



HAL
open science

Caractérisation des populations de *Mycosphaerella fijiensis* et épidémiologie de la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani, RDC

Didy Onautshu Odimba, Anne Legrève, Benoît Dhed'a Djailo

► **To cite this version:**

Didy Onautshu Odimba, Anne Legrève, Benoît Dhed'a Djailo. Caractérisation des populations de *Mycosphaerella fijiensis* et épidémiologie de la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani, RDC. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Catholique de Louvain, 2013. Français. NNT : . tel-00920881

HAL Id: tel-00920881

<https://theses.hal.science/tel-00920881>

Submitted on 19 Dec 2013

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

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

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN



Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale

Earth and Life Institute - Applied Microbiology - Phytopathology

**Caractérisation des populations de *Mycosphaerella fijiensis* et
épidémiologie de la cercosporiose noire du bananier (*Musa spp.*)
dans la région de Kisangani (RDC)**

Thèse présentée par **Didy ONAUTSHU ODIMBA** en vue de l'obtention de
grade de Docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Composition du Jury

Pr. Anne Legrève (UCL) : Promoteur

Pr. Benoît Dhed'a (UNIKIS): Promoteur

Pr. Rony Swennen (KUL): Examineur

Pr. Claude Bragard (UCL): Examineur

Pr. Stephan Declerck (UCL) : Examineur

Pr. Jacques Mahillon (UCL) : Président

2013

Dédicace

A mes Parents

Mes frères et sœurs, cousins et cousines

Mes collègues, amis et collaborateurs

Ma tendre épouse Marlène Safi Faïda

Nos enfants Alain, Marie, Rosy, Sylvain, Didas, Eddy et Chouchou

Remerciements

Au terme de ce parcours doctoral, je rends grâce à l'Éternel Dieu qui m'a donné la force de transcender tous les moments d'épreuve et de dur labeur.

L'aboutissement de ce parcours doctoral est sans nul doute une œuvre de plusieurs bâtisseurs.

De prime à bord, le Professeur Anne Legrève, qui, au-delà du rôle de Promotrice, m'a fait grandir d'un souci de mère. Madame, vous avez eu confiance en mon travail et vous m'avez enseigné la rigueur scientifique, permettant ainsi de contribuer à l'élargissement de mon horizon scientifique. Votre porte est restée toujours ouverte pour d'innombrables discussions et conseils sur le travail quotidien. Je vous remercie pour vos encouragements, pour votre soutien à tout moment, pour votre disponibilité, pour votre continuelle et rassurante bonne humeur. Ça été un réel plaisir de travailler avec vous !

Le professeur Benoît Dhed'a Djailo, Co-promoteur de la thèse, m'a été d'un accompagnement important lors de mes séjours à Kisangani pour la récolte des données, j'ai bénéficié d'une collaboration privilégiée qui m'a facilité le travail. Je vous remercie pour votre soutien, pour votre encadrement et pour vos encouragements. A côté de lui, toute la collaboration des collègues de la faculté des Sciences de l'UNIKIS, m'a chaleureusement renouvelé de vigueur et de persévérance.

Je remercie tous les membres du mon comité d'accompagnement qui ont voulu se joindre pour améliorer la qualité de ce travail, Professeurs Bruno Delvaux, Claude Bragard, Benoît Dhed'a et Anne Legrève.

Je remercie cordialement les Professeurs Rony Swennen, Stephane Declerck, Claude Bragard et Jacques Mahillon d'avoir accepté d'évaluer ma thèse et nourris des conseils constructifs lors de la défense préliminaire.

Remerciements

Je remercie tout particulièrement le Professeur Rony Swennen pour ses nombreux conseils et son apport documentaire lors de la rédaction de la thèse.

Je tiens à remercier du fond de mon cœur le Professeur Henri Maraite pour m'avoir recommandé auprès du Professeur Anne Legrève, promotrice de ma thèse. Professeur, vous m'avez permis de poursuivre mes études doctorales en Belgique par le biais de la CTB, recevez ici la gratitude de toute ma famille.

J'ai une pensée profonde et émue pour « Feu » Professeur Emile Mulotwa et Professeur Dominique Nyakabwa qui n'ont pu assister à l'aboutissement de cette thèse.

L'initiation et la familiarité avec les analyses moléculaires et les tests de sensibilité aux fongicides ne me seraient jamais possibles sans la spontanéité et la disponibilité de toute l'équipe du laboratoire de phytopathologie (FYMY/UCL), de la Clinique des plantes et du comité régional Phyto. Je ne saurai tous les citer mais je garde en mémoire certains noms dont Aurélie Clinckemaillie, Samuel Carrola, François Crutzen, Géraldine Dedeurwaerder, Nicolas Desoignies, Benjamin Dieryck, Yann Galein, Guillaume Meniger, Elsy Lievens Jean-marie Gérard, Laurence Janssens, Virginie Moreau, Pierre Noël, Pierre Hellin, Alain Décroes, Marie Clause, Marie-Eve Renard, Nadine Van Emmerik, Viviane Vanhese, Brigitte Vanpee, Jeannine Weyns, Luc Coquillard, Fabienne Richard, Francis Steeve Amougou et Christine Bousmanne. Je vous remercie pour votre formidable accueil et votre bonne humeur qui a contribué à la bonne ambiance dans le laboratoire. A travers Mme Bénédicte Purnelle, je remercie toute l'équipe de FYSA/UCL, pour les travaux de séquençage des échantillons.

Remerciements

Je tiens à remercier spécialement Bernadette Umba, François Hamadi, Gabriel Akwakwa et Trésor Lodi qui ont réalisé leur mémoire dans le cadre de ma thèse, et ainsi largement contribué aux résultats obtenus.

Une collaboration entre les Professeurs Benoît Dhed'a (UNIKIS), Anne Legrève (UCL) et Rony Swennen (KUL) m'a permis de partager quelques mois au Laboratory of Tropical Crop Improvement de KU Leuven pour me familiariser avec les techniques de culture *in vitro* du bananier et d'autres plantes. Je tiens à les remercier et je remercie tout particulièrement le Docteur Bart Panis, Madame Els Kempenaers, Madame Ines Van Denhouwe et Monsieur Pablo Caceres Vazquez pour leur encadrement et leurs nombreux bons conseils.

Tout ce moment passé dans ce parcours, a été pour ma famille, un moment de dures épreuves et des privations. Marlène, Alain, Marie, Rosy, Sylvain, Didas, Eddy et Chouchou, je ne saurai vous exprimer la satisfaction que je ressens en ce moment en espérant que cette fois je vais devoir vous appartenir et être un père de famille présent.

Je remercie du fond du cœur mon père André Onautshu Okongodiko et ma mère Rosalie Takamanyi Asui, desquels je détiens toutes les bonnes leçons de la vie. Mes frères et soeurs, cousins, cousines, amis de loin et de près, vous m'avez aussi témoigné un grand soutien qui m'a permis d'arriver au bout, je tiens à vous en remercier.

Je ne saurai finir sans exprimer ma reconnaissance aux organismes qui ont appuyé financièrement ce parcours notamment la CTB et le service d'aide aux étudiants de l'UCL.

Didy Onautshu.

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Dédicace | i |
| Remerciements..... | iii |
| Table des matières | 1 |
| Résumé | 6 |
| Abbréviations et acronymes..... | 9 |
| Liste des figures | 13 |
| Liste des tableaux..... | 17 |
| Index des annexes | 19 |
| Glossaire | 21 |
| Introduction générale | 24 |
| Contexte..... | 26 |
| Hypothèses | 30 |
| Objectifs | 32 |
| Première partie | 35 |
| Chapitre 1 | 37 |
| 1.1. Origine | 39 |
| 1.2. Description et classification..... | 40 |
| 1.3. Distribution et diversité génétique | 41 |
| 1.4. Importance socio-économique et alimentaire du bananier | 47 |
| 1.5. Valeurs nutritionnelles..... | 49 |
| 1.6. Exigences écologiques..... | 51 |
| 1.6.1. Facteurs climatiques | 53 |
| 1.6.2. Facteurs édaphiques..... | 54 |

Table des matières

| | | |
|--------|--|-----|
| 1.7. | La culture du bananier en RDC et dans la région de Kisangani | 55 |
| 1.8. | Systèmes de culture en RDC et à Kisangani..... | 58 |
| 1.9. | Maladies et ravageurs du bananier..... | 61 |
| 1.9.1. | Les maladies bactériennes..... | 61 |
| 1.9.2. | Les maladies fongiques..... | 68 |
| 1.9.3. | Les ravageurs | 75 |
| | Chapitre 2 | 81 |
| 2.1. | Origine et distribution..... | 83 |
| 2.2. | L'agent pathogène : systématique, biologie et génétique | 88 |
| 2.3. | Epidémiologie..... | 92 |
| 2.3.1. | Cycle infectieux et développement..... | 92 |
| 2.3.2. | Effet des facteurs biotiques et abiotiques..... | 94 |
| 2.3.3. | Comportement de <i>M. fijiensis</i> vis-à-vis de l'hôte..... | 95 |
| 2.4. | Lutte contre la cercosporiose noire du bananier | 97 |
| 2.4.1. | Pratiques culturales | 98 |
| 2.4.2. | Lutte biologique..... | 98 |
| 2.4.3. | Lutte chimique | 99 |
| 2.4.4. | Utilisation de variétés résistantes..... | 102 |
| | Deuxième partie | 105 |
| | Commentaires préliminaires..... | 107 |
| 3.1. | Résumé | 112 |
| 3.2. | Introduction..... | 113 |
| 3.3. | Matériel et méthodes..... | 116 |

Table des matières

| | |
|--|-----|
| 3.3.1. Matériel végétal..... | 116 |
| 3.3.2. Méthodes..... | 118 |
| 3.4. Résultats et discussion..... | 126 |
| 3.4.1. Caractéristiques morphologiques..... | 126 |
| 3.4.2. Caractéristiques moléculaires..... | 133 |
| 3.4.3. Evaluation de la pathogénicité..... | 147 |
| 3.5. Conclusion..... | 151 |
| Chapitre 4..... | 155 |
| 4.1. Résumé..... | 157 |
| 4.2. Introduction..... | 158 |
| 4.3. Matériel et méthodes..... | 161 |
| 4.3.1. Obtention des souches..... | 161 |
| 4.3.2. Production des conidies..... | 161 |
| 4.3.3. Préparation des fongicides..... | 162 |
| 4.3.4. Détermination de pourcentage d'inhibition..... | 163 |
| 4.3.5. Analyse des données..... | 164 |
| 4.4. Résultats et discussion..... | 164 |
| 4.4.1. Sensibilité des souches aux triazoles..... | 164 |
| 4.4.2. Sensibilité des souches aux strobilurines..... | 174 |
| 4.4.3. Sensibilité des souches aux benzimidazoles..... | 177 |
| 4.5. Conclusion..... | 181 |
| Troisième partie..... | 184 |
| Commentaires préliminaires..... | 186 |

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Chapitre 5..... | 189 |
| 5.1. Résumé | 191 |
| 5.2. Introduction..... | 192 |
| 5.3. Matériel et méthodes..... | 195 |
| 5.3.1. Cadre physique de la région de Kisangani, sites d'analyse et d'expérimentation..... | 195 |
| 5.3.3. Evaluation de l'incidence de la maladie en fonction du système de culture | 198 |
| 5.3.4. Evaluation de la présence de l'inoculum aérien dans les sites expérimentaux | 200 |
| 5.3.5. Analyses statistiques..... | 201 |
| 5.4. Résultats..... | 201 |
| 5.5. Discussion..... | 218 |
| Discussion générale | 227 |
| Conclusion et perspectives..... | 243 |
| Références..... | 249 |
| Annexes | 283 |

Résumé

La maladie des raies noires (MRN), causée par le champignon ascomycète *Mycosphaerella fijiensis*, est l'une des maladies les plus dévastatrices du bananier (*Musa* spp.). Elle constitue une contrainte majeure à sa production, particulièrement dans les pays des tropiques humides où le bananier est une culture alimentaire de base. L'objectif de cette thèse a été de caractériser les populations de *M. fijiensis* et d'étudier l'épidémiologie de la MRN dans la région de Kisangani (RDC) en vue d'évaluer les stratégies de protection intégrée à développer dans les cultures de bananiers et bananiers plantains. La particularité de notre approche réside en la combinaison d'études en laboratoire, selon des approches classique et moléculaire, et des expérimentations sur le terrain pour mieux connaître les caractéristiques épidémiologiques de la maladie selon les saisons et les systèmes de cultures. Les caractéristiques phénotypiques des souches isolées de Kisangani sur milieu PDA étaient typiques de l'espèce *M. fijiensis*. Cette identification a été confirmée selon une approche moléculaire sur base du séquençage d'une partie de l'ADN ribosomal incluant les régions ITS (internal transcribed spacers) et le gène 5,8S. L'existence des deux types de croisement Mat1-1 et Ma1-2 au sein de la population a été révélée mais un déséquilibre entre les deux idiomorphes a été remarqué. L'évaluation de la pathogénicité des souches a montré que toutes les souches testées ont un pouvoir pathogène vis-à-vis du cultivar Cavendish « Grande Naine ». Notre étude a aussi permis de ressortir des différences de virulence selon les souches. Les tests de sensibilité aux fongicides ont montré que les souches de la RDC sont sensibles aux triazoles et au carbendazime, mais certaines souches seraient résistantes à l'azoxystrobine.

Sur le plan épidémiologique, notre étude a révélé que les deux formes fongiques (anamorphe et téléomorphe) sont présentes non seulement en saison des pluies mais également en saison sèche. Elles jouent donc un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie. L'incidence de la maladie

Résumé

a été légèrement moindre en saison sub sèche qu'en saison humide. Une comparaison de la progression de la maladie pendant les deux saisons selon le système de culture a révélé que le développement de la MRN a été plus lent en forêt secondaire qu'en jachère et en jardin de case et l'incidence et la sévérité ont été plus grandes sur les plantains que sur les bananes. La meilleure tolérance du cultivar Yangambi Km5 a été confirmée.

Ces résultats ont apporté des éléments nouveaux sur l'épidémiologie de la maladie dans la région de Kisangani et sur les caractéristiques de la population en présence. Ils ont été exploités pour établir une liste de recommandations visant à mieux gérer les dégâts de *M. fijiensis*, un pathogène au potentiel évolutif important.

Abbréviations et acronymes

A : un génome *Musa acuminata*.

AA : bananiers diploïdes à deux génomes *Musa acuminata*.

AAA : bananiers triploïdes à trois génomes *Musa acuminata*.

AAAA : bananiers tétraploïdes à quatre génomes *Musa acuminata*.

AAA-EAHB : bananiers triploïdes à trois génomes *Musa acuminata*,
spécifiques de l'Afrique de l'Est.

AAB : bananiers triploïdes à deux génomes *Musa acuminata* et un génome
Musa balbisiana.

AB : bananiers diploïdes à un génome *Musa acuminata* et un génome *Musa
balbisiana*.

ABB : bananiers triploïdes à deux génomes *Musa balbisiana*.

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique.

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism.

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism.

ANOVA: Analysis of variance.

AUDPC: area under the disease progress curve.

B : un génome *Musa balbisiana*.

BBTD: Banana Bunchy Top disease.

BBTV: Banana bunchy top virus.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

BXW: Banana Xanthomonas Wilt.

CAM: Cameroun.

CARBAP : Centre africain de recherches sur les bananiers et plantains.

CIRAD : Centre de coopération internationale en recherches agronomique
pour le développement.

CMV : Virus de la mosaïque du concombre.

CRBP : Centre régional de recherches sur les bananiers et plantains.

CTB : Coopération Technique Belge.

DC-PCR: Direct colony-Polymerase Chain Reaction.

Abbréviations et acronymes

DEPC: Diethylpyrocarbamate.

DO: densité optique.

ELSD: Eumusae leaf spot disease.

EEM: Etat d'évolution de la maladie.

FAOSTAT: Food and agriculture organization statistics.

FHIA: Fundación hondureña de investigación agrícola.

FOC: *Fusarium oxysporium* f. sp. *cubens*.

FP: Forêt primaire.

FSV : Forêt secondaire vieille.

FYMY: Phytopathology and Mycology Unit.

FYSA : Physiological Biochemistry Unit.

GRET : Groupe de recherches et d'échanges technologiques.

IFA-Yangambi: Institut facultaire des sciences agronomiques de Yangambi.

INIBAP: International network for the improvement of banana and plantain.

ITS: Internal Transcribed Spacer.

KUL: Katholieke Universiteit Leuven.

Mat: Mating type.

MRN : maladie des raies noires.

MS : maladie de sigatoka.

NCBI: National Center of Biotechnology Institute.

pb: paire de base.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PDB: Potato Dextrose Broth.

pH: potentiel d'hydrogène.

RDC : République Démocratique du Congo.

s.a : substance active.

SAS: Statistical Analyse System.

SSRLP: Simple Sequence Repeat Length Polymorphism.

Abbréviations et acronymes

TDM : Temps de développement de la maladie

Abbréviations et acronymes

TDM : Temps de développement de la maladie.

UCL : Université catholique de Louvain.

UNIKIS : Université de Kisangani.

UV. : Ultra violet.

Ybi: Yangambi.

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1.1. Distribution des bananiers dans le monde | 43 |
| Figure 1.2. Zones agro-écologiques des bananiers (<i>Musa</i> spp.) | 52 |
| Figure 1.3. Activités bananières à Kisangani..... | 57 |
| Figure 1.3. Activités bananières à Kisangani..... | 58 |
| Figure 1.4. Bananiers en jardin de case | 61 |
| Figure 1.5. Symptômes du flétrissement bactérien du bananier | 62 |
| Figure 1.6. Symptômes de la maladie de Moko..... | 63 |
| Figure 1.7. Symptômes de la maladie du sang du bananier..... | 64 |
| Figure 1.8. Symptômes de maladie de bunchy top du bananier | 65 |
| Figure 1.9. Symptômes de la mosaïque des bractées du bananier | 66 |
| Figure 1.10. Mosaïque en plage du bananier | 67 |
| Figure 1.11. Symptômes de la fusariose du bananier | 69 |
| Figure 1.12. Symptômes foliaires localisés des cercosporioses..... | 75 |
| Figure 1.12. Symptômes du charançon du bananier | 77 |
| Figure 2.1. Distribution géographique de la MRN dans le monde | 85 |
| Figure 2.2. Description des stades de développement de la cercosporiose noire en champs | 87 |
| Figure 2.3. Stades de la cercosporiose noire en conditions contrôlées | 88 |
| Figure 2.4. Conidiophore et conidies; Spermogonie et spermaties; périthèce, asques et ascospores de <i>M. fijiensis</i> | 90 |
| Figure 2.5. Cycle infectieux de la maladie des raines noires | 93 |
| Figure 3.1. Carte de la région de Kisangani..... | 118 |
| Figure 3.2. Phénotypes des mycéliums des souches de <i>M. fijiensis</i> en provenance de la RDC | 127 |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 3.3. Phénotypes des mycéliums des souches de <i>M. musicola</i> en provenance de la RDC | 128 |
| Figure 3.4. Distribution des souches de <i>M. fijiensis</i> isolées de la région de Kisangani | 129 |
| Figure 3.5. Evolution de la croissance des 10 souches de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> isolées de la région de Kisangani | 133 |
| Figure 3.6. Visualisation des amplicons obtenus après amplification de l'ADN extrait de souches de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> par PCR | 134 |
| Figure 3.7. Alignement multiple des ITS de 24 souches de <i>M. fijiensis</i> isolées de la région de Kisangani et 4 souches isolées au Cameroun | 142 |
| Figure 3.8. Alignement multiple des Mat1-1 de 4 souches de <i>M. fijiensis</i> isolées de la région de Kisangani avec une séquence des mêmes régions Mat1-1 de souches de <i>M. fijiensis</i> , issues de la base de données NCBI | 144 |
| Figure 3.9. Alignement multiple des Mat1-2 de 5 souches de <i>M. fijiensis</i> isolées de la région de Kisangani avec une séquence des mêmes régions Mat1-2 de souches de <i>M. fijiensis</i> issues de la base de données NCBI | 146 |
| Figure 3.10. Valeurs d'aire sous la courbe de progression de la sévérité de l'infection (AUDPC)..... | 150 |
| Figure 3.11. Dynamique d'infection des souches de <i>M. fijiensis</i> | 150 |
| Figure 4.1. Distribution des valeurs des EC ₅₀ d'époxiconazole des souches de <i>M. fijiensis</i> de la RDC et du Cameroun..... | 165 |
| Figure 4.2. Distribution des valeurs des EC ₅₀ de propiconazole des souches de <i>M. fijiensis</i> de la RDC et du Cameroun..... | 167 |
| Figure 4.3. Distribution des valeurs des EC ₅₀ de tébuconazole des souches de <i>M. fijiensis</i> de la RDC et du Cameroun..... | 170 |
| Figure 4.4. Sensibilité croisée aux triazoles des souches de <i>M. fijiensis</i> de la RDC et du Cameroun..... | 173 |
| Figure 4.5. Distribution des valeurs des EC ₅₀ de l'azoxystrobine des souches de <i>M. fijiensis</i> de la RDC et du Cameroun | 175 |

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 4.6. Distribution des valeurs des EC ₅₀ du carbendazime des souches de <i>M. fijiensis</i> de la RDC | 177 |
| Figure 5.1. Carte de la région de la région de Kisangani..... | 196 |
| Figure 5.2. Pourcentage de détection de <i>M. fijiensis</i> sur bananiers en jardins de case dans les 6 communes à Kisangani selon la saison en 2010..... | 202 |
| Figure 5.3. Pourcentage de détection de <i>M. fijiensis</i> sur bananiers en jardin de case dans les 6 communes à Kisangani selon la variété et la saison en 2010 | 203 |
| Figure 5.4. Détection de la forme anamorphe et téléomorphe de <i>M. fijiensis</i> sur bananiers et bananiers plantains dans les communes de Kabondo et Kisangani | 204 |
| Figure 5.5. Détection de la forme anamorphe et téléomorphe de <i>M. fijiensis</i> sur bananiers et bananiers plantains dans les communes de Lubunga et Makiso | 204 |
| Figure 5.6. Détection de la forme anamorphe et téléomorphe de <i>M. fijiensis</i> sur bananiers et bananiers plantains dans les communes de Mangobo et Tshopo | 205 |
| Figure 5.7. Incidence de la forme anamorphe et téléomorphe de <i>M. fijiensis</i> selon les systèmes de culture à l'île Mbiye au cours de la saison pluvieuse en 2010 | 206 |
| Figure 5.8. Incidence de la forme anamorphe et téléomorphe de <i>M. fijiensis</i> selon les systèmes de culture à Masako au cours de la saison pluvieuse.... | 206 |
| Figure 5.9. Evolution de la sévérité de la cercosporiose noire sur les 7 premières feuilles de quatre cultivars de bananier/bananiers plantains, selon le système de culture à Kisangani, Province orientale, en 2012..... | 213 |
| Figure 5.10. Mesures de la quantité d'ascospores de <i>M. fijiensis</i> selon les saisons et les systèmes de cultures à Kisangani, Province orientale, RDC en 2012. | 216 |
| Figure 5.11. Relation entre l'intensité de la maladie des raies noires et la quantité d'ascospores dans les trois systèmes de culture à Kisangani | 217 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1.1. Principaux cultivars du genre <i>Musa</i> rencontrés dans le District de la Tshopo en Province orientale (RDC)..... | 44 |
| Tableau 1.2. Répartition mondiale de la production bananière en 2011..... | 48 |
| Tableau 1.3. Valeurs nutritionnelles des bananes et bananes plantains par 100 g | 50 |
| Tableau 1.4. Les principales maladies des fruits de bananiers | 71 |
| Tableau 2.1. Sensibilité variétale de quelques cultivars des bananiers aux maladies foliaires causées par <i>Mycosphaerella</i> spp..... | 97 |
| Tableau 3.1. Souches de <i>Mycosphaerella</i> isolées à partir de feuilles présentant des symptômes de cercosporiose sur des cultivars de bananier et bananier plantain dans la région de Kisangani et leur origine. | 117 |
| Tableau 3.2. Longueur, largeur et nombre des septa des conidies produites par les souches de <i>M. fijiensis</i> isolées dans la région de Kisangani..... | 130 |
| Tableau 3.3. Résultats du Blast de séquences ITS ou Mat obtenues pour les souches isolées de la région de Kisangani | 147 |
| Tableau 4.1. Fongicides utilisés..... | 162 |
| Tableau 4.2. Moyennes des EC ₅₀ des triazoles vis-à-vis des souches de <i>M. fijiensis</i> de la RDC et du Cameroun..... | 172 |
| Tableau 5.1. Caractéristiques phénotypiques et usages des cultivars | 197 |
| Tableau 5.2. Epaisseur de la litière et propriétés chimiques du sol selon les systèmes de culture du bananier à Kisangani | 209 |
| Tableau 5.3. Temps de développement de la maladie, incidence et sévérité de MRN selon le système de culture et le cultivar autour de la réserve forestière de Masako | 212 |
| Tableau 5.4. Impact du système de culture et du cultivar sur la MRN à Kisangani | 214 |

Index des annexes

| | |
|--|-----|
| Annexe 1. Classification des principaux cultivars du genre <i>Musa</i> à fruits comestibles | 257 |
| Annexe 2. Souches caractérisées sur le plan moléculaire..... | 258 |
| Annexe 3. Protocole d'extraction d'ADN génomique..... | 261 |
| Annexe 4. Protocole des tests de sensibilité aux fongicides | 266 |
| Annexe 5. Origine des souches de <i>M. fijiensis</i> isolées en RDC et au Cameroun..... | 268 |
| Annexe 6. Valeurs des EC50 des triazoles, strobilurines et benzimidazoles des souches de la RDC et du Cameroun | 270 |
| Annexe 7. Souches isolées Kisangani en 2009 et 2010..... | 271 |
| Annexe 8. Conditions climatiques pendant l'essai en 2010..... | 281 |
| Annexe 9. Conditions climatiques pendant l'essai en 2011..... | 282 |

Glossaire

Abiotique : ensemble des facteurs physico-chimiques d'un écosystème agissant sur une culture donnée, c'est-à-dire l'action du non-vivant sur le vivant.

Agroforesterie : mode d'exploitation des terres agricoles associant des plantations d'arbres dans des cultures ou des pâturages.

Amplicon : séquence d'ADN amplifiée, c'est-à-dire reproduite en plusieurs exemplaires

Anamorphe : phase asexuée ou incomplète de la vie d'un champignon.

Ascospore : spore qui se forme à l'intérieur d'un asque chez les champignons ascomycètes.

Biotique : ensemble des interactions en milieu vivant dans un écosystème.

Chlorose : jaunissement d'une plante dû au manque de chlorophylle.

Conidie : spore asexuée, non mobile, issue d'une cellule conidiogène; formée par clivage ou bourgeonnement.

Cryptogamique : fongique ou relatif aux champignons.

Cultivar : variété cultivée ne se maintenant que par multiplication végétative.

Culture *in vitro* : croissance à partir de minuscules parties d'une plante, en conditions aseptiques en milieu artificiel.

Epidémiologie : étude de la distribution des épidémies et des déterminants de la fréquence d'une maladie.

Facteur édaphique : incidence des propriétés du sol sur la culture.

Flux de gène : processus qui introduit des nouvelles variations génétiques par le retrait des frontières isolant les populations.

Fongicide : produit qui tue les champignons microscopiques qui attaquent les plantes, les animaux ou les hommes.

Génotype : ensemble des allèles d'un individu portés par l'ADN d'une cellule vivante, c'est-à-dire le patrimoine héréditaire d'un individu.

Glossaire

Germoplasme : collection de diverses espèces et variétés servant de base à l'amélioration génétique.

Haplobiontique : cycle reproductif d'une espèce vivante dans lequel la phase haploïde (n chromosomes) domine la phase diploïde ($2n$ chromosomes).

Hétérothallisme : condition de reproduction sexuée dans laquelle la conjugaison n'est possible qu'à travers l'interaction de deux thalles.

Idiomorphe : terme utilisé pour décrire les types de croisements chez les champignons qui sont extrêmement dissemblables les uns des autres et ne présentant pas d'homologie entre les souches du sexe opposé.

Inoculum : agent pathogène ou partie d'un agent pathogène qui cause une infection.

Isolat : matériel biologique prélevé sur un organisme vivant, en vue de son étude ou de sa culture *in vitro*.

Litière : ensemble des feuilles mortes et des débris végétaux en décomposition qui recouvrent le sol.

Mycélium : ensemble des hyphes d'un champignon constituant le thalle.

Nécrotique : relatif à la nécrose ; mort de cellules souvent associée à la décoloration, au noircissement ou au changement de couleur des tissus.

Phénotype : ensemble des caractères anatomiques, morphologiques, physiologiques, éthologiques caractérisant un être vivant donné.

Rhizome : partie du bananier qui supporte la partie souterraine (les racines et les rejets) et la partie aérienne (le pseudotrunc).

Ribotype : empreinte génétique d'une espèce ou d'une souche.

Séminifère : produisant des graines.

Systémique : produit pénétrant et circulant dans la plante.

Téléomorphe : étape sexuée ou parfaite dans le cycle biologique d'un champignon.

Vitroplant : plantule provenant de la micropropagation *in vitro*.

Introduction générale

Contexte

En République Démocratique du Congo (RDC), le bananier et le bananier plantain constituent, une des principales cultures d'autoconsommation de la population de la Province Orientale. Comme le manioc, le riz ou le maïs et l'huile de palme, ils sont une importante source de revenus pour les ménages (Dhed'a *et al.*, 2011). Dans le monde, la banane (banane de type dessert et plantain) constitue le principal fruit frais faisant l'objet d'importants échanges internationaux. Son importance socio-économique et nutritionnelle est considérable : bien loin de se limiter à un simple dessert, la banane joue un rôle essentiel dans la sécurité alimentaire de plus de 400 millions de personnes dans les pays en développement des zones tropicales, et constitue une source d'emploi et de revenus pour les populations locales (Arias *et al.*, 2003).

Au cours de ces dernières années, la production mondiale des bananes est passée de 95,9 millions de tonnes en 2000 à 138,7 millions de tonnes en 2010, dont environ 16% font l'objet d'un commerce international et les autres 84% sont consommés localement (FAOSTAT, 2012). Bien que l'on ait noté une augmentation de la production mondiale des bananes, celles-ci sont soumises à de nombreuses contraintes parasitaires parmi lesquelles les maladies fongiques contribuent significativement à la baisse des rendements dans les différents types de production (Daniells, 2009). Ces contraintes parasitaires peuvent néanmoins être exercées par des agents pathogènes de diverses origines (Carlier *et al.*, 2003).

Dans le cas de la production bananière, les menaces les plus importantes sont le fait de champignons (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet (1969), *M. musicola* Leach et Mulder, *M. musae* Spegazzini, *M. eumusae* Crous et

Introduction générale

Mourichon (2002) et *Fusarium oxysporum* var. *cubense*), de nématodes (*Radopholus similis*, *Helicotylenchus mulicinetus*, *Pratylenchys speijeri* n. sp. et *Meloidogyne* spp.), de virus [virus du bunchy top (BBTV) et ceux des mosaïques (mosaïque des bractées du bananier, mosaïque en plage du bananier, mosaïque en tirets du bananier)], de bactéries (certaines lignées pathogènes de *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*) ou d'insectes (le charançon *Cosmopolites sordidus*) (Mourichon *et al.*, 2000).

Quatre espèces de *Mycosphaerella*, *M. fijiensis*, *M. musicola*, *M. eumusae* et *M. musae*, sont responsables de maladies foliaires et constituent l'un des principaux facteurs limitant de la culture bananière dans le monde. Les deux premières espèces sont associées aux cercosporioses du bananier. Elles sont présentes dans la majorité de zones de production situées entre les deux tropiques (Mourichon et Fullerton, 1990). Par ailleurs, *M. eumusae* et *M. musae* des agents responsables respectivement de la maladie de taches septoriennes du bananier ou Eumusae leaf spot disease (ELSD) et de la moucheture (Leaf speckle). *M. eumusae* est présente en Inde, au Sri Lanka, en Malaisie, en Thaïlande, au Vietnam, à l'île Maurice et au Nigeria (Carlier *et al.*, 2000 ; Crous et Mourichon, 2002). Sa distribution n'est pas encore confirmée à l'échelle planétaire (Jacome *et al.*, 2003). *M. musae* est présente en Australie et en Afrique du Sud (Lassoudière, 2007). Les quatre agents pathogènes se distinguent essentiellement par les caractéristiques morphologiques des conidies et des conidiospores (Arzanlou *et al.*, 2008).

La maladie des raies noires du bananier (MRN) ou cercosporiose noire due à *M. fijiensis* est d'apparition plus récente (Rhodes, 1964) que la maladie de Sigatoka ou cercosporiose jaune due à *M. musicola*, connue et étudiée depuis longtemps. *M. fijiensis* est considéré comme le plus destructif du complexe

Introduction générale

de la maladie de Sigatoka, qui inclut les deux autres espèces du même genre, *M. musicola* et *M. eumusae* (Churchill, 2011). La MRN est largement disséminée dans le monde, son évolution est beaucoup plus rapide sur les cultivars déjà sensibles à *M. musicola* et *M. eumusae* et son spectre d'hôtes est beaucoup plus large (Mourichon *et al.*, 2000). Les lésions coalescentes sont souvent observées sur des feuilles de bananiers Cavendish de 5 ou 6 semaines et les conséquences économiques sont beaucoup plus graves puisque les pertes peuvent représenter 50% de la récolte (Lassoudière, 2007).

Très peu de travaux ont été orientés dans le sens de poser le diagnostic de la situation des maladies des bananiers en RDC en général et en Province orientale : le BBTV a été décrit à Yangambi en 1958 (Ngama, 2011), des enquêtes diagnostiques ont été faites dans le Kivu et le Bas Congo, et la situation de la cercosporiose noire du bananier sous différents systèmes de culture a été analysée à Yangambi (Mobambo, 1993). Plus récemment, une étude de l'incidence des maladies et ravageurs chez les bananiers et bananiers plantains dans la région de Kisangani a été menée (Onautshu, 2007). Cette dernière étude a révélé que la cercosporiose du bananier est parmi les principaux problèmes phytosanitaires qui affectent les bananiers de la région de Kisangani après le charançon et le BBTD. Des études menées à Yangambi (RDC) ont montré que quatre cultivars de bananier et douze cultivars de bananier plantain étaient attaqués par la MRN. Seul le cultivar de bananier Yangambi Km5 (Ibota) manifeste une tolérance à cette maladie (Mobambo, 2002).

Peu d'études ont été consacrées à l'étude de la MRN et à la caractérisation des souches responsables de cette maladie dans la région de Kisangani. Vu l'importance de la culture des bananiers et bananiers plantains, la nécessité

d'accroître la production dans cette région et la menace liée à la MRN, il est impérieux de caractériser les souches de *Mycosphaerella fijiensis* présentes sur cette culture et de mieux connaître les caractéristiques épidémiologiques de la MRN dans cette région. Ces études permettront d'évaluer la diversité des populations en présence, de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie et de développer des stratégies de lutte contre cette maladie. La sécurité alimentaire et le revenu agricole de la population de la région de Kisangani s'en trouveront ainsi améliorés.

La présente étude s'est intéressée à la caractérisation des populations impliquées dans la MRN à Kisangani pour les raisons suivantes. Tout d'abord, c'est une maladie très dévastatrice et difficile à contrôler. La lutte chimique, très importante dans d'autres régions du monde, est efficace mais engendre des effets sur l'environnement et la santé humaine, mais aussi sur les populations fongiques en raison de l'apparition des souches résistantes aux fongicides (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2006). Ensuite, la MRN est aussi une maladie polycyclique, causée par un champignon hétérothallique qui se reproduit de façon asexuée et sexuée. Le cycle asexuel permet aux souches adaptées de se multiplier tandis que le cycle sexuel est à la base des recombinaisons qui génère une diversité des populations et leur donne une capacité évolutive importante. Enfin, la MRN a pour origine géographique l'Asie du Sud-est. Elle s'est dispersée à travers le monde entier et en Afrique. Néanmoins, l'existence de populations spécifiques à certaines régions d'Afrique (Carlier *et al.*, 2003) nous a poussé à caractériser la population présente dans la région de Kisangani afin d'orienter la lutte pour éviter les pertes ou gérer la maladie dans le contexte particulier de Kisangani.

Hypothèses

Cette étude part de l'hypothèse générale qu'il existerait dans la région de Kisangani différentes souches de *Mycosphaerella fijiensis* responsables de la cercosporiose noire chez les bananiers et bananiers plantains.

Plus spécifiquement, cette étude se base sur les hypothèses suivantes :

- Il existerait dans la région de Kisangani plusieurs souches de *Mycosphaerella fijiensis* capables de se reproduire de façon sexuée et asexuée et conférant un potentiel évolutif important à la population en présence.
- Vu l'origine de la MRN en Afrique et l'existence de populations diverses spécifiques de certaines zones géographiques, il est possible que la population en présence à Kisangani soit différente des populations en présence dans les cultures industrielles des pays de la région.
- Les caractéristiques climatiques et culturelles influençant l'épidémiologie de la maladie, il est probable que la maladie évolue différemment selon les saisons et les systèmes de cultures. La connaissance des caractéristiques épidémiologiques spécifiques aux conditions de culture pourra aider à développer des stratégies de production intégrée
- Le cultivar de bananier Yangambi km5 a été identifié comme tolérant à la MRN, il serait donc aussi mieux tolérant que d'autres cultivars de bananiers et de bananiers plantains aux populations en présence dans la région de Kisangani en raison de cycle infectieux plus lent et d'une infection moins sévère.

Introduction générale

En liaison avec les hypothèses ci-haut évoquées, et pour bien cerner les stratégies à développer, cette recherche évoque les questionnements suivants :

- Ya-t-il d'autres espèces de *Mycosphaerella* pathogènes du bananier dans la région de Kisangani ?
- Quelles sont les caractéristiques des souches de *M. fijiensis* en présence dans la région ?
- L'intensité de la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani varie-t-elle suivant la saison, le système de culture et le cultivar du bananier ? Une incidence différente en jachère, en forêt secondaire et en jardin de case est-elle observée ?

La réponse à ces questions permettra de proposer des stratégies pour tenter de limiter l'impact de la MRN dans la région de Kisangani.

Objectifs

➤ *Objectif général*

De manière générale, ce travail vise à caractériser les populations de *M. fijiensis* et à étudier l'épidémiologie de la cercosporiose noire sur les bananiers et bananiers plantains les plus communs de la région de Kisangani dans le but de développer des stratégies de protection intégrée des bananiers et bananiers plantains.

➤ *Objectifs spécifiques*

De manière spécifique, cette étude vise à:

- Isoler et caractériser les souches de *M. fijiensis* sur les bananiers et bananiers plantains de la région de Kisangani;
- Evaluer la prévalence de la forme anamorphe et téléomorphe selon la saison culturale le système de culture et le cultivar;
- Etudier l'épidémiologie de la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani en saison sèche et en saison des pluies;
- Evaluer l'intensité de la cercosporiose noire du bananier selon le cultivar dans trois systèmes de culture autour de la Réserve Forestière de Masako à Kisangani.

Cette thèse rédigée sous forme d'articles est présentée en 5 chapitres regroupés en 3 parties.

La première partie présente une revue bibliographique faisant état des connaissances sur le bananier ainsi que sa culture dans la région de Kisangani (Chapitre 1) et sur la cercosporiose noire du bananier (Chapitre 2).

La deuxième partie porte sur la caractérisation des populations de *M. fijiensis* isolées de bananiers et bananiers plantains de la région de Kisangani

Introduction générale

en RDC. Les caractérisations phénotypiques et moléculaires de souches de *M. fijiensis* isolées sur les bananiers et bananiers plantains de la région de Kisangani sont présentées dans le chapitre 3. Le chapitre 4 relate les tests réalisés pour étudier la sensibilité des souches de *M. fijiensis* à plusieurs familles de fongicides.

La troisième partie est consacrée à l'épidémiologie de la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani (RDC) et est constituée d'un seul chapitre. Ce chapitre 5 rapporte les résultats d'une étude préliminaire qui visait à approfondir les connaissances relatives à l'épidémiologie de la cercosporiose noire en fonction des stades d'évolution de la maladie, des saisons et des systèmes de culture. Il relate aussi les résultats d'une étude approfondie visant à évaluer l'incidence, la sévérité et la dynamique de la cercosporiose noire dans la région de Kisangani (RDC) selon le système de culture et le cultivar.

Les principales avancées et les perspectives potentielles résultant de ce travail font l'objet d'une discussion générale qui clôture cette thèse.

Première partie

Revue bibliographique

Chapitre 1

Le bananier

1.1. Origine

Le bananier est originaire des jungles tropicales chaudes et humides du Sud-Est asiatique. Dans cette région du monde, on trouve les espèces sauvages *Musa acuminata* (génomme de type A) et *Musa balbisiana* (génomme de type B) (Swennen *et al.*, 2001). A partir de cette région, les bananiers se sont répandus à l'est en Amérique du Sud mais surtout à l'ouest à Madagascar/Zanzibar à travers les migrations indo-malaysiennes. Les bananiers ont aussi été répandus par les Arabes et les Portugais le long de la côte Est de l'Afrique d'où ils ont traversé les pays de l'Afrique centrale jusqu'en Afrique de l'Ouest (Dhed'a *et al.*, 2011).

La reconstitution historique du processus de domestication de la banane a été clarifiée par une recherche pluridisciplinaire originale. Les analyses génétiques ont permis d'identifier les ancêtres sauvages et les cultivars modernes, mais aussi d'élucider plusieurs étapes clés de la domestication du bananier. L'archéologie et la linguistique ont apporté la lumière sur les rôles historiques des peuples dans le mouvement et la culture de bananes en provenance de la Nouvelle-Guinée jusqu'en Afrique de l'Ouest au cours de l'Holocène (Perrier *et al.*, 2011). L'existence de nombreux cultivars de bananiers d'altitude en Afrique de l'Est et de plantains laisse supposer qu'ils sont cultivés depuis très longtemps en Afrique (Nyabyenda, 2006).

