

Diversité génétique de l'agent des taches anguleuses du haricot commun

Analyse au sein d'isolats d'Afrique centrale

J.-P. Busogoro¹

M. H. Jijakli¹

P. Lepoivre¹

Introduction

La maladie des taches anguleuses du haricot commun, provoquée par *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., un champignon imparfait (Deutéromycète) anciennement désigné sous le nom de *Isariopsis griseola* Sacc. (Deighton, 1990), est très répandue dans les zones tropicales où se cultive le haricot commun (Guzmán *et al.*, 1995). Dans la région des Grands Lacs d'Afrique où le haricot commun est largement cultivé, la maladie des taches anguleuses constitue une des principales limitations pour la production de cette plante. On peut citer en exemple le cas du Burundi où des enquêtes phytosanitaires réalisées en milieu rural ont montré que la maladie des taches anguleuses est la plus dommageable dans les régions d'altitude intermédiaire (1 400-1 700 m) (Perreaux et Mussche, 1993).

¹ Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, unité de Phytopathologie, 2, passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgique.

Les baisses de rendement occasionnées par la maladie des taches anguleuses chez *Phaseolus vulgaris* peuvent atteindre des proportions élevées (40 à 80 %) (Cardona-Alvarez et Walker, 1956 ; Schwartz *et al.*, 1981 ; Correa *et al.*, 1989). Selon les auteurs, les différences d'importance des pertes observées peuvent être liées à de nombreux facteurs qui touchent aux conditions climatiques, aux époques de réalisation des expériences, aux cultivars de haricot utilisés et aux souches du pathogène. Ces deux derniers paramètres revêtent une importance capitale et se rapportent à la diversité génétique de l'agent pathogène et de l'espèce végétale hôte.

Diverses études ont mis en évidence l'existence d'une diversité génétique au sein de l'espèce *P. griseola*. À cet égard, des analyses basées sur la pathogénicité des souches (Alvarez-Ayala et Schwartz, 1979 ; Srivastava *et al.*, 1995 ; Aggarwal *et al.*, 1996) ont révélé l'existence de nombreuses races de ce pathogène. Par ailleurs, le polymorphisme au sein de *P. griseola* a également été mis en évidence à l'aide des analyses de profils isoenzymatiques (Boshoff *et al.*, 1996) et moléculaires générés par RAPD (Guzmán *et al.*, 1995 ; Chacón *et al.*, 1997). Ces deux derniers types de caractérisation ont permis d'identifier clairement l'existence de deux groupes majeurs d'isolats au sein de *P. griseola* en relation étroite avec les types de haricot commun sur lesquels ils sont isolés (type andin et type mésoaméricain).

Parmi les différentes méthodes de lutte envisageables contre la maladie des taches anguleuses, la résistance génétique représente la stratégie la mieux adaptée pour les agricultures de subsistance des pays en voie de développement. Bien que constituant la solution la mieux appropriée aux agricultures des pays pauvres, la lutte par la résistance variétale n'est pas dépourvue de limitations. En effet, l'adaptation des populations parasitaires aux nouveaux gènes de résistance est un problème majeur qui peut aboutir à l'écroulement de ces derniers (Shaw et Peters, 1994). La lutte génétique exige donc d'analyser la structure des populations parasitaires afin de mettre en œuvre des stratégies de déploiement des variétés résistantes pouvant assurer une plus grande durabilité de la résistance.

L'importance de la diversité de *P. griseola* dans la région des Grands Lacs d'Afrique étant très peu connue, nous nous sommes fixés comme objectif de réaliser une première analyse, à grande échelle, au sein de souches collectées dans cette région afin de comprendre

comment la gestion des gènes de résistance devrait être conduite en vue d'une plus grande durabilité. Pour cela, nous avons mis en œuvre la caractérisation en termes de pathotypes par inoculation sur des génotypes de haricot commun et de son pool génique secondaire (*P. coccineus* et *P. polyanthus*). La caractérisation moléculaire des mêmes souches parasitaires à l'aide des profils RAPD a également été réalisée. Enfin, nous avons comparé les relations entre isolats en termes de profils de virulence et de profils moléculaires.

Matériel et méthodes

Isolats du pathogène

Une collection de 54 isolats monospores de *P. griseola* a été constituée à partir de feuilles de haricot présentant des symptômes de taches anguleuses récoltées dans différentes zones géographiques (tabl. 1). Les isolats ont été cultivés sur milieu gélosé V8 (pour 1 litre de milieu : 200 ml de V8, 3 g de CaCO₃ et 18 g d'agar) avant d'être conservés en chambre froide (4 °C) ou d'être utilisés directement pour les tests d'inoculation.

Génotypes végétaux

Une série de 29 génotypes végétaux comportant 17 variétés de *Phaseolus vulgaris*, 6 introductions de *Phaseolus coccineus* et 6 introductions de *Phaseolus polyanthus* était disponible dès le début de notre expérimentation. Ces génotypes ayant des origines géographiques différentes (tabl. 2) ont été utilisés pour les tests d'inoculation visant à analyser les profils de virulence des isolats de *P. griseola*. À cet effet, les graines ont été semées en serre dans une logette dont la température était de 25 °C avec une photopériode de 16 heures de lumière par jour. Au moment de l'inoculation, les jeunes plantules se trouvaient au stade de développement V3 (ouverture de la première feuille trifoliée et apparition de la deuxième).

