

Répartition géographique de la bactériose vasculaire du manioc en Colombie et variabilité de l'agent pathogène

Valérie Verdier*, Silvia Restrepo**

Introduction

Le manioc (Manihot esculenta Crantz) est originaire des régions tropicales d'Amérique du Sud.

En Colombie, cette culture représente une superficie d'environ 196 000 ha, avec un rendement moyen de 10 tonnes à l'hectare. La production est destinée principalement à la consommation humaine et animale mais constitue également une matière de premier choix pour l'élaboration de produits de transformation tel que l'amidon. En Colombie, l'extraction de l'amidon est la transformation la plus importante. L'amidon de manioc est ensuite utilisé dans les industries alimentaires, textiles et papetières.

Le manioc est une plante à grande capacité d'adaptation, tant climatologique que pédologique. En Colombie, le manioc est cultivé dans des zones écologiques (ou écozones) très diversifiées : zone tropicale subhumide, savanes à sols acides, zone semi-aride et zone tropicale de haute altitude (jusqu'à 2000 m).

L'un des principaux facteurs limitants de la production est la bactériose vasculaire du manioc, plus connue sous le nom de CBB (Cassava Bacterial Blight). Cette maladie est très répandue tant en Afrique que sur le continent Sud Américain. Les pertes de rendement varient de 20 % à la totalité de la production en

* ORSTOM, Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération, Laboratoire de phytopathologie tropicale, BP5045, 35032 Montpellier, France

** CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cassava Program, AA 6713 Cali, Colombie.

tubercules (Lozano et Sequeira, 1974). La maladie influe également sur la qualité des boutures qui sont seules utilisées par le paysan pour assurer une nouvelle plantation.

La bactérie pathogène Xanthomonas axonopodis pv. manihotis (Xam) provoque différents symptômes comme des taches anguleuses foliaires, des exsudats sur les tiges, des flétrissements des feuilles et des tiges et, en cas d'attaque grave, la mort de la plante (Fig. 1).

En Colombie, cette maladie a été particulièrement destructive en 1971 (Lozano et Sequeira, 1974). Depuis, elle a été régulièrement signalée dans les différentes régions de culture du manioc (Lozano, 1986). L'utilisation de variétés résistantes reste la seule méthode de contrôle efficace. La résistance a été développée principalement par croisement interspécifique entre Manihot esculenta et Manihot glaziovii, mais jusqu'à présent aucun gène de résistance n'a été mis en évidence. La caractérisation et la connaissance de la variabilité de l'agent pathogène sont un préalable nécessaire pour les travaux de sélection variétale. Différents auteurs ont montré que la variabilité de l'agent pathogène est importante en Amérique du Sud, centre d'origine du manioc (Maraite et al., 1981 ; Grousson et al., 1990, Verdier et al., 1993).

L'objectif de nos travaux est de caractériser et d'évaluer la variabilité de l'agent de la bactériose vasculaire, dans les différentes zones de culture du manioc et de définir sa répartition en Colombie.

Méthodes

Mesure de l'intensité des symptômes au champ

En Colombie, les principales zones écologiques (ou écozone : ECZ) ont fait l'objet d'une prospection entre 1995 et 1997 à l'exception de la région amazonienne où la culture du manioc est peu développée. Les écozones sont définies en fonction des conditions climatiques, du type de sol, de l'importance de l'écosystème prédominant et des principales contraintes biotiques et abiotiques de la culture. Quatre zones écologiques ont été visitées en Colombie : ECZI : zone tropicale sub-humides dans la région de la Côte Caraïbe, ECZ2 : savanes à sols acides dans la région des plaines orientales (Llanos), ECZ5 : zone tropicale en haute altitude dans la région Andine, ECZ7 : zone semi-aride dans la région de Guajira. Dans chaque zone écologique plusieurs localités ont été visitées et dans chaque

localité plusieurs champs ont été observés. Dans chaque champ, 15 plants sont choisis au hasard et notés selon une échelle de 1 à 5 suivant la méthode recommandée par Boher et Agbobli (1992). Les observations ont été effectuées à différentes époques de l'année, correspondant aux périodes les plus favorables pour l'observation des symptômes.