Selon Lassoudière (2010), Linné a peut-être attribué à la banane le nom de *Musa* en l'honneur d'Antonius Musa (63-14 ans av. J.-C.), médecin de l'empereur romain Octave-Auguste qu'il avait guéri d'une « obstruction du foie ». Deux autres origines sont aussi évoquées, l'une à partir du prophète Musa (environ 1200 ans av. J.-C.), né en Egypte et ayant suivi l'exode du peuple d'Israël de la Palestine; l'autre à partir du nom de la grande ville

commerciale d'Arabie méridionale, Muza, au centre des relations Egypte-Arabie-Inde correspondant à la cité actuelle de Moka (Lassoudière, 2010).

Quant à son histoire, les plus anciennes références au bananier datent de 500 ans avant Jésus-Christ. Une légende indienne affirme que la banane est le fruit qu'Eve a tendu à Adam. Cela explique son appellation de « fruit de paradis ». Par ailleurs, cette croyance est à l'origine du nom latin « *Paradisiaca* » donné à la banane plantain (Haicour *et al.*, 1998).

1.2. Description et classification

Le bananier est une plante herbacée vivace. Elle est herbacée car elle ne comporte pas de croissance secondaire, c'est à dire qu'après que les fruits sont parvenus à maturité, les parties aériennes fanent et s'affaissent. Elle est vivace parce que de nouveaux plants émis à la base du plant mature viennent remplacer les parties aériennes qui meurent. En effet, le bananier est dans son état d'équilibre à partir de la formation des bourgeons latéraux assurant la pérennité de la plante (Dhed'a *et al.*, 2011).

A maturité, le plant de bananier ou pied-mère se compose :

- d'une souche ou bulbe portant des racines et émettant des rejets,
- des feuilles dont les gaines, enroulées les unes dans les autres, forment le faux tronc (pseudotrunc),
- et d'un régime de fruits.

Les bananiers et bananiers plantains sont des monocotylédones géantes appartenant à l'ordre des Scitaminales ou Zingibérales et à la famille des *Musaceae*. Cette famille comporte trois genres: *Musella*, *Ensete* et *Musa*, présentant une forte variabilité (Lassoudière 2007). L'ordre de Scitaminales renferme 6 familles (Dhed'a *et al.*, 2011):

- Famille des *Strelitziaceae* avec les genres *Strelitzia*, *Heliconia* et *Ravenala*,
- Famille des *Lowiaceae* avec le genre *Orchidantha*,
- Famille des *Zingiberaceae* avec les genres *Zingiber* et *Hedichium*,
- Famille des *Maranthaceae* avec le genre *Marantha*,
- Famille des *Cannaceae* avec le genre *Canna*,
- Famille de *Musaceae* avec les genres *Musa* et *Ensete*.

Le genre *Musa* est divisé en quatre sections (*Australimusa*, *Callimusa*, *Eumusa*, *Rhodochlamus*) sur base du nombre de chromosomes et de caractéristiques morphologiques, parmi lesquels *Eumusa* (n=11) est la seule section qui a donné des espèces parthénocarpiques. Il comprend en outre 10 espèces dont les deux espèces principales sont *Musa acuminata* (AA) et *Musa balbisiana* (BB). La contribution haploïde de *M. acuminata* et de *M. balbisiana* aux bananiers est indiqué respectivement par A et B (Lassois *et al.*, 2009; Simmonds et Shepherd 1955).

La majorité des bananes comestibles proviennent des espèces *Musa acuminata* et du croisement *M. acuminata* x *M. balbisiana*. Par ailleurs, il existe différentes espèces du genre *Musa* : *Musa flaviflora*, *Musa itinerans*, *Musa basjoo*, *Musa sikkimensis*, *Musa cheesmani*, *Musa schizocarpa*, *Musa balbisiana*, et *Musa acuminata* qui contient au moins 5 sous-espèces (Dhed'a *et al.*, 2011).

1.3. Distribution et diversité génétique

Le genre *Musa* compte plus de 1000 variétés de bananes parmi lesquelles les cultivars les plus importants sont les bananes de type dessert (AAA pour la plupart) et les bananes à cuire (AAA, AAB et ABB). La classification des

principaux cultivars du genre *Musa* à fruits comestibles (Bakry *et al.*, 1997) est présentée en annexe 1. Les variétés AA sont majoritairement rencontrées en Asie du Sud-Est (Figure 1.1). Quelques variétés AB ont été répertoriées en Afrique de l'Est et en Inde. Les variétés triploïdes AAA (bananes dessert et à cuire), AAB (plantains et bananes à cuire) et ABB (bananes à cuire) sont largement distribuées dans le monde, notamment en Amérique latine et centrale, aux Caraïbes, en Asie du Sud et du Sud-Est et en Afrique (Jones, 2000 ; Lassoudière, 2007).

Les principaux cultivars des bananiers et bananiers plantains rencontrés dans la région de Kisangani, dans le District de la Tshopo en Province orientale (RDC) sont indiqués dans le tableau 1.1.

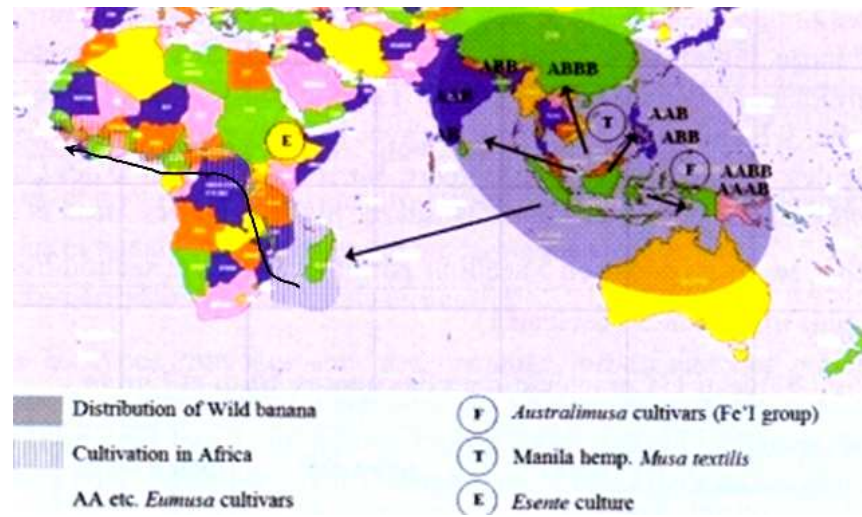


Figure 1.1. Distribution des bananiers dans le monde
(Dhed'a *et al.*, 2011).

Tableau 1.1. Principaux cultivars du genre *Musa* rencontrés dans le District de la Tshopo en Province orientale (RDC) (Adheka, 2009).

| Cultivars | Génotypes | Synonymes |
|---|------------------|--|
| <i>Bananes dessert</i> | | |
| Figue Pomme | AAB | Elengi Eyei (Lingala)* |
| Figue Rose | AAA | Kitika Rouge (Swahili) |
| Grande Naine | AAA | Délavé, Commando |
| Gros Michel | AAA | Mwasi Zoba, Lux |
| Kamaramasenge | AAB | Kitika Sukali |
| Petite Naine | AAA | Kitika ya Bakumu |
| Prata | AAB | Mafuta (Swahili ou Lingala) |
| Yangambi Km5 | AAA | Ibotabota |
| <i>Bananes à cuire</i> | | |
| Bisamunyo | AAA | |
| Pisang Awak | AAB | Kitika Ndizi (Swahili) |
| <i>Bananes plantains "type French"</i> | | |
| Adili | AAB | Losau |
| Afati | AAB | Nekwele (Bali), Alinga Mboka (Lingala) |
| Akpasi | AAB | Mabele ya Baseka (Lingala) |
| Aleke | AAB | Mabele ya Baseka (Lingala) |
| Amakoko I | AAB | |
| Amungu | AAB | Amuku |
| Bogo | AAB | |
| Boloma Ise | AAB | |
| Bofo | AAB | |
| Bofo Noir | AAB | Ifelete Bolome (Topoke) |
| Basakaraka I | AAB | Ndika |
| Bosakaraka II | AAB | Moemba |
| Bosua | AAB | Liondo li Bolome |
| Chwachwa | AAB | Liondo li Bolome |
| French Rouge I | AAB | |
| French Rouge II | AAB | Esende |
| Inekele Ikumi | AAB | |
| Libanga | AAB | |
| Liboelabokoi | AAB | |

| | | |
|---|------|---|
| Litete | AAB | Okali o Nkoyi (Mbole), Molenga (Ngando) |
| Magoma I | AAB | Mayaya |
| Ndika Tinda | AAB | |
| ongua | AAB | |
| Yumba | AAB | Asugbe (Bali) |
| Yumba Noir | AAB | Moikili (Ngelema) |
| <i>Bananes plantains "type Faux corne"</i> | | |
| Akoto | AAB | Imbelenga (Ngelema), Imbenga (Turumbu) |
| Amakake | AAB | Ifelete, Ifelengete (Ngando) |
| Ambulu Multiple | AAB | Double Crane |
| Ambulu Vert-Sombre | AAB | Adili |
| Apoka | AAB | Anena (Ngelema) |
| Apoka Magbuse | AAB | |
| Bopketa | AAB | Inkele Ikumi (Turumbu) |
| Egbe-o-Mabese I | AAB | Nganganga, Mocheche (Ngelema) |
| Libanga Lifombo | AAB | Ambulu, Kasomba (Ngando), Sombo (Manga) |
| Libanga Likale | AAB | Ambulu, Avuka (Lengola), Ebanga (Turumbu) |
| Libanga Noir | AAB | Ambulu |
| Lingu | AAB | Tala, Loose (Turumbu), Manimani |
| Nkalia | AAB | |
| <i>Bananes Plantains "type Vrai corne"</i> | | |
| Ikpolo Noire | AAB | |
| Ikpolo Rouge | AAB | |
| Ikpolo Vert | AAB | |
| Lokusu | AAB | Lasase, Bombili, Etate, Ikpolo |
| Molengo | AAB | Moikili (Ngelema) |
| Tala Lola | AAB | Kuli (Swahili), Chwambo (Manga) |
| <i>Bananes Plantains "type French corne"</i> | | |
| Agbe-o-Mabese II | AAA | Nganganga (Ngelema) |
| <i>Hybrides</i> | | |
| FHIA 03 | AABB | |

* Les noms entre parenthèses sont les noms en dialecte local de la Province orientale.

Dans le District de la Tshopo, le Faux corne Libanga Likale est le plus représentatif de tous les cultivars dans les fermes (70,41%), suivi du French Litete (7,75%) et du Vrai corne Lokusu (2,1%). Pour les bananes dessert, le cultivar Gros Michel est le plus représentatif (3,65%), suivi de Yangambi Km5 (3,55%). Les autres cultivars représentent chacun moins de 2% (Dhed'a *et al.*, 2009).

La variabilité génétique du bananier a fait l'objet de plusieurs études au cours desquelles les marqueurs moléculaires tels que les polymorphismes de longueur de séquences simples répétées (SSRLP) (Tenkouano *et al.*, 1999), les polymorphismes de longueur des fragments d'amplification (AFLP) (Ude *et al.*, 2002a ; Ude *et al.*, 2002b) ainsi que les polymorphismes de longueur de fragments de restriction (RFLP) (Ude *et al.*, 2002a). Ces études ont montré une grande diversité entre les sections du genre *Musa* et entre les différentes variétés d'une même section. Elles ont également permis de mettre en évidence quelques variétés pouvant être considérées comme des sources potentielles exploitables dans l'amélioration génétique du bananier en vue d'une meilleure production (Ude *et al.*, 2002a).

Plus récemment, le génome de 523 mégabases du génotype double haploïde de *Musa acuminata* a été décrit. La séquence désormais disponible permet d'accéder à l'ensemble des gènes de cette plante (plus de 36.000) et à leur position le long de ses onze chromosomes. Cette connaissance facilitera considérablement l'identification des gènes responsables de caractères tels que la résistance aux maladies et la qualité des fruits. Elle fournira au final une aide essentielle à l'amélioration des variétés de bananiers à partir des

nombreuses ressources génétiques disponibles dans le monde (D'Hont *et al.*, 2012).

De nouvelles variétés de bananiers, notamment de bananes à cuire, ont été créées pour faire face à la pression parasitaire et pour satisfaire la demande des consommateurs. Cependant, des progrès restent à faire sur les qualités culinaires et gustatives en comparaison avec les variétés traditionnelles. Le besoin en nouvelles variétés concerne aussi bien la banane dessert que la banane à cuire, qu'elles soient destinées à l'exportation, à l'autoconsommation ou aux marchés nationaux (Abadie *et al.*, 2003 ; Lassoudière, 2007).

1.4. Importance socio-économique et alimentaire du bananier

Les bananes et bananes plantains jouent un rôle important sur les plans économique, culturel et nutritionnel dans le monde entier et particulièrement dans les pays en développement des régions tropicales (Dadzie et Orchard, 1997). Ils font partie des principaux aliments de base dans les pays producteurs et constituent une source considérable d'emploi et de revenus à travers les marchés locaux et internationaux (Frison et Sharrock, 1999).

Le bananier constitue le quatrième produit agricole en termes de production mondiale après le riz, le blé et le maïs. Il occupe le premier rang de la production fruitière, avec un peu plus de 145 millions de tonnes produites en 2011 à l'échelle mondiale (Ganry *et al.*, 2012).

La répartition de la production mondiale des bananes et bananes plantains en 2011 est présentée dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2. Répartition mondiale de la production bananière en 2011 (FAOSTAT, 2012).

| Continent | Pays | Banane | Banane plantain |
|------------------|---------------|---------------|------------------------|
| Afrique | Cameroun | 1.376.000 | 3.400.000 |
| | RCA | 162.799 | 109.265 |
| | Côte d'Ivoire | 317.727 | 1.559.210 |
| | RDC | 408.900 | 1.552.060 |
| | Ghana | 60.000 | 3.619.830 |
| | Kenya | 1.197.990 | 31.000 |
| | Rwanda | 44 | 3.036.270 |
| | Uganda | 522.945 | 10.547.400 |
| | Angola | 2.646.070 | - |
| | Burundi | 1.848.730 | - |
| | Amérique | Costa Rica | 1.937.120 |
| Guadeloupe | | 58.000 | 7.620 |
| Guatemala | | 2.680.390 | 188.755 |
| Panama | | 340.342 | 97.432 |
| Peru | | - | 1.967.920 |
| Venezuela | | 415.693 | 488.878 |
| Brésil | | 7.329.470 | - |
| Asie | | Chine | 10.705.740 |
| Inde | 29.667.000 | - | |
| Thaïland | 2.036.430 | - | |
| Viet Nam | 1.523.430 | - | |
| Philippines | 9.165.040 | - | |
| Europe | Italie | 351 | - |
| | Portugal | 3.0181 | - |
| | Espagne | 346.500 | - |
| | Turquie | 206.501 | - |

La valeur culturelle des bananes est considérable dans plusieurs régions. Dans la légende hindoue en Inde, la banane était considérée comme le fruit interdit du jardin d'Eden. Elle est le symbole de la fertilité et de la prospérité dans de nombreuses communautés d'Asie du Sud, et est fréquemment

exposée dans les cérémonies nuptiales (Frison et Sharrock, 1999 ; Kagy, 1999).

La grande majorité des bananes produites sont consommées localement et jouent ainsi un rôle important dans la sécurité alimentaire. La plupart des cultivars sont riches en sels minéraux (potassium, calcium, phosphore) et en vitamines A, B et C (Ploetz, 1994). Ils sont consommés crus ou cuits, ou bien transformés en fibres (*Musa textilis*), en bière, en farine, en alcool et en vinaigre (Dadzie et Orchard, 1997 ; Frison et Sharrock, 1999 ; Tchango Tchango et Ngalani, 1999). Les bananiers et bananiers plantains occupent donc aujourd'hui une grande importance dans l'alimentation. Quasiment toutes les parties de la plante peuvent être utilisées d'une manière ou d'une autre. Ce sont donc des plantes ressources: rien ne se perd, tout est utilisé. En Inde, par exemple, le cultivar Kalpatharu est la plante de toutes les vertus : le fruit est consommé en dessert et préparations culinaires, les feuilles servent d'assiettes pour le dîner, le bourgeon mâle est cuit comme un légume, les racines servent en décoction médicale, l'extrait naturel du pseudotrunc est utilisé comme complément alimentaire, la sève est utilisée comme encre indélébile et les résidus de culture sont compostés (Lassoudière, 2010).

1.5. Valeurs nutritionnelles

Le bananier est avant tout une plante alimentaire cultivée pour ses fruits consommables frais (bananes desserts) ou cuits (plantains) qui constituent un aliment riche et relativement complet. Il a été suggéré que l'homme peut tout à fait bien vivre avec une alimentation de bananes et du lait. En outre, la banane est aisément digestible et constitue souvent la première nourriture solide donnée aux enfants dans les tropiques (Schoofs, 1997).

Les bananes et bananes plantains sont une source riche en sucre : 22% de la portion comestible dans la banane dessert et 31% dans le plantain. Ils sont de plus, riches en minéraux comme potassium, calcium et phosphore, vitamine C (banane) et vitamine A (plantain). De tous les fruits connus, la banane contient le plus de protéines. Elle contient en plus du magnésium, du sodium, du sélénium. Elle ne contient pas de chlorure de sodium, c'est pourquoi on la trouve dans tous les régimes sans sel (Krishnamoorthy, 2002). En outre, elle ne contient pas de cholestérol.

Le tableau 1.3 donne les valeurs nutritionnelles de bananes et bananes plantains pour 100 grammes.

Tableau 1.3. Valeurs nutritionnelles des bananes et bananes plantains par 100 g (Sharrock et Lusty, 2000).

| Substance | Banane | Banane plantain |
|-------------------------------|---------------|------------------------|
| Eau (g) | 74,26 | 65,28 |
| Energie alimentaire (Kcal) | 92 | 122 |
| Protéines (g) | 1,03 | 1,3 |
| Graisse (g) | 0,48 | 0,37 |
| Hydrate de carbone (g) | 23,43 | 31,89 |
| Calcium (mg) | 6 | 3 |
| Fer (mg) | 0,31 | 0,6 |
| Potassium (mg) | 396 | 499 |
| Sodium (mg) | 10 | 4 |
| Vitamine C (mg) | 9,1 | 18,4 |
| Thiamine (mg) | 0,045 | 0,052 |
| Riboflavine (mg) | 0,1 | 0,054 |
| Niacine (mg) | 0,54 | 0,686 |
| Vitamine A (UI) | 81 | 1127 |
| Acides gras saturés (g) | 0,185 | 0,143 |
| Acides gras monoinsaturés (g) | 0,041 | 0,032 |
| Acides gras polyinsaturés (g) | 0,089 | 0,069 |

UI : Unités internationales

1.6. Exigences écologiques

Les bananiers et bananiers plantains sont cultivés dans les zones agro-écologiques situées entre 30° latitudes Nord et Sud (Dhed'a *et al.*, 2011). Ils peuvent aussi être cultivés, en dehors de cette zone, dans les régions subtropicales libres de gels comme en Israël, en Afrique du Sud ou aux Iles Canaries.

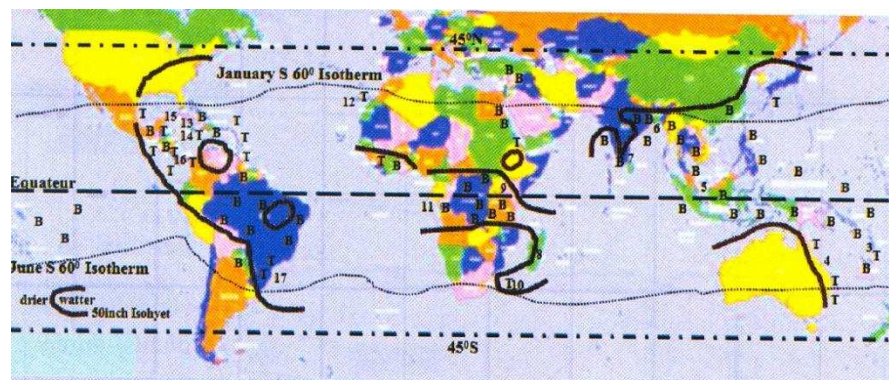


Figure 1.2. Zones agro-écologiques des bananiers et bananiers plantains
(Dhed'a *et al.*, 2011).

Le bananier est une plante de climat humide, appréciant une hygrométrie élevée et un bon ensoleillement, mais craignant les vents et les variations brusques de température (Skiredj *et al.*, 2005), il est sensible aux basses températures et à la lumière. Les sols dans lesquels sont implantées les bananeraies sont extrêmement variés dans le monde. On ne peut dissocier le facteur sol du facteur climat (pluviométrie, température) ni dissocier ces deux facteurs du facteur plante. En ce qui concerne le sol, ce sont plutôt les propriétés physiques (structure grumeleuse, capacité de rétention en eau et en minéraux, porosité...) qui sont essentielles, l'aspect chimique (pH, disponibilité des nutriments...) pouvant être plus facilement modifié (Lassoudière, 2007).

1.6.1. Facteurs climatiques

Le bananier est une plante exigeante en eau : ses racines n'absorbent aisément que le tiers de la tranche dite habituellement utile, le sol doit donc être suffisamment pourvu en eau. En climat chaud et humide, on considère généralement que les besoins sont couvertes avec 35 mm de précipitations par semaine, soit environ 1820 mm de pluies réparties sur toute l'année (Dhed'a *et al.*, 2011).

L'optimum de la température se situe dans l'intervalle de 25 à 30°C. Au delà de 35 à 40°C et en deçà de 14°C, des anomalies surviennent. Les feuilles accusent un retard de croissance qui se manifeste par une lente émission de feuilles plus courtes (Swennen et Vuylsteke, 2001). Le bananier est sensible au froid, exception faite de quelques variétés (par exemple le bananier des Canaries) pour lesquelles une température de 12°C n'est pas fatale, mais constitue la limite inférieure (Vandenput, 1981). Les feuilles jaunissent à des températures de 4 à 6°C (CIRAD-GRET, 2002). Le refroidissement

endommage les fruits qui périssent lorsqu'ils sont exposés à moins de 0°C (Swennen et Vuylsteke, 2001).

Le bananier supporte des fortes insolation si l'approvisionnement hydrique est suffisant. La nébulosité ralentit la végétation et augmente la taille des rejets. Le manque de lumière agit donc sur la hauteur des plants et peut faire « filer » les rejets (Lassoudière, 2007).

Le vent est aussi un facteur climatique important. D'une part, il augmente le flux transpiratoire par l'ouverture des stomates, mais en plus, il engendre souvent la lacération des limbes réduisant ainsi la capacité photosynthétique et, par conséquent, le rendement. Les vents violents peuvent provoquer des dommages considérables, soit en brisant les feuilles aux pétioles, soit en cassant les pseudo-troncs (Dhed'a *et al.*, 2011) ou encore en déracinant complètement la plante (Brun, 1963).

1.6.2. Facteurs édaphiques

Vu la richesse des fruits qu'il produit, le bananier est une plante exigeante en éléments minéraux. Les éléments minéraux indispensables à son développement sont l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium et le magnésium. Ils sont souvent apportés sous forme d'engrais organiques comme le fumier, le compost, les engrais biologiques et les déchets agro-industriels (Laprade et Ruiz, 1999). Le bananier préfère des conditions neutres à modérément acides, cependant il peut se développer dans une gamme de pH assez large, de 4,5 à 8,5 (Delvaux, 1995). Un sol léger, profond et peu caillouteux de type sablo-limoneux ou argilo-limoneux convient parfaitement à sa croissance (Tezenas Du Montcel, 1985).

La croissance et le rendement de la plante dépendent largement de la fertilité du sol (Swennen et Vuylsteke, 2001). Le cycle végétatif du bananier varie d'ailleurs entre 8 et 18 mois selon les cultivars mais aussi les conditions de culture et notamment la fertilité du sol (Champion, 1963). Les bananiers pour l'exportation cultivés en systèmes intensifs sont souvent cultivés sur des andosols d'origine volcanique au Cameroun, en Guadeloupe et au Costa Rica (Rufyikiri, 2000). En milieu tropical, le bananier se développe sur des sols profonds, bien drainés, avec une teneur en matière organique élevée (Swennen et Vuylsteke 2001). La richesse du sol en humus est aussi un facteur déterminant dans la production bananière. C'est pourquoi les sols forestiers lui conviennent le plus (Lassoudière, 2012).

1.7. La culture du bananier en RDC et dans la région de Kisangani

En République Démocratique du Congo, le bananier et le bananier plantain, comparativement à d'autres cultures occupent la deuxième place dans la production nationale après le manioc selon les statistiques nationales. Avec une production annuelle de 1.960.960 tonnes en 2011 (FAOSTAT, 2012), les bananiers et les bananiers plantains en particulier représentent les cultures alimentaires parmi les plus importantes en RDC. Dans la région de Kisangani, en région forestière Nord-Est de la cuvette centrale congolaise, les bananiers plantains constituent aussi la deuxième culture après le manioc et jouent de ce fait un rôle très important dans la sécurité alimentaire et le revenu de la population (Dhed'a *et al.*, 2009). La Province orientale est la première en termes de production avec environ 31,1%, malheureusement, toute sa production est consommée localement.

A Kisangani, six axes de ravitaillement en produits agricoles du centre ville sont concernés par la production bananière : Opala, Ituri, Banalia, Ubundu, Lubutu et Yangambi. La production la plus importante provient de l'axe Opala. Le matériel de plantation utilisé par les agriculteurs est constitué essentiellement des rejets provenant des anciens champs ou des champs voisins et ne subissent aucun traitement. L'âge du champ est d'environ 3 ans suivi de son abandon pour permettre à la forêt de se reconstituer et favoriser ainsi la fertilisation du sol. Le prix du régime a tendance à baisser au fur et à mesure qu'on s'éloigne des centres de grande consommation. Ceci se justifie d'une part, par l'abondance relative du produit et d'autre part, par la difficulté d'accès au marché (Dhed'a *et al.*, 2009).

Plusieurs personnes sont impliquées dans le circuit bananier (Figure 1.3) et tirent leurs revenus dans cette activité : les producteurs, les commerçants intermédiaires, les transporteurs et les vendeurs détaillants. Le mauvais état de route et le manque de moyen de transport adéquat ont conduit la population à utiliser d'autres moyens tels le vélo, la pirogue à pagaie, le radeau ou même la charrette entraînant ainsi une hausse de prix sur le marché.

La banane est consommée dans cette région soit sous forme de frites, de beignets, ou encore sous forme séchée et transformée en farine pour donner également une pâte. Plusieurs plats (mets) sont préparés à partir des bananes plantains. Les plantains non mûrs ou à moitié mûrs sont consommés bouillis (Makenge) ou pillés en une pâte très appréciée (Lituma). Celle-ci peut comporter un mélange de manioc bouilli et pillé en proportions variables suivant le goût ou la disponibilité de l'un ou l'autre composant. Le plantain séché peut être transformé en farine pour faire une pâte. Les fruits mûrs de

bananes sont utilisés comme dessert et ou utilisés comme matière première dans la préparation des boissons alcoolisées locales (Dhed'a *et al.*, 2009).



Figure 1.3. Activités bananières à Kisangani (Dhed'a *et al.*, 2009).

(A) Transport par vélo (Kumbakumba) ; (B) Transport par vélo (Toleka) ;
(C) Transport par pirogue ; (D) Transport par radeau.

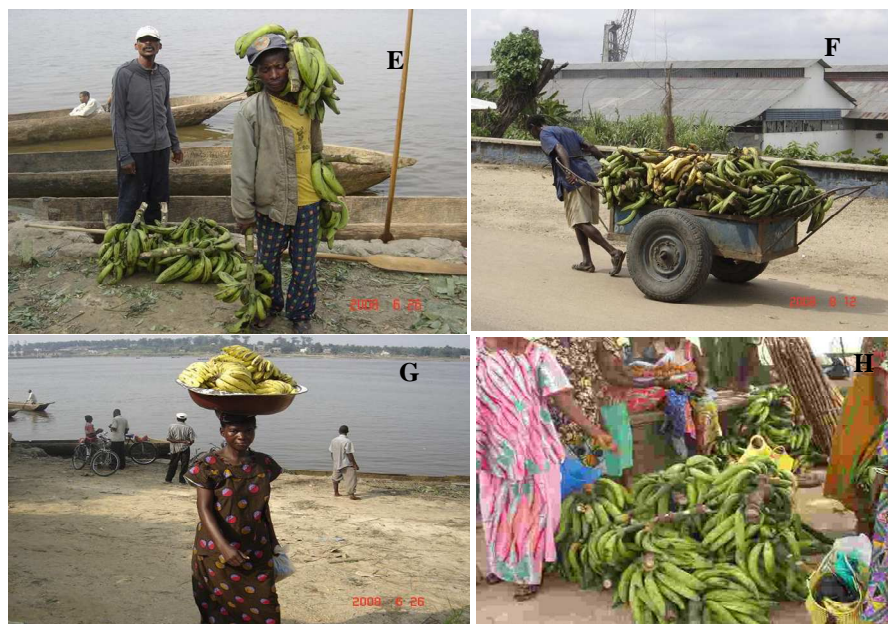


Figure 1.3. Activités bananières à Kisangani (Dhed'a *et al.*, 2009) (suite).
(E) Arrivage des bananes au beach ; (F) Transport par charrette ;
(G) Vente en ambulatoire ; (H) Vente en gros.

1.8. Systèmes de culture en RDC et à Kisangani

En RDC, le bananier est cultivé à différentes altitudes et sa production est distribuée à travers tout le pays, sur de grandes et petites exploitations. Dans le pays et dans la région de Kisangani en particulier, la culture se pratique en trois systèmes : dans les périphéries, les bananiers sont cultivés dans les champs paysans souvent en association avec d'autres cultures (riz, manioc,...), en forêt secondaire vieille ou en jachères et dans le centre ville, le bananier est en culture de case. Le principal système de culture serait le jardin de case où les bananiers sont plantés tout autour des maisons pour l'autosuffisance alimentaire (Onautshu, 2007).

Les particularités des trois systèmes de cultures sont détaillées ci-dessous.

La forêt secondaire vieille (FSV) est une forêt qui se régénère naturellement ou artificiellement à partir d'une végétation forestière autochtone âgée de plus de 20 ans et qui dénote des différences marquées dans la structure de la forêt et/ou de la composition des espèces du couvert par rapport aux forêts voisines plus jeunes (Brown et Lugo, 1990). Ce biotope est caractérisé par l'association des espèces d'arbres comme *Petersitus macrocarpus* et *Zanthoxylum gilleti*. En outre, la forêt secondaire elle-même est subdivisée en forêt secondaire jeune et vieille qui diffère de la forêt primaire (FP) par l'absence de grands arbres émergeant tels que *Gilbertiodendron dewevrei* malgré la présence de quelques jeunes individus (Lissingi, 2010).

Ce type d'écosystème présente quelques particularités. La forêt protège le sol contre l'action des agents atmosphériques : agressivité des pluies et érosion, régulation des régimes thermiques et hydriques. Elle assure le stockage biologique des éléments minéraux ainsi soustraits du risque de lixiviation qui existe au niveau du sol et représente le principal facteur de richesse de l'écosystème. Il a ainsi été estimé en basse Côte-d'Ivoire, d'après Bernhart-Reversat (1975), que 90% des éléments minéraux d'origine tellurique de l'écosystème forestier (P, Ca, Mg, K : minéralomasse + formes assimilables du sol de 0 à 50 cm) sont retenus dans la végétation. En milieu tropical, la forte concentration de racines et mycorhizes à la partie superficielle du sol (Rambelli *et al.*, 1983), assure en outre un recyclage efficace des éléments minéraux provenant des litières dont les restitutions et la minéralisation rapide s'étalent sur toute l'année.

La jachère est un système de culture traditionnel de l'utilisation des sols qui consiste en un abandon de culture pendant une période donnée suite une baisse de rendements des cultures et de la fertilité du sol, un envahissement

par des mauvaises herbes ou des parasites. La phase de jachère s'étend de 10 à 30 ans selon le climat et permet de recouvrer la fertilité du sol grâce à une exploitation du sol moins intensive et au retour à une savane arbustive ou arborée (Bodian *et al.*, 1998).

La jachère est donc source de bois. Elle produit des petits fruits, des plantes médicinales et sert de pâturage. Elle peut être arbustive ou herbacée. On y distingue des espèces comme *Musanga cecropioides*, *Harungana madagascariensis*, *Coloncola subtomentosa*, *Aframomum* sp. Elle protège le sol de l'érosion et permet la reprise de l'activité faunique du sol après culture. Elle permet la régénération des sols, par l'augmentation des stocks de matière organique et des éléments nutritifs (César et Zoumana, 1991).

Les jardins de case sont des systèmes d'exploitation permanents de culture et d'élevage, stratifiés et très diversifiés, situés autour des maisons et où l'accent est mis sur les espèces végétales domestiques à usages multiples, ligneuses et herbacées. Ils sont d'un intérêt écologique et/ou économique inestimable pour l'homme dans la mesure où leur composition, leur gestion et leur production sont étalées sur toute l'année de façon continue.

Dans la région de Kisangani, la plupart des bananiers sont cultivés dans l'arrière-cour ou les jardins de case (Figure 1.4) d'une superficie variant entre 0,5 à 4 ha. Cinq à quinze variétés des bananiers et bananiers plantains y sont cultivées ensemble (Dhed'a *et al.*, 2011).



Figure 1.4. Bananiers en jardin de case (Dhed'a *et al.*, 2011).

1.9. Maladies et ravageurs du bananier

Il existe une diversité importante de parasites du bananier dans le monde (Lassoudière 2007).

1.9.1. Les maladies bactériennes

1.9.1.1. Le flétrissement bactérien du bananier

La première description d'une maladie causée par *Xanthomonas campestris* *pv. musacearum* a été faite par Yirgou et Bradbury (1968) sur l'ensete (*Ensete ventricosum*) en Ethiopie. Elle était connue sous le nom de « flétrissement bactérien de l'ensete ». La sensibilité du bananier à cette maladie était connue, mais comme les bananiers ne sont pas une culture importante en Ethiopie, le flétrissement du bananier causé par *Xanthomonas* n'était pas considéré comme une menace importante (Ploetz, 2004).

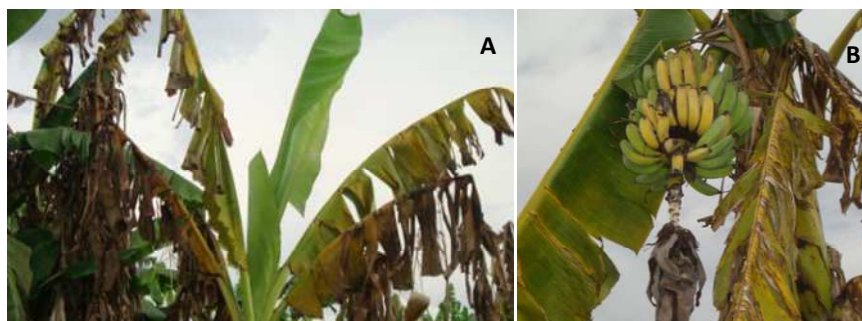


Figure 1.5. Symptômes du flétrissement bactérien du bananier causé par *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* : (A) Flétrissement et rupture des feuilles au niveau du tiers supérieur; (B) Pourriture de la fleur mâle et des bananes causées par BXW (Source : Bizimana *et al.*, 2012).

En Afrique, cette maladie a émergé en Ethiopie et a progressivement disséminé en Afrique de l'Est (Tanzanie), puis en Afrique Centrale (Ouganda) où elle s'est implantée avec force. Approximativement un tiers du territoire ougandais de culture de bananier est affecté par la maladie rendant les fruits non comestibles et décimant les plants. La maladie s'est propagée au Kenya, au Burundi, au Rwanda et en RDC (Karamura, 2006).

Les symptômes les plus communément observés sont le flétrissement et le mûrissement prématuré du régime, parfois moins d'un mois après son émergence. Parmi les plantes qui ont fleuri, les feuilles peuvent présenter des symptômes de flétrissement alors que les régimes finissent par mûrir et peuvent aussi pourrir. Chez les plantes sévèrement affectées, le bourgeon mâle apparaît flétri et parfois décoloré. La hampe du bourgeon floral montre une décoloration qui progresse de la base du bourgeon mâle vers le régime. Une sécrétion de couleur crème, typique de nombreuses infections bactériennes, peut être aperçue dans la zone la plus proche du bourgeon mâle (Ndungo, 2005).

1.9.1.2. La maladie de Moko

La maladie de Moko est causée par *Ralstonia solanacearum* (biovar 1 race 2) ex *Pseudomonas solanacearum*. Elle est largement répandue chez les cultivars de bananes à cuire des Philippines où elle est appelée maladie de bugtok. Elle se confond aisément avec la maladie fongique, la fusariose du bananier causée *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. La distinction entre se deux maladies se fait quand les fruits sont atteints. En effet, lorsqu'une pourriture brune et subsèche s'observe sur ceux-ci, il s'agit de la maladie du Moko. Sur les plantes jeunes et à croissance rapide les feuilles les plus jeunes virent au vert pâle ou au jaune et s'affaissent. En l'espace d'une semaine toutes les feuilles peuvent ainsi s'affaïsser. Les jeunes repousses peuvent noircir, se rabougrir ou se tordre (Hayward, 1983). La bactérie peut être isolée à partir de la substance laiteuse qui suinte des bractées détachées des inflorescences mâles infectées. On peut également l'isoler à partir des gouttelettes d'exsudat bactérien, variant en couleur du blanc au jaune ou au brun rougeâtre, qui suintent des pédoncules coupés placés en milieu humide (Soguilon *et al.*, 1995). La transmission de la maladie est facilitée par des insectes, les thrips (Eden-Green, 1994).



Figure 1.6. Pourriture brune et subsèche observée sur les fruits du bananier atteint par la maladie de Moko (Source : Yabuuchi *et al.*, 1996).

1.9.1.3. La maladie du sang du bananier

La maladie du sang du bananier est causée par une bactérie Gram négatif appelée *Pseudomonas celebensis*. Elle a été signalée la première fois il y a environ 80 ans, en Indonésie, dans le sud de Sulawesi (ancien archipel des Célèbes). Elle se rencontre communément chez le cultivar Pisang Kepok (ABB/BBB. 'Saba'), mais d'autres groupes sont également affectés. Les symptômes sont similaires à ceux de la maladie de Moko, mais varient selon le stade de croissance de la plante et selon le mode d'infection. On observe sur les feuilles entièrement déployées des plants de tous âges un jaunissement transitoire très apparent, une perte de turgescence, une dessiccation et une nécrose. Chez les plants matures, la base du pétiole s'affaisse, et les feuilles flétries pendent alors autour du pseudo-tronc. Les feuilles les plus jeunes cessent d'émerger et des plaques blanchâtres, puis nécrotiques, apparaissent sur leur limbe (Eden-Green, 1994).



Figure 1.7. Symptômes de la maladie du sang du bananier. (A) Décoloration et affaissement du feuillage ; (B) Coupe transversale d'un pseudotrunc mature (Source : (Eden-Green, 1994).

Maladies virales

1.9.2.1. Maladie de Bunchy Top du bananier (BBTD)

Cette maladie est causée par un virus, appelé *Banana bunchy top virus* (BBTV). Ce dernier a des petites particules isométriques, dont le génome est constitué d'ADN monocaténaire à plusieurs composantes. La maladie se transmet par un Aphidae, le puceron du bananier (*Pentalonia nigronervosa*) et puis se propage par multiplication végétative des plants infectés (Lepoivre, 2003).

Les plants infectés par le Bunchy top exhibent divers symptômes. Lorsque la maladie est avancée, ils prennent l'apparence de la rosette, avec des feuilles étroites, dressées et progressivement de plus en plus courte, d'où l'appellation de « Bunchy top » (sommet touffu) (Thomas *et al.*, 1994).



Figure 1.8. Principaux symptômes de maladie de Bunchy Top du bananier. (A) décoloration des feuilles ; (B) feuilles en bouquet dressé vers le haut (Source : Bizimana *et al.*, 2012).

1.9.2.2. Mosaïque des bractées du bananier

L'agent causal de cette maladie est un Potyvirus, le virus de la mosaïque des bractées du bananier (BBrMV). Elle se caractérise par l'apparition d'une mosaïque brune sur les bractées des bananiers infectés, les décolorations et pigmentation du pseudo-tronc. Les fruits présentent des mosaïques verts/jaune importantes. On observe également des traits colorés en forme de fuseaux sur le limbe des jeunes feuilles qui disparaissent très rapidement lorsque la feuille devient mature (Thomas *et al.*, 1999).

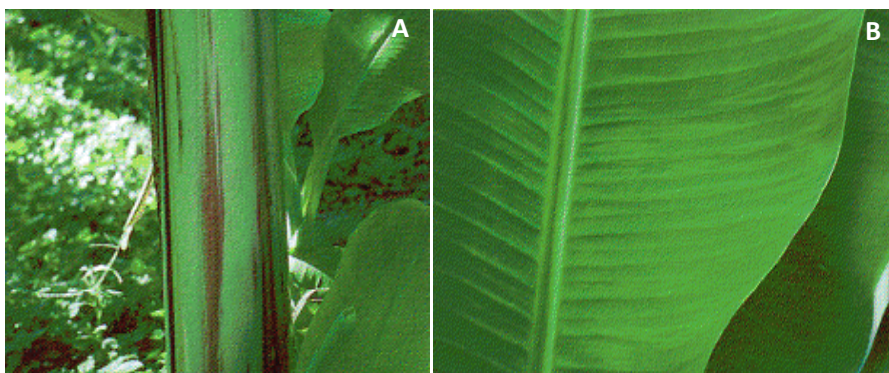


Figure 1.9. Symptômes de la mosaïque des bractées du bananier. (A) Mosaïque et lésions fusiformes sur le pseudotronc ; (B) Lésions chlorotiques fusiformes sur le limbe d'une feuille (Source : Thomas et Magnaye, 1996).