Numéro	Isolat	Pays d'origine	Localité de collecte	Date de collecte	Institution ayant collecté
1	KGM1	Burundi	Muhingira	Janvier 1994	Isabu ¹
2	KGM2	Burundi	Muhingira	Janvier 1994	Isabu
3	KGM3	Burundi	Muhingira	Janvier 1994	Isabu
4	KGM4	Burundi	Muhingira	Janvier 1994	Isabu
5	KGM5	Burundi	Muhingira	Janvier 1994	Isabu
6	KGM6	Burundi	Muhingira	Janvier 1994	Isabu
7	KGM7	Burundi	Muhingira	Janvier 1994	Isabu
8	KGM8	Burundi	Muhingira	Janvier 1994	Isabu
9	KGR1	Burundi	Rubagabaga	Janvier 1994	Isabu
10	KGR2	Burundi	Rubagabaga	Janvier 1994	Isabu
11	KGR3	Burundi	Rubagabaga	Janvier 1994	Isabu
12	KGR4	Burundi	Rubagabaga	Janvier 1994	Isabu
13	KGR5	Burundi	Rubagabaga	Janvier 1994	Isabu
14	KGR6	Burundi	Rubagabaga	Janvier 1994	Isabu
15	NMM1	Burundi	Murama	Janvier 1994	Isabu
16	NMM2	Burundi	Murama	Janvier 1994	Isabu
17	NMM3	Burundi	Murama	Janvier 1994	Isabu
18	KF1	Kenya	Inconnu	Avril 1994	Université de Nairobi
19	KF4	Kenya	Inconnu	Avril 1994	Université de Nairobi
20	KK1	Burundi	Kabuye	Juillet 1994	Isabu
21	KK2	Burundi	Kabuye	Juillet 1994	Isabu
22	KK3	Burundi	Kabuye	Juillet 1994	Isabu
23	KK4	Burundi	Kabuye	Juillet 1994	Isabu
24	KK5	Burundi	Kabuye	Juillet 1994	Isabu
25	KK6	Colombie	Kabuye	Juillet 1994	Isabu
26	RN1	Colombie	Rio Negro	Février 1994	Ciat ²
27	RN2	Colombie	Rio Negro	Février 1994	Ciat
28	RN4	Colombie	Rio Negro	Février 1994	Ciat
29	RN8	Colombie	Rio Negro	Février 1994	Ciat
30	RN10	Brésil	Rio Negro	Février 1994	Ciat
31	BR1	Brésil	Goiás	Décembre 1995	Embrapa ³
32	BR2	Brésil	Ceará	Décembre 1995	Embrapa
33	BR3	Brésil	Minas Gerais	Décembre 1995	Embrapa
34	BR4	Brésil	Espírito Santo	Décembre 1995	Embrapa
35	BR5	Rwanda	Pernambuco	Décembre 1995	Embrapa
36	RDA1	Rwanda	Inconnu	Avril 1996	Université du Rwanda
37	RDA2	Rwanda	Inconnu	Avril 1996	Université du Rwanda
38	RDA3	Rwanda	Inconnu	Avril 1996	Université du Rwanda
39	RDA6	Rwanda	Inconnu	Avril 1996	Université du Rwanda
40	RDA7	Rwanda	Inconnu	Avril 1996	Université du Rwanda
41	BGA2	Burundi	Gitega	Avril 1996	Université du Burundi
42	BGA4	Burundi	Gitega	Avril 1996	Université du Burundi
43	BGA5	Burundi	Gitega	Avril 1996	Université du Burundi
44	ZA1	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
45	ZA2	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
46	ZA3	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
47	ZA4	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
48	ZA5	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
49	ZA6	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
50	ZA7	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
51	ZA8	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
52	ZA9	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
53	ZA10	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa
54	ZA11	Zaïre	Inconnu	Mai 1996	Université de Kinshasa

¹ Isabu : Institut des sciences agronomiques du Burundi.

² Ciat : Centro internacional de agricultura tropical.

³ Embrapa : Empresa brasileira de pesquisa agropecuaria.

■ Tableau 1

Liste des isolats de *Phaeoisariopsis griseola* utilisés pour l'analyse de la diversité génétique de ce pathogène du haricot commun.

Génotype	Espèce	Origine
BAT76	<i>P. vulgaris</i>	Isabu ¹
CALIMA	<i>P. vulgaris</i>	Isabu
AROANA	<i>P. vulgaris</i>	Isabu
A340	<i>P. vulgaris</i>	Isabu
A345	<i>P. vulgaris</i>	Isabu
A285	<i>P. vulgaris</i>	Isabu
A410	<i>P. vulgaris</i>	Isabu
A140	<i>P. vulgaris</i>	Isabu
PRELUDE	<i>P. vulgaris</i>	Belgique
BAT1647	<i>P. vulgaris</i>	Ciat ²
SEAFARER	<i>P. vulgaris</i>	Ciat
CORNELL49242	<i>P. vulgaris</i>	Ciat
MONTCALM	<i>P. vulgaris</i>	Ciat
A339	<i>P. vulgaris</i>	Ciat
G5686	<i>P. vulgaris</i>	Ciat
BAT332	<i>P. vulgaris</i>	Ciat
POMPADOUR CHECA	<i>P. vulgaris</i>	Ciat
NI15	<i>P. coccineus</i>	Rwanda
NI16	<i>P. coccineus</i>	Rwanda
NI1108	<i>P. coccineus</i>	Mexico ³
NI819	<i>P. coccineus</i>	Mexico ³
NI229	<i>P. coccineus</i>	Zaire
NI666	<i>P. coccineus</i>	Puerto Rico
NI429	<i>P. polyanthus</i>	Costa Rica
NI519	<i>P. polyanthus</i>	Mexico
NI1208	<i>P. polyanthus</i>	Colombia
NI1010	<i>P. polyanthus</i>	Colombia
NI1011	<i>P. polyanthus</i>	Colombia
NI373	<i>P. polyanthus</i>	Venezuela

Tableau 2
Liste des génotypes de *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus* et *Phaseolus polyanthus* utilisés pour les tests d'inoculation de l'agent des taches anguleuses.

