



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Importance et distribution de *Macrophomina phaseolina* associé aux semences de niébé au Burkina Faso- caractérisation préliminaire des isolats du champignon

Manan Djamila BAIKORO^{1,2*}, Pawindé Elisabeth ZIDA², Moustapha KOALA², Wendoléan Romain SOALLA², Bouma James NEYA² et Marie Laure GUISSOU¹

¹ Laboratoire Sciences de la Vie et de la Terre, Université Norbert Zongo; B.P: 376, Koudougou, Burkina Faso.

² Laboratoire de Phytopathologie et Biotechnologies Végétales, Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles/CNRST; 01 B.P: 476, Ouagadougou, Burkina Faso.

*Auteur correspondant; E-mail: djamilabaikoro@gmail.com; Tel.: (+226) 73 47 53 13.

Received: 11-03-2023

Accepted: 12-06-2023

Published: 30-06-2023

RESUME

Le niébé, (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), principale légumineuse cultivée au Burkina Faso, est attaqué par plusieurs agents pathogènes dont les champignons. Parmi ces champignons, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich est responsable de la pourriture charbonneuse qui cause d'importantes pertes de production de 80 à 100%. Ces pertes pourraient être considérablement réduites à travers l'utilisation de variétés résistantes à la maladie. L'objectif de l'étude était de contribuer au renforcement des connaissances de l'agent pathogène de la pourriture charbonneuse du niébé pour une meilleure gestion de la maladie au Burkina Faso. A cet effet, une analyse sanitaire des semences, utilisant la méthode du papier buvard a été effectuée sur 27 échantillons de semences collectés dans 14 localités réparties dans les deux principales zones climatiques de production du niébé. La plupart des échantillons de semences collectés (96,30%) étaient infectés par *M. phaseolina*. Le champignon a été retrouvé dans les semences à des taux moyens d'infection de 35,25% dans la zone Soudanienne et 27,86% dans la zone Soudano-Sahélienne. Une caractérisation moléculaire préliminaire réalisée sur 51 isolats de *Macrophomina* a permis d'identifier *M. phaseolina* comme la principale espèce présente dans les semences de niébé dans les deux zones étudiées.

© 2023 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: zones climatiques, pourriture charbonneuse, taux d'infection des semences, champignons, *Vigna unguiculata*, diversité.

Prevalence of Cowpea Charcoal Rot and Molecular Identification of Three *Macrophomina* Species in the Sudanian and Sudano-Sahelian Zones of Burkina Faso

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), the main legume crop cultivated in Burkina Faso, is attacked by several pathogens, including fungi. Among these fungi, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich is responsible for charcoal rot and leads to significant production losses ranging from 80 to 100%. These losses

© 2023 International Formulae Group. All rights reserved.

9385-IJBCS

DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v17i4.14>

could be significantly reduced through the use of disease-resistant varieties. The objective of the study was to contribute to the strengthening of knowledge of the causal agent of cowpea charcoal rot for better management of the disease in Burkina Faso. For this purpose, a seed health analysis, using the blotter paper method. A sanitary analysis was carried out on 27 seed samples collected from 14 localities distributed in the two main climatic zones of cowpea production. Most of the seed samples collected (96.30%) were infected with *M. phaseolina*. The fungus was found in seeds at average infection rates of 35.25% in the Sudanian zone and 27.86% in the Sudano-Sahelian zone. A preliminary molecular characterization of 51 isolates of *Macrophomina* lead to identify *M. phaseolina* as the main species present in cowpea seeds in the two targeted areas.

© 2023 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: climatic zones, charcoal rot, seed infection rate, fungi, *Vigna unguiculata*, diversity.

INTRODUCTION

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.), plante de la famille des légumineuses est d'origine africaine ou asiatique selon la source (Bengaly, 2010). La production de niébé en Afrique occidentale représente 85% de la production mondiale qui est estimée à plus de 8,99 millions de tonnes pour une superficie de 14,91 millions d'hectares (FAOSTAT, 2021). Le Nigeria, le Niger et le Burkina Faso constituent les principaux bassins de production de cette légumineuse (Soule et Gansari, 2010). Au Burkina Faso, le niébé est cultivé dans toutes les zones agroécologiques (Ouédraogo, 2003), participe à la sécurité alimentaire et financière du pays (Sawadogo, 2009). Les feuilles, les gousses immatures et les graines sont consommées par les populations car très riches en protéines, en calcium, en fer et en l'acide nicotinique (Diouf, 2011). Le fourrage, les produits et sous-produits du niébé sont utilisés dans l'alimentation de certains animaux (Sana et al., 2020 ; Ouattara et al., 2014).

Le niébé présente également plusieurs avantages économiques, social et environnemental où il joue un rôle important dans la gestion durable de la fertilité du sol (Coulibaly et al., 2023). En rotation, le niébé permet une amélioration de la nutrition minérale et la survie des cultures subséquentes (Konate et al., 2013). Malheureusement, la production du niébé est fortement limitée par des contraintes abiotiques et biotiques (Hartman et al., 2015). Parmi les nombreuses maladies du niébé, figure la pourriture charbonneuse ou pourriture cendrée ou encore

pourriture sèche. C'est une maladie d'origine fongique causée par *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich, pouvant occasionner des pertes de production atteignant 80 à 100% (Ndiaye, 2007). La pourriture charbonneuse infecte le niébé à presque tous les stades de croissance de la plante. Au Burkina Faso, le champignon a été signalé sur plusieurs autres cultures telles que le mil, le sorgho, l'arachide, le voandzou, le niébé, le maïs, le gombo (Mathur et Manandhar, 2003 ; Zida et al., 2008 ; Ouoba et al., 2019). Cette maladie qui était récemment considérée comme mineure sur le niébé au Nigeria, au Niger, au Sénégal, au Mali et au Burkina Faso, occasionne, à l'heure actuelle, des dommages de plus en plus croissants dans le sahel. Pour Boland et al. (2004) et Van Der Putten et al. (2010), les conditions climatiques ont une forte influence sur l'épidémiologie des maladies des cultures, la production, la survie de l'inoculum primaire et la dissémination des agents pathogènes.

Afin de mettre à la disposition du paysan sahélien une stratégie de gestion appropriée de cette pathologie, une bonne connaissance de l'importance de l'agent pathogène impliqué, sa distribution dans les principales zones de production du niébé et sa diversité sont indispensables. A ce jour, cinq espèces de *Macrophomina* à savoir *M. phaseolina* (Tassi G.), *M. pseudophaseolina* (Sarr M.P.), *M. euphorbiicola* (Machado A.R.), *M. vacini* (Zhao L.) et *M. tecta* (Poudel B.) associées à diverses cultures ont été distinguées dans le monde par analyse de séquence d'ADN. Toutefois, aucune étude moléculaire n'a été menée pour identifier les

espèces de *Macrophomina* présentes sur le niébé au Burkina Faso. L'objectif principal de l'étude était de contribuer au renforcement des connaissances de l'agent pathogène pour une meilleure gestion de la maladie.

