homothallisme partiel. Cette hypothèse devra être testée en déterminant si les isolats porteurs des deux signes de compatibilité sexuelle sont capables de se croiser avec eux-mêmes, avec des souches MAT1-1 et avec des souches MAT1-2.

Globalement, ce travail de caractérisation des populations de *B. oryzae* et *E. rostratum* offre des perspectives d'extension à d'autres zones géographiques. Ces études pourraient être couplées à des analyses épidémiologiques, en particulier pour identifier les voies de dissémination.

Développement d'outils de détection

Pour définir des amorces spécifiques aux espèces responsables de l'helminthosporiose du riz les gènes GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) de 112 isolats de *Helminthosporium* issus du Burkina Faso, du Mali, de France, du Pakistan et du Sénégal ont été séquencés. Des alignements multiples des séquences de gènes produites ont été réalisés entre elles et entre les séquences d'isolats de référence disponibles dans les bases de données. Les zones polymorphes entre les espèces nous ont permis de définir des couples d'amorces GAPDH_Bspf/GAPDH_R, GAPDH_Bof/ GAPDH_R, GAPDH_Bmf/ GAPDH_R et GAPDH_Erf/ GAPDH_R pour détecter spécifiquement le genre *Bipolaris*, les espèces *B. oryzae*, *B. maydis* et *E. rostratum*.

Nous avons pu montrer que ces amorces étaient très spécifiques puisque l'amplification des ADN des espèces cibles (taux de vrais négatifs) a été de 100% pour tous les couples d'amorces. La sensibilité (taux de vrais positifs) s'est avérée très bonne également (entre 97 et 100% en fonction des espèces). Enfin, les amplifications des isolats de *B. oryzae*, *B. maydis* et *E. rostratum* avec respectivement les couples

d'amorces Bof/R, Bmf/R et Erf/R ont montré un seuil de détection relativement bas (0,01 ng/μL à 10 ng/μL).

Pour déterminer le potentiel des amorces Bof/R et Erf/R à détecter respectivement *B. oryzae* et *E. rostratum* dans les organes du riz, des feuilles et des lots de grains infectés naturellement ou inoculés ont été testés. Ces amorces ont également été utilisées avec succès sur des échantillons de riz avec des symptômes. Les amplifications réalisées à partir des ADN extraits directement des feuilles inoculées (suspensions conidiennes) et infectées naturellement (rizière présentant les symptômes de l'helminthosporiose) par *B. oryzae* ont permis d'obtenir des amplicons avec le couple d'amorces spécifique à *B. oryzae* (GAPDH_Bof/GAPDH_R). Pour les feuilles inoculées et infectées naturellement par *E. rostratum* des amplicons ont été aussi obtenus avec le couple d'amorces spécifique à cette espèce (GAPDH_Erf/GAPDH_R). **L'objectif de développer un outil qui soit utilisable au Burkina Faso pour la détection des deux principales espèces responsables de l'helminthosporiose du riz a donc été atteint.**

Sur les grains de riz inoculés, chaque couple d'amorces a permis une détection spécifique à partir d'un taux d'infection de 0,25%. Cependant, des amplifications d'ADN ont été également observées avec les lots de grains témoins non inoculés. Cette amplification pourrait être due à la présence d'inoculum dans l'embryon et/ou l'endosperme des grains. En effet, on ne peut pas exclure que le traitement à l'hypochlorite de sodium n'a pas permis la désinfection de l'embryon et/ou de l'endosperme. L'incubation des grains sur papier Whatman n'a pas révélé la présence de champignon vivant mais ce test pourrait ne pas être suffisant pour révéler la présence dans l'embryon et l'endosperme. Nous ne pouvons pas exclure non plus qu'il n'y ait plus de champignon vivant mais que de l'ADN soit toujours présent après désinfection à l'hypochlorite de sodium. Pour aller plus loin dans la validation de la méthode, des tests sur des lots de semences non exposés (production en serre) aux champignons responsables de l'helminthosporiose devront être réalisés dans les études à venir. Il faudra aussi poursuivre des tests de validation sur un plus grand

nombre de lots de semence et de feuilles infectées naturellement. Inclure une étape d'enrichissement biologique par une incubation des grains de 48 à 72 h dans milieu liquide *potato dextrose broth* pourrait augmenter le seuil de détection du protocole, surtout pour les grains infectés naturellement.

Les tests d'amplifications PCR réalisés sur les ADN permettent une détection spécifique des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz. Cependant, la similarité entre les espèces n'a pas permis de définir des amorces créant une grande différence au niveau des tailles des amplicons et qui seraient utilisables en PCR multiplexes. L'utilisation des séquences de génomes entiers des espèces responsables de l'helminthosporiose du riz dans les études futures pourrait permettre de définir des amorces pour des PCR multiplexes de *Bipolaris* spp. et les espèces aux symptômes similaires à l'helminthosporiose du riz comme *Curvularia* spp., *Pyricularia oryzae* et *Ramularia oryzae*. Par ailleurs, il serait souhaitable de développer des outils de PCR quantitative (qPCR) pour la détection et le suivi de l'helminthosporiose du riz.

Références bibliographiques

- Agrama, H. A., Yan, W., Jia, M., Fjellstrom, R., & McClung, A. M. (2010). Genetic structure associated with diversity and geographic distribution in the USDA rice world collection. *Natural Science*, 02(04), 247-291. <https://doi.org/10.4236/ns.2010.24036>
- Ahmadpour, A., Castell-Miller, C., Javan-Nikkhah, M., Naghavi, M. R., Dehkaei, F. P., Leng, Y., Puri, K. D., & Zhong, S. (2018). Population structure, genetic diversity, and sexual state of the rice brown spot pathogen *Bipolaris oryzae* from three Asian countries. *Plant Pathology*, 67, 181-192. <https://doi.org/10.1111/ppa.12714>
- Alam, S., Seth, R., Singh, H., Srivastava, J., & Shukla, D. (2016). Screening of Disease Resistant Varieties against Brown Leaf Spot of *Oryza sativa* in Allahabad, India. *American Journal of Experimental Agriculture*, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.9734/AJEA/2016/29059>
- Alias, A., Kobayashi, H., Matsumura, I., & Ito, S. (2008). *World rice demand towards 2025 : Impact of decreasing demand of per capita rice consumption for China and India* (Asmadi Hassan, Md Nasrudin Md Akhir, p. 17).
- Alkan, M., Bayraktar, H., İmren, M., Özdemir, F., Lahlali, R., Mokrini, F., Paulitz, T., Dababat, A. A., & Özer, G. (2022). Monitoring of Host Suitability and Defense-Related Genes in Wheat to *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Fungi*, 8(2), 149. <https://doi.org/10.3390/jof8020149>
- Almeida, M. F. de, Costa, S. da S., Dias, I. E., Siqueira, C. da S., & Machado, J. da C. (2020). Specificity and sensibility of primer pair in the detection of *Colletotrichum gossypii* var. *Cephalosporioides* in cotton seeds by PCR technique. *Journal of Seed Science*, 42, e202042012. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v42229530>
- Amorio, D. J. H., & Cumagun, C. J. R. (2017). Pathogenicity and cytological examination of adapted and non- adapted *Bipolaris* species on resistant and susceptible cultivars of rice and corn. *Mycosphere*, 8(3), 377-391. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/3/3>
- Andes, D., & Casadevall, A. (2013). Insights into fungal pathogenesis from the iatrogenic epidemic of *Exserohilum rostratum* fungal meningitis. *Fungal Genetics and Biology*, 61, 143-145. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.014>
- Archana, B. (2014). *Phylogenetic Analysis of Bipolaris oryzae, Host-Pathogen Interactions and Elicitor Mediated Management of Brown Spot of Rice*. [pHD thesis]. University of Mysore.
- Archana, B., Kini, K. R., & Prakash, H. S. (2014a). Genetic diversity and population structure among isolates of the brown spot fungus, *Bipolaris oryzae*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *African Journal of Biotechnology*, 13(2), 238-244. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12063>
- Archana, B., Kini, K. R., & Prakash, H. S. (2014b). Study of genomic fingerprints profile of Indian *Bipolaris oryzae* from rice (*Oryza sativa*) by RAPD-PCR. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 3(1), 83-92.
- Arshad, H. M. I., Hussain, N., Ali, S., Khan, J. A., Saleem, K., & Babar, M. M. (2013). Behavior of *Bipolaris oryzae* at different temperatures, culture media, fungicides and rice germplasm for resistance. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 25(1), 84-90.
- Aryal, L., Bhattarai, G., Subedi, M., Subedi, B., & Sah, G. K. (2016). Response of rice varieties to brown spot disease of rice at Paklihawa, Rupandehi. *Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences*, 5(2), 50-54.
- Asghar, M., Baig, M. M. Q., Chaudhary, S., & Ali, M. A. (2019). Evaluation of Difenoconazole along with Macronutrients Spray for the Control of Brown Leaf Spot (*Bipolaris oryzae*) Disease in

- Rice (*Oryza sativa*) Crop. *Sarhad Journal of Agriculture*, 35(1).
<https://doi.org/10.17582/journal.sja/2019/35.1.1.6>
- Ashfaq, B., Arshad, H. M. I., Atiq, M., Yousaf, S., Saleem, K., & Arshad, A. (2021). Biochemical Profiling of Resistant Phenotypes Against *Bipolaris oryzae* Causing Brown Spot Disease in Rice. *Frontiers in Agronomy*, 3, 675895. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.675895>
- Aslam, H. M., Ali, S., Atiq, M., Mansha, M. Z., Aatif, H. M., Anwaar, H. A., & Naveed, K. (2020). First report of brown leaf spot of rice caused by *Curvularia spicifera* in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00517-2>
- Aslam, H. M., Gleason, M. L., Ikram, A., Alam, M. W., Ahmed, M. Z., Mansha, M. Z., Yasin, O., Hameed, A., & Amrao, L. (2019). First Report of Brown Leaf Spot of Rice Caused by *Curvularia hawaiiensis* in Pakistan. *Plant Disease*, 103(10), 2679. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0311-PDN>
- Aslam, H. M. U., Naveed, K., Hussain, S. I., Shakeel, Q., Ashraf, W., Anwaar, H. A., Raza, M. M., Sarfraz, S., & Tariq, I. (2021). First Report of Brown Leaf Spot of Rice Caused by *Bipolaris zeicola* in Pakistan. *Plant Disease*, 105(1), 212. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-20-0838-PDN>
- Bahous, M., Ouazzani, T. A., Benkirane, R., & Douira, A. (2010). Influence de l'âge de la plante sur la réceptivité des feuilles du riz à la pyriculariose, l'helminthosporiose et la curvulariose. *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, 1, 73-84.
- Bakhshi, M., & Zare, R. (2020). Development of new primers based on gapdh gene for *Cercospora* species and new host and fungus records for Iran. *Mycologia Iranica, Online First*. <https://doi.org/10.22043/mi.2020.122549>
- Balasubramanian, V., Sie, M., Hijmans, R. J., & Otsuka, K. (2007). Increasing Rice Production in Sub-Saharan Africa : Challenges and Opportunities. In *Advances in Agronomy* (Vol. 94, p. 55-133). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(06\)94002-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(06)94002-4)
- Balgude, Y. S., & Gaikwad, A. P. (2016). Integrated Management of Grain Discolouration Disease in Paddy. *Journal of Rice Research* 9(2), 4.
- Bari, B. S., Islam, M. N., Rashid, M., Hasan, M. J., Razman, M. A. M., Musa, R. M., Ab Nasir, A. F., & P.P. Abdul Majeed, A. (2021). A real-time approach of diagnosing rice leaf disease using deep learning-based faster R-CNN framework. *PeerJ Computer Science*, 7, e432. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.432>
- Barnwal, M. K., Kotasthane, A., Magculia, N., Mukherjee, P. K., Savary, S., Sharma, A. K., Singh, H. B., Singh, U. S., Sparks, A. H., Variar, M., & Zaidi, N. (2013). A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. *European Journal of Plant Pathology*, 136(3), 443-457. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0195-6>
- Barro, M., Kassankogno, A. I., Wonni, I., Sereme, D., Somda, I., Kaboré, K. H., Bena, G., Brugidou, C., Tharreau, D., & Tollenaere, C. (2021). Spatiotemporal Survey of Multiple Rice Diseases in Irrigated Areas Compared to Rainfed Lowlands in the Western Burkina Faso. *Plant Disease*, PDIS-03-21-0579-RE. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0579-RE>
- Barúa, M., Quintana, L., & Ortiz, A. (2019). Chemical control of rice brown spot (*Bipolaris oryzae*) in Paraguay. *Tropical Plant Research*, 6(1), 148-151. <https://doi.org/10.22271/tpr.2019.v6.i1.021>
- Bekheet, S. M., El-Bebany, A. F., Aboshosha, S. S., Saleh, M. M., & M. Shams, A. H. (2021). Pathogenicity Evaluation of *Bipolaris oryzae* Isolates on Egyptian Rice Cultivars. *Alexandria Science Exchange Journal*, 42(3), 609-617. <https://doi.org/10.21608/asejaiqjsae.2021.185714>

- Bennett, J., Cohen, M. B., Katiyar, S. K., & Ghareyazie, B. (1997). Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. In *Advances in insect control* (Carozzi N, Koziel M, p. 75-93). Taylor & Francis.
- Berbee, M. L., Pirseyedi, M., & Hubbard, S. (1999). *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91(6), 964-977. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061106>
- Bernaux, P. (1981). Champignons recensés sur le riz en Camargue. *Bulletin de la société mycologique de France*, 1, 15-21.
- Bhunjun, C. S., Dong, Y., Jayawardena, R. S., Jeewon, R., Phukhamsakda, C., Bundhun, D., Hyde, K. D., & Sheng, J. (2020). A polyphasic approach to delineate species in *Bipolaris*. *Fungal Diversity*, 102(1), 225-256. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00446-6>
- Biswas, M. K., Quiry, S., & Ghosh, T. (2018). Brown spot caused by *Bipolaris oryzae* (BREDA DE HAAN). *Bionature*, 38, 86-95.
- Boka, A., Bouet, A., Tiendrebeogo, A., Kassankogno, A. I., Ouedraogo, I., Nda, G. N. E., Denezon, O. D., & Adiko, A. (2018). Pathogenic Variability of *Bipolaris oryzae* Causing Leaf Spot Disease of Rice in West Africa. *International Journal of Phytopathology*, 7(3), 103-110. <https://doi.org/10.33687/phytopath.007.03.2643>
- Boka, A., & Denezon, O. D. (2020). Field evaluation of Nativo 300 SC fungicide (Trifloxystrobin 100 g l⁻¹ + Tebuconazole 200 g l⁻¹) on rice brown spot (*Oryza sativa* L.). *Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences*, 177-182. <https://doi.org/10.22194/JGIASS/8.919>
- Bouet, A., Gbedie, N. A., Boka, A., & Kouassi, N. (2015). Evaluation des variétés de riz prometteuses pour la résistance à quelques contraintes biotiques majeures et pour leurs performances agronomiques en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(4), 2041-2056. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v9i4.27>
- Bouet, A., Gueu, R. K., Boka, A., Noumouha, G. N. E., & Denezon, O. D. (2020). Efficacité au champ de l'ANTRACOL 70 WP, un fongicide à base du Propineb 70%, sous pression naturelle de l'helminthosporiose du riz due à *Bipolaris oryzae*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 14(6), 2230-2239. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v14i6.24>
- Breda de Haan, J. van. (1900). Vorläufige Beschreibung von Pilzen, bei tropischen Kulturpflanzen beobachtet. *Bulletin de l'Institut Botanique de Buitenzorg*, 6, 11-13.
- Bregaglio, S., Donatelli, M., & Confalonieri, R. (2013). Fungal infections of rice, wheat, and grape in Europe in 2030–2050. *Agronomy for Sustainable Development*, 33, 767-776. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0149-6>
- Burgos, M. R. G., Katimbang, M. L. B., Dela Paz, M. A. G., Beligan, G. A., Goodwin, P. H., Ona, I. P., Mauleon, R. P., Ardales, E. Y., & Vera Cruz, C. M. (2013). Genotypic variability and aggressiveness of *Bipolaris oryzae* in the Philippines. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 415-429. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0256-x>
- CABI. (2022). *Brown leaf spot of rice, Cochliobolus miyabeanus*. CAB International, [Downloaded Janvier 2022]. <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/datasheet/14691#>. <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/datasheet/14691#>
- Cardona, R., & Gonzáles, M. S. (2007). First report of *Exserohilum rostratum* associated with rice seed in Venezuela. *Plant Disease*, 91, 226.

- Cardwell, K., Dennis, G., Flannery, A. R., Fletcher, J., Luster, D., Nakhla, M., Rice, A., Shiel, P., Stack, J., Walsh, C., & Levy, L. (2018). Principles of Diagnostic Assay Validation for Plant Pathogens : A Basic Review of Concepts. *Plant Health Progress*, *19*(4), 272-278. <https://doi.org/10.1094/PHP-06-18-0036-RV>
- Castell-Miller, C. V., Gutierrez-Gonzalez, J. J., Tu, Z. J., Bushley, K. E., Hainaut, M., Henrissat, B., & Samac, D. A. (2016). Genome Assembly of the Fungus *Cochliobolus miyabeanus*, and Transcriptome Analysis during Early Stages of Infection on American Wildrice (*Zizania palustris* L.). *PLoS ONE*, *11*(6), 31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154122>
- Castell-Miller, C. V., & Samac, D. A. (2012). Population genetic structure, gene flow and recombination of *Cochliobolus miyabeanus* on cultivated wildrice (*Zizania palustris*). *Plant Pathology*, *61*, 903-914. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02581.x>
- Castell-Miller, C. V., & Samac, D. A. (2019). Sensitivity of *Bipolaris oryzae* Isolates Pathogenic on Cultivated Wild Rice to the Quinone Outside Inhibitor Azoxystrobin. *Plant Disease*, *103*, 1910-1917. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2267-RE>
- Chadha, S., & Gopalakrishna, T. (2006). Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(5), 1147-1153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02920.x>
- Chaijuckam, P., Songkumarn, P., & Guerrero, J. (2019). Genetic Diversity and Aggressiveness of *Bipolaris oryzae* in North-Central Thailand. *Applied Science and Engineering Progress*, *12*(2), 116-125. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2019.03.004>
- Chang, T.-T., & Bardenas, E. A. (1965). The morphology varietal characteristics of the rice plant. *Technical Bulletin*, *4*, 40.
- Channakeshava, C., & Pankaja, N. S. (2018). Performance of Paddy Varieties against Brown Leaf Spot Disease under Flooded Conditions in Mandya District, Karnataka, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(12), 33-38.
- Chelak, Y. K., Tripathi, S., Jain, A., Kumar, A., & Kumar, B. (2019). Integrated disease management of rice in Madhya Pradesh. *International Journal of Chemical Studies*, *7*(3), 374-376.
- Chen, J., Zhang, D., Nanekaran, Y. A., & Li, D. (2020). Detection of rice plant diseases based on deep transfer learning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(7), 3246-3256. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10365>
- Chivenge, P., Angeles, O., Hadi, B., Acuin, C., Connor, M., Stuart, A., Puskur, R., & Johnson-Beebout, S. (2020). Ecosystem services in paddy rice systems. In *The Role of Ecosystem Services in Sustainable Food Systems* (p. 181-201). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816436-5.00010-X>
- Choi, J., & Kim, S.-H. (2017). A genome Tree of Life for the Fungi kingdom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(35), 9391-9396. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711939114>
- Condon, B. J., Leng, Y., Wu, D., Bushley, K. E., Ohm, R. A., Otilar, R., Martin, J., Schackwitz, W., Grimwood, J., MohdZainudin, N., Xue, C., Wang, R., Manning, V. A., Dhillon, B., Tu, Z. J., Steffenson, B. J., Salamov, A., Sun, H., Lowry, S., ... Turgeon, B. G. (2013). Comparative Genome Structure, Secondary Metabolite, and Effector Coding Capacity across *Cochliobolus* Pathogens. *PLoS Genetics*, *9*(1), 29. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003233>
- Condon, B. J., Wu, D., Kraševac, N., Horwitz, B. A., & Turgeon, B. G. (2014). Comparative Genomics of *Cochliobolus* Phytopathogens. In R. A. Dean, A. Lichens-Park, & C. Kole (Éds.), *Genomics of*

- Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens* (p. 41-67). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44053-7_2
- Crous, P., Wingfield, M. J., Guarro, J., Cheewangkoon, R., Van der Bank, M., & Swart, W. J. (2013). Fungal Planet description sheets. *Persoonia*, 31, 154-213.
- Cubry, P., Tranchant-Dubreuil, C., Thuillet, A.-C., Monat, C., Ndjioudjop, M.-N., Labadie, K., Cruaud, C., Engelen, S., Scarcelli, N., Rhoné, B., Burgarella, C., Dupuy, C., Larmande, P., Wincker, P., François, O., Sabot, F., & Vigouroux, Y. (2018). The Rise and Fall of African Rice Cultivation Revealed by Analysis of 246 New Genomes. *Current Biology*, 28(14), 2274-2282.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.066>
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Dariush, S., Darvishnia, M., Ebadi, A.-A., Padasht-Dehkaei, F., & Bazgir, E. (2020). Screening brown spot resistance in rice genotypes at the seedling stage under water stress and irrigated conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(5-6), 247-265. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1741855>
- Datnoff, L. E., Raid, R. N., Snyder, G. H., & Jones, D. B. (1991). Effect of Calcium Silicate on Blast and Brown Spot Intensities and Yields of Rice. *Plant Disease*, 75(7), 729-732.
- Davet, P. (1962). *Observations phytosanitaires sur les riz cultivés en Côte d'Ivoire et Haute Volta pendant la campagne 1962*. ORSTOM.
- De Bruyne, L. (2015). *Interplay between phytotoxins and ethylene mediates rice brown spot disease, caused by Cochliobolus miyabeanus*. [PhD thesis, Ghent University, Belgium]. <https://biblio.ugent.be/publication/5964292/file/5964304.pdf>.
- Deepak, C. A., Mothukapalli, K. P., Hirehally, B. M., Chethana, C., Devanna, P., Nagaraj Banakar, S., Basavegowda Manojkumar, H., & Rajendra Prasad, S. (2022). Rice Blast Disease in India : Present Status and Future Challenges. In M. Huang (Éd.), *Integrative Advances in Rice Research*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98847>
- Dembélé, A. S. (2014). *Caractérisation morphologique et pathogénique de quelques isolats de Bipolaris oryzae (Breda de Haan), agent causal de l'helminthosporiose du riz et identification de sources de résistance génétique* [Mémoire d'ingénieur]. Centre agricole polyvalent de Matourkou.
- Deshpande, K. S., & Deshpande, K. B. (1966). Contributions to the taxonomy of Genus *Helminthosporium* I. *Sydowia*, 20, 39-46.
- Dey, M., & Monjil, M. S. (2016). Comparative efficacy of BAU-Biofungicide and some chemical fungicides in controlling leaf blast and brown spot of rice. *Bangladesh J. Plant Pathol.*, 32(1 & 2), 43-47.
- Diagne, A., Amovin-Assagba, E., Futakachi, K., & Wopereis, M. C. S. (2013). Farmers perceptions of the biophysical constraints to rice production in sub-Saharan Africa, and potential impact of research. In *Realizing Africa's rice promise* (M.C.S. Wopereis, D.E. Johnson, N. Ahmadi, E. Tollens, A. Jalloh, p. 46-68). CABI.
- Dingkuhn, M., Audebert, A. Y., Jones, M. P., Etienne, K., & Sow, A. (1999). Control of stomatal conductance and leaf rolling in *O. sativa* and *O. glaberrima* upland rice. *Field Crops Research*, 61(3), 223-236. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(98\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(98)00165-8)

- Dizès, J., Bois, J. F., Lascève, G., & Couchat, P. (1988). *Aspects morphologiques du plant de riz*. ORSTOM. https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers14-11/27827.pdf
- Doebley, J. F., Gaut, B. S., & Smith, B. D. (2006). The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, *127*(7), 1309-1321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.006>
- Dong, L., Liu, S., Kyaing, M. S., Xu, P., Tharreau, D., Deng, W., Li, X., Bi, Y., Zeng, L., Li, J., Zhou, J., Tao, D., & Yang, Q. (2020). Identification and Fine Mapping of Pi69(t), a New Gene Conferring Broad-Spectrum Resistance Against *Magnaporthe oryzae* From *Oryza glaberrima* Steud. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1190. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01190>
- Dorneles, K. D. R., Pazdiora, P. C., Silva, F. J. A., Moccellin, R., & Farias, C. R. J. (2018). Control of *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) using *Curcuma longa* (Linnaeus) extract and effect of this extract on rice seed physiology. *Revista Caatinga*, *31*(1), 99-105. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n112rc>
- Doyle, J. J., & Doye, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, *19*(1), 11-15.
- Drechsler, C. (1923). Some graminicolous species of *Helminthosporium*. *Journal of Agricultural Research*, *XXIV*(8), 641-713.
- El-Abbasi, I. H., Khalil, A. A., Awad, H. M., & Shoala, T. (2020). Nano-diagnostic technique for detection of rice pathogenic fungus *Pyricularia oryzae*. *Indian Phytopathology*, *73*(4), 673-682. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00254-7>
- El-Shafey, R. A. S., Attia, K. A., Mostafa, F. A., & Elamawi, R. M. (2018). Incidence and Molecular Identification of *Cochliobolus carbonum* as Causal Organism of Rice Seedling Blight. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *7*(4), 652-662. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.07.010>
- El-Shafey, R. A. S., Elamawi, R. M., El-Wahsh, S. M., Abdalkhalek, A. F., Badr, E. A. S., & El-Refae, Y. Z. A. (2011). Morpho-Pathological and Molecular Variation Studies among different Pathotypes of *Helminthosporium* Fungus Causing Brown Spot Disease of Rice. *Egyptian Journal of Phytopathology*, *39*(1), 135-153.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE*, *6*(5), e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- EPPO. (2022). *Bipolaris oryzae* (COCHMI). EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/COCHMI>
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, *131*(2), 479-491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>
- Fahad, S., Adnan, M., Noor, M., Arif, M., Alam, M., Khan, I. A., Ullah, H., Wahid, F., Mian, I. A., Jamal, Y., Basir, A., Hassan, S., Saud, S., Amanullah, Riaz, M., Wu, C., Khan, M. A., & Wang, D. (2019). Major Constraints for Global Rice Production. In *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance* (p. 1-22). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814332-2.00001-0>
- Faivre-Rampant, O., Geniès, L., Piffanelli, P., & Tharreau, D. (2013). Transmission of rice blast from seeds to adult plants in a non-systemic way. *Plant Pathology*, *62*(4), 879-887. <https://doi.org/10.1111/ppa.12003>
- Fan, Y., Ma, J., Gui, X., An, X., Sun, S., & Dong, J. (2007). Distribution of mating types and genetic diversity induced by sexual recombination in *Setosphaeria turcica* in northern China. *Frontiers of Agriculture in China*, *1*(4), 368-376. <https://doi.org/10.1007/s11703-007-0062-3>

- Farias, C. R. J. de, Afonso, A. P. S., Pierobom, C. R., & Del Ponte, E. M. (2011). Regional survey and identification of *Bipolaris spp.* Associated with rice seeds in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciência Rural*, 41(3), 369-372. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000300001>
- Farr, D. F., & Rossman, A. Y. (2022). *Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory*. ARS, USDA [Downloaded Janvier 2022]. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
<https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Faruq, A. N. (2016). *Manual for Molecular Diagnosis of Seed Borne Fungi of Rice*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1229.1444>
- Ferdinandez, H. S., Manamgoda, D. S., Udayanga, D., Deshappriya, N., & Munasinghe, M. L. A. M. S. (2020). Morphological and molecular characterization of two graminicolous *Exserohilum* species associated with cultivated rice and early barnyard grass from Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science*, 49(5), 381. <https://doi.org/10.4038/cjs.v49i5.7805>
- Frichot, E., Mathieu, F., Trouillon, T., Bouchard, G., & François, O. (2014). Fast and Efficient Estimation of Individual Ancestry Coefficients. *Genetics*, 196(4), 973-983. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.160572>
- Fuller, D. Q. (2011). Pathways to Asian Civilizations : Tracing the Origins and Spread of Rice and Rice Cultures. *Rice*, 4(3-4), 78-92. <https://doi.org/10.1007/s12284-011-9078-7>
- Futakuchi, K., Senthilkumar, K., Arouna, A., Vandamme, E., Diagne, M., Zhao, D., Manneh, B., & Saito, K. (2021). History and progress in genetic improvement for enhancing rice yield in sub-Saharan Africa. *Field Crops Research*, 267, 108159. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108159>
- Gao, S., Li, Y., Gao, J., Suo, Y., Fu, K., Li, Y., & Chen, J. (2014). Genome sequence and virulence variation-related transcriptome profiles of *Curvularia lunata*, an important maize pathogenic fungus. *BMC Genomics*, 15(1), 627. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-627>
- Garris, A. J., Tai, T. H., Coburn, J., Kresovich, S., & McCouch, S. (2005). Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, 169(3), 1631-1638. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035642>
- Ghose, R. L. M., Ghatge, M. B., & Subrahmanyam, V. (1960). *Rice in India* (Revised ed). India Council of Agricultural Research.
- Gladieux, P., Ravel, S., Rieux, A., Cros-Arteil, S., Adreit, H., Milazzo, J., Thierry, M., Fournier, E., Terauchi, R., & Tharreau, D. (2018). Coexistence of Multiple Endemic and Pandemic Lineages of the Rice Blast Pathogen. *MBio*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.01806-17>
- Glaszmann, J. C. (1987). Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 74(1), 21-30. <https://doi.org/10.1007/BF00290078>
- Gnancadja-André, L. S., Touhami, A. O., Badoc, A., & Douira, A. (2005). Impact de la mycoflore de la feuille paniculaire du riz sur le rendement en grains. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 114, 225-236.
- Goudet, J. (2005). Hierfstat, a package for r to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 184-186. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00828.x>
- GRDB. (2016). *Brown spot of rice*. <https://grdb.gy/wp-content/uploads/2016/09/Brown-Spot-of-Rice.pdf>
- GRiSP. (2013). *Rice almanac : Source book for the most important economic activities on Earth* (Fourth Edition). IRRI.
- Groth, D. E. (1991). "Rice diseases and disorders in Louisiana. *LSU Agricultural Experiment Station Reports*. 668. <http://digitalcommons.lsu.edu/agexp/668>

- Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., & Fry, W. E. (2003). Analysis of Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. *Phytopathology*[®], 93(6), 738-746. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.738>
- Grünwald, N. J., & Hoheisel, G.-A. (2006). Hierarchical Analysis of Diversity, Selfing, and Genetic Differentiation in Populations of the Oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*[®], 96(10), 1134-1141. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1134>
- Gupta, V., Shamas, N., Razdan, V. K., Sharma, B. C., Sharma, R., Kaur, K., Singh, I., John, D., & Kumar, A. (2013). Foliar application of fungicides for the management of brown spot disease in rice (*Oryza sativa* L.) caused by *Bipolaris oryzae*. *African Journal of Agricultural Research*, 8(25), 3303-3309. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7182>
- Habib, A., Javed, N., Sahi, S. T., & Waheed, M. (2012). Detection of seed borne mycoflora of different coarse and fine rice varieties and their management through seed treatments. *Pak. J. Phytopathol.*, 24(2), 133-136.
- Hariharan, G., & Prasannath, K. (2021). Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens : A Mini Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 600234. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234>
- Harish, S., Saravanakumar, D., Radjacommare, R., Ebenezar, E. G., & Seetharaman, K. (2008). Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. *BioControl*, 53(3), 555-567. <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9098-9>
- Hau, F. C., & Rush, M. C. (1980). A system for inducing sporulation of *Bipolaris oryzae*. *Plant Disease*, 64, 788-789.
- Hau, F. C., & Rush, M. C. (1982). Preinfectional interaction between *Helminthosporium oryzae* and resistant and susceptible rice plants. *Phytopathology*, 72, 285-292.
- Hernández-Restrepo, M., Madrid, H., Tan, Y. P., Cunha, K. C. D., Gené, J., Guarro, J., & Crous, P. W. (2018). Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41, 71-108. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.05>
- Herten, K., Hestand, M. S., Vermeesch, J. R., & Van Houdt, J. K. (2015). GBSX : A toolkit for experimental design and demultiplexing genotyping by sequencing experiments. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0514-3>
- Hosagoudar, G. N., Sheshaiah, Kovi, B. S., & Umesh Babu, B. S. (2019). Evaluation of Host Plant Resistance for Blast and Brown Spot Diseases of Paddy in Hill Zone of Karnataka, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(3), 1294-1304.
- Hossain, M. M., Sultana, F., & Rahman, A. A. H. B. (2014). A comparative screening of hybrid, modern varieties and local rice cultivar for brown leaf spot disease susceptibility and yield performance. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 47(7), 795-802. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.822753>
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254-267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- Ihsan, I., Hidayat, E. W., & Rahmatulloh, A. (2020). Identification of Bacterial Leaf Blight and Brown Spot Disease In Rice Plants With Image Processing Approach. *Jurnal Ilmiah Teknik Elektro Komputer Dan Informatika*, 5(2), 59. <https://doi.org/10.26555/jiteki.v5i2.14136>
- Imran, M., Khanal, S., Zhou, X.-G. (Shane), Antony-Babu, S., & Atiq, M. (2022). First Report of Brown Leaf Spot of Rice Caused by *Curvularia hawaiiensis* in the United States. *Plant Disease*, PDIS-10-21-2253-PDN. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2253-PDN>

- Imran, M., Sahi, S. T., Atiq, M., & Rasul, A. (2020). Brown Leaf Spot : An Exacerbated Embryonic Disease of Rice: A Review. *Journal of Innovative Sciences*, 6(2), 108-125. <https://doi.org/10.17582/journal.jis/2020/6.2.108.125>
- Imrani, N., Touhami, A. O., Benkirane, R., & Douira, A. (2019). *Helminthosporium rostrata*, foliar parasite of rice in Morocco. *Plant Archives*, 19(2), 2045-2018.
- IRRI. (1993). *Rice Almanac* (Maclean JL, Dawe DC, Hardy B, Hettel GP). International Rice Research Institute.
- ISTA. (2021). Validated Seed Health Testing Methods. 7-010 : Detection of *Bipolaris oryzae* in *Oryza sativa* (rice) seed. In *International Rules for Seed Testing*. The International Seed Testing Association.
- Jamaluddin, M., Mahender, A., Gokulan, C. G., Balachiranjeevi, C., Maliha, A., Patel, H. K., & Ali, J. (2021). Molecular Approaches for Disease Resistance in Rice. In *Rice Improvement. Physiological, Molecular Breeding and Genetic Perspectives* (J. Ali, S. H. Wani, p. 315-378). https://doi.org/10.1007/978-3-030-66530-2_10#DOI
- Jatoi, G. H., Abro, M. A., Memon, S., Hussain, S., Mangi, N., & Maari, S. A. (2015). Efficacy of different Botanical extracts on the linear colony growth of the *Helminthosporium oryzae*. *EUROPEAN ACADEMIC RESEARCH*, III(7), 8383-8397.
- Johnson, D. R., & Percich, J. A. (1992). Wild Rice Domestication, Fungal Brown Spot Disease, and the Future of Commercial Production in Minnesota. *Plant Disease*, 76(12), 1193-1198. <https://doi.org/10.1094/PD-76-1193>
- Jombart, T. (2008). adegenet : A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components : A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Jones, M. P., Dingkuhn, M., Aluko, G. K., & Semon, M. (1997). Interspecific *Oryza Sativa* L. X *O. Glaberrima* Steud. Progenies in upland rice improvement. *Euphytica*, 92, 237-246.
- Kaboré, K. H., Diagne, D., Milazzo, J., Adreit, H., Lebrun, M.-H., & Tharreau, D. (2021). First Report of Rice Brown Spot Caused by *Exserohilum rostratum* in Mali. *Plant Disease*, PDIS-03-21-0662-PDN. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0662-PDN>
- Kamal, M. M., & Mia, M. A. T. (2009). Diversity and pathogenicity of the rice brown spot pathogen, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem. In Bangladesh assessed by genetic fingerprint analysis. *Bangladesh Journal of Botany*, 38(2), 119-125.
- Kamei, D., Singh, A. U., & Kamei, A. (2020). Management of Brown Spot Disease of Rice and Studies of Growth Rate of Disease on Application of Different Synthetic Fungicides by using Different Statistical Tools. *International Journal of Environmental & Agriculture Research* (, 6(9), 9.
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). *Poppr* : An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Kandan, A., Akhtar, J., Singh, B., Dixit, D., Chand, D., Agarwal, P. C., Roy, A., & Rajkumar, S. (2013). Population genetic diversity analysis of *Bipolaris oryzae* fungi infecting *Oryza sativa* in India using URP markers. *The Ecoscan*, 7(3 & 4), 123-128.
- Kandan, A., Akhtar, J., Singh, B., Dixit, D., Chand, D., Roy, A., Rajkumar, S., & Agarwal, P. C. (2015). Molecular diversity of *Bipolaris oryzae* infecting *Oryza sativa* in India. *Phytoparasitica*, 43(1), 5-14. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0430-5>