¹ Isabu : Institut des sciences agronomiques du Burundi.

² Ciat : Centro internacional de agricultura tropical.

³ Génotypes sauvages.

Inoculation et évaluation des symptômes

Chaque isolat du pathogène a été préalablement multiplié sur milieu V8 pendant une douzaine de jours à l'obscurité et sous une température de ± 20 °C. L'inoculum a ensuite été préparé par grattage de la surface des colonies à l'aide d'une lame de scalpel dans de l'eau distillée stérile. La suspension conidienne ainsi obtenue a été ajustée à une concentration de 2×10^4 conidies/ml avant d'être pulvérisée, sous une pression de 2,8 atmosphères sur les deux faces des premières feuilles trifoliées des jeunes plantules, jusqu'à saturation. Les plantes inoculées ont été incubées pendant 4 jours dans une enceinte où l'humidité relative était maintenue aux environs de 95 % avec une photopériode de 16 heures de lumière par jour. Après cette période d'incubation, les plantes ont été maintenues en serre jusqu'à l'évaluation des symptômes au 16^e jour après inoculation.

La sévérité des symptômes de taches anguleuses a été estimée à l'aide de l'échelle d'intensité établie par le CIAT (Schoonhoven et Pastor-Corrales, 1992) allant de 1 à 9, où chacun des niveaux désigne une proportion de surface foliaire couverte par les lésions nécrotiques. Le niveau 1 correspond à l'absence de symptômes alors que le niveau 9 traduit la présence de lésions couvrant au moins 25 % de la surface foliaire et des tissus généralement chlorotiques entraînant une importante défoliation prématurée.

Extraction d'ADN

Le mycélium destiné à l'extraction d'ADN a été produit en milieu liquide (pour 1 litre : 10 g de glucose, 5 g d'extrait de levure, 4 g de KH_2PO_4 , 0,9 g de K_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl et 0,25g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et le pH ajusté à 5,3) (Wöstemeyer, 1985). Des pastilles mycéliennes (1 cm de diamètre) prélevées à partir de colonies sur milieu gélosé V8 ont été introduites dans 250-300 ml de milieu liquide. Ces cultures ont été maintenues sur un agitateur rotatif horizontal (115 rpm) pendant 12 jours à la température de $\pm 20^\circ\text{C}$. Le mycélium a ensuite été récolté sur étamines et utilisé pour l'extraction d'ADN selon la procédure de Doyle et Doyle (1990) légèrement modifiée pour quelques adaptations. Ainsi, l'étape d'extraction à l'aide du chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1) était faite deux fois successivement pour chaque purification. L'autre adaptation concernait la précipitation de l'ADN après digestion des ARN ribosomiques à l'aide de la RNase A. Pour cela, la solution d'acides nucléiques était mélangée avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M à pH 8 et 2 volumes d'éthanol pur préalablement refroidi. Ce mélange était alors incubé à -70°C pendant 1 heure avant d'être centrifugé à une vitesse de 10.000 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot ainsi obtenu était rincé deux fois successivement à l'aide de l'éthanol 70 % avant d'être séché et dissout dans une solution de TE.

Amplification par RAPD

Les réactions RAPD ont été faites à l'aide de 5 amorces (OPK7 : AGCGAGCAAG, OPK9 : CCCTACCGAC, OPK10 : GTGCAACGTG,

OPL17 : AGCCTGAGCC et OPL18 : ACCACCCACC) (Operon Technologies, USA) sur un thermocycleur Biometra (TRIO-Thermoblock). Ces réactions ont été réalisées dans un volume final de 50 μ l contenant 5 μ l de tampon PCR 10 fois concentré (Boehringer Mannheim), 0,4 μ M d'amorce, 4 mM de MgCl₂, 200 μ M de chaque dNTP, 50 ng d'ADN et 1 unité de Taq polymérase (Boehringer Mannheim). Les étapes d'amplification consistaient en une dénaturation initiale de l'ADN pendant 3 mn à 94 °C suivie de 45 cycles de 1 mn à 94 °C, 1 mn à 35 °C et 2 mn à 72 °C. À la fin des 45 cycles, une dernière élévation était réalisée à 72 °C pendant 10 mn. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose 1,5 % et visualisés par coloration au bromure d'éthidium sous un éclairage ultra-violet.

Analyse des données

Pour chaque combinaison « isolat pathogène-génotype végétal », la moyenne des notes d'évaluation des symptômes a permis de définir 3 niveaux de réaction que nous avons désignés par les chiffres 1, 2 et 3 pour respectivement les réaction de résistance, résistance partielle et sensibilité telles que définies par le Ciat. Ces données ont été encodées dans une matrice à double entrée et utilisées pour une classification numérique des différents isolats sous forme d'un dendrogramme où les distances entre isolats sont les proportions de génotypes végétaux (en %) pour lesquels les types de réaction n'étaient pas identiques entre les isolats considérés. La version 5 du logiciel Systat a été utilisée pour établir cette classification tenant compte des 3 grandes catégories de types de réaction relevées à la suite des tests d'inoculation.