1.9.2.3. Mosaïque en plages du bananier

La mosaïque en plages du bananier est due au virus de la mosaïque du concombre (CMV) dont 2 groupes sérologiques sur 3 ont de l'importance. Ce virus a une large gamme d'hôtes. Les attaques étaient sporadiques, localisées. Elles sont devenues fréquentes sur les vitroplants; l'expression des symptômes est maximale 2 à 3 mois après plantation. La contamination a lieu en pépinière ou au champ. Les causes de la plus grande sensibilité sont inconnues (Sarah *et al.*, 1990).

La mosaïque apparaît entre la nervure centrale et les bords des feuilles infectées. La mort de la feuille peut suivre dès l'émergence. Ces symptômes peuvent être forts ou peu prononcés sur certaines feuilles ou totalement absents sur d'autres (Cirad-Gret, 2002).



Figure 1.10. Mosaïque en plage du bananier (Source : Loassoudière, 2007).

1.9.2.4. Striure du bananier ou mosaïque en tiret

Cette maladie est causée par un virus qu'on appelle *Banana streak virus* (BSV). Ce virus a la particularité d'avoir des parties de son génome intégrées dans le génome de la plante hôte. Au moins cinq souches virales différentes sont intégrées au génome de l'espèce *Musa balbisiana* (noté B) (Ndowora *et al.*, 1999 ; Lheureux *et al.*, 2003). La maladie se caractérise par des tirets jaunes sur le limbe des feuilles formant des mosaïques chlorotiques, évoluant en nécroses. Leur observation est facilitée par observation en transparence des feuilles vis à vis d'une source de lumière (le soleil). La sévérité des symptômes dépend de/des souches virales présentes, de la nature du cultivar infecté et des conditions environnementales.

L'apparition des symptômes est la plupart du temps dépendante des conditions de températures. Ainsi, des bananiers peuvent être infectés sans qu'il y ait apparition de symptômes (Caruana, 2003)

La lutte contre cette maladie virale est difficile parce que liée au mode de transmission persistant et circulant. Néanmoins, la prévention comme l'utilisation de matériel sain et la destruction de toutes les plantes présentant les symptômes de virus et des plantes se trouvant autour de plantes infectées diminue la maladie (Lepoivre, 2003).

1.9.2. Les maladies fongiques

Les bananiers sont soumis à de nombreuses contraintes parasitaires parmi lesquelles les maladies fongiques, très répandues et destructives, attaquant le système racinaire, le pseudo tronc, les feuilles et les fruits.

1.9.2.1.1. Maladies du système racinaire, de la corne et du pseudo tronc

La fusariose du bananier causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Snyder et Hansen (FOC) encore appelée maladie de Panama est l'une des maladies les plus destructrices du bananier (Ploetz et Pegg, 2000). Cette maladie a entraîné la disparition du cultivar Gros Michel entre 1935 et 1965 en Amérique latine et aux caraïbes. *F. oxysporum* colonise le xylème des variétés susceptibles et provoque un flétrissement vasculaire létal (Lassoudière, 2007).

Une autre maladie du système racinaire est la nécrose des racines causée par les champignons du genre *Cylindrocladium*. Plusieurs espèces de ces genres ont été associées aux nécroses du bananier en Amérique centrale, en Asie et en Afrique, en association avec des nématodes endoparasites (Risède et Simoneau, 2004). Cette maladie est assez largement distribuée en est non négligeable, mais les moyens de contrôle sont peu développés. Une étude récente a montré que l'apport du silicium au bananier permettait de renforcer la tolérance du bananier à l'infection par *C. spathiphylli* (Vermeire *et al.*, 2011).



Figure 1.11. Symptômes de la fusariose du bananier. (A) Jaunissement et flétrissement des feuilles ; (B) Brunissement des gaines causés par la fusariose (Source : Bizimana *et al.*, 2012).

1.9.3.2. Maladies des fruits

Les champignons pathogènes des fruits de bananiers sont à l'origine de lourdes pertes en termes de quantité et de qualité, car les fruits infectés n'ont aucune valeur commerciale et sont rejetés par les consommateurs (Wardlaw, 1961 ; Stover, 1972 ; Dadzie et Orchard, 1997). Les maladies cryptogamiques des fruits sont regroupées en maladies pré-récolte et post-récolte. Les maladies pré-récolte sont caractérisées par une infection suivie du développement des symptômes en champ avant la récolte. Les maladies post-récolte quant à elles résultent d'une infection latente en champ ou d'une infection post-récolte du fruit, suivie dans les deux cas du développement des symptômes après la récolte dans les mûrisséries ou encore lors des transits.

Quelques maladies fongiques des fruits de bananiers sont présentées dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4. Les principales maladies des fruits de bananiers

| Maladies | Type | Pathogènes | Symptômes | Références |
|---|--------------|---|--|------------------------------|
| Anthracnose de blessures | Post-récolte | <i>Colletotrichum musae</i> | Nécroses larges, circulaires, brunes ou noires recouvertes de spores orangées sur fruit mûr. | De Lapeyre de Bellaire, 1999 |
| Anthracnose de quiescence | Post-récolte | <i>Colletotrichum musae</i> | Nécroses brunes ou noires sur fruit vert. | Meredith, 1960 |
| Maladie du bout de cigare | Pré-récolte | <i>Trachysphaera fructigena</i> | Jaunissement précoce de la partie apicale du fruit vert, suivi d'une nécrose noire, ridée et sèche, l'apex se recouvre de mycélium gris et ressemblant à la cendre d'un cigare éteint. | Wardlaw, 1961 ; Feakin, 1971 |
| | | <i>Verticillium theobromae</i> | Pourriture sèche et momification de la pulpe. | Stover, 1972; Slabaugh, 1994 |
| Maladie de la pourriture de la couronne | Post-récolte | <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Botryodiplodia theobromae</i> | Ramollissement et noircissement des tissus de la couronne, pouvant se recouvrir de mycélium blanc, gris ou brun. | Jones et Stover, 2000 |

Tableau 1.3. Les principales maladies des fruits de bananiers (suite)

| Maladies | Type | Pathogènes | Symptômes | Références |
|---|--------------|---------------------------------|--|-------------------------|
| Pourriture du doigt à <i>Trachysphaera fructigena</i> | Post-récolte | <i>Trachysphaera fructigena</i> | Nécroses noires recouvertes de conidies blanches ou brunes. Pulpe momifiée et fibreuse résultant d'une pourriture sèche, ou molle en cas de pourriture humide | Dadzie et Orchard, 1997 |

1.9.3.3. Maladies du système foliaire

1.9.3.3.1. Cercosporioses du bananier

Les cercosporioses du bananier sont des maladies fongiques causées par des champignons ascomycètes du genre *Mycosphaerella*. Quatre espèces, *Mycosphaerella fijiensis*, *M. musicola*, *M. musae* et *M. eumusae*, sont responsables respectivement de la maladie des raies noires (MRN) ou cercosporiose noire, de la maladie de Sigatoka (MS) ou cercosporiose jaune, de la maladie de feuille tachetée ou moucheture et de la maladie des taches foliaires due à *eumusae* ou septoriose, attaquent le système foliaire et peuvent provoquer sur les variétés sensibles des pertes de rendement très significatives (Fouré et Mouliom Pefoura, 1988). Ces maladies qui se caractérisent par des taches foliaires et un dessèchement important des feuilles font partie des affections cryptogamiques les plus dévastatrices du bananier (Gasparotto, 2005).

La cercosporiose jaune, causée par *M. musicola*, a été observée la première fois à Java en 1902 par Zimmermann, puis par Masee en 1912-1913 aux îles Fiji dans la vallée de Sigatoka. Dans cette région, elle devint endémique, d'où son nom : maladie de Sigatoka (Lassoudière, 2012). Les symptômes se caractérisent par des taches qui apparaissent sur la face supérieure du limbe sous forme de tirets jaune-pâle (Jones, 2000).

La moucheture (Leaf speckle), causée par *M. musae*, fut décrite par Stahel en 1937. Stover et Simmonds la considère comme saprophyte souvent associé à *M. musicola*. Elle provoque des marbrures noircissant totalement le limbe. Elle est considérée de peu d'importance, excepté en Australie et en Afrique du Sud (Transvaal et Natal), où elle provoque des dommages foliaires pendant la saison très humide de janvier et de mars (Lassoudière, 2012). Elle

est présente en Inde, au Sri Lanka, en Malaisie, en Thaïlande, au Vietnam, à l'île Maurice et au Nigeria (Carlier *et al.*, 2000 ; Crous et Mourichon, 2002).

La cercosporiose noire, causée par *M. fijiensis*, avait été observée en 1963 aux îles Hawaï par Trujillo et Gotto et en 1964 aux îles Fiji par Rhodes (Lassoudère, 2012). C'est d'ailleurs en raison de la première description aux îles Fiji que l'espèce tient son nom. Cette maladie est plus sévère que la cercosporiose jaune et les bananiers plantains y sont aussi sensibles alors qu'ils sont tolérants à la cercosporiose jaune. Depuis les années 1960, *M. musicola* a été remplacé graduellement par *M. fijiensis* qui est un agent pathogène plus sévère et dont le spectre d'hôtes est plus important. Cette situation s'explique aussi par son caractère plus agressif comme la production des ascospores (quatre fois plus que *M. musicola*), un plus grand nombre de cycles par an et la grande vitesse de colonisation des tissus (Stover, 1980, Mouliom-Pefoura *et al.*, 1996). Les caractéristiques de cet agent sont plus détaillées dans le chapitre 2 puisque la cercosporiose noire fait l'objet de cette étude.

La maladie des taches septoriennes ou septoriose a été mise en évidence entre 1992 et 1995 lors des études de distribution des cercosporioses jaune et noire en Asie du Sud-est. Elle présente des symptômes similaires à cette dernière et serait localisée au Sud-est asiatique, dans l'océan indien (Maurice, Réunion) et au Nigeria (Lassoudère, 2012).



Figure 1.12. Symptômes foliaires localisés des cercosporioses. (A) Maladie des raies noires; (B) Maladie de sigatoka; (C) Maladie des taches septoriennes (Source: Crous et Mourichon, 2002).

1.9.3. Les ravageurs

Deux types de ravageurs constituent les principaux ennemis de la culture du bananier. Ce sont les charançons du bananier et les nématodes.

*1.9.4.1. Les dégâts dus aux charançons***❖ Le charançon du bananier**

Le charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*) est originaire d'Indo Malaisie. En République Démocratique du Congo, l'insecte aurait été introduit avec les plants des bananiers venus de Sao Tomé. A partir de 1925, il est repéré dans les régions de Mbandaka, Libenge, Kindu et Beni (Cuille, 1950). Actuellement, il se trouve dans toutes les régions tropicales et subtropicales productrices des bananes et bananes plantains (Gold et Messiaen, 2000).

Le charançon du bananier est l'un des principaux ravageurs des bananiers, des bananiers plantains et du genre *Ensete*. L'adulte, de couleur noire, mesure 10-15mm. Il se déplace librement, bien qu'on le rencontre le plus souvent entre les gaines foliaires, dans le sol à la base des pieds de bananiers ou dans les débris végétaux. Le charançon a une activité nocturne et il est très sensible au dessèchement. Les adultes peuvent demeurer sur le même pied pendant une période de temps prolongée, seule une petite proportion se déplaçant sur plus de 25 mètres en l'espace de six mois. Les charançons volent rarement. Leur diffusion se fait principalement par l'intermédiaire de matériel végétal infesté (Gold et Messiaen, 2000).

Les symptômes d'attaque s'extériorisent les plus souvent dans les parties aériennes : les feuilles s'étiolent et celles situées à la périphérie se dessèchent en premier lieu. Le bananier paraît souffrir de la sécheresse et les régimes sont de très petites tailles. Une bonne partie du système racinaire se dessèche et les bananiers atteints sont souvent déracinés par les tornades (Buyckx, 1963).

Les méthodes employées pour lutter contre le charançon du bananier varient souvent d'un système à un autre, selon la densité de population et les dégâts de ce ravageur. La lutte chimique est la méthode la plus courante dans les plantations commerciales. La lutte culturale, très efficace pour empêcher l'établissement du charançon, est aussi le seul moyen dont les petits producteurs dépourvus de ressources disposent actuellement pour réduire les populations déjà établies. Elle consiste à désinfecter le rejet à l'eau bouillante ou à nettoyer le bulbe à l'aide d'une machette avant la plantation. Des études sont en cours sur les agents de lutte biologique (notamment les Arthropodes et les champignons entomopathogènes), qui pourraient jouer un rôle important dans l'élaboration de stratégies de lutte intégrée (Gold et Messiaen, 2000).



Figure 1.13. (A) Galeries creusées par les larves de charançon dans le rhizome ; (B) charançons adultes ; (C) larves du charançon du bananier (Source : Bizimana *et al.*, 2012).

❖ Le charançon du pseudo tronc du bananier

Le charançon ou foreur du pseudotronc du bananier, *Odoiporus longicollis* Oliver (Coleoptera : Curculionidae) est l'un des principaux ravageurs des bananiers et des bananiers plantains. Les larves de ce charançon se nourrissent des tissus succulents des gaines, dans lesquelles elles creusent une multitude de galeries qui peuvent atteindre la tige proprement dite. Si les larves émergent juste avant le stade de floraison, il arrive qu'elles dévorent le pseudotronc, bloquant l'émergence du bourgeon (Padmanaban and Sathiamoorthy, 2001).

1.9.4.2. Les nématodes parasites des racines

❖ *Radopholus similis*

Le nématode *Radopholus similis* est l'un des plus importants parasites des racines des bananiers dans la zone intertropicale. La pénétration de ce parasite se produit préférentiellement à proximité de l'apex des racines, mais peut avoir lieu sur toute la longueur de la racine. Au fur et à mesure de sa progression inter et intracellulaire, *R. similis* se nourrit aux dépens du cytoplasme des cellules du parenchyme cortical, détruisant ainsi les parois cellulaires et provoquant la formation de tunnels qui évoluent en nécroses. Ces dernières peuvent s'étendre à l'ensemble du cortex mais le cylindre central n'est jamais attaqué bien que *R. similis* puisse y pénétrer lorsque les tissus sont très jeunes (Sarah *et al.*, 1996).

❖ *Pratylenchus coffeae* et *P. goodey*

Les deux espèces de nématodes, *Pratylenchus coffeae* et *P. goodey*, sont toutes deux des prédateurs majeurs de *Musa*. Leurs dégâts sont très similaires à ceux causés par *Radopholus similis* (Bridge *et al.*, 1997).

❖ *Pratylenchus speijeri*

Un nouveau nématode particulièrement pathogène aux espèces de *Musa* et aux pertes importantes chez les bananiers plantains vient d'être découvert au Ghana et est nommé *Pratylenchys speijeri* n. sp. Cette espèce cause des pertes importantes surtout chez les bananiers plantains. Une étude approfondie des ses caractéristiques morphologiques et moléculaires a montré que cette espèce serait proche de *P. coffeae* (De Luca *et al.*, 2012).

❖ *Meloidogyne incognita* et *M. javanica*

Deux autres nématodes, *Meloidogyne incognita* et *M. javanica*, appelés aussi nématodes à galle des bananiers, parasitent les racines des bananiers et des bananiers plantains partout où ces plantes sont cultivées. *Meloidogyne arenaria* et occasionnellement d'autres espèces du genre *Meloidogyne* peuvent également être associées aux bananiers et bananiers plantains. Malgré leur large répartition et parfois leur grande abondance, les nématodes à galle ne sont pas considérés comme ayant un pouvoir pathogène important sur les bananiers et bananiers plantains. Ils sont généralement présents en association avec *Radopholus similis* et *Pratylenchys* spp. (De Waele *et al.*, 1998).

Chapitre 2

La cercosporiose noire du bananier

2.1. Origine et distribution

La cercosporiose noire du bananier ou maladie des raies noires (MRN) ou encore Sigatoka noire est une maladie fongique foliaire causée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Elle est considérée comme la maladie la plus dévastatrice des bananiers (Lassoudière, 2007) et la plus importante sur le plan économique (Pennisi, 2010). Le champignon responsable est un ascomycète appartenant à la classe des Dothideomycètes, et à la famille des Mycosphaerellaceae. La MRN a été identifiée pour la première fois dans l'île de Vitu Levu de la République des îles Fiji en 1963 (Rhodes, 1964).

La MRN cause des dégâts importants dans les cultures des bananiers et bananiers plantains dans le monde (Stover, 1989 ; Ganry, 1992 ; Gauhl *et al.*, 1993). Au cours des dernières décennies, *M. fijiensis* s'est répandu de manière globale à travers presque toute l'aire de culture des bananiers y compris les zones subtropicales car il est capable d'infecter presque tous les types de bananes comestibles en raison du manque de résistance (Jones, 2009 ; Ploetz, 2001).

Cette maladie a remplacé progressivement la cercosporiose jaune (maladie de Sigatoka, MS) causée par un champignon du même genre, *M. musicola*, en Asie et en Amérique centrale, en raison de sa virulence plus grande et du spectre d'hôtes plus large. Celui-ci inclut non seulement les bananes dessert, mais aussi les bananiers plantains et à cuire qui ne sont pas affectés par la cercosporiose jaune.

En Afrique, cette maladie a été rapportée une première fois en Zambie en 1973. Elle a aussi été identifiée au Gabon en 1978. En Afrique de l'Est, la MRN a été rapportée au Kenya en 1998 (Kung'U *et al.*, 1992), au Rwanda en 1986 (Sebagiri, 1990), au Burundi en 1987 (Sebagiri et Stover, 1988), en

Ouganda en 1990 (Tushemereirwe et Waller, 1993) et au Malawi en 1990 (Ploetz *et al.*, 1992) (Mourichon, 2003). Elle a été signalée en RDC par Mourichon en 1986. Des études épidémiologiques menées à Kinshasa (Mobambo, 2002) et à Kisangani (Onautshu, 2007) ont confirmé la présence de cette maladie en RDC.

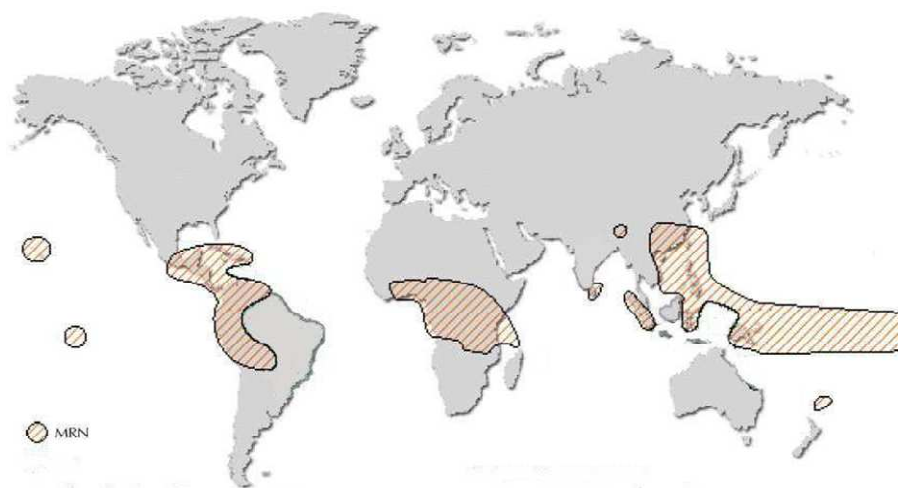


Figure 2.1. Distribution géographique de la maladie des raies noires dans le monde (Adaptée de Mourichon *et al.*, 1997 ; Cabi, 2007).

Les pertes de rendement attribuables à la MRN ont progressivement augmenté de plus de 50% (Marciel Cordeiro et Pires de Matos, 2003 ; Ploetz, 2001). Le contrôle chimique de la maladie dans les plantations commerciales a augmenté les coûts de production jusqu'à 1800 \$ par hectare (Marín *et al.*, 2003), ce qui n'est pas abordable pour les petits producteurs des pays en développement.

❖ Symptômes

Il est parfois difficile de distinguer les symptômes occasionnés par la MRN de ceux produits par la maladie de Sigatoka (MS). De manière générale, le premier symptôme de la MS apparaît sur la face supérieure du limbe sous forme des tirets jaune-pâle tandis que ceux produits par la MRN apparaissent à la face inférieure du limbe sous forme des tirets marron- foncé de 1 à 2 mm de long et s'élargissent ensuite pour former des lésions nécrotiques à halo jaune et centre gris-clair. Les lésions peuvent devenir coalescentes et détruire des vastes portions de tissus foliaires, entraînant une réduction du rendement et une maturation prématurée des fruits (Mourichon, *et al.* 1997).

La MRN revêt un caractère de gravité plus important que la MS, car ses symptômes se manifestent sur les feuilles à un plus jeune âge (l'inoculum étant abondant) et causent donc davantage de dégâts au système foliaire du bananier. En outre, elle affecte de nombreux cultivars résistants à la maladie de Sigatoka (INIBAP, 2002). L'évolution des symptômes dépend du cultivar, de la quantité d'inoculum primaire, de la température et de l'humidité (Fullerton, 1994). En conditions naturelles (champs), elle peut se résumer en 6 stades tels que décrits par Fouré (1982) (Figure 2.2) tandis qu'en conditions contrôlées, l'évolution des symptômes se résume en 5 stades tels que décrit par Mourichon *et al.* (1987) (Figure 2.3).

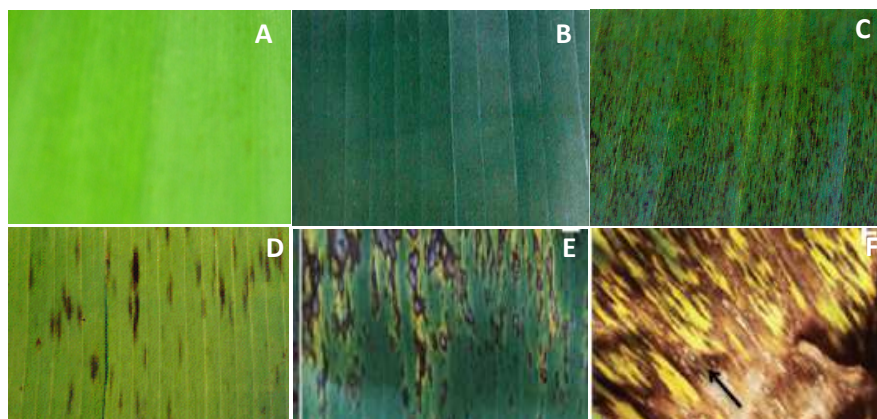


Figure 2.2. Description des stades de développement de la cercosporiose noire en champs d'après Fouré (1982). A = Stade 1 : Décolorations et ponctuations brunes de moins de 0,5 mm sur la surface inférieure de la feuille ; B = Stade 2 : Raies brunes rouilles inférieures à 4 mm et visible sur les deux faces ; C = Stade 3 : Raies allongées et élargies ; D = Stade 4 : Taches brun-noir elliptiques ; E = Stade 5 : Taches brun-noir entourées d'un halo jaune ; F = Stade 6 : Taches desséchées virant au gris avec en son centre des points noirs qui correspondent aux fructifications du pathogène (Source : adapté de Churchill *et al.*, 2011).

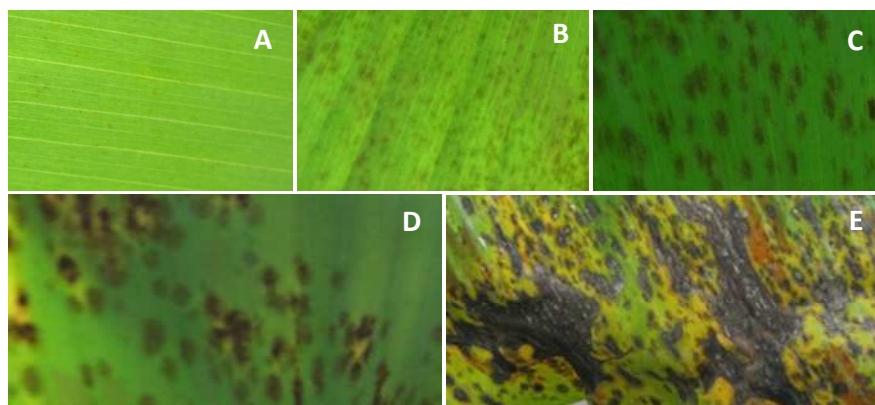


Figure 2.3. Stades de la cercosporiose noire en conditions contrôlées d'après Mourichon *et al.* (1987). A = Stade 1 : Ponctuations très petites d'un diamètre inférieur 0,5 mm juste visible à l'œil nu ; B = Stade 2: Tirets bruns rouilles d'une largeur inférieure à 4 mm ; C = Stade 3: Tirets allongés et élargis ; D = Stade 4 : Taches brun-noir elliptiques ; E = Stade 5 : Taches brun-noir entourées d'une zone chlorotique jaune et dont le centre est bien desséché (Sources : Photos personnelles).

2.2. L'agent pathogène : systématique, biologie et génétique

L'agent causal de la MRN du bananier est *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Ce champignon appartient au Phylum des Ascomycota, Classe des Dothideomycètes, Sous-classe des Dothideomycetidées, Ordre des Capnodiales, Famille des Mycosphaerellaceae, Genre *Mycosphaerella* (Churchill, 2011).

M. fijiensis est un champignon hétérothallique qui se reproduit de façon sexuée et asexuée (Fahleson *et al.*, 2009). La forme asexuée (anamorphe) est appelée *Paracercospora fijiensis* (Crous, 2009 ; Crous *et al.*, 2003, 2009 ; Stewart *et al.*, 1999). Le cycle sexuel joue un rôle épidémiologique

important pour la survie et la dispersion des populations fongiques. Le gène *Mat*, déterminant le type de croisement de l'espèce, a été caractérisé récemment chez cette espèce (Conde-Ferrández *et al.*, 2007).

Le champignon a été décrit pour la première fois en 1969 sur les spécimens en provenance de Fiji (Morelet, 1969). La croissance en culture *in vitro* est lente. Le diamètre de croissance d'une culture issue d'une seule conidie est d'environ 1cm après 38 jours d'incubation à 26°C (Meredith, 1970, cité par Carlier *et al.*, 2000). La température optimale de croissance se situe entre 24 et 28°C (Mouliom-Pefoura et Mourichon, 1990), alors que la germination est optimale autour de 26°C dans des conditions d'humidité saturante (Jacome *et al.*, 1991). Les colonies de 10 à 21 jours peuvent produire des conidies (Mourichon *et al.*, 1987 ; Etebu *et al.*, 2002, 2005).

Au microscope optique, ce champignon présente un conidiophore plus ou moins septé (0 à 5 septa), droit ou courbé souvent renflé à la base (jusqu'à 8 µm de diamètre), mesurant 16,5-62,5 µm de long et 4-7 µm de large (Figure 2.4A). Les conidies sont en forme de massue, droites ou incurvées, pointues à l'apex, tronquées ou arrondies à la base, pouvant avoir jusqu'à 10 cloisons (généralement 5 à 7 cloisons), mesurant 30-132 µm de long et 2,5-5 µm de large (Figure 2.4A). Pour produire la forme sexuée (téleomorpe), le champignon développe des spermogonies (Figure 2.4B) qui vont différencier des spermaties (en forme de bâtonnet de 2,5-5 x 1,0-2,5 µm de large). Celles-ci vont fertiliser les hyphes femelles réceptives appelées trichogynes. Il s'en suit la formation des périthèces (47-85 µm) (Figure 2.4C) à l'intérieur desquels se différencient les asques et les ascospores (11.5-16.5 x 2.5-5.0 µm) (Carlier *et al.*, 2000 ; Cabi, 2007). Les ascospores peuvent être obtenues *in vitro* par croisement de deux souches sexuellement compatibles (Mourichon et Zapater, 1990 ; Etebu *et al.*, 2003).

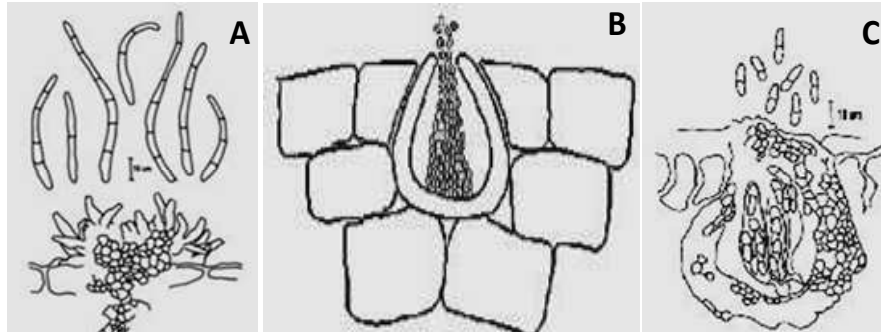


Figure 2.4. Conidiophore et conidies (A) ; Spermogonie et spermaties (B) ; périthèce, asques et ascospores (C) de *M. fijiensis* (Bennett et Arneson, 2003).

La structure génétique des populations de *M. fijiensis* en provenance de différentes régions du monde a été étudiée avec les marqueurs RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Ces études ont montré un niveau élevé de variabilité génétique entre les isolats de Philippines et de la Papouasie Nouvelle Guinée. Les isolats en provenance d’Afrique, du Pacifique et d’Amérique latine ont formé des groupes génétiquement homologues spécifiques à chaque région (Carlier *et al.*, 1994 ; 1996 ; Hayden *et al.*, 2003).

Le niveau de diversité allélique dans les régions autres que l’Asie du Sud-Est était considérablement réduit, indiquant un effet de fondation, et renforçant l’hypothèse selon laquelle *M. fijiensis* serait originaire d’Asie du Sud-Est. Rivas *et al.* (2004) ont également montré une grande diversité génétique des populations de *M. fijiensis* à l’échelle de la plantation et du pied de bananier (Carlier *et al.*, 2003 ; Carlier *et al.*, 2004).

Des études réalisées sur la structure génétique des populations de *M. fijiensis* à une échelle globale ont montré que le niveau de différenciation génétique du champignon est le plus élevé à l'échelle mondiale et moindre à l'échelle locale (Halkett *et al.*, 2010). Rieux *et al.* (2011) ont confirmé la discontinuité génétique existant au sein des populations de *M. fijiensis* et évalué la limite des entités génétiques après une étude faite sur 880 isolats prélevés au Cameroun, dans une zone de production bananière fragmentée et comportant plusieurs barrières physiques potentielles au flux de gènes.

Robert *et al.* (2012) ont analysé la diversité du pathogène à l'aide de marqueurs génétiques en se basant sur 730 individus issus de 37 pays couvrant la zone de distribution du pathogène. Ces chercheurs ont révélé les routes empruntées par *M. fijiensis* lors de sa propagation mondiale avec notamment deux scénarios d'introduction différents en Afrique et en Amérique latine. Alors qu'un petit nombre d'individus, très proches génétiquement, seraient à l'origine de l'invasion du continent africain, probablement au cours d'un seul événement d'introduction, le continent américain aurait été envahi par des populations résultant d'un mélange entre différentes sources.

La maladie aurait été introduite en Afrique via l'importation de plantes infectées en provenance d'Asie. La maladie se serait ensuite disséminée vers le Cameroun, la Côte d'Ivoire, la RDC, le Nigeria et le Ghana. D'après Carlier *et al.* (2000), une deuxième source d'inoculum serait responsable de la dissémination de la maladie au niveau de la côte Est de l'Afrique où la maladie a d'abord été détectée dans l'île de Pemba en 1987, d'où la maladie se serait ensuite rapidement disséminée vers l'île de Zanzibar, puis sur le continent en Tanzanie (Dabek et Waller, 1990).

Outre l'échelle continentale, un niveau élevé de polymorphisme révélé par les marqueurs microsatellites SSR a été signalé en Colombie (Perea *et al.*, 2005). Cette diversité génétique se traduit aussi par une variabilité de la pathogénicité (Fullerton et Olsen, 1995) et de l'agressivité (Cabi, 2007) entre les isolats. Ces résultats reflètent l'importance relative, en fonction de l'échelle géographique, de la propagation de l'agent pathogène par le matériel végétal infecté et par les ascospores.

2.3. Epidémiologie

2.3.1. Cycle infectieux et développement

M. fijiensis développe un cycle infectieux haplobiontique (Agrios, 2005) qui comprend quatre phases: l'infection, l'incubation et latence correspondant au début de la colonisation des tissus, la sporulation suivie de la formation de propagules infectieuses, et la dissémination de l'inoculum secondaire (Figure 2.5).

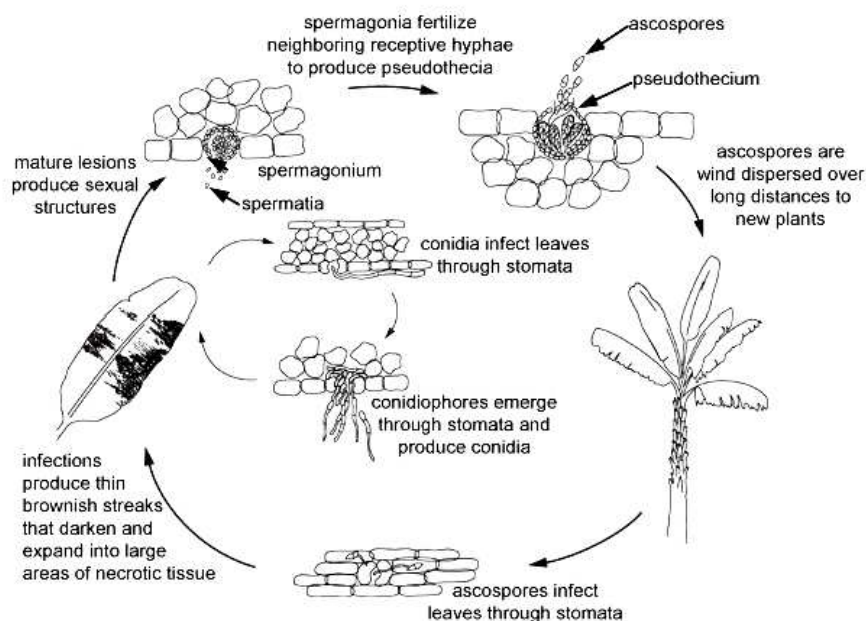


Figure 2.5. Cycle infectieux de la maladie des raines noires (Bennett et Arneson, 2003).

M. fijiensis est un champignon hétérothallique produisant des propagules infectieuses de deux types : des ascospores ou des conidies par voie de reproduction sexuée ou asexuée respectivement. Ces propagules sont responsables de la survie et de la dispersion de la maladie. Pour produire la forme sexuée, le champignon développe des spermogonies, plus abondants à la face axillaire des feuilles. Les spermaties sont hyalines, produites dans des spermogonies, fertilisent des hyphes récepteurs femelles (trichogynes) qui ensuite évoluent en pseudothèces. Les ascus sont oblongs et contiennent huit ascospores. Le cycle asexué est réalisé par l'anamorphe *Paracercospora fijiensis* et produit des conidies.

La MRN se disperse principalement par les ascospores et les conidies. Ces propagules sont formées dans des conditions d'humidité saturante, principalement lorsque des films d'eau apparaissent sur les feuilles.

Contrairement aux conidies, les ascospores sont formées dans des pseudothèces présents sur les vieilles feuilles de bananier ou bien sur les feuilles mortes posées à même le sol (Marin *et al.*, 2003). Les ascospores sont dispersées par le vent et sont projetées violemment suite au dessèchement du périthèce, elles sont donc responsables de la dissémination à longue distance. Quant aux conidies, elles sont généralement le moyen de dispersion locale vu qu'elles sont disséminées par les pluies. Les infections par les ascospores ou les conidies produisent le même type de taches et de développement subséquent de la maladie.

2.3.2. Effet des facteurs biotiques et abiotiques

L'existence d'interactions entre certains facteurs climatiques (humidité relative, température et précipitations auxquelles il faudrait associer éventuellement le couvert végétal) et l'activité de *M. fijiensis* conditionne l'incidence et la gravité de la maladie (Martinez *et al.*, 2002). En 1994, Fouré avait fait état de la relation existant entre les paramètres climatiques et le développement de la maladie qui pourrait permettre une meilleure compréhension de la dynamique de l'épidémiologie dans les zones de production et de son potentiel d'initiation de futures infections. La libération des ascospores par exemple, dépend fortement d'eau résiduelle à la surface des feuilles pendant la saison de pluies. Les ascospores sont éjectées des périthèces présents à la face inférieure des feuilles infectées de nécroses au stade 6 après humectation. Les feuilles sèches supposées détruites par l'infection, collées à la plante constituent une excellente source d'inoculum dans les conditions favorables à l'infection (Gauhl, 1994).

Quant à la température de croissance, plusieurs auteurs estiment que les ascospores germent entre 10 et 38°C avec un optimum de 27°C et un

minimum de 20°C (Perez, 1997). Pour ce qui est du vent, il a été observé qu'il constitue le véhicule par excellence pour la propagation des conidies ou des ascospores tant dans les plantations qu'en distance (Stover *et al.*, 2002). La cercosporiose noire attaque une large gamme de cultivars de bananier plantain (AAB) et bananier (AAA). Mais la gravité de la maladie dépend non seulement des conditions de l'environnement mais aussi de l'intensité de l'infection, de la « virulence des souches » de *M. fijiensis* et du degré de sensibilité ou de résistance de la variété (Orellana *et al.*, 2002).

2.3.3. Comportement de *M. fijiensis* vis-à-vis de l'hôte

Par rapport à la cercosporiose jaune, beaucoup plus de cultivars sont sensibles. Les études sur la sensibilité variétale faite au Cameroun par exemple, ont permis aujourd'hui de caractériser l'ensemble des variétés sauvages ou cultivées appartenant aux différents groupes génomiques (Fouré *et al.*, 1992). Ainsi trois types de comportement ont été mis en évidence et permettent de classer les cultivars en trois catégories bien distinctes à savoir :

Catégorie I: Bananier très résistant « tR » présentant un blocage de l'évolution de la maladie dès les premiers stades de l'infection (1 à 2). Ce comportement met en oeuvre une réaction du type « hypersensibilité » ou interaction incompatible qui se produit dans le cadre d'une relation gène pour gène et peut être facilement surmonté par l'agent pathogène et la résistance qui en résulte peut être instable (cas de cultivar Yangambi Km5).

Catégorie II: bananier partiellement résistant (pR). L'évolution de la maladie est normale du premier au stade nécrotique mais lente. Le nombre de feuille fonctionnelle à la récolte reste élevé. On parle dans ce cas de réaction compatible.

Catégorie III : bananier sensible (S). L'évolution de la maladie vers le stade nécrotique est rapide. Le taux de sporulation peut atteindre un niveau élevé si les conditions climatiques sont favorables à un développement rapide de la maladie. Le nombre de feuilles fonctionnelles à la récolte est faible. C'est aussi un cas de réaction compatible (Lassoudière, 2012).

Il est important de préciser qu'il existe dans la catégorie II plusieurs niveaux de résistances partielles allant d'une résistance prononcée jusqu'à la sensibilité. La séparation entre les deux comportements pR et S apparaît être de nature quantitative, et il conviendrait plus, dans le cas d'une interaction compatible de parler de tolérance plutôt que de résistance. L'essentiel de l'information sur la réaction incompatible provient d'observations de nécrose précoce des cellules de garde des stomates et de composés denses en électrons autour des sites de pénétration du pathogène. Pour une gestion à long terme de la maladie des raies noires, les génotypes partiellement résistants (réaction compatible) sont plus visibles.

Tableau 2.1. Sensibilité variétale de quelques cultivars des bananiers aux maladies foliaires causées par *Mycosphaerella* spp. (Carlier *et al.*, 2003).

| Cultivar | Sensibilité variétale | G. G. | Type | Accession |
|-----------------|------------------------------|--------------|-------------|------------------|
| Yangambi Km5 | Hautement résistant | AAA | Banane ** | ITC1123 |
| Calcutta | Hautement résistant | AA | Banane | ITC0249 |
| Pisang Lilin | Partiellement résistant* | AA | Banane | ITC1400 |
| Pisang Ceylan | Partiellement résistant | AAB | Banane | ITC1441 |
| Pisang Berlin | Sensible | AA | Banane | ITC0611 |
| Grande Naine | Sensible | AAA | Banane | ITC1256 |

G.G : Groupe génomique ; * : Elevé ; ** Dessert.

2.4. Lutte contre la cercosporiose noire du bananier

La maladie de raies noires (MRN) est la plus destructrice des maladies foliaires chez les bananiers et bananiers plantains. Les effets combinés de *M. fijiensis*, des ravageurs et du déclin de fertilité du sol sont aussi capables de réduire le rendement de 93% (Mobambo, 2002). La lutte contre la maladie des raies noires fait intervenir différentes techniques de lutte telles que les pratiques culturales, la lutte chimique, la lutte biologique et l'utilisation des variétés résistantes. Ces méthodes de lutte sont employées simultanément dans une approche intégrée de la lutte encore en développement dans différentes zones de production de bananes. Cette approche intégrée de la lutte vise à minimiser la composante chimique en plantations commerciales et à développer une stratégie adaptée à la production paysanne (Mourichon, 2003).

2.4.1. Pratiques culturales

Les pratiques culturales visent généralement à réduire le niveau d'inoculum et l'humidité relative dans les plantations. A cet effet, pour réduire le taux d'inoculum, les zones nécrotiques des feuilles ou les feuilles entièrement nécrosées sont excisées puis déposées à même le sol pour accélérer leur décomposition. La réduction de l'humidité relative est réalisée à travers un système de drainage efficace visant à empêcher l'eau de stagner dans les parcelles (Romero, 2000).