MATERIEL ET METHODES

Prévalence de la maladie dans les zones Soudanienne et Soudano-Sahélienne

Collecte et conservation des échantillons de semences

Des échantillons de semences de niébé produites en 2020, ont été collectés dans les deux principales zones de culture du niébé du Burkina Faso pour l'étude. La taille des échantillons de semences collectés a varié de 250 à 500 g dans chaque site selon la disponibilité de semences. Chaque échantillon étiqueté (lot de semences, numéro échantillon, localité, variété, année de production) a été placé dans un petit sac en plastique doublé d'un second sachet.

Les semences ainsi obtenues ont été conservées au congélateur afin d'éviter la prolifération des insectes jusqu'à leur utilisation. Pour l'étude chaque échantillon de semences a été divisé en deux ou en quatre parties égales à l'aide d'un diviseur automatique (Broemer divider) suivant sa taille.

Analyse sanitaire des échantillons collectés

La méthode standard du papier buvard a été utilisée pour détecter *M. phaseolina*, capable de se développer sur les semences en présence d'humidité. A cet effet, 400 graines pures de chaque échantillon ont été disposées dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) contenant 4 couches de papier buvard humidifié, à raison de 10 graines par boîte. Les boîtes ont été placées dans une chambre à une température de 20-25°C, sous des cycles d'éclairages alternatifs de 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière proche ultraviolette par jour, pendant 7 jours. Chaque échantillon a été analysé suivant un dispositif blocs randomisés à 4 répétitions, soit 100 graines par répétition. L'identification de *M. phaseolina* sur les graines a été confirmée par un examen du mycélium et des conidies au microscope et en se référant au manuel d'identification des champignons de Mathur et

Kongsdal (2003). *M. phaseolina* présent sur chaque graine a été noté et le pourcentage de graines infectées a été calculé pour chaque échantillon de semences. Dans chaque zone agroécologique, le taux de prévalence ou pourcentage d'échantillons de semences contaminées par le champignon a été également calculé.

Identification moléculaire des espèces de *Macrophomina*

Isolement de *M. phaseolina* et production de monospores

Les isolats de *Macrophomina* ont été collectés sur chaque échantillon de semences. Ainsi, à l'aide d'une pince, des pycnides du champignon (organes de fructification du champignon) ont été prélevées aseptiquement sur des graines incubées infectées puis écrasées dans de l'eau stérile contenue dans un tube Eppendorf. Pour chaque isolat (ou isolat-mère), deux gouttes de suspension conidienne contenant environ 100 spores/ml de suspension, ont été étalées sur un milieu Agar contenu dans une boîte de Pétri et incubées à la température du laboratoire. Un à deux jours après l'ensemencement, cinq spores en germination (monospores) ont été transférées individuellement dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA et laissées en croissance. Trois monospores ont été produites par isolat-mère. Au total 51 isolats monospores ont été retenus pour l'extraction d'ADN.

Préparation de mycélium et extraction de l'ADN

La culture du mycélium a été faite dans du milieu liquide Potato Dextrose Broth (PDB). Un explant mycélien de chaque isolat monospore en culture sur le milieu PDA et âgé de 7 jours a été prélevé aseptiquement et déposé dans le milieu PDB contenu dans un erlenmeyer. Pour stimuler le développement du mycélium des champignons dans le milieu liquide, les erlenmeyers ont été placés en incubation sur un oscillateur à la vitesse de 120 oscillations par minute, à la température ambiante du laboratoire, pendant deux jours. Après avoir retiré les explants mycéliens de l'erlenmeyer, le mycélium obtenu a été recueilli par filtrage à l'aide d'une pompe à vide et mis à sécher à l'étuve à 25°C pendant 4 jours.

L'ADN a été extrait selon la méthode de Abu Almakarem et al., (2012) avec quelques modifications. Le mycélium fongique contenu dans chaque tube Eppendorf a été broyé en présence de billes et à l'aide d'un tissu lyser, pendant une minute. Un volume de 600 µl de solution de Cetyl Triméthyl Ammonium Bromide (CTAB) constituée de 1,4 M NaCl 2% (w/v) ; CTAB ; 0,1 M Tri-Base pH8 et 0,02 M EDTA pH8, a été ajouté au mycélium broyé, puis les tubes ont été placés sur un vortex afin d'obtenir un mélange homogène. Les tubes ont été placés au bain marie pour incubation à 65°C pendant 30 minutes. Un volume de 450 µl de chloroforme a été ajouté dans chaque tube puis mélangé par inversion des tubes jusqu'à obtenir un contenu laiteux. Après avoir centrifugé le mélange à 13000 g pendant 5 minutes à 25°C, le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube de 2 ml. Après avoir ajouté 400 µl de chloroforme au surnageant, les tubes ont été de nouveau centrifugés à 13000 g pendant 5 minutes à 25°C. Le surnageant a encore été transféré dans un nouveau tube de 1,5 ml et 0,7 volume d'isopropanol a été ajouté à la solution afin de précipiter l'ADN. Une nouvelle centrifugation à 13000 g à 25°C pendant 10 minutes a permis d'obtenir un culot d'ADN au fond de chaque tube. Le culot a été rincé avec 500 µl d'éthanol à 70%, centrifugé à 13000 g pendant 3 minutes à 25°C puis rincé à deux reprises. Le culot a été séché puis l'ADN dissous dans 50 µl d'eau distillée stérile, a été conservé au congélateur à -20°C.

Dosage et amplification de l'ADN, séquençage des produits PCR et analyse des séquences

Les concentrations et la pureté des ADNs issus de l'extraction ont été quantifiés à l'aide du NANODROP (2000). Les concentrations initiales ont ensuite été diluées dans de l'eau stérile au cas par cas pour obtenir une concentration de travail convenable. Trois (3) couples d'amorces spécifiques dont deux pour amplifier la région du facteur d'élongation de la traduction 1- α ou TEF-1 α et un pour amplifier la région conservée et adjacente du gène 5.8S de l'ARN ribosomique (ARNr 5,8S) ont été utilisés. Il s'agit des couples d'amorces MeTefF/MeTefR, spécifique à *M. euphorbiicola*; MpKF1/MpKR1, spécifique à

M. phaseolina; MsTefF/MsTefR, spécifique à *M. pseudophaseolina* (Babu et al., 2007; Santos et al., 2020).

La réaction d'amplification a été réalisée selon le programme suivant : un cycle de dénaturation à -95°C pendant 12 minutes suivi de 35 cycles consécutifs (une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation à 58°C pendant 30 secondes, une élongation à 72°C pendant 1 minute et une élongation de 5 minutes). L'électrophorèse a été effectuée sur un gel d'agarose à 1%, sous une tension de 120 V pendant 20 minutes. Les produits d'amplification ont été visualisés sous une transilluminateur UV, préalablement colorés au bromure d'éthidium. Pour les échantillons testés positifs les produits d'amplification ont été envoyés à MacroGen Europe B.V. pour le séquençage par la technique de Sanger. Les couples d'amorce MeTefF/MeTefR et MpKF1/MpKR1 ont été utilisés pour le séquençage des produits PCR.

Lorsque le séquençage a été réalisé, les produits de séquençage sous forme de contigs ont été assemblés à l'aide du logiciel Seqman afin de déterminer les séquences entières du gène de la protéine de capsid. Ces séquences ont été ensuite traduites à l'aide du logiciel EditSeq et alignées sous Megalign. Ces programmes de bio-informatique font partis du paquetage

Lasergene de DNASTAR® v10.0. Les séquences entières obtenues ont été alignées avec l'algorithme CLUSTALW (Thompson et al., 1994) du programme Megalign inclus dans le logiciel Lasergene v10.0 (DNASTAR).