Le relevé de chacune des bandes inventoriées dans les profils RAPD a été réalisé à l'aide d'une matrice à double entrée dans laquelle chaque isolat était considéré individuellement. La présence de toute bande était désignée par 1 et l'absence par 0. On a ainsi obtenu une matrice binaire de type 0/1 qui a été soumise à l'analyse par classification numérique à l'aide de la version 5 du logiciel Systat. Le dendrogramme résultant de cette classification présentait les distances entre isolats exprimées en pourcentage de bandes non communes entre les isolats considérés.

Pour préciser la nature des relations entre isolats sur la base de leurs profils moléculaires, nous avons déterminé les pourcentages de similarité moléculaire entre isolats au sein et entre les sites de collecte. Ce calcul se basait sur le pourcentage des bandes communes entre isolats. Seuls les isolats du Burundi dont les sites de collecte étaient précisément connus ont été considérés pour cette analyse.

La relation entre les propriétés de virulence des isolats et leurs profils moléculaires a été évaluée à l'aide de calculs de corrélation. La matrice des propriétés de virulence (avec les 3 catégories de réaction) et la matrice des profils moléculaires (type 0/1) ont été combinées en une matrice globale. Les corrélations entre les 2 types de variables (virulence et moléculaire) ont été déterminées sur la base du coefficient de corrélation de Pearson calculé à l'aide du système SAS.

■ Résultats

Propriétés de virulence

L'apparition des symptômes de taches anguleuses avait lieu dès le 10^e jour après inoculation et leur intensité atteignait le niveau maximal (cote 9 sur l'échelle du Ciat) 16 jours après inoculation pour les combinaisons « isolat pathogène-génotype végétal » donnant lieu à des réactions de sensibilité. Une grande diversité de pathogénicité a pu être révélée au sein des isolats de *P. griseola* sur base des réactions qu'ils provoquaient sur les 29 génotypes végétaux. Les trois types de réaction ont été observés sur certains génotypes végétaux en fonction des isolats pathogènes inoculés. Par exemple, le génotype de haricot commun BAT76 s'est montré résistant à l'isolat KGR1, partiellement résistant à l'isolat KGM1 alors qu'il était sensible à l'isolat KGM2. Sur les 54 isolats considérés lors de notre analyse, on a pu différencier 53 profils de virulence différents sur la base des types de réaction que chaque isolat provoquait sur les 29 génotypes végétaux. Les isolats KGM4 et ZA7 se sont montrés avirulents sur tous les génotypes inoculés tandis que tous les autres isolats ont donné lieu à des réactions très diversifiées. Le dendro-

gramme présenté dans la figure 1 illustre l'ampleur de la diversité relevée sur la base des propriétés de virulence des isolats. Les isolats KGM4 et ZA7 y forment un groupe fort homogène où la distance est nulle. Plus un isolat est virulent sur un nombre élevé de génotypes, plus grande est la distance le séparant du groupe formé par les 2 isolats avirulents sur tous les génotypes végétaux testés.

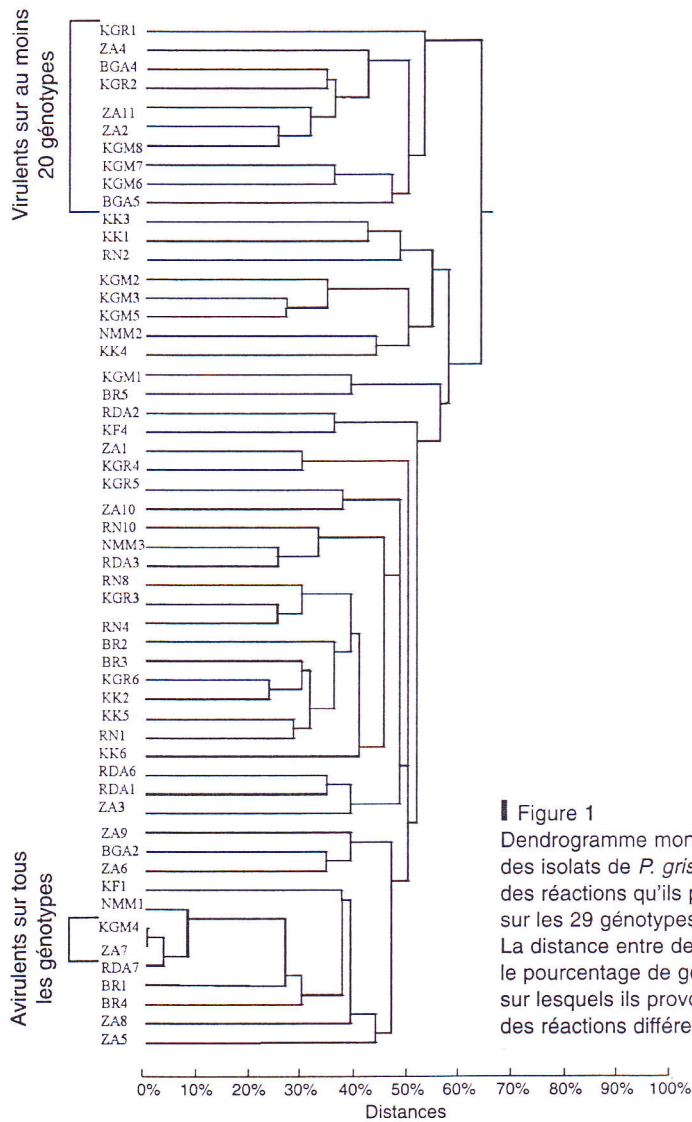


Figure 1
Dendrogramme montrant la classification des isolats de *P. griseola* sur la base des réactions qu'ils provoquent sur les 29 génotypes végétaux inoculés. La distance entre deux isolats indique le pourcentage de génotypes végétaux sur lesquels ils provoquent des réactions différentes.

