

## Caractérisation de l'agent responsable de l'ascochytose de *Phaseolus vulgaris* en Afrique et en Amérique du Sud \*

par

P. LEPOIVRE \*\* & J. P. BAUDOIN \*\*\*

MOTS-CLÉS. — Ascochytose ; *Phaseolus vulgaris* ; *Phoma* ; Phytopathologie ; Résistance génétique ; Zymogrammes.

RÉSUMÉ. — La littérature mentionne plusieurs espèces fongiques responsables de l'ascochytose du haricot, *Phoma exigua* Desm. var. *diversispora* (Bub.) Boerema, *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* (anciennement connu sous le nom d'*Ascochyta phaseolorum* Sacc.) et *Stagonosporopsis hortensis* (Sacc. et Malbr.) (anciennement connu sous le nom de *Ascochyta boltshauseri* Sacc.). Des isolats fongiques provenant d'échantillons de feuilles prélevées en Afrique de l'Est et en Colombie sont tous rattachés, sur base de la symptomatologie et de l'analyse des isoenzymes, à l'espèce *P. exigua* var. *diversispora*. Le polymorphisme enzymatique révèle des variations génétiques entre les souches africaines et américaines de *P. exigua* var. *diversispora* et au sein des isolats africains de cette espèce. Des génotypes résistants ont été observés chez plusieurs introductions de *Phaseolus polyanthus* Greenman, *Phaseolus coccineus* L. subsp. *coccineus*, *Phaseolus coccineus* subsp. *purpurascens*, *Phaseolus oligospermus* Piper, *Phaseolus pedicellatus* Benthham var. *pedicellatus*, *Phaseolus pauciflorus* Sesse et Mocino ex G. Don, *Phaseolus pluriflorus* MM. & S. et *Phaseolus salicifolius* Piper.

SAMENVATTING. — Het karakteriseren van de agens verantwoordelijk voor de ascochytose van *Phaseolus vulgaris* in Afrika en Zuid-Amerika. — In de literatuur worden verschillende schimmels aangehaald die verantwoordelijk geacht worden voor de ascochytose van de boon : *Phoma exigua* Desm. var. *diversispora* (Bub.) Boerema, *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* (voorheen bekend onder de naam *Ascochyta phaseolorum* Sacc.) en *Stagonosporopsis hortensis* (Sacc. en Malbr.) (voorheen bekend onder de naam *Ascochyta boltshauseri* Sacc.). Schimmelachtige isolaten afkomstig van in Oost-Afrika en Columbia genomen bladmonsters kunnen, op grond van de ziekteverschijnselen en de isoenzymenanalyse, met *P. exigua* var. *diversispora* in verband gebracht worden. De enzym-polymorfie brengt genetische verschillen aan het licht tussen

\* Lecture faite par M. P. Lepoivre à la Troisième Conférence Raymond Vanbreuseghem tenue le 3 décembre 1993. Texte reçu le 9 décembre 1993.

\*\* Chargé de cours à la Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux (Unité de Phytopathologie), Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux (Belgique).

\*\*\* Professeur ordinaire à la Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux (Unité de Phytotechnie des Régions intertropicales), Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux (Belgique).



de Afrikaanse en de Amerikaanse *P. exigua* var. *diversispora*, en tussen de Afrikaanse isolaten van deze soort onderling. Bij verschillende invoeringen van *Phaseolus polyanthus* Greenman, *Phaseolus coccineus* L. subsp. *coccineus*, *Phaseolus coccineus* subsp. *purpurascens*, *Phaseolus oligospermus* Piper, *Phaseolus pedicellatus* Benthham var. *pedicellatus*, *Phaseolus pauciflorus* Sesse en Mocino ex G. Don, *Phaseolus pluriflorus* MM. & S. en *Phaseolus salicifolius* Piper werden weerstand biedende genotypes waargenomen.