Analyse statistique et expression des résultats

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System, 2001). La séparation des taux moyens de prévalence de *M. phaseolina* dans les échantillons de semences et des taux moyens de semences infectées ont été effectués par le test de Duncan (Duncan's Multiple Range Test). Pour chaque échantillon de semences évalué, le taux moyen de semences infectées par *M. phaseolina* a été exprimé en pourcentage du nombre de graines attaquées

par le champignon sur un total de 400 graines de l'échantillon considéré.

La prévalence de *M. phaseolina* dans les échantillons de semences a été exprimée en pourcentage du nombre d'échantillons de semences infectés par le champignon sur le nombre total d'échantillons de semences évalués.

La prévalence *M. phaseolina* dans une zone agro écologique donnée a été exprimée en pourcentage du nombre d'échantillons infectés provenant de ladite zone par le champignon sur le nombre total d'échantillons de semences collectés dans ladite zone.

Le taux moyen de semences infectées par *M. phaseolina* dans une zone agro écologique donnée a été exprimé en pourcentage et correspond à la moyenne des taux d'infection des semences des échantillons provenant de ladite zone par le champignon.

Le taux moyen de semences infectées par *M. phaseolina* dans une localité donnée a été exprimé en pourcentage et correspond à la moyenne des taux d'infection des semences des échantillons provenant de ladite localité par le champignon.

Le taux moyen de semences infectées par *M. phaseolina* d'une variété de niébé donnée a été exprimé en pourcentage et correspond à la moyenne des taux d'infection des semences des échantillons de la même variété par le champignon.

RESULTATS

Prévalence de la pourriture charbonneuse **Résultats de la collecte des échantillons de semences**

Au total, 27 échantillons de semences issus de huit variétés de niébé dont six améliorées (Komcallé, Tiligré, Nafi, Yiis-Yandé, Niwzè, Gourgou) et deux variétés locales purifiées (Pobé local, Moussa local), ont été collectés dans 14 localités du Burkina Faso, réparties dans les zones climatiques Soudanienne et Soudano-Sahélienne (Figure 1). Ces variétés de niébé dans leur majorité figurent parmi les variétés améliorées préférées par les producteurs et font l'objet de production de semences de base par l'Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA). Parmi les échantillons de semences

collectées, 22 échantillons (soit 81,48%) proviennent de 11 sites situés dans la zone climatique Soudano-Sahélienne et 5 échantillons (soit 20,83%) proviennent de trois villages situés dans la zone Soudanienne. On note que la grande majorité des échantillons de semences de niébé (81,48%) proviennent de la zone climatique Soudano-Sahélienne tandis que dans la zone Soudanienne le nombre est relativement faible.

Prévalence de *M. phaseolina* et niveaux d'infection des semences

L'examen visuel des semences incubées a permis de détecter *M. phaseolina* dans 26 des 27 échantillons (soit 96,30%) (Figure 2). Parmi les échantillons contaminés, le pourcentage de graines hébergeant ce champignon a varié de 3,75 à 75,75 (Tableau 1). Parmi ces échantillons, quatre (Kamboinsen-Kom, môgtédo-Yiis Yandé, Kombissiri-Kom, -Dédougou Til) ont enregistré de faibles taux d'infection (<10%), sept ont enregistré entre 10 et 20% de taux d'infection pendant que les seize autres enfin ont présenté des taux d'attaque élevés allant de 20 à 75,75%.

M. phaseolina a été recensé dans les deux zones d'étude sans distinction aucune entre les zones (95,45-100% des échantillons contaminés) (Tableau 2). On note cependant que les niveaux d'infection des semences par *M. phaseolina* étaient variables et plus élevés dans la zone Soudano-Sahélienne (35,25% de semences attaquées) que dans la zone Soudanienne (27,86% de semences attaquées) (Tableau 2).

Suivant les variétés, les taux d'infection par *M. phaseolina* étaient également variables ($p < 0,0001$). La variété Nafi, avec 75,75% de taux d'infection, a été significativement plus contaminée, suivie de la variété Niwzè (46%) qui était également plus infectée que les variétés Moussa locale (21%), Komcallé (20,33%) et Yiis-Yandé (3,75%) (Tableau 3).

Les taux de contamination des semences par *M. phaseolina* étaient variables suivant les sites de production des semences (Figure 3). Le taux le plus élevé (49,25%) avait été enregistré dans le site de Farakoba et le taux le plus bas (3,75%), dans le site de Môgtédo.

Identification moléculaire

Résultats d'amplification des espèces de *Macrophomina* par l'utilisation d'amorces spécifiques

Nos résultats, en partie illustrés à la Figure 4 après amplification avec les amorces universelles (ITS1/ITS4) pour l'identification du genre *Macrophomina* ont montré des bandes d'ADNs d'environ 500 pb. Les réactions ont été caractérisées par l'obtention de bandes d'amplification de forte intensité et avec une quasi-absence de bandes parasites pour tous les échantillons.

L'ensemble des 51 isolats ont été testés individuellement par utilisation d'amorces spécifiques pour l'identification de *M. phaseolina*, *M. euphorbiicola* et *M. pseudophaseolina* (Tableau 4). Sur un total de 51 isolats testés, 20 isolats ont été testés positifs pour l'identification spécifique de *M. phaseolina* (Figure 5a). Pour l'identification de l'espèce *M. euphorbiicola*, seulement 4 isolats ont été testés positifs sur 51 isolats testés (Figure 5b). Aucun isolat n'a pu être testé positif pour l'amplification de l'espèce *M. pseudophaseolina*.

Analyse des séquences nucléotidiques et protéiques

Sur un total de 24 séquences obtenues, 2 espèces de *Macrophomina* étaient recherchées : il s'agissait des espèces *M. phaseolina* et *M. euphorbiicola*. Dans le but de connaître l'identité précise de ces isolats, une analyse bioinformatique des fragments de séquençage a été nécessaire. L'analyse BLASTn (NCBI) des différentes séquences a montré une homologie très proche de *M. phaseolina* de 18 séquences d'isolats, c'est-à-dire une similarité moyenne de 99% avec les séquences de référence déposées dans la banque de gènes. Par contre, pour les séquences des isolats dans lesquelles *M. euphorbiicola* était recherché, les analyses n'ont révélées aucune correspondance avec les séquences de référence déposées dans la banque de gènes.

Nous avons retenu 278 nucléotides compte tenu de la qualité moyenne des différentes séquences obtenues. L'alignement

de nos séquences avec des séquences de GenBank a révélé diverses régions conservées et variables dans les séquences de *M. Phaseolina*. Parmi les régions conservées, la région 5.8S ribosomale était hautement conservée et identiques aux séquences des isolats de GenBank avec lesquelles elles avaient été comparées. Par contre, dans les régions ITS1 et ITS2, des variabilités ont été observées.