La distribution des isolats dans les différents groupes ne saurait être liée à leurs origines géographiques puisque des isolats collectés dans une même localité peuvent présenter d'importantes différences dans leurs profils de virulence respectifs. C'est ainsi que les isolats NMM1, NMM2 et NMM3, collectés sur la colline de Murama au Burundi se classent dans des groupes fort éloignés, ce qui traduit bien les différences dans leurs profils de virulence puisqu'ils ont été à l'origine de réactions compatibles (sensibilité ou résistance partielle) sur respectivement 2, 19 et 14 génotypes végétaux. Une situation similaire a également été relevée pour les isolats BGA2, BGA4 et BGA5 collectés dans une autre localité au Burundi (Gitega) mais qui ont entraîné des réactions compatibles sur respectivement 13, 24 et 21 génotypes végétaux.

Profils moléculaires

Le dendrogramme obtenu à l'aide des profils de bandes amplifiées par RAPD a permis de visualiser les relations existant entre les différents isolats de la collection (fig. 2). Les isolats ZA7, ZA10 et KGR3 ne sont pas inclus dans cette classification numérique car aucune des amorces retenues n'a permis d'amplifier des bandes à partir de leurs extraits d'ADN. Cependant, l'amplification RAPD à l'aide d'autres amorces ou l'amplification de la zone ITS étaient possibles chez ces isolats, ce qui montre que l'absence de bandes dans le cas présent n'est pas due à une mauvaise qualité des solutions d'ADN. Parmi les 51 isolats restants, on a pu dégager 51 profils moléculaires différents.

Le dendrogramme fait apparaître certains groupes au sein desquels existent de très faibles différences entre isolats. Un de ces groupes est composé des isolats NMM1 et NMM2 distants de seulement 1,4 % et originaires d'un même site au Burundi (colline de Murama). Par contre, l'isolat NMM3 également originaire de cette même colline a montré un profil moléculaire avec d'importantes différences par rapport aux deux autres (distance de 10 %). Un autre groupe au sein duquel les différences entre isolats étaient faibles, rassemble les isolats ZA1 et ZA3 originaires d'une même localité au Zaïre. Pourtant, d'autres isolats collectés dans la même localité se montrent fort éloignés de ce groupe. C'est notamment le cas de l'isolat ZA5 dont la distance par rapport à ce groupe est de 32 %. Les

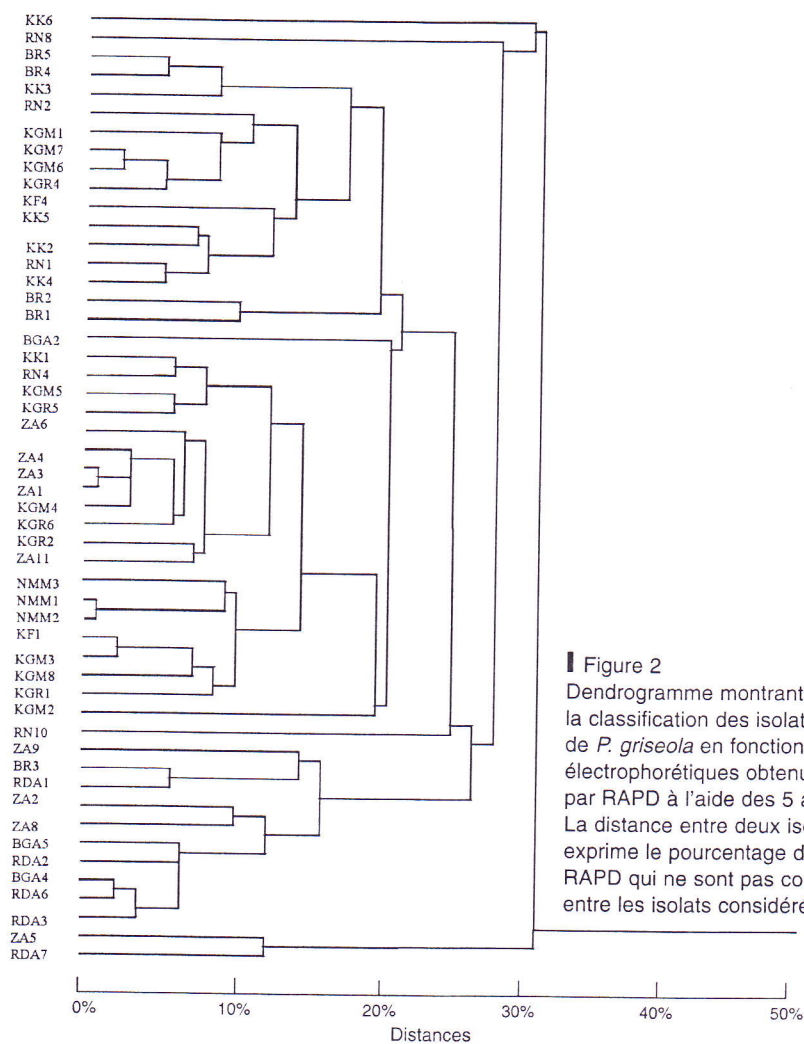


Figure 2
Dendrogramme montrant la classification des isolats de *P. griseola* en fonction des profils électrophorétiques obtenus par RAPD à l'aide des 5 amorces. La distance entre deux isolats exprime le pourcentage d'amplicons RAPD qui ne sont pas communs entre les isolats considérés.