- Kaushal, M., & Prasad, R. (2021). *Microbial biotechnology in crop protection*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0049-4>
- Khemmuk, W., Shivas, R. G., Henry, R. J., & Geering, A. D. W. (2016). Fungi associated with foliar diseases of wild and cultivated rice (*Oryza spp.*) in northern Queensland. *Australasian Plant Pathology*, 45(3), 297-308. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0418-3>
- Khush, G. S. (2000). Taxonomy and origin of rice. In *Aromatic rices*.
- Kohler, F., & Pellegrin, F. (1992). *Pathologie des végétaux cultivés : Nouvelle-Calédonie, Polynésie Française, Wallis et Futuna*. (ORSTOM).
- Kuan, C. S., Yew, S. M., Toh, Y. F., Chan, C. L., Ngeow, Y. F., Lee, K. W., Na, S. L., Yee, W.-Y., Hoh, C.-C., & Ng, K. P. (2015). Dissecting the fungal biology of *Bipolaris papendorfii*: From phylogenetic to comparative genomic analysis. *DNA Research*, 22(3), 219-232. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv007>
- Kumar, A., Solanki, I. S., Akhtar, J., & Gupta, V. (2016). Morpho-molecular diversity of *Bipolaris oryzae* causing brown spot of paddy. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 86(5), 615-620.
- Kumar, H., Ahmad, S., & Zacharia, S. (2015). *Efficacy Of Fungal, Bacterial Bioagents and Botanicals Against Brown Spot (Helminthosporium oryzae) of Rice (Oryza Sativa)*. 3, 5.
- Kumar, H., Ahmad, S., Zacharia, S., Kumar, S., & Ali, A. (2017). Impact of different fungicides combination against brown leaf spot (*Drechslera oryzae*) of rice under the in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(1), 341-344.
- Kumar, M., & Simon, S. (2016). Efficacy of Certain Botanical Extracts in the Management of Brown Leaf Spot of Rice Cause by *Helminthosporium oryzae*. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 13(4), 2015-2018. <https://doi.org/10.13005/bbra/2358>
- Kumar, P., Anshu, V., & Kumar, S. (2011). Morpho-pathological and Molecular Characterization of *Bipolaris oryzae* in Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Phytopathology*, 159, 51-56. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01726.x>
- Kumar, S., Kashyap, P. L., Mahapatra, S., Jasrotia, P., & Singh, G. P. (2021). New and emerging technologies for detecting *Magnaporthe oryzae* causing blast disease in crop plants. *Crop Protection*, 143, 105473. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105473>
- Kumar, S., Prakash, N., Arzoo, K., & Erayya. (2017). Biological and Biotechnological Approaches to Manage Brown Spot (*Helminthosporium oryzae*) Disease of Rice. In *Biotic Stress Management in Rice. Molecular Approaches* (Vol. 1-394, p. 175-196). Apple Academic Press Inc.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kusai, N. A., Azmi, M. M. Z., Zainudin, N. A. I. M., Yusof, M. T., & Razak, A. A. (2016). Morphological and molecular characterization, sexual reproduction, and pathogenicity of *Setosphaeria rostrata* isolates from rice leaf spot. *Mycologia*, 108(5), 905-914. <https://doi.org/10.3852/15-175>
- Lin, S.-H., Huang, S.-L., Li, Q.-Q., Hu, C.-J., Fu, G., Qin, L.-P., Ma, Y.-F., Xie, L., Cen, Z.-L., & Yan, W.-H. (2011). Characterization of *Exserohilum rostratum*, a new causal agent of banana leaf spot disease in China. *Australasian Plant Pathology*, 40(3), 246-259. <https://doi.org/10.1007/s13313-011-0037-y>
- Liu, Y. L., Tang, J. R., Li, Y., & Zhou, H. K. (2021). First Report of *Bipolaris oryzae* Causing Leaf Spot on Cultivated Wild Rice (*Oryza rufipogon*) in China. *Plant Disease*, PDIS-11-20-2529. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2529-PDN>

- Ludwig, J. A., & Reynolds, J. F. (1988). *Statistical Ecology : A Primer on Methods and Computing* (Wiley-Interscience Pub.).
- Luttrell, E. S. (1963). Taxonomic criteria in *Helminthosporium*. *Mycologia*, 55(5), 643-674. <https://doi.org/10.2307/3756441>
- Luttrell, E. S. (1964). Systematics of *Helminthosporium* and related genera. *Mycologia*, 56, 119-132. <https://doi.org/10.2307/3756405>
- Lutwick, L. (2014). The *Exserohilum rostratum* Incident. In *Emerging Infectious Diseases* (p. 295-307). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416975-3.00022-4>
- Maclean, J. L., Dawe, D. C., & Hettel, G. P. (Éds.). (2002). *Rice almanac : Source book for the most important economic activity on earth* (3rd ed). CABI Pub.
- Maiti, R., Sarkar, N. C., Rodriguez, H. G., Kumari, Ch. A., Begum, S., & Rajkumar, D. (2021). *Advances in Rice Science : Botany, Production, and Crop Improvement* (Apple Academic Press Inc.).
- Majeed, R. A., Shahid, A. A., Ashfaq, M., Saleem, M. Z., & Haider, M. S. (2016c). First Report of *Curvularia lunata* Causing Brown Leaf Spots of Rice in Punjab, Pakistan. *The American Phytopathological Society*, 219-219.
- Majeed, R. A., Shahid, A. A., Liaqat, G. A., Saleem, K., Asif, M., Shafiq, M., & Noreen, M. S. H. M. (2016b). First Report of *Setosphaeria rostrata* Causing Brown Leaf Spot of Rice in Pakistan. *The American Phytopathological Society*, 2162.
- Majeed, R. A., Shahid, A. A., Saleem, M. Z., Asif, M., Zahid, M. A., & Haider, M. S. (2016c). First Report of *Curvularia tuberculata* Causing Brown Leaf Spot of Rice in Punjab, Pakistan. *The American Phytopathological Society*, 100(8), 1791-1791.
- Manamgoda, D. S., Cai, L., Bahkali, A. H., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2011). *Cochliobolus* : An overview and current status of species. *Fungal Diversity*, 51(1), 3-42. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0139-4>
- Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R. G., Tan, Y. P., & Hyde, K. D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the Bipolaris Cochliobolus—Curvularia Complex. *Fungal Diversity*, 56(1), 131-144. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2>
- Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2014). The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 79, 221-288. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>
- Marin-Felix, Y., Senwana, C., Cheewangkoon, R., & Crous, P. (2017). New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere*, 8(9), 1556-1574. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/9/11>
- Mathur, S. B., & Kongsdal, O. (2003). *Common Laboratory Seed Health Testing Methods for detecting fungi* (First edition). Kandrup's Bogtrykkeri edition.
- Matsumoto, K., Ota, Y., Seta, S., Nakayama, Y., Ohno, T., Mizobuchi, R., & Sato, H. (2017). Identification of QTLs for rice brown spot resistance in backcross inbred lines derived from a cross between Koshihikari and CH45. *Breeding Science*, 67(5), 540-543. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.17057>
- Meneses, P. R., Farias, C. R. J. de, Caniela, A. R. de A., Schwanck, A. A., Deibler, A. N., Funck, G. D., & Del Ponte, E. M. (2014). Regional and varietal differences in prevalence and incidence levels of *Bipolaris* species in Brazilian rice seedlots. *Tropical Plant Pathology*, 39(5), 349-356. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500001>

- Mew, T. W., & Gonzáles, P. (2002). *A handbook of rice seedborne fungi*. International Rice Research Institute, and Enfield, N.H. (USA): Science Publishers.
- Milgroom, M. G. (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 457-477. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.457>
- Milgroom, M. G. (2017). Emerging and Reemerging Plant Diseases. In *Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology, and Evolution* (American Phytopathological Society, p. 275-311).
- Mizobuchi, R., Fukuoka, S., Tsushima, S., Yano, M., & Sato, H. (2016). QTLs for Resistance to Major Rice Diseases Exacerbated by Global Warming: Brown Spot, Bacterial Seedling Rot, and Bacterial Grain Rot. *Rice*, 9(23), 12. <https://doi.org/10.1186/s12284-016-0095-4>
- Mohamed, A. A., & Gomaa, F. H. (2019). Molecular characterization and biological control of some rice seed-borne fungal pathogens. *Journal of Phytopathology and Pest Management*, 6(1), 40-53.
- Moletti, M., Giudici, M. L., & Villa, B. (1997). Rice Akiuchi-brown spot disease in Italy: Agronomic and chemical control. In: Chataigner J. (ed.). Maladies du riz en région méditerranéenne et les possibilités d'amélioration de sa résistance. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 15(3), 79-85.
- Morishima, H., Hinata, K., & Oka, H.-I. (1962). Comparaison between two cultivated rice species, *Oryza sativa* L. and *O. glaberrima* Steud. *Jap. J. Breeding*, 12, 17-29.
- Motlagh, M. R. S., & Anvari, M. (2010). Genetic variation in a population of *Bipolaris oryzae* based on RAPD-PCR in north of Iran. *African Journal of Biotechnology*, 9(36), 5800-5804.
- Motlagh, M. R. S., & Kaviani, B. (2008a). Characterization of New *Bipolaris* Spp.: The Causal Agent of Rice Brown Spot Disease in the North of Iran. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 638-642.
- Motlagh, M. R. S., & Kaviani, B. (2008b). Study of genetic variation in population of *Bipolaris victoriae*, the causal agent of rice brown spot disease, in Guilan Province of Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(22), 4027-4030.
- Muhire, B. M., Varsani, A., & Martin, D. P. (2014). SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE*, 9(9), e108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>
- Mukerji, K. G., & Manoharachary, C. (2006). *Current Concepts in Botany* (K. G. Mukerji, C. Manoharachary).
- Nayak, M. S., & Hiremath, S. V. (2019). Cultural, morphological and molecular characterization of *Bipolaris oryzae* causing brown leaf spot of rice in Northern Karnataka. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(2), 5.
- Nayar, N. M. (2014). The Origin of African Rice. In *Origin and Phylogeny of Rices* (p. 117-168). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417177-0.00005-X>
- Nazari, S., Javan-Nikkhah, M., Fotouhifar, K.-B., Khosravi, V., & Alizadeh, A. (2015). *Bipolaris* species associated with rice plant: Pathogenicity and genetic diversity of *Bipolaris oryzae* using rep-PCR in Mazandaran province of Iran. *Journal of Crop Protection*, 4(4), 497-508.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590. <https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>
- Nguefack, J., Wulff, G. E., Lekagne Dongmo, J. B., Foeleleack, F. R., Fotio, D., Mbo, J., & Torp, J. (2013). Effect of plant extracts and an essential oil on the control of brown spot disease, tillering, number of panicles and yield increase in rice. *European Journal of Plant Pathology*, 137(4), 871-882. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0298-0>

- Nigatu, G., Hansen, J., Childs, N., & Seeley, R. (2017). *Sub-Saharan Africa Is Projected To Be the Leader in Global Rice Imports*. 12.
- Nikiéma, W. F., Koïta, K., Zida, E. P., & Kaboré, K. B. (2017). In vitro Management of *Bipolaris oryzae* the Causal Pathogen of Brown Spot of Rice by Plant Extracts. *International Journal of Sciences*, 6(12), 42-47. <https://doi.org/10.18483/ijSci.1503>
- Nisikado, Y. (1928). Studies on *Helminthosporium* diseases of *graminae* in Japan. Sp. Rep. Ohara Inst. Agric. Res. 4:1–384 (in Japanese). English translation in Ber Ohara Inst Landw Forsch 4:111–126. *Ber Ohara Inst Landw Forsch* 4. https://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/files/public/4/49682/20160528094447738090/boi_004_001_111_126.pdf
- Nneke, N. E. (2012). Screening lowland rice varieties for resistance to brown spot disease in Enyong creek rice field in Akwa Ibom State of Nigeria. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 18(1 & 2), 5-10.
- Nur Ain Izzati, M. Z., Madihah, M. Z. A., Nor Azizah, K., Najihah, A., & Muskhazli, M. (2019). First Report of *Bipolaris cactivora* Causing Brown Leaf Spot in Rice in Malaysia. *Plant Disease*, 103(5), 1021-1021. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1384-PDN>
- Nutsugah, S. K., & Twumasi, J. K. (2001). Fungal Diseases of Rice in Ghana : Knowledge and Research Needs. In S. Sreenivasaprasad & R. Johnson, *Major Fungal Diseases of Rice* (p. 321-329). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2157-8_23
- Nwanze, K. F., Mohapatra, S., Kormawa, P., Keya, S., & Bruce-Oliver, S. (2006). Rice development in sub-Saharan Africa. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(5), 675-677. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2415>
- Odjo, T., Diagne, D., Adreit, H., Milazzo, J., Raveloson, H., Andriantsimialona, D., Kassankogno, A. I., Ravel, S., Gumedzoé, Y. M. D., Ouedraogo, I., Koita, O., Silué, D., & Tharreau, D. (2021). Structure of African Populations of *Pyricularia oryzae* from Rice. *Phytopathology*[®], 111(8), 1428-1437. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0186-R>
- OECD-FAO. (2020). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*. OECD. <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>
- Ohm, R. A., Feau, N., Henrissat, B., Schoch, C. L., Horwitz, B. A., Barry, K. W., Condon, B. J., Copeland, A. C., Dhillon, B., Glaser, F., Hesse, C. N., Kost, I., LaButti, K., Lindquist, E. A., Lucas, S., Salamov, A. A., Bradshaw, R. E., Ciuffetti, L., Hamelin, R. C., ... Grigoriev, I. V. (2012). Diverse Lifestyles and Strategies of Plant Pathogenesis Encoded in the Genomes of Eighteen Dothideomycetes Fungi. *PLOS Pathogens*, 8(12), 26.
- Oliveira, L. M. de, Marchesan, E., David, R. de, Werle, I. S., Aramburu, B. B., Donato, G., Silva, A. L. da, & Costa, I. F. D. da. (2019). Occurrence of rice blast on and grain quality of irrigated rice fertilized with nitrogen and silicates. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 54, e00295. <https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.00295>
- Ota, Y., Matsumoto, K., Nakayama, Y., Yamakawa, T., Ohno, T., Mizobuchi, R., & Sato, H. (2021). QTL analysis for brown spot resistance in American rice cultivar 'Dawn'. *Breeding Science*, 21015. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.21015>
- Ou, S. H. (1985). *Rice Diseases* (Second Edition). Commonwealth Mycological Institute, Kew. <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=k3mewv9nMoC&oi=fnd&pg=PR1&dq=OU,+1985+Rice+diseases&ots=ZlpVACshdh&sig=rocnh rNjWeFeSfAglzkT0JiOhH0#v=onepage&q=OU%2C%201985%20Rice%20diseases&f=false>

- Ouédraogo, I. (2008). *Incidence de l'helminthosporiose du riz au Burkina Faso et caractérisation des populations de l'agent pathogène [Bipolaris oryzae (Breda de Haan) Shoemaker]* [Thèse de doctorat]. Université de Ouagadougou.
- Ouédraogo, I., Correll, J. C., Boza, E. J., Cartwright, R. D., Lee, F. N., & Sankara, P. (2004). Pathogenic, Molecular, and Genetic Diversity Among *Bipolaris*, *Drechslera*, and *Exserohilum* Species on Rice. *AAES Research Series*, 529, 111-119.
- Ouédraogo, I., Wonni, I., Sérémé, D., & Kaboré, K. B. (2016). Survey of Fungal Seed-Borne Diseases of Rice in Burkina Faso. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 5(3), 476-480.
- Padmanabhan, S. Y. (1973). The Great Bengal Famine. *Annual Review of Phytopathology*, 11, 11-24.
- Pandey, N., & Sharma, C. (2019). Different Approaches for Management of Brown Spot (*Helminthosporium oryzae*) Disease in Rice (*Oryza sativa*) in Nepal. *International Journal of Graduate Research and Review. Rev*, 5(3), 190-193.
- Panesar, P. S., & Kaur, S. (2016). Rice : Types and Composition. In *Encyclopedia of Food and Health* (p. 646-652). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00596-1>
- Pantha, P., Shrestha, S. M., Manandhar, H. K., Gaire, S. P., Aryal, L., & Yadav, D. R. (2017). Evaluation of rice genotypes for resistance against brown spot disease caused by *Bipolaris oryzae*. *International Journal of Current Research*, 9(4), 48562-48569.
- Pantha, P., & Yadav, D. R. (2016). Assessment of Seed Infestation Level of Brown Spot (*Bipolaris oryzae*) in Different Rice Genotypes under Natural Epiphytotic Conditions. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 4(3), 294-297. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v4i3.15354>
- Pétriaccq, P., Stassen, J. H. M., & Ton, J. (2016). Spore Density Determines Infection Strategy by the Plant Pathogenic Fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiology*, 170(4), 2325-2339. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00551>
- Picco, A. M., & Rodolfi, M. (2002). *Pyricularia grisea* and *Bipolaris oryzae* : A preliminary study on the occurrence of airborne spores in a rice field. *Aerobiologia*, 18, 163-167.
- Pielou, E. C. (1975). *Ecological diversity* (Wiley&Sons).
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., & Jannink, J.-L. (2012). Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. *PLoS ONE*, 7(2), e32253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032253>
- Portères, R. (1962). Berceaux Agricoles Primaires Sur Le Continent Africain. *The Journal of African History*, 3(2), 195-210. <https://doi.org/10.1017/S0021853700003030>
- Portères, R. (1976). African cereals : Eleusine, Fonio, Black Fonio, Teff, Brachiaria, Paspalum, Pennisetum, and African Rice. In *The origin of African Plant Domestication* (Harlan, J.R de Wet, J.M.J&Stemler, A. B. L., p. 498).
- Poudel, N. S., Bharatee, P., & Acharya, M. (2019). Influence of Different Chemical Fungicides against Rice Brown Leaf Spot Disease Caused by *Bipolaris oryzae*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(01), 441-446. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.801.046>
- Prasad, R., Shivay, Y. S., & Kumar, D. (2017). Current status, challenges, and opportunities in rice production. In *Rice Production Worldwide* (Bhagirath S. Chauhan, Gulshan Mahajan, Khawar Jabran, p. 1-32). Springer International Publishing.
- Priti, S., Prameela, D., & Raju, J. (2016). Comparison of the multi gene regions for selection of potential barcode for *Bipolaris* spp. *Research Journal of Biotechnology*, 11, 8.

- Raboin, L. M., Ramanantsoanirina, A., Dusserre, J., Razasolofonahary, F., Tharreau, D., Lannou, C., & Sester, M. (2012). Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem: Cultivar mixtures and blast in upland rice. *Plant Pathology*, *61*(6), 1103-1111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02602.x>
- Ramesh, S., & Vydeki, D. (2020). Recognition and classification of paddy leaf diseases using Optimized Deep Neural network with Jaya algorithm. *Information Processing in Agriculture*, *7*(2), 249-260. <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2019.09.002>
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, *97*(1), 84-98. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>
- Rivera, J. F., Duarte, H. da S., Dorneles, K. da R., Pazdiora, P. C., Vanier, N. L., & Dallagnol, L. J. (2021). *Effects of Calcium Silicate Fertilization on Disease Intensity and Yield and Quality of Rice Grain*. <https://doi.org/10.31031/MCDA.2021.08.000688>
- Sadhukhan, R., J S Bohra, & Pal, V. (2018). Management of brown spot disease in rice (*Helminthosporium oryzae*) by spraying of cow urine. *International Journal of Chemical Studies*, *6*(1), 1721-1723. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25238.24640>
- Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Fournier, E., & Tharreau, D. (2014). South-East Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *New Phytologist*, *201*(4), 1440-1456. <https://doi.org/10.1111/nph.12627>
- Samal, P., Babu, S. C., & Mondal, B. (2021). *The Global Rice Scenario Towards 2050 : Results for Six Continents*. International Conference of Agricultural Economists.
- Santos, G. R. dos, Castro Neto, M. D. de, Ramos, L. N., Sarmiento, R. A., Korndörfer, G. H., & Ignácio, M. (2011). Effect of silicon sources on rice diseases and yield in the State of Tocantins, Brazil. *Acta Scientiarum. Agronomy*, *33*(3), 451-456. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.6573>
- Sato, H., Ando, I., Hirabayashi, H., Takeuchi, Y., Arase, S., Kihara, J., Kato, H., Imbe, T., & Nemoto, H. (2008). QTL analysis of brown spot resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*, *58*(1), 93-96. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.58.93>
- Sato, H., Matsumoto, K., Ota, C., Yamakawa, T., Kihara, J., & Mizobuchi, R. (2015). Confirming a major QTL and finding additional loci responsible for field resistance to brown spot (*Bipolaris oryzae*) in rice. *Breeding Science*, *65*(2), 170-175. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.170>
- Sattari, A., Moradi, K., & Noorzi, M. (2015). Brown Spot Resistance in Rice: A Review. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, *1*(5), 175-179.
- Savary, S., Castilla, N. P., Elazegui, F. A., & Teng, P. S. (2005). Multiple effects of two drivers of agricultural change, labour shortage and water scarcity, on rice pest profiles in tropical Asia. *Field Crops Research*, *91*, 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.07.017>
- Savary, S., Nelson, A., Sparks, A. H., Willocquet, L., Duveiller, E., Mahuku, G., Forbes, G., Garrett, K. A., Hodson, D., Padgham, J., Pande, S., Sharma, M., Yuen, J., & Djurle, A. (2011). International Agricultural Research Tackling the Effects of Global and Climate Changes on Plant Diseases in the Developing World. *Plant Disease*, *95*(10), 1204-1216. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0316>
- Savary, S., Willocquet, L., Elazegui, F. A., Castilla, N. P., & Teng, P. S. (2000). Rice Pest Constraints in Tropical Asia: Quantification of Yield Losses Due to Rice Pests in a Range of Production Situations. *Plant Disease*, *84*(3), 357-369. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.357>

- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3(3), 430-439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Scheben, A., Batley, J., & Edwards, D. (2017). Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes : Choosing the right tool for the right application. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 149-161. <https://doi.org/10.1111/pbi.12645>
- Schwanck, A. A., Meneses, P. R., Farias, C. R. J., Funck, G. R. D., Maia, A. H. N., & Del Ponte, E. M. (2015). *Bipolaris oryzae* seed borne inoculum and brown spot epidemics in the subtropical lowland rice-growing region of Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 142(4), 875-885. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0659-y>
- Séré, Y., Fargette, D., Abo, M., Wydra, K., Bemereu, M., Onasanya, A., & Akator, S. (2013). Managing the major diseases of rice in Africa. In *Realizing Africa's 841 Rice Promise* (M. Wopereis, D. Johnson, N. Ahmadi, E. Tollens and A. Jalloh).
- Sester, M., Raveloson, H., Tharreau, D., & Becquer, T. (2019). Difference in blast development in upland rice grown on an Andosol vs a Ferralsol. *Crop Protection*, 115, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.09.010>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423, 623-656.
- Sharma, K., Goss, E. M., Dickstein, E. R., Smith, M. E., Johnson, J. A., Southwick, F. S., & van Bruggen, A. H. C. (2014). *Exserohilum rostratum* : Characterization of a Cross-Kingdom Pathogen of Plants and Humans. *PLoS ONE*, 9(10), e108691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108691>
- Sharma, T. R., Rai, A. K., Gupta, S. K., Vijayan, J., Devanna, B. N., & Ray, S. (2012). Rice Blast Management Through Host-Plant Resistance : Retrospect and Prospects. *Agricultural Research*, 1(1), 37-52. <https://doi.org/10.1007/s40003-011-0003-5>
- Shoemaker, R. A. (1959). Nomenclature of Drechslera and Bipolaris, grass parasites segregated from *Helminthosporium*. *Canadian Journal of Botany*, 37(5), 879-887. <https://doi.org/10.1139/b59-073>
- Shrestha, S., Aryal, L., Parajuli, B., Panthi, J., Sharma, P., & Singh Saud, Y. (2017a). Field Experiment to Evaluate the Efficacy of Different Doses of Chemical Fungicides against Rice Brown Leaf Spot Disease Caused by *Bipolaris Oryzae* L. At Paklihawa, Rupandehi, Nepal. *World Journal of Agricultural Research*, 5(3), 162-168. <https://doi.org/10.12691/wjar-5-3-6>
- Shrestha, S., Aryal, L., Parajuli, B., Panthi, J., Sharma, P., & Singh Saud, Y. (2017b). Field Experiment to Evaluate the Efficacy of Different Doses of Chemical Fungicides against Rice Brown Leaf Spot Disease Caused by *Bipolaris Oryzae* L. At Paklihawa, Rupandehi, Nepal. *World Journal of Agricultural Research*, 5(3), 162-168. <https://doi.org/10.12691/wjar-5-3-6>
- Silva, F. J. A., Maich, S. L. P., Meneses, P. R., Bellé, C., de Barros, D. R., & Farias, C. R. J. (2016). First Report on *Exserohilum rostratum* Pathogenicity Causing Brown Spot to Rice in Brazil. *The American Phytopathological Society*, 2531.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163, 688.
- Simpson, J. T., Wong, K., Jackman, S. D., Schein, J. E., Jones, S. J. M., & Birol, Í. (2009). ABySS : A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research*, 19(6), 1117-1123. <https://doi.org/10.1101/gr.089532.108>
- Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*, 158, 1-261.

- Sobanbabu, G., Sabarinathan, K. G., Parthiban, V. K., & Ramamoorthy, V. (2018). Isolation, Screening and Identification of Virulent Isolates of *Bipolaris oryzae* Causing Rice Brown Spot and *Sarocladium oryzae* Causing Sheath Rot Disease. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(09), 930-939. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.709.112>
- Sonavane, P., Devi, T. P., & Raju, J. (2015). Taxonomic studies on cultural and morphological characters for re-evaluation in *Helminthosporium* species complex. *The Bioscan*, 10(4), 1525-1530.
- Soura, B. H., Gnancadja, A. L. S., Zandjanakou-Tachin, M., & Koita, K. (2019). Diagnostic de l'incidence des Pathogènes Fongiques du Riz au Sud Bénin et Identification Morphologique de *Cercospora oryzae*. *European Scientific Journal ESJ*, 15(12), 346-358. <https://doi.org/10.19044/esj.2019.v15n12p346>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8 : A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stoddart, J. A., & Taylor, J. F. (1988). Genotypic diversity : Estimation and prediction in samples. *Genetics*, 118(4), 705-711. <https://doi.org/10.1093/genetics/118.4.705>
- Sunder, S., Singh, R., & Agarwal, R. (2014). Brown spot of rice : An overview. *Indian Phytopathology*, 67(3), 201-215.
- Sunder, S., Singh, R., Dodan, D. S., & Mehla, D. S. (2005). Effect of different nitrogen levels on brown spot (*Drechslera oryzae*) of rice and its management through host resistance and fungicides. *Pl. Dis. Res.*, 20(2), 111-114.
- Surendhar, M., Anbuselvam, Y., & Ivin, J. J. S. (2021). Status of Rice Brown Spot (*Helminthosporium oryzae*) Management in India : A Review. *Agricultural Reviews, Of*, 1-6. <https://doi.org/10.18805/ag.R-2111>
- Suty, L. (2010). *La lutte biologique. Vers de nouveaux équilibres écologiques*.
- Su'udi, M., Park, J.-M., Kang, W.-R., Park, S.-R., Hwang, D.-J., & Ahn, I.-P. (2012). Quantification of rice brown leaf spot through Taqman real-time PCR specific to the unigene encoding Cochliobolus miyabeanus SCYTALONE DEHYDRATASE1 involved in fungal melanin biosynthesis. *Journal of Microbiology*, 50(6), 947-954. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2538-y>
- Sweeney, M., & McCouch, S. (2007). The Complex History of the Domestication of Rice. *Annals of Botany*, 100(5), 951-957. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm128>
- Tan, Y. P., Madrid, H., Crous, P. W., & Shivas, R. G. (2014). Johnalcornia gen. Et. Comb. Nov., and nine new combinations in *Curvularia* based on molecular phylogenetic analysis. *Australasian Plant Pathology*, 43, 589-603. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s13313-014-0315-6>
- Terensan, S., Fernando, N., Perera, C., Silva, N., Kottarachchi, N., & Weerasena, O. V. D. S. J. (2021). Morphological and Molecular Analysis of Fungal Species Associated with Blast and Brown Spot Diseases of *Oryzae sativa*. *Plant Disease*, PDIS-04-21-0864-RE. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0864-RE>
- Tharreau, D., Fudal, I., Andriantsimalona, D., Santoso, Utami, D., Fournier, E., Lebrun, M.-H., & Nottéghem, J.-L. (2009). World Population Structure and Migration of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. In G.-L. Wang & B. Valent (Éds.), *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease* (p. 209-215). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9500-9_21

- Thierry, M., Chatet, A., Fournier, E., Tharreau, D., & Ios, R. (2020). A PCR, qPCR, and LAMP Toolkit for the Detection of the Wheat Blast Pathogen in Seeds. *Plants*, *9*(2), 277. <https://doi.org/10.3390/plants9020277>
- Toher, A. S., Mior Ahmad, Z. A., & Wong, M. Y. (2016). First Report of *Exserohilum rostratum* as Pathogen of Rice Brown Spot in Malaysia. *Plant Disease*, *100*(1), 226-226. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0276-PDN>
- Touhami, A. O., Ennaffah, B., & Douira, M. E. Y. et A. (2000). Pathogénie comparée de 4 espèces d'*Helminthosporium* Obtenues à Partir des Plantes Malades du Riz au Maroc. *Journal of Phytopathology*, *148*(4), 221-226. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00491.x>
- Tsuda, M., & Ueyama, A. (1976). Distribution of two mating types of *Cochliobolus miyabeanus* in field and a laboratory attempt to produce hybrids between isolates of *Helminthosporium oryzae* from the USA and Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, *42*, 7-11.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115-e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Valarmathi, P., & Ladhakshmi, D. (2018). Morphological Characterization of *Bipolaris oryzae* Causing Brown Spot Disease of Rice. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(2), 161-170. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.021>
- Van Ba, V., & Sangchote, S. (2006). Seed Borne and Transmission of *Bipolaris oryzae*, the Causal Pathogen of Brown Spot of Rice. *Kasetsart Journal - Natural Science*, *40*, 353-360.
- van Oort, P. A. J. (2018). Mapping abiotic stresses for rice in Africa : Drought, cold, iron toxicity, salinity and sodicity. *Field Crops Research*, *219*, 55-75. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.01.016>
- Wallace, J. G., & Mitchell, S. E. (2017). Genotyping-by-Sequencing. *Current Protocols in Plant Biology*, *2*(1), 64-77. <https://doi.org/10.1002/cppb.20042>
- Wang, C.-H., Zheng, X.-M., Xu, Q., Yuan, X.-P., Huang, L., Zhou, H.-F., Wei, X.-H., & Ge, S. (2014). Genetic diversity and classification of *Oryza sativa* with emphasis on Chinese rice germplasm. *Heredity*, *112*(5), 489-496. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.130>
- Wei, X., & Huang, X. (2019). Origin, taxonomy, and phylogenetics of rice. In *Rice* (p. 1-29). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811508-4.00001-0>
- Weir, B. S., & Cockerham, C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, *38*(6), 1358-1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* (p. 315-322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wilson, A. W., Wickett, N. J., Grabowski, P., Fant, J., Borevitz, J., & Mueller, G. M. (2015). Examining the efficacy of a genotyping-by-sequencing technique for population genetic analysis of the mushroom *Laccaria bicolor* and evaluating whether a reference genome is necessary to assess homology. *Mycologia*, *107*(1), 217-226. <https://doi.org/10.3852/13-278>
- Wopereis, M. (Éd.). (2013). *Realizing Africa's rice promise*. CABI.
- Wu, D., & Turgeon, B. G. (2013). *Setosphaeria rostrata* : Insights from the sequenced genome of *Setosphaeria turcica*. *Fungal Genetics and Biology*, *61*, 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.015>
- Xiao, J. Z., Tsuge, T., Doke, N., Nakatsuka, S., Tsuda, M., & Nishimura, S. (1991). Rice-specific toxins produced by *Bipolaris zeicola*, race 3; evidence for role as pathogenicity factors for rice and

- maize plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38(1), 67-82. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(05\)80143-2](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(05)80143-2)
- Xiao, J.-Z., Nakatsuka, S., Tsuge, T., Doke, N., & Nishimura, S. (1990). Isolation and Characterization of a Factor from *Bipolaris zeicola* Race 3 that Induces Susceptibility in Rice Plants. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 56, 605-612.
- Xiao, Z.-L., Hyde, K. D., & Zhang, J.-Z. (2015). Synonymy of two species of *Bipolaris* from aquatic crops of *Poaceae*. *Mycotaxon*, 130(1), 131-143. <https://doi.org/10.5248/130.131>
- Yamaguchi, K., & Mutsunobu, M. (2010). A simple selective medium for the primary isolation of *Bipolaris*, *Drechslera* and *Exserohilum* species. *Bulletin of Minamikyushu University*, 40A, 55-58.
- Yang, F., Zhang, J., Zhang, H., Ji, G., Zeng, L., Li, Y., Yu, C., Fernando, W. G. D., & Chen, W. (2020). Bacterial Blight Induced Shifts in Endophytic Microbiome of Rice Leaves and the Enrichment of Specific Bacterial Strains With Pathogen Antagonism. *Frontiers in Plant Science*, 11, 963. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00963>
- Yaqoob, M., Mann, R. A., Iqbal, S. M., & Anwar, M. (2011). Reaction of rice genotypes to brown spot disease pathogen *Cochliobolus miyabeanus* under drought conditions. *Mycopath*, 9(1), 9-11.
- Zadoks, J. C. (1974). The role of epidemiology in modern Phytopathology. *Phytopathology*, 64, 765-906.
- Zehhar, G., Ouazzani Touhami, A., & Douira, A. (2008). First report of *Bipolaris cynodontis* on *Oryza sativa* in Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 73-76.
- Zhang, C., Dong, S.-S., Xu, J.-Y., He, W.-M., & Yang, T.-L. (2019). PopLDdecay : A fast and effective tool for linkage disequilibrium decay analysis based on variant call format files. *Bioinformatics*, 35(10), 1786-1788. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty875>
- Zhou, X.-G. (2019). Sustainable Strategies for Managing Bacterial Panicle Blight in Rice. In Y. Jia (Éd.), *Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84882>
- Zhou, X.-G., Zhang, D., & Lin, F. (2021). UAV Remote Sensing : An Innovative Tool for Detection and Management of Rice Diseases. In D. Kourouski (Éd.), *Diagnostics of Plant Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95535>