Pour l'ITS1, les analyses ont porté sur 21 derniers nucléotides de l'extrémité 3'adjacents au gène de l'ARNr 5.8S. L'alignement de nos séquences avec quelques séquences de la base de données Genbank (AF132795, DQ359739, KF951710, KF951705, KF951723, KF951711, KF951712, KF951642, KF951644, KFF951647) a révélé une variabilité dans les positions 161 et 173 pour certains de nos isolats (BD1, BD2, BD3 ; BD6, BD7, BD13, BD15, BD17, BD19, BD20). Ces variations ont lieu au niveau du premier codon entraînant des changements d'acides aminés observées au niveau des séquences d'acides aminés. Par contre ; les séquences des isolats (BD4, BD5, BD8, BD9, BD10, BD11, BD12, BD13, BD14, BD16, BD18) se sont révélées identiques aux séquences de la base de données pour ses mêmes positions (Figure 6).

Pour l'ITS2, nous avons considéré les 100 premiers nucléotides à partir de l'extrémité 5'. L'alignement de nos séquences avec quelques séquences de Genbank a révélé une homologie parfaite avec quatre séquences de Genbank dont 2 séquences du Sénégal et 2 séquences de l'Inde dont les numéros d'accessions correspondent à KF951644, KF951647, AF132795, DQ359739, respectivement. Par ailleurs, la comparaison a révélé une forte variabilité entre nos séquences et quelques séquences d'isolats (KF951642, KF951710, KF951705, KF951711, KF951712, KF951723) de l'Afrique de l'Ouest de la base de données Genbank. Au total 50 sites variables entre la position 36 et la position 100 pour ce qui concerne les séquences nucléotidiques (Figure 7). Ces variations ont entraîné des changements d'acides aminés au niveau des séquences d'acides aminés.

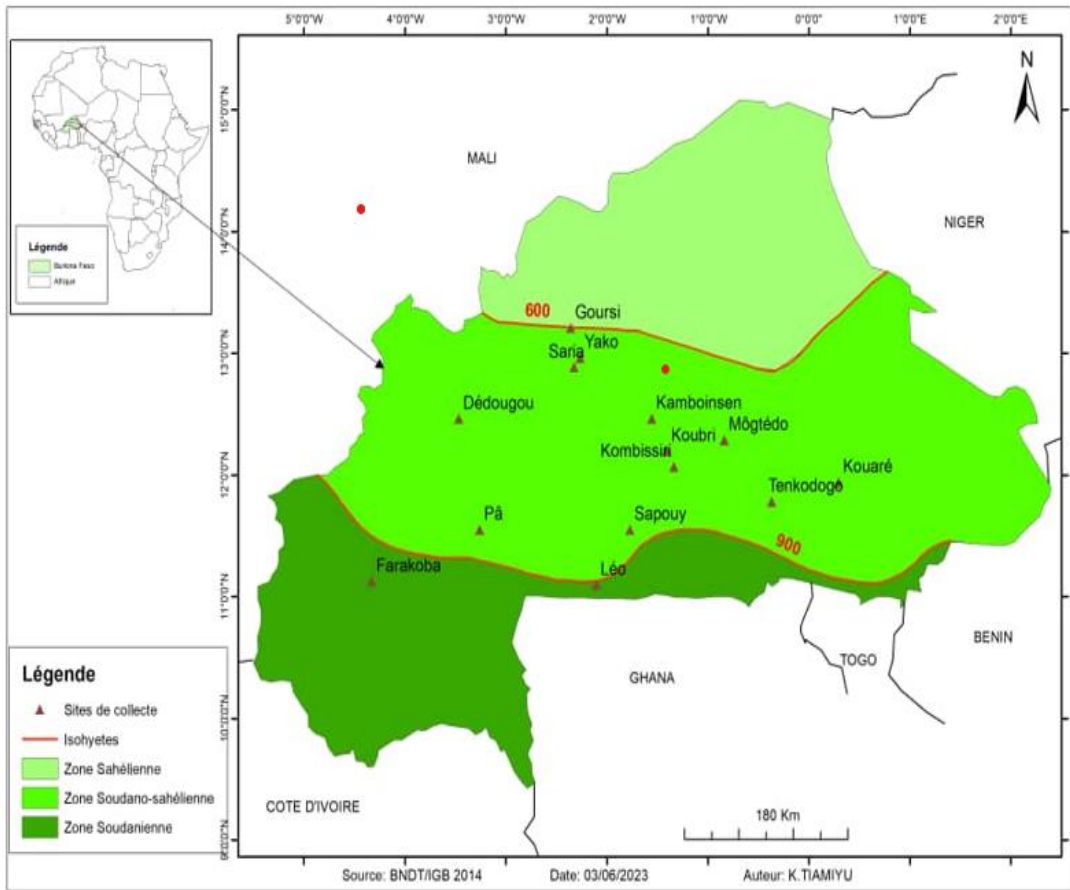


Figure 1 : Carte du Burkina Faso présentant la zone agroécologique et les différentes localités de collecte des échantillons utilisée dans l'étude.



Figure 2: Semences de niébé incubées montrant des infections de *Macrophomina* (coloration noirâtre des graines).

Tableau 1: Taux d'infection des semences par *M. phaseolina*, de 27 échantillons de semences de niébé du Burkina Faso.

Echantillons de semences	Variété de niébé	Taux moyens de semences infectées par <i>M. phaseolina</i> (%)
Kouaré-Nafi	Nafi	75,75 ^A
Farakoba-Til	Tiligré	68,50 ^B
Kamboinsen-Til	Tiligré	65,00 ^B
Saria-Gourg	Gourgou	61,75 ^{BC}
Goursi-Til	Tiligré	55,25 ^C
Kamboinsen-Niiz	Niizwè	46,00 ^D
Pâ-Kom	Komcallé	40,25 ^{DE}
Saria-Til	Tiligré	36,75 ^{EF}
Dédougou -Kom	Komcallé	36,00 ^{EF}
Kamboinsen-Pobé Loc	Pobé local	34,00 ^{EF}
Livara1-Kom	Komcallé	32,00 ^{EF}
Sapouy-Kom	Komcallé	30,25 ^{EFG}
Farakoba -Kom	Komcallé	29,75 ^{EFG}
Yako-Til	Tiligré	26,50 ^{FG}
Kamboinsen-Mous Loc	Moussa local	21,00 ^{GH}
Kouaré-Kom	Komcallé	21,00 ^{GH}
Kouaré-Til	Tiligré	15,75 ^{HI}
Livara2-Kom	Komcallé	15,75 ^{HI}
Tenkodogo-Til	Tiligré	13,50 ^{HIJ}
Kamboinsen-Gourg	Gourgou	12,50 ^{HIJ}
Saria-Kom	Komcallé	11,25 ^{HIJ}
Goursi-Kom	Komcallé	10,50 ^{IJK}
Koubri-Kom	Komcallé	10,25 ^{IJK}
Dédougou -Til	Tiligré	9,25 ^{IJK}
Kombissiri-Kom	Komcallé	7,00 ^{IJK}
Môgtédo-Yiis-Yand	Yiis-Yandé	3,75 ^{JK}
Kamboinsen-Kom	Komcallé	0,00 ^K
p au seuil de 5%		< 0,0001

Kom : Komcallé ; Til : Tiligré ; Pobé Loc : Pobé Local ; Mous Loc : Moussa Local ; Gourg : Gourgou ; Niiz : Niizwè ; Yiis Yand : Yiis-Yandé

Tableau 2: Taux d'infection des semences de niébé par *M. phaseolina* dans deux zones climatiques du Burkina Faso.