isolats KGM6 et KGM7 distants de 2,7 % et originaires d'une même colline au Burundi forment également un groupe d'isolats dont les profils moléculaires n'ont montré que très peu de différences.

Par contre, d'autres groupes réunissent des isolats collectés dans des localités fort éloignées mais montrant beaucoup de ressemblances dans leurs profils moléculaires. Il s'agit par exemple des isolats KGM3 et KF1 respectivement originaires du Burundi et du Kenya.

Ces isolats ne présentaient des différences dans leurs profils moléculaires que pour 2,7 % des bandes amplifiées par RAPD. Le groupe formé par les isolats BGA4 et RDA6, respectivement originaires du Burundi et du Rwanda, présente la même caractéristique puisque la distance entre ces isolats n'est que de 2,7 %.

Pour la détermination des niveaux de similarité moléculaire, les isolats du Burundi ont été groupés en fonction des localités de collecte, ce qui a donné 5 groupes d'isolats (tabl. 3). Malgré l'existence de polymorphisme moléculaire entre isolats au sein même des sites de collecte, la similarité moléculaire est globalement la plus élevée pour des isolats collectés dans un même site que pour des isolats collectés dans des localités différentes.

Groupes d'isolats	KGM	KGR	NMM	KK	BGA
KGM	54				
KGR	31	47			
NMM	31	25	79		
KK	39	26	22	61	
BGA	20	18	24	25	76

Tableau 3
Moyenne de similarité moléculaire entre isolats de *P. griseola* sur la base des profils RAPD au sein et entre différents sites de collecte au Burundi.

* Les lettres donnent une abréviation de la localisation des sites de collecte des isolats.
KGM : Kayanza-Gatara-Muhingira.
KGR : Kayanza-Gatara-Rubagabaga.
NMM : Ngozi-Mwumba-Murama.
KK : Kayanza-Kabuye.
BGA : Burundi-Gitega.

Relation entre propriétés de virulence et profils moléculaires

On n'a pas relevé de relation directe entre profils de virulence et profils moléculaires des isolats de *P. griseola*. Ainsi par exemple, les isolats NMM1 et NMM2 qui présentaient des profils moléculaires fort similaires ont manifesté d'importantes différences dans leurs propriétés de virulence. Cette absence de corrélation se manifeste également à travers la comparaison des deux dendrogrammes illustrant les relations entre isolats sur base de ces propriétés (fig. 1 et 2). Les distances entre isolats sont généralement beaucoup plus élevées dans le cas des

propriétés de virulence que dans celui des profils RAPD. Les valeurs maximales de ces distances sont de 63 % et 32 % respectivement sur base des propriétés de virulence et sur base des profils RAPD. Par ailleurs, des isolats dont les profils moléculaires étaient fort identiques entraînaient des réactions différentes sur de nombreux génotypes végétaux. C'est par exemple le cas des isolats NMM1 et NMM2 qui sur le plan moléculaire forment un même groupe au sein duquel ils ne sont distants que de 1,4 % alors que sur le plan des propriétés de virulence ils se retrouvent dans des groupes distants de 56 %.

Discussion

Nos observations ont démontré l'existence de nombreux pathotypes différents parmi les isolats de *P. griseola* dans la région des Grands Lacs d'Afrique centrale. En effet, la majorité des isolats analysés ont manifesté des profils de virulence fort différents, ceci étant vrai même pour des isolats collectés dans une même localité. Cette diversité plus importante que celle décrite dans la littérature a été détectée grâce à l'utilisation d'un nombre élevé de génotypes végétaux pour la réalisation des tests d'inoculation. En effet, le nombre de profils de virulence potentiellement détectable augmente avec le nombre de variétés différentielles inoculées (Chen *et al.*, 1993). Cependant, la méconnaissance précise des gènes de résistance portés par les variétés inoculées ne permet pas une interprétation de nos résultats en termes de structure des populations. Malgré cette limitation, l'analyse sur base des propriétés de virulence nous a permis de mettre en évidence une grande diversité de races de *P. griseola* dans la zone considérée où on retrouvait la coexistence d'isolats capables de surmonter la résistance de la plupart des génotypes végétaux et d'autres isolats avirulents sur la majorité des génotypes testés. Cette grande diversité du pathogène pourrait être entretenue par l'importance des pressions de sélection exercées par l'hôte sur les populations parasitaires. À cet égard, les pressions de sélection sont particulièrement diversifiées dans les mélanges variétaux et la diversité au sein des populations parasitaires est beaucoup plus importante dans les cul-

tures de mélanges variétaux que dans les cultures monovariétales (Wolfe *et al.*, 1997). Ainsi, l'usage très courant de mélanges de haricot en Afrique centrale, où on peut parfois trouver jusqu'à 40 variétés différentes en mélange (Godderis, 1995), pourrait être de nature à permettre la survie de nombreuses races parasitaires.