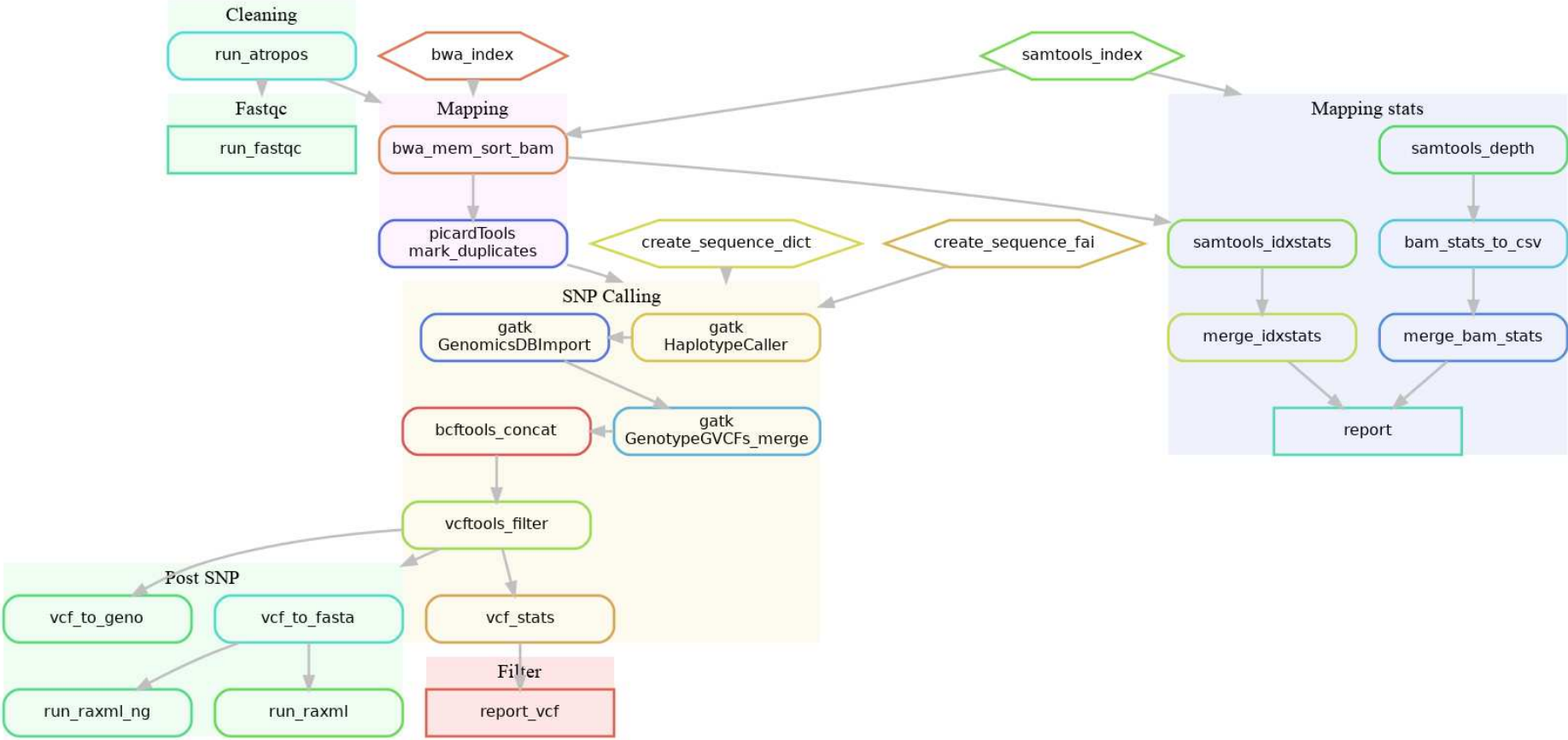
Annexes

Annexe 1 : script RattleSNP pour mapping et SNPcalling

```
2 # Input output data options
3 DATA:
4     FASTQ: "/shared/ibfstor1/projects/helminthosporiose/bipolaris/"
5     BAM: ""
6     VCF: ""
7     REFERENCE_FILE: "/shared/ibfstor1/projects/helminthosporiose/references_genomes/"
8     OUTPUT: "/shared/ibfstor1/projects/helminthosporiose/Result_mapping/"
9 PARAMS:
10     MITOCHONDRIAL_NAME : ""
11     # boolean, add stats mapping report if True
12     FILTER_SUFFIX: ["-Q30-DP5-MAF005-MISS07",
13                   "-Q30-DP20-MAF001-MISS05"]
14 # Pipeline tools activation
15 FASTQC: False
16 CLEANING:
17     ATROPOS: False
18 MAPPING:
19     ACTIVATE: true
20     TOOL: "BWA_MEM" # Use BWA_MEM or BWA_SAMPE only
21     BUILD_STATS: true
22     SNPCALLING: false
23     FILTER: false # Must be true if want run raxml or raxml-ng
24     RAXML: false
25     RAXML_NG: false
26 # Misc. options for programs
27 PARAMS_TOOLS:
28     ATROPOS: "--minimum-length 35 -q 20,20 -U 8 -O 10"
29     FASTQC: ""
30     BWA_ALN: ""
31     BWA_SAMPE: ""
32     BWA_MEM: ""
33     SAMTOOLS_VIEW: "-bh"
34     SAMTOOLS_SORT: ""
35     SAMTOOLS_DEPTH: ""
36     PICARDTOOLS_MARK_DUPLICATES: "CREATE_INDEX=TRUE VALIDATION_STRINGENCY=SILENT"
37     GATK_HAPLOTYPECALLER: "--emit-ref-confidence GVCF --output-mode EMIT_ALL_ACTIVE_SITES -ploidy 1"
38     GATK_GENOMICSDBIMPORT: ""
39     GATK_GENOTYPEGVCF: "-new-qual"
```

Annexe 2 : Représentation schématique du fonctionnement du pipeline RattleSNP

RattleSNP workflow



Annexe 3 : Génomes fongiques utilisés pour l'affectation taxonomique des souches séquencées par GBS

Espèce	Code de l'isolat	Technique de séquençage	Taille du génome (Mb)	Référence
<i>Bipolaris bicolor</i>	ML9021	Illumina	35,29	Cette étude
<i>B. cookei</i>	LSLP18	Illumina	36,17	Zaccaron and Bluhm, 2017 NCBI soumission directe
<i>B. maydis</i>	ATCC 48331	Illumina	32,93	Ohm <i>et al.</i> , 2012
<i>B. maydis</i>	C5	Sanger	36,46	Ohm <i>et al.</i> , 2012
<i>B. oryzae</i>	ATCC 44560	Illumina	31,36	Condon <i>et al.</i> , 2013
<i>B. oryzae</i>	TG12bL2	Illumina	31,67	(Castell-Miller <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. secalis</i>	BF9003	Illumina	34,53	Cette étude
<i>B. sorokiniana</i>	ND90Pr	Sanger; 454; Illumina	36,4	Ohm <i>et al.</i> , 2012
<i>B. victoriae</i>	FI3	Illumina	32,83	Ohm <i>et al.</i> , 2012
<i>B. yamadae</i>	PK9029	Illumina	31,47	Cette étude
<i>B. zeicola</i>	26-R-13	Illumina	31,27	Condon <i>et al.</i> , 2013
<i>Curvularia hawaiiensis</i>	PK9021	Illumina	31,47	Cette étude
<i>C. papendorffii</i>	UM 226	Illumina ; PacBio	33,38	Kuan <i>et al.</i> , 2015
<i>C. spicifera</i>	FR9030	Illumina	31,80	Cette étude
<i>Curvularia lunata</i>	CX-3	Illumina	35,5	Gao <i>et al.</i> , 2014
<i>Exserohilum rostratum</i>	BF9006	Illumina	34,71	Cette étude
<i>E. rostratum</i>	ER1	PacBio	35,19	Wang <i>et al.</i> , 2021
<i>E. turcicum</i>	Et28A	PacBio	43,48	Zhang, 2020 NCBI soumission directe

Annexe 4: liste des 133 isolats séquencés (112) et référents de NCBI (21) utilisés pour la construction pour des arbres phylogénétiques

N°	Espèces	Isolats	Hôtes	Pays	N° accession GenBank		References
					ITS	GPDH	
1	<i>Alternaria alternata</i>	EGS 340160	<i>Arachis hypogaea</i>	Inde	AF071346	AF081400	Berbee et al., 2002
2	<i>Bipolaris bicolor</i>	YB450101	<i>Momordica charantia</i>	Chine	MH201400	MK372988	Qin et al., 2019
3	<i>Bipolaris bicolor</i>	ML9021	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
4	<i>Bipolaris coffeana</i>	BRIP 14845	<i>Coffea arabica</i>	Kenya	KJ415525	KJ415421	Tan et al. 2014
5	<i>Bipolaris cynodontis</i>	CBS 109894	<i>Cynodon dactylon</i>	Hongrie	KJ909767	KM034838	Manamgoda et al., 2014
6	<i>Bipolaris maydis</i>	AR5182	<i>Sorghum bicolor</i>	Japon	KM230383	KM034844	Manamgoda et al., 2014
7	<i>Bipolaris maydis</i>	CBS 13629	<i>Zea mays</i>	Japon	KJ909769	KM034845	Manamgoda et al., 2014
8	<i>Bipolaris maydis</i>	CBS 137271	<i>Zea mays</i>	USA	KM034846	KM093794	Berbee et al., 1999
9	<i>Bipolaris maydis</i>	ML9001	<i>O. longistaminata</i>	Mali			Cette étude
10	<i>Bipolaris maydis</i>	ML9030	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
11	<i>Bipolaris maydis</i>	ML9032	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
12	<i>Bipolaris oryzae</i>	CPC 28826	<i>Oryza sativa</i>	Taïlande	MF490809	MF490831	Marin-Felix et al., 2017
13	<i>Bipolaris oryzae</i>	MFLUCC 100715	<i>Oryza sativa</i>	Taïlande	JX256416	JX276430	Manamgoda et al., 2012
14	<i>Bipolaris oryzae</i>	MFLUCC 13-0511	<i>Oryza sativa</i>	Chine	KF688965	KF688971	Xiao et al., 2013
15	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9000	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
16	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9001	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
17	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9002	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
18	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9004	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
19	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9005	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
20	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9008	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
21	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9009	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
22	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9010	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude

23	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9011	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
24	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9012	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
25	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9013	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
26	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9014	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
27	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9015	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
28	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9016	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
29	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9017	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
30	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9018	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
31	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9019	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
32	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9020	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
33	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9021	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
34	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9022	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
35	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9023	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
36	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9024	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
37	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9025	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
38	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9030	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
39	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9032	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
40	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9033	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
41	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9034	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
42	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9035	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
43	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9036	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
44	<i>Bipolaris oryzae</i>	BF9037	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
45	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9031	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
46	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9032	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
47	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9033	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
48	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9035	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
49	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9037	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
50	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9039	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
51	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9044	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude

52	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9046	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
53	<i>Bipolaris oryzae</i>	FR9049	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
54	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9013	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
55	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9014	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
56	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9015	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
57	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9016	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
58	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9017	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
59	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9018	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
60	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9022	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
61	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9023	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
62	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9024	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
63	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9025	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
64	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9028	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
65	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9029	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
66	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9031	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
67	<i>Bipolaris oryzae</i>	ML9033	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
68	<i>Bipolaris oryzae</i>	PK9035	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
69	<i>Bipolaris secalis</i>	BRIP 14453	<i>Secale cereale</i>	Argentine	KJ415537	KJ415409	Tan et al., 2014
70	<i>Bipolaris</i> sp.	BF9003	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
71	<i>Bipolaris</i> sp.	FR9029	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
72	<i>Bipolaris</i> sp.	FR9036	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
73	<i>Bipolaris</i> sp.	FR9041	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
74	<i>Bipolaris</i> sp.	FR9047	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
75	<i>Bipolaris</i> sp.	FR9048	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
76	<i>Bipolaris</i> sp.	ML9002	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
77	<i>Bipolaris</i> sp.	ML9003	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
78	<i>Bipolaris</i> sp.	ML9004	<i>O. longistaminata</i>	Mali			Cette étude
79	<i>Bipolaris</i> sp.	ML9005	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
80	<i>Bipolaris</i> sp.	ML9006	<i>O. longistaminata</i>	Mali			Cette étude

81	<i>Bipolaris</i> sp.	ML9007	<i>O. longistaminata</i>	Mali			Cette étude
82	<i>Bipolaris</i> sp.	PK9029	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
83	<i>Bipolaris</i> sp.	PK9037	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
84	<i>Bipolaris victoriae</i>	CBS 327 64	<i>Avena sativa</i>	USA	KJ909778	KM034811	Manamgoda et al., 2014
85	<i>Bipolaris yamadae</i>	CBS 202 29	<i>P. miliaceum</i>	Japon	K909779	KM034830	Manamgoda et al., 2014
86	<i>Bipolaris zeicola</i>	AR 5166	<i>Sorghum</i> sp.	USA	KJ909788	KM034813	Manamgoda et al., 2014
87	<i>Curvularia hawaiiensis</i>	CBS 274.52	<i>Oryza sativa</i>		HG778988	HG779140	Pham et al., 2015
88	<i>Curvularia nodosa</i>	CPC 28800	<i>Digitaria ciliaris</i>	Thaïlande	MF490816	MF490838	Marin-Felix et al., 2017
89	<i>Curvularia</i> sp.	FR9030	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
90	<i>Curvularia</i> sp.	FR9034	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
91	<i>Curvularia</i> sp.	FR9038	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
92	<i>Curvularia</i> sp.	FR9040	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
93	<i>Curvularia</i> sp.	FR9042	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
94	<i>Curvularia</i> sp.	FR9043	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
95	<i>Curvularia</i> sp.	FR9045	<i>Oryza sativa</i>	France			Cette étude
96	<i>Curvularia</i> sp.	PK9019	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
97	<i>Curvularia</i> sp.	PK9020	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
98	<i>Curvularia</i> sp.	PK9021	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
99	<i>Curvularia</i> sp.	PK9023	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
100	<i>Curvularia</i> sp.	PK9024	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
101	<i>Curvularia</i> sp.	PK9027	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
102	<i>Curvularia</i> sp.	PK9028	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
103	<i>Curvularia</i> sp.	PK9030	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
104	<i>Curvularia</i> sp.	PK9031	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
105	<i>Curvularia</i> sp.	PK9033	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
106	<i>Curvularia</i> sp.	PK9034	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
107	<i>Curvularia</i> sp.	PK9036	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
108	<i>Curvularia</i> sp.	PK9038	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
109	<i>Curvularia</i> sp.	PK9039	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude

110	<i>Curvularia spicifera</i>	CBS 27452	Sol	Espagne	JN192387	JN600979	Manamgoda et al., 2014
111	<i>Curvularia spicifera</i>	DAOM 575355	<i>Bouteloua gracilis</i>	USA	KJ922377	KM061788	Manamgoda et al., 2014
112	<i>Exserohilum rostratum</i>	BF9006	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
113	<i>Exserohilum rostratum</i>	BF9007	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso			Cette étude
114	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9011	<i>Oryza sativa</i>	Mali	MZ029592	MZ029600	Kaboré et al., 2021
115	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9012	<i>Oryza sativa</i>	Mali	MZ029593	MZ029601	Kaboré et al., 2021
116	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9019	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
117	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9020	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
118	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9026	<i>Oryza sativa</i>	Mali	MZ029594	MZ029602	Kaboré et al., 2021
119	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9027	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
120	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9040	<i>Oryza sativa</i>	Mali	MZ029595	MZ029603	Kaboré et al., 2021
121	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9041	<i>Oryza sativa</i>	Mali	MZ029596	MZ029604	Kaboré et al., 2021
122	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9042	<i>Oryza sativa</i>	Mali	MZ029597	MZ029605	Kaboré et al., 2021
123	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9044	<i>Oryza sativa</i>	Mali	MZ029598	MZ029606	Kaboré et al., 2021
124	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9045	<i>Oryza sativa</i>	Mali			Cette étude
125	<i>Exserohilum rostratum</i>	ML9046	<i>Oryza sativa</i>	Mali	MZ029599	MZ029607	Kaboré et al., 2021
126	<i>Exserohilum rostratum</i>	PK9022	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
127	<i>Exserohilum rostratum</i>	PK9025	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
128	<i>Exserohilum rostratum</i>	PK9026	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
129	<i>Exserohilum rostratum</i>	PK9032	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan			Cette étude
130	<i>Exserohilum rostratum</i>	SN9002	<i>Pennisetum glaucum</i>	Sénégal			Cette étude
131	<i>Exserohilum rostratum</i>	BRIP 11426	<i>Oryza sativa</i>	Australie	LT837453	LT883533	Hernandez-Restrepo et al., 2018
132	<i>Exserohilum rostratum</i>	BRIP 10995	<i>Zea mays</i>	Australie	LT837823	LT882566	Hernandez-Restrepo et al., 2018
133	<i>Exserohilum rostratum</i>	BRIP 11416	<i>Zea mays</i>	Australie	LT837466	LT883543	Hernandez-Restrepo et al., 2018

Annexe 5: Taux de mapping des séquences GBS des 469 isolats sur les génomes de références de 15 espèces du complexe *Helminthosporium*

N°	Isolats	Taux de mapping des séquences GBS sur les différents génomes entiers																		%Mapping élevé	Espèce
		<i>B. oryzae</i> (ATC C 44560)	<i>B. oryzae</i> (TG12bL 2)	<i>B. maydis</i> (ATC C 48331)	<i>B. maydis</i> (C5)	<i>B. cookei</i> (LSLP1 8)	<i>B. yamadae</i> (PK902 9)	<i>B. bicolor</i> (ML902 1)	<i>B. secalis</i> (BF900 3)	<i>B. victoriae</i> (F13)	<i>B. sorokiniana</i> (ND90Pr)	<i>B. zeicola</i> (26-R-13)	<i>C. papendorffii</i> (UM 226)	<i>C. spicifera</i> (FR903 0)	<i>C. lunata</i> (CX-3)	<i>C. hawaiiensis</i> (PK9021)	<i>E. rostratum</i> (BF9006)	<i>E. rostratum</i> (ER1)	<i>E. turcicum</i> (Et28A)		
1	BF9000	100,62	102,46	82,06	82,46	4,12	85,6	85,6	85,85	84,55	85,66	84,38	32,98	33,31	2,7	31,55	30,21	32,016	28,59	102,46	<i>B. oryzae</i>
2	BF9001	99,09	100,81	83,12	83,56	3,98	86,21	86,32	86,68	85,7	85,96	85,1	35,05	35,23	2,92	33,62	32,11	31,693	30,31	100,81	<i>B. oryzae</i>
3	BF9002	93,42	95,34	77,05	77,34	3,32	79,96	80,18	79,91	78,99	79,34	78,62	32,2	31,91	2,43	30,86	28,2	31,69	27,73	95,34	<i>B. oryzae</i>
4	BF9003	79,75	81,38	78,87	80,07	4,88	82,81	91,86	99,44	91,79	82,48	90,69	34,56	34,89	2,81	32,6	31,7	28,627	30,01	99,44	<i>B. secalis</i>
5	BF9004	91,28	92,99	75,13	75,47	4	77,8	77,7	77,18	76,98	77,49	76,22	30,32	30,6	2,29	29,54	27,15	31,945	25,74	92,99	<i>B. oryzae</i>
6	BF9005	79,54	80,93	66,34	66,58	3,28	68,65	68,84	68,98	67,63	68,63	67,55	28,02	28,88	2,1	27,31	25,75	31,593	24,49	80,93	<i>B. oryzae</i>
7	BF9006	27,71	28,65	28,51	28,93	1,63	29,68	29,27	29,9	28,54	28,71	28,06	28,08	28,4	2,19	27,08	103,41	105,56	53,89	105,56	<i>E. rostratum</i>
8	BF9007	28,37	29,34	29,59	30,08	1,74	30,61	30,37	30,89	29,29	29,66	28,88	28,99	29,28	2,32	27,85	105,54	105,31	55,77	105,54	<i>E. rostratum</i>
9	BF9008	101,54	103,2	82,69	82,98	4,02	86,41	86,69	86,73	85,62	86,21	85,18	33,87	33,85	2,63	32,41	30,28	31,456	29,1	103,2	<i>B. oryzae</i>
10	BF9009	105,37	106,78	86,59	86,96	4,39	90,29	90,06	90,29	89,37	89,91	88,79	36,13	36,1	2,86	34,4	32,23	34,918	31,01	106,78	<i>B. oryzae</i>
11	BF9010	99,67	101,33	81,18	81,6	4,19	84,75	84,89	85,06	83,79	84,67	83,29	33,17	33,37	2,53	31,96	29,91	31,565	28,3	101,33	<i>B. oryzae</i>
12	BF9011	99,36	101,33	80,98	81,3	3,69	84,96	85,33	85,58	84,08	84,19	83,48	33,38	33,21	2,89	30,84	30,14	31,251	29,28	101,33	<i>B. oryzae</i>
13	BF9012	104,45	106,46	86,05	86,45	4,42	89,57	89,92	89,78	88,35	89,5	88,03	35,83	35,97	2,89	34,28	31,92	31,516	30,69	106,46	<i>B. oryzae</i>
14	BF9013	83,16	84,65	68,16	68,55	3,86	71,2	71,46	71,42	70,66	70,84	70,04	29,63	29,55	2,25	27,72	26,01	31,867	25,13	84,65	<i>B. oryzae</i>
15	BF9014	102,91	105,04	83,54	83,93	4,36	87,31	87,25	87,52	86,26	87,23	85,91	34,07	34,29	2,58	32,62	30,9	31,073	29,27	105,04	<i>B. oryzae</i>

16	BF901 5	103,7 8	106,2	83,75	84,18	4,27	87,15	87,85	87,74	86,47	87,08	86,01	35,33	34,44	2,54	33,58	31,29	32,129	30,15	106,2	<i>B. oryzae</i>
17	BF901 6	93,26	102,64	78,82	82,64	5,92	83,4	83,81	84,41	80,2	84,95	81,08	39,69	34,21	3,34	31,62	30,28	34,294	35,59	102,64	<i>B. oryzae</i>
18	BF901 7	100,4 4	103,75	82,17	82,78	4,33	86,16	86,39	86,36	84,45	86,06	84,16	33,9	33,82	2,75	32,49	30,79	31,893	30,2	103,75	<i>B. oryzae</i>
19	BF901 8	93,36	100,96	78,32	81,32	5,88	82,49	82,79	83,21	80,59	84,22	80,82	37,96	33,28	3,18	30,93	29,71	33,155	34,63	100,96	<i>B. oryzae</i>
20	BF901 9	89,75	98,58	75,99	79,39	5,73	79,94	80,53	81,41	77,81	82	78,23	37,84	32,87	3,3	30,43	29,26	34,195	34,4	98,58	<i>B. oryzae</i>
21	BF902 0	99,38	101,68	82,96	83,46	4,01	86,5	86,63	86,5	85,01	86,23	84,73	34,44	34,72	2,63	33,04	30,91	30,553	29,62	101,68	<i>B. oryzae</i>
22	BF902 2	79,46	80,77	65,96	66,22	3,52	68,28	68,28	68,36	67,89	68,59	67,59	28,76	28,48	2,06	26,74	25,57	29,685	24,76	80,77	<i>B. oryzae</i>
23	BF902 3	93,23	94,65	76,75	77,05	3,85	79,91	80,12	80,27	79,12	79,62	78,78	32,27	32,48	2,53	30,66	29,19	29,726	27,95	94,65	<i>B. oryzae</i>
24	BF902 4	102,7 8	104,43	83	83,31	4,34	86,58	86,82	86,74	85,68	86,48	85,25	33,38	33,65	2,64	31,81	30,16	30,208	28,54	104,43	<i>B. oryzae</i>
25	BF902 5	99,05	100,82	81,37	81,67	4,19	84,88	84,92	84,98	83,9	84,6	83,46	33,68	33,75	2,58	32,2	30,19	30,004	28,65	100,82	<i>B. oryzae</i>
26	BF903 0	105,0 2	106,99	86,64	87,08	4,42	90,3	90,26	90,51	89,09	90,02	88,61	36,06	36,76	2,73	34,7	32,53	29,752	30,92	106,99	<i>B. oryzae</i>
27	BF903 2	101,6 7	102,69	82,69	83,02	4,06	86,11	85,91	86,09	85,49	86,08	84,99	33,28	33,17	2,46	31,55	29,32	29,638	28,2	102,69	<i>B. oryzae</i>
28	BF903 3	96,55	98,27	79,79	80,15	3,84	83,01	83,44	83,41	81,94	82,88	81,49	32,89	32,89	2,54	31,46	29,24	29,307	27,92	98,27	<i>B. oryzae</i>
29	BF903 4	98,7	99,87	80,84	81,19	4,1	84,09	84,62	84,38	83,71	84,02	83,26	33,2	33,24	2,69	31,55	29,83	29,607	28,39	99,87	<i>B. oryzae</i>
30	BF903 5	101,9 7	103,3	83,41	83,76	4,24	86,87	87,3	87,18	86,11	86,81	85,73	34,33	34,63	2,68	32,86	30,61	29,841	29,38	103,3	<i>B. oryzae</i>
31	BF903 6	101,6 1	103,03	83,31	83,95	4,36	86,88	87,01	87,26	86,36	87,01	85,85	34,65	34,68	2,78	32,84	31,1	29,776	29,91	103,03	<i>B. oryzae</i>
32	BF903 7	100,9 8	103,16	82,75	83,14	4,25	86,2	86,5	86,76	85,21	86,08	84,7	34,33	34,55	2,75	32,7	30,92	29,57	29,71	103,16	<i>B. oryzae</i>
33	BF903 8	33,34	34,26	33,96	34,37	1,97	35,29	35,16	35,69	34,22	34,29	34,03	33,38	34,13	2,52	32,57	106,69	101,47	63,25	106,69	<i>E. rostratum</i>
34	BF904 0	38,56	39,26	39,18	39,41	1,76	40,36	40,15	40,42	39,69	39,64	39,3	79,17	99,82	5,5	91,08	35,06	30,88	32,27	99,82	<i>C. spicifera</i>
35	BF904 1	34,25	35,09	34,32	35,12	2,15	36,12	35,92	36,42	35,4	35,4	34,67	34,3	34,46	2,71	32,5	111,82	107,03	65,16	111,82	<i>E. rostratum</i>
36	BF904 2	86,18	92,73	77,2	80,53	6,48	81,32	81,53	82,82	79,08	82,48	80,45	43,14	39,49	4,13	36,08	38,24	37,679	41,36	92,73	<i>B. oryzae</i>
37	BF904 3	32,8	36,47	31,85	34,23	3,9	34,17	35,22	37,08	33,79	35,18	35,01	34,51	32,88	3,15	30,58	93,53	90,357	61,41	93,53	<i>E. rostratum</i>

38	BF904 4	37,67	39,69	38,6	39,08	2,36	40,59	40,62	40,71	38,95	39,66	39,75	80,35	97,88	6,42	108,66	34,77	29,037	33,22	108,66	<i>C. hawaiiensis</i>
39	BF904 5	103,5 2	104,66	89,34	89,96	5,08	92,58	92,57	92,79	91,72	92,31	91,11	40,99	41,63	3,24	39,46	37,16	31,809	35,18	104,66	<i>B. oryzae</i>
40	BF904 6	87,95	92,09	96,64	97,95	5,45	104,69	93,82	94,16	90,18	95,21	92,46	41,92	42,81	3,29	40,26	37,43	30,858	38,08	104,69	<i>B. yamadae</i>
41	BF904 7	91,89	98,84	81,71	85,23	7,06	86,05	86,41	87,84	83,84	87,2	84,99	44,96	40,5	4,36	37,05	36,27	35,066	41,71	98,84	<i>B. oryzae</i>
42	BF904 8	88,97	90,66	87,63	89,15	5,8	91,8	99,4	105,59	98,87	91,22	98,19	41,28	41,82	3,48	39,71	38,31	32,655	36,07	105,59	<i>B. secalis</i>
43	BF904 9	33,26	33,84	33,5	33,94	2,11	34,87	34,62	35,15	34,14	33,97	33,82	33,22	33,58	2,51	32,2	104,02	98,838	62,08	104,02	<i>E. rostratum</i>
44	BF905 0	32,93	34,32	33,59	34,29	2,02	35,26	34,99	36	34,17	34,6	33,95	33,29	33,59	2,5	31,96	104,12	98,454	62,37	104,12	<i>E. rostratum</i>
45	BF905 1	33,54	34,55	34,1	34,8	2,05	35,55	35,24	35,83	34,62	34,86	34,09	33,78	34,09	2,49	32,56	111,45	105,16	64,3	111,45	<i>E. rostratum</i>
46	BF905 2	32,82	34,32	33,69	34,46	2,09	35,34	34,84	35,61	34,09	34,37	33,69	33,28	33,5	2,48	32,08	102,33	96,689	61,58	102,33	<i>E. rostratum</i>
47	BF905 3	92,04	93,01	91,5	92,19	4,66	94,78	108,03	102,86	101,22	94,25	100,5	41,02	42,4	3,02	40,47	37,62	31,752	35,04	108,03	<i>B. bicolor</i>
48	BF905 4	33,67	34,83	33,92	35,07	2,25	35,97	35,58	36,45	34,85	35,28	34,15	33,97	33,98	2,73	32,02	106,54	101,75	63,32	106,54	<i>E. rostratum</i>
49	BF905 5	86,58	87,87	86,39	87,26	4,28	89,52	99,53	96,29	94,34	88,99	93,8	40,22	41,38	3,06	39,52	37,39	32,671	34,74	99,53	<i>B. bicolor</i>
50	BF905 6	33,36	34,21	33,96	34,39	1,97	35,2	35,06	35,62	34,33	34,38	34,13	33,05	33,88	2,45	32,48	104,95	99,908	62,79	104,95	<i>E. rostratum</i>
51	BF905 7	101,2 1	102,23	88,29	88,75	4,84	91,31	91,29	91,47	90,5	90,94	89,86	40,8	41,37	3,19	39,16	37,31	32,033	34,9	102,23	<i>B. oryzae</i>
52	BF905 8	32,74	33,55	33,11	33,7	1,98	34,47	34,16	34,75	33,6	33,75	33,28	32,61	33,07	2,4	31,74	100,86	96,092	60,97	100,86	<i>E. rostratum</i>
53	BF905 9	79,88	85,7	94,31	98,09	6,67	91,03	84,97	86,67	83,27	88,98	84,68	43,54	38,3	2,9	35,56	33,14	32,981	39,92	98,09	<i>B. maydis</i>
54	BF906 0	87,7	95,23	77,35	80,47	10,3	82,95	85,26	86,11	82,09	84,32	82,88	42,53	40,97	4,41	38,22	37,37	35,011	41,67	95,23	<i>B. oryzae</i>
55	BF906 1	86,2	88,11	86,11	87,31	4,15	89,8	100,21	96,97	94,14	89,11	94,16	39,73	40,95	2,97	39,51	36,85	32,091	34,43	100,21	<i>B. bicolor</i>
56	BF906 2	95,47	102,66	83,78	87,26	7,63	88,46	88,87	90,41	85,78	89,59	87,29	46,03	40,93	4,45	37,49	36,7	34,112	42,01	102,66	<i>B. oryzae</i>
57	BF906 3	96,99	103,84	84,98	88,26	7,26	89,57	89,71	90,91	87,28	90,38	88,35	45,68	41,16	4,35	37,75	36,69	34,336	41,86	103,84	<i>B. oryzae</i>
58	BF906 4	33,3	34,14	33,58	34,07	2,12	34,98	34,81	35,37	34,08	34,13	33,87	32,99	33,59	2,54	32,29	106,51	100,88	62,8	106,51	<i>E. rostratum</i>

59	BF906 5	83,33	89,39	91,57	94,76	7,78	99,86	90,42	92,82	86,33	91,97	88,55	42,94	42,2	3,51	39,2	37,26	33,284	39,81	99,86	<i>B. yamadae</i>
60	BF906 6	32,71	33,91	33,57	34,09	2,04	35,15	34,72	35,43	33,6	34,02	33,5	33,13	33,53	2,44	32,29	101,45	96,437	61,45	101,45	<i>E. rostratum</i>
61	BF906 7	38,3	39,31	39,16	39,36	1,97	40,76	40,23	40,36	39,47	39,77	39,65	79,44	95,83	6,05	105,54	35,18	30,245	32,91	105,54	<i>C. hawaiiensis</i>
62	BF906 8	80,2	85,3	95,34	99,02	6,31	91,6	84,95	86,32	83,57	88,91	84,54	42,35	38,19	2,78	35,48	33,07	32,078	38,53	99,02	<i>B. maydis</i>
63	BF906 9	93,6	100,37	82,8	86,18	7,16	87,1	87,58	88,94	84,84	88,29	86,18	45,06	40,56	4,27	37,25	36,32	34,544	41,54	100,37	<i>B. oryzae</i>
64	BF907 0	80,93	85,86	87,89	89,96	5,67	94,66	87,56	87,67	84,23	88,49	85,9	41,3	41,13	3,22	38,69	36,66	31,946	37,43	94,66	<i>B. yamadae</i>
65	BF907 1	81,05	86,13	97,63	101,05	6,28	93,01	86,07	87,31	84,54	89,86	85,51	42,44	37,73	2,79	35,06	32,97	31,66	38,52	101,05	<i>B. maydis</i>
66	BF907 2	85,23	86,87	84	85,54	5,52	87,85	94,71	100,4	94,33	87,31	93,62	40,08	40,77	3,24	38,56	37,15	32,93	35,27	100,4	<i>B. secalis</i>
67	BF907 3	79,19	84,31	94,35	98	6,11	90,18	83,99	84,98	82,68	87,82	83,62	42,33	37,53	2,74	34,6	32,63	32,565	38,57	98	<i>B. maydis</i>
68	BF907 4	33,26	34,42	34,07	34,63	2,15	35,53	35,1	35,92	34,3	34,53	33,99	33,46	33,72	2,53	32,23	105,26	99,766	62,38	105,26	<i>E. rostratum</i>
69	BF907 5	78,42	83,21	92,7	96,38	6,09	89,08	82,92	83,93	81,83	86,86	82,58	41,9	37,42	2,78	34,73	33,89	33,254	38,5	96,38	<i>B. maydis</i>
70	BF907 6	87,98	89,53	88,02	88,93	4,37	91,17	102,55	98,55	96,33	90,6	95,92	40,56	41,65	3,03	40,19	37,15	32,002	34,87	102,55	<i>B. bicolor</i>
71	BF907 7	33,38	34,28	33,71	34,28	1,95	35,17	35,01	35,59	34,23	34,37	34,06	33,33	33,93	2,49	32,42	113,27	106,18	64,49	113,27	<i>E. rostratum</i>
72	BF907 8	105,73	106,41	90,77	91,15	5,17	93,89	93,89	94,03	93,33	93,63	92,72	41,15	41,72	3,31	39,42	37,27	31,585	34,96	106,41	<i>B. oryzae</i>
73	BF907 9	96,3	97,16	95,61	96,31	4,96	99,13	114,36	108,01	106,37	98,72	105,55	42,55	43,64	3,13	41,43	38,51	31,338	35,91	114,36	<i>B. bicolor</i>
74	BF908 1	88,22	92,4	97,02	98,46	5,44	105,56	94,49	94,62	90,66	95,68	92,7	41,82	42,68	3,42	39,92	37,52	30,748	37,68	105,56	<i>B. yamadae</i>
75	BF908 2	102	102,51	88,44	88,76	4,86	91,35	91,34	91,53	90,84	91,07	90,25	40,56	41,14	3,29	39,1	36,87	31,998	34,54	102,51	<i>B. oryzae</i>
76	BF908 3	103,66	104,13	89,73	90,04	4,88	92,61	92,61	92,81	92,24	92,39	91,62	41,14	41,71	3,28	39,63	37,2	31,989	34,93	104,13	<i>B. oryzae</i>
77	BF908 4	100,4	100,99	87,81	88,13	4,78	90,56	90,57	90,75	90,08	90,32	89,49	40,48	41,16	3,22	39,06	37,06	32,284	34,63	100,99	<i>B. oryzae</i>
78	BF908 5	34,07	35,5	34,52	35,24	2,45	36,12	35,8	36,81	35,26	35,32	34,82	38,14	39,74	2,87	39,05	95,41	90,135	59,05	95,41	<i>E. rostratum</i>
79	BF908 6	98,69	99,57	86,33	86,75	5,02	89,22	89,27	89,39	88,59	89	88,09	40,02	40,82	3,21	38,56	36,53	32,172	34,39	99,57	<i>B. oryzae</i>