Caractérisation de l'agent pathogène : l'analyse moléculaire

Cent quatre-vingt-neuf tissus de manioc (feuilles et tiges) présentant les symptômes de la maladie ont été collectés dans différentes localités des trois zones écologiques prospectées, aucune souche n'ayant pu être isolée dans la zone écologique 7 (zone semi-aride). Les caractères morphologique et génétique des souches ont été étudiés suivant les méthodes décrites par Boher et Agbobli (1992) et Verdier *et al.* (1993). Le pouvoir pathogène des souches est testé en serre sur la variété sensible MCol 1522 par piqûre de tige avec une colonie bactérienne âgée de 12 heures. Les symptômes sont notés 30 jours après l'inoculation en observant la longueur des portions de tige portant des exsudats, le nombre de feuilles flétries et le dessèchement des tiges.

La technique RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction) est une analyse moléculaire qui permet de révéler les différences entre souches et qui porte sur la séquence des acides nucléiques formant l'ADN.

18

PRINCIPE DE L'ANALYSE RFLP

Les techniques ont été décrites par Berthier *et al.* (1993) et Verdier *et al.* (1993). L'ADN des souches est extrait puis digéré avec une ou plusieurs enzymes de restriction (dans notre cas EcoRI). Le produit de la digestion est séparé sur gel d'agarose, transféré après dénaturation sur une membrane de Nylon. Cette membrane est ensuite hybridée avec la sonde préalablement marquée soit au 32P avec un kit commercial (Multiprime Amersham) soit à l'Acétylaminofluorène

(AAF) dans le cas d'une sonde rRNA (Eurogentec, Belgique). La membrane est exposée sur un film d'autoradiographie que l'on révèle quelques heures après exposition à -80°C. Les méthodes de ribotypage et de RFLP, avec les sondes décrites dans le tableau 1, sont des techniques utilisées pour distinguer les *Xanthomonas* au niveau du genre et pour différencier les souches au niveau du *Pathovar* manihotis (Verdier *et al.*, 1994).

Méthode	Caractéristiques des sondes
Ribotypage	Sonde universelle rRNA 16 + 23S <i>E. coli</i>
RFLP	Sonde <i>ptbB</i> portant un gène impliqué dans le pouvoir pathogène de <i>Xam</i> Sondes <i>pBS6</i> et <i>pBS8</i> portant des séquences répétées et spécifiques de <i>Xam</i> .

Tableau 1 - Techniques et sondes moléculaires utilisées pour la caractérisation des souches de *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis

L'analyse statistique

Chaque profil d'hybridation obtenu avec la sonde est considéré comme un « haplotype ». A chaque souche correspond donc un « haplotype » qui est codifié en donnée binaire (0 ou 1) selon la présence ou l'absence de bande. La diversité génétique de *Xam* dans chaque zone écologique est calculée avec l'indice de diversité de Nei et Tajima selon la formule : $H = (n/(n-1))/(1 - \sum X_i^2)$ où n = nombre de souches dans chaque zone écologique, $\sum X_i^2$ = fréquence de l'haplotype i dans chaque zone écologique.

Résultats

Caractérisation et variabilité de l'agent pathogène

La plupart des souches de *Xam* analysées sont très agressives et développent une infection systémique sur la variété sensible McoI 1522 (Fig.2). On peut noter l'apparition d'exsudat et le flétrissement des feuilles dès le dixième jour après inoculation. Ces symptômes reproduisent parfaitement ceux observés en conditions naturelles. Quatre souches ne reproduisent pas les symptômes de la bactériose et sont considérées comme non pathogènes. Les différences d'agressivité observées sur la tige ne sont pas corrélées avec l'origine géographique des souches (Fig. 3). Après 48 h de croissance sur milieu gélosé, toutes les souches ont l'aspect caractéristique de *Xam*, c'est-à-dire des colonies blanc-ivoire, rondes et muqueuses.

Les haplotypes obtenus tant par la technique de ribotypage que par les différentes sondes moléculaires (*ptbB*, *pBS6*, *pBS8*) permettent d'identifier rapidement les souches comme étant *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Les quatre souches non pathogènes ont des profils en RFLP qui confirment leur appartenance au Pathovar manihotis. L'analyse des ribotypes des souches Colombiennes de *Xam* met en évidence seulement deux groupes différents, groupes RNA1 et RNA5, alors que trois ribotypes (1, 3 et 5) avaient été préalablement décrits en Colombie (Verdier *et al.*, 1993).