Par ailleurs, Mobambo (2002) rapporte que plus la fertilité est élevée, plus la sévérité de la cercosporiose noire est faible. Ceci suggère qu'une gestion adéquate de la matière organique est essentielle pour la production durable du bananier plantain, permettant de minimiser la sévérité de la cercosporiose noire. De même, l'enrichissement du substrat en silicium pourrait contribuer à une réduction de la susceptibilité du cultivar Grande Naine à la maladie des raies noires : une étude récente a en effet montré que le développement de la maladie sur bananier est retardé lorsque celui-ci est planté sur un substrat enrichi en silicium (Kablan *et al.*, 2012). L'action de cet élément dans la résistance du bananier aux stress biotiques serait liée à une augmentation de la teneur en polyphénols totaux et de l'activité antioxydante (Kablan, 2012).

2.4.2. Lutte biologique

Aucune méthode de lutte biologique n'a encore été adoptée dans les plantations commerciales (Cabi, 2007), très probablement à cause du caractère polycyclique de la maladie, de la présence de plants de tous âges et du déroulement de jeunes feuilles susceptibles tous les 6 à 12 jours (Marin *et al.*, 2003). Cependant des études, bien que peu nombreuses, sont menées en

vue de mettre à la disposition des producteurs des bio-fongicides efficaces contre la maladie des raies noires. Contrairement aux résultats de Guzman et Villalta (Marin *et al.*, 2003) qui ont montré une faible efficacité d'une souche commerciale de *Bacillus subtilis* contre *M. fijiensis*, De Lapeyre de Bellaire *et al.* (2006) font état d'un contrôle significatif par *B. subtilis*, testé à différentes modalités incluant l'huile à 20 l/ha, contre la maladie des raies noires. Ces auteurs signalent également que le lixiviat issu du compostage de la hampe de banane et de banane plantain présente un effet antifongique prometteur contre *M. fijiensis*. De même des filtrats de bactéries testés par Riveros *et al.* (2003) se sont montrés antagonistes à *M. fijiensis*. Toutefois des études approfondies incluant les essais en champ sont nécessaires pour identifier des bio-fongicides présentant une activité comparable aux fongicides conventionnels.

2.4.3. Lutte chimique

La lutte chimique de la maladie des raies noires se fait par alternance de fongicides de contact et systémiques. Les fongicides de contact (mancozeb ou chlorothalonil) sont préventifs et multisites dont l'activité est liée à l'inhibition de la germination des spores. Ils peuvent aussi être utilisés en association avec des unisites. Par contre, les fongicides systémiques appartenant aux groupes des benzimidazoles, triazoles, morpholines et strobilurines sont appliqués dans de l'huile minérale ou sous forme d'émulsion (Marin *et al.*, 2003). Cette lutte réalisée par des pulvérisations massives et quasi-systémiques des fongicides unisites seuls ou en association, occasionne cependant des foyers de persistance des maladies liés à l'apparition de souches résistantes. Cela engendre une augmentation de coût de la lutte et surtout par un accroissement des impacts environnementaux (Essis *et al.*, 2010).

Deux stratégies de contrôle chimique sont adoptées par les agro-industries, à savoir l'application de fongicides basée sur un système d'avertissement et l'application de fongicides basée sur le développement physiologique du bananier et les conditions climatiques (Romero, 2000). Le choix de l'une ou l'autre stratégie est déterminé par le niveau de sensibilité du pathogène aux différents fongicides employés. Un exemple d'évolution de la stratégie d'avertissement vers un système de contrôle systématique est illustré par le cas des plantations industrielles au Cameroun (De Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2006).

En effet, quelques années après l'introduction de la maladie des raies noires au Cameroun en 1981 (Fouré *et al.*, 1984), la mise au point d'un système d'avertissement basé sur les descripteurs biologiques (Fouré, 1988) a permis un bon contrôle de la maladie avec seulement 12 à 14 applications de fongicides systémiques par an de 1984 à 1991. Ce système d'avertissement biologique dirigé par le Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains (CARBAP) est basé sur la détection précoce de nouvelles attaques de *M. fijiensis*, à travers le calcul de l'état d'évolution de la maladie (EEM) en fonction du rapport du rang de la feuille sur le stade des symptômes et le rythme d'émission foliaire.

Une représentation graphique de l'évolution hebdomadaire de cet EEM est utilisée pour programmer l'application aérienne des fongicides. Après un certain temps les agro-industries ont décidé de diriger eux-mêmes le système d'avertissement et en ont malheureusement fait mauvais usage. Cela a conduit à la perte du contrôle de la maladie et par conséquent à un accroissement du nombre d'applications de fongicides systémiques.

Cette utilisation intensive de fongicides a conduit au développement de la résistance détectée pour la première fois en 1996, et l'abandon progressif de la lutte raisonnée au profit d'un système de contrôle systématique, avec des mélanges de produits systémiques, pénétrants et de contact pour tenter de limiter l'apparition des résistances. Les strobilurines ont été introduites en 1998 dans le programme d'application de fongicides. Cependant, très vite la résistance de *M. fijiensis* à ces molécules, liée à une seule mutation dans le gène mitochondrial du cytochrome b, s'est développée et ces molécules ont été abandonnées en 2004. Ainsi en 2005, environ 40 à 50 traitements fongicides étaient effectués dans les plantations industrielles, dont 90% de fongicides de contact et 10 % de fongicides systémiques.

Dans la majorité des pays, les fongicides sont actuellement appliqués de manière systématique pour protéger les jeunes feuilles, selon un programme préétabli (40-60 traitements/an). Cette évolution a conduit non seulement à un accroissement du coût de la lutte, mais aussi à une augmentation des nuisances environnementales.

En Afrique, dans nombreux pays, les stratégies chimiques de contrôle ne sont cependant pas accessibles pour les petits exploitants, puisque les fongicides coûtent chers, ils sont difficiles à se procurer. En outre, ils peuvent être dangereux à la santé des personnes dans les villages où la majeure partie du plantain est développée (Mobambo *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces stratégies sont d'application dans certains pays tels que le Cameroun (De Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2006 ; Kennang, 2009) et la Côte d'ivoire (Koné *et al.*, 2008 ; Essis *et al.*, 2010). Des stratégies alternatives associées à des mesures prophylactiques de base, comme l'ablation mécanique des nécroses foliaires, sont nécessaires si l'on souhaite mettre en

œuvre une lutte durable contre ces maladie (De Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2006).

2.4.4. Utilisation de variétés résistantes

L'utilisation de variétés résistantes à la maladie des raies noires constitue le seul moyen de lutte efficace pour les petits producteurs de bananes. Cette lutte est basée sur la création et l'exploitation de la variabilité génétique au sein du germplasm *Musa* (El Hadrami 2000). Elle vise à introduire la résistance à la maladie des raies noires existant chez les espèces sauvages de *Musa* tels que *M. acuminata* et les cultivars diploïdes tels que Paka (AA) et Pisang Lilin (AA). Les hybrides obtenus font l'objet d'évaluations au champ dans le cadre du programme international d'évaluation des *Musa* (IMTP) dans divers sites internationaux avant d'être diffusés chez les producteurs de bananiers (Mourichon *et al.*, 1997; Noupadja *et al.*, 2007).

La sélection classique pour la résistance des bananiers et bananiers plantains aux maladies est extrêmement difficile et dure longtemps en raison d'un cycle végétatif long (jusqu'à 2 ans), la polyploïdie, la stérilité masculine et la fertilité femelle étant fortement réduite pour les cultivars locaux (Swennen et Vuylsteke, 1993). La modification génétique est devenue un outil prometteur supplémentaire pour l'amélioration des bananiers, notamment avec les méthodes de transformation à l'aide d'*Agrobacterium* (Pérez Hernández *et al.*, 2006), mais aussi avec le développement des cultures de suspensions cellulaires embryogènes (Côte *et al.*, 1996).. Par conséquent, l'introduction de gènes de résistance potentiels contre diverses maladies de la banane a été tentée et l'élaboration d'une technologie basée sur le transfert de gène qui offre une résistance à un stress biotique aux cultivars de bananiers sans

modifier leur patrimoine génétique est d'une importance primordiale (Chakrabarti *et al.*, 2003 ; Remy *et al.*, 1998a ; Vishnevetsky *et al.*, 2011).

L'approche transgénique la plus utilisée pour améliorer la résistance contre les maladies fongiques est basée sur la sur-expression des protéines PR (Pathogenesis related proteins), parmi lesquelles les chitinases végétales sont les plus étudiées et appliquées depuis 1991 (Broglie *et al.*, 1991). Kavacs *et al.* (2013) ont intégré chez le bananier transgénique *Musa acuminata* cultivar 'Gros Michel', l'un des deux gènes de chitinase de riz et ont testé sa résistance à la MRN. En utilisant un dosage biologique sur disques foliaires, ces chercheurs ont montré le potentiel de ce gène à améliorer la résistance à *M. fijiensis* ainsi que l'utilité de cette technique pour le dépistage précoce de cette maladie dans les lignées des bananiers transgéniques.

Deuxième partie

Caractérisation des populations de *Mycosphaerella fijiensis* sur les bananiers et bananiers plantains de la région de Kisangani (RDC).

Commentaires préliminaires

La banane est considérée comme le plus important fruit tropical (Lassoudière, 2010). Dans la région de Kisangani, plusieurs cultivars de bananiers et bananiers plantains présentent les symptômes caractéristiques des cercosporioses (Onautshu, 2007). Quatre espèces fongiques, *Mycosphaerella fijiensis*, *M. musicola*, *M. eumusae* et *M. musae* responsables respectivement de la Maladie des raies noires (MRN), de la Maladie de Sigatoka (MS), de la maladie des tâches foliaires et de la maladie de feuille tachetée, sont impliquées dans ce type de symptômes. Elles attaquent le système foliaire et peuvent provoquer sur les variétés sensibles des pertes de rendement très significatives (Fouré et Mouliom Pefoura, 1988). Ces maladies qui se caractérisent par des taches foliaires et un dessèchement important des feuilles font partie des affections cryptogamiques les plus dévastatrices du bananier (Mouliom Pefoura, 1984).

Dans le but de mettre en place des mesures de contrôles adaptées à la situation de Kisangani, il était important d'identifier l'agent responsable des symptômes observés. L'isolement et la caractérisation étaient nécessaires pour son identification, pour évaluer le type de populations en présence et pour développer les moyens des contrôles adaptés. Le contrôle efficace de cette maladie ne se fait actuellement dans les productions industrielles quasiment que par une lutte chimique intensive. Cependant, les applications répétées de fongicides systémiques conduisent non seulement au développement de souches résistantes au sein des populations du pathogène, mais aussi à d'importantes nuisances environnementales.

Dans la région de Kisangani, le bananier et le bananier plantain sont cultivés par les producteurs locaux, sans recours à la lutte chimique. Dans une

perspective de développement plus intense de la culture, ce moyen de lutte pourrait être intégré à un programme de protection raisonnée. Il importe donc d'évaluer les niveaux de résistance des souches locales aux fongicides. Malgré l'absence de traitement, des flux de gènes en provenance de populations industrielles via la dispersion des ascospores par le vent pourraient en effet être à l'origine de la présence de souches résistantes dans la région.

L'étude qui fait l'objet du troisième chapitre a été menée afin de confirmer la présence de l'espèce *Mycosphaerella fijiensis* dans la région de Kisangani. Les échantillons ont été récoltés dans les jardins de case de la ville de Kisangani et ses environs. Des souches de champignons ont été isolées et caractérisées sur les plans morphologique et moléculaire. Un test de pathogénicité des souches en conditions contrôlées sur plantes entières a aussi été réalisé. A cet effet, des jeunes plants de bananiers Grande Naine (sous groupe Cavendish AAA) produits in vitro ont été sevrés dans une solution hydroponique oxygénée, puis inoculés par pulvérisation des suspensions conidiennes.

Dans le chapitre 4, une étude de la sensibilité des souches de *M. fijiensis* issues de la région de Kisangani aux triazoles (époxyconazole, propiconazole et tébuconazole), aux strobilurines (azoxystrobine) et aux benzimidazoles (carbendazime) a été réalisée pour déterminer leurs niveaux de sensibilité et établir une comparaison avec des souches en provenance de plusieurs types de production bananière du Cameroun. Les populations du Cameroun ont été choisies vues la diversité des systèmes de production dans ce pays, intégrant notamment les plantations industrielles. Plusieurs techniques d'analyses ont été mises en œuvre.

Chapitre 3

Caractérisations phénotypique et moléculaire des souches de *Mycosphaerella fijiensis* sur les bananiers et bananiers plantains de la région de Kisangani (RDC)

Onautshu, O.^{1,2}, Dhed'a, D.² et Legrève, A.¹

1 Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Applied Microbiology-
Phytopathology, Croix du sud 2- L7.05.03, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

2 Université de Kisangani, Faculté des Sciences, Laboratoire de culture *in vitro*,
Amélioration des plantes et Biotechnologie, B- 2012 Kisangani, RDCongo.

3.1. Résumé

Le bananier (*Musa* spp.) est une culture alimentaire de base dans de nombreux pays des tropiques humides. *Mycosphaerella fijiensis* et d'autres espèces du même genre, *M. musicola*, *M. musae* et *M. eumusae*, sont responsables des maladies foliaires chez le bananier. Dans la région de Kisangani, plusieurs cultivars de bananiers et bananiers plantains présentent les symptômes caractéristiques des cercosporioses. L'isolement et la caractérisation des souches responsables s'avèraient donc nécessaires pour identifier l'(les) espèce(s) responsable(s) et déterminer la diversité des populations.

Une prospection a été menée dans la région de Kisangani afin de collecter des échantillons de bananiers présentant les symptômes de cercosporiose. Une fois le matériel collecté, des isollements sur milieux de culture par la méthode de décharge des ascospores sur milieu gélosé et repiquage sur PDA ont été effectués. La caractérisation des souches a porté sur les caractéristiques morphologiques des cultures, sur des analyses moléculaires et sur l'analyse de la pathogénicité dans des conditions contrôlées.

Au total, 296 souches ont été isolées sur 14 cultivars de bananiers et bananiers plantains. Les colorations des mycéliums en croissance sur milieu PDA sont variables pour les différentes souches étudiées. La forme est soit régulière, soit irrégulière, avec un aspect plat, légèrement ou très bombé. La croissance moyenne des souches présente une allure linéaire, mais le niveau de croissance reste en-dessous de 25 mm après 70 jours. La longueur des conidies varie entre 46,7 et 61,8 μm , leur largeur entre 2,3 et 2,8 μm , et le nombre de septa varie entre 4 et 8. Ces caractéristiques morphologiques sont typiques de l'espèce *M. fijiensis*. Cette identification a été confirmée par le

séquençage d'une région de l'ADN ribosomal pour 27 souches testées. L'alignement multiple des séquences obtenues a révélé un très faible niveau de diversité de la région ITS2 entre les souches. L'amplification du gène Mat a montré l'existence des deux types de croisement, Mat1-1 et Mat1-2, au sein de la population, avec une prédominance de Mat1-1. La comparaison des séquences du gène Mat des neuf souches testées avec les séquences données sur NCBI a montré que le gène Mat est bien conservé.

L'évaluation de la pathogénicité de 20 souches a révélé que toutes les souches sont pathogènes sur le cultivar Cavendish « Grande Naine ». Cependant, la souche RDC215 a manifesté un impact plus élevé que les autres et peut être considérée comme la plus virulente.

3.2. Introduction

Les bananiers et bananiers plantains constituent un groupe d'une importance agricole, alimentaire et économique considérable à travers le monde (Gaidashova *et al.*, 2010). Dans les pays les plus pauvres d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie, près de 90% de la production est consommée sur place. La consommation par habitant varie, selon les pays, de 2 kg par habitant et par an (kg/hab./an) par exemple en Chine, à 50kg/hab./an en Océanie, et même 250kg/hab./an dans les pays d'Afrique de l'Est tels que l'Ouganda, le Burundi et le Rwanda (Lassoudière, 2010). En RDC, les bananiers et bananiers plantains sont cultivés à des altitudes comprises entre 2 m sur la côte Ouest jusqu'à 1840 m sur les monts de Butembo (Ndungo, 2004). La production nationale annuelle de cette culture est passée de 1,49 millions de tonnes en 2000 à 1,96 millions de tonnes en 2011(FAOSTAT, 2012).

D'une importance capitale pour la sécurité alimentaire et économique de plus de 400 millions de personnes des pays du Sud, le bananier est soumis à des menaces parasitaires constantes. En RDC et notamment dans la région de Kisangani, des symptômes de cercosporiose sont couramment observés. Il serait associé à *M. fijiensis*, l'agent responsable de la cercosporiose noire (Onautshu, 2007 ; Carlier *et al.*, 2002, Mobambo, 1993), mais pourraient être aussi associés à d'autres espèces. Trois champignons (ascomycètes) responsables de graves maladies foliaires sont rapportées : *Mycosphaerella fijiensis*, *M. musicola* et *M. eumusae* (Carlier *et al.*, 2002).

La maladie des raies noires du bananier (MRN) ou cercosporiose noire causée par *M. fijiensis* est considérée comme la maladie foliaire la plus importante de cette culture (Lassoudière, 2007). La maladie de Sigatoka (MS) ou cercosporiose jaune causée par *M. musicola* est aussi considérée comme une contrainte sérieuse à la production des bananiers dans certaines régions du monde. Elle est moins sévère que la MRN parce que le spectre d'hôtes de *M. musicola* est plus restreint et sa virulence moins grande que *M. fijiensis*, et la MS reste répandue dans les zones où la MRN est absente, notamment dans les zones de plus hautes altitudes (Mwauzoma *et al.*, 2011).

L'identification de l'espèce en cause dans une région donnée est importante afin d'adopter des mesures de contrôle adaptées aux caractéristiques épidémiologiques du pathogène. Les trois espèces responsables des cercosporioses produisent des symptômes semblables et elles sont morphologiquement très proches (Maxwell *et al.*, 2005 ; Arzanlo *et al.*, 2008). Le diagnostic de *M. fijiensis* et sa différenciation avec *M. musicola* et *M. eumusae* ne peuvent se donc faire uniquement à partir de l'observation des symptômes sur les feuilles. En plus, les caractéristiques phénotypiques

du stade sexué de trois espèces sont également proches (Balint-Kurti *et al.*, 2001 ; Churchill *et al.*, 2011).

Ces espèces peuvent cependant être distinguées sur base des caractéristiques macroscopiques et microscopiques de leur stade asexué, soit directement *in situ* sur des échantillons foliaires, ou encore après leur isolement *in vitro* (Carlier *et al.*, 2003). En outre, l'identification de ces espèces peut se faire par voie moléculaire. Le séquençage des régions particulières du génome, telle que les régions ITS (Internal transcribed spacer) de l'ADN ribosomal s'est avéré être un outil valable pour le développement de la systématique moléculaire, l'étude de la phylogénie des espèces, et le développement de méthodes de détection et quantification spécifiques des espèces (Boysen *et al.*, 1996 ; Kuninanga *et al.*, 1997 ; Takamatsu, 1998 ; Lorena *et al.*, 1999 ; Legrève *et al.*, 2002).

Les techniques moléculaires basées sur l'amplification spécifique de fragments de génome situés dans les régions ITS et leur séquençage vont permettre non seulement de déterminer l'(es) espèce(s) de *Mycosphaerella* dans la zone d'étude, mais peuvent mettre en évidence l'existence d'une diversité au sein de la population. Sur ce plan, plusieurs études réalisées sur la structure génétique des populations de *M. fijiensis* à une échelle globale ont montré que le niveau de différenciation génétique de *M. fijiensis* est très élevé à l'échelle mondiale et moindre à l'échelle locale (Halkett *et al.*, 2010).

Dans le but de mieux appréhender les problèmes liés à la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani, le premier objectif de notre thèse visait à caractériser les populations de *M. fijiensis* sur les bananiers et bananiers plantains et d'évaluer la diversité des souches en présence. Une étude morphologique a été entreprise à cet effet. Un test moléculaire a été

mis en place pour faciliter le diagnostic et évaluer le niveau de diversité. Comme aucune information n'était disponible par rapport aux populations de la région de Kisangani, le séquençage des régions ITS a été privilégié dans un premier. En outre, vu le caractère hétérothallique de l'espèce, il nous a semblé intéressant d'évaluer, par voie moléculaire, les proportions des deux idiomorphes Mat 1-1 et Mat 1-2 responsables du type de croisement des souches au sein de la population. Enfin, une étude comparative de la pathogénicité de 20 souches isolées de différentes régions et à partir de cultivars de bananier et bananier plantain distincts, par une technique d'inoculation en conditions contrôlées sur bananiers, a également été réalisée dans le but d'évaluer le spectre de virulence des souches.

3.3. Matériel et méthodes

3.3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail au départ duquel la collection de souches fongiques a été isolée (Tableau 3.1) était constitué des feuilles nécrosées des bananiers et bananiers plantains avec taches foliaires et un dessèchement important, récoltées à Kisangani et ses environs sur les cultivars prédominants cultivés localement. Les feuilles récoltées ont été directement mises dans des papiers journaux pour leur séchage au laboratoire pendant 3 jours à la température ambiante. Elles ont été conservées de cette manière jusqu'à l'étape d'isolement des souches.

Les souches de *M. fijiensis* isolées sur différents cultivars des bananiers et bananiers plantains de la région de Kisangani sont présentées dans le tableau 3.1 tandis que la région de Kisangani qui est notre milieu d'étude est illustrée par la figure 3.1.

Tableau 3.1. Souches de *Mycosphaerella* isolées à partir de feuilles présentant des symptômes de cercosporiose sur des cultivars de bananier et bananier plantain dans la région de Kisangani et leur origine.

| Codes | N | Origine | Cultivar | Type | Année |
|------------|----|-----------------|--------------|------|-------|
| RDC1-4 | 4 | PK 10 Rte Opala | Muku | P. | 2009 |
| RDC5-10 | 6 | PK 14 Rte Ybi | Libanga Lib. | P.Fr | 2009 |
| RDC11-16 | 6 | PK 14 Rte Udu | Litete | P.Fr | 2009 |
| RDC17-32 | 16 | PK 14 Rte Ybi | Akoto | P.Fc | 2009 |
| RDC33-51 | 19 | PK 8 Rte Opala | Libanga Lik. | P.Fc | 2009 |
| RDC52-62 | 11 | Ile Mbiye | Gde Naine | B. | 2010 |
| RDC63-79 | 17 | Ile Mbiye | Amakoko | P. | 2010 |
| RDC80-98 | 19 | Lubunga | Akoto | P.Fc | 2010 |
| RDC99-117 | 19 | Ile Mbiye | Apoka | P.Fc | 2010 |
| RDC118-132 | 15 | Masako | Bosua | P.Fr | 2010 |
| RDC133-153 | 21 | Kabondo | Libanga Lik. | P.Fc | 2010 |
| RDC154-170 | 17 | Masako | Libanga Lif. | P.Fc | 2010 |
| RDC171-189 | 19 | Lubunga | Litete | P.Fr | 2010 |
| RDC190-207 | 18 | Kabondo | Litete Lik. | P.Fr | 2010 |
| RDC208-224 | 17 | Makiso | Libanga Lib. | P.Fr | 2010 |
| RDC225-244 | 20 | Makiso | Tala Lola | P.Vc | 2010 |
| RDC245 | 1 | Masako | Bisamunyo | B. | 2009 |
| RDC246-265 | 20 | Mangobo | Bisamunyo | B. | 2010 |
| RDC266-287 | 22 | Tshopo | Gros Michel | B. | 2010 |
| RDC288-296 | 9 | Ile Mbiye | Gde Naine | B. | 2010 |

Légende : Rte Ybi = Route Yangambi ; Rte Udu = Route Ubundu ; Libanga Lib. = Libanga Liboelabokoi ; Libanga Lik. = Libanga Likale ; Gde Naine = Grande Naine ; Libanga Lif. = Libanga Lifombo ; P. = Plantain ; B. = Banane ; P.Fr = French ; P.Fc = Faux corne ; P.Vc = Vrai corne

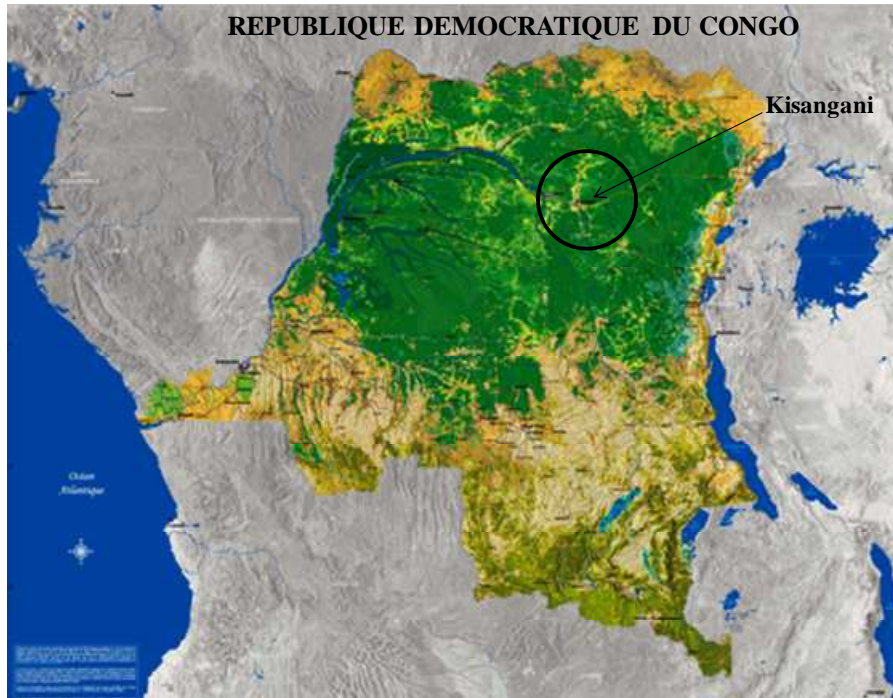


Figure 3.1. La région de Kisangani encerclée en noire sur la carte est notre milieu d'étude. Cette carte générale de la République Démocratique du Congo utilisée a été fournie par l'unité d'environnement et Géomatique de l'Université catholique de Louvain, UCL (Belgique). ©UCL-Geomatics 2010.

3.3.2. Méthodes

3.3.2.1. Isolements des champignons

A partir des échantillons de feuilles récoltées, les souches de *Mycosphaerella* spp. ont été isolées par la technique de décharge des ascospores sur milieu gélosé (H₂O Agar), qui ont ensuite été repiquées ensuite sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (Carlier *et al.*, 2003).

Pour la mise à décharge, les morceaux de feuilles nécrosées ont été d'abord découpés, ensuite mis à tremper dans l'eau distillée stérile pendant 20 minutes afin de les humidifier. Les morceaux de feuilles ont ensuite été placés à l'intérieur de couvercles de boîtes de Pétri qui ont été posés sur des boîtes contenant de l'agar à 3%. La face inférieure de la feuille était dirigée vers le haut, face au milieu de culture. Les boîtes ont été incubées à 25°C pendant une nuit. Le lendemain, les ascospores déchargées sur l'agar pendant la nuit ont été repiquées individuellement sur le milieu PDA (39 g/l).

Le repiquage s'est fait par l'observation au microscope inversé (Motic AE31), en récupérant soigneusement, une à une, les ascospores déchargées à l'aide d'une aiguille. Les cultures ont été incubées à 25°C et le phénotype des souches observé après 45 jours pour évaluer la correspondance avec celui de *M. fijiensis*, *M. musicola* ou *M. eumusae*. Les souches obtenues ont été repiquées en boîtes de Pétri et en tubes afin de conserver la collection établie.

3.3.2.2. Mise en sporulation des conidies

Pour produire des conidies, des petits fragments de mycélium obtenus à partir des mycéliums en croissance depuis trois semaines sur milieu PDA ont été repiqués sur milieu V8 modifié, de la composition suivante : 10% de jus de légumes V8, 0,02% de carbonate de calcium (CaCO₃), 2% d'agar, pH 6, 4% de streptomycine et 6% de pénicilline (Carlier *et al.*, 2003). Les boîtes de Pétri ont été placées à 25°C sous une lumière blanche permanente. Les conidies ont été observées, après prélèvement et préparation microscopique, à partir du 14^e jour de culture.

3.3.2.3. Caractérisation des souches

La caractérisation des souches s'est faite sur base d'observations phénotypiques, d'analyses moléculaires et de l'analyse de la pathogénicité dans des conditions contrôlées.

3.3.2.3.1. *Caractérisation morphologique*

Les caractéristiques phénotypiques, à savoir la coloration, la forme et l'aspect du mycélium des souches en croissance sur milieu PDA ont été observées. En outre, la vitesse de croissance de chaque souche sur ce même milieu a été suivie pendant 10 semaines. A cet effet, une rondelle de mycélium de 4 mm de diamètre a été prélevée dans le front de croissance d'une culture sur PDA et inoculée au milieu d'une boîte de Pétri à raison de quatre répétitions par souche. Les boîtes ont été placées à 25°C à la lumière blanche pendant 3 mois et le diamètre des colonies a été mesuré tous les 7 jours.

La croissance radiale fongique a été mesurée et calculée selon la formule suivante :

$$r_i = \frac{d_i - d_0}{2}$$

Avec r_i comme rayon spécifique, d_i le diamètre spécifique et d_0 le diamètre de la rondelle fongique de départ.

Les observations sur la longueur, la largeur et le nombre de septations (septa) des conidies ont eu lieu 14 jours après incubation sur milieu V8 au grossissement 40x et ont été réalisées à partir des petits fragments de culture prélevés dans la culture et montés entre lames et lamelles microscopiques avec une goutte du lactophénol. Le nombre moyen de ces paramètres a été déterminé après observation de quatre conidies par souche.

3.3.2.3.2. *Caractérisation moléculaire*

La caractérisation moléculaire a porté sur l'amplification par PCR et le séquençage des régions "internal transcribed spacers" (ITS), ITS1 et ITS2, et du gène 5,8S de l'ADN ribosomal d'une part, et du gène Mat, d'autre part. Les souches analysées (Annexe 3) ont été choisies en fonction de la diversité observée au niveau de leurs caractéristiques morphologiques. Elles ont été ensuite comparées à des souches originaires du Cameroun et des accessions de *Mycosphaerella* spp. disponibles dans la base des données NCBI afin de confirmer l'identification de l'espèce *M. fijiensis* des souches et d'évaluer la diversité au sein de la populations isolées de RDC.

Les étapes suivantes ont été réalisées pour la caractérisation moléculaire: l'extraction de l'ADN (Annexe 2), la quantification de la concentration en ADN, l'amplification par PCR, l'analyse de produit PCR sur gel d'agarose, la visualisation sous UV et le séquençage.

L'ADN a été extrait en utilisant le kit FastDNA (annexe 1) avec les outils FastPrepR (Qbiogene, Inc., CA), puis dilué 10x avant l'amplification par PCR.

3.3.2.3.2.1.. *Amplification par PCR et analyse des produits*

a. Région ITS

Les amorces suivantes, universelles pour l'étude des régions ITS de l'ADN ribosomal des champignon, ont été utilisées :

- ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') et
- ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (Lee *et al.*,1990).

Le mélange réactionnel pour un échantillon était constitué d'eau DEPC (eau distillée stérile traitée au diéthylpyrocarbonate) (13,125 µl), Tampon Go taq 5x (5 µl), MgCl₂ 25 mM (2,5 µl), d'NTPs 10 mM (0,75 µl), amorce forward 20 mM (ITS1) (0,5 µl), amorce reverse 20 mM (ITS4) (0,5 µl), Go taq polymérase 5 unités/µl (0,125 µl). L'extrait d'ADN (2,5 µl) y est ajouté de façon à obtenir une quantité de 0,05 à 5 ng pour 25 µl de mélange réactionnel. L'amplification d'ADN a été réalisée par la méthode de "polymerase chain reaction", PCR, dans un thermocycleur iCycler version 4.006. Le cycle suivant a été appliqué : une première étape de 95°C pendant 2 minutes pour la dénaturation, suivi de 30 cycles d'amplification à 95°C pendant 30 secondes pour la dénaturation, 55°C pendant 30 secondes pour l'hybridation et 72°C pendant 1 minute pour l'élongation. Une élongation finale a été réalisée à 72°C pendant 10 minutes. L'amplicon a migré par électrophorèse à 120 volts sur gel d'agarose 1,2% pendant 1 heure avant d'être visualisé sous UV en présence de bromure d'éthidium.

b. Gène Mat

Les amorces suivantes ont été utilisées:

- flan4739-F (5'-GCGGTTTTGGAGCGGTCAGG-3'),
- inver5656-R (5'-GAAGCTCTGGGTATCTCAGCACAGG-3') et
- inver8486-F (5'GCACCTCAGGGAGGCATTGG-3') (Conde-Ferraez, *et al.*, 2007).

Le mélange réactionnel pour un échantillon était constitué d'eau DEPC (13,125 µl), Tampon Go taq 5x (5 µl), MgCl₂ 25 mM (2,5 µl), d'NTPs 10 mM (0,75 µl), amorce forward 20 mM (flan4739-F pour Mat1-1 et Mat1-2) (0,5 µl), amorce reverse 20 mM (inver8486-F pour Mat 1-1 et inver5656-R pour Mat1-2) (0,5 µl), Go taq polymérase 5 unités/µl (0,125 µl). Une

quantité de 0,05 à 5 ng pour 25µl de mélange réactionnel a été obtenue après ajout de 2,5 µl de l'extrait d'ADN. Pour la détermination des deux types de croisement, l'amplification de l'ADN par PCR a été réalisée à des cycles de températures définis comme suit : dénaturation (94°C : 5 minutes) ; [dénaturation (94°C : 30 secondes), hybridation (64°C : 1 minute pour Mat1-1 et 58°C : 1 minute pour Mat1-2), élongation (72°C : minute)] x 30 ; élongation finale (72°C : 7 minutes). Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%. Les bandes attendues de taille 966 bp pour Mat1-1 et 917 bp pour Mat1-2 ont été révélées par fixation du bromure d'éthidium dans le gel suivie d'une lecture de ce gel avec un transilluminateur à UV.

3.3.2.3.2.2. Séquençage et analyse des séquences nucléotidiques

Le séquençage direct a été réalisé suivant la méthode de Sanger par la firme Macrogen, avec le produit PCR dilué 10 fois dans l'eau distillée. Le séquençage de chaque fragment a été réalisé séparément avec les amorces forward et reverse. Le mélange à séquencer a été placé dans un tube Eppendorf. Le segment complet de DNAa été obtenu par assemblage des séquences contiguës (Vector NTI® Advance11, Invitogen). L'alignement des séquences obtenues a été réalisé via ClustalW en incluant les séquences des régions ITS de l'ADN ribosomal d'accessions de *M. fijiensis*, *M. eumusae* et *M. Musicola* et celles des gènes Mat1-1 et Mat 1-2 des accessions de *Mycosphaerella* spp. disponibles dans le GenBank. Un NCBI Blast a été effectué sur les séquences des nucléotides.

3.3.2.3.3. Test de pathogénicité

Un test de pathogénicité de 20 souches de *M. fijiensis* sur bananier a été réalisé en serre, à une température de 24-28°C, une humidité relative de 100% et une photopériode de 12 h/12 (Abadie, 2008). Les souches analysées ont été choisies pour étudier un spectre de souches isolées de divers cultivars et de plusieurs sites.

Cent vitroplants du cultivar Cavendish 'Grande Naine' issus de culture *in vitro* ont été sevrés en serre dans des pots contenant du terreau et dans une ambiance confinée à l'abri des rayons directs pendant 3 jours. Après repiquage des plants dans des pots plus grands, les bananiers ont été arrosés à intervalle de deux jours pendant 25 jours avec une solution nutritive ayant la composition: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (472,3 g/5 litres) ; KCl (74,56 g/5 litres) ; K_2SO_4 (87,135 g/5 litres) ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (81,324 g/2 litres) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (98,592 g/2 litres) ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (62,404 g/2 litres) ; $\text{FeEDTA} \cdot \text{Ne}$ (62,404 g/2 litres), H_3BO_3 (9,893 g/2 litres).

Ensuite, les bananiers âgés de 29 jours après repiquage ont reçu une application de fertilisant Osmocote® dans tous les pots à raison de 5 granules (dés) par pot et l'arrosage à l'eau simple. Après l'application de l'Osmocote, les dernières feuilles déroulées ont été marquées pour servir de repère.

Les vingt souches de *M. fijiensis* ont été repiquées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA (39 g/l) et incubées pendant 20 jours à 25°C dans une étuve afin d'obtenir du mycélium. Les souches ont ensuite été cultivées sur du milieu V8 modifié (Carlier *et al.*, 2003) pendant 14 jours à 25°C sous lumière permanente.

Après deux semaines de croissance, 5 ml d'eau distillée stérile ont été ajoutés à la boîte de Pétri, la culture frottée avec une lame et la suspension de conidies ainsi obtenue a été filtrée sur papier filtre Whatman (diamètre 150 mm) pour obtenir une suspension de conidies. Cette suspension a ensuite été centrifugée pendant 20 minutes à 5000 tours/minute. La concentration ainsi obtenue est a été déterminée par comptage des conidies à l'aide d'une cellule de Fuchs-Rosenthal. Une concentration de 5.000 conidies/ml a été utilisée pour l'inoculation et quelques gouttes d'une solution de gélatine 1% ont été ajoutées à la suspension finale pour permettre une bonne adhésion sur la zone foliaire inoculée.

L'inoculation de solutions conidiennes a été réalisée par pulvérisation sur les bananiers âgés de 60 jours d'une quantité de 2 ml (10.000 conidies) par feuille, soit 6 ml pour trois feuilles et par plante. Quatre bananiers par souche ont été inoculés. L'inoculum pour chaque souche était de 24 ml. Au total 100 plants de bananiers et 20 souches de *M. fijiensis* ont été testés en trois séries inoculées à 3 jours d'intervalle. Pour chaque série, une même souche contrôle a été inoculée sur 4 plants tandis que 4 autres plants (bananiers témoins) n'ont pas été inoculés. Au total, 88 plants ont donc été inoculés.

Sur chaque plant, l'inoculation a été faite sur les trois premières feuilles déroulées et celles-ci ont été retenues pour suivre l'évolution des symptômes. Pour éviter la dispersion des conidies sur les autres feuilles de l'étage supérieur, ces dernières ont été recouvertes avec du plastic pendant la pulvérisation.

Les plants inoculés ont été maintenues dans la serre avec une humidité relative de 100% pendant une semaine à l'aide d'humidificateur, une photopériode de 12 h et une température jour et nuit respectivement de 28 et 25°C (Abadie, 2008). Après une semaine, l'humidité a été réduite à 80%. Le

suivi des symptômes selon l'échelle de Fouré a commencé 17 jours après l'inoculation, et s'est poursuivi tous les 3 jours. L'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) a été évaluée à l'échelle de l'étage foliaire jusqu'au 35^e jour après inoculation.

3.3.2.4. Analyse des données

Les données obtenues ont été analysées par une ANOVA à l'aide du logiciel "Entreprise Guide SAS". Les moyennes ont été comparées au seuil de 5% par le test de l'étendue studentisée de Tukey. Les barres d'erreur sur les courbes représentent les déviations standards calculées à partir de l'écart type.

3.4. Résultats et discussion

3.4.1. Caractéristiques morphologiques

Les caractéristiques phénotypiques de 296 souches de *Mycosphaerella* isolées sur 14 cultivars de bananiers et bananiers plantains (Tableau 3.1) prennent en compte la coloration, la forme et l'aspect des mycéliums (Figure 3.2). Les colorations des mycéliums en croissance sur milieu PDA sont variables pour les différentes souches étudiées. Sur la face supérieure des cultures en croissance sur PDA, les couleurs blanc-olive, blanc-verdâtre, blanc-rosâtre, brun-olive, verdâtre, grisâtre ont été observées. Sur la face inférieure, c'est la couleur noire, typique des souches de *M. fijiensis*, qui prédomine. La forme est soit régulière, soit irrégulière avec un aspect plat, ou légèrement à très bombé (Figure 3.2). Les phénotypes différents ont été rencontrés dans la quasi totalité des sites visités. Une prédominance des souches à contour régulier et bombée est observée (Figure 3.4).

Ces caractéristiques sont différentes de celles observées sur les souches de *M. musicola* (Figure 3.3) isolées de bananiers collectés dans la région de Bukavu au Sud-Kivu par un étudiant au laboratoire de phytopathologie à l'UCL selon les mêmes conditions que celles appliquées dans ce travail (Zihalirhwa, 2011). Leur couleur dominante sur la face supérieure était blanchâtre tandis que sur la face inférieure, les cultures étaient jaunes. Par ailleurs, un contour régulier et un aspect plat étaient observés.