Par le passé, les analyses sur base de profils isoenzymatiques (Boshoff *et al.*, 1996) et RAPD (Guzmán *et al.*, 1995) ont révélé l'existence d'une diversité au sein de *P. griseola* démontrant par la même occasion la répartition des isolats en deux grands groupes majeurs fortement corrélés avec les types de haricot sur lesquels ils sont isolés. Dans notre étude, le polymorphisme détecté dans la zone ITS de l'ADN ribosomique (Busogoro *et al.*, 1997) était faible alors que notre analyse par RAPD a démontré l'existence d'une importante diversité parmi les isolats analysés. La coexistence dans une même zone géographique de différents isolats avec des profils moléculaires différents a été fréquemment observée. Malgré l'importante variabilité détectée par RAPD, il y a lieu de considérer qu'il existe un certain gradient de similarité moléculaire.

Le dendrogramme obtenu sur base des données RAPD n'a pas mis en évidence l'existence de deux grands groupes majeurs parmi nos isolats. Cette observation, en contradiction avec les résultats d'autres auteurs (Guzmán *et al.*, 1995 ; Chacón *et al.*, 1997) pourrait être interprétée comme étant une preuve que les isolats collectés dans la région considérée l'auraient été à partir de cultivars de haricot commun appartenant à un même pool génique. En effet, les génotypes de *Phaseolus vulgaris* retrouvés dans cette région du monde appartiennent pour la plupart au pool génique andin (Correa, 1988 ; Gepts et Bliss, 1988 ; Khairallah *et al.*, 1990). Les marqueurs moléculaires ont parfois permis de retracer le cheminement de l'inoculum pour différents parasites fongiques (Andebrhan et Furtek, 1994 ; Huff *et al.*, 1994). Les vagues de migration de *Colletotrichum lindemuthianum* en Amérique du Sud ont également pu être déterminées avec plus ou moins de précision en se servant de la caractérisation par RAPD (Sicard *et al.*, 1997). Ce type d'interprétation n'est pas possible pour nos résultats étant donné l'importante diversité retrouvée chez *P. griseola* et l'absence d'un échantillonnage répétitif dans le temps.

Des mécanismes comme les mutations, les migrations ainsi que la recombinaison sexuée conduisent à l'apparition de la diversité au sein

des populations pathogènes (Burdon et Roelfs, 1985 ; Leung *et al.*, 1993 ; Drenth *et al.*, 1996). La forte ressemblance des profils RAPD entre certains isolats de *P. griseola* collectés dans différentes localités géographiquement éloignées peut faire penser à d'éventuelles migrations entre ces localités. Avant de confirmer cette hypothèse, il est plus que nécessaire de procéder à un échantillonnage beaucoup plus précis et ce de manière répétée dans le temps. Quant à la recombinaison sexuée, il est peu probable que ce mécanisme soit intervenu étant donné l'absence d'une forme de reproduction sexuée connue pour *P. griseola*.

Les résultats que nous avons pu dégager ont d'importantes implications pour l'amélioration de la résistance à la maladie des taches anguleuses du haricot commun. En présence d'une telle diversité pathogénique, les cultures monovariétales ne portant qu'un seul gène de résistance ne sont pas à conseiller car elles pourraient très vite sélectionner les gènes de virulence correspondants chez le pathogène (Tapsoba, 1996). Dans ce contexte, la diversification des gènes de résistance s'impose pour éviter l'apparition rapide des phénomènes de rupture de résistance. Tenant compte de cette diversité, l'utilisation de variétés possédant des gènes de résistance verticale devrait faire l'objet de mesures de gestion stricte dans la région considérée. À court terme, on pourrait constituer des mélanges variétaux contenant un maximum possible de gènes de résistance différents en attendant d'avoir des précisions quant à la manière dont on peut améliorer le comportement des mélanges couramment utilisés vis-à-vis de la maladie des taches anguleuses. Par ailleurs, il s'impose des analyses complémentaires qui permettraient de déterminer l'importance relative de l'allo-infection et celle de l'auto-infection chez *P. griseola*. Avec ce genre d'information, il sera possible de choisir entre différentes modalités de diversification de la résistance allant des mélanges variétaux aux rotations géniques ou à des associations de gènes agissant à différents stades (juvénile et adulte).

Remerciements

Les auteurs expriment leurs remerciements à l'AGCD (Administration générale de la coopération au développement) qui a supporté le présent travail à travers la bourse d'études attribuée à J.-P. Busogoro.