L'analyse génétique la plus discriminante est l'étude RFLP avec la sonde *ptbB*. Elle permet de caractériser 26 haplotypes distincts avec des profils simples de 1 à 9 bandes (Fig. 4). Avec cette sonde nous avons identifié plusieurs haplotypes dans chaque zone mais des haplotypes identiques dans différents sites d'une même zone, ce qui laisse supposer une dissémination du parasite par l'intermédiaire de matériel végétal contaminé (Tableau 2). Les sondes répétitives produisant des

des souches
agressives

identifiées comme
des Xams

divers selon les zones

identiques à l'intérieur
d'une zone

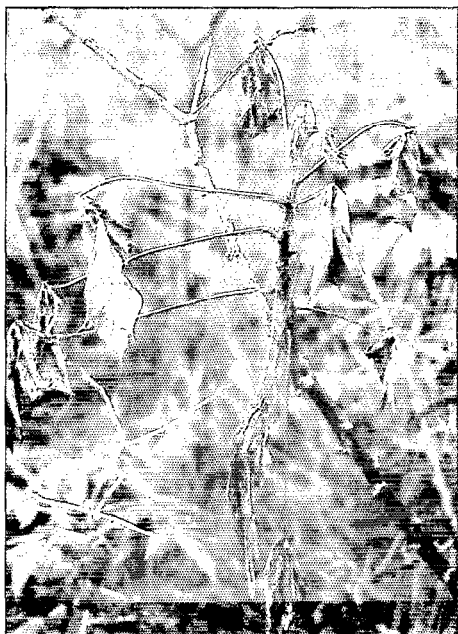


Figure 1 - Symptômes de la bactériose vasculaire du manioc en champ dans la zone écologique 5

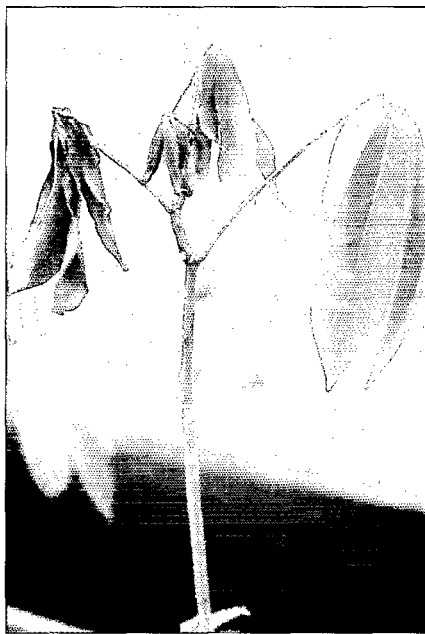


Figure 2 - Symptômes observés en serre et développés par une souche Xam agressive sur la variété sensible MColl522.

20

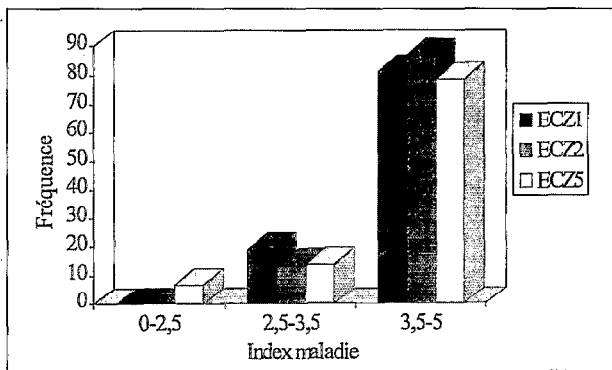


Figure 3 - Fréquence de la répartition des souches Xam en Colombie, en fonction de leur agressivité et par zone écologique (0-2,5 : souches peu agressives, 2,5 - 3,5 : moyennement agressives, 3, 5-5 : très agressives)