Zones agro écologiques de production des semences	Nombre d'échantillons collectés	% d'échantillons infectés par <i>M. phaseolina</i>	Taux moyens de semences infectées par <i>M. phaseolina</i> (%)
Zone Soudanienne	5	100,00 ^A	35,25 ^A
Zone Soudano-Sahélienne	22	95,45 ^A	27,86 ^A
p au seuil de 5%	-	< 0,0001	0,1646

Tableau 3: Taux moyens de contamination des semences de différentes variétés de niébé par *M. phaseolina*.

Variétés de niébé	Nombre d'échantillons collectés	Taux moyens de semences infectées par <i>M. phaseolina</i> (%)
Nafi	1	75,75 ^A
Niizwè	1	46,00 ^B
Gourgou	2	37,13 ^{BC}
Tiligré	8	36,32 ^{BC}
Pobé Local	1	34,00 ^{BC}
Moussa local	1	21,00 ^{CD}
Komcallé	12	20,33 ^{CD}
Yiis-Yandé	1	3,75 ^D
p au seuil de 5%	-	< 0,0001

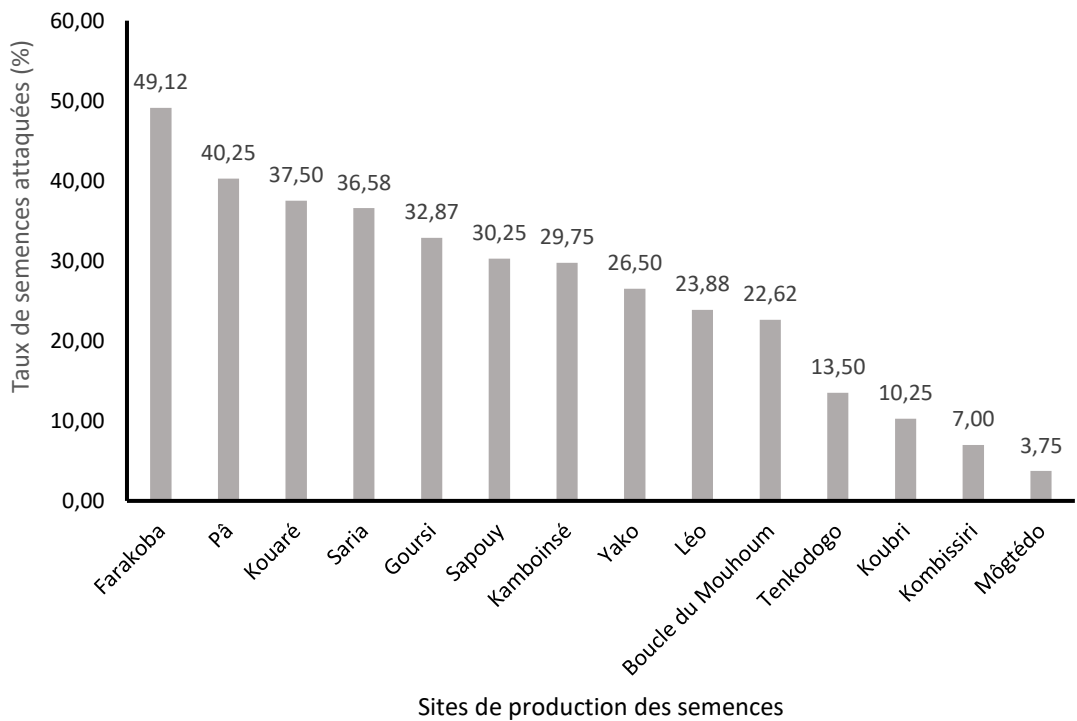


Figure 3: Indices d'infection des semences de niébé par *M. phaseolina* en fonction du site de production des semences.

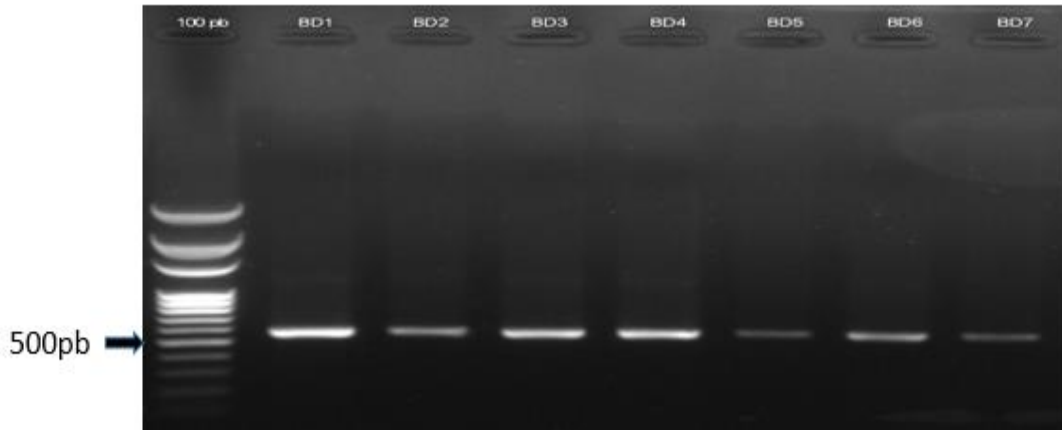


Figure 4: Quelques isolats de *M. phaseolina* testés avec les amorces ITS1/ITS4.

Tableau 4: Résultats d’amplifications avec les amorces spécifiques à *M. phaseolina* (MpKF1/MpKR1), *M. Euphorbiicola* (MetefF/MetefR) et *M. pseudophaseolina* (MstefF/MstefR).

Code Séquençage	Localité	Espèce	Résultats d’amplification		
			MpKF1/MpKR1	MeTefF/MeTefR	MsTefF/MsTefR
BD1	Saria	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD4	Saria	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD6	Saria	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD8	Saria	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD23	Saria	<i>M. euphorbiicola</i>	-	+	-
BD2	Kouaré	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD11	Kouaré	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD16	Kouaré	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD21	Kouaré	<i>M. euphorbiicola</i>	-	+	-
BD22	Kouaré	<i>M. euphorbiicola</i>	-	+	-
BD3	Tenkodogo	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD5	Koubri	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD7	Kamboinsen	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD15	Kamboinsen	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD9	Yako	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD12	Kombissiri	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD19	Môgtédo	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD10	Farakoba	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD14	Farakoba	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD20	Livara1= Léo	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD18	Livara2= Léo	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD13	Dédougou	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD17	Dédougou	<i>M. phaseolina</i>	+	-	-
BD24	Sapouy	<i>M. euphorbiicola</i>	-	+	-

+ : positif à l’amorce ; - : négatif à l’amorce

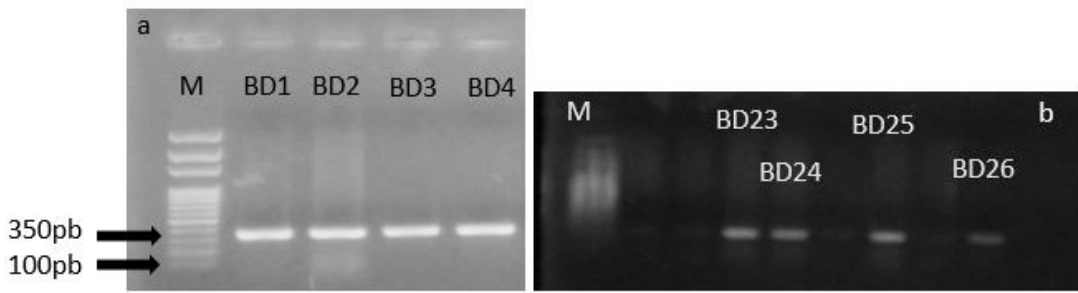


Figure 5: électrophorèse des produits d’amplification sur gel d’agarose de quelques isolats de *Macrophomina* appartenant à(a) *M. phaseolina* 350pb et à (b) *M. euphorbiicola* 217pb.