80	BF908 7	32,47	33,69	32,64	33,89	2,45	34,11	34,47	35,18	33,72	33,56	33,48	32,57	33,12	2,74	30,88	99,1	96,466	62,21	99,1	<i>E. rostratum</i>
81	BF908 8	33	33,65	33,41	33,83	1,96	34,61	34,53	34,93	33,91	33,76	33,67	32,63	33,42	2,45	31,98	105,49	100,34	62,46	105,49	<i>E. rostratum</i>
82	BF908 9	32,23	32,88	32,56	33,22	2,1	33,99	33,78	34,26	33,1	33,2	32,89	32,23	32,66	2,51	31,19	99,58	94,844	59,83	99,58	<i>E. rostratum</i>
83	BF909 1	102,1 1	103,26	87,32	87,94	5,19	90,45	90,39	90,77	89,63	90,2	89,2	39,85	40,27	3,19	38,38	36,93	31,986	34,4	103,26	<i>B. oryzae</i>
84	BF909 2	33,86	34,91	33,95	34,9	2,37	35,74	35,53	36,22	34,93	34,99	34,18	33,83	34,04	2,83	31,92	102,32	98,432	62	102,32	<i>E. rostratum</i>
85	BF909 3	33,29	33,96	33,73	34,13	2,04	34,98	34,79	35,34	34,28	34,09	34	33,11	33,64	2,6	32,1	106,69	101,53	62,65	106,69	<i>E. rostratum</i>
86	BF909 4	88,22	90,51	88,42	89,8	4,29	92,4	104,29	100,39	97,03	91,64	97,04	40,91	42	2,96	40,68	37,72	31,716	35,26	104,29	<i>B. bicolor</i>
87	BF909 5	32,87	33,69	33,43	33,89	2,08	34,73	34,57	35,04	33,83	33,82	33,6	32,64	33,36	2,54	31,96	103,26	98,282	61,97	103,26	<i>E. rostratum</i>
88	BF909 6	33,67	34,79	34,36	34,97	2	35,89	35,73	36,35	34,84	34,83	34,43	34	34,42	2,53	32,64	111,41	105,13	64,09	111,41	<i>E. rostratum</i>
89	BF909 7	102,0 1	103,13	87,82	88,5	4,96	90,97	90,98	91,39	90,17	90,66	89,7	40,59	40,97	3,32	38,99	37,27	32,227	35,12	103,13	<i>B. oryzae</i>
90	BF909 9	33,48	33,99	33,21	34	2,12	35,04	34,5	35,19	34,23	34,31	33,6	33,25	32,99	2,67	31,2	103,03	99,575	61,44	103,03	<i>E. rostratum</i>
91	BF910 0	83,18	88,82	100,3 7	103,9 4	6,75	95,95	88,73	90,04	86,74	92,24	87,95	43,57	38,99	2,83	36,41	33,86	32,306	39,74	103,94	<i>B. maydis</i>
92	BF910 1	104,3 1	105,09	90,11	90,55	5,23	93,2	93,15	93,42	92,64	92,84	91,99	41,46	41,96	3,29	39,6	37,54	32,226	35,29	105,09	<i>B. oryzae</i>
93	BF910 2	33,17	34,13	33,79	34,34	2,09	35,26	34,93	35,58	34,06	34,21	33,89	32,95	33,7	2,47	32,42	103,79	98,634	62,23	103,79	<i>E. rostratum</i>
94	BF910 3	105,0 2	105,59	90,26	90,7	5,08	93,2	93,2	93,4	92,73	93	92,06	41,42	42,03	3,28	39,73	37,75	32,59	35,25	105,59	<i>B. oryzae</i>
95	BF910 4	80,66	86,05	87,33	90,51	7,27	95	86,51	89,39	83,49	88,6	85,41	42,49	41,29	3,47	38,49	36,7	33,933	39,24	95	<i>B. yamadae</i>
96	BF910 5	38,62	39,22	39,37	39,5	1,73	40,4	40,31	40,64	39,7	39,63	39,51	79,53	103,21	5,6	92,51	34,89	30,622	32,28	103,21	<i>C. spicifera</i>
97	BF910 6	103,7 3	104,59	89,73	90,17	4,98	92,79	92,82	93,08	92,05	92,47	91,51	41,21	41,92	3,2	39,74	37,31	32,1	35,1	104,59	<i>B. oryzae</i>
98	BF910 7	102,0 3	103,29	88,65	89,23	4,98	91,7	91,7	92,12	90,71	91,32	90,39	40,98	41,51	3,25	39,71	37,02	31,924	34,92	103,29	<i>B. oryzae</i>
99	BF910 8	37,58	41,21	37,85	39,19	4,71	40,81	40,88	42,7	39,57	41,33	39,45	77,11	90,53	6,08	100,5	35,35	31,009	36,3	100,5	<i>C. hawaiiensis</i>
100	BF910 9	102,2 1	103,64	88,58	89,11	4,92	91,85	91,76	92,12	90,61	91,3	90,42	40,74	41,44	3,19	39,53	37,09	31,936	34,79	103,64	<i>B. oryzae</i>

101	BF911 0	102,1 6	104,29	88,76	89,24	4,54	91,98	91,86	92,42	90,38	91,42	89,99	40,62	41,31	3,2	39,31	37,06	31,749	34,87	104,29	<i>B. oryzae</i>
102	BF911 1	99,36	100,93	87,52	87,96	4,53	90,45	90,4	90,77	89,26	90,03	88,88	40,57	41,36	3,22	39,25	36,94	32,135	34,68	100,93	<i>B. oryzae</i>
103	BF911 2	85,08	89,34	92,36	95,07	8,15	100,15	90,16	92,5	88,16	92,96	88,94	43,97	41,67	3,76	38,44	37,37	32,898	39,44	100,15	<i>B. yamadae</i>
104	BF911 3	33,9	34,73	33,35	34,1	2,07	35,2	34,8	35,76	34,52	34,02	33,99	32,6	33,22	2,5	32,14	103,3	99,483	61,95	103,3	<i>E. rostratum</i>
105	BF911 4	33,5	34,21	33,58	34,14	2,06	35,19	35,08	35,62	34,29	34,41	33,86	33,35	33,88	2,59	32,28	104,85	101,21	62,83	104,85	<i>E. rostratum</i>
106	BF911 5	33,48	34,42	34,05	34,67	1,99	35,5	35,17	35,93	34,48	34,74	34,12	33,6	34,02	2,55	32,53	105,89	100,3	63,49	105,89	<i>E. rostratum</i>
107	BF911 6	87,4	89,56	84,84	86,07	4,75	87,16	89,38	89,5	86,53	87,76	86,67	39,18	40,22	2,99	38,2	36,36	31,098	34,48	89,56	<i>B. oryzae</i>
108	BF911 7	37,7	39,43	38,71	39,03	2,17	40,37	40,32	40,37	39,02	39,63	39,47	77,98	93,96	5,89	103,53	34,81	30,584	33,36	103,53	<i>C. hawaiiensis</i>
109	BF911 8	32,3	33,35	33,03	33,48	1,99	34,36	34,16	34,69	33,21	33,57	33,09	32,35	32,74	2,46	31,73	102,55	97,147	60,76	102,55	<i>E. rostratum</i>
110	BF911 9	33,01	34,12	33,59	34,42	2	35,17	34,73	35,35	34,27	34,2	33,71	33,21	33,45	2,52	31,71	104,75	99,378	62,07	104,75	<i>E. rostratum</i>
111	BF912 0	32,98	33,73	33,5	34,04	1,9	34,8	34,53	35,11	33,98	33,83	33,7	32,95	33,18	2,42	31,86	105,67	100,24	62,22	105,67	<i>E. rostratum</i>
112	BF912 1	31,74	33,16	32,34	33,5	2,57	33,56	33,97	34,87	33,32	33,28	33,15	32,16	32,41	2,71	30,25	96,65	94,306	61,2	96,65	<i>E. rostratum</i>
113	BF912 2	34,24	35,06	34,55	35,15	2,08	35,94	35,74	36,38	35,34	35,07	34,73	33,82	34,15	2,54	32,51	108,38	102,71	63,89	108,38	<i>E. rostratum</i>
114	BF912 3	99,23	100,31	87,06	87,58	4,71	90,01	90,06	90,21	89,18	89,64	88,75	40,16	40,94	3,17	38,95	37,51	32,772	34,67	100,31	<i>B. oryzae</i>
115	BF912 4	33,16	34,19	33,51	34,32	2,06	34,9	34,68	35,41	34,21	34,1	33,7	33	33,42	2,49	31,84	103,79	98,705	62,02	103,79	<i>E. rostratum</i>
116	BF912 5	104,0 6	105,01	89,69	90,07	5,04	92,65	92,76	92,98	91,94	92,32	91,54	40,58	41,04	3,12	39,08	36,71	31,413	34,5	105,01	<i>B. oryzae</i>
117	BF912 6	97,43	98,43	85,11	85,58	4,54	87,89	88,06	88,19	87,25	87,67	86,81	39,31	39,96	3,13	37,95	35,82	31,808	33,53	98,43	<i>B. oryzae</i>
118	BF912 7	100,3 2	101,59	86,67	87,08	4,47	89,6	89,78	90	88,76	89,25	88,28	39,76	40,06	3,1	38,19	36,04	31,823	33,87	101,59	<i>B. oryzae</i>
119	BF912 8	32,98	34,05	33,65	34,28	2,04	35,21	34,79	35,71	34,13	34,29	33,75	33,19	33,5	2,54	31,91	101,45	96,398	61,35	101,45	<i>E. rostratum</i>
120	BF912 9	104,9	106,03	90,79	91,23	5,06	93,63	93,85	94,15	92,89	93,39	92,3	41,36	41,82	3,16	39,84	37,56	31,979	35,17	106,03	<i>B. oryzae</i>
121	BF913 0	103,7 9	104,92	89,17	89,61	4,85	92,04	92,21	92,6	91,46	91,78	90,84	40,42	40,86	3,16	38,83	36,72	31,72	34,34	104,92	<i>B. oryzae</i>

122	BF913 1	33,8	34,79	34,37	34,97	2,08	35,79	35,7	36,29	34,93	34,85	34,58	33,83	34,34	2,61	32,68	104,63	99,338	63,32	104,63	<i>E. rostratum</i>
123	BF913 2	32,85	33,93	33,56	34,31	1,95	35,1	34,68	35,56	33,98	34,14	33,69	33,08	33,54	2,51	32,05	105,5	99,698	62,08	105,5	<i>E. rostratum</i>
124	BF913 3	39,15	40,42	40,19	41,05	2,15	42,3	41,91	42,55	41,21	40,81	40,3	79,23	82,36	6,14	78,01	37,03	31,33	33,69	82,36	<i>C. spicifera</i>
125	BF913 4	33,03	34,06	33,63	34,15	2,01	34,97	34,72	35,46	33,96	34,06	33,74	33,28	33,86	2,5	32,51	101,77	96,621	61,51	101,77	<i>E. rostratum</i>
126	BF913 5	33,45	36,55	34,26	35,97	3,61	36,84	36,8	39,08	35,75	37,22	35,34	34,97	34,8	3,21	32,78	108,26	101,46	65,76	108,26	<i>E. rostratum</i>
127	BF913 6	37,88	39,31	39	39,88	2,15	41,1	40,74	41,32	39,91	39,69	39,06	77,73	80,75	6,01	76,51	35,84	30,224	32,66	80,75	<i>C. spicifera</i>
128	BF913 7	32,82	33,8	33,45	33,95	1,99	34,85	34,63	35,22	33,61	33,86	33,48	32,79	33,5	2,44	32,09	102,89	97,82	61,8	102,89	<i>E. rostratum</i>
129	BF913 8	33,17	34,43	33,88	34,34	1,96	35,45	35,26	35,91	34,14	34,54	34,05	33,36	34,03	2,47	32,81	105,73	99,916	63,1	105,73	<i>E. rostratum</i>
130	BF913 9	33,07	34,29	33,88	34,38	2	35,41	35,18	35,81	34,11	34,44	33,96	33,24	33,86	2,45	32,57	104,34	98,541	62,58	104,34	<i>E. rostratum</i>
131	BF914 0	33,24	35,37	34,76	35,45	2,04	36,61	36,13	37,4	34,34	35,39	34,18	34,38	34,9	2,56	33,41	107,82	100,58	63,8	107,82	<i>E. rostratum</i>
132	BF914 1	33,87	34,63	34,19	34,66	2,03	35,57	35,47	36,01	34,79	34,62	34,45	33,73	34,26	2,48	32,63	107,42	102,17	63,85	107,42	<i>E. rostratum</i>
133	BF914 2	32,78	33,6	33,21	33,84	1,97	34,44	34,23	35,05	33,82	33,66	33,38	32,68	33,08	2,53	31,65	101,34	95,963	60,84	101,34	<i>E. rostratum</i>
134	BF914 3	33,04	33,79	33,43	33,95	2	34,73	34,56	35,19	33,95	33,97	33,74	33,1	33,49	2,5	32,17	102,99	97,969	61,97	102,99	<i>E. rostratum</i>
135	BF914 4	32,84	33,89	33,54	34,21	2,03	35,09	34,67	35,34	33,9	34,12	33,63	32,85	33,5	2,5	32,23	102,56	97,196	61,86	102,56	<i>E. rostratum</i>
136	BF914 5	85,82	87,3	85,63	86,63	4,17	89,13	101,62	96,85	94,3	88,33	93,8	39,55	40,59	2,89	39,25	36,37	31,83	34,08	101,62	<i>B. bicolor</i>
137	BF914 6	88,23	89,88	88,15	89,21	4,45	91,74	105,3	99,97	97,43	91,1	97,01	39,99	41,04	3,09	39,63	36,76	31,475	34,46	105,3	<i>B. bicolor</i>
138	BF914 7	33,11	34,1	33,65	34,23	1,99	35,02	34,7	35,49	34,08	34,11	33,77	33,1	33,59	2,45	32,14	103,07	97,826	62,32	103,07	<i>E. rostratum</i>
139	BF914 8	33,23	34,13	32,91	33,86	2,32	34,71	34,53	35,1	34,03	34,21	33,41	33,1	33,11	2,66	31,37	102,4	98,654	61,06	102,4	<i>E. rostratum</i>
140	BF914 9	33,61	34,22	33,77	34,33	1,97	35,22	34,94	35,54	34,52	34,26	34,2	33,28	33,85	2,47	32,39	107,7	102,06	63,43	107,7	<i>E. rostratum</i>
141	BF915 0	33,3	34,42	34,13	34,74	2,11	35,61	35,26	36,09	34,22	34,58	34,05	33,41	33,92	2,58	32,42	105,99	100,22	62,84	105,99	<i>E. rostratum</i>
142	BF915 1	82,21	87,58	99,55	102,8 7	6,29	95,04	87,95	89,11	85,57	91,09	87,07	43,44	38,99	2,87	36,65	34,15	32,439	39,49	102,87	<i>B. maydis</i>
143	BF915 2	85,87	89,75	86,17	87,74	5,09	90,72	102,72	98,74	94,64	90,19	94,74	40,76	41,31	3,04	39,69	37,73	31,877	36,57	102,72	<i>B. bicolor</i>

144	BF915 3	78,37	84,6	94,58	98,51	5,93	90,75	84,4	86,11	81,78	87,9	83,63	42,98	37,88	2,73	35,13	32,77	32,715	39,49	98,51	<i>B. maydis</i>
145	BF915 4	33	33,54	32,93	33,56	2,03	34,48	34,37	35	33,76	33,87	33,33	32,67	33,1	2,55	31,63	101,48	98,08	61,47	101,48	<i>E. rostratum</i>
146	BF915 6	91,36	93,11	91,27	92,3	4,52	95,05	108,12	103,18	100,7	94,43	100,4 2	41,11	42,41	2,93	40,87	37,73	31,313	35,33	108,12	<i>B. bicolor</i>
147	BF915 7	99,51	101,13	86,96	87,52	4,59	90,09	90,01	90,59	88,77	89,7	88,32	40,33	40,86	3,11	39,01	37,04	32,155	34,49	101,13	<i>B. oryzae</i>
148	BF915 8	81,26	85,96	88,87	91,73	7,81	95,58	87,61	88,91	84,31	89,11	85,72	41,78	40,37	3,6	37,16	36,04	32,723	38,55	95,58	<i>B. yamadae</i>
149	BF915 9	89,96	91,51	89,77	90,77	4,33	93,27	105,82	101,1	98,91	92,64	98,51	41,13	42,38	3,02	40,78	37,53	32,034	35,16	105,82	<i>B. bicolor</i>
150	BF916 0	33,64	34,94	34,36	35,02	2,13	35,96	35,43	36,18	34,62	35,08	34,21	33,65	34,11	2,56	32,54	109,17	99,5	63,71	109,17	<i>E. rostratum</i>
151	BF916 1	33,48	34,77	34,25	34,9	2,15	35,83	35,33	36,11	34,51	34,97	34,11	33,67	34,12	2,57	32,56	108,99	102,66	63,62	108,99	<i>E. rostratum</i>
152	BF916 2	33,09	37,49	32,57	34,94	4,24	35,19	36,59	38,1	34,59	35,98	35,51	35,77	33,97	3,35	31,67	99,9	93,896	63,9	99,9	<i>E. rostratum</i>
153	BF916 3	82,02	86,6	98,02	101,5 9	6,45	93,43	86,33	87,77	85,28	90,4	85,88	42,72	38,18	2,92	35,59	34,12	31,959	38,99	101,59	<i>B. maydis</i>
154	BF916 4	33,91	34,87	34,34	34,96	2,45	35,85	35,69	36,33	34,93	35,03	34,65	33,85	34,32	2,69	32,7	108,85	102,93	63,95	108,85	<i>E. rostratum</i>
155	BF916 5	32,41	33,21	32,48	33,23	2,13	34,02	33,83	34,47	33,24	33,33	32,69	32,25	32,66	2,62	30,91	99,38	96,267	59,95	99,38	<i>E. rostratum</i>
156	BF916 6	30,69	36,56	31,7	34,08	3,12	34,54	34,03	36,58	31,82	35,03	33,28	33,67	31,94	2,44	29,82	92,94	93,417	62,83	93,417	<i>E. rostratum</i>
157	BF916 7	34,16	35,02	34,62	35,22	2,09	35,95	35,83	36,34	35,24	35,18	34,88	33,84	34,37	2,55	32,69	108,89	103,28	64,59	108,89	<i>E. rostratum</i>
158	BF916 8	81,53	86,04	89,02	90,92	4,79	96,34	87,74	88,74	83,79	88,93	86,2	40,2	40,78	3,15	38,53	36,82	31,513	36,51	96,34	<i>B. yamadae</i>
159	BF916 9	33,11	34,74	33,85	34,67	2,16	35,57	35,02	35,93	34,28	34,86	33,65	33,44	33,7	2,61	31,91	105,46	99,09	62,1	105,46	<i>E. rostratum</i>
160	BF917 1	33,87	35,18	34,62	35,23	2,27	36,15	35,98	36,66	35,05	35,2	34,65	33,91	34,59	2,81	33,13	110,86	104,75	64,61	110,86	<i>E. rostratum</i>
161	BF917 2	108,1	108,92	92,47	93,04	5,38	95,6	95,75	95,92	94,99	95,36	94,43	41,37	41,87	3,2	39,8	37,51	31,424	35,27	108,92	<i>B. oryzae</i>
162	BF917 3	33,47	34,78	34,42	35,03	2,03	35,97	35,64	36,26	34,5	34,83	34,18	33,48	34,13	2,48	32,78	107,53	101,08	63,13	107,53	<i>E. rostratum</i>
163	BF917 4	96,86	99,24	85,65	86,25	4,7	88,86	88,72	89,02	86,91	88,2	86,8	39,78	40,43	3,01	38,7	36,74	32,004	34,22	99,24	<i>B. oryzae</i>
164	BF917 5	33,15	33,85	33,7	34,18	2,11	34,95	34,81	35,28	34,14	34	33,86	33,28	33,64	2,47	32,2	104,91	99,68	62,45	104,91	<i>E. rostratum</i>
165	BF917 6	108,4 8	110,41	92,85	93,38	4,99	96,41	96,35	96,69	94,69	95,85	94,46	41,47	42,02	3,12	40,15	37,7	31,005	35,21	110,41	<i>B. oryzae</i>

166	BF917 7	33,73	34,81	34,16	34,79	2,29	35,83	35,49	36,14	34,65	34,93	34,37	33,66	34,19	2,81	32,8	108,52	102,72	63,83	108,52	E. rostratum
167	BF917 8	33,4	34,48	33,82	34,45	2,11	35,28	35,1	35,67	34,34	34,55	33,94	33,31	33,77	2,62	32,17	105,92	100,18	62,83	105,92	E. rostratum
168	BF917 9	32,84	33,45	33,3	33,79	2,14	34,54	34,36	34,81	33,82	33,63	33,55	32,87	33,24	2,48	31,87	101,27	96,563	61,35	101,27	E. rostratum
169	BF918 0	33,04	34,2	33,99	34,46	2,07	35,42	35,07	35,73	33,9	34,29	33,79	33,26	33,93	2,46	32,65	105,89	100,42	63,02	105,89	E. rostratum
170	BF918 1	33,15	33,92	33,59	34,28	2,1	35,04	34,7	35,31	33,97	34,18	33,7	33,03	33,44	2,53	31,99	105,75	99,824	62,82	105,75	E. rostratum
171	BF918 2	32,89	33,82	33,42	33,99	2,02	34,74	34,68	35,23	33,89	33,97	33,71	32,89	33,5	2,59	32,2	106,96	101,24	62,55	106,96	E. rostratum
172	BF918 3	33,4	34,37	34	34,56	2,06	35,44	35,32	35,83	34,45	34,57	34,22	33,54	34,22	2,49	32,74	107,37	101,74	63,79	107,37	E. rostratum
173	BF918 4	33,13	37,24	32,73	34,88	4,09	35,17	36,68	37,93	34,58	35,76	35,5	35,59	34,49	3,23	31,97	102,53	96,783	64,65	102,53	E. rostratum
174	BF918 5	32,99	33,9	33,7	34,24	2,16	35,15	34,95	35,48	34,11	34,22	33,8	33,25	33,72	2,51	32,29	107,63	102,04	63,2	107,63	E. rostratum
175	BF918 6	33,13	33,88	33,54	34,12	2,17	34,98	34,83	35,39	34,09	33,99	33,8	33,26	33,68	2,64	32,08	104,32	99,036	62,27	104,32	E. rostratum
176	BF918 7	32,66	33,73	33,16	33,74	2,06	34,46	34,34	34,99	33,66	33,57	33,21	32,36	32,98	2,59	31,44	103,08	98,086	60,99	103,08	E. rostratum
177	BF918 8	33,35	34,18	33,71	34,15	2,05	35,02	35,01	35,5	34,2	34,18	33,91	33,06	33,73	2,55	32,44	108,5	102,97	63,28	108,5	E. rostratum
178	BF918 9	32,96	34,08	33,72	34,32	2,02	35,24	34,9	35,62	34,06	34,26	33,68	33,24	33,64	2,53	32,24	106,8	100,34	62,49	106,8	E. rostratum
179	BF919 0	35,1	39,1	34,52	36,72	4,37	37	37,98	39,82	36,33	37,79	37,51	36,85	35,64	3,45	33,41	104,78	99,112	66,21	104,78	E. rostratum
180	BF919 1	33,12	34,44	34,13	34,6	2,01	35,46	35,18	35,98	34,04	34,54	33,89	33,56	33,98	2,5	32,74	109,17	102,99	63,51	109,17	E. rostratum
181	BF919 2	33,23	34,03	33,65	34,09	2,08	34,82	34,68	35,29	34,08	34,08	33,76	32,88	33,43	2,46	32,13	107,96	102,56	63,05	107,96	E. rostratum
182	BF919 3	33,31	37,37	32,85	34,95	4,03	35,1	36,83	37,86	34,73	35,78	35,75	35,58	34,74	3,3	32,5	102,17	96,564	64,6	102,17	E. rostratum
183	BF919 4	33,47	34,46	33,93	34,55	2,05	35,32	35,05	35,74	34,33	34,58	34,16	33,44	33,9	2,53	32,48	109,21	103,43	64,1	109,21	E. rostratum
184	BF919 5	33,27	34,16	33,52	34,31	2,2	34,96	34,99	35,51	34,23	34,08	33,75	33,03	33,54	2,67	31,79	107,6	101,39	62,66	107,6	E. rostratum
185	BF919 6	33,15	33,86	33,57	34,05	2,05	34,92	34,67	35,16	34,05	34,07	33,72	33,24	33,59	2,49	32,12	107,54	101,98	62,94	107,54	E. rostratum
186	BF919 7	37,59	38,6	37,91	38,42	2,19	39,45	40,13	40,35	38,88	38,6	38,55	33,86	34,35	2,5	32,9	103,68	97,698	61,41	103,68	E. rostratum
187	BF919 8	33,35	34,41	34	34,5	2,07	35,5	35,25	35,99	34,31	34,6	34,13	33,54	34,08	2,55	32,5	110,71	104,26	64,07	110,71	E. rostratum

188	BF919 9	35,03	36,11	35,2	35,92	2,1	36,85	36,48	37,45	35,95	35,96	35,36	33,95	34,38	2,54	32,55	109,15	102,97	63,45	109,15	<i>E. rostratum</i>
189	BF920 0	33,31	34,19	33,83	34,32	1,98	35,21	35	35,56	34,17	34,28	33,98	32,87	33,7	2,43	32,33	108,2	102,41	63,2	108,2	<i>E. rostratum</i>
190	BF920 1	86,25	91,31	94,37	97,07	8,09	102,95	92,25	94,17	89,17	94,55	90,8	43,74	42,17	3,65	39	37,58	33,433	40,07	102,95	<i>B. yamadae</i>
191	BF920 2	39,96	42,31	40,5	41,6	3,34	43,44	42,36	43,82	41,43	42,6	40,38	108,46	83,09	8,93	77,93	36,93	30,458	35,47	108,46	<i>C. papendorf ii</i>
192	BF920 3	33,99	35,02	34,25	34,79	2,16	35,82	35,63	36,17	34,8	35,01	34,5	33,98	34,46	2,69	32,98	108,36	102,31	64,13	108,36	<i>E. rostratum</i>
193	BF920 4	33,84	35,03	34,46	35,03	2,16	35,93	35,76	36,45	34,95	35,2	34,57	34,23	34,6	2,6	32,92	110,34	103,98	64,4	110,34	<i>E. rostratum</i>
194	BF920 5	33,49	34,9	34,37	35	2,08	35,95	35,53	36,24	34,63	34,88	34,08	33,86	34,19	2,6	32,58	109	101,79	63,52	109	<i>E. rostratum</i>
195	BF920 6	33,41	34,25	33,54	34,29	2,04	35,13	35,33	35,55	34,37	34,41	33,96	33,43	33,99	2,56	32,1	109,2	105,65	64,45	109,2	<i>E. rostratum</i>
196	BF920 7	33,37	34,5	33,93	34,85	2,25	35,58	35,18	35,96	34,49	34,78	33,97	33,9	33,9	2,66	32,29	108,61	102,24	63,37	108,61	<i>E. rostratum</i>
197	BF920 8	33,22	34,37	33,94	34,44	2,03	35,36	35,12	35,84	34,09	34,26	33,98	33,37	33,99	2,5	32,72	106,63	100,8	63,15	106,63	<i>E. rostratum</i>
198	BF920 9	32,37	33,83	33,29	33,89	1,98	34,78	34,53	35,37	33,32	33,78	33,07	32,62	33,28	2,39	32,05	101,46	95,78	60,79	101,46	<i>E. rostratum</i>
199	BF921 2	33,9	34,88	34,31	34,93	2,1	36,1	35,68	36,44	34,74	35,19	34,32	34,29	34,65	2,6	33,08	107,44	103,11	64,03	107,44	<i>E. rostratum</i>
200	BF921 3	33,61	35,01	34,41	35,25	2,11	36,06	35,61	36,56	35,05	34,86	34,32	34,1	34,41	2,53	32,55	111,33	104,66	63,9	111,33	<i>E. rostratum</i>
201	BF921 4	32,66	33,87	32,81	33,68	2,28	34,53	34,39	35,18	33,6	33,91	33,12	32,86	33,22	2,68	31,33	97,27	94,15	60,15	97,27	<i>E. rostratum</i>
202	BF921 5	33,66	34,74	33,96	34,61	2,13	35,45	35,29	35,89	34,53	34,66	34,09	33,6	33,9	2,7	32,32	108,32	102,15	63,2	108,32	<i>E. rostratum</i>
203	BF921 6	33,62	34,77	34,31	34,87	1,99	35,65	35,54	36,14	34,93	34,77	34,45	34,57	34,94	2,56	33,3	109,63	101,42	63,31	109,63	<i>E. rostratum</i>
204	BF921 7	31,82	32,58	31,64	32,87	2,12	33,72	33,61	34,29	32,76	32,92	32,12	31,51	31,65	2,56	30,07	89,56	84,817	62,96	89,56	<i>E. rostratum</i>
205	BF921 8	33,1	33,89	33,4	33,96	2,04	34,88	34,56	35,27	34,2	33,96	33,73	33,1	33,41	2,49	31,87	101,85	96,78	61,38	101,85	<i>E. rostratum</i>
206	BF922 1	33,16	33,86	33,27	34,14	2,23	34,99	34,69	35,23	34,18	34,19	33,45	33,24	33,17	2,64	31,33	102,08	98,117	61,14	102,08	<i>E. rostratum</i>
207	BF922 2	104,2 9	105,29	89,86	90,27	4,85	92,96	92,99	93,22	92,23	92,67	91,78	40,96	41,56	3,19	39,54	37,05	31,84	34,63	105,29	<i>B. oryzae</i>
208	BF922 3	105,6 5	106,73	90,85	91,24	5,14	94,01	93,94	94,17	93,13	93,6	92,59	41,33	42,07	3,3	39,82	37,58	31,949	35,14	106,73	<i>B. oryzae</i>

209	BF922 4	76,32	83,97	83,65	87,43	9,84	90,4	83,44	85,88	81,03	85,66	83	40,46	38,55	3,05	34,9	33,9	32,361	40,51	90,4	<i>B. yamadae</i>
210	BF922 5	92,68	94,22	89,03	90,04	4,66	92,19	92,88	93,66	91,42	92,51	91,54	39,77	41,18	3,06	38,99	37,34	31,363	34,34	94,22	<i>B. oryzae</i>
211	BF922 6	106,0 3	107,16	90,79	91,35	5,42	93,97	94,01	94,32	93,37	93,62	92,98	41,15	41,44	3,28	39,22	37,36	31,684	35,26	107,16	<i>B. oryzae</i>
212	BF922 7	31,95	32,63	31,74	32,76	2,39	33,66	33,37	34,23	32,9	32,92	32,25	32	31,73	2,66	29,7	95,87	91,938	57,67	95,87	<i>E. rostratum</i>
213	BF922 8	81,84	87,52	89,25	91,83	7,65	97,28	88,29	90,58	84,72	89,93	86,93	42,45	41,44	3,71	38,18	36,26	33,931	39,32	97,28	<i>B. yamadae</i>
214	BF923 0	33,59	34,34	33,65	34,32	2,19	35,46	35,15	35,67	34,5	34,5	33,94	33,44	33,68	2,61	32	106,31	102,79	63,21	106,31	<i>E. rostratum</i>
215	BF923 1	32,85	33,34	32,92	33,37	2,02	34,39	34,17	34,73	33,57	33,64	33,22	32,41	32,98	2,47	31,42	98,03	95,321	60,76	98,03	<i>E. rostratum</i>
216	BF923 2	94,86	96,1	94,29	95,19	4,75	98,03	113,1	107,11	104,95	97,48	104,4 7	41,71	43,13	3,02	41,27	38,43	31,618	35,78	113,1	<i>B. bicolor</i>
217	BF923 3	33,76	34,69	34,08	34,59	2,09	35,56	35,5	36,04	34,81	34,85	34,47	33,38	33,98	2,59	32,43	108,1	102,08	63,36	108,1	<i>E. rostratum</i>
218	BF923 4	107,7 3	109,61	91,66	92,33	5,6	95,19	95,2	95,54	93,96	94,78	93,78	41,06	41,6	3,16	39,43	37,14	29,774	35,11	109,61	<i>B. oryzae</i>
219	BF923 5	35,24	36,15	34,74	36,25	3,9	37,35	37,06	37,35	36,49	36,78	35,92	35,32	35	3,64	32,83	95,02	88,846	64,25	95,02	<i>E. rostratum</i>
220	BF923 6	77,97	83,42	93,37	97,17	6,06	89,67	83,03	84,42	81,32	86,93	82,76	41,06	36,6	2,72	34,07	31,82	31,045	37,41	97,17	<i>B. maydis</i>
221	BF923 7	32,63	34,9	32,56	34,58	4,58	34,75	34,78	36,18	34,07	36,47	33,99	35,63	33,79	3,75	31,82	64,83	56,15	102,61	102,61	<i>E. turcica</i>
222	BF923 8	38,42	39,96	39,32	39,6	2,05	41,22	40,78	41,01	39,58	40,13	39,87	81,68	99,89	6,48	111,46	34,82	27,783	32,68	111,46	<i>C. hawaiiensis</i>
223	BF923 9	98,5	100,68	84,84	86	6,15	88,56	88,94	89,35	88,03	88,8	87,46	40,17	40,17	3,23	38,2	36,5	31,193	34,97	100,68	<i>B. oryzae</i>
224	BF924 0	32,87	33,72	33,13	33,76	1,88	34,62	34,43	35,11	34,04	33,81	33,51	32,93	33,48	2,45	31,75	106,99	100,56	61,5	106,99	<i>E. rostratum</i>
225	BF924 1	77,83	83,65	84,92	87,48	7,21	92,86	84,58	86,34	80,79	85,68	83	40,65	39,86	3,39	36,35	34,02	32,145	38,02	92,86	<i>B. yamadae</i>
226	BF924 2	103,0 7	104,22	88,1	88,67	4,89	91,25	91,35	91,51	90,61	91,03	90,33	39,69	40,22	3,08	38,1	36,38	30,929	34,02	104,22	<i>B. oryzae</i>
227	BF924 3	32,08	33,32	32,69	33,28	1,89	34,14	33,94	34,75	32,86	33,23	32,82	32,04	32,61	2,34	31,39	104,2	98,13	60,96	104,2	<i>E. rostratum</i>
228	BF924 4	32,22	33,94	32,02	33,84	4,37	33,9	34,03	35,1	33,53	35,45	33,38	34,67	32,81	3,69	31,09	62,71	56,182	98,9	98,9	<i>E. turcica</i>
229	BF924 5	32,34	33,17	32,47	33,01	1,91	33,78	33,69	34,24	33,08	32,97	32,71	32,13	32,73	2,37	31,39	100,83	95,626	59,45	100,83	<i>E. rostratum</i>

230	BF924 6	32,98	34,13	33,46	34,14	1,93	34,94	34,65	35,45	34,07	34,21	33,48	32,9	33	2,4	31,34	108,1	101,61	61,91	108,1	<i>E. rostratum</i>
231	BF924 7	32,75	33,8	33,06	33,71	1,95	34,5	34,39	34,93	33,71	33,86	33,23	32,52	32,86	2,52	31,32	106,45	99,84	61,84	106,45	<i>E. rostratum</i>
232	BF924 8	101,1	103,24	86,96	87,75	5,09	90,35	90,5	90,71	89,07	90,03	88,96	39,84	40,18	3,16	38,1	36,01	30,55	34,26	103,24	<i>B. oryzae</i>
233	BF924 9	32,76	33,66	33,01	33,6	2	34,52	34,3	34,93	33,72	33,77	33,21	32,56	32,9	2,49	31,3	107,94	101,53	61,96	107,94	<i>E. rostratum</i>
234	BF925 1	94,52	95,81	90,83	91,54	4,74	93,83	94,35	95,06	93,12	94,06	93,07	39,25	40,93	2,9	38,75	36,54	29,192	33,3	95,81	<i>B. oryzae</i>
235	BF925 2	32,68	33,65	33,06	33,71	1,88	34,42	34,45	34,93	33,62	33,62	33,27	32,26	32,84	2,38	31,42	108,15	101,27	61,7	108,15	<i>E. rostratum</i>
236	BF925 3	32,45	33,96	33,38	34,17	1,95	35,13	34,64	35,24	33,54	34,13	33,17	33,22	33,38	2,42	31,85	107,93	100,89	62,23	107,93	<i>E. rostratum</i>
237	BF925 4	106,5 1	108,27	90,22	90,86	5,27	93,44	93,71	93,8	92,62	93,24	92,33	40,28	40,58	3,12	38,45	36,25	29,943	34,68	108,27	<i>B. oryzae</i>
238	BF925 5	107,7	108,95	91,38	91,92	5,08	94,6	94,87	95,11	93,78	94,47	93,34	40,51	40,75	3,08	38,67	36,61	29,663	34,33	108,95	<i>B. oryzae</i>
239	BF925 6	105,3 1	106,96	90,12	90,84	5,25	93,49	93,68	93,98	92,5	93,34	92,18	40,36	40,74	3,12	38,55	36,23	29,864	34,53	106,96	<i>B. oryzae</i>
240	BF925 7	33,25	34,07	33,18	33,79	2,01	35,01	34,74	35,33	33,87	34,15	33,47	32,99	33,22	2,58	31,57	106,26	101,83	62,36	106,26	<i>E. rostratum</i>
241	BF925 8	32,89	34,14	33,41	34,17	1,97	34,86	34,7	35,51	33,79	34,13	33,46	32,67	33,16	2,45	31,5	108,87	101,7	62,24	108,87	<i>E. rostratum</i>
242	BF925 9	104,4	105,44	89,08	89,56	4,66	92,23	92,45	92,65	91,53	92,06	91,09	39,51	40,06	2,95	38,12	35,97	30,13	33,54	105,44	<i>B. oryzae</i>
243	BF926 0	33,34	34,45	34,07	34,6	2,02	35,47	35,29	35,86	34,4	34,72	34,15	33,52	33,63	2,49	32,11	109,73	102,68	63,67	109,73	<i>E. rostratum</i>
244	BF926 1	91,55	92,86	91,06	91,9	4,56	94,54	108,88	103,24	101,05	94,01	100,4 7	40,22	41,2	2,94	39,45	36,58	29,88	34,26	108,88	<i>B. bicolor</i>
245	BF926 3	32,07	33,49	32,64	33,52	2,07	34,34	34,24	34,8	33,07	33,77	32,83	32,29	32,28	2,39	30,7	106,66	99,358	61,09	106,66	<i>E. rostratum</i>
246	BF926 5	32,43	33,45	32,83	33,43	2,12	34,35	34,35	34,98	33,4	33,62	33,25	32,52	32,94	2,54	31,51	108,03	101,24	62,3	108,03	<i>E. rostratum</i>
247	BF926 6	87,04	88,38	86,9	87,68	4,13	90,28	102,59	98,04	95,75	89,49	95,24	38,95	40,08	2,74	38,58	35,71	30,215	33,3	102,59	<i>B. bicolor</i>
248	BF926 7	30,83	32,92	31,37	32,12	2,21	33,17	33,31	34,68	32,09	32,98	32,16	31,38	31,28	2,57	29,67	97,14	92,357	58,53	97,14	<i>E. rostratum</i>
249	BF926 8	97,98	99,15	84,75	85,21	4,38	87,51	87,97	88,25	87,17	87,61	86,72	38,44	39,07	2,96	37,11	34,73	30,348	32,64	99,15	<i>B. oryzae</i>
250	BF926 9	85,53	91,29	93,73	96,26	8,44	102,28	91,83	93,54	88,62	93,47	90,43	43,64	41,88	3,49	37,84	35,78	31,706	40,88	102,28	<i>B. yamadae</i>
251	BF927 0	106,8 9	107,9	90,96	91,46	5,24	94,08	94,24	94,38	93,42	93,87	92,79	40,55	40,93	3,08	38,61	36,38	30,021	34,22	107,9	<i>B. oryzae</i>