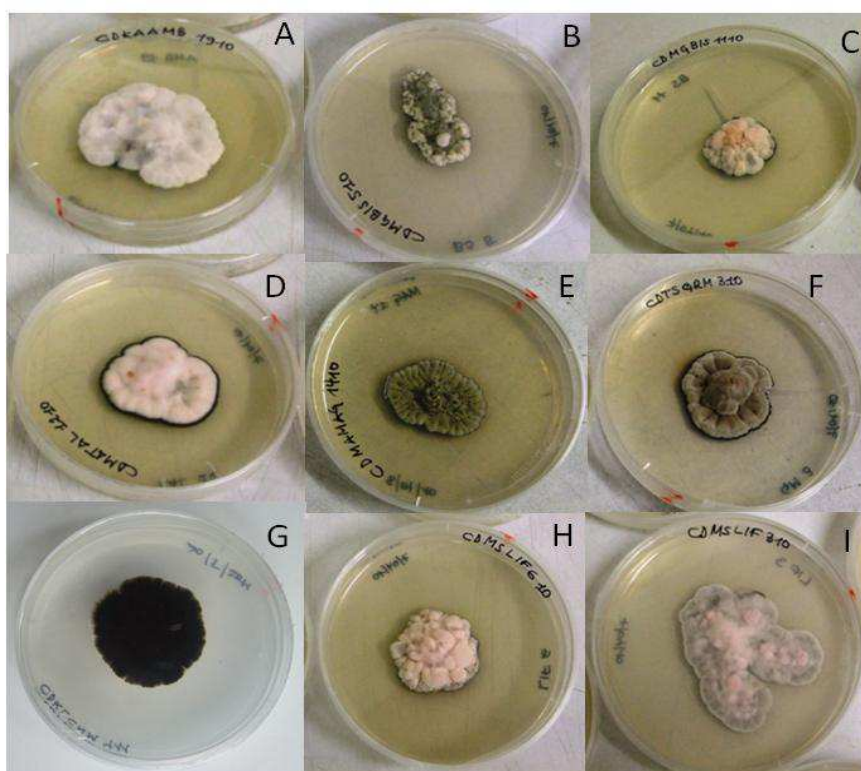


Figure 3.2. Phénotypes des mycéliums des souches de *M. fijiensis* en provenance de la RDC (Province Orientale) et cultivées sur PDA à 25°C après 45 jours de culture. Couleurs sur la face supérieure : blanc-olive (A), blanc verdâtre (B), blanc rosâtre (C), brun-olive (D), verdâtre (E), grisâtre (F). Couleur noire sur la face inférieure (G). Contour régulier, aspect bombé (H), contour irrégulier, aspect plat (I).

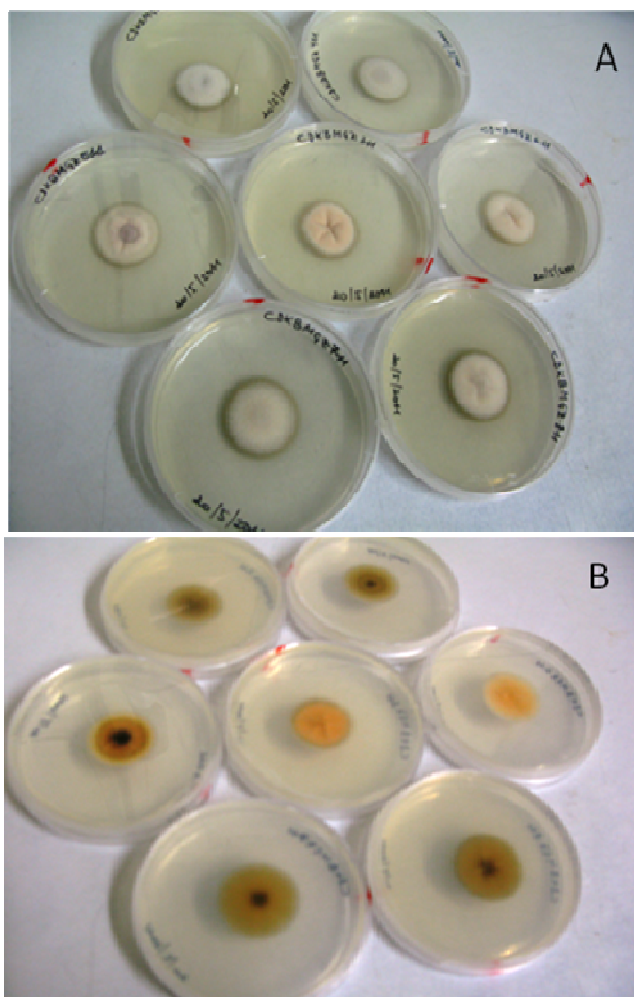


Figure 3.3. Phénotypes des mycéliums des souches de *M. musicola* en provenance de la RDC (Province du Sud-Kivu) et cultivées sur PDA à 25 °C après 45 jours de culture. Couleur sur la face supérieure (A) et face inférieure (B) (Zihalirhwa, 2011).

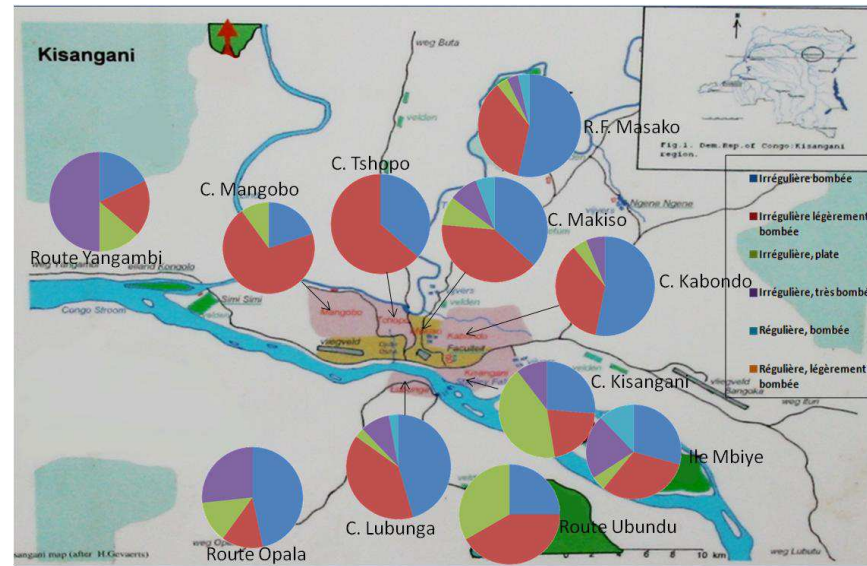


Figure 3.4. Distribution des souches de *M. fijiensis* isolées de la région de Kisangani en fonction de la forme et de l'aspect de mycélium.

Les dimensions et le nombre des septations des conidies de différentes souches, observés 14 jours après culture sur le milieu V8, sont présentés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2. Longueur, largeur et nombre des septa des conidies produites par les souches de *Mycosphaerella fijiensis* isolées dans la région de Kisingani pour une moyenne de 4 conidies par souche.

| Souches | Longueur (µm) | Largeur (µm) | Nombre de septa |
|---------|---------------|--------------|-----------------|
| RDC2 | 54,5±6,0 | 2,6±0,1 | 5±0,8 |
| RDC3 | 61,8±3,5 | 2,8±0,3 | 6±1,5 |
| RDC4 | 57,6±5,1 | 2,7±0,2 | 5±0,8 |
| RDC5 | 50,7±3,8 | 2,5±0,1 | 4±0,8 |
| RDC6 | 58,4±5,4 | 2,6±0,2 | 8±0,7 |
| RDC7 | 46,7±4,6 | 2,4±0,1 | 4±0,8 |
| RDC8 | 58,9±4,9 | 2,7±0,2 | 5±0,8 |
| RDC11 | 55±7,6 | 2,4±0,1 | 5±0,7 |
| RDC12 | 55,8±6,5 | 2,7±0,2 | 4±0,8 |
| RDC13 | 49,7±5,4 | 2,5±0,1 | 4±0,7 |
| RDC14 | 59,3±4,9 | 2,8±0,2 | 5±0,7 |
| RDC15 | 58,3±5,4 | 2,7±0,2 | 5±0,8 |
| RDC16 | 57,4±5,4 | 2,6±0,3 | 5±0,7 |
| RDC93 | 53,8±4,7 | 2,7±0,2 | 5±0,8 |
| RDC94 | 54,6±5,8 | 2,7±0,2 | 5±0,7 |
| RDC146 | 57±6,1 | 2,8±0,2 | 5±0,8 |
| RDC147 | 53,5±5,2 | 2,5±0,1 | 5±0,7 |

L'étude des caractéristiques morphologiques révèle que la longueur et la largeur des conidies varient respectivement de 46,7 à 61,8 µm et de 2,4 à 2,8 µm tandis que le nombre de septa varie de 4 à 8 (Tableau 3.2). Pour l'ensemble des souches, les dimensions de conidies et le nombre de septa se situent bien dans l'intervalle de dimensions rapportées pour l'espèce *M. fijiensis* soit 30 à 132 µm x 2,5-5 µm et de 1 à 10 septa (CMI, 1974; Ploetz *et*

al., 1994 ; Carlier *et al.*, 2003) . Les valeurs de ces paramètres sont de 10 à 109 μm x 2 à 6 μm et 0 à 8 septa pour *M. musicola* et de 21,2 à 41,6 μm x 2,5 μm et 3 à 5 septa pour *M. eumusae* (Wardalaw, 1972 ; Carier *et al.*, 2000 ; Crous et Mourichon, 2002). La taille des conidies des souches isolées dans ce travail ne correspond pas donc à celle renseignée pour *M. eumusae*. Par contre, les valeurs observées pour les caractéristiques de taille et nombre de septa ne permettent pas d'identifier formellement *M. fijiensis* et *M. musicola*.

Les valeurs observées pour les souches de RDC sont quelques peu différentes de celles observées par Gaillard (2000) sur les souches de *M. fijiensis* en provenance de Philippines, Gabon, Honduras, Cameroun, Panama, Indonésie, Tanzanie, Nouvelle Calédonie, Costa Rica, Tonga, Samoa, Papouasie Nouvelle Guinée, Côte d'Ivoire, Taiwan, Iles Cook et Burundi. Ce chercheur a trouvé 50 à 130 μm pour la longueur, 3,5 à 7,5 μm pour la largeur et 6 à 10 pour le nombre de septa chez *M. fijiensis*. Par ailleurs, il a trouvé les valeurs de 50 à 90 μm , 3 μm et 6 à 12 respectivement pour la longueur, la largeur et le nombre de septa de conidies chez *M. musicola* pour les souches isolées au Brésil, au Cameroun, en Colombie, à Martinique, en Indonésie, au Costa Rica, en Guadeloupe, en Guinée et en Australie. La longueur chez *M. musae*, variait entre 7,5 et 73,5 μm tandis que la largeur était de 1,2 μm pour les souches du Cameroun, du Brésil et des Iles Cook.

La vitesse moyenne de croissance de 10 souches sur PDA à 25°C sous lumière blanche permanente a été évaluée. L'évolution de la croissance des souches de *M. fijiensis* en fonction du temps présente une allure très linéaire (Figure 3.4) témoignant d'une vitesse radiale constante. Pour les 10 souches, ces vitesses ont été estimées entre 0,19 mm/jour pour les souches les plus

lentes et 0,36 mm/jour pour la souche à croissance plus rapide, soit un maximum de 25 mm après 70 jours. Cooke *et al.* (2009) rapporte une vitesse de croissance comparable pour *M. fijiensis* dans les mêmes conditions, sur PDA pour une température comprise entre 24-28°C : 1 cm/38 jours, soit 0,26 mm par jour.

Au regard des caractéristiques morphologiques des nos souches, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les souches isolées dans région de Kisangani appartiendraient à *M. fijiensis*. Cependant, afin de confirmer cette identification, des analyses moléculaires ont été effectuées.

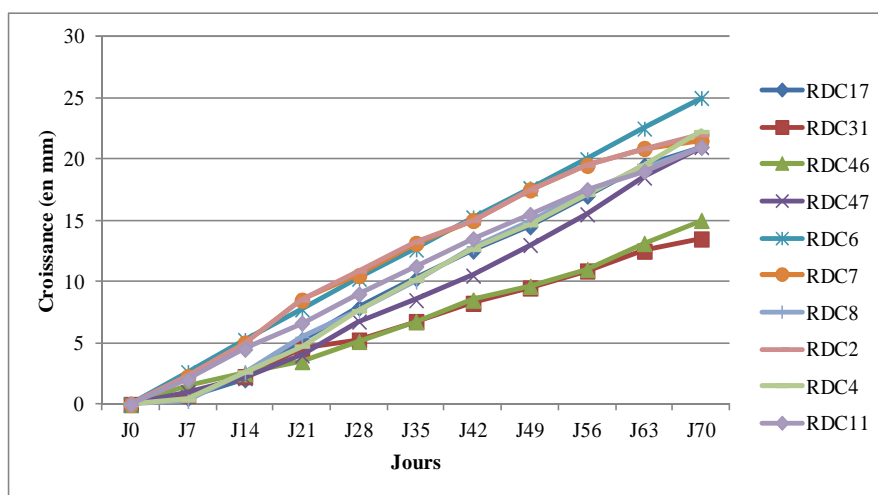


Figure 3.5. Evolution de la croissance des 10 souches de *Mycosphaerella fijiensis* isolées de la région de Kisangani pendant 70 jours sur PDA en conditions contrôlées à 25°C.

3.4.2. Caractéristiques moléculaires

Après extraction de l'ADN des souches, l'amplification de la région de l'ADN ribosomal comprise entre les amorces ITS1 et ITS4 d'une part et du gène Mat d'autre part a été réalisée par PCR. Les résultats de l'amplification de quelques souches sont présentés dans la figure 3.6. Il apparaît que pour la région ITS, un amplicon d'environ 500 pb a été obtenu alors que pour le gène Mat, les souches Mat1-1 donnait un amplicon d'environ 966 pb avec le couple d'amorces flan4739-F et inver8486-F pour Mat1-1, et flan4739-F et un amplicon d'environ 917 pb avec le couple d'amorces flan4739-F et inver5656-R pour Mat1-2.

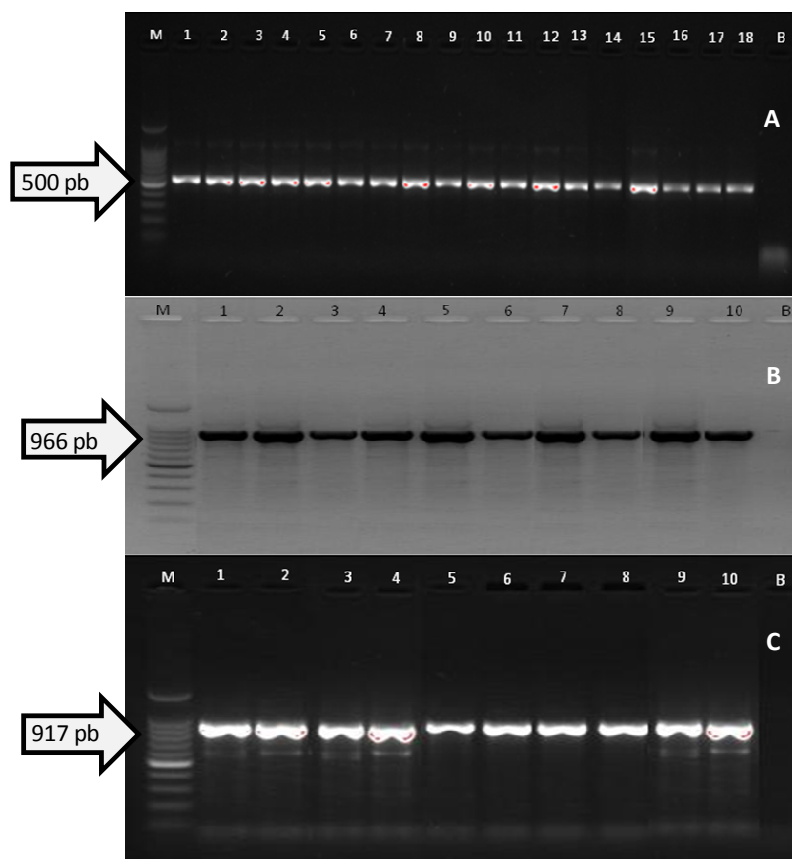


Figure 3.6. Visualisation des amplicons obtenus après amplification de l'ADN extrait de souches de *Mycosphaerella fijiensis* par PCR. ITS (A), Promega DNA Ladder 100 pb (M), RDC134 (1), RDC296 (2), RDC64 (3), RDC288 (4), RDC239 (5), RDC217 (6), RDC115 (7), RDC206 (8), RDC252 (9), RDC182 (10), RDC155 (11), RDC220 (12), RDC149 (13), RDC255 (14), RDC184 (15), RDC77 (16), RDC15 (17), RDC254 (18), Blanc (B), Mat1-1 (B), Promega DNA Ladder 100 pb (M), RDC8 (1), RDC275 (2), RDC167 (3), RDC97 (4), RDC281 (5), RDC132 (6), RDC142 (7), RDC53 (8), RDC100 (9), RDC254 (10), Blanc (B), Mat 1-2 (C) ; Promega DNA Ladder 100 pb (M), RDC175 (1), RDC55 (2), RDC131 (3), RDC86 (4), RDC225 (5), RDC134 (6), RDC296 (7), RDC288 (8), RDC239 (9), RDC155 (10), Blanc (B).

Pour permettre de distinguer les trois espèces de *Mycosphaerella*, certains amplicons ont été séquencés suivant la méthode de Sanger par la firme Macrogen. Après réception des séquences, des contigs ont été formés avec les deux séquences (forward et reverse) issues d'une même souche.

La comparaison de séquences avec le programme BLAST (Tableau 3.3) et l'alignement des séquences de la RDC avec un échantillon de séquences de *M. fijiensis*, *M. eumusae* et *M. musicola* avec le programme ClustalW démontrent que les séquences ITS des 27 souches testées de la région de Kisangani appartiennent à l'espèce *M. fijiensis* (Figure 3.7). Très peu de diversité dans les régions ITS1 et ITS2 sont observées parmi les séquences obtenues alors que plusieurs mutations ponctuelles et même des délétions sont observées par rapport aux séquences rapportées pour *M. musicola* et *M. eumusae* (Figure 3.7).

La comparaison des séquences du gène Mat des souches de la RDC à celles de souches de référence de la base des données NCBI montre également une très forte similarité avec les séquences de *M. fijiensis*. Ce résultat obtenu par voie moléculaire confirme que les symptômes de la cercosporiose observés sur divers cultivars de bananiers et bananiers plantains dans la région de Kisangani sont effectivement dûs à *M. fijiensis*.

M. fijiensis a donc été la seule espèce isolée des échantillons de la région de Kisangani. Sur bases du phénotype des souches ou des analyses moléculaire, aucune souche de *M. musicola* ou *M. eumusae* n'a été isolée de ces échantillons. La méthode utilisée dans notre laboratoire n'était pas spécifique à *M. fijiensis* : des souches de *M. musicola* ont été isolées selon cette même technique au sein du laboratoire à partir d'échantillons de

feuilles de bananiers collectées dans la région de Bukavu au Sud-Kivu (Zihalirhwa, 2011).

Plusieurs laboratoires ont récemment développé des protocoles moléculaires pour différencier les espèces de *Mycosphaerella* associées au bananier. À l'heure actuelle, un certain nombre d'amorces ciblant des séquences de l'ADN ribosomal ou des gènes de l'actine, de la tubuline et de l'histone ont été développées pour le diagnostic des cercosporioses noire et jaune.

En effet, Vázquez *et al.* (2012) ont mis au point un test rapide nommé "DC-PCR (Direct colony-PCR) " pour distinguer *M. fijiensis* et *M. musicola* en utilisant les paires d'amorces ACTR / MFactF et MMactF2/MactRb rapporté par Arzanlou *et al.* (2007). Celles-ci amplifient des fragments spécifiques du gène de l'actine de *M. fijiensis* ou *M. musicola* en donnant un amplicon de 500 pb pour *M. fijiensis* et de 200 pb pour *M. musicola*.

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait qu'elle permet de diagnostiquer les deux espèces sans préalablement effectuer un séquençage. Nous avons utilisé les amorces universelles ITS1 et ITS4 qui produisent un amplicon d'environ 500 pb pour les deux espèces, afin de ne pas restreindre l'analyse à ces deux espèces.

Sur base des amplifications PCR avec les amorces spécifiques pour différencier Mat 1-1 de Mat 1-2, les deux types de croisement sont présents dans les populations de RDC avec une prédominance de Mat1-1 (34 souches : RDC8, 53, 58, 64, 72, 91, 97,99, 110, 129, 132, 141, 142, 149, 150, 156, 167, 184, 190, 192, 207, 220, 221, 222, 232, 236, 249, 254, 266, 268, 269, 275, 281 et 285) sur Mat1-2 (18 souches : RDC54, 86, 93, 95, 115, 131, 133, 151, 153, 159, 180, 203, 225, 239, 255, 288, 292 et 296). Ce résultat diffère de celui rapporté par Vázquez *et al.* (2012).

Ces auteurs rapportent que la PCR proposée pour l'identification rapide des types de croisement Mat1-1 et Mat1-2 pour les souches de *M. fijiensis* avec la PCR multiplex développée par Conde *et al.* (2010) n'avait permis de mettre en évidence que les souches Mat1-1 (Vázquez *et al.*, 2012).

De notre côté, les deux types de croisement ont bien été identifiés. Le déséquilibre entre les proportions de souches Mat1-1 et Mat1-2 est étonnant dans la mesure où *M. fijiensis* est une espèce hétérothaliique. Néanmoins, deux voire même trois hypothèses peuvent être à la base de ces observations. D'une part, il est possible qu'à Kisangani, les souches de type de croisement Mat1-2 soient arrivées plus tard que les souches de type Mat1-1. Ce décalage aurait permis une multiplication préalable des souches Mat1-1 avant l'arrivée de Mat1-2. Il en résulterait des proportions Mat1-1/Mat1-2 non équilibrées. Une autre explication peut être liée au 'fitness' ou à l'aptitude des souches Mat1-1, qui serait meilleure comparativement aux souches Mat1-2, dans les conditions de la région de Kisangani. Une troisième hypothèse, qu'il ne faut cependant pas négliger vu les observations de Vasquez (2012), peut être que l'efficacité de la PCR spécifique à Mat1-2 est moindre que celle développée pour Mat1-1.

L'alignement multiple (Figure 3.7) révèle que toutes les souches appartiennent à *M. fijiensis* car elles présentent des dissemblances avec les deux autres espèces (*M. musicola* et *M. eumusae*), bien que la même méthode a permis de mettre en évidence *M. musicola* (Zihalirhwa, 2011). Par ailleurs, il se dégage qu'il existe une diversité entre les souches, mais celle-ci est faible.

| | ← 18S/ITS1 → | |
|------------|---|-----|
| RDC6 | AAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 352 |
| RDC12 | AAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 352 |
| CAM12 | AAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 356 |
| CAM6 | AAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 357 |
| RDC2 | AAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 360 |
| EU514254.1 | -----AGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 23 |
| RDC220 | -----CGTAATGATCCCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 58 |
| RDC100 | -----CCGAGTGAGGGC | 12 |
| RDC58 | -----CCGAGTGAGGGC | 12 |
| RDC129 | -----TGAGGGC | 7 |
| RDC190 | -----CATTACCGAGTGAGGGC | 17 |
| RDC95 | | |
| AF297225.1 | AAAGTCGTAACAAGG-TCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGG-C | 65 |
| RDC224 | | |
| RDC121 | | |
| RDC144 | | |
| CAM15 | -----TAACAAGGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGGGAGGGC | 53 |
| AF181705.1 | AAAGTCGTAACAAGG-TCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 66 |
| RDC222 | -----ATCATTACCGAGTGAGGGC | 19 |
| RDC32 | | |
| RDC35 | | |
| RDC99 | | |
| RDC42 | -----CGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 40 |
| CAM41 | -----CGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 40 |
| RDC33 | -----CCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 41 |
| RDC113 | | |
| RDC110 | | |
| RDC225 | | |
| RDC208 | | |
| RDC292 | -----CCGAGTGAGGGC | 12 |
| AY266149.1 | -----TCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 44 |
| AF181706.1 | AAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 66 |
| AY266148.1 | -----TCTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACCGAGTGAGGGC | 44 |
| EU140340.1 | -----AGTGATTTCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGC | 49 |
| EU514234.1 | -----TCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGC | 42 |
| AY923757.1 | -----TCCGTAGGTGAACCTGCCGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGC | 42 |
| | ← ITS1 → | |
| RDC6 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 410 |
| RDC12 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 410 |
| CAM12 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 414 |
| CAM6 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 415 |
| RDC2 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 418 |
| EU514254.1 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 81 |
| RDC220 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 116 |
| RDC100 | TCACGCCCCGACCTTCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 71 |
| RDC58 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTCA-----CACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 65 |
| RDC129 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 65 |
| RDC190 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 75 |
| RDC95 | -----TGTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 23 |
| AF297225.1 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 123 |
| RDC224 | -----GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 50 |
| RDC121 | | |
| RDC144 | -----TGGGGCGACC-TGC | 13 |
| CAM15 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 111 |
| AF181705.1 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 124 |
| RDC222 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 77 |
| RDC32 | -----CCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 53 |
| RDC35 | -----CCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 53 |
| RDC99 | -----CC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 52 |
| RDC42 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 98 |
| CAM41 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 98 |
| RDC33 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 99 |
| RDC113 | -----CCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 53 |
| RDC110 | -----TGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-CGC | 34 |
| RDC225 | | |
| RDC208 | | |
| RDC292 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACAACCTGTTGCTTCGGGGGCGACC-TGC | 70 |
| AY266149.1 | TCACCCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACA-CCTGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGC | 102 |
| AF181706.1 | TCACCCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACA-CCTGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGC | 124 |
| AY266148.1 | TCACCCCC-GACCTCCAACCCCTTTGTGAACCACA-CCTGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGC | 102 |
| EU140340.1 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTGTGAACCACA-CCTGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGC | 107 |
| EU514234.1 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTGTGAACCACA-CCTGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGC | 100 |
| AY923757.1 | TCACGCCC-GACCTCCAACCCCTTGTGAACCACA-CCTGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGC | 100 |

← **ITS1** →

```

RDC6          CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 459
RDC12         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 459
CAM12         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 463
CAM6          CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 464
RDC2          CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 467
EU514254.1    CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 130
RDC100        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 120
RDC220        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 165
RDC129        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 114
RDC58         CG-----TCGGCG-GGCG-CCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 113
RDC190        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 124
RDC222        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 126
RDC292        CG-----TCGGCGGGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 120
RDC32         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 102
RDC35         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 102
RDC42         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 147
CAM41         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 147
RDC99         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 101
RDC33         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 148
RDC113        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 102
RDC95         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 72
CAM15         CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 160
RDC224        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 99
RDC121        -----GCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 38
RDC144        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 62
AF181705.1    CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 173
RDC208        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 46
AF297225.1    CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCGAGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 173
RDC225        -----CCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 36
RDC110        CG-----TCGGCG-GGCGCCCCCG-AGGCCGTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCG 83
AY266149.1    CGGCGAACTTGTGCGCG-GGCGCCCCCG-AGGTCCTTAACTGCATCTTTCGTCG 160
AF181706.1    CGGCGAACTTGTGCGCG-GGCGCCCCCG-AGGTCCTTAACTGCATCTTTCGTCG 182
AY266148.1    CGGCGAACTCGTTCGCG-GGCGCCCCCG-AGGTCCTTAACTGCATCTTTCGTCG 160
EU140340.1    CGGCGAACTCGTTCGCG-GGCGCCCCCG-AGGTCCTTAACTGCATCTTTCGTCG 165
EU514234.1    CGGCGAACTCGTTCGCG-GGCGCCCCCG-AGGTCCTTAACTGCATCTTTCGTCG 158
AY923757.1    CGGCGAACTCGTTCGCG-GGCGCCCCCG-AGGTCCTTAACTGCATCTTTCGTCG 158
    
```

* * * * * ** :***** * .*****

← **ITS1 / 5,8S** →

```

RDC6          GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 519
RDC12         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 519
CAM12         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 523
CAM6          GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 524
RDC2          GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 527
EU514254.1    GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 190
RDC100        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 180
RDC220        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 225
RDC129        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 174
RDC58         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 173
RDC190        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 184
RDC222        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 186
RDC292        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 180
RDC32         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 162
RDC35         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 162
RDC42         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 207
CAM41         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 207
RDC99         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 161
RDC33         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 208
RDC113        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 162
RDC95         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 132
CAM15         GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 220
RDC224        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 159
RDC121        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 97
RDC144        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 122
AF181705.1    GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 233
RDC208        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 106
AF297225.1    GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 233
RDC225        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 96
RDC110        GAGTTTAAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 143
AY266149.1    GAGTTTCAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 220
AF181706.1    GAGTTTCAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 242
AY266148.1    GAGTTTCAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 220
EU140340.1    GAGTTTCAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 225
EU514234.1    GAGTTTCAACAATCGAACAAAATTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATG 218
    
```


| | | |
|------------|--|-----|
| AF181706.1 | TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGCATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTC | 361 |
| AY266148.1 | TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTC | 340 |
| EU140340.1 | TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTC | 345 |
| EU514234.1 | TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTC | 338 |
| AY923757.1 | TTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTC | 338 |
| | ***** | |
| | ← ITS2 → | |
| RDC6 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 697 |
| RDC12 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 698 |
| CAM12 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 702 |
| CAM6 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 703 |
| RDC2 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 706 |
| EU514254.1 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 369 |
| RDC100 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 359 |
| RDC220 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 404 |
| RDC129 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 353 |
| RDC58 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 352 |
| RDC190 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 363 |
| RDC222 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 365 |
| RDC292 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 359 |
| RDC32 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 341 |
| RDC35 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 341 |
| RDC42 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 386 |
| CAM41 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 386 |
| RDC99 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 340 |
| RDC33 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 387 |
| RDC113 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 341 |
| RDC95 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 311 |
| CAM15 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 399 |
| RDC224 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 338 |
| RDC121 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 275 |
| RDC144 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 301 |
| AF181705.1 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 412 |
| RDC208 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 284 |
| AF297225.1 | ACCACTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 412 |
| RDC225 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 275 |
| RDC110 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 321 |
| AY266149.1 | ACCACTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 400 |
| AF181706.1 | ACCACTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 421 |
| AY266148.1 | ACCACTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 400 |
| EU140340.1 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 405 |
| EU514234.1 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 398 |
| AY923757.1 | ACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTTCTTCGCGCGCCTTAAAGTCT-CC | 398 |
| | ***** | |
| | ← ITS2 → | |
| RDC6 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 757 |
| RDC12 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 758 |
| CAM12 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 762 |
| CAM6 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 763 |
| RDC2 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 766 |
| EU514254.1 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 429 |
| RDC100 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 419 |
| RDC220 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 464 |
| RDC129 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 413 |
| RDC58 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 412 |
| RDC190 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 423 |
| RDC222 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 425 |
| RDC292 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 419 |
| RDC32 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 401 |
| RDC35 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 401 |
| RDC42 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 446 |
| CAM41 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 446 |
| RDC99 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 400 |
| RDC33 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 447 |
| RDC113 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 401 |
| RDC95 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 371 |
| CAM15 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 459 |
| RDC224 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 398 |
| RDC121 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 334 |
| RDC144 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 359 |
| AF181705.1 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 472 |
| RDC208 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 343 |
| AF297225.1 | GGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCAATTTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG | 472 |

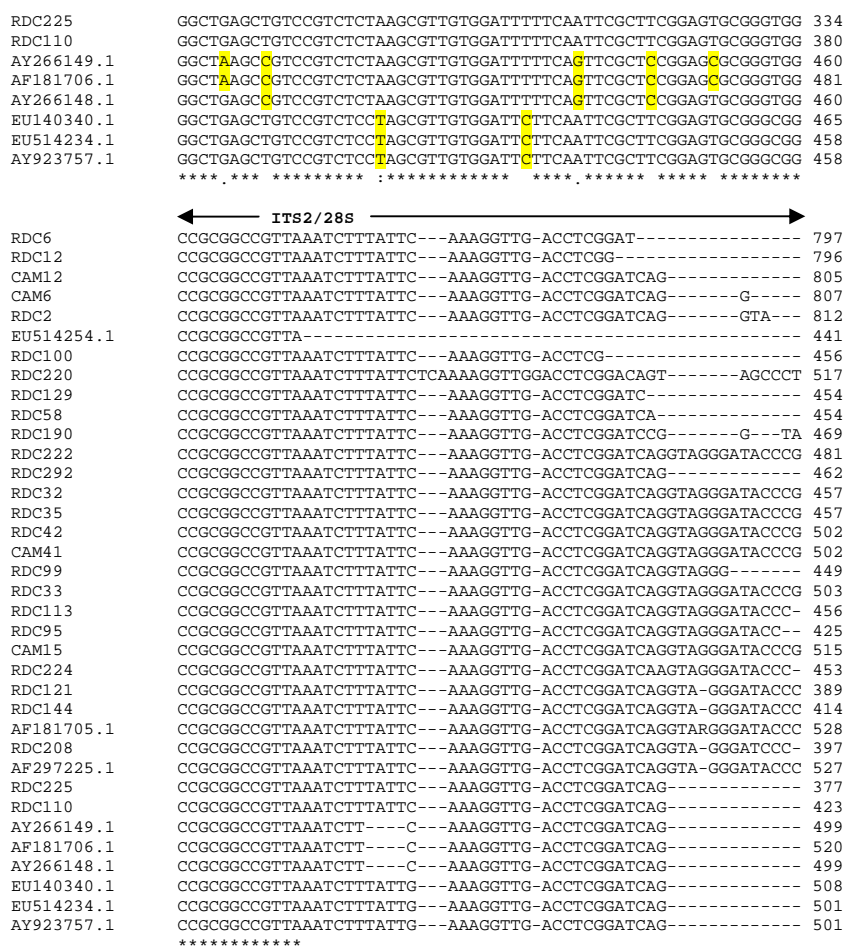


Figure 3.7. Alignement multiple des ITS de 24 souches de *Mycosphaerella fijiensis* isolées de la région de Kisangani et 4 souches isolées au Cameroun (CAM6, 12, 15 et 41) avec des séquences des mêmes régions ITS de souches de *M. fijiensis* (accessions AF181705.1, AF297225.1 et EU514254.1), *M. musicola* (AY266149.1, AY266148.1 et AF181706.1) et *M. eumusae* (EU140340, AY923757.1 et EU514234.1) issues de la base de données NCBI.

L'alignement multiple des Mat1-1 de souches de *M. fijiensis* isolées de la région de Kisangani avec une séquence des mêmes régions Mat1-1 de

souches de *M. fijiensis*, issues de la base de données NCBI (accession DQ787015.1) est illustré par la figure 3.8.

```

RDC150 -TTGGGGACCGTCAGGTTCGAAGTGAAGTGGAGAAGGAAAGGAAGTAAAGAGCGGGTGGGA 59
RDC58 -TTTGGGAACGTCAGGTTCGAAGTGAAGTGGAGAAGGAAAGGAAGTAAAGAGCGGGTGGGA 59
DQ787015.1 TTTTGGAGCGGTCAGGTTCGAAGTGAAGTGGAGAAGGAAAGGAAGTAAAGAGCGGGTGGGA 960
RDC232 -----CGT--AGTT--GAATGAAGTG--AGAGGAAGGAAGTAA--GAGCGGG--GGA 42
RDC110 TTTTGGGGCGTC-AGTTCGAAGTGAAGTGGAGAAGGAAAGGAAGTAAAGAGCGGGTGGGA 61
          **   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
RDC150 TAAAGATTGCTCGGGTCCGGGTGGATGGGGGGCCTGAGGCAGAGTAATCTGTCTAATA 119
RDC58 TAAAGATTGCTCGGGTCCGGGTGGATGGGGGGCCTGAGGCAGAGTAATCTGTCTAATA 119
DQ787015.1 TAAAGATTGCTCGGGTCCGGGTGGATGGGGGGCCTGAGGCAGAGTAATCTGTCTAATA 1020
RDC232 TAAAGAT-GTCCTGGG-TCCGGGTGGATGGGGG-CCTGAGGCAGAGTAATCTGTCTAATA 99
RDC110 TAAAGATTGCTCGGGTCCGGGTGGATGGGGGGCCTGAGGCAGAGTAATCTGTCTAATA 121
          *****
RDC150 GTCTGCCTATCCTCTACTACACAATTCTCAATCTCGTCGCGATTCTCTTCGATGAGGTC 179
RDC58 GTCTGCCTATCCTCTACTACACAATTCTCAATCTCGTCGCGATTCTCTTCGATGAGGTC 179
DQ787015.1 GTCTGCCTATCCTCTACTACACAATTCTCAATCTCGTCGCGATTCTCTTCGATGAGGTC 1080
RDC232 GTCTGCCTATCCTCTACTACACAATTCTCAATCTCGTCGCGATTCTCTTCGATGAGGTC 159
RDC110 GTCTGCCTATCCTCTACTACACAATTCTCAATCTCGTCGCGATTCTCTTCGATGAGGTC 181
          *****
RDC150 ACGTGCTTCTTGACCGCGCGCATGCCCTCTGCGCTCAGGAATGTAGCCTGGAATGCGGC 239
RDC58 ACGTGCTTCTTGACCGCGCGCATGCCCTCTGCGCTCAGGAATGTAGCCTGGAATGCGGC 239
DQ787015.1 ACGTGCTTCTTGACCGCGCGCATGCCCTCTGCGCTCAGGAATGTAGCCTGGAATGCGGC 1140
RDC232 ACGTGCTTCTTGACCGCGCGCATGCCCTCTGCGCTCAGGAATGTAGCCTGGAATGCGGC 219
RDC110 ACGTGCTTCTTGACCGCGCGCATGCCCTCTGCGCTCAGGAATGTAGCCTGGAATGCGGC 241
          *****
RDC150 TGGTGGTACGCGGTTCTGCGTAGTCACATCACCATCATACAAAGCCATGAGACGTCCTCAT 299
RDC58 TGGTGGTACGCGGTTCTGCGTAGTCACATCACCATCATACAAAGCCATGAGACGTCCTCAT 299
DQ787015.1 TGGTGGTACGCGGTTCTGCGTAGTCACATCACCATCATACAAAGCCATGAGACGTCCTCAT 1200
RDC232 TGGTGGTACGCGGTTCTGCGTAGTCACATCACCATCATACAAAGCCATGAGACGTCCTCAT 279
RDC110 TGGTGGTACGCGGTTCTGCGTAGTCACATCACCATCATACAAAGCCATGAGACGTCCTCAT 301
          *****
RDC150 CTCTGCAATGTGCTCCTGCTTGCCAAACGCCATGCCTTCTTCGTCATATGCATTGTTAG 359
RDC58 CTCTGCAATGTGCTCCTGCTTGCCAAACGCCATGCCTTCTTCGTCATATGCATTGTTAG 359
DQ787015.1 CTCTGCAATGTGCTCCTGCTTGCCAAACGCCATGCCTTCTTCGTCATATGCATTGTTAG 1260
RDC232 CTCTGCAATGTGCTCCTGCTTGCCAAACGCCATGCCTTCTTCGTCATATGCATTGTTAG 339
RDC110 CTCTGCAATGTGCTCCTGCTTGCCAAACGCCATGCCTTCTTCGTCATATGCATTGTTAG 361
          *****
RDC150 TATTTGAAGGCACCTTTGATGTATTTGTGATCTTACATTGTCAATCATGGGAACCATTTGCA 419
RDC58 TATTTGAAGGCACCTTTGATGTATTTGTGATCTTACATTGTCAATCATGGGAACCATTTGCA 419
DQ787015.1 TATTTGAAGGCACCTTTGATGTATTTGTGATCTTACATTGTCAATCATGGGAACCATTTGCA 1320
RDC232 TATTTGAAGGCACCTTTGATGTATTTGTGATCTTACATTGTCAATCATGGGAACCATTTGCA 399
RDC110 TATTTGAAGGCACCTTTGATGTATTTGTGATCTTACATTGTCAATCATGGGAACCATTTGCA 421
          *****
RDC150 GCTGGCCGTCTGATCTTTGCGCTCAGGCCCTCCACGACCTTCTCTCCGGAGATTGGAGCG 479
RDC58 GCTGGCCGTCTGATCTTTGCGCTCAGGCCCTCCACGACCTTCTCTCCGGAGATTGGAGCG 479
DQ787015.1 GCTGGCCGTCTGATCTTTGCGCTCAGGCCCTCCACGACCTTCTCTCCGGAGATTGGAGCG 1380
RDC232 GCTGGCCGTCTGATCTTTGCGCTCAGGCCCTCCACGACCTTCTCTCCGGAGATTGGAGCG 459
RDC110 GCTGGCCGTCTGATCTTTGCGCTCAGGCCCTCCACGACCTTCTCTCCGGAGATTGGAGCG 481
          *****
RDC150 TCTCTGCTTGGCAATTGCTTCTCGACAACCTCTGGACGTGGAGACTGCTGCATGATGTCC 539
RDC58 TCTCTGCTTGGCAATTGCTTCTCGACAACCTCTGGACGTGGAGACTGCTGCATGATGTCC 539
DQ787015.1 TCTCTGCTTGGCAATTGCTTCTCGACAACCTCTGGACGTGGAGACTGCTGCATGATGTCC 1440
RDC232 TCTCTGCTTGGCAATTGCTTCTCGACAACCTCTGGACGTGGAGACTGCTGCATGATGTCC 519
RDC110 TCTCTGCTTGGCAATTGCTTCTCGACAACCTCTGGACGTGGAGACTGCTGCATGATGTCC 541
          *****
RDC150 GTCACGATTCTCTCATGCTTCTGTCTGTATCGCTCGCTGATGAGCAGCCGTTTGGAGGA 599
RDC58 GTCACGATTCTCTCATGCTTCTGTCTGTATCGCTCGCTGATGAGCAGCCGTTTGGAGGA 599
DQ787015.1 GTCACGATTCTCTCATGCTTCTGTCTGTATCGCTCGCTGATGAGCAGCCGTTTGGAGGT 1500
RDC232 GTCACGATTCTCTCATGCTTCTGTCTGTATCGCTCGCTGATGAGCAGCCGTTTGGAGGA 579
RDC110 GTCACGATTCTCTCATGCTTCTGTCTGTATCGCTCGCTGATGAGCAGCCGTTTGGAGGA 601
          *****
RDC150 AGCTGTGGGCGGCGATCATGCGCATATCTGGAGCGAGCTTTTGAATCTCCTTCACGGCT 659
RDC58 AGCTGTGGGCGGCGATCATGCGCATATCTGGAGCGAGCTTTTGAATCTCCTTCACGGCT 659
DQ787015.1 AGCTGTGGGCGGCGATCATGCGCATATCTGGAGCGAGCTTTTGAATCTCCTTCACGGCT 1560
RDC232 AGCTGTGGGCGGCGATCATGCGCATATCTGGAGCGAGCTTTTGAATCTCCTTCACGGCT 639
RDC110 AGCTGTGGGCGGCGATCATGCGCATATCTGGAGCGAGCTTTTGAATCTCCTTCACGGCT 661
          *****
RDC150 GCAGAGTCTGTAAACAGAGGCATCTTGCACCAAGCTCTCCCATGGCTGGTATGGTTGC 719
    
```

```

RDC58          GCAGAGTCCTGTAACAGAGGCATCTTGCACCAAAGCTCTCCCATGGCTGGTATGGTTGC 719
DQ787015.1    GCAGAGTCCTGTAACAGAGGCATCTTGCACCAAAGCTCTCCCATGGCTGGTATGGTTGC 1620
RDC232        GCAGAGTCCTGTAACAGAGGCATCTTGCACCAAAGCTCTCCCATGGCTGGTATGGTTGC 699
RDC110        GCAGAGTCCTGTAACAGAGGCATCTTGCACCAAAGCTCTCCCATGGCTGGTATGGTTGC 721
*****
RDC150        TTGGTCCAAGGATTGATCGGGTTCGAGCTGGTCCATCCGTCGATTCTCTTCTGGGAGCGC 779
RDC58          TTGGTCCAAGGATTGATCGGGTTCGAGCTGGTCCATCCGTCGATTCTCTTCTGGGAGCGC 779
DQ787015.1    TTGGTCCAAGGATTGATCGGGTTCGAGCTGGTCCATCCGTCGATTCTCTTCTGGGAGCGC 1680
RDC232        TTGGTCCAAGGATTGATCGGGTTCGAGCTGGTCCATCCGTCGATTCTCTTCTGGGA-CGC 758
RDC110        TTGGTCCAAGGATTGATCGGGTTCGAGCTGGTCCATCCGTCGATTCTCTTCTGGGAGCGC 781
*****
RDC150        ACGATGAGCGCCTTGACTCCTCCATGATATCAATGAGCTTGACACAGAACTTCATAATC 839
RDC58          ACGATGAGCGCCTTGACTCCTCCATGATATCAATGAGCTTGACACAGAACTTCATAATC 839
DQ787015.1    ACGATGAGCGCCTTGACTCCTCCATGATATCAATGAGCTTGACACAGAACTTCATAATC 1740
RDC232        ACGATGAGCGCCTTGACTCCTCCATGATATCAATGAGCTTGACACAGAACTTCATAATC 818
RDC110        ACGATGAGCGCCTTGACTCCTCCATGATATCAATGAGCTTGACACAGAACTTCATAATC 841
*****
RDC150        TTGCCGACACGGAGGAAGAATCGCTCTTTCTGGCGGACGTCGCTGAAAACCTCCGGATGC 899
RDC58          TTGCCGACACGGAGGAAGAATCGCTCTTTCTGGCGGACGTCGCTGAAAACCTCCGGATGC 899
DQ787015.1    TTGCCGACACGGAGGAAGAATCGCTCTTTCTGGCGGACGTCGCTGAAAACCTCCGGATGC 1800
RDC232        TTGCCGACACGGAGGAAGAATCGCTCTTTCTGGCGGACGTCGCTGAAAACCTCCGGATGC 878
RDC110        TTGCCGACACGGAGGAAGAATCGCTCTTTCTGGCGGACGTCGCTGAAA-CCTCCGGAT-C 899
*****
RDC150        TCTTCGAGTCGCTTCATTCCGGCATGACCTTGATACATG-TCGC-AATCCC----- 948
RDC58          TCTTCGAGTCGCTTCATTCCGGCATGACCTTGATACATG----- 935
DQ787015.1    TCTTCGAGTCGCTTCATTCCGGCATGACCTTGATACATGATCGCCAATGCCTCCCTGAGG 1860
RDC232        TCTTCGAGTC-CCTTCATTCCGG-ATGAC-TTGT-CATG----- 913
RDC110        TCTTCGAG-CGCTTCATT-CCGG-ATGAC-TTGTACATGA-CGCAATGCTCCCAAGAGG 954
***** * ***** **

```

Figure 3.8. Alignement multiple des Mat1-1 de 4 souches de *Mycosphaerella fijiensis* isolées de la région de Kisangani avec une séquence des mêmes régions Mat1-1 de souches de *M. fijiensis*, issues de la base de données NCBI (accession DQ787015.1).