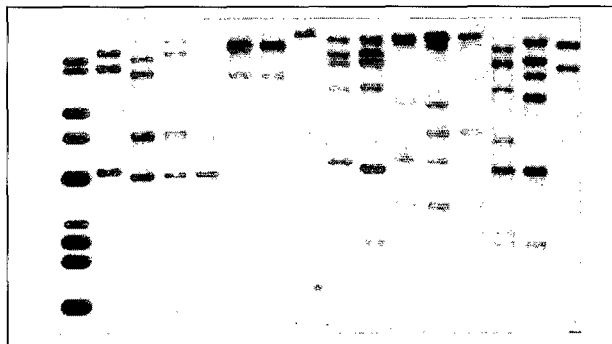


Figure 4 - Illustration des profils ou haplotypes obtenus pour différentes souches de Xam après hybridation avec la sonde pthB

profils plus complexes composés de multiples bandes, sont moins discriminantes que la sonde *pthB*.

L'indice de diversité de l'agent pathogène dans les différentes zones écologiques est indiqué dans le tableau 2. La diversité génétique des souches *Xam* de la zone écologique 5 est de 0,4 alors que les indices de diversité des souches des ECZ1 et ECZ2 sont de 0,75 et 0,78 respectivement (Tableau 2).

Code localité	Localités	Nombre de sites visités	ECZ ^a	Sévérité de la maladie ^b	Haplotypes détectés avec la sonde <i>pthB</i>	Diversité génétique ^c
A	Cajibío	3	5	4	C7, C8, C9	0,4
B	Mondomo	5	5	4,5	C8	
S	Sant. de Quilichao	3	2	3	C8	0,78
ST	Santho Thomas	1	2	2	/	
C	Puerto Lopez	1	2	3,5	C2, C4	
D	Carimagua	2	2	4,5	C2, C4, C13, C19	
E	Villavicencio	3	2	4	C3, C26, C25, C24, C23, C20	
F	Granada	2	2	3	C20	
G	Pivijay	6	1	3,5	C5, C6, C16, C18	0,75
H	Maria la Baja	1	1	2	C10, C11	
I	Carmen de Bolívar	1	1	2	C10	
J	Sincelejo	1	1	3	C16, C18	
K	Segovia	3	1	3	C18	
L	Ciénaga de oro	2	1	3	C4	
M	Chinu	2	1	4,5	C18	
N	La Corozza	1	1	4	C14, C15, C16	
O	El Canito	2	1	2	C4, C14	
P	Santa Martha	3	7	1	/	
Q	Fonseca	4	7	1	/	
R	Riohacha	5	7	1	/	
T	Canaverales	1	7	1	/	
U	Aremasain	1	7	1	/	

^aZones écologiques comme expliqué dans le texte, ^bd'après Boher et Agbobli (1992), ^cIndice décrit dans le texte.

Tableau 2 - Indice de sévérité de la maladie par localité, groupes génétiques auxquels appartiennent les souches isolées dans les différents sites, indice de diversité par zone écologique

Distribution géographique de la bactériose

L'intensité moyenne des symptômes dans chacun des sites visités est indiqué dans la figure 5. Dans la région " Côte Nord " (ECZ1), la maladie est présente dans tous les champs visités et se manifeste avec une forte intensité. En milieu paysan, on rencontre le plus souvent les variétés Mcol 2215 (Venezolana)

migration possible de
la maladie

et Mcol 1 505 (PI2) très sensibles à la maladie. Les essais effectués en serre confirment les observations au champ. Dans la région de la Guajira (ECZ7 : zone semi-aride), les symptômes de la maladie n'ont pas été observés et l'agent pathogène n'a pas été détecté dans le matériel végétal collecté. Dans l'ECZ 2 (région des Llanos), la maladie est présente avec une forte intensité. Les champs de Granada et Puerto Lopez (Tableau 2) sont des premiers essais régionaux menés avec les paysans où la maladie est apparue pour la première fois et a été introduite avec du matériel végétal contaminé. La caractérisation moléculaire renforce cette hypothèse car elle met en évidence la migration de certaines souches d'un site à l'autre (Tableau 2). Dans l'ECZ5, région de haute altitude isolée par la cordillère occidentale, la maladie se manifeste avec une très forte intensité ce qui a été confirmé par des prospections récentes en 1997 (moyenne des notes entre 4 et 5).