252	BF927 1	32,56	33,42	32,73	33,53	2	34,57	34,43	34,84	33,51	33,8	33,07	32,59	32,89	2,45	31,2	105,15	100,28	61,68	105,15	<i>E. rostratum</i>
253	BF927 2	95,87	97,11	81,96	82,56	4,69	85,13	84,96	85,34	84,35	84,74	83,96	44,69	44,98	3,49	42,61	35,21	29,251	33,3	97,11	<i>B. oryzae</i>
254	BF927 3	106,4 5	108,42	90,44	90,97	4,85	93,63	93,97	94,4	92,69	93,6	92,38	39,87	40,32	2,97	38,25	35,82	29,206	33,7	108,42	<i>B. oryzae</i>
255	BF927 4	38,41	41,16	38,99	40,07	2,67	41,33	41,74	42,47	39,55	40,31	39,94	107,36	82,05	8,81	77,17	34,95	29,533	34,5	107,36	<i>C. papendorf ii</i>
256	BF927 5	32,3	34,14	33,03	33,86	2,24	34,88	34,72	35,66	33,33	34,45	33,23	33,13	33,06	2,5	31,5	108,42	101,05	62,99	108,42	<i>E. rostratum</i>
257	BF927 6	31,75	32,71	32,21	32,8	1,9	33,66	33,47	34,05	32,61	32,82	32,33	31,64	32,07	2,35	30,67	104,4	98,376	59,85	104,4	<i>E. rostratum</i>
258	BF927 7	32,37	33,07	32,38	33,03	1,97	34,03	33,85	34,35	33,18	33,16	32,78	32,13	32,48	2,49	31,03	101,95	98,186	60,47	101,95	<i>E. rostratum</i>
259	BF927 8	82,72	85,73	90,58	91,59	4,72	97,5	87,79	87,21	84,97	88,5	86,22	38,53	39,77	3,02	37,29	35,22	30,399	34,74	97,5	<i>B. yamadae</i>
260	BF927 9	32,52	33,61	32,99	33,61	2,01	34,63	34,21	35,03	33,53	33,71	33,11	32,51	32,71	2,48	31,22	106,08	99,758	61,08	106,08	<i>E. rostratum</i>
261	BF928 0	32,65	33,73	33,28	33,75	1,88	34,67	34,36	35,14	33,64	33,86	33,36	33,04	33,28	2,38	31,84	107,8	101,53	62,38	107,8	<i>E. rostratum</i>
262	BF928 1	33,04	34,27	33,63	34,32	1,93	35,29	34,74	35,5	34,16	34,37	33,57	33,02	33,29	2,39	31,48	106,44	100,33	61,78	106,44	<i>E. rostratum</i>
263	BF928 2	32,91	34,31	33,52	34,25	2,16	35,21	34,99	35,65	34,02	34,61	33,83	33,06	33,08	2,41	31,56	107,33	100,65	62,59	107,33	<i>E. rostratum</i>
264	BF928 3	32,84	33,63	33,15	33,63	1,93	34,57	34,36	34,99	33,68	33,67	33,44	32,59	33,05	2,43	31,53	108,98	102,38	62,36	108,98	<i>E. rostratum</i>
265	BF928 5	76,63	82,12	83,99	86,16	7,08	91,25	82,77	84,2	79,6	84,21	81,33	40,2	38,85	3,4	35,44	34,09	32,943	37,64	91,25	<i>B. yamadae</i>
266	BF928 8	31,85	32,97	31,78	32,89	2,41	33,29	33,38	33,91	32,61	32,79	32,43	31,63	32,02	2,49	30,19	100	95,987	60,09	100	<i>E. rostratum</i>
267	BF928 9	97,26	98,87	84,26	84,84	4,24	87,23	87,63	87,66	86,3	87,15	86,03	37,48	38,26	2,81	36,47	34,2	29,874	32,17	98,87	<i>B. oryzae</i>
268	BF929 0	105,4 5	106,72	90,02	90,43	5,08	93,15	93,37	93,35	92,42	92,84	91,95	40,07	40,67	3,03	38,44	35,98	29,755	34,03	106,72	<i>B. oryzae</i>
269	BF929 1	105,6 1	106,85	90,33	90,68	5,05	93,38	93,59	93,57	92,7	93,16	92,28	39,76	40,5	2,94	38,53	35,99	29,698	33,64	106,85	<i>B. oryzae</i>
270	BF929 2	33,03	34,55	33,25	34,23	2,29	35,2	34,84	35,79	34,03	34,45	33,3	33,28	33,26	2,7	31,14	105,59	100,94	62,28	105,59	<i>E. rostratum</i>
271	BF929 3	32,91	33,77	33,16	33,69	1,99	34,54	34,41	34,93	33,77	33,89	33,44	32,23	32,65	2,43	31,23	107,12	101,06	61,34	107,12	<i>E. rostratum</i>
272	BF929 4	101,9 2	103,88	87,68	88,25	4,75	90,87	91,02	91,31	89,48	90,56	89,1	39,54	39,77	2,99	37,94	36,18	30,119	33,77	103,88	<i>B. oryzae</i>

273	BF929 5	80,95	86,4	88,34	90,6	7,26	96,41	86,84	88,71	83,7	88,76	85,64	41,57	39,99	3,46	36,46	35,27	32,847	38,55	96,41	<i>B.</i> <i>yamadae</i>
274	BF929 6	104,9 8	106	89,29	89,97	5,31	92,6	92,76	93	92,06	92,41	91,57	39,86	40,2	3,21	38,13	35,98	30,026	33,97	106	<i>B. oryzae</i>
275	BF929 7	80,85	84,83	88,57	89,87	4,81	95,7	86,57	86,4	83,16	87,47	84,98	38,6	39,5	3,05	36,98	35,36	30,517	35,56	95,7	<i>B.</i> <i>yamadae</i>
276	BF929 8	32,68	33,72	32,84	33,56	1,89	34,64	34,26	35,04	33,51	33,88	32,86	32,86	32,98	2,4	31,14	107,79	103,15	62,13	107,79	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
277	BF929 9	32,03	34,05	32	33,47	3,02	34,25	34,48	35,5	33,12	34,14	33,64	32,97	32,19	2,81	30,2	103,41	97,523	61,38	103,41	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
278	BF930 0	32,45	33,75	33,13	33,73	1,91	34,83	34,5	35,12	33,45	33,86	33,23	32,78	33,11	2,43	31,63	109,82	102,75	62,81	109,82	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
279	BF930 1	32,44	33,75	32,85	33,47	2,04	34,51	34,28	34,92	33,34	33,75	33,03	32,62	33,03	2,48	31,56	110,15	102,86	62,58	110,15	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
280	BF930 2	33,14	34,23	33,1	33,91	2,16	34,76	34,59	35,52	34,01	34,33	33,38	32,91	32,92	2,69	30,9	106,68	101,71	61,75	106,68	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
281	BF930 3	104,9 9	106,16	89,69	90,25	5,07	92,87	93,04	93,06	92,21	92,5	91,7	39,91	40,36	3,1	38,28	36,07	29,978	33,96	106,16	<i>B. oryzae</i>
282	BF930 4	32,91	33,67	32,95	33,63	2,04	34,51	34,35	34,9	33,81	33,82	33,18	32,49	32,64	2,53	30,79	103,57	99,735	60,92	103,57	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
283	BF930 5	32,53	33,67	32,88	33,63	1,97	34,48	34,06	35,16	33,57	33,85	33,11	32,54	33,01	2,37	31,24	106	99,78	61,75	106	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
284	BF930 6	102,2 5	103,24	87,25	87,88	5,06	90,45	90,67	90,73	89,99	90,31	89,51	39,14	39,58	3,09	37,62	35,46	30,245	33,37	103,24	<i>B. oryzae</i>
285	BF930 7	104,9 2	105,81	89,25	89,58	4,68	92,29	92,44	92,53	91,86	92,06	91,32	39,42	40,29	2,96	38,1	35,55	29,805	33,2	105,81	<i>B. oryzae</i>
286	BF930 8	32,21	33,76	32,49	33,37	2,08	34,31	34,2	35,1	33,09	33,72	33,02	32,25	32,22	2,45	30,74	103,11	96,379	60,59	103,11	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
287	BF930 9	80,04	85,3	87,57	90,15	7,45	95	86,08	88,02	82,83	87,93	84,69	41,27	39,82	3,45	36,72	35,09	32,235	38,1	95	<i>B.</i> <i>yamadae</i>
288	BF931 0	32,67	33,55	33,18	33,69	1,9	34,71	34,5	35	33,63	33,74	33,37	32,71	33,33	2,4	31,97	108,54	102,08	62,38	108,54	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
289	BF931 1	32,56	33,78	32,44	33,59	2,03	34,51	34,01	35,06	33,42	33,77	32,92	33,02	32,73	2,51	30,81	105,93	101,23	62,17	105,93	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
290	BF931 2	29,81	30,58	30,16	30,56	1,78	31,35	31,33	31,86	30,55	30,59	30,37	29,46	30,05	2,23	28,87	96,1	90,256	55,93	96,1	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
291	BF931 3	32,45	34,23	33,02	33,74	2,02	34,81	34,81	35,57	33,51	34,4	33,54	32,73	32,87	2,46	31,31	105,52	98,831	61,99	105,52	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
292	BF931 4	32,42	32,99	32,82	33,28	1,85	34,09	33,88	34,3	33,3	33,19	33,02	32,13	32,73	2,37	31,14	106,16	100,73	61,57	106,16	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
293	BF931 5	31,64	33,38	32,67	33,38	1,9	34,1	33,95	34,41	32,89	33,11	32,21	31,77	32,6	2,36	30,81	101,82	96,029	59,45	101,82	<i>E.</i> <i>rostratum</i>
294	BF931 6	32,2	33,26	32,49	33,29	2	34,29	34,09	34,73	33,16	33,48	32,6	32,56	32,8	2,57	31,05	105,62	101,11	61,2	105,62	<i>E.</i> <i>rostratum</i>

295	BF931 7	34	34,99	34,01	34,68	2,29	35,13	35,7	36,62	34,75	34,69	34,56	33,39	34	2,9	32,4	104,2	98,827	61,87	104,2	<i>E. rostratum</i>
296	BF931 8	32,06	34,37	31,96	33,7	2,4	34,11	33,93	35,23	32,87	33,67	32,97	32,54	32,25	2,5	30,14	100,64	95,58	60,88	100,64	<i>E. rostratum</i>
297	BF931 9	32,08	32,96	32,56	33	1,91	33,9	33,9	34,36	32,94	33,08	32,7	32,04	32,67	2,43	31,37	108,98	102,28	61,74	108,98	<i>E. rostratum</i>
298	BF932 0	32,48	33,33	32,91	33,41	1,86	34,37	34,21	34,58	33,43	33,49	33,14	32,35	32,9	2,35	31,51	108,39	102,05	62,31	108,39	<i>E. rostratum</i>
299	BF932 1	31,69	32,25	31,64	32,29	1,94	33,1	33,06	33,62	32,52	32,51	32,04	31,36	31,67	2,42	30,11	98,29	94,937	58,73	98,29	<i>E. rostratum</i>
300	BF932 2	88,03	89,33	87,71	88,63	4,31	91,32	104,94	99,82	97,63	90,68	97,11	38,64	39,8	2,81	38,21	35,59	29,97	33,18	104,94	<i>B. bicolor</i>
301	BF932 3	32,18	33,31	32,64	33,3	2	34,14	33,93	34,53	33,21	33,3	32,67	31,8	32,13	2,38	30,63	100,52	95,35	59,21	100,52	<i>E. rostratum</i>
302	BF932 4	88,74	90,14	88,38	89,37	4,31	92,05	105,98	100,69	98,42	91,51	97,91	39,14	40,02	2,85	38,5	35,85	30,011	33,5	105,98	<i>B. bicolor</i>
303	BN900 1	95,27	101,56	82,25	85,82	7,1	86,78	87,06	88,59	85,07	88,23	85,97	43,72	38,73	4,1	35,37	35,55	32,665	40,12	101,56	<i>B. oryzae</i>
304	BN900 2	103,8 4	104,94	88,62	89,6	5,69	91,94	92,36	92,59	91,42	91,91	90,76	40,52	40,56	3,47	38,48	36,68	30,156	34,65	104,94	<i>B. oryzae</i>
305	BN900 3	105,7 7	107,05	90,26	91,19	5,79	93,6	93,98	94,2	92,95	93,6	92,32	41,08	41,15	3,52	38,96	37,1	30,005	34,94	107,05	<i>B. oryzae</i>
306	BN900 4	103,7 4	104,68	88,77	89,69	5,6	91,99	92,43	92,65	91,67	92,05	90,98	40,58	40,7	3,51	38,53	36,47	30,129	34,5	104,68	<i>B. oryzae</i>
307	BN900 5	109,7 8	111,19	92,75	93,69	6,04	96,36	96,79	96,98	95,59	96,23	95,02	41,67	41,82	3,5	39,59	37,46	29,247	35,26	111,19	<i>B. oryzae</i>
308	BN900 7	98,37	98,81	84,71	85,07	4,65	87,41	87,69	87,82	87,27	87,11	86,6	38,18	38,59	3,02	36,55	34,46	30,094	32,4	98,81	<i>B. oryzae</i>
309	BN900 8	99,41	100,9	85,41	86,03	5,04	88,64	88,9	89,08	87,9	88,4	87,36	38,67	38,91	3,07	36,68	34,74	30,25	33,29	100,9	<i>B. oryzae</i>
310	BN900 9	99,05	100,48	85,69	86,37	4,74	88,59	88,72	89,08	87,78	88,46	86,98	38,51	38,86	2,99	36,78	34,93	30,098	32,84	100,48	<i>B. oryzae</i>
311	BN901 0	35,44	36,69	36,24	36,91	2,15	37,59	36,48	37,73	36,36	36,7	36,06	33,84	34,67	2,67	33,02	99,3	94,748	60,57	99,3	<i>E. rostratum</i>
312	BN901 1	98,11	98,98	85,6	85,91	4,36	88,45	88,44	88,59	87,65	88,03	87,24	38,79	39,46	3,07	37,6	35,39	30,794	33,04	98,98	<i>B. oryzae</i>
313	BN901 2	102,8 4	103,47	88,1	88,42	4,72	90,89	91,2	91,2	90,64	90,71	90,03	39,24	39,62	3,02	37,55	35,23	30,105	33,11	103,47	<i>B. oryzae</i>
314	BN901 3	106,8 1	108,14	91,21	91,89	5,33	94,34	94,43	94,8	93,56	94,24	92,77	40,76	40,91	3,07	38,67	37,05	30,24	34,67	108,14	<i>B. oryzae</i>
315	BN901 4	104,0 5	105,13	89,02	89,47	5,01	92,06	92,26	92,49	91,14	91,74	90,66	39,84	40,09	3,07	38,19	36,05	29,993	33,76	105,13	<i>B. oryzae</i>
316	BN901 5	93,47	99,68	81,7	85,26	6,74	86,12	86,43	87,63	84,39	87,19	85,38	44,16	39,39	4,12	36,05	35,02	33,209	40,04	99,68	<i>B. oryzae</i>

317	BN901 6	97,25	98,35	84,7	85,26	4,83	87,59	87,87	87,93	86,97	87,4	86,41	38,7	38,88	3,05	37,05	35,05	30,725	33,27	98,35	<i>B. oryzae</i>
318	BN901 7	100,2 5	101,31	86,21	86,67	4,63	89,13	89,55	89,46	88,55	88,81	87,98	38,54	38,86	2,89	36,96	34,98	30,108	32,84	101,31	<i>B. oryzae</i>
319	BN901 8	99,71	100,71	86,14	86,58	4,62	88,95	89,37	89,27	88,35	88,61	87,8	38,8	39,14	2,96	37,3	34,88	30,018	32,85	100,71	<i>B. oryzae</i>
320	BN901 9	99,96	101	86,14	86,54	4,53	89,13	89,35	89,31	88,47	88,81	87,88	38,6	39,02	3,02	37,12	35,13	30,366	32,93	101	<i>B. oryzae</i>
321	BN902 0	100,3 2	101,14	86,58	86,88	4,5	89,42	89,4	89,57	88,99	89,16	88,43	38,59	39,23	2,95	37,24	35,14	30,316	32,94	101,14	<i>B. oryzae</i>
322	CH900 0	111,4 1	112,35	93,42	93,77	5,17	96,64	96,64	96,88	95,77	96,29	95,35	40,5	40,92	3,02	39,02	36,85	29,092	34,16	112,35	<i>B. oryzae</i>
323	CH900 2	100,8 1	101,98	87,12	87,5	4,35	90,07	89,92	90,1	89,08	89,68	88,54	38,61	39,04	2,91	37,19	34,95	29,942	32,73	101,98	<i>B. oryzae</i>
324	CH900 3	108,5 4	109,64	91,77	92,17	4,75	94,93	94,95	95,36	93,96	94,79	93,61	40,51	40,75	2,92	38,83	35,91	29,182	33,71	109,64	<i>B. oryzae</i>
325	CH900 4	110,2 9	111,16	92,88	93,17	4,93	96,07	95,93	96,32	95,29	95,81	94,78	40,21	40,51	2,94	38,57	36,26	29,249	33,88	111,16	<i>B. oryzae</i>
326	CH901 0	101,6 3	102,96	86,72	87,41	4,74	89,97	89,68	90,44	88,93	89,28	88,46	39,12	39	2,97	36,88	35,58	30,442	33,11	102,96	<i>B. oryzae</i>
327	CH901 2	107,9 6	108,74	91	91,33	4,8	94,07	94,05	94,45	93,55	93,95	93,01	39,89	40,05	2,93	38,02	36,03	29,855	33,92	108,74	<i>B. oryzae</i>
328	CH901 5	104,1	105,67	88,45	89,01	4,84	91,77	91,51	92,11	90,69	91,28	90,49	39,62	39,68	2,96	37,45	36,03	30,476	33,63	105,67	<i>B. oryzae</i>
329	CL900 1	99,57	100,89	85,81	86,23	4,23	88,8	88,74	88,99	87,85	88,5	87,42	37,92	38,49	2,89	36,71	34,47	29,754	32,35	100,89	<i>B. oryzae</i>
330	FR902 9	86,89	88,74	83,41	84,77	4,72	87,77	88,75	88,4	87,12	89,75	87,06	35,82	35,84	2,79	33,69	31,5	27,749	30,43	89,75	<i>B. sorokiniana</i>
331	FR903 0	34,3	35,21	34,86	35,19	2,08	36,15	35,99	36,56	35,21	35,52	35,11	76,43	109,27	5,7	92	31,45	28,184	29,13	109,27	<i>C. spicifera</i>
332	FR903 2	95,49	100,64	77,76	79,52	5,98	82,59	83,47	84,57	81,9	83,02	82,21	34,17	33,42	2,94	31,53	30,14	29,697	31,71	100,64	<i>B. oryzae</i>
333	FR903 3	94,05	99,1	77,47	79,27	5,97	82	82,83	84,28	81,41	82,42	82,12	35,27	34,23	3,18	32,47	31,05	31,073	32,25	99,1	<i>B. oryzae</i>
334	FR903 4	35,71	36,8	36,77	37,53	2,42	38,46	37,8	38,82	37,52	37,9	36,7	79,72	110,8	6,14	94,57	33,28	29,343	31,04	110,8	<i>C. spicifera</i>
335	FR903 5	89,05	92,95	72,52	74,05	5,1	76,72	77,15	77,97	75,83	76,96	76,32	33,2	33,09	2,88	31,2	28,82	29,92	30,51	92,95	<i>B. oryzae</i>
336	FR903 8	35,19	36,23	35,64	36,1	1,85	37,06	36,61	37,33	36,3	36,71	35,94	78,31	109,36	5,78	93,91	32,4	28,982	30,08	109,36	<i>C. spicifera</i>
337	FR903 9	84,83	88,91	69,73	71,1	5,29	73,47	74,66	75,67	72,96	74,22	73,41	31,5	31,26	2,72	29,22	27,83	31,858	28,85	88,91	<i>B. oryzae</i>

338	FR904 1	74,08	74,73	73,21	73,67	3,48	76,36	84,22	88,44	84,87	76,28	84,06	30,59	31,84	2,22	29,96	28,14	25,82	27,05	88,44	<i>B. secalis</i>
339	FR904 2	34,35	35,37	34,99	35,36	1,87	36,6	36,23	36,72	35,33	35,75	35,12	78,2	111,81	5,83	94,18	31,61	28,4	29,51	111,81	<i>C. spicifera</i>
340	FR904 3	34,43	35,21	34,97	35,41	2	36,07	36,18	36,81	35,83	35,33	35,59	77,91	111,73	5,79	94,26	31,81	28,338	29,29	111,73	<i>C. spicifera</i>
341	FR904 4	100,6 8	105,47	81,49	83,14	5,88	86,08	86,97	87,83	85,57	86,52	85,73	35,57	34,96	2,92	33,13	31,35	32,866	32,24	105,47	<i>B. oryzae</i>
342	FR904 5	32,33	33,79	33,36	33,79	2,03	34,84	34,49	35,11	33,89	34,38	33,47	72,52	101,74	5,38	87,31	30,03	26,765	28,31	101,74	<i>C. spicifera</i>
343	FR904 6	89,38	90,46	72,99	73,56	3,82	76,08	76,21	76,31	75,59	76,13	75,18	32,41	33,71	2,68	31,73	27,56	31,285	26,75	90,46	<i>B. oryzae</i>
344	FR904 7	77,8	79,66	74,7	76,32	4,34	78,93	80,15	79,41	78,43	81,18	78,12	32,69	32,43	2,46	30,4	28,63	25,652	27,85	81,18	<i>B. sorokiniana</i>
345	FR904 8	79,42	81,3	76,37	77,81	5,08	80,14	81,8	80,83	80,53	82,43	79,65	33,11	32,76	2,69	30,76	29,06	26,537	28,98	82,43	<i>B. sorokiniana</i>
346	FR904 9	97,38	102,22	78,04	79,66	5,73	82,88	83,9	85,06	82,67	83,59	83,05	33,86	32,98	2,96	30,88	29,63	31,922	31,02	102,22	<i>B. oryzae</i>
347	GH900 1	103,9	104,94	88,93	89,39	4,79	91,9	92,09	92,24	91,25	91,65	90,68	39,72	40,1	3,03	37,99	36,14	30,36	33,78	104,94	<i>B. oryzae</i>
348	GH900 2	35,23	37,25	36,48	37,2	2,36	38,63	38,22	39,56	36,28	37,5	36,09	34,3	35,32	2,77	33,75	104,01	97,525	62,26	104,01	<i>E. rostratum</i>
349	GH900 4	33,41	34,38	33,45	34,49	2,43	35,46	35,29	35,89	34,34	34,6	34	33,4	33,9	2,69	32,05	110,49	102,97	64,02	110,49	<i>E. rostratum</i>
350	GH900 5	32,38	33,19	32,25	33,33	2,42	34,22	33,99	34,7	33,35	33,39	32,9	32,51	32,82	2,65	30,99	105,88	99,352	61,14	105,88	<i>E. rostratum</i>
351	GH900 6	36,69	39,19	37,27	38,42	2,47	39,48	39,75	40,41	37,85	38,61	37,91	100,59	76,79	7,68	72,16	34,75	30,507	33,7	100,59	<i>C. papendorfii</i>
352	GH900 7	100,8 4	102,26	88,19	88,71	4,66	91,9	92	91,92	90,62	90,87	90,31	39,14	39,18	2,98	37,43	35,13	29,857	32,87	102,26	<i>B. oryzae</i>
353	GH900 9	86,86	91,55	96,4	98,03	5,91	106,91	92,92	93,98	90,52	94,45	90,81	40,63	39,79	3,13	37,19	36,14	30,226	36,75	106,91	<i>B. yamadae</i>
354	GH901 1	104,8 7	106,09	88,53	89,2	5,13	91,78	92,16	92,16	91,09	91,57	90,68	39,34	39,62	3,09	37,5	36,23	30,857	34,3	106,09	<i>B. oryzae</i>
355	GH901 2	91,94	98,33	80,74	84,67	6,9	85,2	85,2	86,88	83	86,61	84,14	43,88	38,87	4,1	35,27	34,86	33,269	39,91	98,33	<i>B. oryzae</i>
356	GH901 3	98,3	99,5	84,91	85,58	4,87	88	88,07	88,43	87,23	87,64	86,85	38,89	39,08	3,25	37,19	35,33	30,606	33,25	99,5	<i>B. oryzae</i>
357	GH901 4	104,9 4	106,11	88,85	89,55	5,72	92,21	92,31	92,55	91,49	91,88	91,15	39,72	39,93	3,09	37,83	36,25	30,364	34,27	106,11	<i>B. oryzae</i>

358	GH901 5	98,16	99,3	84,06	84,72	5,08	87,12	87,43	87,55	86,79	87,09	86,2	37,93	38,33	3,03	36,16	34,3	30,171	32,8	99,3	<i>B. oryzae</i>
359	IT9003	37,84	39,49	38,56	38,9	2,13	40,27	40,43	40,72	38,99	39,38	39,18	81,2	108,74	6,31	95,05	34,44	27,934	32,48	108,74	<i>C. spicifera</i>
360	IT9004	37,41	38,44	37,77	38,27	2,36	39,47	39,17	39,88	38,88	38,96	38,47	78,55	104,03	6,01	91,42	34,1	29,581	31,83	104,03	<i>C. spicifera</i>
361	IT9005	89,04	90,26	88,65	89,49	4,39	92,18	105,62	100,55	98,57	91,72	97,9	39,42	40,4	2,89	38,44	35,98	30,057	33,51	105,62	<i>B. bicolor</i>
362	IT9006	38,33	39,5	38,7	39,27	2,57	40,48	40,33	40,73	39,69	39,78	39,35	80,71	106,89	6,49	94,06	34,97	29,303	32,61	106,89	<i>C. spicifera</i>
363	IT9007	94,22	95,37	93,09	93,9	4,66	96,72	106,72	110,34	105,59	96,79	105,1 1	41,39	42,75	3,09	40,05	37,49	30,772	34,91	110,34	<i>B. secalis</i>
364	IT9008	97,64	103,37	82,88	84,92	6,81	88,01	89,01	90,39	87,04	88,68	87,41	40,32	39,14	3,53	36,79	35,62	31,247	36,96	103,37	<i>B. oryzae</i>
365	ML900 1	79,2	83,55	99,96	102,9 2	5,74	93,51	84,53	84,92	83,25	88,51	83,65	38,84	34,45	2,6	32,12	30,43	29,667	34,82	102,92	<i>B. maydis</i>
366	ML900 2	89,56	91,31	86,07	87,68	5,12	90,11	91,69	91,17	90,12	92,43	89,62	37,54	37,58	2,89	35,04	33,11		31,71	92,43	<i>B. sorokiniana</i>
367	ML900 3	79,68	85,1	100,9	104,1 3	5,54	95,38	86,45	87,13	83,46	89,72	84,92	39,14	34,97	2,52	33,14	30,92	29,739	35,4	104,13	<i>B. maydis</i>
368	ML900 4	89,9	91,73	86,17	87,48	4,91	90,65	91,29	91,61	89,74	92,13	89,81	36,62	36,65	2,88	34,57	32,49	28,592	31,21	92,13	<i>B. sorokiniana</i>
369	ML900 5	82,48	85,2	80,09	82,01	4,67	84,46	86,58	85,69	84,01	87,02	83,2	35,92	36,31	2,82	33,58	32,33	28,564	30,65	87,02	<i>B. sorokiniana</i>
370	ML900 6	80,87	82,35	77,49	78,54	4,23	81,3	81,95	82,13	80,75	82,66	80,66	32,38	32,26	2,56	30,43	28,8	26,162	27,72	82,66	<i>B. sorokiniana</i>
371	ML900 7	83,25	84,96	79,75	81,16	4,44	84,31	85,44	84,8	83,57	86,01	83,36	33,28	33,02	2,48	30,81	28,55	26,072	27,97	86,01	<i>B. sorokiniana</i>
372	ML901 1	30,47	31,55	31,27	31,7	1,79	32,56	32,39	32,87	31,38	31,67	31	30,87	31,39	2,37	30,15	112,22	99,8	59,72	112,22	<i>E. rostratum</i>
373	ML901 2	29,77	30,62	30,48	30,96	1,77	31,94	31,39	32,06	30,54	31,02	30,14	30,38	30,74	2,44	29,3	110,05	95,398	58,55	110,05	<i>E. rostratum</i>
374	ML901 3	100,7	103,1	82,98	83,63	4,15	86,68	86,73	86,9	85,48	86,62	85,26	34,28	34,68	2,64	33,05	30,97	29,572	29,87	103,1	<i>B. oryzae</i>
375	ML901 4	98,74	100,91	81,77	82,29	3,93	85,32	84,64	84,79	83,07	84,52	82,8	34,85	34,45	2,54	33,17	30,97	30,46	29,36	100,91	<i>B. oryzae</i>
376	ML901 5	95,09	96,68	78,77	79,11	4	81,85	81,92	81,85	80,61	81,53	80,3	32,59	33,25	2,51	31,7	29,94	29,691	28,47	96,68	<i>B. oryzae</i>
377	ML901 6	102,7 5	104,55	84,76	85,26	4,21	88,24	88,71	88,65	87,36	88,15	86,92	35,48	35,46	2,77	33,91	31,75	30,021	30,34	104,55	<i>B. oryzae</i>

378	ML901 7	97,84	99,31	80,3	80,62	4,27	83,46	83,77	83,79	82,89	83,19	82,43	33,21	33,56	2,62	31,59	30,35	29,871	29,03	99,31	<i>B. oryzae</i>
379	ML901 8	103,6 2	106,27	85,33	85,74	4,11	88,96	89,05	89,21	87,41	88,71	87,26	34,85	35,45	2,66	33,83	31,37	29,401	30,21	106,27	<i>B. oryzae</i>
380	ML901 9	29,03	30,1	29,43	29,97	1,87	30,65	30,46	31,04	29,82	30,19	29,34	29,3	29,56	2,44	28,21	109,52	101,88	56,86	109,52	<i>E. rostratum</i>
381	ML902 0	26,39	27,49	26,84	27,38	1,58	28,21	28,09	28,57	27,22	27,61	26,78	26,94	27,05	2,17	25,9	96,59	102	51,9	102	<i>E. rostratum</i>
382	ML902 1	82,12	83,87	82,33	83,23	4,71	85,33	102,19	93,74	92,55	85,26	91,82	35,08	35,59	2,75	33,8	32,02	29,173	30,98	102,19	<i>B. bicolor</i>
383	ML902 2	102,8 4	104,4	84,1	84,47	4,38	87,62	87,97	87,81	86,78	87,42	86,21	35,08	35,12	2,87	33,57	31,43	30,413	30,54	104,4	<i>B. oryzae</i>
384	ML902 3	92,8	94,7	76,38	76,84	3,75	79,51	80,2	79,6	78,7	79,42	78,41	32,11	32,02	2,58	30,59	28,41	29,913	27,21	94,7	<i>B. oryzae</i>
385	ML902 4	85,43	91,22	69,87	71,62	7,5	74,88	76,86	77,11	74,6	76,27	74,99	32,85	31,46	2,94	29,5	28,22	30,531	31,61	91,22	<i>B. oryzae</i>
386	ML902 5	90,16	96,92	73,74	75,83	8,44	78,65	81,04	81,69	78,57	80,46	79,61	34,93	33,52	3,13	31,4	30,11	31,874	34,27	96,92	<i>B. oryzae</i>
387	ML902 6	29	30,5	29,84	30,34	1,76	31,16	30,95	31,77	29,83	30,49	29,45	29,84	30,03	2,32	28,76	106,19	100,22	56,43	106,19	<i>E. rostratum</i>
388	ML902 7	27,54	28,4	28,04	28,46	1,68	29,06	29,03	29,34	28,06	28,5	27,85	27,67	28,26	2,19	27,21	100,39	100,13	54,24	100,39	<i>E. rostratum</i>
389	ML902 8	102,7 9	105,53	83,43	83,85	4,3	87,26	87,53	87,59	86,03	86,99	85,59	34,12	34,16	2,72	32,79	30,69	31,765	29,23	105,53	<i>B. oryzae</i>
390	ML902 9	101,2 6	102,74	82,32	82,6	4,19	85,71	85,91	85,93	84,72	85,49	84,47	32,94	32,95	2,56	31,35	29,68	31,009	28,61	102,74	<i>B. oryzae</i>
391	ML903 0	74,2	79,57	93,55	96,67	5,39	88,28	80,32	81,22	78,17	83,56	79,85	36,95	32,83	2,28	30,69	28,37	32,674	34,11	96,67	<i>B. maydis</i>
392	ML903 2	77,8	82,27	100,2 1	103,0 7	5,44	93,3	83,49	83,67	81,5	86,97	82,49	36,76	32,67	2,38	30,79	28,47	32,178	33,11	103,07	<i>B. maydis</i>
393	ML903 3	93,78	95,08	77,08	77,46	3,98	80,28	80,45	80,41	79,37	79,97	78,86	32,75	32,9	2,51	31,03	29,42	5,3858	28,3	95,08	<i>B. oryzae</i>
394	ML904 0	28,46	29,28	28,9	29,45	1,79	30,16	29,72	30,36	29,35	29,6	28,91	28,45	28,86	2,25	27,61	106,49	94,511	56	106,49	<i>E. rostratum</i>
395	ML904 1	28,72	29,86	29,26	29,84	1,82	30,65	30,52	30,88	29,55	30,04	29,05	29,1	29,39	2,4	28,05	105,71	101,54	56,03	105,71	<i>E. rostratum</i>
396	ML904 2	28,3	29,22	28,86	29,2	1,79	29,76	29,81	30,24	28,83	29,18	28,46	28,51	28,98	2,27	27,73	107,45	100,37	56,1	107,45	<i>E. rostratum</i>
397	ML904 4	29,38	30,91	30,01	30,61	1,75	31,57	31,17	32,14	30,32	30,95	29,92	29,9	30,16	2,36	28,93	107,78	98,419	57,37	107,78	<i>E. rostratum</i>
398	ML904 5	27,72	28,46	27,87	28,38	1,76	29,27	29,38	29,56	28,34	28,64	27,68	27,91	28,03	2,17	26,48	95,2	100,25	52,34	100,25	<i>E. rostratum</i>
399	ML904 6	29,12	30,8	30,28	31,1	1,8	31,87	31,2	32,11	30,27	31,04	29,61	30,29	30,1	2,38	28,76	104,18	101,08	56,35	104,18	<i>E. rostratum</i>