L'alignement multiple des Mat1-2 de souches de *M. fijiensis* isolées de la région de Kisangani avec une séquence des mêmes régions Mat1-2 de souches de *M. fijiensis* issues de la base de données NCBI (accession DQ787016.1) est illustrée par la figure 3.9.

| | | |
|------------|---|------|
| DQ787016.1 | GATAAAGATTGTCTGGGGTCCGGGTGGATGGCGGGCTGAGGCAGGAAAGGCTCACAGA | 4860 |
| RDC95 | -----GATTGTCTGGGGTCCGGGTGGATGGCGGGCTGAGGCAGGAAAGGCTCACAGA | 54 |
| RDC93 | -----GGATGGCGGGCTGAGGCAGGAAAGGCTCACAGA | 34 |
| RDC133 | -----AGATTGTCTGGGGTCCGGGTGGATGGCGGGCTGAGGCAGGAAAGGCTCACAGA | 55 |
| RDC151 | GATAAAGATTGTCTGGGGTCCGGGTGGATGGCGGGCTGAGGCAGGAAAGGCTCACAGA | 61 |
| RDC292 | -----ATTGTCTGGGGTCCGGGTGGATGGCGGGCTGAGGCAGGAAAGGCTCACAGA | 53 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | TGCAATGCAGCCATATGCCTCAATTCATGAGAGTGATGCTCAAGCAGTCTGCATTTCCTT | 4920 |
| RDC95 | TGCAATGCAGCCATATGCCTCAATTCATGAGAGTGATGCTCAAGCAGTCTGCATTTCCTT | 114 |
| RDC93 | TGCAATGCAGCCATATGCCTCAATTCATGAGAGTGATGCTCAAGCAGTCTGCATTTCCTT | 94 |
| RDC133 | TGCAATGCAGCCATATGCCTCAATTCATGAGAGTGATGCTCAAGCAGTCTGCATTTCCTT | 115 |
| RDC151 | TGCAATGCAGCCATATGCCTCAATTCATGAGAGTGATGCTCAAGCAGTCTGCATTTCCTT | 121 |
| RDC292 | TGCAATGCAGCCATATGCCTCAATTCATGAGAGTGATGCTCAAGCAGTCTGCATTTCCTT | 113 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | CGAGGAGCAATGCTTTGATTCCGACTTGGCACGACGCCGCTGCCTTGGGCCTCTCCCGA | 4980 |
| RDC95 | CGAGGAGCAATGCTTTGATTCCGACTTGGCACGACGCCGCTGCCTTGGGCCTCTCCCGA | 174 |
| RDC93 | CGAGGAGCAATGCTTTGATTCCGACTTGGCACGACGCCGCTGCCTTGGGCCTCTCCCGA | 154 |
| RDC133 | CGAGGAGCAATGCTTTGATTCCGACTTGGCACGACGCCGCTGCCTTGGGCCTCTCCCGA | 175 |
| RDC151 | CGAGGAGCAATGCTTTGATTCCGACTTGGCACGACGCCGCTGCCTTGGGCCTCTCCCGA | 181 |
| RDC292 | CGAGGAGCAATGCTTTGATTCCGACTTGGCACGACGCCGCTGCCTTGGGCCTCTCCCGA | 173 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | GAATGGCTTAGATCGCTACTGCCAAGCAAAAAGCCCTAACATCATCTCTTGCATATCAAT | 5040 |
| RDC95 | GAATGGCTTAGATCGCTACTGCCAAGCAAAAAGCCCTAACATCATCTCTTGCATATCAAT | 234 |
| RDC93 | GAATGGCTTAGATCGCTACTGCCAAGCAAAAAGCCCTAACATCATCTCTTGCATATCAAT | 214 |
| RDC133 | GAATGGCTTAGATCGCTACTGCCAAGCAAAAAGCCCTAACATCATCTCTTGCATATCAAT | 235 |
| RDC151 | GAATGGCTTAGATCGCTACTGCCAAGCAAAAAGCCCTAACATCATCTCTTGCATATCAAT | 241 |
| RDC292 | GAATGGCTTAGATCGCTACTGCCAAGCAAAAAGCCCTAACATCATCTCTTGCATATCAAT | 233 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | CCCAGTTGTGAGTGCAGTGCACAACAGATAACGTACACATAGTGCAGAAAACATGCTG | 5100 |
| RDC95 | CCCAGTTGTGAGTGCAGTGCACAACAGATAACGTACACATAGTGCAGAAAACATGCTG | 294 |
| RDC93 | CCCAGTTGTGAGTGCAGTGCACAACAGATAACGTACACATAGTGCAGAAAACATGCTG | 274 |
| RDC133 | CCCAGTTGTGAGTGCAGTGCACAACAGATAACGTACACATAGTGCAGAAAACATGCTG | 295 |
| RDC151 | CCCAGTTGTGAGTGCAGTGCACAACAGATAACGTACACATAGTGCAGAAAACATGCTG | 301 |
| RDC292 | CCCAGTTGTGAGTGCAGTGCACAACAGATAACGTACACATAGTGCAGAAAACATGCTG | 293 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | TATGTGTAGAGTTCTGTATGATGTAATGAGTTCTGCCACGCTGTTTCAGAGCACATTCC | 5160 |
| RDC95 | TATGTGTAGAGTTCTGTATGATGTAATGAGTTCTGCCACGCTGTTTCAGAGCACATTCC | 354 |
| RDC93 | TATGTGTAGAGTTCTGTATGATGTAATGAGTTCTGCCACGCTGTTTCAGAGCACATTCC | 334 |
| RDC133 | TATGTGTAGAGTTCTGTATGATGTAATGAGTTCTGCCACGCTGTTTCAGAGCACATTCC | 355 |
| RDC151 | TATGTGTAGAGTTCTGTATGATGTAATGAGTTCTGCCACGCTGTTTCAGAGCACATTCC | 361 |
| RDC292 | TATGTGTAGAGTTCTGTATGATGTAATGAGTTCTGCCACGCTGTTTCAGAGCACATTCC | 353 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | AGTGCGAAACATTTTtagggagtaaatgcattccagccggataccgcaatcaaacatctcg | 5220 |
| RDC95 | AGTGCGAAACATTTTtagggagtaaatgcattccagccggataccgcaatcaaacatctcg | 414 |
| RDC93 | AGTGCGAAACATTTTtagggagtaaatgcattccagccggataccgcaatcaaacatctcg | 394 |
| RDC133 | AGTGCGAAACATTTTtagggagtaaatgcattccagccggataccgcaatcaaacatctcg | 415 |
| RDC151 | AGTGCGAAACATTTTtagggagtaaatgcattccagccggataccgcaatcaaacatctcg | 421 |
| RDC292 | AGTGCGAAACATTTTtagggagtaaatgcattccagccggataccgcaatcaaacatctcg | 413 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | AACAGGAGGTAACAAGGCTTTTGACAATCGATTCTGATTGCAAAATGATGACTCTGTTT | 5280 |
| RDC95 | AACAGGAGGTAACAAGGCTTTTGACAATCGATTCTGATTGCAAAATGATGACTCTGTTT | 474 |
| RDC93 | AACAGGAGGTAACAAGGCTTTTGACAATCGATTCTGATTGCAAAATGATGACTCTGTTT | 454 |
| RDC133 | AACAGGAGGTAACAAGGCTTTTGACAATCGATTCTGATTGCAAAATGATGACTCTGTTT | 475 |
| RDC151 | AACAGGAGGTAACAAGGCTTTTGACAATCGATTCTGATTGCAAAATGATGACTCTGTTT | 481 |
| RDC292 | AACAGGAGGTAACAAGGCTTTTGACAATCGATTCTGATTGCAAAATGATGACTCTGTTT | 473 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | GCAACATGGAGAGACTAGTGAATACTGATCTTCGACCTCGCTCCGATCATCATACAGCC | 5340 |
| RDC95 | GCAACATGGAGAGACTAGTGAATACTGATCTTCGACCTCGCTCCGATCATCATACAGCC | 534 |
| RDC93 | GCAACATGGAGAGACTAGTGAATACTGATCTTCGACCTCGCTCCGATCATCATACAGCC | 514 |
| RDC133 | GCAACATGGAGAGACTAGTGAATACTGATCTTCGACCTCGCTCCGATCATCATACAGCC | 535 |
| RDC151 | GCAACATGGAGAGACTAGTGAATACTGATCTTCGACCTCGCTCCGATCATCATACAGCC | 541 |
| RDC292 | GCAACATGGAGAGACTAGTGAATACTGATCTTCGACCTCGCTCCGATCATCATACAGCC | 533 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | TGACAAAACCCCTGGTCTGGCATTCCATCCATAGTGTACATGCATACCACGGAGCTACGA | 5400 |
| RDC95 | TGACAAAACCCCTGGTCTGGCATTCCATCCATAGTGTACATGCATACCACGGAGCTACGA | 594 |
| RDC93 | TGACAAAACCCCTGGTCTGGCATTCCATCCATAGTGTACATGCATACCACGGAGCTACGA | 574 |
| RDC133 | TGACAAAACCCCTGGTCTGGCATTCCATCCATAGTGTACATGCATACCACGGAGCTACGA | 595 |
| RDC151 | TGACAAAACCCCTGGTCTGGCATTCCATCCATAGTGTACATGCATACCACGGAGCTACGA | 601 |
| RDC292 | TGACAAAACCCCTGGTCTGGCATTCCATCCATAGTGTACATGCATACCACGGAGCTACGA | 593 |
| | ***** | |
| DQ787016.1 | CTCTATTCCATGTCATCTACAGCAATCTCCTGATCGCGAGCCTTCTGCTGCATCTCCTCC | 5460 |
| RDC95 | CTCTATTCCATGTCATCTACAGCAATCTCCTGATCGCGAGCCTTCTGCTGCATCTCCTCC | 654 |
| RDC93 | CTCTATTCCATGTCATCTACAGCAATCTCCTGATCGCGAGCCTTCTGCTGCATCTCCTCC | 634 |
| RDC133 | CTCTATTCCATGTCATCTACAGCAATCTCCTGATCGCGAGCCTTCTGCTGCATCTCCTCC | 655 |

```

RDC151      CTCTATTCCATGTCATCTACAGCAATCTCCTGATCGCGAGCCTTCTGCTGCATCTCCTCC 661
RDC292      CTCTATTCCATGTCATCTACAGCAATCTCCTGATCGCGAGCCTTCTGCTGCATCTCCTCC 653
*****
DQ787016.1  AGCCGATCTTGGCTCTGCACATTGCGCAGCAACTTCTTCATCTGTAACATCTCCTCCGCG 5520
RDC95       AGCCGATCTTGGCTCTGCACATTGCGCAGCAACTTCTTCATCTGTAACATCTCCTCCGCG 714
RDC93       AGCCGATCTTGGCTCTGCACATTGCGCAGCAACTTCTTCATCTGTAACATCTCCTCCGCG 694
RDC133      AGCCGATCTTGGCTCTGCACATTGCGCAGCAACTTCTTCATCTGTAACATCTCCTCCGCG 715
RDC151      AGCCGATCTTGGCTCTGCACATTGCGCAGCAACTTCTTCATCTGTAACATCTCCTCCGCG 721
RDC292      AGCCGATCTTGGCTCTGCACATTGCGCAGCAACTTCTTCATCTGTAACATCTCCTCCGCG 713
*****
DQ787016.1  TTCAGTGCAGGACCGAGGATATTCGCTTTGTCCTTGACTGCGGAATCTGGTCAGCTTTCT 5580
RDC95       TTCAGTGCAGGACCGAGGATATTCGCTTTGTCCTTGACTGCGGAATCTGGTCAGCTTTCT 774
RDC93       TTCAGTGCAGGACCGAGGATATTCGCTTTGTCCTTGACTGCGGAATCTGGTCAGCTTTCT 727
RDC133      TTCAGTGCAGGACCGAGGATATTCGCTTTGTCCTTGACTGCGGAATCTGGTCAGCTTTCT 775
RDC151      TTCAGTGCAGGACCGAGGATATTCGCTTTGTCCTTGACTGCGGAATCTGGTCAGCTTTCT 781
RDC292      TTCAGTGCAGGACCGAGGATATTCGCTTTGTCCTTGACTGCGGAATCTGGTCAGCTTTCT 773
*****

```

Figure 3.9. Alignement multiple des Mat1-2 de 5 souches de *Mycosphaerella fijiensis* isolées de la région de Kisangani avec une séquence des mêmes régions Mat1-2 de souches de *M. fijiensis* issues de la base de données NCBI (accession DQ787016.1).

Tableau 3.3. Résultats du Blast de séquences ITS ou Mat obtenues pour les souches isolées de la région de Kisangani.

| Souches | Descr. | Taille | Accessions | M.S | Q.C (%) | E.V | M.I (%) |
|---------|--------------|--------|------------|------|------------|-----|------------|
| RDC18 | <i>M.F.1</i> | 534 | GQ169763.1 | 900 | 100 | 0.0 | 100 |
| RDC32 | <i>M.F.1</i> | 534 | GQ169763.1 | 900 | 100 | 0.0 | 100 |
| RDC100 | <i>M.F.1</i> | 480 | EU514255.1 | 830 | 100 | 0.0 | 99 |
| RDC222 | <i>M.F.1</i> | 511 | GQ169763.1 | 896 | 99 | 0.0 | 99 |
| RDC58 | <i>M.F.2</i> | 936 | DQ787015.1 | 1243 | 64 | 0.0 | 99 |
| RDC110 | <i>M.F.2</i> | 12545 | GU057991.1 | 1605 | 98 | 0.0 | 99 |
| RDC150 | <i>M.F.2</i> | 5243 | DQ787015.1 | 1622 | 98 | 0.0 | 99 |
| RDC232 | <i>M.F.2</i> | 919 | DQ787015.1 | 1410 | 79 | 0.0 | 98 |
| RDC95 | <i>M.F.3</i> | 9799 | DQ787016.1 | 1533 | 98 | 0.0 | 100 |
| RDC133 | <i>M.F.3</i> | 9799 | DQ787016.1 | 1544 | 99 | 0.0 | 99 |
| RDC151 | <i>M.F.3</i> | 841 | DQ787016.1 | 1546 | 99 | 0.0 | 99 |
| RDC292 | <i>M.F.3</i> | 833 | DQ787016.1 | 1533 | 99 | 0.0 | 99 |

Descr: Description; M.S: Maximum Score; Q.C: Query Coverage; E.V: E Value; M.I: Maximum identity ; *M.F.1* : *Mycosphaerella fijiensis* région ITS ; *M.F.2* : *Mycosphaerella fijiensis* Mat1-1; *M.F.3* : *Mycosphaerella fijiensis* Mat1-2.

3.4.3. Evaluation de la pathogénicité

La pathogénicité de 20 souches a été testée en conditions contrôlées par inoculation de bananiers avec des suspensions conidiennes selon un protocole standardisé. Le choix des souches a été fait sur base de la représentativité de l'ensemble des cultivars (bananiers et bananiers plantains) et des sites. Les 20 souches ont été testées en trois sets

expérimentaux à trois jours d'intervalle. Les valeurs d'aire sous la courbe de progression de la sévérité de l'infection (AUDPC), jusqu'au 35^e jour après inoculation, pour 20 souches de *M. fijiensis* isolées de la région de Kisangani sont illustrées par la figure 3.10.

La souche RDC230, isolée bananier plantain Vrai corne « Tala Lola » à Makiso, a été testée dans les trois sets pour s'assurer de la reproductibilité des conditions expérimentales. Comme le montre la figure 3.10, la progression de la sévérité de la maladie au cours des trois sets a été sensiblement comparable pour la souche RDC230, même si un léger décalage est parfois observé à l'apparition des symptômes ou au moment où les nécroses s'étendent. Les valeurs de l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) pour la souche RDC230 lors des trois sets expérimentaux sont très proches et les analyses statistiques montrent qu'il n'existe pas des différences significatives pour cette souche au cours de trois inoculations.

Il ressort des résultats de ces tests que l'inoculation artificielle du bananier par les 20 souches testées a donné lieu à des symptômes typiques de la cercosporiose noire dans les conditions de la serre. Toutes les souches testées ont donc présenté un pouvoir pathogène vis-à-vis du cultivar testé. Les premières lésions visibles, des petits points jaunes verdâtres, sont apparues 17 jours après l'inoculation, les nécroses foliaires brun-foncé ont été observées 35 jours après inoculation.

La progression de la dynamique de développement des symptômes des 20 souches de *M. fijiensis* en conditions contrôlées (Figure 3.11) montre que la période de latence est variable suivant les souches. En effet, la souche RDC215 a atteint le deuxième stade 20 jours après inoculation et le dernier

stade après 29 jours. Par contre, les souches RDC63, 186 et 248 ont mis 17 jours pour atteindre le stade 1, mais le stade 5 s'est manifesté après 35 jours d'inoculation. Par ailleurs, les souches RDC53, 58, 80, 108, 121, 140, 142, 150, 169, 230 (souche contrôle) et 272 se sont limitées en moyenne au stade 4 après 35 jours, mais la souche RDC285 n'a atteint que le stade 3 durant la période de l'expérimentation.

Globalement, sur base de la progression de la sévérité de la maladie au cours du temps, calculée par l'aire sous la courbe de progression de la maladie à partir de l'inoculation jusqu'au 35^e jour après inoculation avec des conidies (Figure 3.6), il ressort que toutes les souches ont un pouvoir pathogène vis-à-vis du cultivar testé. Cependant, la souche RDC215, isolée à Makiso sur le cultivar de bananier plantain « Libanga Liboelabokoi » a manifesté un impact plus élevé que les autres (Figure 3.7) et comme le montre la Figure 3.5, la progression de la sévérité de cette souche a été plus rapide dès le 20^{ème} jour après l'inoculation. La valeur de l'AUDPC de la souche RDC215 est d'ailleurs statistiquement supérieure à celles des souches RDC53, 58, 80, 108, 121, 140, 142, 150, 162, 169, 230 et 285. Cela signifie qu'elle peut être considérée comme plus virulente. Inversement, et bien que l'AUDPC obtenue pour la souche RDC162 ne soit pas significativement différente de la plupart des souches testées, la progression de la souche RDC162 semble démarrer plus lentement que les autres (Figure 3.8). L'AUDPC de la souche RDC63 a aussi été statistiquement plus grande que les valeurs observées pour les souches RDC126, 176, 196, 248, 272 et 288. Cette souche semble donc également relativement plus sévère.

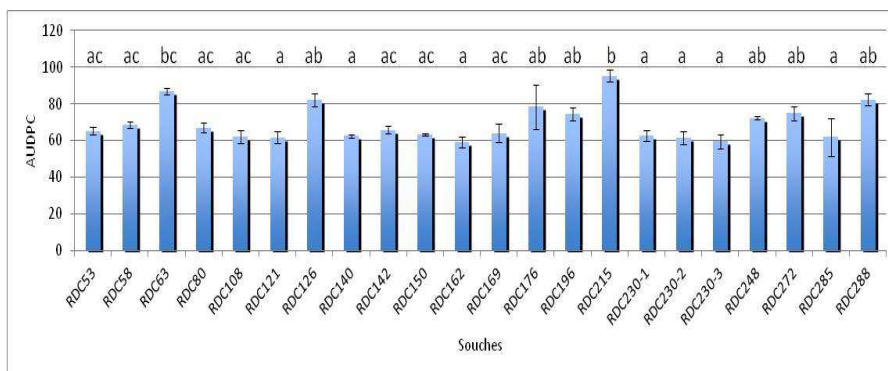


Figure 3.10. Valeurs d’aire sous la courbe de progression de la sévérité de l’infection (AUDPC), jusqu’au 35^e jour après inoculation, pour 20 souches de *M. fijiensis* isolées de la région de Kisangani et inoculées sous forme d’une suspension de conidies. Trois feuilles de quatre bananiers ont été inoculées par souche. Les moyennes des AUDPC affectées d’une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles, à un niveau de probabilité de 0,05, selon le test de l’étendue studentisée de Tukey.

La progression dans la dynamique d’infection des souches de *M. fijiensis* en conditions contrôlées est illustrée à la figure 3.11.

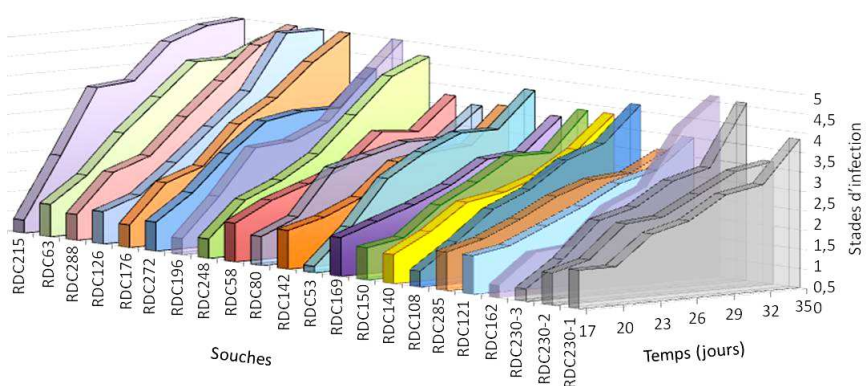


Figure 3.11. Dynamique d’infection des souches de *M. fijiensis*.

Un essai comparable avait été réalisé par Busogoro *et al.* (2004) qui ont inoculé dans les mêmes conditions et chez le même cultivar quatre souches à savoir HND049 en provenance du Honduras, COOK281 en provenance des Îles Cook, TON282 et TON283 en provenance de Tonga. Ces auteurs ont montré que pour l'ensemble de souches, la première période après l'inoculation, caractérisée par la germination des spores, la croissance des tubes de germination et la pénétration par les stomates, s'est produit 7 jours après inoculation chez le cultivar Grande Naine.

Dans cette étude, les premières lésions macroscopiques sont apparues environ 20 jours après l'inoculation, soit environ trois jours plus tard que ce que nous avons observé, et le stade nécrose (stade 5) a été observé 30 jours après l'inoculation, soit environ 5 jours plus tard que notre étude. Les conditions environnementales, les quantités de conidies ou encore la virulence des souches utilisées dans cette étude sont sans doute à la base des légers décalages observés par rapport à la progression des souches testées dans notre essais. Il est cependant intéressant de constater les relatives similitudes dans la progression des souches de *M. fijiensis* dans les deux expérimentations séparées.

3.5. Conclusion

Cette étude visait à isoler les souches fongiques de *Mycosphaerella* spp. associées aux symptômes de cercosporiose dans la région de Kisangani en vue de confirmer l'identification de l'espèce *M. fijiensis* et de les caractériser. Les isolements ont été réalisés à partir d'échantillons des feuilles nécrotiques de 14 cultivars de bananiers, bananiers plantains French, vrai corne et faux corne collectés dans la région de Kisangani, en RDC. Une collection de 296 souches d'origine monosporique a ainsi été constituée

après décharge d'ascospores sur milieu gélosé et repiquage monospore sur PDA.

Sur le plan morphologique, toutes les souches ont présenté un niveau de croissance très lent sur PDA et leur phénotype était typique de celui renseigné pour *M. fijiensis*, et notamment la coloration noire sur la face inférieure qui est une des caractéristiques de *M. fijiensis*. La tendance de la vitesse moyenne de croissance est presque similaire pour toutes les souches qui présentent une allure linéaire, mais le niveau de croissance reste en-dessous de 25 mm après 70 jours. Les dimensions des conidies et le nombre des cloisons pour toutes les souches (une moyenne respective de 46,7-61,8 x 2,4-2,8 μm et 4-8) sont dans l'intervalle reconnu pour l'espèce *M. fijiensis* (30-132 x 2.5-5 μm et 1-10 septa).

Le séquençage de la région ITS de l'ADN ribosomal, réalisé pour 27 souches, a permis de confirmer la similarité des séquences obtenues avec les séquences de *M. fijiensis* déposées dans la base de données NCBI et différentes de celles de *M. musicola* et *M. eumusae*. L'alignement multiple a révélé l'existence d'une faible diversité des régions ITS entre les souches de la région. Les gènes responsables du type de croisement des souches ont aussi été séquençés en partie pour neuf souches dont quatre Mat1-1 (Figure 3.8) et cinq Mat1-2 (Figure 3.9) pour lesquelles une similarité avec *M. fijiensis* a aussi été observée. En outre, afin de caractériser les populations en présence, la détermination du type de croisement des souches a été étudiée pour 52 souches. Trente quatre d'entre elles se sont révélées de type Mat1-1 et 18 autres Mat1-2. Bien qu'une disparité de proportion Mat1-1/Mat 1-2 a été observée, la détection des deux types étaient attendues vu le caractère hétérothallique de l'espèce et l'isolement des souches via la forme sexuée.

Une évaluation du pouvoir pathogène des souches sur bananiers en conditions contrôlées a été réalisée dans le but d'établir définitivement, selon le postulat de Koch que les souches isolées étaient bien les souches impliquées dans le symptôme observés sur bananiers dans la région de Kisangani et d'évaluer leur niveau de pathogénicité. Cette étude a permis de confirmer que toutes les souches présentaient un pouvoir pathogène vis-à-vis du cultivar Cavendish « Grande Naine » avec des degrés de virulence légèrement différents. La souche RDC215 a manifesté un impact plus élevé que les autres et peut être considérée comme la plus virulente tandis que la souche RDC162 peut être considérée comme la moins virulente.

De ces résultats, nous concluons que l'agent fongique responsable des symptômes de MRN dans la région de Kisangani appartient bien à l'espèce *M. fijiensis*. Sur les 296 souches, et sur base de l'ensemble des tests réalisés, seules les caractéristiques de cette espèce ont été relevées.

Chapitre 4

Evaluation de la sensibilité des souches de *Mycosphaerella fijiensis* aux fongicides

Onautshu, O.^{1,2}, Kennang, A.¹, Dhed'a, D.² et Legrève, A.¹

1 Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Applied Microbiology-
Phytopathology, Croix du Sud 2- L7.05.03, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

2 Université de Kisangani, Faculté des Sciences, Laboratoire de culture *in vitro*,
Amélioration des plantes et biotechnologie, B- 2012 Kisangani, RDCongo.

4.1. Résumé

La maladie des raies noires causée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet est l'affection parasitaire la plus dévastatrice des bananiers dans le monde. Le contrôle efficace de cette maladie dans les cultures industrielles ne se fait actuellement que par une lutte chimique intensive. Cependant, les applications répétées de fongicides systémiques ont conduit non seulement au développement de souches résistantes au sein des populations du pathogène, mais aussi à d'importantes nuisances environnementales.

La présente étude a été menée en vue de caractériser le niveau de résistances aux fongicides des populations de *M. fijiensis* de la région de Kisangani afin d'évaluer leur comportement vis-à-vis des fongicides et de déterminer un éventuel flux de gènes issus de populations isolées de plantations industrielles résistantes aux fongicides. Des souches de *M. fijiensis* en provenance de la région de Kisangani en RDC, une région où les fongicides ne sont pas utilisés, et en provenance du Cameroun, où les traitements fongicides sont fréquents dans les plantations industrielles, ont été cultivées en présence de fongicides de différentes familles chimiques, triazoles (époxyconazole, propiconazole et tébuconazole), strobilurine (azoxystrobine) et benzimidazole (carbendazime), pour évaluer leurs niveaux de sensibilité à ces substances selon la technique de dilution sur plaques multi-puits en milieu liquide et celle de l'inhibition de la croissance mycélienne sur boîte de Pétri en milieu solide. Les souches de la RDC se sont révélées toutes sensibles aux triazoles et au carbendazime. Certaines d'entre elles, ont manifesté cependant, une résistance à l'azoxystrobine. Les niveaux de sensibilité des souches du Cameroun aux fongicides testés ont été beaucoup plus variables. De grandes différences de sensibilité ont été observées en fonction de l'origine de la souche et de l'isolement à partir de bananiers des plantations industrielles ou non. Des souches à haut niveau de résistance à

certaines substances ont été isolées des plantations industrielles, mais la résistance aux différentes substances n'y était pas généralisée. Une sensibilité croisée a en outre été observée entre le propiconazole et le tébuconazole, mais pas entre ces molécules et l'époxiconazole. Ces résultats montrent qu'il y a une relation entre le niveau de sensibilité des souches et les traitements et que les populations de la région de Kisangani semblent relativement à l'abri d'importants flux de gènes entre les populations de plantations industrielles. La résistance à l'azoxystrobine laisse néanmoins penser que les populations de Kisangani ne sont pas complètement isolées. Les implications sur une potentielle mise en place de la lutte chimique dans un programme de protection intégrée contre la cercosporiose noire à Kisangani sont discutées.

4.2. Introduction

La cercosporiose noire du bananier ou maladie des raies noires ou encore Sigatoka noire est une maladie fongique foliaire causée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Elle est considérée comme la maladie la plus dévastatrice des bananiers (Lassoudière, 2007). Cette maladie affecte gravement le système foliaire du bananier dans des conditions favorables à son développement. Il en résulte une réduction de la surface photosynthétique, une maturation précoce des fruits (Ploetz, 2001) et une perte significative des rendements de 40 à 100% (Meredith, 1970 ; Martinez, 1997 ; Mourichon *et al.*, 1997 ; Porras and Perez, 1997 ; Cordeiro *et al.*, 1998 ; Martinez *et al.*, 1998 ; Vicente, 1998 ; Ploetz, 2000, Burt *et al.*, 1997 in Sanchez and Zapata, 2000 ; De Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2006).

Le contrôle efficace de cette maladie implique une gestion des variétés résistantes et/ou l'utilisation raisonnée des fongicides. Les applications

répétées des fongicides systémiques conduisent cependant au développement des souches résistantes aux substances actives au sein des populations du pathogène, mais aussi d'importantes nuisances environnementales (Essis *et al.*, 2010).

Plusieurs familles de fongicides sont utilisées pour lutter contre les champignons du genre *Mycosphaerella*. Les plus anciens (chlorothalonil, folpet, mancozèbe) sont des inhibiteurs multisites et de contact dont l'activité préventive est liée à l'inhibition de la germination des spores. Un deuxième groupe comprend le carbendazime, le bénomyl et le thiophanate-méthyle. Ils appartiennent au groupe chimique de benzimidazoles et sont des inhibiteurs de la division cellulaire. Les strobilurines (azoxystrobine, dimoxystrobine, fluoxastrobine, kresoxim-méthyl, picoxystrobine, pyraclostrobine, trifloxystrobine) agissent quant à elles au niveau de la respiration cellulaire en bloquant le transfert d'électrons au niveau du site d'oxydation quinone dans le complexe cytochrome bc1, et empêche la production d'énergie (adénosine triphosphate) (Leroux *et al.*, 2007).

La lutte chimique de la maladie des raies noires se fait par alternance de fongicides de contact (mancozeb ou chlorothalonil) et de fongicides systémiques appartenant aux groupes des benzimidazoles, triazoles, morpholines et strobilurines, appliqués dans de l'huile minérale ou sous forme d'émulsion (Marin *et al.*, 2003). L'utilisation intensive des ces produits chimiques essentiellement de synthèse fait de la culture bananière une culture polluante (Loeillet, 1998).

La maladie des raies noires est bien présente en RDC et nous avons pu identifier dans la première partie de ce travail que *M. fijiensis* était bien associé aux symptômes observés dans la région de Kisangani. Vu la sévérité

de ce pathogène, il importe de mettre en place des mesures pour éviter la dévastation des cultures de bananiers et bananiers plantains dans cette région. Ces mesures devraient intégrer un ensemble de stratégies de protection raisonnée basée sur des pratiques culturales et phytosanitaires pouvant inclure, éventuellement et dans une certaine mesure, la lutte chimique.

En RDC, la majeure partie de la production bananière est l'œuvre de petits producteurs pour qui la lutte chimique n'est actuellement pas accessible du fait de son coût élevé (Mobambo, 2002). Il convient néanmoins d'avoir une idée du niveau de sensibilité des populations de *M. fijiensis* de la région aux fongicides pour évaluer les stratégies à développer. Les capacités de dispersion des pathogènes et notamment les flux de gène qui en découlent jouent un rôle important dans la dynamique spatio-temporelle des épidémies et dans l'évolution des populations pathogènes (McDonald et Linde, 2002).

L'application intensive des fongicides, particulièrement les fongicides systémiques, a sélectionné les individus résistants au sein des populations de *M. fijiensis* dans plusieurs régions du monde et notamment au Cameroun et au Costa Rica (Mavroeidi et Shaw, 2006). La résistance des souches aux fongicides constitue un bon marqueur pouvant permettre l'évaluation du flux de gène entre différentes populations.

Dans cette étude, une évaluation de la résistance des souches isolées dans une région où il n'y a pas utilisation des fongicides a été effectuée pour avoir une idée du flux de gène au sein des populations en RDC et entre les populations plus lointaines en Afrique, notamment, les populations du Cameroun au sein desquelles la résistance à plusieurs familles de fongicides est connue et servira de contrôle interne à notre étude.

4.3. Matériel et méthodes

4.3.1. Obtention des souches

Les souches de *M. fijiensis* utilisées sont regroupées dans l'annexe 4. A partir des échantillons de feuilles récoltées en RDC, l'isolement a été réalisé par la technique de décharge des ascospores sur milieu gélosé (H₂O Agar,) puis mise en culture des ascospores déchargées, sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) comme décrit par Carlier *et al.* (2003). Les souches du Cameroun ont été isolées au Centre africain de Recherche sur Bananiers et Plantains (CARBAP) à partir d'échantillons de feuilles des bananiers et bananiers plantains récoltés dans les localités de Njombé, Mbanga et Ekona au mois de Mars 2008 (Kennang, 2009).

Pour la mise à décharge, les morceaux de feuilles nécrosées ont été d'abord découpés, ensuite trempés dans l'eau distillée stérile pendant 20 minutes, puis déposés sur les couvercles de boîtes de Pétri inversées contenant un gel d'agar à 3%, la face inférieure de la feuille dirigée vers le milieu de culture. Les boîtes ont été incubées à 25°C et les ascospores étaient déchargées pendant la nuit, puis repiquées sur le milieu PDA (39 g/l). Le repiquage monoascospore s'est fait par observation au microscope inversé, marque Motic AE31. Les souches monoascospores ont été conservées à 25°C sous la lumière blanche permanente.

4.3.2. Production des conidies

Les conidies ont été obtenues après ensemencement des petits fragments de mycélium obtenus à partir des mycéliums en croissance sur milieu PDA de deux semaines sur milieu V8 modifié (Carlier *et al.*, 2003) ayant la

composition suivante pour 1 litre d'eau : 10% de jus de légumes V8, 0,02% de carbonate de calcium (CaCO₃), 2% d'agar, pH 6, 4% de streptomycine et 6% de pénicilline, puis incubé à 25°C sous une lumière blanche permanente. Les conidies ont été observées sur une préparation microscopique, à partir du 14^e jour de culture.

4.3.3. Préparation des fongicides

Les fongicides utilisés sont regroupés dans le tableau 4.1. Deux méthodes ont été utilisées pour étudier la sensibilité des souches vis-à-vis des fongicides à savoir la méthode de dilution sur plaques multi-puits à différentes concentrations sur milieu liquide (Annexe 3) et celle de l'évaluation de l'inhibition de la croissance mycélienne sur boîte de Pétri en milieu solide. La première méthode a été appliquée aux triazoles et à l'azoxystrobine, et la deuxième au carbendazime. Le choix de ces fongicides a été fait sur base de leur utilisation courante au Cameroun pour lutter contre la cercosporiose noire (Cohan *et al.*, 2004).

Tableau 4.1. Fongicides utilisés.

| Classe | Substance active | Nom commercial | Formulation (mg de s.a./ml) |
|----------------|------------------|----------------|--------------------------------|
| Triazoles | Epoxiconazole | Opus 125 SC | 125 |
| | Tébuconazole | Horizon 250 EW | 250 |
| | Propiconazole | Tilt 250 EC | 250 |
| Strobilurines | Azoxystrobine | Amistar® | 10 |
| Benzimidazoles | Carbendazime | Bavistin | 20 |

Pour les tests des fongicides en milieu liquide dans les plaques multipuits, des concentrations de 0.003, 0.01, 0.03, 0.11, 0.33, 1, 3.16, 10 et 31.6 mg de s.a. par litre de solution de Potato Dextrose Broth (PDB) ont été utilisées.

L'incubation a été faite à 25°C dans l'obscurité pendant 6 jours. Pour les tests en milieu solide en boîtes de Pétri, des concentrations de 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 et 30 mg de s.a. par litre de milieu Potato Dextrose Agar (PDA) ont été utilisées. L'incubation a été faite à 25°C sous la lumière blanche permanente. La croissance mycélienne a été suivie régulièrement pendant 15 jours sous des doses croissantes de chacun de fongicides.

4.3.4. Détermination de pourcentage d'inhibition

Pour la méthode de dilution sur plaque multi-puits en milieu liquide, la densité optique a été mesurée au spectrophotomètre à 620 nm à partir du 6^e jour d'incubation. L'absorbance de chaque puits a été mesurée avec un spectrophotomètre Ascent et les données ont été directement enregistrées avec le logiciel Ascent software version 2.4.2. Un 'blanco t' était constitué de milieu non inoculé et sans fongicide (150 µl PDB + 50 µl H₂O + Tween 20), alors que le 'blanco f' contenait en plus du milieu de culture, le fongicide à la concentration testée (150µl PDB + fongicide à concentration testée + 50 µl H₂O + Tween 20). Le témoin a été constitué de milieu de culture inoculé mais sans fongicide.