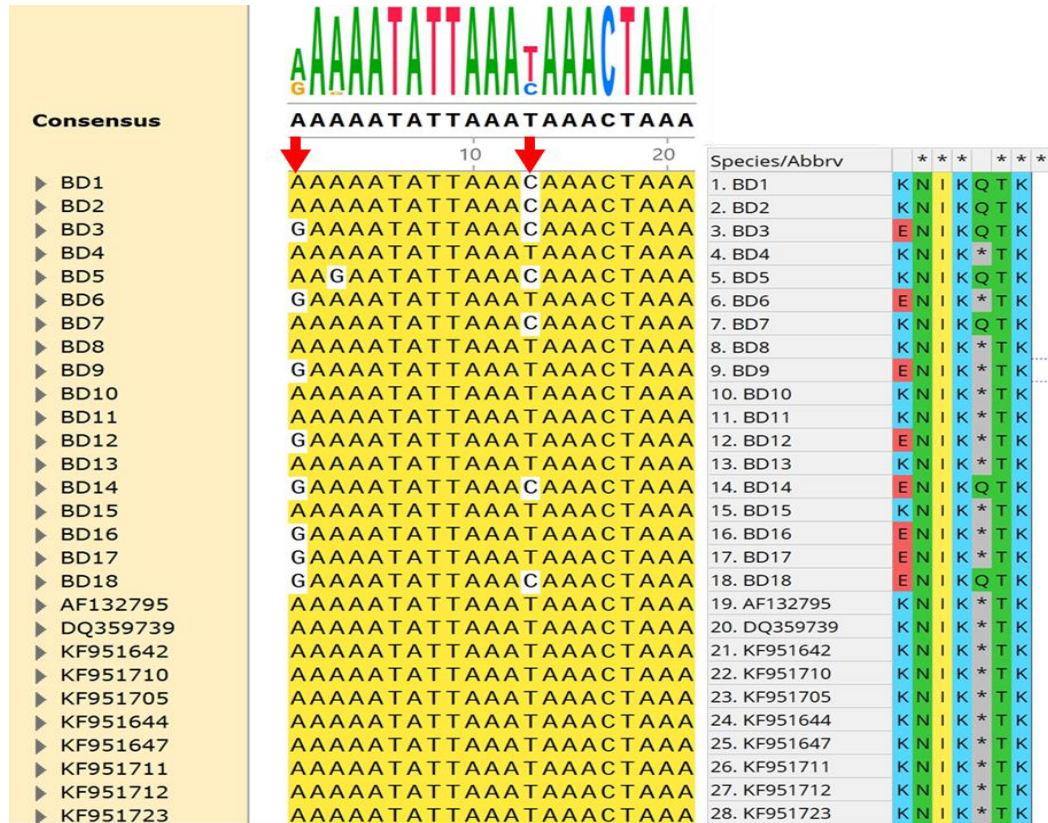


Figure 6: Alignement de la zone ITS1 de nos séquences et de séquences de référence provenant GenBank.

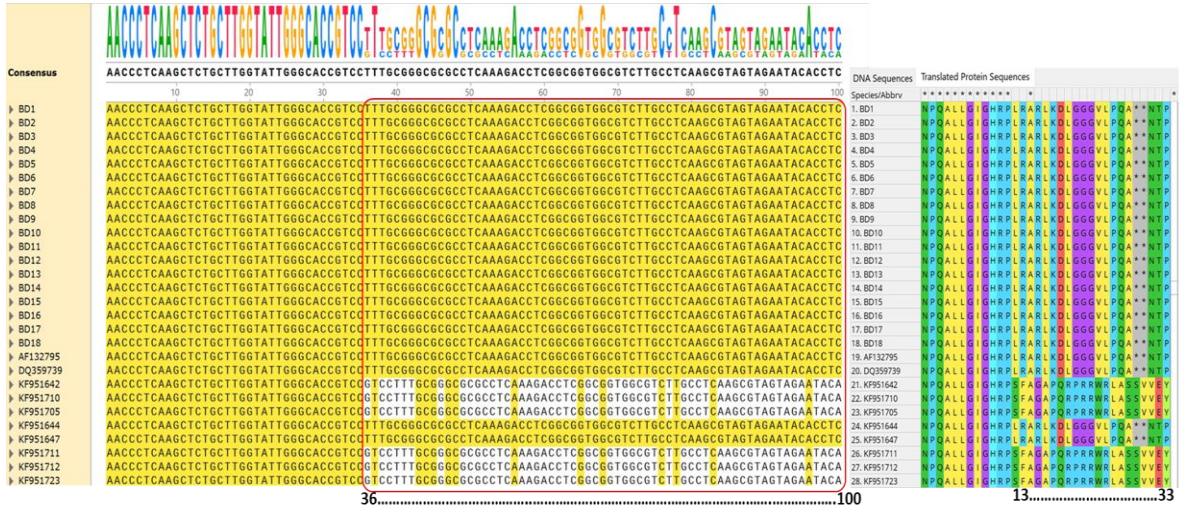


Figure 7: Alignement de la zone ITS2 de nos séquences et de séquences de référence provenant GenBank.

DISCUSSION

Le niébé est cultivé dans toutes les zones climatiques du Burkina Faso, à des proportions diverses. Les conditions pluviométriques et édaphiques dans la zone Soudano-Sahélienne se prêtent bien à la culture du niébé. En se référant aux statistiques agricoles disponibles (DGESS, 2020), les zones climatiques Soudanienne et Soudano-Sahélienne ont respectivement fourni 14,03 et 67,04% de la production nationale de niébé à la campagne 2019/2020. Plus de 2/3 de la production annuelle de niébé proviennent de la zone Soudano-Sahélienne. Aussi, un grand nombre d'échantillons de semences (22 échantillons) a pu être collecté dans cette zone, étant donné la disponibilité des semences. Quant à la zone Soudanienne, relativement plus humide, des cultures comme le coton, le maïs, le riz et l'igname y sont prioritaires au détriment du niébé. Dans cette partie du territoire, l'indisponibilité des semences pourrait justifier le faible nombre d'échantillons collectés (seulement 5 échantillons). Compte tenu de la crise sécuritaire, un nombre très faible d'échantillons (seulement 2 échantillons) a pu être collecté dans la zone sahélienne, ce qui a prévalu à la non considération de cette zone

dans l'étude. Toutefois, l'échantillonnage réalisé peut être considéré comme représentatif du territoire du fait que les échantillons proviennent des deux zones agroécologiques fournissant 91% de la production totale de niébé du pays. Ces échantillons de semences pourront être utilisés pour évaluer la présence ou non et la fréquence de *M. phaseolina* associé aux semences de niébé produites au Burkina Faso.