400	PK901 9	35,14	36,46	36,06	36,36	1,74	37,83	37,45	37,82	36,41	36,79	36,18	79,29	109,92	5,97	95,13	32,98	28,388	30,39	109,92	<i>C. spicifera</i>
401	PK902 0	33,64	34,63	34,84	35,24	1,6	36	35,37	36,02	34,95	35,44	34,68	76,36	105,7	5,74	91,58	31,47	27,933	29,11	105,7	<i>C. spicifera</i>
402	PK902 1	33,4	34,47	33,93	34,05	1,85	35,41	35,37	35,2	34,04	34,77	33,91	75,18	96,54	5,7	113,83	30,59	26,787	28,93	113,83	<i>C. hawaiiensis</i>
403	PK902 2	27,9	28,62	28,35	28,71	1,75	29,52	29,35	29,76	28,62	28,79	28,32	27,87	28,47	2,17	27,18	101,13	99,734	54,37	101,13	<i>E. rostratum</i>
404	PK902 3	31,75	32,93	32,68	32,9	1,5	33,97	33,68	34,15	32,68	33,15	32,55	73,67	104,8	5,21	90,2	29,18	26,008	27,44	104,8	<i>C. spicifera</i>
405	PK902 4	33,16	34,09	34,42	34,57	1,43	35,54	35,16	35,43	34,43	34,5	34,29	75,7	106,54	5,35	92,19	30,21	26,953	27,95	106,54	<i>C. spicifera</i>
406	PK902 5	26,21	26,93	26,5	26,96	1,92	27,68	27,56	28,06	27,1	27,18	26,72	26,4	26,52	2,2	25,37	92,44	100,14	50,98	100,14	<i>E. rostratum</i>
407	PK902 6	28,8	29,88	29,58	30,08	1,8	30,85	30,55	31,21	29,59	30,2	29,27	29,38	29,83	2,28	28,57	102,21	97,505	56,42	102,21	<i>E. rostratum</i>
408	PK902 7	32,69	33,59	33,38	33,63	1,58	34,89	34,47	34,89	33,93	33,97	33,5	73,18	102,83	5,38	88,76	29,69	26,603	27,38	102,83	<i>C. spicifera</i>
409	PK902 8	33,84	34,86	34,77	35,07	1,48	35,92	35,64	36,2	34,96	35,04	34,75	76,57	106,72	5,45	92,39	30,8	27,147	28,62	106,72	<i>C. spicifera</i>
410	PK902 9	78,92	80,61	88,54	89,62	3,98	97,24	82,86	83,45	81,18	84,92	81,3	34,45	34,86	2,64	33,13	31,03	27,267	29,57	97,24	<i>B. yamadae</i>
411	PK903 0	34,78	35,53	35,49	35,59	1,62	36,6	36,43	36,78	35,84	36	35,66	78,95	111,48	5,76	95,95	31,6	28,062	29,39	111,48	<i>C. spicifera</i>
412	PK903 1	35,24	35,94	35,93	36,36	1,72	37,33	37,14	37,38	36,74	36,63	36,28	79,62	110,86	5,99	95,42	32,06	28,241	29,85	110,86	<i>C. spicifera</i>
413	PK903 2	27,36	28,14	27,87	28,11	1,72	28,97	28,41	29,02	27,74	28,12	27,62	27,1	27,68	2,18	26,68	96,07	99,499	52,78	99,499	<i>E. rostratum</i>
414	PK903 3	34,11	35,79	35,11	35,73	1,88	37,12	36,41	36,63	35,23	36,01	34,58	76,38	96,13	5,76	110,13	31,88	27,458	29,38	110,13	<i>C. hawaiiensis</i>
415	PK903 4	33,33	34,3	34,18	34,45	1,59	35,36	34,99	35,5	34,6	34,89	34,31	74,08	101,2	5,35	88,42	30,54	27,212	28,6	101,2	<i>C. spicifera</i>
416	PK903 5	84,98	86,26	70,8	71,19	3,24	73,7	73,64	73,64	72,72	73,59	72,52	29,38	29,74	2,34	28,11	26,49	32,02	25,5	86,26	<i>B. oryzae</i>
417	PK903 6	31,66	32,58	32,54	32,91	1,6	33,76	33,27	34	32,89	33,13	32,54	69,84	95,09	5,18	82,99	29,36	25,739	27,58	95,09	<i>C. spicifera</i>
418	PK903 8	34,03	34,88	34,92	35,08	1,56	35,99	35,8	36,23	34,97	35,31	34,85	76,99	108,31	5,64	93,74	31,15	27,432	28,87	108,31	<i>C. spicifera</i>
419	SN900 2	26,79	27,62	26,96	27,69	1,73	28,51	28,23	28,62	27,55	27,91	27,2	27,4	26,9	2,24	25,77	95,98	98,884	51,7	98,884	<i>E. rostratum</i>
420	SN900 3	32,92	34,41	33,62	34,45	1,98	35,29	35,29	35,82	34,23	35,01	33,73	33,41	33,84	2,57	31,98	113,5	105,78	64,36	113,5	<i>E. rostratum</i>

421	SN900 5	32,5	33,58	33,07	33,71	1,88	34,45	34,19	34,99	33,63	33,57	33,14	32,66	33,21	2,38	31,47	106,75	100,53	61,34	106,75	<i>E. rostratum</i>
422	SN900 6	35,82	36,43	36,69	36,77	1,78	37,6	37,27	37,33	36,65	36,53	36,49	72,71	88,4	5,22	97,06	34,34	30,492	31,05	97,06	<i>C. hawaiiensis</i>
423	SN900 7	69,63	70,98	69,38	70,28	3,62	72,35	80,45	77,32	75,4	71,99	75,01	37,72	38,29	2,53	36,55	61,96	56,67	44,39	80,45	<i>B. bicolor</i>
424	SN900 8	32,96	34	33,29	34,06	2,11	34,96	35,86	35,25	34,99	35,77	34,31	33,12	33,42	2,71	31,73	109,12	102,55	62,42	109,12	<i>E. rostratum</i>
425	SN900 9	31,57	32,39	31,97	32,48	1,96	33,38	33,1	33,61	32,47	32,67	31,98	31,67	32	2,47	30,48	102,52	97,289	59,49	102,52	<i>E. rostratum</i>
426	SN901 0	32,16	33,34	32,44	33,24	1,98	34,11	33,88	34,48	33,13	33,63	32,8	31,84	32,05	2,44	30,51	103,13	97,336	59,99	103,13	<i>E. rostratum</i>
427	TG900 0	34,87	35,85	35,63	36,26	2,4	36,78	36,21	37,85	36,01	36	35,69	33,12	34,29	2,62	33,37	107,59	101,9	63,72	107,59	<i>E. rostratum</i>
428	TG900 1	32,63	33,46	32,8	33,59	2,23	34,18	34,22	34,87	33,39	33,49	33,09	32,66	32,84	2,6	31,35	108,27	101,91	62,36	108,27	<i>E. rostratum</i>
429	TG900 3	32,76	33,52	32,7	33,64	2,19	34,3	34,22	34,95	33,5	33,43	33,26	32,57	33,03	2,64	31,7	107,35	101,88	62,48	107,35	<i>E. rostratum</i>
430	TG900 4	91,44	98,36	80,34	84,26	6,91	85,23	85,35	86,72	82,59	86,26	83,56	43,54	39,08	4,19	35,67	34,59	32,566	39,56	98,36	<i>B. oryzae</i>
431	TG900 5	91,18	97,44	79,6	83,53	6,83	84,29	84,44	86,01	82,15	85,54	82,9	42,5	38,29	4,01	34,94	34,53	32,919	38,84	97,44	<i>B. oryzae</i>
432	TG900 6	88,61	96,05	77,85	81,95	6,73	82,51	82,74	84,66	80,27	83,99	81,49	42,92	37,54	4,06	34,28	33,86	32,692	39,46	96,05	<i>B. oryzae</i>
433	TG900 7	87,05	93,97	80,45	84,29	6,48	83,93	83,1	84,55	80,38	84,29	81,61	42,5	37,98	3,83	34,88	34,13	33,136	38,93	93,97	<i>B. oryzae</i>
434	TG900 8	31,48	37,92	32,6	35,37	3,49	35,62	35,24	37,81	32,57	36,11	34,18	35,09	32,62	2,44	30,24	102,14	99,161	65,68	102,14	<i>E. rostratum</i>
435	TG901 0	92,76	99,45	81,01	84,41	6,63	85,38	85,72	86,94	83,67	86,41	84,72	43,6	38,84	3,99	35,6	34,34	32,502	39,57	99,45	<i>B. oryzae</i>
436	TG901 1	85,59	93,03	75,21	79,02	6,7	79,6	79,61	81,33	77,03	81,05	78,56	41,04	36,17	3,7	32,93	32,96	32,887	38,09	93,03	<i>B. oryzae</i>
437	TG901 2	100,5 7	102,77	86,54	87,15	4,73	90,21	90,11	90,73	88,55	89,55	88,23	39,97	39,82	2,86	38,15	42,87	36,755	37,27	102,77	<i>B. oryzae</i>
438	TG901 3	31,34	37,6	32,26	34,81	3,4	35,17	35,04	37,33	32,4	35,61	34,17	34,91	32,63	2,42	30,23	103,62	101	65,99	103,62	<i>E. rostratum</i>
439	TG901 4	32,25	33,37	32,62	33,41	2,31	33,78	34,13	34,03	33,38	33,83	32,72	32,74	32,08	2,61	30,39	102,13	99,382	60,3	102,13	<i>E. rostratum</i>
440	TG901 5	32,5	33,76	33,16	33,95	2,29	34,35	34,68	34,56	33,67	34,31	33,06	33,2	32,66	2,62	30,95	101,96	98,972	61,14	101,96	<i>E. rostratum</i>
441	TG901 6	32,61	33,92	33,24	34,05	2,3	34,43	34,78	34,66	33,85	34,44	33,23	33,4	32,78	2,63	30,93	105,08	101,67	61,92	105,08	<i>E. rostratum</i>

442	TG901 8	76,3	81,07	91,99	95,73	6,03	87,85	80,89	82,21	79,99	85,39	80,51	39,89	35,25	2,53	32,41	30,82	29,826	36,06	95,73	<i>B. maydis</i>
443	TG902 1	83,97	88,66	102,8 5	106,4 4	6,91	97,24	88,75	89,84	87,79	93,24	88,24	42,71	37,63	2,76	34,69	33	29,682	38,31	106,44	<i>B. maydis</i>
444	TG902 4	32,79	33,69	32,83	33,84	2,09	34,52	34,33	35,12	33,66	33,74	33,26	32,82	33,25	2,6	31,54	110,11	104,11	63,1	110,11	<i>E. rostratum</i>
445	US900 4	35,55	36,56	35	35,43	2,06	37,33	36,42	37,36	35,37	35,97	35,42	33,31	33,78	2,24	31,4	105,26	99,35	63,44	105,26	<i>E. rostratum</i>
446	US900 5	97,79	102,86	83,34	84,93	6,13	87,79	88,54	89,9	86,8	88,21	87,07	39,76	38,83	3,3	36,84	35,03	30,624	35,93	102,86	<i>B. oryzae</i>
447	US900 7	105,4 5	108,96	88,8	90,02	6,37	92,75	93,58	94,51	92,37	93,3	92,68	40,7	40,32	3,21	38,07	36,34	30,725	36,82	108,96	<i>B. oryzae</i>
448	US900 9	91,43	95,47	87,68	89,79	7,34	92,11	91,95	93,59	91,03	93,24	90,56	40,96	39,23	3,02	36,36	34,43	30,963	37,12	95,47	<i>B. oryzae</i>
449	US901 1	94,39	100,03	80,24	82,22	6,41	84,56	85,55	87,19	84,58	85,72	84,51	39,14	38,02	3,34	35,56	34,22	31,157	35,93	100,03	<i>B. oryzae</i>
450	US901 3	102,8 7	107,74	86,65	88,13	6,68	90,96	91,99	93,19	90,36	91,56	90,63	40,73	40,08	3,33	37,91	35,9	30,527	37,12	107,74	<i>B. oryzae</i>
451	US901 6	94,97	99,74	81,08	82,61	6,07	85,31	86,34	87,25	84,98	85,84	84,79	38,85	38,2	3,26	36,14	34,13	30,171	35,21	99,74	<i>B. oryzae</i>
452	US901 8	104,8	110,03	87,33	88,93	6,9	91,9	92,84	93,86	91,45	92,42	91,41	41,06	40,18	3,44	37,86	35,93	30,43	37,16	110,03	<i>B. oryzae</i>
453	US902 0	96,34	101,17	81,79	83,25	6,05	86,04	86,85	87,79	85,55	86,43	85,54	40,4	39,83	3,35	37,51	35,4	31,267	36,02	101,17	<i>B. oryzae</i>
454	US902 2	104,8 5	110,38	87,67	89,43	7,27	92,4	93,23	94,99	91,89	93,15	92,11	41,65	40,54	3,47	38,06	36,31	30,295	38,14	110,38	<i>B. oryzae</i>
455	US902 4	96,5	101,02	81,78	83,56	6,46	86,39	87,43	88,52	86,28	86,99	86,53	39,18	38,65	3,42	36,3	34,63	31,45	35,61	101,02	<i>B. oryzae</i>
456	US902 6	103,6 8	108,91	86,71	88,49	7,24	91,6	92,75	93,94	90,98	92,08	91,34	40,82	40,24	3,55	37,97	36,05	30,911	37,32	108,91	<i>B. oryzae</i>
457	US902 8	106,2 2	111,41	87,81	89,78	7,27	92,58	93,47	94,9	92,18	93,23	92,24	41,55	40,47	3,65	37,77	36,05	30,144	37,84	111,41	<i>B. oryzae</i>
458	US902 9	107,7 2	112,34	89,94	91,41	6,69	94,39	95,15	96,33	93,83	95,06	94	42,2	41,18	3,99	38,71	36,22	30,066	37,49	112,34	<i>B. oryzae</i>
459	US903 0	97,37	102,78	83,23	85	6,53	87,79	88,63	89,96	87,19	88,38	87,25	40,84	39,96	3,59	37,65	35,98	31,528	37,17	102,78	<i>B. oryzae</i>
460	US903 1	105,9 6	110,5	88,24	90,05	7,45	93	94,08	95,33	92,65	93,59	92,96	41,26	40,65	3,47	38,11	36,18	30,619	37,66	110,5	<i>B. oryzae</i>
461	US903 2	103,6 4	109,23	87,1	88,75	6,94	91,63	92,56	94,05	91,33	92,35	91,17	41,37	40,22	3,4	37,72	35,95	30,306	37,72	109,23	<i>B. oryzae</i>
462	US903 3	109,6 3	114,52	90,75	92,65	8,06	95,57	96,78	98,08	95,15	96,34	95,33	42,01	41,26	3,58	38,85	36,54	30,077	38,31	114,52	<i>B. oryzae</i>
463	US903 4	106,5 1	112,41	88,87	90,75	7,66	93,55	94,54	95,82	93,34	94,45	92,82	42,1	41,16	3,67	38,48	36,7	30,178	38,72	112,41	<i>B. oryzae</i>

464	VT900 2	32	33,52	31,68	33,36	4,24	33,46	33,59	34,52	33,19	34,73	32,98	33,75	32,18	3,66	30,55	61,3	56,038	95,94	95,94	<i>E. turcica</i>
465	VT900 4	103,2 8	104,19	90,04	90,7	5,14	93,22	95,78	94,99	93,87	93,04	93,48	40,18	40,65	3,15	38,57	36,59	29,966	34,49	104,19	<i>B. oryzae</i>
466	VT900 5	105,1 5	106,25	89,17	89,58	4,63	92,34	92,53	92,59	91,58	92,11	91,21	39,43	39,88	2,98	37,78	35,16	29,558	33,3	106,25	<i>B. oryzae</i>
467	VT900 6	105,4 6	106,52	89,02	89,42	4,64	92,23	92,42	92,49	91,58	92,03	91,2	39,26	39,75	2,99	37,64	35,37	29,992	33,42	106,52	<i>B. oryzae</i>
468	VT900 7	102,2 6	103,62	87,72	88,33	4,38	90,87	90,93	91,45	90,14	90,69	89,74	39,01	39,55	2,86	37,58	35,3	29,957	33,11	103,62	<i>B. oryzae</i>
469	VT900 9	99,57	101,14	85,56	86,46	5,34	88,88	89,03	89,41	87,99	88,64	87,72	38,93	39,17	3,3	37,19	35,3	30	33,58	101,14	<i>B. oryzae</i>

Annexe 6: espèces fongiques cibles et couramment rencontrées sur le riz, testées avec les amorces GAPDH_Bspf/R, GAPDH_Bof/R, GAPDH_Bmf/R et GAPDH_Erf/R

N°	Isolats	Espèces	Hôtes	Pays d'origine	Amorces			
					GAPDH_Bspf/R	GAPDH_Bof/R	GAPDH_Bmf/R	GAPDH_Erf/R
1	BF9000	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
2	BF9001	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
3	BF9002	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
4	BF9004	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
5	BF9005	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
6	BF9008	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
7	BF9009	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
8	BF9010	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
9	BF9011	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
10	BF9012	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
11	BF9013	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
12	BF9014	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
13	BF9015	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
14	BF9016	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
15	BF9017	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
16	BF9018	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
17	BF9019	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
18	BF9020	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
19	BF9021	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
20	BF9022	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
21	BF9023	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
22	BF9024	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
23	BF9025	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
24	BF9030	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	+	+	+
25	BF9032	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
26	BF9033	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
27	BF9034	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
28	BF9035	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
29	BF9036	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
30	BF9037	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
31	BF9042	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
32	BF9045	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
33	BF9047	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
34	BF9057	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
35	BF9062	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
36	BF9063	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
37	BF9069	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
38	BF9078	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
39	BF9082	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT

85	BF9296	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
86	BF9303	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
87	BF9306	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
88	BF9307	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	+	NT	NT
89	BN9001	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
90	BN9002	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
91	BN9003	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
92	BN9004	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
93	BN9011	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
94	BN9012	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
95	BN9013	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
96	BN9014	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
97	BN9015	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
98	BN9016	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
99	BN9017	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
100	BN9018	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
101	BN9019	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
102	BN9020	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Benin	NT	+	NT	NT
103	CH9000	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	NT	+	NT	NT
104	CH9002	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	NT	+	NT	NT
105	CH9003	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	NT	+	NT	NT
106	CH9004	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	NT	+	NT	NT
107	CH9010	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	NT	+	NT	NT
108	CH9012	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	NT	+	NT	NT
109	CH9015	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	NT	+	NT	NT
110	CH9017	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	NT	+	NT	NT
111	CL9001	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Colombie	NT	+	NT	NT
112	FR9031	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
113	FR9032	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
114	FR9033	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
115	FR9035	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
116	FR9037	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
117	FR9039	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
118	FR9044	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
119	FR9046	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
120	FR9049	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	+	NT	NT
121	GH9001	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	+	NT	NT
122	GH9003	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	+	NT	NT
123	GH9007	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	+	NT	NT
124	GH9011	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	+	NT	NT
125	GH9012	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	+	NT	NT
126	GH9013	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	+	NT	NT
127	GH9014	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	+	NT	NT
128	GH9015	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	+	NT	NT
129	IT9002	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Italie	NT	-	NT	NT

130	IT9008	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Italie	NT	+	NT	NT
131	ML9013	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
132	ML9014	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
133	ML9015	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
134	ML9016	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
135	ML9017	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
136	ML9018	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
137	ML9022	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
138	ML9023	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
139	ML9024	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza longistaminata</i>	Mali	NT	+	NT	NT
140	ML9025	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza longistaminata</i>	Mali	NT	+	NT	NT
141	ML9028	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
142	ML9029	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
143	ML9031	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	+	NT	NT
144	TG9002	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	-	NT	NT
145	TG9004	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	+	NT	NT
146	TG9005	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	+	NT	NT
147	TG9006	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	+	NT	NT
148	TG9007	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	+	NT	NT
149	TG9010	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	+	NT	NT
150	TG9011	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	+	NT	NT
151	TG9012	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	+	NT	NT
152	US9005	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
153	US9007	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
154	US9009	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	-	NT	NT
155	US9011	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
156	US9013	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
157	US9016	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
158	US9018	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
159	US9020	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
160	US9022	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
161	US9024	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
162	US9026	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
163	US9028	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
164	US9029	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
165	US9030	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
166	US9031	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
167	US9032	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
168	US9033	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
169	US9034	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Zizania palustris</i>	USA	NT	+	NT	NT
170	VT9005	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Vietnam	NT	+	NT	NT
171	VT9006	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Vietnam	NT	+	NT	NT
172	VT9007	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Vietnam	NT	+	NT	NT
173	VT9009	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Vietnam	NT	+	NT	NT
174	VT9010	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Vietnam	NT	+	NT	NT

175	PK9035	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan	NT	+	NT	NT
176	BF9006	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	+
177	BF9007	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	+
178	BF9038	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	+
179	BF9041	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	+
180	BF9043	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	+
181	BF9049	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	+
182	BF9050	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	+
183	BF9051	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	+
184	BF9052	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
185	BF9054	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
186	BF9056	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
187	BF9058	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
188	BF9064	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
189	BF9066	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
190	BF9074	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
191	BF9077	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
192	BF9087	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
193	BF9088	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
194	BF9092	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
195	BF9093	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
196	BF9095	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
197	BF9096	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
198	BF9098	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
199	BF9099	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
200	BF9102	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
201	BF9113	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
202	BF9114	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
203	BF9115	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
204	BF9118	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
205	BF9119	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
206	BF9120	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
207	BF9121	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	+
208	BF9122	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
209	BF9124	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
210	BF9128	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
211	BF9131	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
212	BF9132	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
213	BF9134	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
214	BF9135	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
215	BF9137	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
216	BF9138	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
217	BF9139	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
218	BF9140	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
219	BF9141	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+

310	BF9301	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
311	BF9302	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
312	BF9304	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
313	BF9305	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
314	BF9308	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
315	BF9310	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
316	BF9311	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
317	BF9313	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
318	BF9314	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
319	BF9316	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
320	BF9317	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
321	BF9318	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
322	BF9319	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
323	BF9320	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	NT	NT	+
324	GH9002	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	NT	NT	-
325	GH9004	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	NT	NT	+
326	GH9005	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Ghana	NT	NT	NT	+
327	ML9011	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	NT	NT	+
328	ML9019	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza longistaminata</i>	Mali	NT	NT	NT	+
329	ML9020	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza longistaminata</i>	Mali	NT	NT	NT	+
330	ML9027	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Ischaemum rugosum</i>	Mali	NT	NT	NT	+
331	ML9040	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	NT	NT	+
332	ML9041	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	NT	NT	+
333	ML9042	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	NT	NT	+
334	ML9044	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	NT	NT	+
335	ML9045	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	NT	NT	+
336	ML9046	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	NT	NT	NT	+
337	PK9022	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan	NT	NT	NT	+
338	PK9025	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan	NT	NT	NT	+
339	PK9026	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan	NT	NT	NT	+
340	PK9032	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan	NT	NT	NT	+
341	SN9002	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Sénégal	NT	NT	NT	+
342	SN9003	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Sénégal	NT	NT	NT	+
343	SN9005	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Sénégal	NT	NT	NT	+
344	SN9008	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Sénégal	NT	NT	NT	+
345	TG9000	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	-
346	TG9001	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	+
347	TG9003	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	+
348	TG9008	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	+
349	TG9013	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	+
350	TG9014	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	+
351	TG9015	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	+
352	TG9016	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	+
353	TG9024	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Togo	NT	NT	NT	+

354	US9004	<i>Exserohilum rostratum</i>	<i>Oryza sativa</i>	USA	NT	NT	NT	+
355	BF9026	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	-
356	BF9027	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	-
357	BF9028	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	-
358	CD9001	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Côte d'ivoire	-	-	-	-
359	CD9002	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Glycine max</i>	Côte d'ivoire	-	-	-	-
360	CD9003	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Zea mays</i>	Côte d'ivoire	-	-	-	-
361	CD9004	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Côte d'ivoire	-	-	-	-
362	FR9000	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	France	-	-	-	-
363	FR9001	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	France	-	-	-	-
364	FR9004	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	France	-	-	-	-
365	FR9008	<i>Sclerotium oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	-	-	-	-
366	FR9009	<i>Sclerotium oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	-	-	-	-
367	FR9011	<i>Sclerotium oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	France	-	-	-	-
368	FR9018	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	France	-	-	-	-
369	MD9003	<i>Rhynchosporium</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Madagascar	-	-	-	-
370	MD9004	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Madagascar	-	-	-	-
371	MD9006	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Oryza sativa</i>	Madagascar	-	-	-	-
372	ML9000	<i>Sclerotium oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mali	-	-	-	-
373	ML9034	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Mali	-	-	-	-
374	SR9000	<i>Rhynchosporium</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Sierra Leone	-	-	-	-
375	MD9001	<i>Drechslera gigantea</i>	<i>Oryza sativa</i>	Madagascar	-	-	-	-
376	BF9046	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
377	BF9059	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
378	BF9065	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
379	BF9068	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
380	BF9070	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
381	BF9071	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
382	BF9073	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
383	BF9075	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
384	BF9081	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
385	BF9100	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
386	BF9104	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
387	BF9112	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
388	BF9151	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
389	BF9153	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
390	BF9158	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
391	BF9163	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
392	BF9168	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
393	BF9201	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
394	BF9224	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
395	BF9228	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
396	BF9236	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
397	BF9241	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-
398	BF9269	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	-	+	-

399	BF9278	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	+	NT	+	NT
400	BF72	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	-
401	CH1071	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	-	-	-	-
402	CH1111	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Chine	-	-	-	-
403	MD188	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Madagascar	-	-	-	-
404	MD204	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Madagascar	-	-	-	-
405	CD0143	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Côte d'ivoire	-	-	-	-
407	PK9029	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan	-	-	-	-
408	FR9030	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	France	NT	-	-	NT
409	BF9003	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	-	-	-	-
410	ML9021	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Mali	-	-	-	-
411	PK9021	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Pakistan	NT	-	-	NT
412	BF9040	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	NT
413	BF9044	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	NT
414	BF9067	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	NT
415	BF9105	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	NT
416	BF9108	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	NT
417	BF9117	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	NT
418	BF9133	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Oryza sativa</i>	Burkina Faso	NT	-	-	NT

(+) : ADN détecté ; (-) : ADN non détecté ; NA : Non Testé

Annexe 7 : Spatiotemporal Survey of Multiple Rice Diseases in Irrigated Areas Compared to Rainfed Lowlands in the Western Burkina Faso

Spatiotemporal Survey of Multiple Rice Diseases in Irrigated Areas Compared to Rainfed Lowlands in the Western Burkina Faso

Mariam Barro,^{1,2,3} Abalo Itolou Kassankogno,² Issa Wonni,² Drissa Sérémé,² Irénée Somda,³ Hilaire Kouka Kaboré,^{1,4} Gilles Béna,¹ Christophe Brugidou,¹ Didier Tharreau,^{1,4} and Charlotte Tollenaere^{1,2,†}

¹ PHIM Plant Health Institute, Université de Montpellier, IRD, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

² INERA, Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles du Burkina Faso, Laboratoire de Phytopathologie, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

³ Université Nazi Boni, Institut du Développement Rural, Laboratoire des Systèmes Naturels, Agrosystèmes et Ingénierie de l'Environnement (SyNAIE), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

⁴ CIRAD, UMR PHIM, 34390 Montpellier, France

Abstract

Multiple constraints affect rice yields in West Africa. Among these constraints are viral, bacterial, and fungal pathogens. We aimed to describe the spatiotemporal patterns of occurrence and incidence of multiple rice diseases in farmers' fields in contrasting rice growing systems in the western Burkina Faso. For this purpose, we selected a set of three pairs of sites, each comprising an irrigated area and a neighboring rainfed lowland, and studied them over four consecutive years. We first performed interviews with the rice farmers to better characterize the management practices at the different sites. This study revealed that the transplanting of rice and the possibility of growing rice twice a year are restricted to irrigated areas, while other practices, such as the use of registered rice cultivars, fertilization, and pesticides, are not specific but differ between the two rice growing systems. Then, we performed symptom observations

at these study sites to monitor the following four diseases: yellow mottle disease, Bacterial Leaf Streak (BLS), rice leaf blast, and brown spot. The infection rates were found to be higher in irrigated areas than in rainfed lowlands, both when analyzing all observed symptoms together (any of the four diseases) and when specifically considering each of the two diseases: BLS and rice leaf blast. Brown spot was particularly prevalent in all six study sites, while yellow mottle disease was particularly structured geographically. Various diseases were frequently found together in the same field (co-occurrence) or even on the same plant (coinfection), especially in irrigated areas.

Keywords: *Bipolaris* spp, Burkina Faso, Epidemiology, *Magnaporthe oryzae*, Rice, RYMV, *Xanthomonas oryzae*

Yield losses that occur because of pathogens and insect pests in major crops are estimated at 17 to 30% worldwide, with the highest losses evidenced in food-deficit regions with fast-growing populations (Savary et al. 2019). Such drastic yield losses emphasize the need to develop efficient control strategies to achieve food security. Understanding the spatiotemporal dynamics of crop diseases and identifying the risk factors are of primary importance for guiding the deployment of control strategies (Carvajal-Yepes et al. 2019), as illustrated by the management of potato mildew, cereal rust, apple scab, and cassava mosaic (Jones 1998). The availability of recent field data is critical for this purpose and will likely become the major issue as a large range of analytical tools becomes available (Savary et al. 2011a).

Spatiotemporal field surveys allow the accumulation of data for this purpose and may either focus on a particular disease or target multiple diseases at once. The latter case appears to be more challenging, as it requires specific protocols and field workers with extended skills, potentially explaining why this type of survey remains rare in the literature (but see Savary et al. 2011b, 2016). However, spatiotemporal surveys of multiple crop diseases can generate a wealth of information in a cost-effective way and generate pertinent information on the co-occurrence (i.e., simultaneous presence in the same site) of multiple diseases over a geographic area. Indeed, co-occurrence is a prerequisite for coinfection, i.e., the

simultaneous infection of the same plant by various pathogens. Coinfecting pathogens frequently interact within plants in positive (synergism) or negative (antagonism) ways (Abdullah et al. 2017), with striking consequences on pathogen multiplication and symptom expression (Barrett et al. 2009; Syller 2012), and further impact on evolutionary and epidemiological outcomes (Tollenaere et al. 2016). In this study, we described the spatial occurrence and incidence of four major rice diseases in six study sites in the western Burkina Faso.

Rice is a major staple crop in West Africa. It accounts for 25% of the overall cereal consumption, second only to maize (Mendez del Villar and Bauer 2013). Over recent decades, West Africa specifically has experienced a large surge in rice consumption (8% increase each year from 2009 to 2019; Soullier et al. 2020) as a consequence of demographic growth and habit changes caused by urbanization (preference for fast-prepared foods such as rice). To face such a growing demand and, particularly, following the 2008 price crisis, West African states are developing ambitious projects to increase local rice production and decrease their dependency on the worldwide rice market (Demont 2013; Soullier et al. 2020). For example, in Burkina Faso, rice-growing areas increased more than threefold between 2006 and 2016 (FAO), and the average annual growth of production was 6% between 2009 and 2019 (Soullier et al. 2020). Such a production increase is, however, lower than the average annual national consumption growth (12%) so that the dependence of the country on importations is maintained, and the importance of sustained efforts to increase local rice production is highlighted.

Rice cultivation in West Africa is performed within four major production systems: rainfed upland, rainfed lowland, irrigated, and mangrove swamps (AfricaRice 2011; Katic et al. 2013). Among these four rice production systems, irrigated rice and rainfed upland rice are particularly important in Burkina Faso. First, irrigated rice, introduced in the 1960s with labor-intensive and costly infrastructures, remains restricted to particular sites (<30% of harvest areas; CountrySTAT

[†]Corresponding author: Charlotte Tollenaere; charlotte.tollenaere@ird.fr

*The e-Xtra logo stands for "electronic extra" and indicates there are three supplementary figures published online.

The author(s) declare no conflict of interest.

Accepted for publication 14 June 2021.

2021). However, irrigated rice constitutes more than half of the total paddy rice produced as a consequence of the relatively high productivity of this system, up to 4 to 7 t/ha per year (MAHRH 2011). On the other hand, rainfed lowland rice is grown in valleys in regions where rainfall is sufficient and represents the largest rice growing surface in the country (67% between 1984 and 2009; MAHRH 2011). Rainfed rice systems are characterized by a lack of water control, and their yields remain low; for example, a yield of only 2 t/ha per year was estimated at the Dano site (Serpantié et al. 2019), and rice grown under this system is mostly dedicated to self-consumption.

A study consulting rice farmers in the Malanville area in Benin (Nonvide et al. 2018) showed significant differences in the socioeconomic and demographic characteristics between rice farmers from irrigated areas versus those from rainfed lowlands, with differences in rice cultivation practices. Notably, irrigated areas presented higher fertilizer application rates and the more frequent use of improved high-quality seeds compared with those in rainfed farming systems (Nonvide et al. 2018). Irrigated areas and rainfed lowlands in West Africa thus represent two rice production systems that are characterized by their contrasting water availability/control but also differ in many other aspects that cannot be distinguished.

Various constraints hamper the development of rice production in West Africa (Balasubramanian et al. 2007). Diseases are one of these constraints and were considered the major cause of crop losses observed in fields in a farmer survey in the Cascades region in Burkina Faso (Kam et al. 2013). The major rice diseases in Africa include yellow mottle disease, Bacterial Leaf Blight (BLB), Bacterial Leaf Streak (BLS), rice blast, and brown spot (Séré et al. 2013).

Rice yellow mottle disease, caused by the rice yellow mottle virus (RYMV), is endemic in Africa and is estimated to cause approximately 4.3% of rice production losses in Sub-Saharan Africa (Savary et al. 2019). This disease occurs in different rice systems, but epidemics are less frequent in rainfed rice than in irrigated rice (Traore et al. 2009). Agricultural intensification is considered to favor RYMV epidemics as a consequence of the generalization of susceptible cultivars and the transplanting step, which favors mechanical transmission (Traore et al. 2009).

The bacteria *Xanthomonas oryzae* presents two pathovars (pv.): pv. *oryzae*, causing BLB, and pv. *oryzicola*, causing BLS; these two diseases constrain rice production in much of Asia and parts of Africa (Nino-Liu et al. 2006). In particular, BLS is considered as an emerging disease in West Africa (Wonni et al. 2011). The disease is seedborne and seed-transmitted; its development is favored by rain, high humidity (>80%), and high temperatures (28–30°C) (Cartwright et al. 2018).

Rice blast disease, caused by *Magnaporthe oryzae*—syn. *Pyricularia oryzae*—can be particularly destructive, causing an estimated 4.2% of rice production losses in Sub-Saharan Africa (Savary et al. 2019). Major factors known to affect this type of epidemic development are rice cultivar, climatic factors (temperature, humidity, and the presence of dew; Ou 1985), water management, and nitrogen fertilization (Long et al. 2000). Losses caused by blast are greatest in upland rice and in intensive, high-input rice cultivation regions (Cartwright et al. 2018).

Brown spot, caused by *Bipolaris oryzae*, is estimated to cause 3.8% of rice production losses worldwide (Savary et al. 2019), second only to rice blast in terms of its economic importance (Cartwright et al. 2018). This disease was classically known to be associated with scarce water resources (as it is prevalent in rainfed lowlands and uplands, and higher incidence of the disease is observed in lower rainfall years) combined with nutritional imbalances, particularly the lack of nitrogen. Consequently, the disease is often associated with resource-poor farmers' fields (Barnwal et al. 2013; Mew and Gonzales 2002; Pannu et al. 2005). However, its recent reemergence on a large array of conditions (Barnwal et al. 2013) challenges this statement and may be linked to climate change (Bregaglio et al. 2013; Savary et al. 2011a).

Rice and its diseases constitute an ideal model in crop epidemiology (Savary et al. 2011b), because of the central role of rice in global food security (Zeigler and Barclay 2008), the importance of

rice diseases as yield-reducing factors (Savary et al. 2019), the existence of large-scale field survey data, and the specificity of various rice disease symptoms enabling symptom-based epidemiological approaches. In Africa, research on rice diseases is active in terms of pathogen collection and characterization and the evaluation of control methods. However, studies describing the epidemiological patterns of rice diseases in farmers' fields remain rare, especially studies simultaneously considering multiple diseases, with very few exceptions including the descriptions of rice diseases in mangrove swamp rice in Sierra Leone (Fomba 1984), and a study on the fungal seed-borne diseases of rice conducted in Burkina Faso (Ouedraogo et al. 2016).

This work presents an observational study of rice disease symptoms in smallholder rice fields in western Burkina Faso. We first described the six study sites in terms of agricultural practices (sociological information, rice cultivars, fertilization practices, and off-season crops) to improve the characterization of the practices used in each rice production system: irrigated areas and rainfed lowlands. Then, we documented the spatiotemporal dynamics of four major rice diseases: yellow mottle, bacterial leaf streak, leaf blast, and brown spot. More specifically, our aim was to compare disease levels between two contrasting rice production systems (irrigated areas compared with rainfed lowlands) and to estimate the levels of disease co-occurrence and coinfection among the four considered rice diseases.

Materials and Methods

Overall rationale of the study and choice of studied fields.

The study area is in the western Burkina Faso, in a 100 × 100-km location within the two regions Hauts-Bassins (Houet and Kenedougou provinces) and Cascades (Comoe and Lereba provinces) in the Sudanian bioclimatic area (Fig. 1).