SUMMARY. — *Characterization of the fungal agent causing ascochyta blight of Phaseolus vulgaris in Africa and South America.* — The literature reports several species of fungi which are considered to be responsible for *Ascochyta* blight including *Phoma exigua* Desm. var. *diversispora* (Bub.) Boerema, *Phoma exigua* Desm. var. *exigua* (formerly known as *Ascochyta phaseolorum* Sacc.) and *Stagonosporopsis hortensis* (Sacc. et Malbr.) (formerly known as *Ascochyta boltshauseri* Sacc.). Fungal isolates obtained from foliar samples taken from bean with symptoms of *Ascochyta* blight in various regions of East Africa and Colombia were related all to *P. exigua* var. *diversispora* based on the symptoms produced on inoculated bean and isozyme analysis. Isozyme banding patterns revealed genetic variations between African and American strains of *P. exigua* var. *diversispora* and within the African isolates of this fungus. Resistant genotypes were found in several introductions of *Phaseolus polyanthus* Greenman, *Phaseolus coccineus* L. subsp. *coccineus*, *Phaseolus coccineus* subsp. *purpurascens*, *Phaseolus oligospermus* Piper, *Phaseolus pedicellatus* Benthham var. *pedicellatus*, *Phaseolus pauciflorus* Sesse et Mocino ex G. Don, *Phaseolus pluriflorus* MM. & S. et *Phaseolus salicifolius* Piper.

### Introduction

L'«ascochytose» du haricot est le nom vernaculaire désignant les infections maculicoles causées par trois espèces fongiques : *Phoma exigua* var. *diversispora* (Bub.) Boerema, *Phoma exigua* var. *exigua* Desm. (anciennement désigné sous le nom de *Ascochyta phaseolorum* Sacc.) et *Stagonosporopsis hortensis* (Sacc. et Malbr.) (anciennement connu sous le nom de *Ascochyta boltshauseri* Sacc.).

L'ascochytose a acquis une importance croissante au cours de la seconde moitié du vingtième siècle, parallèlement à l'extension de la culture des haricots. Elle constitue un facteur limitant majeur de l'intensification de cette culture dans toute la zone andine (1700 à 2200 m d'altitude) de l'Amérique du Sud, dans les régions d'altitude de l'Afrique de l'Est et dans des régions tempérées froides.

Dans les pays en développement où sévit la maladie, les agriculteurs disposent rarement des ressources financières et des connaissances techniques nécessaires à la mise en œuvre des moyens de lutte chimique. La sélection de génotypes résistants de haricot constitue dès lors le moyen le plus approprié pour combattre la maladie.





Fig. 1. — Symptômes d'ascochytose sur *Phaseolus* au Burundi.



À ce jour, seules quelques variétés ont été sélectionnées tandis qu'un niveau plus élevé de résistance a été identifié chez plusieurs génotypes de *Phaseolus coccineus* et *Phaseolus polyanthus* (SCHMIDT & BAUDOIN 1987). La recherche de nouvelles sources de résistance génétique vis-à-vis de l'ascochytose du haricot est actuellement indispensable. La classification des espèces fongiques responsables est basée sur des caractéristiques morphologiques qui entraînent une confusion taxonomique principalement entre les espèces *P. exigua* var. *diversispora* et *P. exigua* var. *exigua*, ce qui empêche une approche rationnelle pour sélectionner des génotypes de haricot résistant.

L'objectif de cette étude a été d'identifier des isolats fongiques d'origine géographique différente, et obtenus à partir de matériel foliaire montrant des symptômes d'ascochytose, et de caractériser une éventuelle variabilité intraspécifique au sein de ces isolats.

Notre travail a ensuite visé à rechercher des sources de résistance à l'égard de l'ascochytose chez les formes sauvages de *P. vulgaris* et chez d'autres espèces apparentées.

#### Matériel et méthodes

L'origine des souches fongiques de référence appartenant aux espèces *P. exigua* var. *exigua* (= souches R3 et R6), *P. exigua* var. *diversispora* (= souches R1, R4 et R5) et *S. hortensis* (souches R2 et R7) a été décrite antérieurement (OBANDO *et al.* 1990a). Le tableau 1 présente l'origine des 18 isolats collectés en Amérique du Sud et en Afrique de l'Est.

Les techniques d'inoculation des plantes et de culture du mycélium en vue de l'extraction et de l'analyse électrophorétique des enzymes des souches fongiques ont également été décrites (OBANDO *et al.* 1990a, OBANDO *et al.* 1990b).