Le pourcentage d'inhibition par rapport au témoin a été calculé suivant la formule :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{DO}_{\text{témoin}} - \text{DO}_{\text{blancot}}) - (\text{DO}_{\text{test}} - \text{DO}_{\text{blancof}})}{(\text{DO}_{\text{témoin}} - \text{DO}_{\text{blancot}})} \times 100$$

Où DO = absorbance.

Pour une souche et un fongicide donnés, la concentration effective 50 (EC₅₀) correspondant à la concentration en substance active qui inhibe de 50% la croissance du champignon par rapport au témoin a été déterminée. Elle a été estimée en réalisant une régression à partir des pourcentages d'inhibition de

deux points d'intervalle incluant 50% d'inhibition contre les concentrations de fongicide correspondantes. L'équation de la droite résultante a été utilisée pour calculer l'EC₅₀.

En ce qui concerne le test de croissance mycélienne en boîte de Pétri, la EC₅₀ a été calculée à partir du taux d'inhibition de souches au 15^e jour de croissance, en considérant par ordre croissant la première concentration qui donne un taux d'inhibition de plus de 50% et la concentration précédente qui a un taux d'inhibition inférieur à 50%. On a déduit ensuite l'EC₅₀ par les calculs en considérant la différence entre les deux concentrations ainsi que celle de leurs taux d'inhibition.

4.3.5. Analyse des données

Les données obtenues ont été analysées par une ANOVA à l'aide du logiciel "Entreprise Guide" (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Les moyennes ont été comparées au seuil de 5% par le test de l'étendue studentisée de Tukey. La concentration qui inhibe 50% de la croissance (EC₅₀) a été calculée après avoir déterminé les équations de régression.

4.4. Résultats et discussion

4.4.1. Sensibilité des souches aux triazoles

La sensibilité des souches de *M. fijiensis* de la RDC et du Cameroun à l'époxiconazole, au propiconazole et au tébuconazole a été évaluée sur plaques multi-puits après 6 jours d'incubation à 25±2°C dans l'obscurité.

La répartition de la sensibilité des souches de RDC à l'époxiconazole, exprimée en classes de valeurs EC₅₀, soit la concentration en fongicide qui inhibe de 50% la croissance fongique, est illustrée par la figure 4.1.

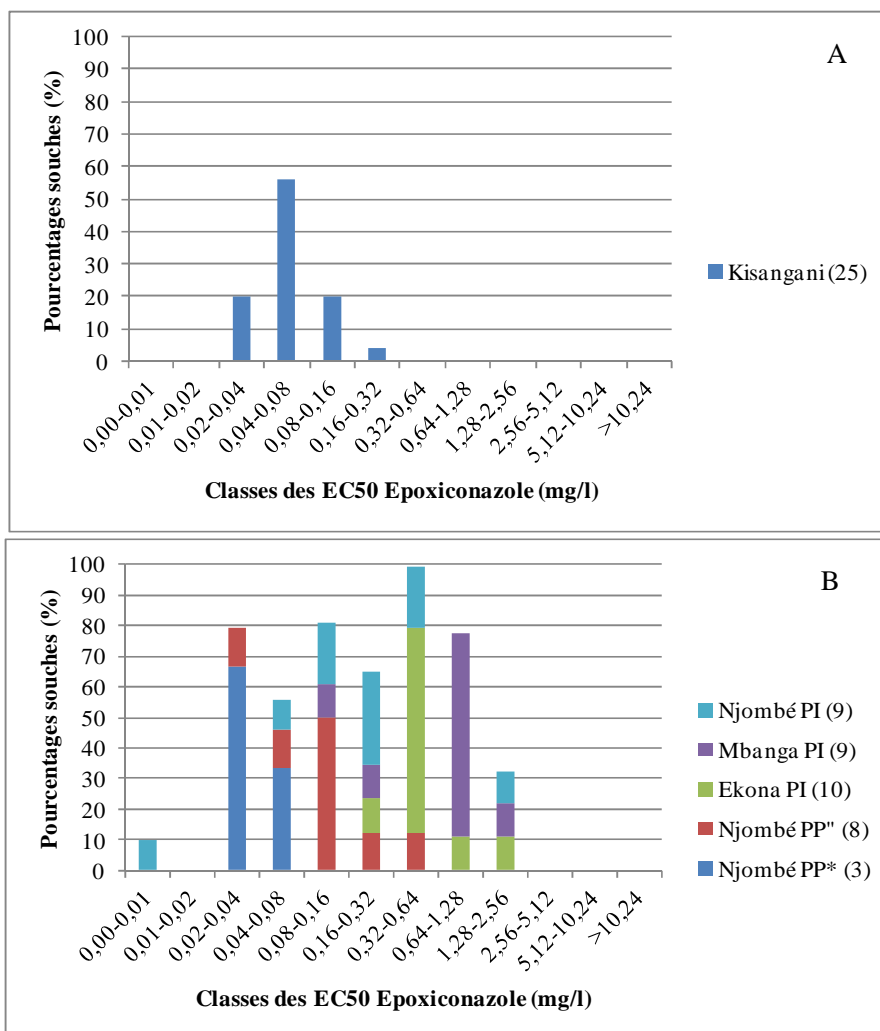


Figure 4.1. Distribution des valeurs des EC₅₀ (concentration effective pour inhiber la croissance de 50%) d'époxiconazole (A) des souches de *M. fijiensis* de la RDC et (B) des souches du Cameroun selon leur origine (PI = plantation industrielle, PP* = plantation paysanne sans historique d'application fongicide et PP'' = plantation paysanne proche des plantations industrielles). La valeur entre parenthèses correspond au nombre de souches testées.

L'analyse de la figure 4.1 montre que la distribution des valeurs des EC_{50} des souches testées vis-à-vis de l'époxiconazole (Opus 125 SC) est étalée entre les classes 0,00-0,01 mg/l et 1,28-2,56 mg/l avec des classes modales distinctes selon l'origine des souches : l'une à 0,04-0,08 mg/l pour les souches de RDC et l'autre à 0,32-0,64 mg/l pour les souches du Cameroun. Les souches de la RDC issues des plantations paysannes sont toutes sensibles à l'époxiconazole tandis qu'en ce qui concerne les populations du Cameroun, les souches des plantations industrielles de Mbanga présentent une plus grande dérive de la sensibilité à ce fongicide, suivies de celles d'Ekona, puis de Njombé.

Notons que quelle que soit la localité, les souches en provenance de plantations industrielles présentent en majorité des valeurs d' EC_{50} plus grandes et sont donc pour la plupart résistantes (dérive prononcée de la sensibilité) à l'exception de la souche CAM26 en provenance d'une plantation industrielle de Njombé, qui est parmi les souches les plus sensibles avec une EC_{50} de 0,003 mg/l. Ceci suggère la présence de souches très sensibles à l'époxiconazole dans les populations des plantations industrielles à Njombé qui ne sont pas homogènes, soit en raison du fitness des souches, soit en raison de flux de gènes entre les populations. Les ascospores volent et il n'est pas surprenant qu'à Njombé, des ascospores se déplacent entre bananeraies industrielles ou plantations paysannes.

Par ailleurs les souches de plantations paysannes présentent en moyenne des valeurs des EC_{50} plus petites que la moyenne pour les plantations industrielles, mais certaines souches ont des EC_{50} supérieures à 0,16 mg/l. Ce phénomène pourrait s'expliquer par les flux de gènes entre les diverses populations du Cameroun, les ascospores de *M. fijiensis* pouvant se disperser sur plusieurs kilomètres (Burt et al., 1997).

La sensibilité des souches de *M. fijiensis* de la RDC et du Cameroun au propiconazole est illustrée par la figure 4.2.

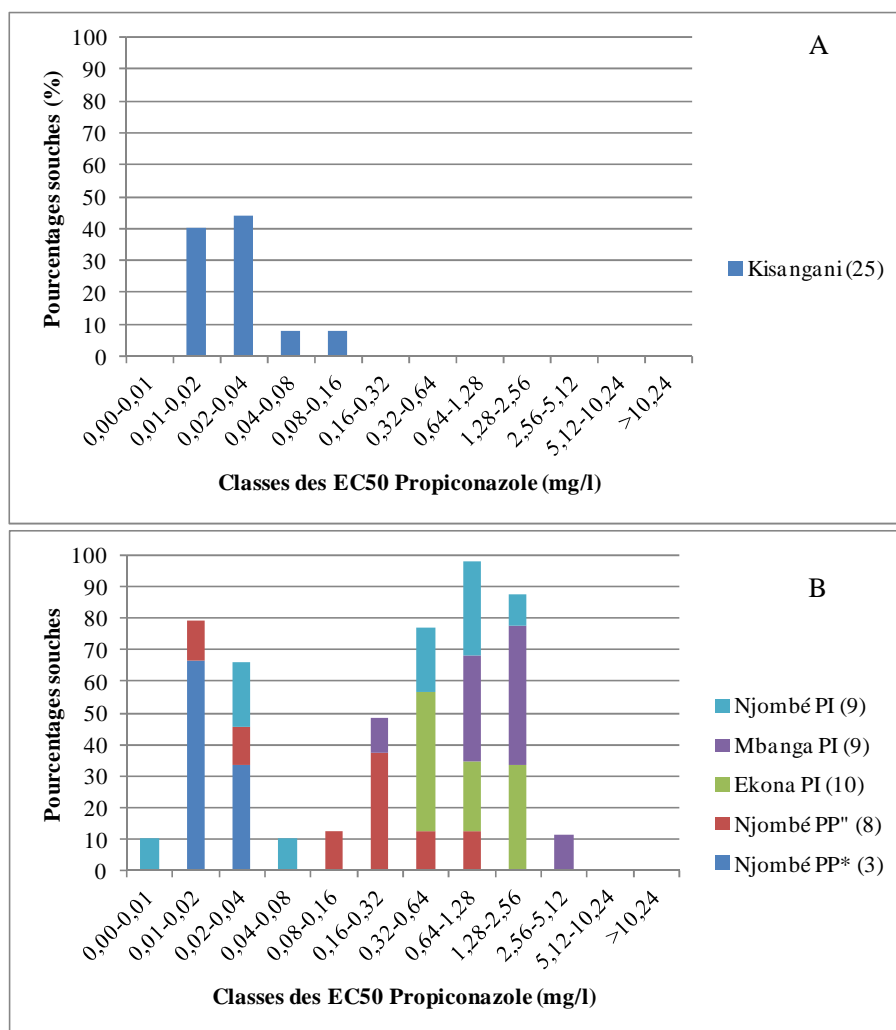


Figure 4.2. Distribution des valeurs des EC₅₀ (concentration effective pour inhiber la croissance de 50%) de propiconazole (A) des souches de *M. fijiensis* de la RDC et (B) des souches du Cameroun selon leur origine (PI = plantation industrielle, PP* = plantation paysanne sans historique d’application fongicide et PP'' = plantation paysanne proche des plantations

industrielles). La valeur entre parenthèses correspond au nombre de souches testées.

Au regard de la figure 4.2, il ressort que les distributions des valeurs des EC_{50} du propiconazole diffèrent selon l'origine des souches. Pour les des souches de la RDC, ces valeurs se situent dans l'intervalle entre 0,01-0,02 mg/l et 0,08-0,16 mg/l, ce qui correspond à des valeurs assez faibles, témoignant de la sensibilité des souches.

Les souches du Cameroun montrent une large distribution des valeurs des EC_{50} de propiconazole comprises entre les classes 0,00-0,01 et 2,56-5,12 mg/l, et il apparaît que les classes modales diffèrent selon la population. Au Cameroun, les souches les moins sensibles sont celles de Mbanga, suivies des souches d'Ekona et de Njombé dans les plantations industrielles, les souches des plantations paysannes étant les plus sensibles. Il est une fois de plus intéressant de constater que les souches des plantations industrielles de Njombé présentent une plus large distribution des valeurs d' EC_{50} comparativement aux souches de Mbanga et d'Ekona.

Deux hypothèses peuvent être à l'origine de cette observation. D'une part, les vols d'ascospores entre plantations paysannes et industrielles qui partagent la même région permettent des échanges entre populations soumises ou non aux traitements qui contribueraient à éviter une généralisation de la résistance. Le fait que certaines souches isolées des plantations paysannes, particulièrement pour les souches de Njombé, présentent des niveaux de sensibilité plus élevées que la moyenne de leur population, voire plus ou moins comparables à ceux des plantations industrielles, peut aussi s'expliquer par un flux de gènes entre les populations des plantations industrielles dans lesquelles les fongicides sont

couramment appliquées et les populations de plantations paysannes non soumises au traitement fongicide.

En effet, si les échanges de matériel génétique entre les populations de différents continents s'avèrent rares (Rivas et *al.*, 2004), il n'en est pas de même entre les populations d'une même région, les ascospores étant dispersées par le vent (Rutter et *al.*, 1998). Mais une autre explication pourrait être liée aux stratégies mises en place pour gérer et limiter les problèmes de résistance en alternant les molécules et les familles chimiques utilisées par les agro-industries concernées pour le contrôle de la cercosporiose.

La sensibilité des souches de *M. fijiensis* de la RDC et du Cameroun au propiconazole est illustrée par la figure 4.3.

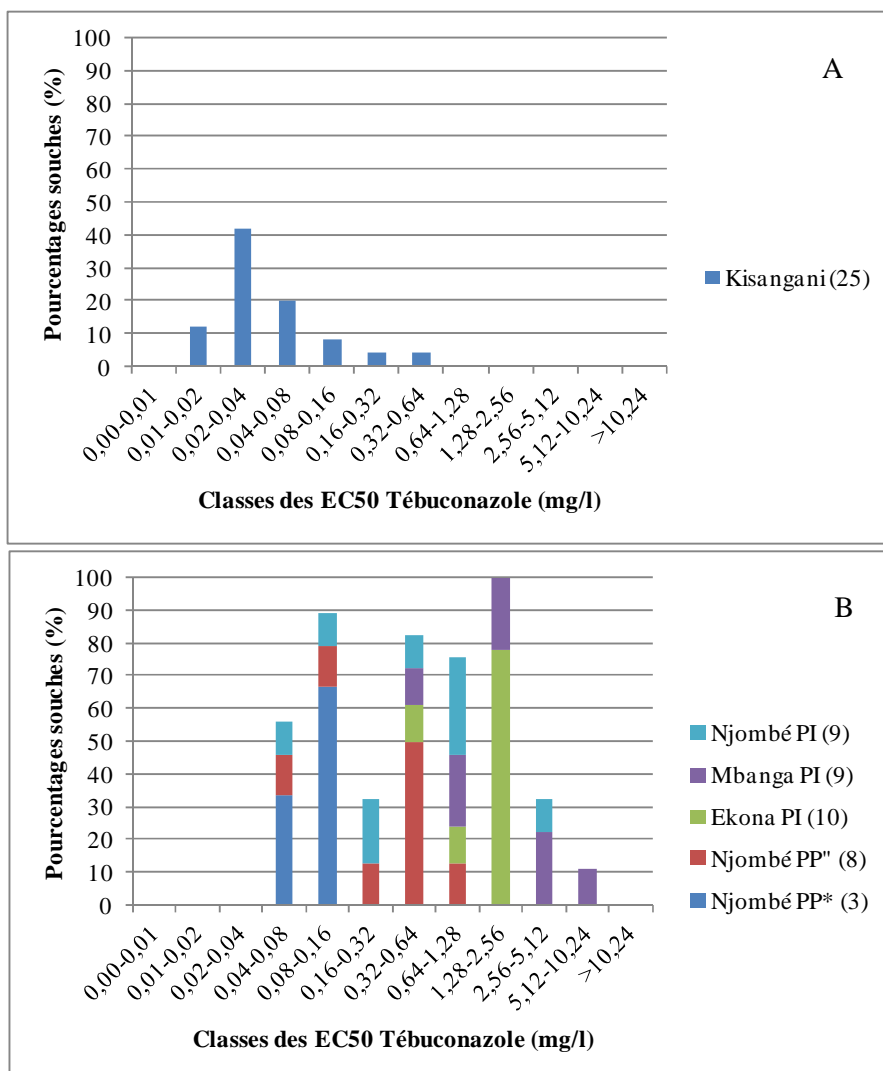


Figure 4.3. Distribution des valeurs des EC₅₀ (concentration effective pour inhiber la croissance de 50%) de tébuconazole (A) des souches de *M. fijiensis* de la RDC et (B) des souches du Cameroun selon leur origine (PI = plantation industrielle, PP* = plantation paysanne sans historique d’application fongicide et PP'' = plantation paysanne proche des plantations industrielles). La valeur entre parenthèses correspond au nombre de souches testées.

Il ressort de cette figure que la distribution des valeurs des EC_{50} des souches de la RDC testées est étalée entre les classes 0,01-0,02 mg/l et 0,32-0,64 mg/l avec une classe modale à 0,02-0,04 mg/l. Toutes les souches sont donc sensibles au tébuconazole. Par contre, la distribution des valeurs des EC_{50} des souches du Cameroun est étalée entre les classes 0,04-0,08mg/l et 5,12-10,24 mg/l avec une classe modale à 1,28-2,56 mg/l. Les souches les moins sensibles au tébuconazole sont celles de Mbanga, suivies des souches d'Ekona puis celles de Njombé.

On remarque également que la souche la plus résistante provient de la localité de Mbanga avec une EC_{50} égale à 7,013 mg/l (souche CAM16), alors que la souche la plus sensible (souche CAM26) provient de Njombé en zone paysanne avec une EC_{50} égale à 0,051mg/l. Par ailleurs, pour ce qui est des souches de Njombé, la souche la plus résistante provient d'une plantation industrielle (CAM30) avec une EC_{50} de 4,378 mg/l alors que les souches les plus sensibles sont comprises dans la classe 0,04-0,08 mg/l, contenant aussi bien les souches isolées de plantation industrielle que des plantations paysannes proches et éloignées des plantations industrielles.

Afin de comparer les niveaux de sensibilités aux triazoles des deux populations entre elles, les valeurs moyennes des EC_{50} des triazoles testés sur les souches de *M. fijiensis* en provenance de la RDC et du Cameroun sont présentées dans le tableau 4.2 et ont été analysées. Au regard de ce tableau, il ressort que les niveaux de sensibilité des souches testées aux triazoles sont variables selon la substance active. En d'autres termes, une dérive de la sensibilité à une triazole n'implique pas toujours une moindre sensibilité aux autres triazoles. Si on veut développer une lutte chimique contre la cercosporiose noire en RDC, il est nécessaire d'utiliser les produits en adoptant directement des stratégies anti-résistances.

Tableau 4.2. Moyennes des EC₅₀ des triazoles vis-à-vis des souches de *M. fijiensis* de la RDC et du Cameroun

| Triazole | CAMEROUN | | | |
|---------------|--------------|------------|--------------|------------|
| | Moyenne EC50 | Ecart type | Moyenne EC50 | Ecart type |
| Epoxiconazole | 0,064 a | 0,0363 | 0,374 a | 0,483 |
| Propiconazole | 0,032 a | 0,0502 | 0,583 b | 0,726 |
| Tébuconazole | 0,065 a | 0,0920 | 0,983 ab | 1,366 |

Les moyennes d'EC₅₀ affectées d'une même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes entre elles, à un niveau de probabilité de 0,05, selon le test de l'étendue studentisée de Tukey.

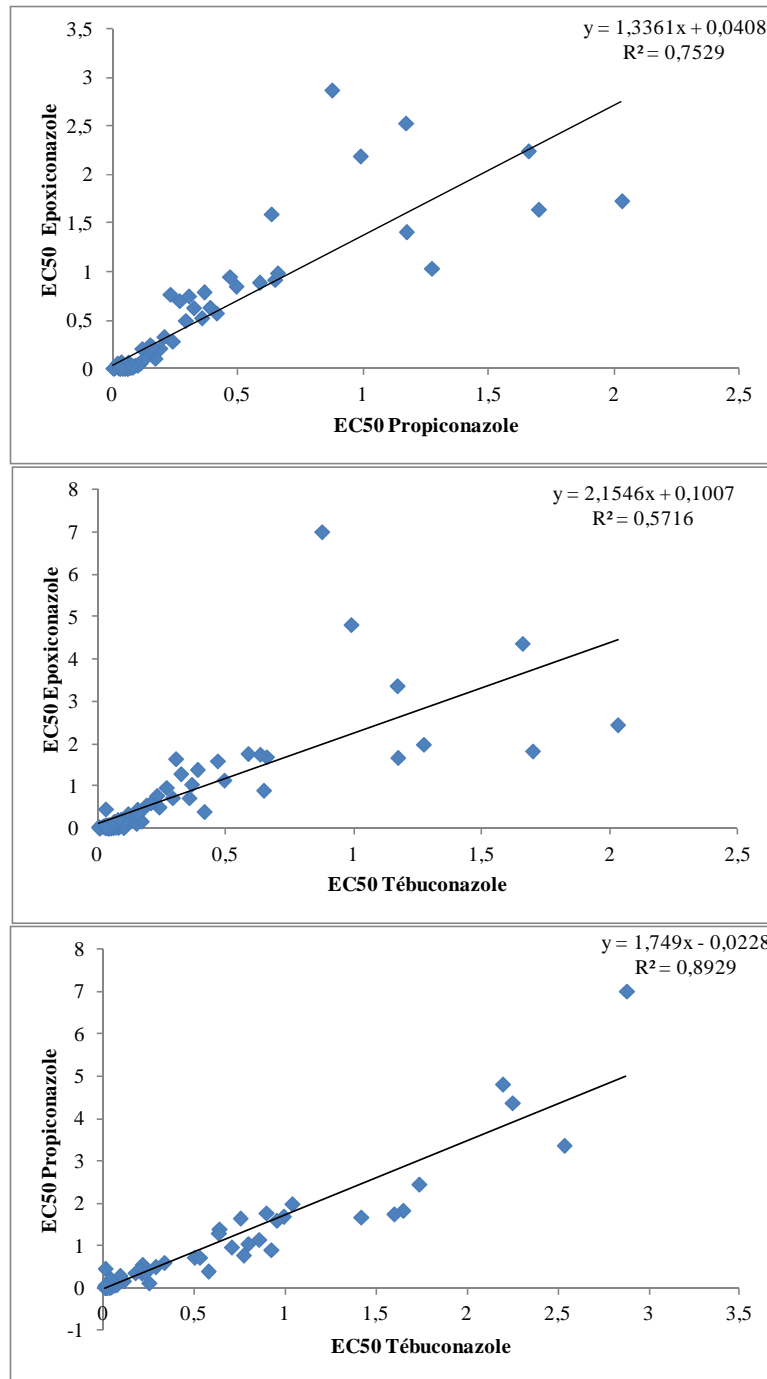


Figure 4.4. Sensibilité croisée aux triazoles des souches de *M. fijiensis* de la RDC et du Cameroun

.Si on observe une sensibilité croisée entre le propiconazole et le tébuconazole au Cameroun et en RDC, tel ne semble pas être le cas entre le propiconazole et l'époxiconazole d'une part, et d'autre part entre le tébuconazole et l'époxiconazole

4.4.2. Sensibilité des souches aux strobilurines

La sensibilité des souches de *M. fijiensis* de la RDC et du Cameroun à l'azoxystrobine exprimée en valeur EC_{50} , soit la concentration en fongicide qui inhibe de 50% la croissance fongique, est illustrée par la figure 4.5.

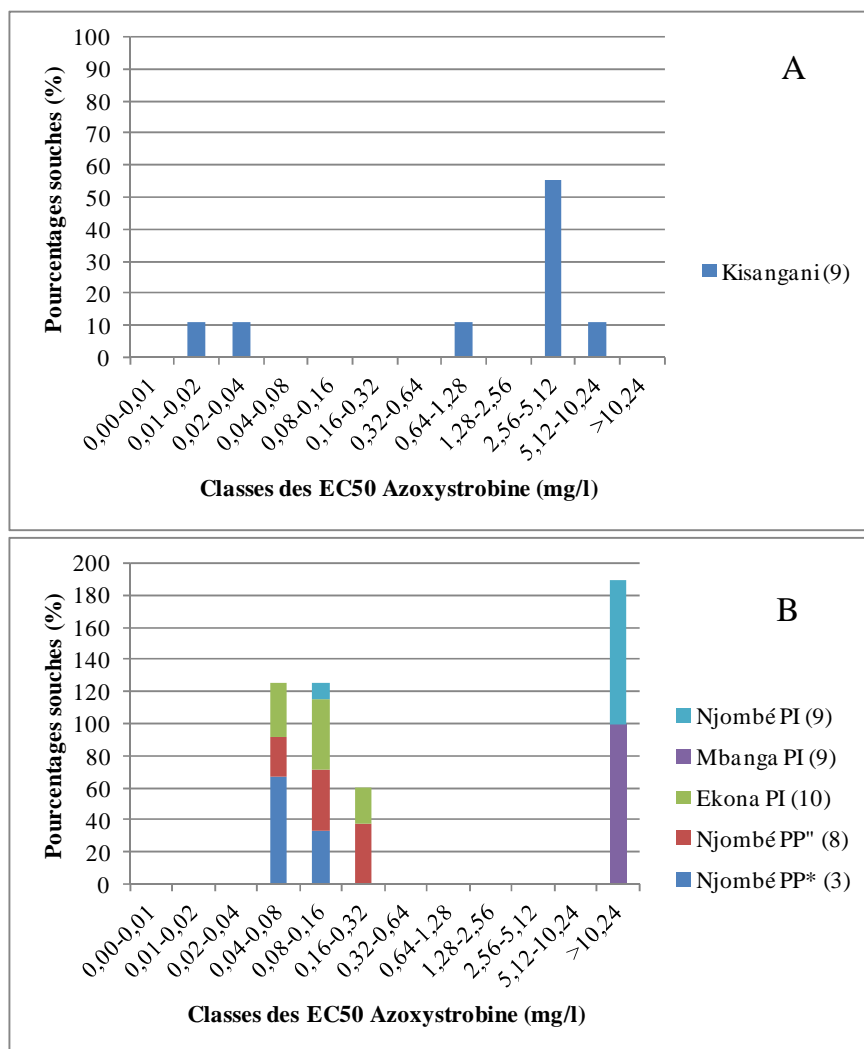


Figure 4.5. Distribution des valeurs des EC₅₀ (concentration effective pour inhiber la croissance de 50%) de l'azoxystrobine (A) des souches de *M. fijiensis* de la RDC et (B) des souches du Cameroun selon leur origine (PI = plantation industrielle, PP* = plantation paysanne sans historique d'application fongicide et PP'' = plantation paysanne proche des plantations industrielles). La valeur entre parenthèses correspond au nombre de souches testées.

L'analyse de cette figure montre que 6 souches sur 9 sont résistantes à l'azoxystrobine (EC_{50} supérieures à la classe de 0,64-1,28 mg/l) à Kisangani (RDC), région dans laquelle il n'y a pas utilisation des fongicides. Cette situation étonnante pourrait être due soit à la résistance naturelle des souches de la région à ce fongicide, soit à un flux de gènes en provenance de populations issues des plantations industrielles, du Cameroun par exemple, et dont le fitness adapté permet le maintien de la résistance malgré l'absence de traitement fongicide. Ceci permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle les souches résistantes en provenance d'ailleurs ont coévolué avec les souches sensibles locales suite à une mauvaise adaptation par rapport à leur lieu d'origine.

Cependant, au Cameroun, on remarque une nette séparation de la distribution des souches sensibles et des souches résistantes à l'azoxystrobine. En effet, toutes les 9 souches en provenance de Mbanga et 9 souches sur 10 en provenance des plantations industrielles de Njombé sont résistantes à l'azoxystrobine avec des valeurs d' EC_{50} supérieures à 20,48 mg/l, alors que toutes les 10 souches d'Ekona sont sensibles. Ces résultats suggèrent une plus grande utilisation d'azoxystrobine dans les zones agro-industrielles de Mbanga et Njombé comparativement aux plantations industrielles d'Ekona.

Par ailleurs, plusieurs niveaux de sensibilité sont observés parmi les souches sensibles. Les souches des plantations paysannes de Njombé (Njombé PP et Njombé PP*) apparaissent les moins sensibles suivies des souches d'Ekona. Il est important de signaler que parmi les souches des plantations paysannes de Njombé, les souches isolées des parcelles éloignées de plantations industrielles présentent un même niveau de sensibilité que les souches isolées des parcelles plus proches.

4.4.3. Sensibilité des souches aux benzimidazoles

La sensibilité des souches de *M. fijiensis* de la RDC au carbendazime exprimée en valeur EC_{50} , soit la concentration en fongicide qui inhibe de 50% la croissance fongique, est illustrée par la figure 4.6.

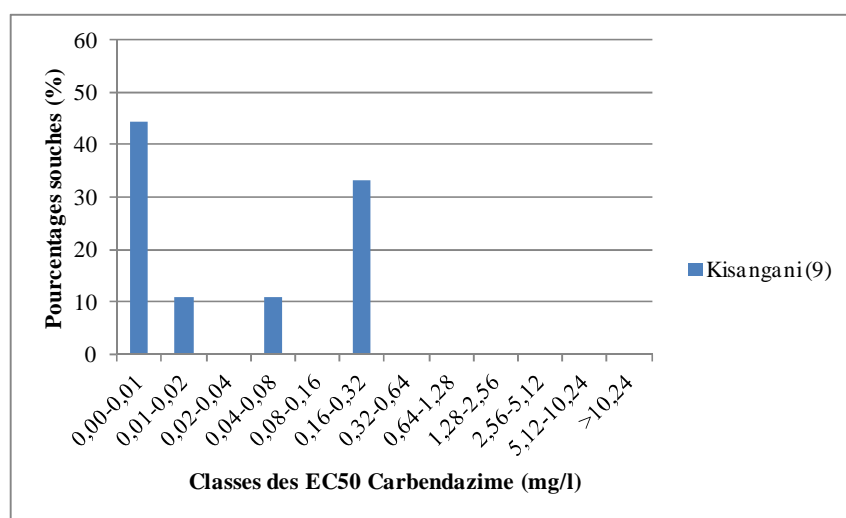


Figure 4.6. Distribution des valeurs des EC_{50} (concentration effective pour inhiber la croissance de 50%) pour le carbendazime pour des souches de *M. fijiensis* de la RDC.

Au regard de cette figure, il ressort que toutes les souches de la RDC sont sensibles au carbendazime avec des valeurs des EC_{50} inférieures à la classe de 0,16-0,32. D'après Suwan *et al.* (2012), une souche est sensible au carbendazime si $EC_{50} \leq 1$ mg/l, faiblement résistante si $EC_{50} \leq 10$ mg/l, modérément résistante si $EC_{50} \leq 100$ mg/l et très résistant si $EC_{50} \geq 500$ mg/l.

De manière générale, les souches en provenance de la RDC se sont révélées toutes sensibles aux triazoles et au carbendazime. Certaines souches de RDC ont manifesté une résistance vis-à-vis de l'azoxystrobine. Par ailleurs, les souches en provenance du Cameroun se sont montrées nettement plus

diversifiées quant à leur comportement vis à vis des fongicides testés et certaines d'entre elles présentaient une résistance marquée aux fongicides testés. Ces résultats révèlent que dans les plantations industrielles il existe à la fois des souches résistantes et des souches sensibles aux fongicides, et que les niveaux de résistance varient d'une localité à l'autre. Cependant, la différence de comportement observée entre les deux populations suppose que la population de *M. fijiensis* de la RDC est différente de celle du Cameroun et qu'il n'existe pas de flux de gènes entre elles ou qu'ils sont peu fréquents.

Koné *et al.* (2009) ont montré qu'en Côte d'Ivoire, les taux de réduction de la croissance mycélienne de propiconazole, tébuconazole, Trifloxystrobine et spiroxamine étaient variables en fonction des substances actives et des espèces. Contre *M. fijiensis*, les EC_{50} étaient respectivement de 0,57 ; 0,73 ; 0,44 et 1,06 mg/l Leroux *et al.* (2007) ont montré également que chez *M. graminicola*, la résistance aux fongicides appartenant à la classe des inhibiteurs de la stérol 14 α -déméthylase (DMI) était associée à différentes mutations sur le gène CYP51 codant pour la 14 α -déméthylase. En effet, les mutations au niveau des codons 459, 460 et 461 confèreraient un faible niveau de résistance, alors que à la position 381 la substitution de l'isoleucine par la valine en combinaison avec les mutations précédentes ont déterminé un plus grand niveau de résistance. Ce type de mutation sur le gène CYP51 conférant les variations de sensibilité aux inhibiteurs de déméthylation (DMI) a également été signalé par Zhonghua et Michailides (2005) et Cools *et al.* (2006) pour *Mycosphaerella graminicola*. En plus des mutations, les différences de sensibilité des souches pourraient aussi s'expliquer par des différences d'activité intrinsèque des principes actifs (Gisi *et al.*, 2000). Tout comme chez d'autres champignons, l'analyse du gène CYP51 chez *M. fijiensis* a permis de révéler que différentes mutations

étaient associées à différents degrés de sensibilité *in vitro* au propiconazole, un des fongicides le plus largement répandus de la classe des inhibiteurs de déméthylation (IDM). Six mutations liées à la perte dans la sensibilité à ce fongicide ont été identifiées : Y136F, A313G, Y461D, Y463D, Y463H et Y463N. Ces mutations ont été analysées en utilisant un modèle d'homologie de la protéine qui a été construite de la structure cristallographique de *Mycobacterium tuberculosis* (Canãs-Gutiérrez *et al.*, 2009). Ces chercheurs ont également déterminé l'expression du gène sur 13 souches de *M. fijiensis* à travers l'analyse quantitative des produits obtenus par RT-PCR. Par ailleurs, ils ont trouvé plusieurs modifications de la séquence du gène codant pour la stérol 14- α -déméthylase qui ont été décrits déjà dans d'autres champignons comme étant en corrélation avec la résistance aux fongicides appartenant au groupe chimique de triazoles. Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre l'expression du gène et la résistance de propiconazole.

Comparativement à ces données et à certaines valeurs élevées observées pour les souches du Cameroun, il semble que les valeurs des EC50 obtenues pour les souches de la région de Kisangani pour les trois triazoles (DMI) testées ainsi que le carbendazime sont faibles et représentatives d'une population sensible à ces matières actives. Cette situation pourrait être liée à l'absence de traitements fongicides en RDC, mais l'apparition des souches résistantes à l'azoxystrobine observée malgré l'absence de ces traitements pourrait être le fait de la dissémination du champignon par les ascospores via le vent.

Une nette séparation de la distribution des souches sensibles et des souches résistantes à l'azoxystrobine a été observée pour les souches du Cameroun. En plus, toutes les 9 souches en provenance de Mbangé et 9 souches sur 10 en provenance des plantations industrielles de Njombé ont été résistantes à

l'azoxystrobine avec des valeurs des EC₅₀ supérieures à 20,48 mg/l, alors que toutes les 10 souches d'Ekona étaient sensibles. Ces résultats suggèrent une plus grande utilisation d'azoxystrobine dans les zones agro-industrielles de Mbanga et Njombé comparativement aux plantations industrielles d'Ekona. Cependant, nos résultats révèlent des différences des niveaux de sensibilité à l'azoxystrobine en fonction des régions ou même au sein des régions.

Ce phénomène a aussi été observé par Amil *et al.* (2007) avec des souches de *M. fijiensis* issues de différentes régions. Bien qu'il soit admis que la résistance à l'azoxystrobine (strobilurine) est qualitative et contrôlée par un seul gène (Geier *et al.*, 1992 ; Wiggins et Jager, 1994, cités par Pérez Vicente *et al.*, 2002), Amil *et al.* (2007) n'ont trouvé aucune relation directe entre le nombre d'applications de strobilurines en champ et la fréquence d'allèles G143A dans chaque plantation, responsable de la résistance des souches aux strobilurines.

Vu que les valeurs les plus grandes des EC₅₀ des souches de RDC obtenues par notre étude sont nettement inférieures à celles observées pour les souches du Cameroun, nous restons prudents quant à l'affirmation de la présence de souches résistantes à l'azoxystrobine dans la population de Kisangani. Les variations des niveaux de sensibilité des souches testées pourraient aussi être liés à des facteurs différents de la mutation G143A. Par ailleurs, d'autres mutations sur le gène *cytb* conférant la résistance aux strobilurines (inhibiteurs de la respiration cellulaire) ont été démontrées (Gisi *et al.*, 2002 ; Zhonghua et Michailides, 2005 ; Fernandez-Ortuno *et al.*, 2008), ce qui expliquerait les différences des niveaux de sensibilité observés. De ce fait, la cause de la résistance aux strobilurines pourrait être plus complexe

qu'une simple mutation et il serait utile de vérifier la présence de la mutation G143A au sein de la population de la RDC.

En ce qui concerne la sensibilité des souches aux fongicides, on remarque qu'il existe des comportements différents entre *M. graminicola* et *M. fijiensis*. Pour la première espèce, on rapporte autant de diversité dans une même parcelle qu'à l'échelle mondiale (Mavroeidi et Shaw, 2004) tandis que pour la seconde, il existe des populations séparées (Robert *et al.*, 2012). Ceci suppose d'une part que les barrières géographiques ou un autre élément physique pourraient limiter la dispersion des ascospores ou affecter leur viabilité en région chaude.

4.5. Conclusion

Cette étude visait principalement à caractériser les niveaux de résistance de différentes populations de *M. fijiensis* de la RDC et du Cameroun à l'époxiconazole, au propiconazole, au tébuconazole, à l'azoxystrobine et au carbendazime, selon la technique de dilution sur plaques multi-puits en milieu liquide et la technique de l'inhibition de la croissance mycélienne sur boîte de Pétri en milieu solide.

Il ressort de cette étude que toutes les souches de la RDC sont sensibles aux triazoles testées et au carbendazime, mais certaines souches de *M. fijiensis* seraient sensibles et d'autres résistantes à l'azoxystrobine. Cette situation est différente des souches du Cameroun où il y a existence d'une dérive de sensibilité et observation des souches résistantes.

Il ressort également des tests de sensibilité aux fongicides que les niveaux de résistance varient en fonction des régions et au sein d'une même région. La

distribution des valeurs des EC_{50} est différente pour les triazoles que pour la strobilurine et le benzimidazole, ce qui reflète des mécanismes différents de résistance vis-à-vis des trois classes de fongicides. En ce qui concerne les triazoles, on observe une sensibilité croisée entre le propiconazole et le tébuconazole, alors que tel n'est pas le cas entre le propiconazole et l'époxiconazole d'une part, et d'autre part entre le tébuconazole et l'époxiconazole. Ce résultat suggère que le propiconazole et le tébuconazole pourraient être appliqués en alternance avec l'époxiconazole pour lutter contre la maladie des raies noires.

Compte tenu de ces résultats, si on veut développer une lutte contre la cercosporiose noire en RDC, il est nécessaire d'utiliser les produits en adoptant directement des stratégies anti-résistances entre autres utiliser les fongicides à modes d'action différents, varier et alterner les substances actives utilisées et enfin ne pas utiliser plus d'une fois une substance active par saison.

Troisième partie

Epidémiologie de la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani (RDC)

Commentaires préliminaires

La banane est consommée partout dans le monde mais elle constitue également une nourriture de base pour des millions de personnes des pays en développement. Elle est un fruit très énergétique (90 calories/100 g), très riche en protéines et en potassium dont elle peut couvrir les besoins quotidiens chez l'homme. Elle est très nutritive et facile à digérer (Churchill, 2011). En République Démocratique du Congo (RDC), le bananier et le bananier plantain sont produits généralement dans toutes les provinces du pays (Dhed'a, 2011). Sa culture est cependant confrontée à de nombreuses maladies entre autres les cercosporioses jaune et noire, la fusariose, les nématodes menaçant considérablement cette culture en diminuant le rendement à l'hectare.

La cercosporiose noire causée par le champignon *Mycosphaerella fijiensis* est l'une des maladies la plus dévastatrice affectant la culture de bananier et bananier plantain à l'échelle mondiale. Elle est favorisée par un climat chaud et une humidité relative élevée. La dissémination de la maladie des raies noires se fait par deux types de propagules, les conidies (spores asexuées) et/ou les ascospores (spores sexuées), produites sur les plants infectés et sur les feuilles sèches infectées jetées dans les bananeraies et dispersées par les pluies de plante à plante au sein d'une même parcelle ou par les vents prédominants de parcelle en parcelle, respectivement (Mourichon, 2003). D'après Marciel (1998), la saison pluvieuse augmente

l'incidence de la maladie des raies noires en raison des précipitations favorables à l'infection.

Les infections par les ascospores ou les conidies produisent les mêmes types de taches sur les feuilles et de développement subséquent de la maladie (Agrios, 2005).

La lutte contre cette maladie se fait principalement par des traitements chimiques dans les plantations industrielles à travers le monde et est par conséquent coûteuse. En RDC, cette pratique ne peut être conseillée à grande échelle à cause, d'une part, des faibles moyens des agriculteurs et, d'autre part, des conséquences sanitaires, environnementales et phytopathologiques imputables à la lutte chimique comme le développement des souches résistantes du pathogène, l'intoxication des paysans et la pollution (Mobambo, 2002).

Etant donné que la région de Kisangani est caractérisée par deux saisons, la saison subsèche et la saison des pluies, et que le bananier est cultivé dans trois systèmes de culture, en forêt secondaire, sur jachère et dans les jardins de case, il nous a semblé intéressant de suivre l'évolution de cette maladie pendant ces deux saisons dans les trois systèmes. Ceci afin d'approfondir les connaissances relatives à l'épidémiologie de la cercosporiose et aux stades d'évolution de la maladie, en fonction des saisons et des systèmes de culture, mais également afin d'évaluer l'impact des cultivars des bananiers et bananiers plantains sur le développement de la cercosporiose noire dans la région.

Chapitre 5

Epidémiologie de la cercosporiose du bananier selon les systèmes de culture dans la région de Kisangani (RDC)

Onautshu, O.^{1,2}, Dhed'a, D.² et Legrève, A.¹

1 Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Applied Microbiology-
Phytopathology, Croix du sud 2- L7.05.03, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

2 Université de Kisangani, Faculté des Sciences, Laboratoire de culture *in vitro*,
Amélioration des plantes et Biotechnologie, B- 2012 Kisangani, RDCongo.