M. phaseolina est présent dans presque la totalité des échantillons de semences de niébé collectés à des taux élevés, indiquant que la maladie est beaucoup répandue dans les zones de production du niébé au Burkina Faso. Ainsi, des graines de niébé apparemment saines, hébergent en leur sein ce champignon. Des travaux antérieurs réalisés par Mathur et Manandhar (2003) avaient décelé également la présence *M. phaseolina* à des fréquences élevées atteignant 100% dans des semences de niébé produites au Burkina Faso. Ce champignon a été également associé aux semences de sorgho (Zida et al., 2008) et de voandzou (Ouoba et al., 2019 ; Ouili et al., 2022) au Burkina Faso. L'initiation de la maladie au champ serait majoritairement assurée par les micro sclérotés du champignon présents sur la surface des graines et / ou dans

le sol, ou, par le mycélium présent dans les embryons infectés (Kendig et al., 2000). Au champ, *M. phaseolina* cause la mortalité avant et après la levée des semis et des plantes adultes. *M. phaseolina* est reconnu comme un pathogène largement distribué qui cause des dommages sur une large gamme d'hôtes (Sarr et al., 2014). La présence de ce champignon dans les graines de niébé, en grande quantité, est alarmante d'autant plus que ce champignon est reconnu produire des mycotoxines telles que la botryodiplodine et la phaséolinone, dangereuses pour la plante-hôte et pour l'Homme (Abbas et al., 2019 ; Khambhati et al., 2020).

Les résultats de la PCR via l'utilisation des amorces universelles ont révélé la présence effective du genre *Macrophomina* dans tous nos échantillons. Ces résultats consolident l'identification morphologiques qui avait déjà prouvé la présence du genre *Macrophomina* dans tous nos échantillons. L'utilisation d'amorce spécifique pour l'identification des espèces de *M. phaseolina* (350 pb) et *M. euphorbiicola* (217 pb) a révélé la présence de 24 échantillons positifs sur 51 échantillons testés. Ces résultats confirment la discrimination formelle à partir de la PCR des espèces de *M. phaseolina* et *M. euphorbiicola* décrite par Babu et al., (2007) et de Santos et al., (2020).

Ce résultat correspond à 47% de taux de succès d'où la présence suspecte de 53% d'autres espèces de *Macrophomina* tels que *M. vaccini* et *M. tecta* pour lesquelles l'indisponibilité de primers spécifiques n'a pas permis leur prise en compte dans la présente étude. Les résultats du séquençage des 4 isolats n'ont pas permis d'identifier l'espèce *M. euphorbiicola*; cela pourrait s'expliquer par la qualité des séquences car tout comme pour d'autres séquences identifiées comme *M. phaseolina* par la PCR les résultats du séquençage n'ont pas été exploitables. Par ailleurs, la mauvaise qualité des séquences pourrait s'expliquer par le choix inapproprié des amorces proposées pour le séquençage.

Par contre, pour l'espèce *M. phaseolina* 18 séquences ont été obtenues. Les analyses bioinformatiques de nos séquences avec

plusieurs autres de la base de données Genbank ont montré que la région 5.8S ribosomale reste hautement conservée dans toutes les séquences de l'espèce *M. phaseolina*. Des variabilités ont été observées au niveau des régions ITS1 et ITS2 quand bien que nos séquences soient partielles. Plusieurs auteurs (Su et al., 2001; Almeida et al., 2003) ont montré que les régions ITS variables dans les isolats de *M. phaseolina* du maïs, du coton, du sorgho et du soja.

L'analyse de nos séquences pour ce qui concerne la région ITS1 a révélé des variations au niveau des séquences nucléotidiques et des séquences d'acides aminés dans deux sites (position 161 et position 173) majeurs. En effet, ces changements d'acides aminés pourraient se révéler par des modifications de propriétés pathogéniques de nos isolats. Il est encore tôt pour tirer une conclusion et il serait plus judicieux de poursuivre la caractérisation sur la base des séquences complètes de l'ITS1.

Pour la région ITS2, la comparaison a révélé une forte variabilité entre nos séquences et quelques séquences d'isolats (KF951642, KF951710, KF951705, KF951711, KF951712, KF951723) de l'Afrique de l'Ouest de la base de données Genbank. Ces séquences proviennent majoritairement du Niger qui fait frontière avec le Burkina Faso. L'absence de séquences similaires dans nos séquences pourrait s'expliquer par le manque d'isolats provenant de la région du sahel. La variabilité est d'autant plus importante par rapport à nos isolats qu'il serait judicieux dans l'avenir de tenir compte des isolats du sahel afin de mieux appréhender la diversité et le développement des méthodes de lutte appropriées. L'homologie observée avec les 2 séquences l'Inde et du Sénégal peut s'expliquer par des échanges de semences contaminées, possible grâce aux essais collaboratifs menés à travers les réseaux d'évaluation de matériel génétique. Toutefois nos analyses sont partielles au regard de la portion de la région de l'ITS2 considéré. La caractérisation sur la base des séquences complètes de l'ITS2 pourra statuer sur la diversité réelle des espèces de *Macrophomina phaseolina*.

Conclusion

La pourriture charbonneuse du niébé est une maladie importante qui affecte la production de niébé au Burkina Faso. La prévalence de la maladie est élevée et les pertes de récolte sont considérables. Le couple d'amorces MpKF1/MpKfR1 utilisé constitue un bon outil pour le diagnostic moléculaire de l'espèce *M. phaseolina*. Cependant, ces amorces ne sont pas appropriées pour l'étude de la diversité des espèces de *M. phaseolina*. Il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de l'espèce *M. phaseolina* en utilisant des amorces à large spectre pour obtenir des séquences complètes des régions IT1 et ITS2 afin de mieux étudier la diversité moléculaire. En plus de poursuivre l'analyse sur *M. euphorbiicola*, il serait également intéressant de l'étendre aux deux nouvelles espèces de *Macrophomina* (*M. vaccini* et *M. tecta*). En dépit de la variabilité de l'agent pathogène, l'existence de génotypes de niébé résistants à la maladie donne des motifs d'encouragement dans la gestion de cette pathologie par l'amélioration variétale.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'il n'y a aucun conflit d'intérêts.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

DMB a collecté les données, suivi les tests et a participé à l'analyse et la rédaction du manuscrit. PEZ a suivi les tests, supervisé les travaux et a participé à l'analyse et à la correction du manuscrit. MK a participé à l'analyse moléculaire et corrigé le document. WRS a suivi les tests, a participé à la collecte des données et à la correction du manuscrit. JBN et MLG ont participé à la correction du manuscrit.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le projet *Maize and Cowpea for sustainable food and nutrition security in Western and Central Africa (MACOWECA)*, le laboratoire de phytopathologie et le LMI-Patho-Bios et le projet *Accelerated Varietal Improvement and Seed delivered of legumes and cereals in Africa*

(AVISA) pour les soutiens financiers et techniques qui nous ont permis de réaliser cette étude.