#### Symptômes induits par les souches fongiques

Les symptômes de *P. exigua* var. *diversispora* (souches de référence R1, R2 et R5) sur haricot (var. Karama demi ou Ica Llano Grande) apparaissent sur les feuilles et les tiges 2 ou 3 jours après l'inoculation. Des anneaux de pycnides se forment à la surface des taches nécrotiques qui atteignent rapidement 50% de la surface foliaire.

Par contre, avec *S. hortensis* (souches de référence R7 et R2) ou *P. exigua* var. *exigua* (souches de référence R3 et R6), la surface infectée ne dépasse pas 10% après 15 jours d'incubation et aucune lésion ne se développe sur les tiges.



Tableau 1

Liste des isolats obtenus à partir de feuilles séchées provenant d'Afrique et d'Amérique du Sud et présentant des symptômes d'ascochytose

Souches	Hôte	Région	Altitude	Collecteur	Année
BDI S1	<i>P. vulgaris</i>	Rutegama	1600 m	D. Perreaux	(ISABU) <sup>1</sup> , 1985
BDI S2	<i>P. vulgaris</i>	Mosso	1250 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S3	<i>V. glabrescens</i>	Mosso	1250 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S4	<i>V. radiata</i>	Mparambo	900 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S5	<i>V. mungo</i>	Mosso	1250 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S6	<i>V. unguiculata</i>	Bujumbura	800 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S7	<i>V. unguiculata</i>	Mparambo	900 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S8	<i>P. vulgaris</i>	Murongwe	1470 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S9	<i>P. vulgaris</i>	Ijenda	2300 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S10	<i>P. vulgaris</i>	Giheta	1600 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
BDI S11	<i>P. vulgaris</i>	Rutegama	1700 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
COL S12	<i>P. vulgaris</i>	Popayan	1700 m	J. P. Baudoin	(FSAGx) <sup>2</sup> , 1985
COL S13	<i>P. vulgaris</i>	Sybundoy	2000 m	J. P. Baudoin	(FSAGx), 1985
COL S14	<i>P. lunatus</i>	Rio Negro	2600 m	V. Schmidt	(CIAT) <sup>3</sup> , 1986
COL S15	<i>P. vulgaris</i>	Popayan	1700 m	J. P. Baudoin	(FSAGx), 1987
EQU S16	<i>P. vulgaris</i>	Quito	2700 m	J. P. Baydoin	(FSAGx), 1987
ZAR S16	<i>P. vulgaris</i>	Bukavu	1635 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986
ZAR S17	<i>P. vulgaris</i>	Mulungu	1700 m	D. Perreaux	(ISABU), 1986

(1) ISABU : Institut des Sciences agronomiques du Burundi.

(2) FSAGx : Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux.

(3) CIAT : Centro Internacional de Agricultura Tropical.

BDI = Burundi ; COL = Colombie ; EQU = Equateur ; ZAR = Zaïre.

Les symptômes induits par les isolats S1 à S18 originaires d'Amérique du Sud ou d'Afrique de l'Est ressemblent à ceux des souches de référence *P. exigua* var. *diversispora*.

#### Analyse des enzymes

Des systèmes enzymatiques extraits du mycélium des souches de référence appartenant aux 3 espèces fongiques et des 18 isolats ont été analysés par électrophorèse.

Des considérations génétiques peuvent parfois expliquer le déterminisme de certains isoenzymes et sont alors d'une grande utilité dans l'interprétation des zymogrammes obtenus après électrophorèse (BONDE *et al.* 1984). Étant donné notre ignorance du statut génétique (mono ou dicaryotique, niveau de ploïdie) des espèces fongiques étudiées, notre interprétation de leur polymorphisme enzymatique ne peut s'appuyer sur de telles considérations.

Nous nous sommes donc basés sur la présence ou l'absence des bandes électrophorétiques pour interpréter nos résultats et caractériser la variabilité



enzymatique des souches par 4 systèmes enzymatiques qui ont montré un polymorphisme : alcool déshydrogénase, estérase, galactose déshydrogénase et glutamate déshydrogénase (tableau 2).