The study sites are located within three geographical zones (Bama, Banzon, and Karfiguela), and we studied an irrigated area and a neighboring rainfed lowland area in each of these three zones (Table 1 and Fig. 1). The irrigated areas and rainfed lowlands were chosen as “neighboring” (maximal distance between the irrigated and lowland fields within a geographical zone was 7 km) to assume similar climatic conditions. In this context, we assume that for each zone, only the rice-growing practices differed between the irrigated areas and rainfed lowlands. We returned to these six sites annually from 2016 to 2019. Prior to this study period, an initial survey (Tollenaere et al. 2017) was performed in 2015 that included two of the study areas (both irrigated), Banzon and Karfiguela, and these data were included in some subsequent analyses.

Within each of these six sites, we used aerial pictures and selected the studied fields so that they would be accessible and evenly distributed spatially within site. Such field selection was performed before getting to the field so that symptom observations could not bias field selection. Each studied field was approximately a square of 25 meters on each side (ca. 625 square meters). The total number of fields studied per year and per site ranged between 5 and 11; the details are shown in Table 1. Over the 5-year (2015–2019) period, 203 observations were performed (179 observations over the 2016–2019 period). In every case, we obtained permission from the farmers to work in their fields, and the management of the entire project followed the guidelines of the Nagoya protocol regarding access and benefit-sharing.

Farmers' interviews. We aimed to characterize each site and each production system (irrigated areas and rainfed lowlands) in terms of sociological information, rice cultivars, cultivation practices, and off-season crops. For this purpose, interviews with farmers were performed for 81% of the surveyed fields, with a total of 165 interviews performed over the 2015 to 2019 period (see Table 1 for detailed information regarding each site and year). The interviews were mostly performed face-to-face but also sometimes (37/165 = 22%) by phone.

The survey questionnaire included a set of questions concerning four topics: (i) the farmer (age, gender, whether rice is cultivated to sell or for self-consumption), (ii) the rice cultivars grown, (iii) the

cultivation practices used in the field (planting, fertilization, pesticides), and (iv) the preceding crops (in the dry season and previous wet season). The original list of questions was slightly amended across the study years. All collected data were recorded in the Afrivey (AfricaSys) application on a smartphone.

Protocol for symptom observations. The observations were performed at the maximum tillering or heading initiation stages of the field from September to December each year.

Each studied field was visually inspected carefully for the presence of major rice diseases. We particularly focused on the following four diseases, for which the detection was confirmed by serological,

molecular, or biological analyses (see below): yellow mottle disease, BLS, rice leaf blast, and brown spot.

The presence or absence of each of these four diseases was reported in the Afrivey application for each studied field. In addition, each field was subdivided in a 4 × 4 grid (materialized using wooden stakes), and the incidence (0 to 100% infected plants based on observations of specific symptoms by carefully pacing around each cell) was estimated in four cells of a diagonal transect in the grid. Moreover, we annotated the presence or absence (with no severity estimates) of the observed symptoms on the leaves of each of the 16 plants located at the intersections of the 4 × 4 grid. Three leaves of each of these 16 studied plants per field were dried and stored in paper envelopes in plastic bags containing silica gel for further laboratory analyses performed to confirm the symptom-based diagnosis.

We recorded all the data (from the fields, diagonal cells, and plant hierarchical levels) directly in the Afrivey application, as with the data obtained from the farmer interviews.

Pathogen detection to assess symptom recognition. To determine the accuracy of disease identification based on symptoms in the field, a subset of collected samples was submitted to laboratory detection methods. In particular, 85 leaves presenting yellow mottle-specific symptoms and collected in 2015 were submitted to RYMV-specific serological detection, by ELISA (Traoré et al. 2008) in INERA Kamboinse, PathoBios platform (Burkina Faso). A few leaves presenting BLS symptoms were kept fresh following the sampling and frozen (−20°C) when back in the laboratory. *Xanthomonas oryzae*-specific molecular amplification (Lang et al. 2010) was performed in the Bobo-Dioulasso molecular biology PathoBios platform (Burkina Faso) on a set of samples collected in 2016 ($n = 5$) and then on a set collected in 2017 ($n = 12$). The leaves presenting rice blast or brown spot symptoms were kept dried in an envelope containing silica gel. Back at the mycology laboratory at INERA Farako-Bâ (Burkina Faso), we arranged the leaf samples on humid blotting paper in a growth chamber with a 12-h/12-h light/darkness cycle. After one week of incubation, mycelial growth was observed with a binocular microscope, and spores were observed using a light microscope. The fungi were identified following the classical methodology (Mathur and Kongsdal 2003). In addition, for the brown spot identification, 21 strains were isolated from the symptomatic samples collected in 2018, and molecular characterization (sequencing of ITS, GPD and EF1 genes) was performed in Cirad (Montpellier, France).

Data analysis. The data analysis was performed using R software (R Core Team 2018) using various packages for the analyses (see above) and ‘ggplot2’ (Wickham 2016) for visualization.

The data on rice cultivation practices obtained from farmers’ interviews (165 interviews, Table 1) were analyzed using multiple correspondence analysis (MCA) on a subset of nine variables describing the cultivars divided into four categories (the rice cultivars FKR62N on the one hand, the rice cultivar FKR64 on the other hand, other registered, and finally unregistered cultivars), and the management practices, direct seedling or transplanting, the presence/absence of mineral fertilization, the presence/absence of organic fertilization, the number of NPK applications, the number of urea applications, herbicide application (or not), insecticide application (or not), and crop type planted in the off-season (rice, legumes or nothing). First, we

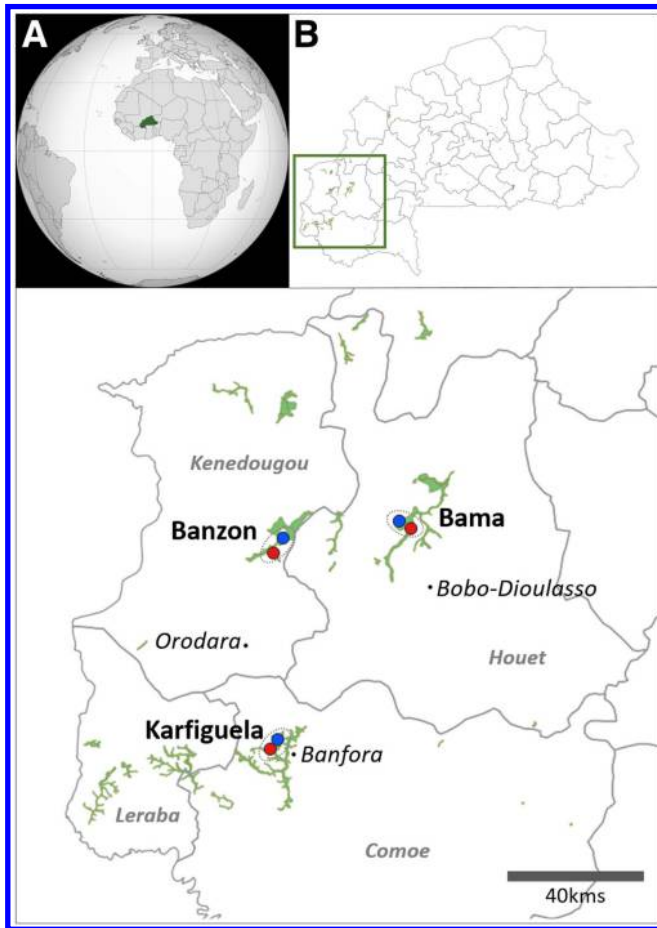


Fig. 1. Locations of the study sites: **A**, location of Burkina Faso in Africa; **B**, location of the area studied in Burkina Faso; and **C**, precise locations of the six rice growing study sites with irrigated sites in blue and rainfed lowland sites in red within the three geographical zones (Bama, Banzon, and Karfiguela). The locations of all rice fields and irrigated areas according to the Burkina Faso land occupation database (<https://www.ignfi.fr/fr/portfolio-item/occupation-des-terres-burkina-fao>) are indicated in maps **B** and **C**. Three major cities (Bobo-Dioulasso, Banfora, and Orodara) and four provinces (Comoe, Houet, Kenedougou, and Leraba) are mentioned.

Table 1. List of the six sites studied from 2015 to 2019 in western Burkina Faso

Studied site (name of the village) ^a	Number of fields studied ^b				
	2015	2016	2017	2018	2019
Bama-RL (Badala)	0	6 (6)	8 (5)	7 (5)	6 (6)
Bama-IR (Bama)	0	10 (10)	8 (4)	9 (7)	7 (6)
Banzon-RL (Senzon)	0	5 (5)	7 (4)	7 (6)	7 (5)
Banzon-IR (Banzon)	12 (11)	8 (8)	8 (7)	11 (9)	6 (5)
Karfiguela-RL (Tengrela)	0	5 (5)	7 (7)	7 (6)	6 (6)
Karfiguela-IR (Karfiguela)	12 (11)	9 (7)	8 (3)	9 (7)	8 (4)
Total (all sites)	24 (22)	43 (41)	46 (30)	50 (40)	40 (32)

^a RL: rainfed lowlands; IR: irrigated areas.

^b The number of rice fields where symptom observations were performed are indicated for each year, with the number of fields where farmers’ interviews could be performed in parentheses.

used the package 'missDMA' to impute missing data in the dataset. Then, the packages 'FactoMineR' and 'factoextra' were used to perform the MCA analysis and to visualize the results, respectively. The sample sizes at each site and year were small for the rice cultivation practices (Table 1), so we performed a visual representation to characterize the rice cultivation practices at each site but did not statistically analyze the data.

Second, in order to compare the disease pressures in irrigated areas compared with those in rainfed lowlands, we analyzed the symptom data at various scales (field and plant) using generalized linear mixed models (GLMMs) using the package 'lme4' in R. Type III ANOVA was performed with the package 'car', and a contrast analysis was performed using the package 'lsmeans'.

The presence or absence of different types of symptoms at the plant level was modeled using binomial regression over the 2016 to 2019 dataset, i.e., 16 plants \times 179 fields = 2,864 observations. First, we considered the presence or absence of symptoms of any of the four main rice diseases, yellow mottle disease, BLS, rice leaf blast, and brown spot, as a multipathogen response variable. Then, we modeled the presence or absence of symptoms of each of the four main studied diseases (yellow mottle disease, BLS, blast, and brown spot) independently. The same kind of modeling was performed for each of these five variables, with the year and field included as random effects and the rice production system, the geographical zone, and their interaction included as fixed effects (only the significant factors were included in the final version of each model).

At the field level, the presence or absence of each of the four diseases in each field and year was modeled using binomial regression over the 2016 to 2019 dataset (179 observations). Four GLMMs were run with the rice production system, the geographical zone and their interaction (if significant) included as fixed effects and the year included as a random effect.

We then added the presence or absence of the three other diseases to the four GLMMs to assess the potential statistical associations among the four main studied diseases. The levels of cooccurrence were also estimated for each disease pair (six in total) in each site and year.

Finally, the levels of coinfection were estimated at each site and year considering simultaneous presence of symptoms of at least two diseases of the four diseases studied (yellow mottle disease, BLS, rice blast, and brown spot) on the same rice plant.

Results

Obtained data. The obtained data are available on the IRD data storage platform (<https://dataverse.ird.fr>) with doi 10.23708/8FDWIE. Five datasets are included: (i) a dataset of the sampling dates of the studied fields, (ii) a dataset containing the results of the interviews with farmers, (iii) a dataset containing the symptom observations at the field level (presence/absence of each disease in the field), (iv) a dataset with the symptom observations listed at the cell level (incidence estimate of each disease in the four diagonal cells of each grid), and finally (v) a dataset containing symptom observations in each of the particular plants. Only the precise location of each rice field (GPS coordinate) remains as a private file to preserve the anonymity of the farmers.

The total number of field visits for symptom observations and sampling over the 2015 to 2019 period was 203, while the number of interviews performed with farmers was 165 (Table 1). The observation dates differed between the irrigated areas and rainfed lowlands, as the rice season is slightly later and more variable in irrigated areas (data not shown).

The set of samples collected in 2015 and analyzed by RYMV-specific ELISA resulted in 80/84 (95.2%) RYMV-positive samples. *Xanthomonas oryzae*-specific molecular detection revealed the presence of *Xanthomonas oryzae* in almost all cases (16/17, 94.1%). A total of 22 rice blast symptomatic samples collected in 2017 and 2018 resulted in fungal development typical of *M. oryzae*, and 95 of the brown spot symptomatic leaf samples resulted in fungal strains morphologically corresponding to *Bipolaris* spp. (H. K. Kaboré, A. I., Kassankogno, and D. Tharreau, *personal communication*). Finally, molecular analysis confirmed 19 of 21 (90.4%) of analyzed fungal

strains isolated from the symptomatic samples collected in 2018 as the genus *Bipolaris* (H. K. Kaboré and D. Tharreau, *personal communication*), while the remaining two strains (2/21 = 9.5%) were *Exserohilum rostratum* (syn. *Setosphaeria rostrata*), also known to cause brown spot symptoms in rice (Kusai et al. 2016). Symptom recognition was consequently considered as accurate for yellow mottle disease, BLS, rice leaf blast, and brown spot.

Characterization of agricultural practices used in each rice production system. The rice farmers interviewed were mostly men (139/165, 84% of all interviews performed), but this factor varied among sites, with particularly few women (<10%) interviewed in the Bama and Bazon zones (both in the irrigated and lowland areas), while women represented almost 80% of surveyed farmers in the Karfiguela lowland areas (Tengrela site). In addition, the age structure varied among sites, with the proportion of young farmers surveyed (<35 years) being 34.5% on average but varying from <20% in the Bazon and Karfiguela irrigated areas to >45% in the Bama zone and Karfiguela lowlands.

The interviewed farmers owned the studied rice fields in many cases (35/72, 48%) and even in all cases in the Karfiguela irrigated areas, while farmers who owned the fields composed <30% of the realized interviews in the Bazon and Karfiguela lowlands. Most farmers cultivated rice to sell it (54/69 of cases, 78%), except in the Karfiguela zone, where self-consumption was the main purpose of rice growing (78% of the cases in the irrigated areas of Karfiguela, while in Tengrela, self-consumption was always the case; none of the interviewed farmers sold their rice).

The agricultural practices (including information on rice cultivars, planting, fertilization, pesticides, and preceding crops) differed between the studied sites in irrigated areas and rainfed lowlands (Fig. 2).

In particular, a second rice season was possible only in irrigated areas (32 of 69 cases, 46%; see Fig. 2 and Supplementary Fig. 1B). Legume production in rotation with rice was more common in rainfed lowlands (14/47, 30%) than in irrigated areas (6/69, 9%). Crop rotations were particularly common in Badala (13/21, 62%), where green beans (and to a lesser extent eggplant, cabbage, or tomato) were frequently cultivated in rotation with rice.

Rice planting was also highly discriminant; all farmers from the studied irrigated fields transplanted seedlings from nurseries, while this was only the case in 12% of the interviews (8/66) conducted in rainfed lowlands (never in the Bazon lowlands). Direct sowing (with no transplanting step) remained the most common management practice in the studied rainfed lowlands.

The most common rice cultivar (54 of 161, 34%) was the Chinese cultivar TS2, registered in Burkina Faso as FKR64. The NERICA ('New Rice for Africa')-registered rice cultivar FKR62N was also very common, representing 34 of 161 cases (21%). Registered cultivars (including FKR64, FKR62N, and others) represented >92% (90/98) of the rice cultivars observed during the surveys in irrigated areas and less than half of those determined during the surveys in rainfed lowlands (29/63, 46%), with striking differences observed among sites. Indeed, unregistered cultivars represented 40% of the cases (8/20) in the Bama lowlands and all (23/23, 100%) of the cases in the Karfiguela lowlands (see Fig. 2 and Supplementary Fig. 1A).

Mineral fertilization more generally consisted of one NPK and one urea application or one NPK and two urea applications. Mineral fertilization was always applied in irrigated areas (94/94 cases) but was less frequent in rainfed lowlands, with 46 cases of 66 (70%) reporting mineral fertilization. It was particularly uncommon in Tengrela (only 8/24, 33%), where organic fertilization (namely, manure from household waste) was more widely used than in other sites (11/24, 46%). Indeed, organic fertilization was only used in 16% (25/158) of the observed cases over the whole dataset. It was particularly uncommon in irrigated areas (7/92, 8%), with a relative exception in Bama (5/24, 21%).

Herbicide use was very frequent in the dataset (119/127 cases, 94%). All farmers from irrigated areas said they used herbicides in their fields, while this was the case for 86.4% (51/59) of the interviews performed in rainfed lowlands. Insecticide use was also common (76/96, 80%), especially in irrigated areas (50/56, 90%)

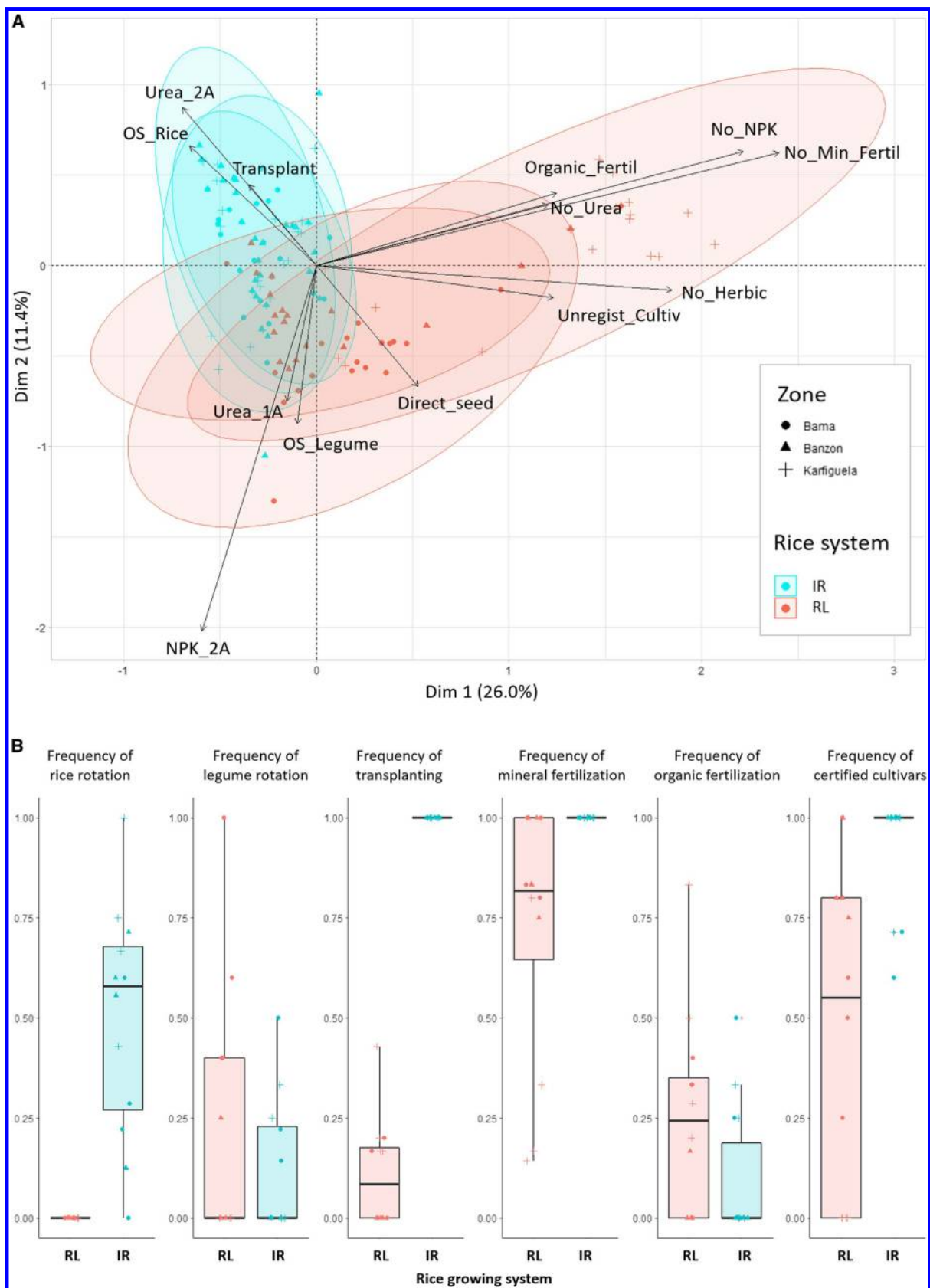


Fig. 2. Characterization of rice cultivation practices within the studied sites based on farmers' interviews. The colors correspond to the rice growing system (red for rainfed lowlands and blue for irrigated areas), while the shape of the points refers to the geographic zone. **A**, Representation of the multiple component analysis (MCA) results. Each point corresponds to one field in a particular year; the figure comprises 165 points (all interviews conducted between 2015 and 2019). The arrows represent the variables contributing to axis 1 or axis 2 more than the average expected under the null hypothesis: no mineral fertilization ("No_Min_Fertil"), the presence of organic fertilization ("Organic_Fertil"), the number of urea or NPK applications ("No_Urea", "Urea_1A", "Urea_2A", "No_NPK", "NPK_2A"), the type of transplanting ("Direct_seed" or "Transplant"), the absence of herbicide ("No_Herbic"), the use of unregistered cultivars ("Unregist_Cultiv"), and the culture performed during the off-season ("OS_Rice", "OS_Legume") are denoted. **B**, Repartition of several rice cultivation practices in irrigated areas compared with rainfed lowlands in the different years (2016–2019 dataset). Each point corresponds to one site in a particular year, and the legend is the same as that in **A**.

compared with that in lowlands (26/40, 65%). The herbicides used belonged to different World Health Organization (WHO) toxicity categories (II-III-U, slightly to moderately hazardous), while the identified insecticides all belonged to type II (moderately hazardous). All pesticides identified, except one (an herbicide containing paraquat, cited nine times), were probed by the Sahelian Pesticide Committee. The most commonly used herbicides included an herbicide containing bensulfuron-methyl (43/94, 46%), one based on 2,4-D dimethylamine salt (18/94, 19%), and one containing glyphosate (17/94, 18%). An insecticide based on deltamethrine was most commonly used (31/47, 66%).

Overall, strong differentiation in terms of agricultural practices was found between the two rice systems, with more variability observed among the rainfed lowland sites; the rainfed rice site in the Karfiguela zone was the most different compared with the Bama and Banzon lowland sites (Fig. 2).

Comparison of disease occurrence and incidence in the two rice production systems. The analysis of all observed symptoms at the plant level revealed no effect of the geographical zone or of the interaction between the zone and rice system on disease occurrences. Only the rice production system was a significant factor in the analysis, revealing the higher incidence of any of the four main rice diseases in irrigated areas compared with in rainfed lowlands ('rice growing system' fixed effect, $df = 1$, $Chi = 5.28$, $P = 0.022$) (Fig. 3). The contrast analysis showed that the differences observed between the irrigated and lowland areas were significant within the Bama zone (z -ratio = -2.97 , $P = 0.003$) but not within the Banzon or Karfiguela geographical zones.

The comparison between the irrigated areas and rainfed lowlands, in terms of disease occurrence at the field scale and the incidence estimates considering each observed disease independently (yellow mottle disease, BLS, rice leaf blast, and brown spot), appears in Figure 4. The results of the statistical tests are reported in Table 2. The

average occurrence over the whole dataset (179 fields) for each of the four diseases is presented in the diagonal of Figure 5. The occurrences ranged from 30.2% of the studied fields for rice yellow mottle disease to 79.9% for brown spot. The average incidences over the whole dataset (2,864 observed plants) were 6.5% for RYMV, 6.7% for BLS, 9.9% for rice leaf blast, and 32.2% for brown spot.

We found significant interactions between the zone and rice growing system for both yellow mottle disease and brown spot, with congruences between the field and plant scales (Table 2). The effect of the rice system on these two diseases depended on the geographical zone. This result is especially striking for yellow mottle disease, for which higher frequencies of infected fields and plants were found in the irrigated area in Banzon, while the opposite was observed in the Bama zone (Table 2 and Supplementary Fig. 2). For brown spot, the frequencies of infected fields ($143/179 = 80\%$) and plants ($922/2,864 = 32\%$) were much higher than those observed for other diseases (Fig. 4). Only the Bama lowlands had a lower disease incidence than the corresponding neighboring irrigated area (Table 2 and Supplementary Fig. 2).

For both BLS and rice leaf blast, the interaction between the zone and rice growing system was not a significant variable in the models. In these two cases, we found a significant effect of the rice system: observations of BLS- and rice blast-specific symptoms were more common in irrigated areas than in rainfed lowlands both at the field and plant scales (Fig. 4 and Table 2). At the plant level, this effect was congruently significant over the three zones for BLS, while this effect was the case in Banzon only at the field level (Table 2 and Supplementary Fig. 3A).

Co-occurrence and coinfection. When running additional GLMMs including the presence/absence of the three other diseases as fixed effects, we obtained various significant effects (only brown spot was not involved in any significant association). The presence of yellow mottle disease was positively associated with the presence

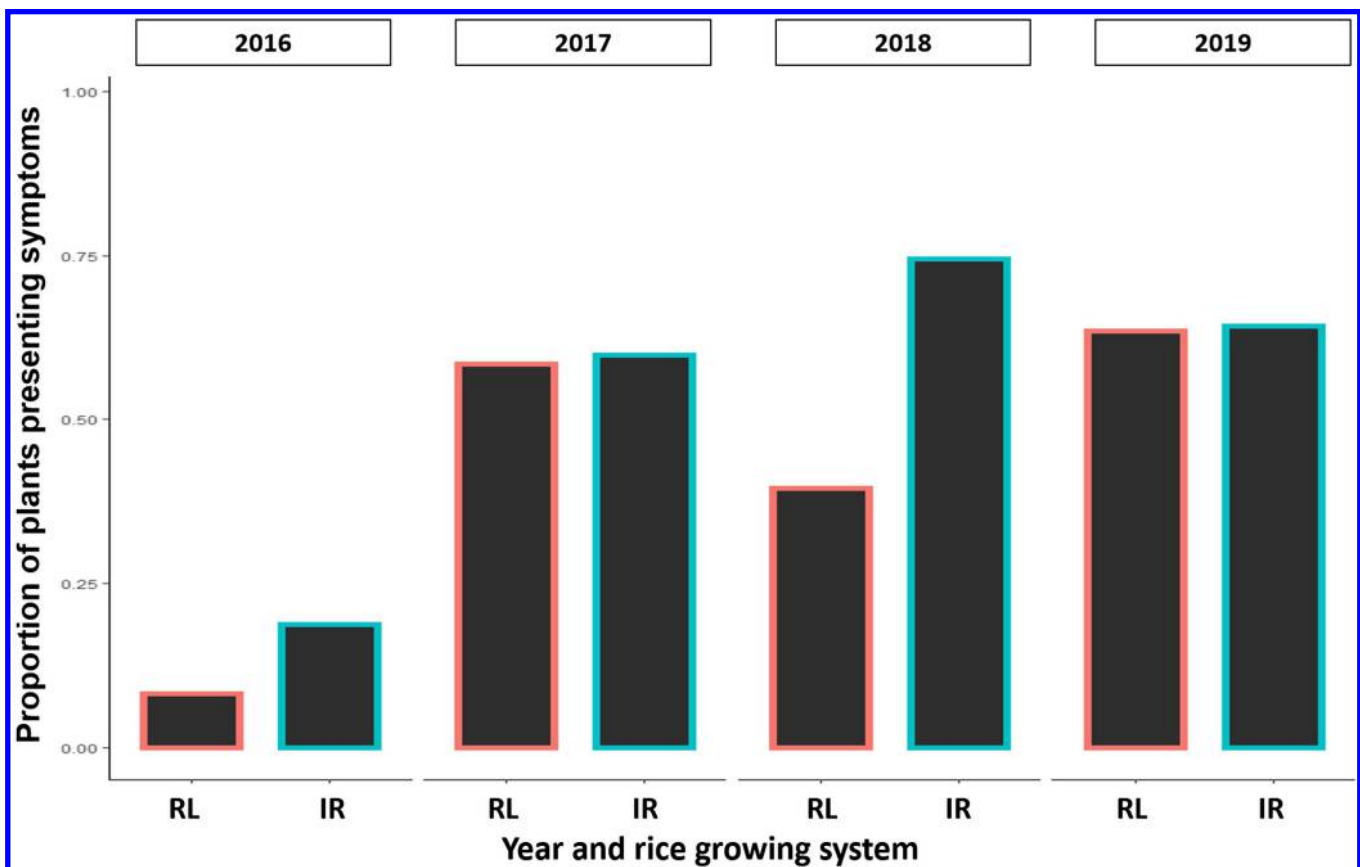


Fig. 3. Proportion of observed rice plants presenting any symptoms of the four studied diseases over the four years (2016–2019) and the two rice cultivation systems (RL: rainfed lowlands, shown in red; IR: irrigated areas, shown in blue). The symptoms of any of the four following rice diseases are considered: yellow mottle disease (RYMV), Bacterial Leaf Streak (BLS), rice blast, and brown spot.

of BLS (Chi = 8.52, $P = 0.003$) and negatively associated with rice blast (Chi = 7.11, $P = 0.007$). The presence of BLS was positively associated with the presence of both yellow mottle disease (Chi = 10.36, $P = 0.001$) and rice blast (Chi = 7.70, $P = 0.005$). Finally, the presence of rice blast was negatively associated with the presence of yellow mottle disease (Chi = 5.45, $P = 0.019$).

The co-occurrence levels within the whole dataset varied among the disease pairs, from 10% (17/179) for RYMV and rice blast to 41% (73/179) for brown spot and rice blast. In many cases, we observed higher co-occurrence levels in irrigated areas than in rainfed lowland sites (Fig. 5).

The overall level of coinfection, considering the four studied diseases, was 5% (152/2,864). These coinfection levels reached 7% (116/1,616) when focusing on the samples collected in irrigated areas (Supplementary Fig. 3B). The highest coinfection level was found in the Banzon irrigated area in 2019 (Supplementary Fig. 3B), where 20% (19/96) of sampled plants presented the symptoms of at least two of the main studied diseases (rice yellow mottle, BLS, rice blast, and brown spot).

Discussion

Despite the importance of rice in the field of food safety, especially in the present context of global change and the challenge of food security in areas with fast-growing populations, epidemiological surveys of rice diseases in smallholder fields with spatiotemporal analysis of disease incidences remain limited worldwide, especially in Africa. In addition, with the noteworthy exception of a multiple-disease dataset comprising four countries from tropical and subtropical Asia (Savary et al. 2011b; Savary et al. 2000), very few studies have documented the epidemiology of various rice diseases simultaneously to allow the generation of a wealth of data on various specific diseases and to document co-occurrence and coinfection. Here, we presented the first multilocal and pluriannual analysis of multiple rice diseases in two contrasting rice production systems in the western Burkina Faso.

We performed an analysis of rice cultivation management practices based on interviews with farmers conducted at the six studied sites in the western Burkina Faso.

Most interviewed farmers were men, except in the rainfed lowland area of Tengrela in the Karfiguela zone. The Cascades region, where the Karfiguela zone is located, is known as an area in which women

constitute the majority of rice farmers (Kam et al. 2013; Sié et al. 1998). In our study, as in a study conducted in Benin (Nonvide et al. 2018), it seems that the areas prone to higher production are restricted to production conducted by men. Younger farmers were found at some sites, particularly but not exclusively in rainfed lowlands, while Nonvide et al. (2018) reported that farmers were younger in rainfed lowlands than in irrigated areas in Benin. The purpose of rice cultivation differed depending on the zone: most farmers cultivated rice to sell it in the Bama and Banzon geographical zones, while self-consumption was dominant in the Karfiguela zone, as previously reported for the Cascades region (Kam et al. 2013).

The agricultural practice regarding rice cultivation differed globally between irrigated areas and rainfed lowlands, and site-specific features were also evidenced in our results. The specific management practices reported in irrigated areas included the transplanting step and the possibility of growing rice twice a year. On the other hand, the absence of mineral fertilization, or not using herbicide, was only reported in rainfed lowlands. Other practices were not system-specific but had strong differences in frequency, such as the use of registered cultivars that are much more frequent in irrigated areas than in rainfed lowlands.

In Benin, Nonvide et al. (2018) also reported that improved seeds were more frequent in irrigated areas than in rainfed rice areas. More globally, the adoption of improved rice varieties (including NERICA) in West Africa increased after the 2008 food crisis, with an impact on poverty reduction and food security (Arouna et al. 2017), but training programs are also required to reach rice farmers in lowland areas (Kijima et al. 2012). In addition, registered cultivars are not necessarily resistant to rice diseases. Here, among the two registered cultivars most frequently grown in the studied sites (FKR64 = TS2 and FKR62N), only FKR62N was shown to be moderately resistant to rice blast (Kassankogno et al. 2015), while both cultivars are susceptible to RYMV and BLS (Sereme et al. 2016a, Sereme et al. 2016b; Wonni et al. 2011; I. Wonni, *personal communication*). Information on the spatial variation in rice diseases, as was documented in this study, is important for driving the local deployment of resistant cultivars.

Finally, in terms of fertilization, Nonvide et al. (2018) reported no difference in the frequency of fertilizer use in Benin but a significant difference in the fertilizer application rate (in kg/ha). Our study documented the presence/absence of mineral fertilization and the number of applications, but not the fertilizer application rate. A more detailed

Table 2. Results of the generalized linear mixed models (GLMMs) regarding the presence/absence of specific symptoms at the field and plant levels for each of the four diseases: yellow mottle disease (RYMV), bacterial leaf streak (BLS), rice blast, and brown spot^a

Variables	Yellow mottle disease		BLS		Rice blast		Brown spot	
	Chi	<i>P</i> value ^b	Chi	<i>P</i> value ^b	Chi	<i>P</i> value ^b	Chi	<i>P</i> value ^b
	Field-level data (2016–2019, 179 observations)							
Rice system (df = 1)	10.72	0.001063**	8.98	0.002723**	10.30	0.00133**	8.20	0.004182**
Geographical zone (df = 2)	4.75	0.093223	7.13	0.028364*	NS	NS	13.39	0.001238**
Rice system*Zone (df = 2)	28.60	6.162e-07***	NS	NS	NS	NS	8.13	0.017151*
CONTRASTS (RL-IR)	z-ratio	<i>P</i> value	z-ratio	<i>P</i> value	z-ratio	<i>P</i> value	z-ratio	<i>P</i> value
Zone = Bama	3.27	0.001	-1.048	0.295	-2.107	0.035	-2.86	0.004
Zone = Banzon	-3.79	0.000	-2.567	0.010	-2.241	0.025	0.55	0.583
Zone = Karfiguela	1.87	0.062	-1.577	0.115	-1.321	0.187	0.96	0.338
Plant-level data (2016–2019, 179 × 16 = 2,864 observations)								
Variables	Chi	<i>P</i> value	Chi	<i>P</i> value	Chi	<i>P</i> value	Chi	<i>P</i> value
Rice system (df = 1)	7.84	0.005121**	14.41	0.0001473***	6.11	0.013453*	9.48	0.0020764**
Geographical zone (df = 2)	2.65	0.266	7.87	0.0195825*	13.65	0.001087**	13.64	0.0010936**
Rice system*Zone (df = 2)	25.14	3.480e-06***	NS	NS	NS	NS	11.00	0.0040823**
CONTRASTS (RL-IR)	z-ratio	<i>P</i> value	z-ratio	<i>P</i> value	z-ratio	<i>P</i> value	z-ratio	<i>P</i> value
Zone = Bama	2.80	0.005	-2.097	0.036	-1.72	0.086	-3.08	0.002
Zone = Banzon	-3.61	0.000	-2.417	0.016	-1.44	0.151	1.08	0.279
Zone = Karfiguela	2.19	0.028	-2.135	0.033	-1.17	0.244	0.89	0.374

^a The eight models include the 'rice growing system', 'zone', and their interaction, if significant, as fixed effects. The models applied at the field level include the 'year' as a random effect, while those realized at the plant level include both the 'year' and 'field_ID' as random effects. Type 3 ANOVA was performed for the models including interaction terms, and contrast analyses tested whether the rice system significantly affected the studied variables within each of the three zones.

^b * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS = not significant.

(quantitative) survey of farmers at selected sites could reveal more subtle differences among and within the study sites in terms of fertilization as well as other management practices, such as manual weeding, irrigation, or soil management.

Overall, the six study sites exhibit a high diversity of agricultural practices for rice cultivation. We demonstrate strong differences between irrigated areas and rainfed lowlands. Management practices are less intensive in rainfed lowlands than in irrigated areas, probably because the incurred risks are high in rainfed lowlands (Serpantié et al. 2019). It is also important to note that a high variability is found among the rainfed lowland sites: the management practices are particularly different from irrigated areas in the lowlands of Karfiguela (Tengrela lakeside) but are much less different in the lowlands of Banzon (village of Senzon).