REFERENCES

- Abbas HK, Bellaloui N, Accinelli C, Smith JR, Shier WT. 2019. Toxin production in soybean (*Glycine max* L.) Plants with Charcoal Rot Disease and by *Macrophomina phaseolina*, the fungus that causes the disease. *Toxins*, **11**(11): 645. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11110645>
- Abu Almakarem AS, Heilman KL, Conger HL, Shtarkman MY, Rogers OS. 2012. Extraction of DNA from Plant and Fungus Tissues in situ. *BMC Researches Notes*, **5**: 266. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-266>
- Almeida AMR, Abdelnoor RV, Arias CAA, Carvalho VP, Filho DSJ, Marin SRR, Benato LC, Pinto MC, Carvalho CGP. 2003. Genotypic Diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, **28**(3): 279–85. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000300009>
- Babu, BK, Saxena AK, Srivastava AK, Arora DK. 2007. Identification and Detection of *Macrophomina phaseolina* by Using Species-Specific Oligonucleotide Primers and Probe. *Mycologia*, **99**(6): 797–803. DOI: <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832511>
- Bengaly AA. 2010. Comité Interprofessionnel des Céréales et du Niébé du Burkina (CICB), Etude diagnostic « Chaîne de Valeur Niébé », Rapport final, p. 65.
- Boland GJ, Melzer MS, Hopkin A, Higgins V, Nassuth M. 2004. Climate Change on Plant Diseases in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **26**(3): 335–350. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060660409507151>

- Coulibaly K, Traore M, Gomgnimbou AP, Yameogo LP, Bacye B, & Nacro HB. 2023. Effets de Différents Modes de gestion de la Fertilité du sol sur les Performances du Niébé (*Vigna unguiculata*) et de l'Ambérique (*Vigna radiata*) à l'Ouest du Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **17**(1): 267-280. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v17i1.19>
- Diouf D. 2011. Recent Advances in Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) "OMICS" Research for Genetic Improvement. *African Journal of Biotechnology*, **10**(15): 2803-2810. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJBx10.015>
- FAOSTAT, 2021. Agricultural Production Data in 2021.
- Hartman GL, Chang HX, Leandro LF. 2015. Research Advances and Management of Soybean Sudden Death Syndrome. *Crop Protect.*, **73**: 60–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.017>
- Kendig SR., Rupe JC, Scott HD. 2000. "Effect of Irrigation and Soil Water Stress on Densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two Soybean Cultivars. *Plant disease*, **84**(8): 895-900. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.8.895>
- Khambhati VH, Abbas HK, Sulyok M, Tomaso-Peterson M, Shier WT. 2020. First Report of the Production of Mycotoxins and Other Secondary Metabolites by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Isolates from Soybeans (*Glycine max* L.) Symptomatic with Charcoal Rot Disease. *Journal of Fungi*, (Basel), **6**(4): 332. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof6040332>
- Konate Z, Messoum FG, Sekou A, Yao-Kauame A, Camara M, Kelizagbahi J. 2013. Effets des Cultures de Soja (*Glycine max*) et de Niébé (*Vigna unguiculata*) sur la Densité Apparente et la teneur en eau des sols et sur la Productivité du Riz Pluvial de plateau sur ferralsol hyperdystrique. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **7**(1): 47-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v7i1i.5>
- Mathur SB, Manandhar HK. 2003. Fungi in seeds recorded at the Danish Government Institute of Seed Pathology for developing countries, Copenhagen, Denmark.
- Mathur SB, Kongsdal O. 2003. *Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi* (1st edn). Kandrups Bogtrykkeri edition: Bassersdorf, CH-Switzerland.
- Ndiaye M. 2007. Ecology and Management of Charcoal Rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel. Thèse PhD, Université de Wageningen, Pays Bas, p. 122.
- Ouattara S, Bougouma-Yameogo VMC, Nianogo AJ, Al Bachir A. 2014. Effets des Graines Torréfiées de *Vigna unguiculata* (niébé) comme Source de Protéines, dans l'Alimentation des Poules locales en ponte au Burkina Faso, sur leurs Performances Zootechniques et la Rentabilité Economique des régimes. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **8**(5): 1990-1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i5.4>
- Ouédraogo S. 2003. Impact Economique des Variétés Améliorées du Niébé sur les Revenus des Exploitations Agricoles du Plateau Central du Burkina Faso. *Tropicicultura.*, **21**(4): 204-210. URL: <https://www.researchgate.net/profile/Jan-Pieters-2/publication/45266484>.
- Ouili AS, Maiga Y, Zida EP, Ouoba A, Nandkangre H, Compaore COT, Nikiema M, Ouedraogo M, Ouattara AS. 2022. Isolation and Characterization of Fungal Strains from the seeds of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdcourt) produced in Burkina Faso. *African Journal of Food Science*, **16**(5): 107-115. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJFS2022.2168>
- Ouoba A, Zida EP, Soalla RW, Bangratz M, Palanga E, Konate MN, Nandkangre H,

- Ouedraogo M, Sawadogo M. 2019. Molecular Characterization of the main Fungi associated to Bambara groundnut foliar diseases in Burkina Faso. *Journal of Applied Biosciences*, **133**: 13574 – 13583. DOI: <https://doi.org/10.4314/jab.v133i1.9>
- Sana Y, Sanou J, Kondombo SR, Sawadogo L, Kabore-Zoungana C. 2020. Effet de l'Utilisation de Cosses de trois Variétés Améliorées de Niébé (*Vigna unguiculata*) et de Maïs de Variété Espoir dans l'Alimentation des Lapereaux dans l'Ouest du Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **14**(5): 1585-1599. DOI: <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v14i5.8>
- Santos KM, Lima GS, Barros APO, Machado AR, Souza-Motta CM, Correia KC, Michereff SJ. (2020). Novel Specific Primers for rapid Identification of *Macrophomina* species. *European Journal of Plant Pathology*, **156**(4): 1213-1218. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01952-8>
- Sarr MP, Ndiaye MB, Groenewald JZ, Crous PW. 2014. Genetic Diversity in *Macrophomina phaseolina*, the Causal Agent of Charcoal Rot. *Phytopathologia Mediterranea*, **53**(2): 250–268. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-13736
- Sawadogo A. 2009. Evaluation de la Production du Niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] en Condition de Stress Hydrique: Contribution au Phénotypage et à la Sélection du Niébé pour la Résistance à la Sécheresse. Mémoire de fin de cycle du Diplôme d'Ingénieur du Développement Rural. Option Agronomie, Université Polytechnique de Bobo Dioulasso, p. 90.
- Soule G, Gansari S. 2010. La Dynamique des Echanges Régionaux des Céréales en Afrique de l'Ouest. Rapport, Michigan State University: Syngenta.
- Su G, Suh S-O, Schneider RW, Russin JS. 2001. Host Specialization in the Charcoal Rot Fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, **91**(2): 120–126. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.2.120>
- Thompson JD, Higgins GD, Gibson JT. 1994. "CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, **22**(22): 4673-4680. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Van Der Putten WH, Macel M, Visser ME. 2010. Predicting Species Distribution and Abundance Responses to Climate Change: why it is Essential to Include Biotic Interactions across Trophic Levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**(1559): 2025–2034. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0037>
- Zida PE, Sérémé P, Leth V, Sankara P, Somda I, Neya A. 2008. Importance of Seed-Borne Fungi of Sorghum and Pearl Millet in Burkina Faso and their Control using Plant Extracts. *Pakistan journal of Biological Sciences*, **11**(3): 321–331. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.321.33>