Tableau 2

Révélation et polymorphisme des activités enzymatiques recherchées

Enzyme	Révélation	Polymorphisme
Catalase	non	—
Malate déshydrogénase	non	—
Peroxydase	non	—
Shikimate déshydrogénase	non	—
Phosphatase acide	oui	non
Phosphatase alcaline	oui	non
Alcool déshydrogénase	oui	oui
Estérase	oui	oui
Galactose déshydrogénase	oui	oui
Glutamate déshydrogénase	oui	oui

La variabilité des 25 souches fongiques testées a été étudiée sur base des 31 bandes enzymatiques polymorphes par l'analyse des composantes principales (ACP) et la classification hiérarchique ascendante (CHA).

L'ACP a montré que les 31 variables (bandes) caractérisant le polymorphisme enzymatique des 25 souches fongiques pouvaient être ramenées à 8 composantes principales significatives, expliquant 89% de la variabilité totale. Les 3 premiers axes de l'ACP expliquent 57% de cette variabilité.

L'ACP a groupé tous les isolats provenant du continent américain avec la souche de référence R5 d'origine américaine appartenant à l'espèce *P. exigua* var. *diversispora* (figures 2 et 3).

Par ailleurs, tous les isolats d'origine africaine se retrouvent dans les groupes G4a, G4b et G4c, le groupe G4a comprenant les souches de référence d'origine africaine R1 et R4 de l'espèce *P. exigua* var. *diversispora*.

Parmi les 18 isolats que nous avons étudiés, aucun ne se rattache aux groupes G1 et G2, lesquels rassemblent respectivement les souches de référence appartenant aux espèces *S. hortensis* et *P. exigua* var. *exigua*.

La figure 4 représente le dendogramme obtenu par la CHA, pour un nombre de classes égal à 7, expliquant 76% de la variabilité.

Ces 7 classes sont reprises au tableau 3, où elles peuvent être comparées aux groupes identifiés par l'ACP. Les 2 méthodes statistiques aboutissent à des regroupements similaires des 25 souches fongiques, les classes obtenues par la CHA correspondant exactement aux groupes identifiés par l'ACP à l'exception du groupe G4b de l'ACP, qui est subdivisé en classes 5 et 6 par l'analyse de la CHA.



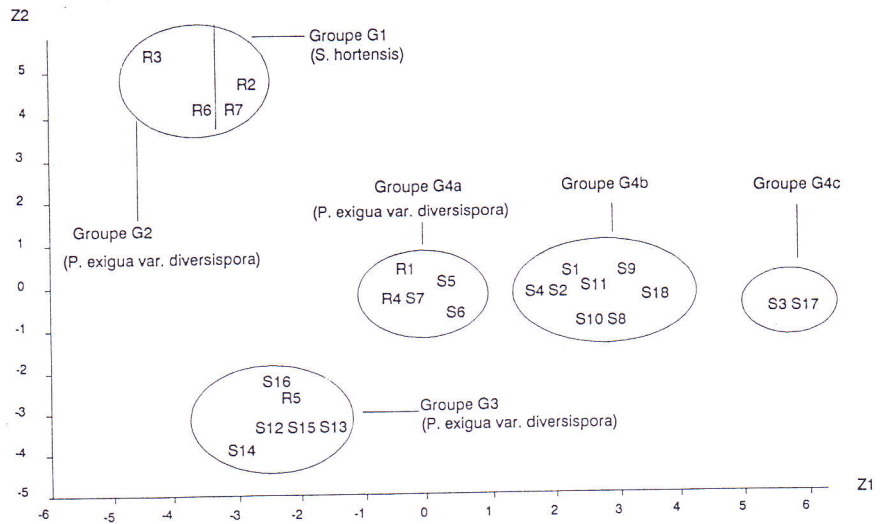


Fig. 2. — Représentation graphique de deux axes (Z1 et Z2) résultant de l'analyse des composantes principales (ACP) pour l'ensemble des bandes des zymogrammes relatifs aux souches et isolats fongiques causant l'ascochytose du haricot.