Dans chaque zone, les champs sous couvert forestier sont indemnes de la bactériose, fait déjà signalé dans d'autres pays (Boher et Agbobli, 1992 ; Daniel *et al.*, 1981).

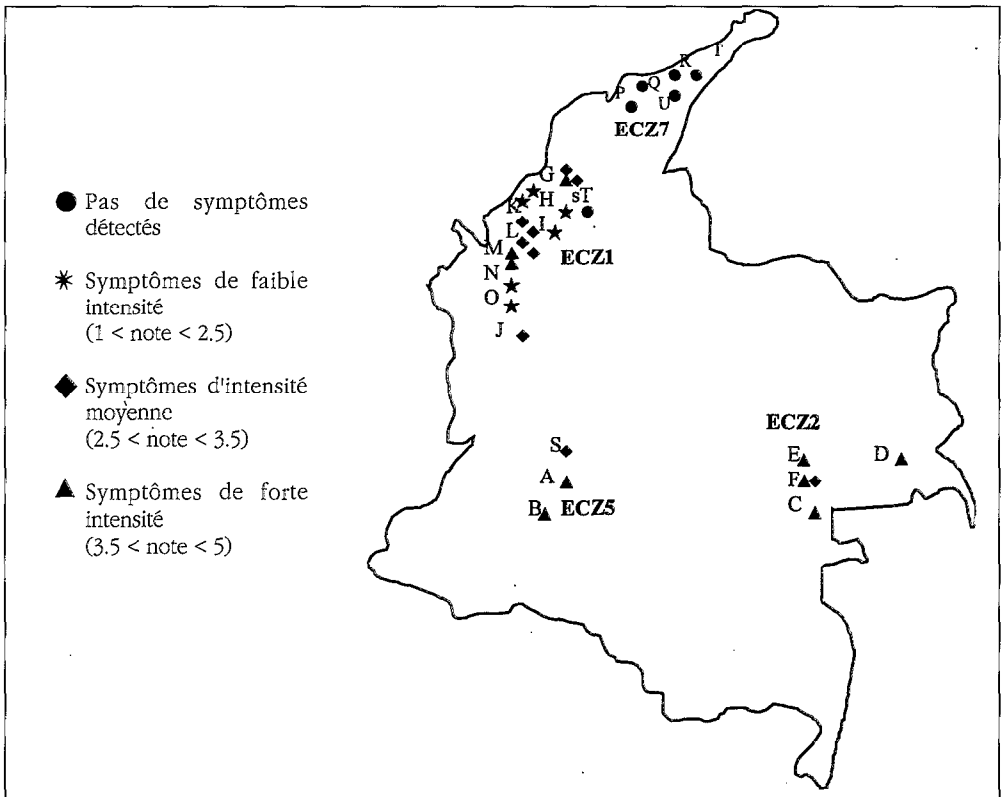


Figure 5 - Intensité des symptômes de la bactériose vasculaire dans les différentes zones écologiques. A à U : sites visités (se référer au tableau 2).

Discussion

L'étude présentée ici révèle la forte présence de la maladie en Colombie dans trois zones écologiques. Dans la zone 1, différents facteurs peuvent expliquer l'incidence de la maladie : le climat est très favorable à la bactériose (alternance de saison sèche et pluvieuse, humidité maximale, écart de températures diurne et nocturne important), la présence du pathogène y est ancienne, la culture du manioc y est intensive. La faible disponibilité en matériel végétal explique les nombreux échanges de boutures entre paysans. La sélection variétale et la multiplication se font dans quelques stations expérimentales où la maladie est présente mais avec une pression d'inoculum très faible (par exemple Carmen de Bolivar). Comme le signalent Boher et Agbobli (1992), certaines variétés sélectionnées expriment peu de symptômes et échappent ainsi au contrôle sanitaire visuel. Ces mêmes variétés peuvent par la suite, constituer un foyer d'inoculum important.

facteurs favorables :
climat, multiplication
végétale

Notre étude met en évidence la diversité existant parmi les souches de l'agent pathogène. Celle-ci est liée à la diversité génétique de l'hôte et varie en fonction de l'écozone où le manioc est cultivé. Vingt-six groupes de souches différents (ou haplotypes) ont pu être mis en évidence en Colombie et à chaque zone écologique correspond un groupe d'haplotypes particulier.

diversité de l'agent
pathogène

La présence de souches de même haplotype dans différentes localités d'une même zone écologique est la conséquence directe des échanges de matériel végétal contaminé. Ces échanges sont pratiquement inexistantes entre les quatre zones écologiques, conséquence des barrières physiques naturelles (Cordillères), des conditions de culture et des variétés de manioc cultivées très différentes.