Bibliographie

- Aggarwal VD, Jambawe CM, Chirwa RM, Kisyombe CT 1996 — Identification of a multiple disease resistant line from the andean gene pool. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 39 : 282-283.
- Alvarez-Ayala G, Schwartz HF 1979 — Preliminary investigations of pathogenic variability expressed by *Isariopsis griseola*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 22 : 86-87.
- Andebrhan T, Furtek DB 1994 — Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis perniciosus* isolates from different hosts. Plant Pathology 43 : 1020-1027.
- Boshoff WHP, Swart WJ, Pretorius ZA, Liebenberg MM, Crous PW 1996 — Isozyme variability among isolates of *Phaeoisariopsis griseola* in southern Africa. Plant Pathology 45 : 344-349.
- Burdon JJ, Roelfs AP 1985 — Isozyme and Virulence Variation in Asexually Reproducing Populations of *Puccinia graminis* and *P. recondita* on Wheat. Phytopathology 75 : 907-913.
- Busogoro JP, Colinet D, Lepoivre P 1997 — A non-radioactive Single Strand Conformation Polymorphism using digoxigenin detection system to analyse the genetic diversity of ITS region in fungi. Proceedings of the 49th International Symposium on Crop Protection. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 919-927.
- Cardona Alvarez C, Walker JC 1956 — Angular leaf spot of Bean. Phytopathology 46 : 610-615.
- Chacón MI, Jara C, Castellanos G, Posso CE, Buruchara R, Cuasquer JB, Pastor-Corrales MA 1997 — Genetic diversity and relation between Common Bean Angular Leaf Spot fungus isolates from Africa and South America: genetic improvement implications. Annual report of the Bean Improvement Cooperative 40 : 127-128.
- Chen X, Line RF, Leung H 1993 — Relationship Between Virulence Variation and DNA Polymorphism in *Puccinia striiformis*. Phytopathology 83 : 1489-1497.
- Correa VF 1988 — Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr. Ph. D. Dissertation, Michigan State University, 154 p.
- Correa VF, Pastor Corrales MA, Saettler AW 1989 — Angular leaf spot. In Bean Production Problems in the Tropics. HF Schwartz MA Pastor Corrales eds. Centro International de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 59-75.
- Deighton FC 1990 — Observations on *Phaeoisariopsis*. Mycological-Research 94 : 1096-1102.
- Doyle JJ, Doyle JL 1990 — Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Drenth A, Whisson SC, Maclean DJ, Irwin JAG, Obst NR, Ryley MJ 1996 — The Evolution of Races of *Phytophthora sojae* in Australia. Phytopathology 86 : 163-169.
- Gepts P, Bliss FA 1988 — Dissemination Pathways of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) Deduced from Phaseolin Electrophoretic Variability. II. Europe and Africa. Economic Botany 42 : 86-104.

- Godderis W 1995 —
IBIHARAGE, La culture du haricot
au Burundi. AGCD, Bruxelles, 163 p.
- Guzmán P, Gilbertson RL, Nodari R,
Johnson WC, Temple SR, Mandala D,
Mkandawire ABC, Gepts P 1995 —
Characterization of Variability in
the Fungus *Phaeoisariopsis griseola*
Suggests Coevolution with the
Common Bean (*Phaseolus vulgaris*).
Phytopathology 85 : 600-607.
- Huff DR, Bunting TE,
Plumley KA 1994 —
Use of Random Amplified
Polymorphic DNA Markers
for the Detection of Genetic
Variation in *Magnaporthe poae*.
Phytopathology 84 : 1312-1316.
- Khairallah MM,
Adams MW, Sears BB 1990 —
Mitochondrial DNA polymorphisms
of Malawian bean lines:
further evidence for two major
gene pools. Theoretical and Applied
Genetics 80 : 753-761.
- Leung H, Nelson RJ, Leach JE 1993 —
Population Structure of Plant
Pathogenic Fungi and Bacteria.
In Advances in Plant Pathology.
J Andrews, I Tommerop eds. Academic
Press, New York, Vol 10, 157-205.
- Perreaux D, Mussche G 1993 —
Les contraintes biotiques du haricot
au Burundi. *In Bilan des recherches*,
Séminaire sur la culture du haricot
au Burundi, Bujumbura,
16-17 février 1993, 107-127.
- Schoonhoven A,
Pastor-Corrales MA 1992 —
Système standard pour l'évaluation
du germoplasme du haricot.
Centro Internacional de Agricultura
Tropical, Cali, 49 p.
- Schwartz HF, Correa VF, Pineda PAD,
Otaya MM, Katherman MJ 1981 —
Dry Bean Yield Losses Caused by
Ascochyta, Angular and White Leaf
Spots in Colombia. Plant Disease,
65 : 494-496.
- Shaw MW, Peters JC 1994 —
The Biological Environment and
Pathogen Population Dynamics:
Uncertainty, Coexistence
and Competition.
In Ecology of Plant Pathogens.
JP Blakeman, B Williamson eds.
CAB International, Wallingford, 17-35.
- Sicard D, Michalakis Y,
Dron M, Neema C 1997 —
Genetic Diversity and Pathogenic
Variation of *Colletotrichum*
lindemuthianum in the Three Centers
of Diversity of Its Host,
Phaseolus vulgaris.
Phytopathology 87 : 807-813.
- Srivastava LS, Gupta DK,
Dhiman KR, Singh G 1995 —
Source of resistance in french bean
(*Phaseolus vulgaris*) to angular
leaf-spot (*Phaeoisariopsis griseola*)
in Sikkim. Indian Journal
of Agricultural Sciences 65 : 305-307.
- Tapsoba H 1996 —
Pathogenic Variation
in *Puccinia substriata* var. *indica*
in the Southeastern United States
and Screening for Resistance
in Pearl Millet Germplasm.
Plant Disease 80 : 395-397.
- Wolfe MS, Pope CV, Lannou C,
Goyeau H, Finckh MR, Munk L,
Merz U, Valenghi D, Gacek E 1997 —
Mélanges variétaux de blés
ou d'orges. Théorie, pratique
et exemples. Phytoma 497 : 28-31.
- Wöstemeyer J 1985 —
Strain-dependent variation
in ribosomal DNA arrangement
in *Absidia glauca*.
Eur. J. Biochem. 146 : 443-448.