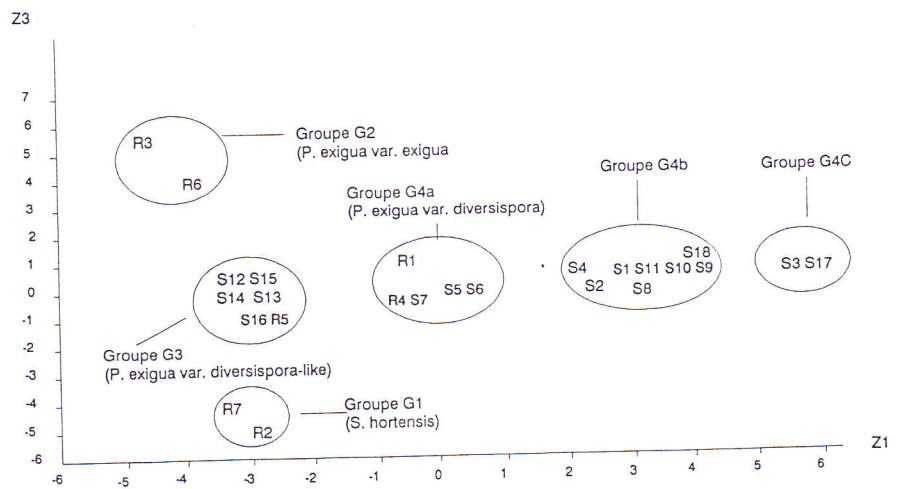


Fig. 3. — Représentation graphique de deux axes (Z1 et Z3) résultant de l'analyse des composantes principales (ACP) pour l'ensemble des bandes des zymogrammes relatifs aux souches et isolats fongiques causant l'ascochytose du haricot.



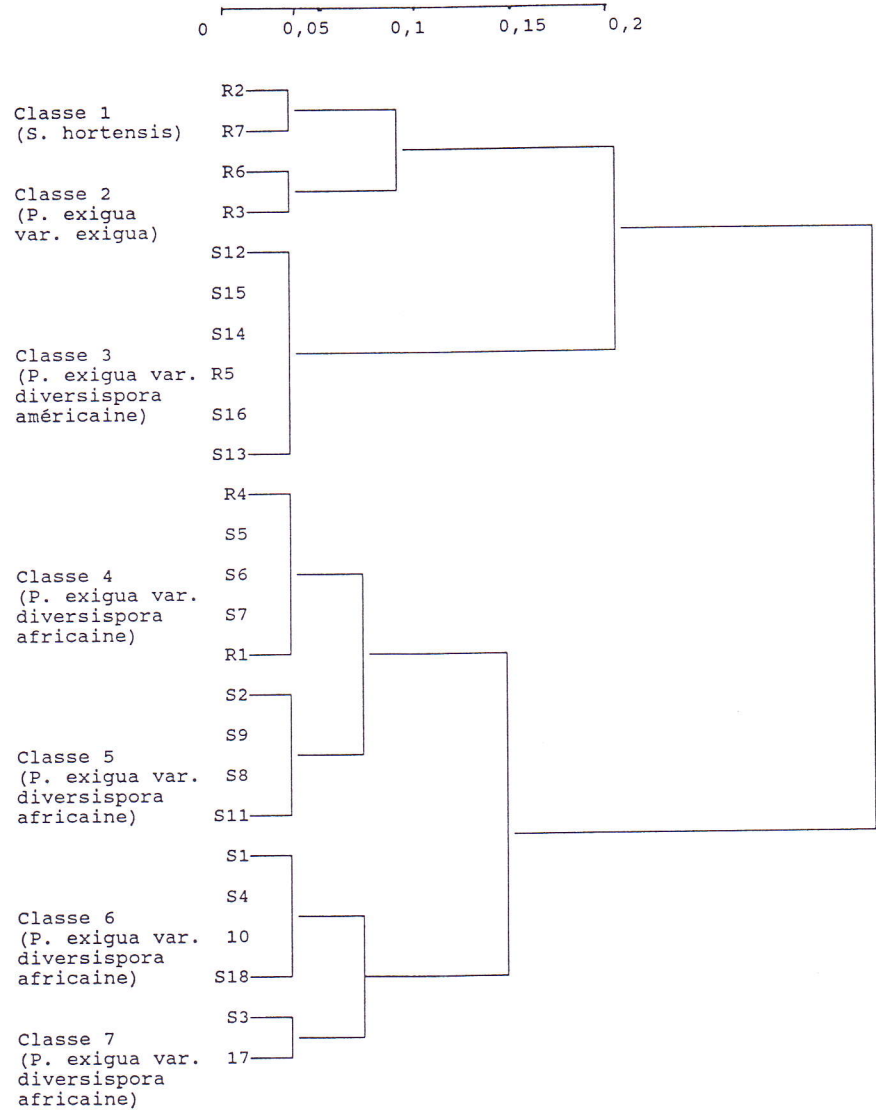


Fig. 4. — Dendrogramme obtenu par la classification hiérarchique ascendante pour l'ensemble des bandes des zymogrammes relatifs aux souches et isolats fongiques causant l'ascochytose du haricot.