The frequency of yellow mottle disease was not structured by the rice growing system but, instead, was particularly prevalent in the irrigated areas of Banzon and, to a lesser extent, in the rainfed lowlands of the Bama zone (Badala village). The emergence and epidemic dynamics observed over the last 50 years are thought to be linked to the intensification of rice agriculture, with particular practices such as transplanting (seedbed nurseries) contributing to the

build-up of RYMV inoculum (Traore et al. 2009). This is consistent with the high incidence of RYMV found in the irrigated perimeter of Banzon but not in the observations from the Bama zone, where the rainfed lowlands (Badala) had more symptomatic plants than the neighboring irrigated area. Although this rice virus is one of the major models used for plant virus molecular epidemiology research (Pagán et al. 2016; Trovão et al. 2015), its patterns have mostly been described at large geographical scales. Further investigations at the local scale could provide new insights into RYMV epidemiology, especially considering the complexity of its transmission (various insects and mechanical transmission).

BLS was predominant in irrigated areas compared with rainfed lowlands. This could be related to the more constant presence of water, which is a major transmission mode of *Xanthomonas oryzae oryzae*, and the high level of humidity favoring bacterial infection (Nino-Liu et al. 2006; Cartwright et al. 2018). As for *Xanthomonas oryzae*, irrigation water is considered a reservoir for many plant-pathogenic bacteria (Lamichhane and Bartoli 2015). In addition, the higher level of BLS in the irrigated areas could be caused by the higher frequency of mineral fertilization recorded in this rice production system. Indeed, excess nitrogen levels favor BLB epidemics



Fig. 4. Effect of the rice production system (irrigated areas, shown in blue, versus rainfed lowlands, shown in red) on specific symptoms observed for the four major diseases, yellow mottle disease (RYMV), bacterial leaf streak (BLS), rice blast, and brown spot, over the four studied years (2016–2019). **A**, Proportion of fields presenting specific symptoms for each of the four diseases for each rice growing system and year; **B**, average incidence level estimated in the four diagonal cells of each field for each of the four diseases and for each rice growing system and year; and **C**, proportion of sampled plants that presented specific symptoms for each of the four diseases and for each rice growing system and year.

(Reddy et al. 1979), although, to our knowledge, this effect has not been documented for BLS. Finally, we note that BLS seems to be well established (as it was found here in all six study sites), although it was reported in Burkina Faso only recently (Wonni et al. 2011). The seed transmission of BLS could also be an important driver of the epidemic success of BLS in the studied country. Although it is often considered a less important disease than BLB, the high incidence of BLS reported here requires the rapid development of control measures.

We found rice leaf blast to be particularly prevalent in irrigated areas compared with rainfed lowlands. Considering the literature on the factors favoring rice blast epidemics (Long et al. 2000; Ou 1985), we speculate that the microclimate (higher humidity) and the higher mineral fertilization in irrigated areas than in lowlands could be the driving factors underlying the observed differences between irrigated areas and rainfed lowlands.

Brown spot is the disease presenting the highest within-field incidence compared with the other diseases studied. This confirms an earlier study on rice seeds in which, on average, 84% of analyzed rice seed batches (from 3 to 76% of seeds infected within batches) were found to be infected in a 2013 to 2014 survey in 28 locations across rice-growing regions in Burkina Faso (Ouedraogo et al. 2016). Our results do not fit with the classical view of a rice disease associated with particularly poor conditions because (i) brown spot is found almost everywhere, with 79.9% of the studied fields presenting symptoms, and (ii) the rainfed lowland production system, in which mineral fertilization is much less frequent than it is in irrigated areas, does not present higher brown spot incidences. Brown spot is emerging in various rice growing countries, as reported, for example, in Bangladesh (Hossain et al. 2014) and the Ivory Coast (Bouet et al. 2015). However, as with other chronic crop diseases, it has received a lower level of attention than acute diseases such as rice blast (Savary et al. 2011a). More work, preferably studies also including brown spot severity estimates in addition to the occurrence frequencies of fields and plants, is encouraged to drive the understanding of

the environmental factors that favor epidemics and to better understand the drivers of this emergence.

Overall, we found that symptomatic plants are more frequent in irrigated areas than in rainfed lowlands. Irrigation is arguably one of the most important cultural practices in the management of plant disease (Café-Filho et al. 2018), and the other differences observed between irrigated areas and rainfed lowlands (in particular, the differences observed in terms of transplanting, crop rotation, fertilization, and cultivars) are also classically known to affect plant disease dynamics. Our study performed in farmer fields globally compares the two contrasting rice production systems and cannot separate the confounding factors. Additional data are required to identify the effects of specific practices on multiple diseases in rice in Burkina Faso.

The development of irrigated areas carries strong hope to develop rice production in Burkina Faso and in Sub-Saharan Africa in general (Xie et al. 2018). However, although rice yields are much higher in irrigated areas than in rainfed lowlands, they are not as high as expected (Ragasa and Chapoto 2017), and the poverty of farmers in irrigated areas, where the input burdens are higher, remains worrying, as exemplified by the case study of Bagré in the East Center of Burkina Faso (Daré et al. 2019; Tapsoba et al. 2018). The major constraints identified by farmers in the irrigated area of Malanville in Benin include water management problems (water unavailability and flooding) and poor access to production inputs, agricultural information, and markets (Nonvide et al. 2018). Irrigated systems require large amounts of water and inputs, causing them to be considered less sustainable, particularly in the context of climate change. Their higher yields are, however, essential for facing the challenge of rice self-sufficiency.

We speculate that the losses that occur because of diseases contribute to the prevention of expected yields being realized in irrigated areas; however, more work, including estimating rice yield losses that occur caused by different diseases, is required to better understand the factors affecting rice yields in each rice production system in Burkina Faso.

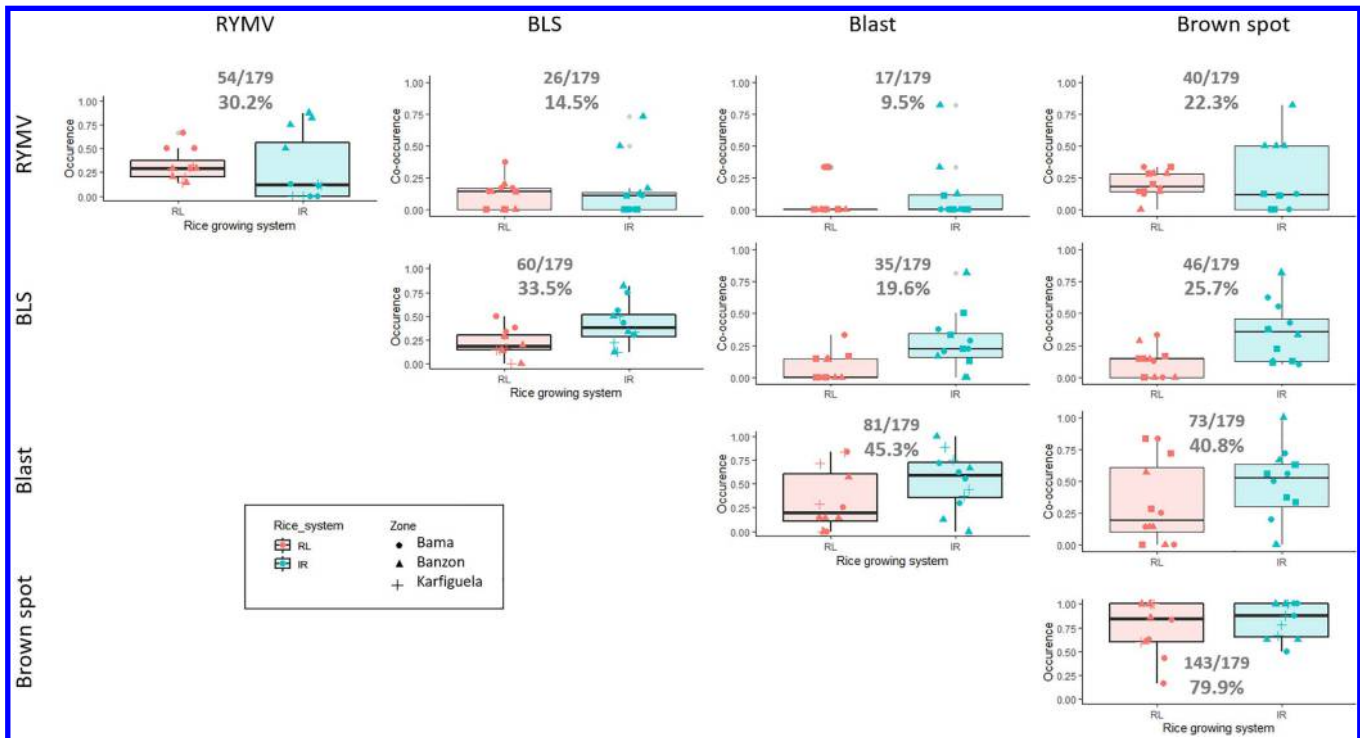


Fig. 5. Analysis of the presence/absence (each disease, on the diagonal) and co-occurrence (disease pairs) data from the 2016–2019 field-scale observations of the four major rice diseases: yellow mottle disease (RYMV), bacterial leaf streak (BLS), rice blast and brown spot. On the diagonal: the frequency of the presence of one disease (one point corresponds to one site in a particular year) in rainfed lowlands versus irrigated areas. The numbers in gray refer to the whole dataset (179 observations) showing the numbers of fields in which specific symptoms were observed and the corresponding frequencies. Right upper part: frequency of the co-occurrence of a disease pair (one point corresponds to one site in a particular year) in rainfed lowlands versus irrigated areas. The numbers in gray refer to the whole dataset (179 observations), showing the numbers of fields in which specific symptoms of two diseases were simultaneously observed and the corresponding frequencies.

The originality of our approach involves the consideration of multiple diseases simultaneously. In addition to the gains of time and money associated with such an approach, this method allows us to address new epidemiological questions, such as the quantitative importance of multiple infections in the studied agroecosystem (Tollenaere et al. 2016). Analyses of the co-occurrence of various species are frequently performed to detect interactions among species (i.e., the influence of the presence of one species on the occurrence of another species). Here, at the field level, we report positive associations between the presence of yellow mottle disease and BLS, as well as between BLS and rice blast, and a negative association between yellow mottle disease and rice blast. These statistical associations must, however, be taken with caution, as a recent critical analysis highlights that the co-occurrence of various diseases in the same field is not evidence of ecological interactions (Blanchet et al. 2020). However, the positive association observed between the presence of yellow mottle disease and BLS is particularly interesting considering that reciprocal interactions between the virus RYMV and the bacteria *Xanthomonas oryzae* have been reported experimentally (Tollenaere et al. 2017). Experimental work on other pathogen pairs has not been investigated to our knowledge, with one exception: antagonistic interactions were reported between *M. oryzae* and *B. oryzae* (Bahous et al. 2003), but the interactions did not correspond to a significant statistical association between disease occurrences (rice blast and brown spot) in our dataset.

Our study documents high levels of co-occurrence among various rice diseases in the studied small fields (25 × 25 meters), from 10% (yellow mottle disease and rice blast) to 41% (brown spot and rice blast). These co-occurrence levels were higher in irrigated areas than in rainfed lowlands. This is important because only situations in which pathogens circulate within the same sites and fields lead to the opportunity for pathogen–pathogen interactions, with important impacts on the outcomes of pathogen multiplication and infection (Abdullah et al. 2017; Syller 2012; Tollenaere et al. 2016).

At the plant level, in accordance with our previous data on RYMV-*Xanthomonas oryzae* coinfection (Tollenaere et al. 2017) and coinfection by multiple rice pathogenic bacteria (Bangratz et al. 2020), here, we document relatively high levels of coinfection, especially in one of the studied irrigated areas (Banzon zone). However, because this study consists only of symptom observations and because symptoms can be blurred in coinfection situations (Tollenaere et al. 2016), further research using molecular detection tools is required to complement the study of multiple infections by various rice pathogens in West Africa.

Our study area corresponds to the major rice growing area in Burkina Faso, where farmers perform a variety of rice-growing practices. Although it only represented a small geographical area (ca. 100 × 100 km), a study encompassing four Asian countries showed that production systems (PS) and disease syndromes (S) were not site-specific, with the same PS and S found at very geographically distant locations, while very different PS and S occurred in close proximity (Savary et al. 2011b; Savary et al. 2000). Therefore, our results are likely to provide important insight for rice production in West Africa in general and, consequently, to contribute to filling a data gap regarding rice diseases in this area. The results herein emphasize the critical need to pursue the development of efficient disease control strategies that are especially applicable by small farmers in irrigated areas.

We encourage more spatiotemporal surveys of rice diseases in Africa, including surveys of the rainfed upland rice growing system. Upland rice is uncommon in Burkina Faso and, consequently, was not considered in this study, but it is more important in coastal countries (particularly Guinea and Côte d'Ivoire) and represented 40% of rice-growing areas in Sub-Saharan Africa in 2008 (AfricaRice 2011). Studies investigating disease occurrences within a cropping season (whereas observations were performed in our study once a year) could generate more detailed epidemiological data. Surveying multiple rice diseases at once is demanding in terms of expertise but reveals efficiency in terms of time and money and generates new data on the relative distributions of multiple pathogens within an agrosystem and their possibilities of interacting within plants.

Finally, the design of efficient disease control strategies, such as resistant cultivars or management practices, should be efficient not only against one biotic constraint but should also take into account the multiple pests faced by the crops in each rice cultivation system.

Acknowledgments

This work was performed thanks to the facilities of the “International joint Laboratory LMI PathoBios: Observatory of plant pathogens in West Africa: biodiversity and biosafety” (<http://pathobios.com/en/home>; <https://twitter.com/PathoBios>), and conducted within E-SPACE project (<https://www6.inrae.fr/e-space>). We are very grateful to Manaka Douanio, Sylvain Zougrana, Nils Poulicard, Kader Guigma, Yacouba Kone, Edouard Kabore, Moustapha Koala, Amadou Diallo, Fabrice Nikiema, Bouda Zakaria, Ouedraogo Alassane, Daouda Hema, Drissa Tou, Traoré Moumouni, Dabire Roméo, Martial Kabore, and Noël Ouattara for their contributions to the fieldwork in Burkina Faso. We thank the rice farmers from Badala, Bama, Senzon, Banzon, Tengrela, and Karfiguela for their kind collaboration. We thank AfricaSys for the technical assistance in data management and Marjorie Le Bars for sharing her expertise on the pesticides cited by the farmers. We thank Christian Vernière, Philippe Roumagnac, Eugénie Hébrard, Nils Poulicard, Agnieszka Klonowska, David Berre, Georges Serpantié, Boris Szurek, and Mathilde Hutin for the constructive discussions throughout the project and/or helpful comments on earlier versions of the manuscript.

Literature Cited

- Abdullah, A. S., Moffat, C. S., Lopez-Ruiz, F. J., Gibberd, M. R., Hamblin, J., and Zerihun, A. 2017. Host-Multi-Pathogen Warfare: Pathogen Interactions in Co-infected Plants. *Front. Plant Sci.* 8:1806.
- AfricaRice. 2011. Boosting Africa's Rice Sector: A research for development strategy 2011-2020. Africa Rice Center, Cotonou, Benin.
- Arouna, A., Lokossou, J. C., Wopereis, M. C. S., Bruce-Oliver, S., and Roy-Macauley, H. 2017. Contribution of improved rice varieties to poverty reduction and food security in sub-Saharan Africa. *Glob. Food Secur.* 14:54-60.
- Bahous, M., Touhami, A., and Douira, A. 2003. Interaction between *Pyricularia oryzae*, four *Helminthosporium* species and *Curvularia lunata* in rice leaves. *Phytopathol. Mediterr.* 42:113-122.
- Balasubramanian, V., Sie, M., Hijmans, R. J., and Otsuka, K. 2007. Increasing Rice Production in Sub-Saharan Africa: Challenges and Opportunities. *Adv. Agron.* 94: 55-133.
- Bangratz, M., Wonn, I., Kini, K., Sondo, M., Brugidou, C., Béna, G., Gnacko, F., Barro, M., Koebnik, R., Silué, D., and Tollenaere, C. 2020. Design of a new multiplex PCR assay for rice pathogenic bacteria detection and its application to infer disease incidence and detect co-infection in rice fields in Burkina Faso. *PLoS One* 15:e0232115.
- Barnwal, M. K., Kotasthane, A., Magculia, N., Mukherjee, P. K., Savary, S., Sharma, A. K., Singh, H. B., Singh, U. S., Sparks, A. H., Variar, M., and Zaidi, N. 2013. A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. *Eur. J. Plant Pathol.* 136:443-457.
- Barrett, L. G., Kniskern, J. M., Bodenhausen, N., Zhang, W., and Bergelson, J. 2009. Continuum of specificity and virulence in plant host-pathogen interactions: causes and consequences. *New Phytol.* 183:513-529.
- Blanchet, F. G., Cazelles, K., and Gravel, D. 2020. Co-occurrence is not evidence of ecological interactions. *Ecol. Lett.*
- Bouet, A., Gbedie, N. A., Boka, A., and Kouassi, N. 2015. Evaluation des variétés de riz prometteuses pour la résistance à quelques contraintes biotiques majeures et pour leurs performances agronomiques en Côte d'Ivoire. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 9:2041-2056.
- Bregaglio, S., Donatelli, M., and Confalonieri, R. 2013. Fungal infections of rice, wheat, and grape in Europe in 2030–2050. *Agron. Sustain. Dev.* 33: 767-776.
- Café-Filho, A. C., Lopes, C. A., and Rossato, M. 2018. Management of plant disease epidemics with irrigation practices. *Irrigation in agroecosystems*. G. Ondrasek, ed. IntechOpen, London, UK.
- Cartwright, R. D., Groth, D. E., Wamishe, Y. A., Greer, C. A., Calvert, L. A., Cruz, C. M. V., Verdier, V., and Way, M. O., eds. 2018. *Compendium of Rice Diseases and Pests*, 2nd Ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Carvajal-Yepes, M., Cardwell, K., Nelson, A., Garrett, K. A., Giovani, B., Saunders, D. G. O., Kamoun, S., Legg, J. P., Verdier, V., Lessel, J., Neher, R. A., Day, R., Pardey, P., Gullino, M. L., Records, A. R., Bextine, B., Leach, J. E., Staiger, S., and Tohme, J. 2019. A global surveillance system for crop diseases. *Science* 364:1237-1239.
- CountrySTAT. 2021. *Annuaire statistique agricole 1993-2021: Superficie des céréales*. CountrySTAT, Burkina Faso.
- Daré, W., Venot, J.-P., Kaboré, E., Tapsoba, A., Traoré, F., Gérard, F., Carboni, S., Idani, D., Kambiré, H., and Napon, K. 2019. Grands aménagements hydroagricoles, inégalités environnementales et participation: le cas de Bagré au Burkina Faso. *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement* 19:1.

- Demont, M. 2013. Reversing urban bias in African rice markets: A review of 19 National Rice Development Strategies. *Glob. Food Secur.-Agric. Policy Econ. Environ.* 2:172-181.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1997. FAOSTAT statistical database. Rome. <http://www.fao.org/faostat/>.
- Fomba, S. N. 1984. Rice disease situation in mangrove and associated swamps in Sierra Leone. *Trop. Pest Manage.* 30:73-81.
- Hossain, M. M., Sultana, F., and Asadur Rahman, A. H. M. 2014. A comparative screening of hybrid, modern varieties and local rice cultivar for brown leaf spot disease susceptibility and yield performance. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 47:795-802.
- Jones, G. D., ed. 1998. *The epidemiology of plant diseases*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Kam, H., Laing, M. D., Ouoba, J., and Ndijondjop, M.-N. 2013. Rice traits preferred by farmers and their perceptions of rice yellow mottle virus (RYMV) disease in Cascades Region of Burkina Faso. *Afr. J. Agric. Res.* 8:2703-2712.
- Kassankogno, A. I., Saibou, A., Ouedraogo, I., Kpemoua, K. E., Nana, A., Ouedraogo, L., and Sankara, P. 2015. Caractéristiques morphologique et phénotypique des isolats de *Magnaporthe grisea* du Burkina Faso et du Togo. *Afr. Sci.* 11:5.
- Katic, P. G., Namara, R. E., Hope, L., Owusu, E., and Fujii, H. 2013. Rice and irrigation in West Africa: Achieving food security with agricultural water management strategies. *Water Resour. Econ.* 1:75-92.
- Kijima, Y., Ito, Y., and Otsuka, K. 2012. Assessing the Impact of Training on Lowland Rice Productivity in an African Setting: Evidence from Uganda. *World Dev.* 40:1610-1618.
- Kusai, N. A., Azmi, M. M. Z., Zainudin, N. A. I. M., Yusof, M. T., and Razak, A. A. 2017. Morphological and molecular characterization, sexual reproduction, and pathogenicity of *Setosphaeria rostrata* isolates from rice leaf spot. *Mycologia* 108:905-914.
- Lamichhane, J. R., and Bartoli, C. 2015. Plant pathogenic bacteria in open irrigation systems: what risk for crop health? *Plant Pathol.* 64:757-766.
- Lang, J. M., Hamilton, J. P., Diaz, M. G. Q., Van Sluys, M. A., Burgos, M. R. G., Cruz, C. M. V., Buell, C. B., Tisserat, N. A., and Leaf, J. E. 2010. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Dis.* 94:311-319.
- Long, D. H., Lee, F. N., and TeBeest, D. O. 2000. Effect of Nitrogen Fertilization on Disease Progress of Rice Blast on Susceptible and Resistant Cultivars. *Plant Dis.* 84:403-409.
- MAHRH. 2011. Burkina Faso: National Rice Development Strategy (NRDS). Ouagadougou, Burkina Faso. https://riceforafrica.net/images/stories/PDF/burkina_faso_en.pdf
- Mathur, S. B., and Kongsdal, O. 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen.
- Mendez del Villar, P., and Bauer, J.-M. 2013. Rice in West Africa: dynamics, policies and trends. *Cah. Agric.* 22:336-344.
- Mew, T. W., and Gonzales, P. 2002. A handbook of rice seedborne fungi. IRRI (International Rice Research Institute), Los Banos, Philippines; Science Publishers, Inc., Enfield, U.S.A.
- Niño-Liu, D. O., Ronald, P. C., and Bogdanove, A. J. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol. Plant Pathol.* 7:303-324.
- Nonvide, G. M. A., Sarpong, D. B., Kwadzo, G. T. M., Anim-Somuah, H., and Amoussouga Gero, F. 2017. Farmers' perceptions of irrigation and constraints on rice production in Benin: a stakeholder-consultation approach. *Int. J. Water Resour. Dev.* 34:1001-1021.
- Ou, S. 1985. *Rice Diseases*, 2nd Ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Ouedraogo, I., Wonni, I., Sereme, D., and Kabore, K. B. 2016. Survey of Fungal Seed-Borne Diseases of Rice in Burkina Faso. *Int. J. Agric. Innov. Res.* 5:476-480.
- Pagán, I., Fraile, A., and García-Arenal, F. 2016. Evolution of the Interactions of Viruses with Their Plant Hosts. Pages 127-154 in: *Virus Evolution: Current Research and Future Directions* S. C. Weaver, M. Denison, M. Roossinck, and M. Vignuzzi, eds. Caister Academic Press, U.K.
- Pannu, P. P. S., Chahal, S. S., Mandeep, K., and Sidhu, S. S. 2005. Influence of weather variables on the development of brown leaf spot caused by *Helminthosporium oryzae* in rice. *Indian Phytopathol.* 58:489-492.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ragasa, C., and Chapoto, A. 2017. Limits to Green Revolution in rice in Africa: The case of Ghana. *Land Use Policy* 66:304-321.
- Reddy, A. P. K., Katyal, J. C., Rouse, D. I., and MacKenzie, D. R. 1979. Relationship Between Nitrogen Fertilization, Bacterial Leaf Blight Severity, and Yield of Rice. *Phytopathology* 69:970-973.
- Savary, S., Jouanin, C., Félix, I., Gourdain, E., Piraux, F., Willocquet, L., and Brun, F. 2016. Assessing plant health in a network of experiments on hardy winter wheat varieties in France: multivariate and risk factor analyses. *Eur. J. Plant Pathol.* 146:757-778.
- Savary, S., Mila, A., Willocquet, L., Esker, P. D., Carisse, O., and McRoberts, N. 2011b. Risk Factors for Crop Health Under Global Change and Agricultural Shifts: A Framework of Analyses Using Rice in Tropical and Subtropical Asia as a Model. *Phytopathology* 101:696-709.
- Savary, S., Nelson, A., Sparks, A. H., Willocquet, L., Duveiller, E., Mahuku, G., Forbes, G., Garrett, K. A., Hodson, D., Padgham, J., Pande, S., Sharma, M., Yuen, J., and Djurle, A. 2011a. International Agricultural Research Tackling the Effects of Global and Climate Changes on Plant Diseases in the Developing World. *Plant Dis.* 95:1204-1216.
- Savary, S., Willocquet, L., Elazegui, F. A., Castilla, N. P., and Teng, P. S. 2000. Rice Pest Constraints in Tropical Asia: Quantification of Yield Losses Due to Rice Pests in a Range of Production Situations. *Plant Dis.* 84:357-369.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., and Nelson, A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol. Evol.* 3:430-439.
- Séré, Y., Fargette, D., Abo, M., Wydra, K., Bemerew, M., Onasanya, A., and Akator, S. 2013. Managing the major diseases of rice in Africa. Pages 213-228 in: *Realizing Africa's Rice Promise*. M. Wopereis, D. Johnson, N. Ahmadi, E. Tollens, and A. Jalloh, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Sereme, D., Ouedraogo, I., Neya, B., Zida, P. E., Yao, N., and Sie, M. 2016a. Screening Improved Rice Varieties (*Oryza spp*) for their Resistance/Tolerance to Rice Yellow Mottle Virus in West Africa. *Int. J. Agric. Innov. Res.* 5:481-486.
- Sereme, D., Ouedraogo, I., Wonni, I., Yao, N., Neya, B. J., and Konate, G. 2016b. Assessment of yield losses due to Rice yellow mottle virus under field conditions in Burkina Faso. *Int. J. Curr. Adv. Res.* 5:1522-1528.
- Serpantié, G., Dorée, A., Fusillier, J.-L., Moity-Maizi, P., Lidon, B., Douanio, M., Sawadogo, A., Bossa, A., and Houngpè, J. 2019. Nouveaux risques dans les bas-fonds des terroirs soudanais. Une étude de cas au Burkina Faso. *Cah. Agric.* 28:19.
- Sié, M., Zongo, J. D., and Dona Dakouo, D. 1998. Prospection des cultivars traditionnels de riz du Burkina Faso. *Revue CAMES. Sci. Med. (Phila.)* 00:21-27.
- Soullier, G., Demont, M., Arouna, A., Lancon, F., and del Villar, P. M. 2020. The state of rice value chain upgrading in West Africa. *Glob. Food Secur.* 25:100365.
- Syller, J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant Pathol.* 13:204-216.
- Tapsoba, A., Gérard, F., and Daré, W. s. 2018. Grands périmètres irrigués et résilience des paysans au Sahel. *Le cas de Bagré au Burkina Faso. Revue internationale des études du développement* 235:147-176.
- Tollenaere, C., Lacombe, S., Wonni, I., Barro, M., Ndougoua, C., Gnacko, F., Sereme, D., Jacobs, J. M., Hebrard, E., Cunnac, S., and Brugidou, C. 2017. Virus-Bacteria Rice Co-Infection in Africa: Field Estimation, Reciprocal Effects, Molecular Mechanisms, and Evolutionary Implications. *Front. Plant Sci.* 8:645.
- Tollenaere, C., Susi, H., and Laine, A. L. 2016. Evolutionary and Epidemiological Implications of Multiple Infection in Plants. *Trends Plant Sci.* 21:80-90.
- Traoré, O., Pinel-Galzi, A., Sorho, F., Sarra, S., Rakotomalala, M., Sangu, E., Kanyeka, Z., Sere, Y., Konate, G., and Fargette, D. 2009. A reassessment of the epidemiology of Rice yellow mottle virus following recent advances in field and molecular studies. *Virus Res.* 141:258-267.
- Traoré, O., Traoré, E. V. S., Gumedzoé, M. Y. D., and Konaté, G. 2008. Diagnostic sérologique des isolats soudano-sahéliens du virus de la panachure jaune du riz (Rice Yellow Mottle Virus, RYMV). *Tropicicultura* 26:74-77.
- Trovão, N. S., Baele, G., Vrancken, B., Bielejec, F., Suchard, M. A., Fargette, D., and Lemey, P. 2015. Host ecology determines the dispersal patterns of a plant virus. *Virus Evol.* 1:vev016.
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.
- Wonni, I., Ouedraogo, L., and Verdier, V. 2011. First Report of Bacterial Leaf Streak Caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* on Rice in Burkina Faso. *Plant Dis.* 95:72-73.
- Xie, H., Perez, N., Anderson, W., Ringler, C., and You, L. 2018. Can Sub-Saharan Africa feed itself? The role of irrigation development in the region's drylands for food security. *Water Int.* 43:796-814.
- Zeigler, R. S., and Barclay, A. 2008. The Relevance of Rice. *Rice (N. Y.)* 1:3-10.

Titre : Helminthosporiose du riz en Afrique de l'Ouest : identification des espèces responsables et diversité génétique de *Bipolaris oryzae* et *Exserohilum rostratum*

Mots clés : recombinaison, détection, reproduction, GBS

Résumé : Le riz est la deuxième céréale la plus produite dans le monde. En Afrique, de nombreux Etats fondent leur espoir sur la production locale de riz pour atteindre la sécurité alimentaire. Les problèmes phytosanitaires contribuent à l'insécurité alimentaire.

L'helminthosporiose du riz est une maladie fongique qui peut attaquer le riz à tous les stades de son développement. En Afrique subsaharienne, cette maladie est en progression dans de nombreux pays et cause des pertes d'environ 3,3% de la production. Malgré ce constat, les espèces responsables de la maladie, la diversité génétique et la structuration de leurs populations restent peu connues. Ces connaissances sont primordiales à l'élaboration de stratégies efficaces de lutte contre l'helminthosporiose du riz en Afrique de l'Ouest. Cette thèse avait pour objectifs : (i) d'identifier les espèces responsables de l'helminthosporiose du riz en Afrique de l'Ouest et d'évaluer leur pathogénie en milieu contrôlé, (ii) d'analyser la diversité génétique et le mode de reproduction des espèces les plus fréquentes, (iii) et de développer des outils de détection.

La caractérisation par *genotyping by sequencing* (GBS) de 469 isolats isolés des symptômes de l'helminthosporiose du riz a permis d'assigner les isolats à des espèces : deux espèces majoritaires, *Bipolaris oryzae* (37%) et *Exserohilum rostratum* (41%), et 9 espèces moins fréquentes (<5% ; *B. bicolor*, *B. maydis*, *B. sorokiniana*, *B. secalis*, *B. yamadae*, *Curvularia hawaiiensis*, *C. papendorfii*, *C. spicifera* et *E. turcicum*). Les deux espèces les plus fréquentes ont été identifiées dans la plupart des pays échantillonnés.

L'analyse de la structure génétique de *B. oryzae* et *E. rostratum* réalisée sur des échantillons provenant de 6 zones rizicoles du Burkina Faso a montré que la différenciation génétique était plus importante au sein des populations qu'entre les populations.

Chacune des espèces était structurée en 4 groupes génétiques dont la distribution était indépendante de l'origine géographique des isolats. Des preuves de recombinaison ont été identifiées dans les populations de *B. oryzae* et *E. rostratum*. Les fréquences relatives des signes de compatibilité sexuelle étaient en accord avec une reproduction sexuée pour *B. oryzae* mais pas pour *E. rostratum*. Des souches porteuses des deux signes de compatibilité ont été observées dans cette dernière espèce.

Les tests de pathogénicité réalisés par pulvérisation de suspensions conidiennes (*B. bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae*, *B. sorokiniana*, *C. spicifera* et *E. rostratum*) sur les feuilles des variétés de riz FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, Kitaake et TS2 ont montré que *B. oryzae* et *B. maydis* sont les espèces les plus pathogènes. Les cultivars FKR 19 et FKR 62N du Burkina Faso ont montré une plus grande résistance à toutes les espèces testées.

L'alignement multiples des séquences du gène GAPDH produites durant cette thèse ou déjà disponibles ont permis de dessiner 4 couples d'amorces pour distinguer les principales espèces responsables de l'helminthosporiose. Ils détectent spécifiquement *Bipolaris spp*, *B. maydis*, *B. oryzae* et *E. rostratum*. Les tests d'amplification PCR réalisés à partir des isolats des espèces cibles et de diverses espèces fongiques isolées du riz ont montré une très bonne sensibilité (taux de vrais positifs variant de 97 % à 100%), une très bonne spécificité (taux de vrais négatifs de 100%) et un faible seuil de détection (0,01 ng/μL d'ADN ; 0,25% de grains infectés). Des détections ont été aussi possibles sur les feuilles de riz infectées.

Cette étude a produit des connaissances nouvelles sur une maladie ré-émergente et fournit une base pour l'orientation des études futures sur la biologie et la génétique de *B. oryzae* et *E. rostratum* en Afrique de l'Ouest. Elle ouvre également des perspectives pour le suivi épidémiologique de l'helminthosporiose et pour une certification efficace des semences de riz au profit des producteurs.

Title : Brown spot of rice in West Africa: identification of causal species and genetic diversity of *Bipolaris oryzae* and *Exserohilum rostratum*

Keywords: recombination, detection, reproduction, GBS

Abstract: Rice is the second most produced cereal in the world. In Africa, many countries are pinning their hopes on local rice production to achieve food security. But phytosanitary problems contribute to food insecurity.

Brown spot of rice is a fungal disease that can attack rice at any stage of its development. In sub-Saharan Africa, this disease is on the rise in many countries and causes losses of about 3.3% of production. Despite this situation, the species responsible for the disease, the genetic diversity and the structure of their populations remain poorly known. This knowledge is essential for the development of effective strategies for the control of Brown spot of rice in West Africa.

The objectives of this thesis were: (i) to identify the species responsible for Brown spot of rice in West Africa and to evaluate their pathogenesis in a controlled environment, (ii) to analyze the genetic diversity and the mode of reproduction of the most frequent species, (iii) and to develop detection tools.

Characterization by genotyping-by-sequencing (GBS) of 469 isolates isolated from the symptoms of Brown spot of rice allowed to assign the isolates to species: two major species, *Bipolaris oryzae* (37%) and *Exserohilum rostratum* (41%), and 9 less frequent species (<5%; *B. bicolor*, *B. maydis*, *B. sorokiniana*, *B. secalis*, *B. yamadae*, *Curvularia hawaiiensis*, *C. papendorfii*, *C. spicifera* and *E. turcicum*). The two most frequent species were identified in most of the countries sampled.

The analysis of the genetic structure of *B. oryzae* and *E. rostratum* carried out on samples from 6 rice-growing areas of Burkina Faso showed that genetic differentiation was greater within populations than between populations.

Each of the species was structured into 4 genetic groups whose distribution was independent of the geographic origin of the isolates. Evidence of recombination has been identified in populations of *B. oryzae* and *E. rostratum*. The relative frequencies of mating types were consistent with sexual reproduction for *B. oryzae* but not for *E. rostratum*. Strains carrying both signs of compatibility were observed in the latter species.

Pathogenicity tests carried out by spraying conidial suspensions (*B. bicolor*, *B. maydis*, *B. oryzae*, *B. sorokiniana*, *C. spicifera* and *E. rostratum*) on the leaves of rice varieties FKR 19, FKR 62N, Gambiaka, Manobi, Kitaake and TS2 showed that *B. oryzae* and *B. maydis* are the most pathogenic species. Cultivars FKR 19 and FKR 62N from Burkina Faso showed greater resistance to all species tested.

The multiple alignment of the GAPDH gene sequences produced during this thesis or already available made it possible to design 4 pairs of primers to distinguish the main species responsible for Brown spot of rice. They specifically detect *Bipolaris spp*, *B. maydis*, *B. oryzae* and *E. rostratum*. The PCR amplification tests carried out using isolates of the target species and various fungal species isolated from rice showed very good sensitivity (rate of true positives varying from 97% to 100%), very good specificity (rate of true negative of 100%) and a low detection threshold (0.01 ng/μL of DNA; 0.25% of infected grains). Detections were also possible on rice infected leaves.

This study has produced new insights into a re-emerging disease and provides a basis for directing future studies on the biology and genetics of *B. oryzae* and *E. rostratum* in West Africa. It also opens up prospects for the epidemiological monitoring of Brown spot of rice and for effective certification of rice seeds for the benefit of producers.