Dans la zone écologique 5, l'incidence de la maladie est très importante et les informations génétiques que nous avons sur le parasite, suggèrent l'existence d'une population clonale. L'ECZ 5 est une région de haute altitude, isolée par la cordillère occidentale, et contrairement aux autres zones écologiques, on y cultive un nombre très limité de variétés de manioc avec une base génétique étroite. La variété locale communément cultivée est l'Algodona. La culture extensive du manioc y est relativement récente (12 ans) de même que l'apparition de la maladie.

Dans les autres zones écologiques (1 et 2), la diversité du pathogène peut s'expliquer par la forte pression exercée par

l'hôte (plus grand nombre de variétés cultivées et présence d'autres espèces de *Manihot*), l'existence ancienne de la maladie, le mouvement important du matériel végétal contaminé.

agressivité variable

La plupart des souches de *Xam* sont très agressives mais on détecte une variation dans le pouvoir pathogène des souches. Celle-ci n'est pas corrélée à la variabilité génétique des souches. Cependant nos tests de pouvoir pathogène n'ont été effectués que sur la variété sensible McoI 1522. L'existence d'une interaction différentielle entre souches de *Xam* et variétés de manioc (races) n'est pas connue chez *Xam* (Boher et Agboblí, 1992), mais n'a jamais fait l'objet d'une étude approfondie. Une telle étude suppose de choisir une gamme de souches représentative de la diversité connue chez *Xam* et de les inoculer sur un nombre important de génotypes de manioc d'origines différentes. Les connaissances acquises sur la génétique du parasite représentent une aide précieuse dans le choix des souches devant constituer cette gamme. En Colombie, par exemple, les 26 souches représentatives chacune des 26 groupes caractérisés, sont inoculées sur 60 variétés sélectionnées par le CIAT.

24

lutte chimique peu
efficace

mais contrôle sanitaire
et pratiques culturales
spécifiques,
satisfaisantes

Les études développées actuellement et qui font appel à la connaissance de la génétique tant de l'agent pathogène que de l'hôte, n'excluent pas une approche pratique sur le terrain. Si la lutte chimique (application foliaire) et le contrôle biologique (utilisation d'antagonistes) ne donnent pas de résultats satisfaisants, des méthodes simples telles que la production de matériel végétal sous contrôle sanitaire rigoureux, la modification des pratiques culturales, la fertilisation potassique, permettent de réduire significativement l'incidence de cette maladie (Lozano, 1986 ; Boher, et Verdier, 1994). L'utilisation de variétés résistantes reste cependant une alternative efficace dans la lutte contre la maladie.

une amélioration
variétales inadaptée

En Colombie, des variétés nouvelles ont été diffusées en milieu paysan mais souvent l'adoption n'a pas été celle espérée. Plusieurs facteurs sont en cause : une vulgarisation insuffisante, une faible disponibilité en boutures, une inadéquation des variétés à la demande locale, un fort attachement des paysans aux variétés traditionnelles, et enfin la faible résistance aux insectes et aux maladies de ces nouvelles variétés (Michel, 1996). La recherche pour l'amélioration variétale doit prendre une forme plus participative. Une collaboration directe entre les chercheurs et les producteurs de manioc est indispensable pour répondre à l'attente du paysan et du consommateur.

Conclusion

Actuellement si les réactions de défense du manioc à l'infection par le parasite sont en partie connues (Kpémoua et al., 1996) beaucoup restent à faire dans la recherche et la caractérisation de gène(s) de résistance. La carte génétique du manioc a été construite (Fregene et al., 1994) et sert de base à la recherche de marqueurs liés à la résistance à la bactériose. Nous espérons à court terme, pouvoir caractériser sur un ou des chromosomes, le(s) gène(s) impliqué(s) dans la résistance à la bactériose. Le recours aux techniques de biotechnologies comme, par exemple la transformation génétique, peut permettre l'obtention rapide d'un nouveau matériel végétal (Li et al., 1996, Schopke et al., 1996). L'introduction de gènes d'intérêt agronomique, par les techniques de biotechnologie pourrait être une voie d'avenir conditionnée cependant par les problèmes de régénération et surtout par l'acceptation de l'utilisation de plantes transgéniques.