Tableau 3

Classification des agents de l'ascochytose sur base du polymorphisme enzymatique

Méthode A.C.P.	Méthode C.H.A.	Espèce
Groupe 1 : R2, R7	Classe 1 : R2, R7	<i>S. hortensis</i>
Groupe 2 : R3, R6	Classe 2 : R3, R6	<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i>
Groupe 3 : R5, S12, S13, S14, S15, S16	Classe 3 : R5, S12, S13, S14, S15	<i>P. exigua</i> var. <i>diversispora</i> et souches américaines
Groupe 4a : R1, R4, S5, S6, S7	Classe 4 : R1, R4, S5, S6, S7	<i>P. exigua</i> var. <i>diversispora</i> et souches africaines
Groupe 4b : S1, S2, S4, S8, S9, S10, S11, S18	Classe 5 : S2, S8, S9, S11	idem
Groupe 4c : S3, S17	Classe 6 : S1, S4, S10, S18	idem
	Classe 7 : S3, S17	idem

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide des systèmes enzymatiques extraits du mycélium fournit donc des zymogrammes reproductibles permettant de différencier et de classer les différents agents fongiques responsables de l'ascochytose du haricot en groupes distincts et homogènes, cohérents avec la division taxonomique basée sur des critères morphologiques et le pouvoir pathogène.

Selon cette analyse enzymatique, il apparaît de plus que tous les isolats collectés en Amérique latine sont réunis dans un groupe spécifique incluant la souche américaine de référence de *P. exigua* var. *diversispora*.

La situation des isolats d'origine africaine de *P. exigua* var. *diversispora* semble plus complexe : ces isolats sont distribués dans 3 groupes différents (selon la technique de l'ACP) ou 4 groupes (selon la technique de la CHA) sans relation apparente avec les plantes hôtes (*P. vulgaris* ou espèces du genre *Vigna*), le pays d'origine (Burundi, Kenya, Rwanda, Zaïre) ou l'altitude de la récolte (900-2000 m).

#### Identification de sources de résistance à l'ascochytose du haricot au sein du genre *Phaseolus*

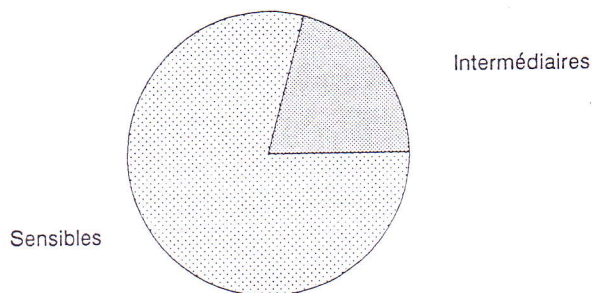
Le degré de sensibilité des génotypes de *Phaseolus* vis-à-vis de *Phoma exigua* var. *diversispora* a été évalué par inoculation artificielle des plantes, en estimant le pourcentage de la surface foliaire nécrosée et le temps d'incubation. En terme d'épidémiologie, le temps nécessaire à la production de pycnides au sein des lésions constitue également un paramètre important, car il concourt à l'accroissement de l'inoculum dans les conditions de champ.

L'évaluation des symptômes a été réalisée pendant la période de 15 jours qui suit l'inoculation. Aucune résistance n'a été trouvée chez les 88 formes

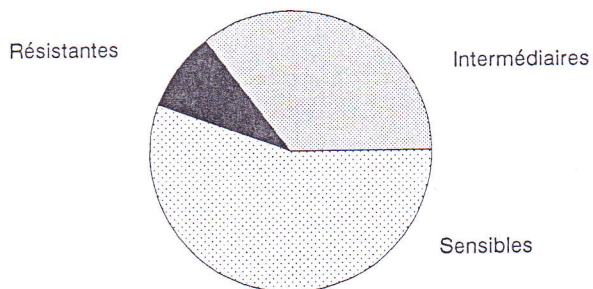


sauvages de *P. vulgaris* étudiées. Par contre, des résistances ont été observées chez plusieurs introductions de *Phaseolus polyanthus* Greenman, *Phaseolus coccineus* L. subsp. *coccineus*, *Phaseolus coccineus* L. subsp. *purpurescens*, *Phaseolus oligospermus* Piper, *Phaseolus pedicellatus* Benthham var. *pedicellatus*, *Phaseolus pauciflorus* Sesse et Mocino, *Phaseolus pluriflorus* MM. & S. et *Phaseolus salicifolius* Piper.

Altitude < 1000 m



1000 m < Altitude < 2000 m



Altitude > 2000 m

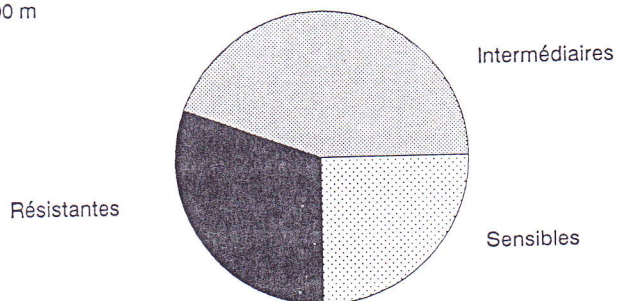


Fig. 5. — Évaluation de la proportion des introductions résistantes, intermédiaires et sensibles à l'ascochytose du haricot, en fonction de l'altitude d'origine des plantes testées.



Ces résultats indiquent cependant que le niveau de résistance à l'ascochytose de certaines introductions de *Phaseolus* dépend des souches de *P. exigua* var. *diversispora* utilisées (souches africaines ou américaines) (OBANDO *et al.* 1990b).

Parmi les facteurs qui peuvent être corrélés avec la résistance des introductions de *Phaseolus* vis-à-vis de l'ascochytose figure leur adaptation à l'altitude (fig. 4). Le pourcentage de génotype résistant est nettement plus marqué chez les introductions originaires de sites d'altitude où sévit particulièrement l'ascochytose.

### Conclusions

En conditions contrôlées, les symptômes occasionnés sur haricot par les agents responsables de l'ascochytose varient en fonction des espèces fongiques considérées.

L'identification des isolats originaires d'Amérique du Sud ou de l'Afrique de l'Est, tant sur base de leur pouvoir pathogène que de leur composition enzymatique confirme leur appartenance à l'espèce *P. exigua* var. *diversispora*.

Il est difficile de spéculer sur la signification taxonomique des différences observées dans les zymogrammes des souches africaines et américaines de *P. exigua* var. *diversispora*. Sur le plan pratique, le comportement différent de certaines introductions de *Phaseolus* selon l'origine géographique des souches inoculées démontre la nécessité de prendre en compte la variabilité génétique existant au sein des populations de *Phoma exigua* var. *diversispora* lors des programmes d'amélioration de la résistance des haricots à l'ascochytose.

### RÉFÉRENCES

- BONDE, M. R., PETERSON, G. L., DOWLER, W. M. & MAY B. 1984. Isozyme analysis to differentiate species of *Peronosclerospora* causing downy mildews of maize. — *Phytopathology*, **74** (11) : 1278-1283.
- OBANDO, L., KUMMERT, J., LEPOIVRE, P. & BAUDOIN, J. P. 1990a. Virulence and isozyme variations within fungi causing Ascochyta blight of *Phaseolus vulgaris*. — *Meded. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, **55** (3a) : 815-825.
- OBANDO, L., BAUDOIN, J. P., DICKBURT, C. & LEPOIVRE, P. 1990b. Identification de sources de résistance à l'ascochytose du haricot au sein du genre *Phaseolus*. — *Bull. Rech. agron. Gembloux*, **25** (4) : 443-457.
- SCHMIDT, V. & BAUDOIN, J. P. 1987. Multiplication et évaluation de *Phaseolus coccineus* L. et *Phaseolus polyanthus* Greenman, deux espèces intéressantes pour l'amélioration de la productivité des légumineuses vivrières. — *Bull. Rech. agron. Gembloux*, **22** : 235-253.