Bibliographie

- BERTHIER Y.D., VERDIER V., GUESDON J.L., CHEVRIER D., DENIS J.B., DECOUX G., LEMATTRE.M., 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by RRNA gene restriction patterns. Applied and Environmental Microbiology, n°59, pp. 851-859.
- BOHER B., AGBOBLI C.A., 1992. La bactériose vasculaire du manioc au Togo : caractérisation du parasite, répartition géographique et sensibilité variétale. L'Agronomie Tropicale n°46, pp. 131-136.
- BOHER B., VERDIER V., 1994. Cassava Bacterial Blight in Africa: the state of knowledge and implications for designing control strategies. African Crop Science, Vol 2, n°4, pp. 1-5.
- DANIEL J.F., BOHER B., KOHLER F., 1981. Les maladies bactériennes du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en République Populaire du Congo et en République Centrafricaine. Agronomie, n° 1, pp. 751-758.
- FREGENE M., ANGEL F., GOMEZ R., RODRIGUEZ F., MAYA M., BONIERBALE M., TOHME J., IGLIASIAS C., ROCA. W., 1994. A linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on RFLP and RAPD markers. In Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting on the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia, Vol 1, pp. 49-61.
- GROUSSON F., PAGES J., BOHER. B., 1990. Etude de la variabilité d'un agent pathogène, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, par l'analyse factorielle multiple. Agronomie, n°4, pp. 627-640.
- KPÉMOUA K., BOHER B., NICOLE M., CALATAYUD P., GEIGER. J.P., 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Canadian Journal of Microbiology, n° 42, pp. 1131-1143.
- IL H., SAUTTER C., POTRYKUS I., PUONTI-KAERLAS J., 1996. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Nature Biotechnology, n°14, pp. 736-740.
- LOZANO J.C., 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. Plant Disease, n° 70, pp. 1089-1093.

- LOZANO J.C., SEQUELRA L., 1974. Bacterial blight of cassava in Colombia: Etiology. *Phytopathology*, n°64, pp. 74-82.
- MARAITE H., WEYNS J., YINKWAN O., LIPEMBRA P., PERREAUX D., 1981. Physiological and pathogenic variations in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. In Proceedings of the 5th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Cali, Colombie, pp. 358-368.
- MICHEL C., 1996. Etude de l'adoption et de l'impact de trois nouvelles variétés de manioc dans la région Caraïbe. Mémoire de fin d'études, CNEARC, Montpellier, pp 1-19.
- SCHOPKE S., TAYLOR N., CARCAMO R., KONAN K., MARMAY P., HENSHAW G., BEACHY R., FAUQUET C., 1996. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. *Nature Biotechnology*, n°14, pp. 731-735.
- VERDIER V., DONGO P., BOHER B., 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Journal of General Microbiology*, n° 139, pp. 2591-2601.
- VERDIER V., BOHER B., MARAITE H., GEIGER J. P., 1994. Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 60, n°12, pp. 4478-4486.

Résumé

Le manioc est une culture importante en Colombie puisqu'elle couvre environ 196 000 ha. L'un des facteurs limitants de la production est une maladie causée par une bactérie : *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). La distribution géographique de la maladie et son incidence sont précisées dans les différentes zones écologiques de la Colombie. Les souches de cette bactérie collectées dans trois zones ont été caractérisées selon une

approche moléculaire, leur agressivité étant évaluée sur la plante. Vingt-six groupes de souches de *Xam* ont pu être définis et leur répartition dans les 3 zones écologiques analysée. Dans une zone de haute altitude, la variabilité de l'agent pathogène est très faible. L'impact de cette étude pour l'amélioration variétale vis-à-vis de la résistance à la bactériose est discuté. Les perspectives d'étude sur les gènes de résistance sont également abordés.