5.1. Résumé

La cercosporiose noire du bananier, causée par le champignon *Mycosphaerella fijiensis*, est une maladie majeure du bananier. Elle a été identifiée dans la région de Kisangani en République démocratique du Congo en 2007. L'impact des systèmes de culture sur la cercosporiose noire du bananier a été étudié afin d'évaluer l'épidémiologie de la maladie et, en conséquence, les stratégies de contrôle à pratiquer. Une étude préliminaire a d'abord été effectuée pour comparer l'incidence de la maladie sur 15 cultivars des bananiers et bananiers plantains en forêt, en jachère et en jardin de case. Une étude approfondie a ensuite été réalisée pour comparer la dynamique d'évolution de la cercosporiose noire sur quatre cultivars en saison sèche et en saison de pluies dans ces trois systèmes de culture selon un dispositif en blocs de Fisher.

Les mesures de l'épaisseur de la litière et les analyses des propriétés chimiques du sol ont été effectuées. Le temps de développement de la maladie, l'incidence, la sévérité et la présence de l'inoculum aérien disséminé dans les trois systèmes de culture ont été évalués. Des conidies et des ascospores ont été observées en quantités variables suivant les saisons, les cultivars et les systèmes de culture. Le temps de développement de la maladie (nombre de jours entre le moment où un cigare atteint le stade B de Brun) a varié de 33 à 67 jours en forêt, de 21 à 52 jours en jachère et de 24 à 60 jours en jardin de case, selon le cultivar. La durée la plus longue a été observée en forêt sur le cultivar de bananier Yangambi Km5 (67 jours) et la durée la plus courte en jachère chez le cultivar de plantain Libanga Likale (21 jours).

L'incidence de la cercosporiose dans les trois systèmes de culture a été plus forte chez ce cultivar Libanga Likale que les autres cultivars de bananiers plantains et de bananiers testés. La sévérité a également été la plus forte en jachère, suivi du jardin de case et de la forêt. L'indice d'infection le plus élevé a été observé en jachère chez Libanga Likale (32,4%) et le plus faible chez Yangambi Km5 en forêt (4,22%).

Une estimation de la quantité d'ascospores présentes dans l'air en saison subsèche et en saison des pluies révèle que cette quantité varie selon l'heure de la journée, le système de culture et la saison. Il semblerait qu'il y a une relation entre l'inoculum aérien et l'indice d'infection des plantes. La libération de spores a été plus forte durant les heures proches du lever du jour et a diminué à partir du moment où le feuillage a séché, durant la période diurne. La concentration de l'air en ascospores est significativement plus faible en saison subsèche et plus élevée en saison pluvieuse. Nos résultats démontrent donc que la pression de la maladie est liée aux cultivars, aux systèmes de culture et à la saison. La moindre infection du bananier en forêt pourrait être liée au meilleur isolement des bananiers moins exposés à l'inoculum aérien en raison de barrières physiques que constitue la végétation environnante. En outre, les caractéristiques minérales et biologiques du sol pourraient influencer la résistance naturelle de la plante.

5.2. Introduction

Les bananes (bananes de type dessert et les bananiers plantains) jouent un rôle essentiel dans l'économie et la subsistance des pays en développement des régions tropicales et subtropicales (FAOSTAT, 2011). Le bananier est une plante ressource (Lassoudière, 2010), son fruit est le plus apprécié dans les pays industrialisés (D'Hont *et al.*, 2012) et constitue la quatrième plus

importante culture de base, avec une production mondiale d'environ 145 millions de tonnes en 2011 (FAOSTAT, 2012).

La cercosporiose noire du bananier ou maladie des raies noires est une maladie fongique foliaire causée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, un ascomycète appartenant à la classe des Dothideomycètes, et à la famille des Mycosphaerellaceae. Elle est considérée comme la maladie la plus destructrice des bananiers (Lassoudière, 2007). Cette maladie a été signalée en République Démocratique du Congo dans la région montagneuse de l'Est (Mourichon, 1987, Sebasigari et Stover, 1988), à Nvuazi dans le Bas-Congo en 1988 et à Yangambi dans la Province orientale en 1989 (Mobambo *et al.*, 1993).

Vu la propagation rapide de cette maladie dans toutes les régions productrices de bananier plantain de basse altitude et son important pouvoir destructeur, des stratégies de protection intégrée doivent être développées pour limiter son impact dans les régions d'Afrique où les exploitations villageoises et les petits exploitants ne peuvent avoir recourt à la lutte chimique pour des raisons économiques. En outre, des stratégies alternatives doivent être développées dans une perspective de développement durable.

Des études menées à Yangambi ont montré que sur douze cultivars de bananiers plantains (AAB) et quatre cultivars des bananiers (AAA), tous étaient sensibles à très sensibles excepté le cultivar 'Yangambi Km5' (AAA) qui avait manifesté une meilleure tolérance à cette maladie (Mobambo, 2002). En outre, les bananiers plantains mis en culture de case, se comportaient en général mieux vis à vis de la maladie comparativement à ceux cultivés en champs (Mobambo *et al.*, 1993).

Dans la région de Kisangani, les bananiers sont cultivés dans trois systèmes de culture, en cultures de case, en jachère ou en forêt secondaire vieille après brûlis, sans traitement préalable.

Les jardins de case sont implantés aux abords immédiats des habitations et constituent la partie de l'exploitation agricole la plus intensivement cultivée. Ils sont en général constitués d'une combinaison d'espèces végétales annuelles et pérennes, et présentent fréquemment une structure étagée, formée d'arbres, de buissons et de plantes de couverture. Grâce à leur structure pluristratifiée, les jardins de case jouent un rôle très important dans la protection des sols contre l'érosion (Wiersum, 1981). Ces sols ont des potentialités agricoles très élevées grâce à l'incorporation constante de litières, de déjections animales et d'autres déchets qui maintiennent leur fertilité.

Les jachères se caractérisent par le développement des populations d'herbacées en place dans les cultures afin de rétablir la fertilité des terres épuisées par la succession des récoltes (Morlon et Siquat, 2008).

La forêt secondaire, fortement ou entièrement façonnée par l'homme, se caractérise par l'association des espèces d'arbres comme *Petersitus macrocarpus* et *Zanthoxylum gilleti* et par l'absence de grands arbres émergeant tels que *Gilbertiodendron dewevrei*. Dans la région de Kisangani, cet écosystème a tendance à s'éloigner des villages suite aux activités anthropiques et la distance qui la sépare de jardins de case est d'environ 3 km.

L'objectif de cette étude est de mieux connaître les caractéristiques épidémiologiques de la maladie de raies noires dans la région de Kisangani

et d'évaluer l'impact des systèmes de culture sur son intensité. Une première étude a été réalisée dans le but de déterminer la distribution et l'incidence de la forme anamorphe et téléomorphe du champignon. Les résultats ont révélé que la production des conidies et d'ascospores était variable suivant les saisons, les cultivars et les systèmes de culture. Une étude approfondie a ensuite été réalisée afin de comparer la dynamique d'évolution de la cercosporiose noire en forêt, en jachère et en jardin de case, sur quatre cultivars (AAA et AAB) et selon la saison.

5.3. Matériel et méthodes

5.3.1. Cadre physique de la région de Kisangani, sites d'analyse et d'expérimentation

L'étude préliminaire relative à l'incidence de la cercosporiose a été réalisée dans la région de Kisangani au cours de la période allant de juillet 2009 à mars 2010. Située au Nord-est de la R.D. Congo à cheval sur l'équateur et le fleuve Congo, Kisangani est localisée dans la région forestière du rebord oriental de la cuvette centrale congolaise et entièrement comprise dans la zone bioclimatique de la forêt dense humide équatoriale (Juakaly, 2007). L'ensemble des données écoclimatiques ainsi que la localisation géographique de la ville de Kisangani à proximité de l'Equateur lui confère un climat équatorial du type Af dans la classification de Köppen (Mate, 2001).

Six communes de la ville de Kisangani, à savoir Kabondo, Kisangani, Lubunga, Makiso, Mangobo et Tshopo, en plus de l'île Mbiye et Masako ont été prospectées.

Les sites choisis pour l'étude expérimentale relative à l'évolution de la cercosporiose noire étaient localisés autour de la réserve forestière de Masako (0°36'N, 25°13'E, Province orientale) à 500 m d'altitude (Upoki, 2001), au Nord de la ville de Kisangani à 14 km sur l'ancienne route Buta, dans la localité Batiabongena, commune Tshopo et district urbain de Kisangani (Lejoly *et al.*, 1988). Le sol de Masako est sablo argileux, de structure grumeleuse, fine à moyenne, friable, à nombreuses racines, de couleur brun-foncé (Soki, 1994).

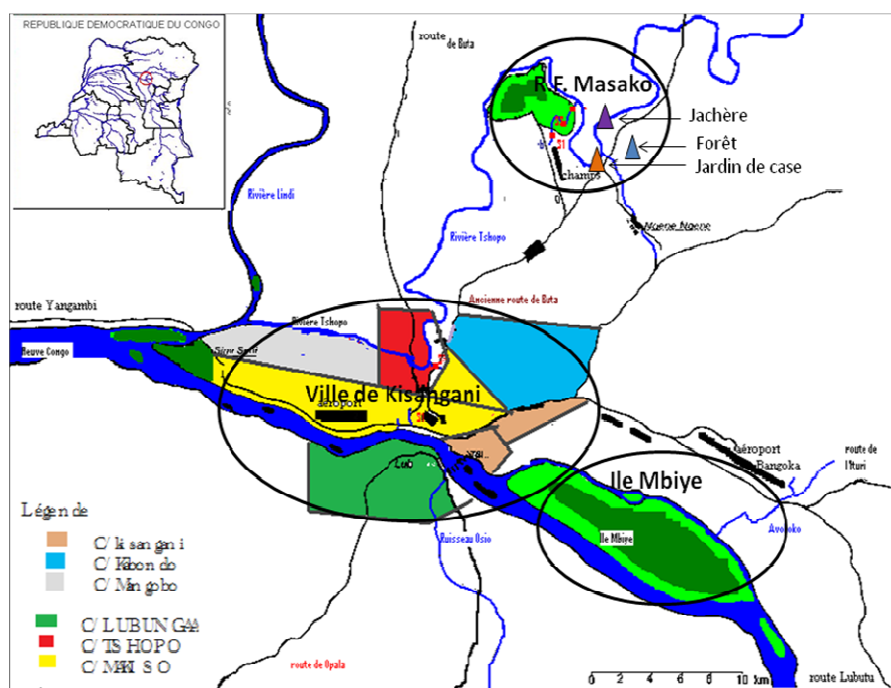


Figure 5.1. Localisation de la région de Kisangani (Source : Adaptation de photo satellitaire 2006, de Lisingi et CFT). R.F. = réserve forestière

5.3.2. Evaluation de la distribution de *M. fijiensis* au cours de la saison subsèche et celle de pluies en 2010 et 2012.

Des échantillons de feuilles de bananiers et bananiers plantains présentant les symptômes caractéristiques de la cercosporiose noire ont été récoltés à Kisangani et ses environs sur des cultivars distincts (Tableau 5.1). Trois sites ont été retenus pour l'étude préliminaire en 2010, à savoir les 6 communes de la ville de Kisangani (Kabondo, Kisangani, Lubunga, Makiso, Mangobo et Tshopo) pour le jardin de case, l'île Mbiye sur le fleuve Congo et les villages autour de la Réserve Forestière de Masako pour les systèmes de culture. L'étude approfondie relative à l'impact du système de culture, de la saison et des cultivars, a été faite à Masako, sur quatre cultivars qui sont parmi les plus cultivés par les paysans de la région (Tableau 5.1).

Le choix de ces cultivars a été motivé d'une part, par leur culture dans le milieu d'étude.

Tableau 5.1. Caractéristiques génotypiques et usages des cultivars.

| Nom de cultivar | Type | Génotype | Usages |
|-----------------|-----------------------|------------|---------|
| Bisamunyo | Banane | AAA-EAHB** | A cuire |
| Grande Naine | Banane | AAA | Dessert |
| Gros Michel* | Banane | AAA | Dessert |
| Yangambi Km5* | Banane | AAA | Dessert |
| Libanga Likale* | Plantain "Faux corne" | AAB | A cuire |
| Litete* | Plantain "French" | AAB | A cuire |

Les cultivars avec * ont concerné l'étude préliminaire et l'étude approfondie. ** AAA-EAHB = groupe de bananier d'altitude d'Afrique de l'Est.

Pour l'étude préliminaire, une pré-enquête a été effectuée dans les différents sites afin de confirmer l'accessibilité et la faisabilité des investigations. Celle-ci a consisté à cibler les sites de prélèvement, à déterminer les noms locaux des cultivars et la présence des symptômes sur les feuilles. Les observations proprement dites ont été basées surtout sur l'aspect de la feuille en distinguant les symptômes de la maladie de la sénescence naturelle des feuilles. Celles-ci ont concerné les stades sexué et asexué à partir des feuilles présentant les symptômes et non les stades de développement de la maladie selon l'échelle de Fouré (1982).

5.3.3. Evaluation de l'incidence de la maladie en fonction du système de culture

En 2012, une étude approfondie a été réalisée afin d'évaluer l'impact du système de culture en jachère, en jardin de case et en forêt secondaire sur la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani, particulièrement autour de la réserve forestière de Masako, 0° 36'N, 25° 13'E. Un dispositif expérimental en blocs de Fisher (Carlier *et al.*, 2002) a été mis en place avec 5 blocs de 4 parcelles de 10 x 9 m chacune, chaque parcelle étant cultivée avec un des cultivars suivants : Libanga Likale, Litete, Gros Michel et Yangambi Km5. Dans chaque parcelle, 6 bananiers avec des plants de bordure espacés de 3 x 2,5 m ont été implantés le 5 décembre 2011, soit une densité de 667 plants par hectare. Ce dispositif expérimental a été implanté dans un champ en jachère et en forêt secondaire. Pour le jardin de case, les plants de bananiers des quatre cultivars étudiés ont été repérés et marqués au stade baïonnette. La distance entre les sites était de 3 km environ.

Dans chaque site expérimental, les mesures de l'épaisseur de la litière et les analyses des propriétés chimiques du sol (carbone organique, azote total, calcium et potassium) ont été effectuées sur les trois sites d'étude à savoir, le jardin de case, la jachère et la forêt secondaire. Les échantillons ont été prélevés dans toutes les zones d'étude moyennant t les sondes pédologiques (Pauwels *et al.*, 1992). Cinq répétitions ont été effectuées. La profondeur considérée était de 0,60 m, le bananier étant une plante à enracinement superficiel. Ces échantillons ont été amenés dans des sachets au laboratoire de pédologie l'Institut Facultaire des sciences Agronomiques de Yangambi (IFA / Yangambi) où les éléments de la matière organique (carbone et azote) et le complexe adsorbant (calcium et potassium) ont été analysés.

Le développement de la maladie a été évalué une fois par semaine par le temps de développement de la maladie qui est le nombre de jours entre le moment où un cigare atteint le stade B de Brun (un stade de déroulement de la feuille du bananier) et l'apparition d'au moins 10 lésions nécrotiques matures distinctes sur cette feuille (Carlier *et al.*, 2002). Les plants ayant un cigare proche du stade B de Brun ont été repérés, la date à laquelle on estime que la feuille a atteint le stade B de Brun a été marquée puis reportée à la fiche d'observation.

L'incidence (nombre de plants infectés par *M. fijiensis* exprimé en pourcentage) et la sévérité de la maladie (la quantité de la surface foliaire infectée par *M. fijiensis*, exprimée en pourcentage ou en stade la maladie) ont été évaluées toutes les 2 semaines à partir de 4 mois après plantation jusqu'à la floraison (Carlier *et al.*, 2002).

La sévérité de la maladie a été évaluée à l'aide de la modification de Gauhl du système de notation de Stover (Carlier *et al.*, 2002). Pour chaque plant

évalué, le pourcentage de surface foliaire infectée par l'agent pathogène a été enregistré et exprimé en stade de la maladie.

Après enregistrement de la sévérité de la cercosporiose, l'indice d'infection pour chaque plant évalué a été calculé à l'aide de la formule :

$$\text{Indice d'infection} = \frac{\sum n.b}{(N-1)T} \times 100 \quad (\text{Carlier } et \text{ al., } 2002)$$

Où n est le nombre de feuilles pour chaque degré de l'échelle, b est le degré de l'échelle, N est le nombre de degré de l'échelle et T est le nombre total de feuilles évaluées.

Les estimations moyennes de la sévérité ont été utilisées pour calculer l'aire sous la courbe de progression d'infection (AUDPC) selon la formule :

$$\text{AUDPC} = \sum_{j=1}^{n_j-1} \left(\frac{y_j + y_{j+1}}{2} \right) (t_{j+1} - t_j)$$

Où y_j est la sévérité de la maladie à la $j^{\text{ème}}$ observation, t_j est le temps à la $j^{\text{ème}}$ observation et n_j est le nombre d'observations (Madden *et al.*, 2007).

5.3.4. Evaluation de la présence de l'inoculum aérien dans les sites expérimentaux

La présence de l'inoculum aérien disséminé dans les trois systèmes de culture a été évaluée par la méthode de sédimentation sur boîte de Pétri (Larpen *et al.*, 1985) modifiée (Dhed'a, 2011). Celle-ci a consisté à exposer de façon passive, pendant 30 minutes, les boîtes de Pétri à la chute naturelle des spores sous l'effet de la gravitation. Dans chacun de 5 blocs expérimentaux, 2 boîtes de Pétri ouvertes contenant le milieu gélosé (eau

agar) stérile ont été placées aléatoirement à une hauteur de 2 m pour la capture des spores.

Pour estimer l'inoculum aérien, 10 boîtes de Pétri ont été placées dans chaque système de culture pendant environ 30 minutes. Les prélèvements ont été effectués du 22 janvier au 15 mars 2012 pour la saison subsèche et 07 avril au 31 mai 2012 pour la saison de pluies, avec un intervalle de deux jours, suivant huit classes horaires de 2 heures chacune, entre 4 heures et 20 heures. Le nombre de spores a été ensuite comptabilisé le jour même au Laboratoire de Microbiologie et Phytopathologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani à l'aide d'un microscope inversé de la marque Motic AE31 et chaque classe horaire a été testée pour les trois systèmes de culture.

5.3.5. Analyses statistiques

Les données collectées ont été analysées par une ANOVA à l'aide du logiciel "Entreprise Guide" (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Le test de l'étendue studentisée de Tukey à un niveau de signification de 0,05 a été utilisé pour comparer la moyenne des traitements pour chaque paramètre. Les barres d'erreur sur les courbes représentent la déviation standard calculée à l'aide de l'écart-type.

5.4. Résultats

L'incidence de la cercosporiose noire, au cours de la saison subsèche et la saison de pluies, a été évaluée dans trois systèmes de culture dans la région de Kisangani en 2010 sur base de la détection de conidies ou d'ascospores. L'étude révèle que l'incidence moyenne de *M. fijiensis* dans les jardins de case variait, selon les communes, entre 40% à Tshopo et 55% à Mangobo en

saison subsèche. Par ailleurs, en saison des pluies, elle a oscillée entre 58% à Kabondo et 76% à Lubunga en saison des pluies (Figure 5.2).

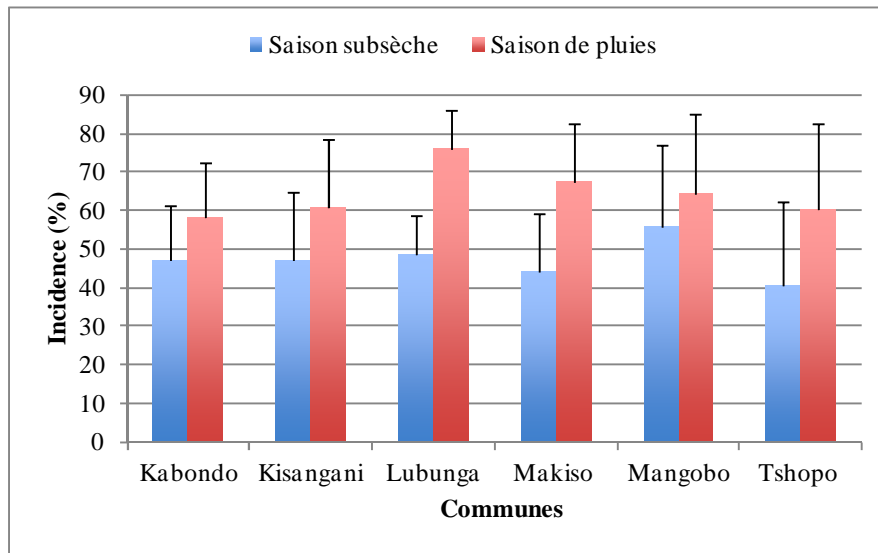


Figure 5.2. Pourcentage de détection de *M. fijiensis* sur bananiers en jardins de case dans les 6 communes à Kisangani selon la saison en 2010.

Pour tous les cultivars dans les six communes de Kisangani, l'incidence a été plus importante en saison des pluies qu'en saison subsèche (Figure 5.2). L'incidence la plus faible a été observée sur Yangambi Km5, en saison subsèche et en saison de pluies. Des incidences plus fortes, égales ou supérieures à 50% même en saison subsèche ont été observées sur les cultivars Bisamunyo, Gros Michel, Libanga Likale et Litete alors qu'une incidence de 33,3% a été observé sur le cultivar Grande Naine. (Figure 5.3).

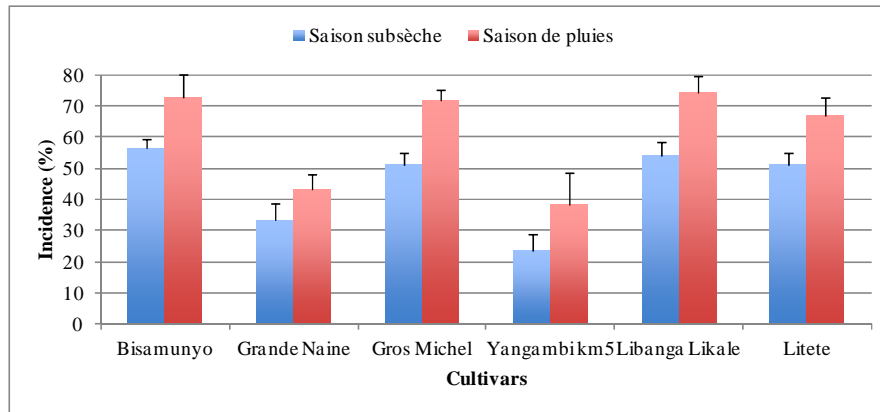


Figure 5.3. Pourcentage de détection de *M. fijiensis* sur bananiers en jardins de case dans six communes à Kisangani selon la variété et la saison en 2010.

Les détections de la forme anamorphe et téléomorphe de *M. fijiensis* sur bananiers et bananiers plantains dans les six communes de la ville de Kisangani (jardin de case) au cours de deux saisons en 2010 sont illustrées par les figures 5.4, 5.5 et 5.6.

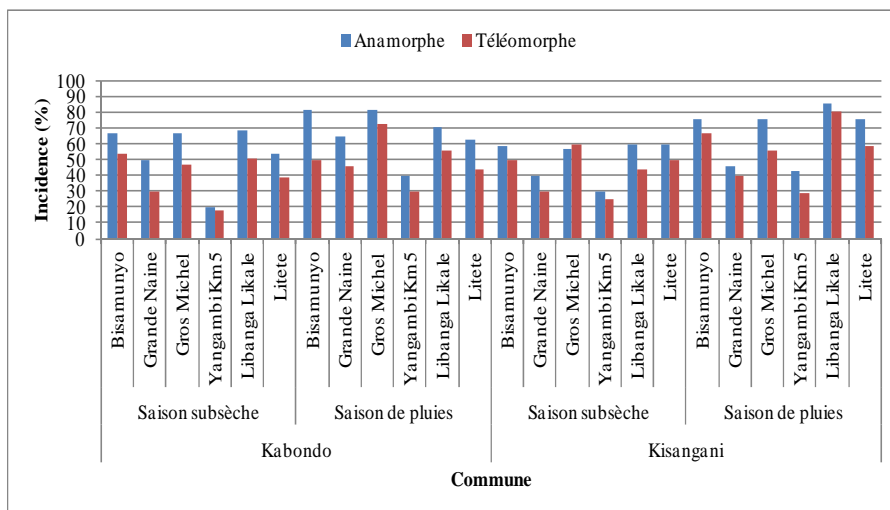


Figure 5.4. Détection de la forme anamorphe et téléomorphe de *M. fijiensis* sur bananiers et bananiers plantains dans les communes de Kabondo et de Kisangani (jardin de case) au cours de deux saisons en 2010.

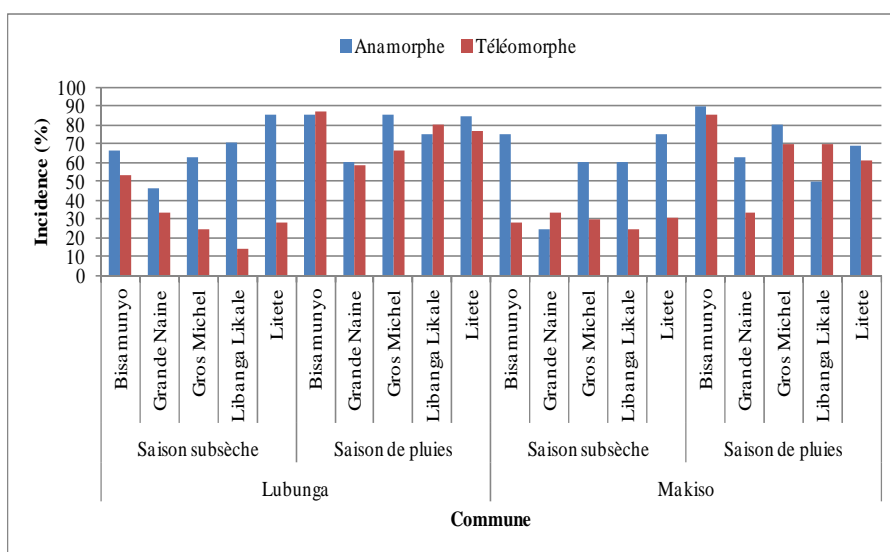


Figure 5.5. Détection de la forme anamorphe et téléomorphe de *M. fijiensis* sur bananiers et bananiers plantains dans les communes de Lubunga et de Makiso (jardin de case) au cours de deux saisons en 2010.

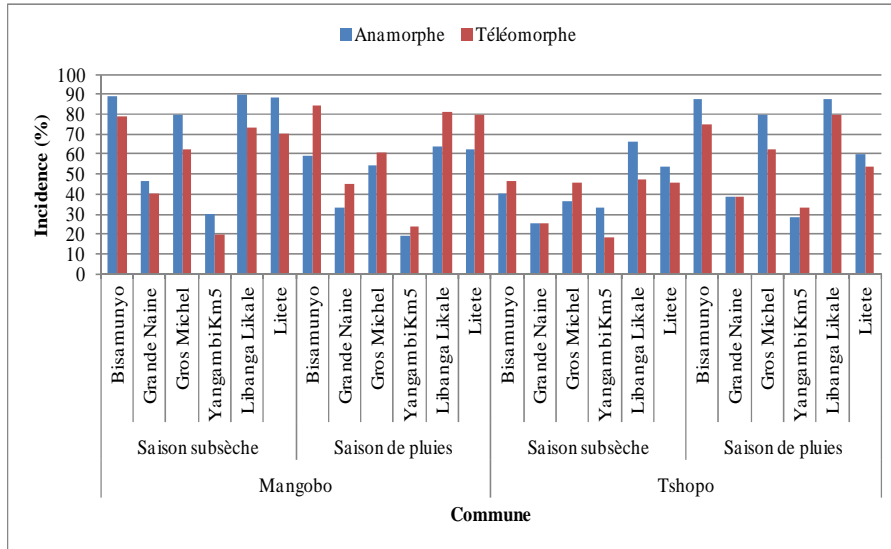


Figure 5.6. Détection de la forme anamorphe et téléomorphe de *M. fijiensis* sur bananiers et bananiers plantains dans les communes de Mangobo et de la Tshopo (jardin de case) au cours de deux saisons en 2010.

L'incidence de la cercosporiose noire du bananier selon les systèmes de culture, à l'île et à Masako sont illustrées respectivement par les figures 5.7 et 5.8.

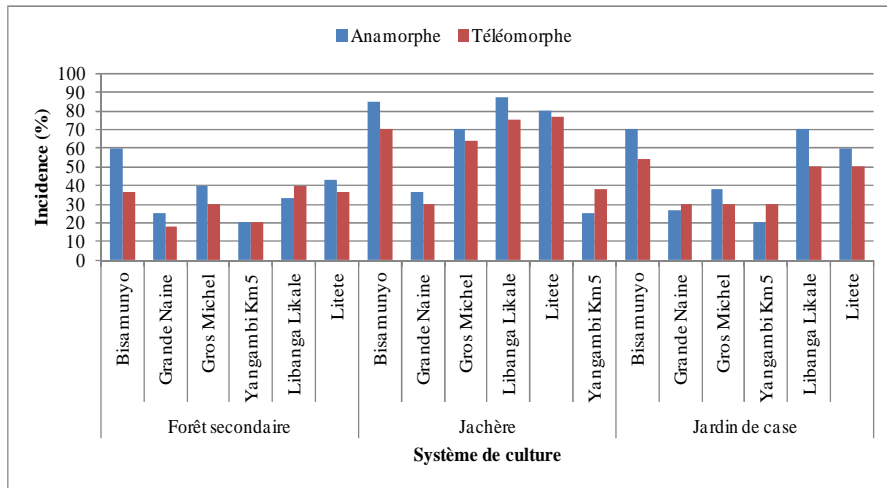


Figure 5.7. Incidence de la forme anamorphe et téléomorphe de *M. fijiensis* selon les systèmes de culture à l’île Mbiye au cours de la saison pluvieuse en 2010.

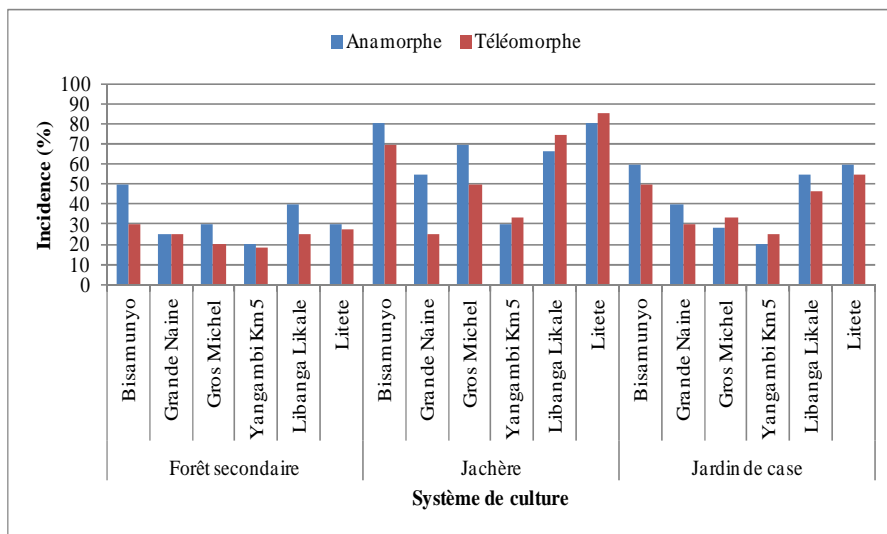


Figure 5.8. Incidence de la forme anamorphe et téléomorphe de *M. fijiensis* selon les systèmes de culture à Masako au cours de la saison pluvieuse.

Les observations des formes anamorphe et téléomorphe révèlent la présence de ces deux formes dans les trois systèmes de culture et les deux saisons. Les formes anamorphes et téléomorphes ont été détectées dans toutes les six communes (Figure 5.2) et sur tous les cultivars analysés (Figure 5.3) en saison des pluies et en saison subsèche. La forme anamorphe a quasi toujours été détectée dans des proportions plus importantes que la forme téléomorphe et l'écart entre les deux formes était le plus important en saison subsèche. Cependant, dans certains cas, la forme téléomorphe était mieux représentée, en saison des pluies sur Libanga Likale et Bisamunyo à Lubunga (Figure 5.5) et sur tous les cultivars à Mangobo (Figure 5.6), mais sur Bisamunyo et Gros Michel à Tshopo en saison subsèche (Figure 5.6).

Par contre, à Kabondo, la forme anamorphe a été mieux représentée, en saison subsèche sur Libanga Likale (686,4%) et moins représentée sur Yangambi Km5 (20%) tandis que la forme téléomorphe a été mieux représentée sur Bisamunyo (53,3%) et moins représentée sur Yangambi Km5 (18,2%). Par ailleurs, en saison pluvieuse, la forme anamorphe a été mieux représentée sur Bisamunyo (81,8%) et moins représentée sur Yangambi Km5 (40%) alors que la forme téléomorphe l'a été mieux sur Gros Michel (72,7%) et moins sur Yangambi Km5 (30%).

Quant à la commune Kisangani, les valeurs observées pour les formes anamorphe et téléomorphe en saison subsèche sont respectivement 58,3 et 50% sur Bisamunyo, 40 et 30% sur Grande Naine, 56,2 et 60% sur Gros Michel, 60 et 44% sur Libanga Likale, 60 et 50% sur Litete et enfin 30 et 25% sur Yangambi Km5. Cependant, en saison des pluies, la forme anamorphe a été représentée à 75% sur Bisamunyo, Gros Michel et Litete, 41,6% sur Grande Naine, 85,7% sur Libanga Likale, et 42,8% sur Yangambi Km5. Par contre, les valeurs de 66,6% sur Bisamunyo, 40%, sur Grande

Naine, 56% sur Gros Michel, 80% sur Libanga Likale, 58,3% sur Litete et 28,5% sur Yangambi Km5 ont été observées en saison des pluies pour la forme téléomorphe.

L'analyse de l'incidence de la cercosporiose noire montre que l'incidence la plus élevée chez les bananiers a été observée sur le cultivar Bisamunyo au cours de la saison de pluies avec 89,4% à Mangobo et 85,7% à Makiso et Kisangani, suivi du cultivar Gros Michel (80%) dans les communes Makiso, Mangobo et Tshopo au cours de la même saison. Par ailleurs, l'incidence la plus faible a été observée sur le cultivar Yangambi Km5 à Kabondo au cours de la saison subsèche. Quant aux bananiers plantains, le cultivar Libanga Likale (90%) a présenté le taux le plus élevé dans la commune Mangobo au cours de la saison subsèche suivi de Litete 88,2% dans la même commune et au cours de la même saison (Figure 5.6).

En ce qui concerne la cercosporiose noire à l'île Mbiye, les incidences ont été variables selon les systèmes de culture (Figure 5.7) et le cultivar. Les détections de l'anamorphe et du téléomorphe ont été les plus fréquentes en jachère, avec des incidences supérieures à 60 voire 80%, excepté pour les cultivars de bananier Yangambi Km5 et Grande Naine. L'incidence a été légèrement moindre en jardins de case et nettement plus faible en forêt secondaire où les fréquences de détection étaient comprises entre 20 et 70% en jardin de case et 18,2 et 60 en forêt secondaire selon le cultivar. L'incidence la plus élevée observée en jachère sur l'île étaient de 87,5% sur le cultivar de bananier plantain Libanga Likale tandis que la plus faible était de 25% chez Yangambi Km5.

A Masako, il ressort également que les bananiers et bananiers plantains ont été plus infectés dans les jachères que dans les jardins de case tandis qu'ils l'ont été nettement moins en forêt secondaire (Figure 5.8). Par ailleurs, dans

les trois systèmes de culture, le taux le plus élevé a été observé chez Bisamunyo et Litete (80%) dans les jachères alors que le taux le plus faible a été observé chez Yangambi Km5 (18,2%) dans la forêt secondaire vieille. De manière générale, la forme anamorphe a été plus observée que la forme téléomorphe dans les trois systèmes de culture, excepté dans quelques cas isolés où les deux formes étaient représentées dans des proportions équivalentes.

Afin d'évaluer si l'incidence de la cercosporiose est effectivement liée aux systèmes de culture et de mieux mettre en évidence les différences entre cultivars, un essai a été mis en place pendant la saison subsèche et celle de pluies au cours de l'année 2012. Les sols des trois sites expérimentaux choisis pour évaluer l'impact des variétés et des systèmes de cultures ont été analysés afin de caractériser des propriétés édaphiques particulières des sols. Les mesures de l'épaisseur de la litière et des propriétés chimiques du sol dans les trois systèmes de culture sont présentées dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2. Epaisseur de la litière et propriétés chimiques du sol selon les systèmes de culture du bananier à Kisangani, Province orientale, en 2012.

| Système de culture | Litière (cm) | Carbone organique (%) | Azote total (%) | Cations échangeables (méq/100 g) | |
|--------------------|--------------|-----------------------|-----------------|----------------------------------|--------|
| | | | | Ca | K |
| | | | | Forêt | 7 c |
| Jachère | 5 b | 0,21 a | 0,05 a | 0,39 a | 0,01 a |
| Jardin de case | 2 a | 0,24 a | 0,03 b | 0,36 a | 0,01 a |

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à un niveau de probabilité de 0,05, selon le test de l'étendue studentisée de Tukey.

Des différences significatives ont été observées dans la hauteur de la litière entre les différents systèmes de culture. La hauteur la plus importante (7 cm) a été observée pour le sol de la forêt, une hauteur de 5 cm en moyenne a été mesurée pour la jachère alors qu'elle était nettement moindre, 2 cm, pour le jardin de case.

Des différences significatives ont été également trouvées pour le carbone organique dont les proportions retrouvées en forêt, 0,46%, atteignaient quasi le double de celles observées dans les deux autres systèmes. L'azote total était quant à lui faible dans les trois systèmes de culture avec 0,03% en jardin de case, 0,05% en jachère et 0,06% en forêt. La teneur en potassium était comprise entre 0,01 à 0,03 méq/100 g de sol selon les sites. Cette teneur a été de 0,01 méq dans le jardin de case et la jachère contre 0,03 méq dans la forêt secondaire vieille. La teneur en calcium a été évaluée de 0,36 à 0,40 méq/100 g de sol selon les zones d'étude.

En 2012, le temps de développement de la cercosporiose noire a varié en moyenne de 33 à 67 jours en forêt, selon les cultivars. Il a été plus faible dans les deux autres systèmes de culture : de 21 à 52 jours en jachère et de 24 à 60 jours en jardin de case (Tableau 5.3). Le temps le plus long a été observé en forêt sur le cultivar de bananier Yangambi Km5 (67,4 jours) suivi du cultivar de bananier plantain Litete et du cultivar de bananier Gros Michel respectivement 51,4 et 48,1 jours. Un temps plus court a été observé chez le cultivar de bananier plantain Libanga Likale (32,5 jours). En jardins de case, ces temps ont été plus courts pour les quatre cultivars, mais la chronologie entre les variétés suivait le même ordre. Il en a été de même en

jachère où les temps ont été encore moindres : 21 jours pour Libanga Likale sur lequel la maladie est apparue le plus précocement et 51 jours pour observer la présence de la maladie sur Yangambi Km5.

L'incidence et la sévérité de la cercosporiose noire ont été plus importantes en jachère comparativement aux deux autres systèmes de culture, pour les quatre cultivars testés (Tableau 5.3). Pour chacun des trois systèmes de culture, le cultivar le plus fréquemment infecté était Libanga Likale, suivi de Litete, Gros Michel et Yangambi Km5.

L'évolution de la sévérité de la cercosporiose noire sur les 7 premières feuilles pendant deux mois d'observation (Figure 5.7) a été la plus rapide en jachère. Elle a été moindre en jardin de case et plus lente encore en forêt. Les différences entre les trois systèmes de culture sont particulièrement marquées entre la forêt et les deux autres systèmes pour les quatre cultivars tandis que la différence entre l'évolution de la sévérité de la cercosporiose noire en jardin de case et en jachère est plus visible pour les trois cultivars les plus sensibles.

Le temps de développement de la maladie, l'incidence et sévérité de la MRN selon le système de culture et le cultivar dans la région de Kisangani, selon un dispositif en blocs de Fisher sont présentés dans le tableau 5.3.

Tableau 5.3. Temps de développement de la maladie (TDM), incidence et sévérité de la maladie des raies noire selon le système de culture et le cultivar de bananier et bananier plantain, dans un dispositif expérimental de Fisher en 5 blocs, autour de la réserve forestière de Masako (Kisangani, RDC) en 2012.

| Paramètre | Cultivar | Système de culture | | | | | |
|--|----------------|--------------------|----------|----------------|----------|-----------------------|----------|
| | | <i>Forêt</i> | | <i>Jachère</i> | | <i>Jardin de case</i> | |
| | | \bar{x} | σ | \bar{x} | σ | \bar{x} | σ |
| TDM | Libanga Likale | 32,5 | 0,7 | 21,0 | 0,6 | 23,9 | 0,3 |
| | Litete | 51,4 | 1,5 | 36,4 | 1,6 | 46,0 | 0,6 |
| | Gros Michel | 48,1 | 0,7 | 27,8 | 0,8 | 39,8 | 0,8 |
| | Yangambi Km5 | 67,4 | 0,8 | 51,0 | 0,7 | 59,5 | 1,1 |
| Incidence | Libanga Likale | 46,7 | 10,3 | 62,0 | 12,5 | 46,7 | 7,5 |
| | Litete | 41,0 | 10,2 | 46,7 | 7,5 | 43,3 | 9,1 |
| | Gros Michel | 32,0 | 11,0 | 45,3 | 0,8 | 40,0 | 0,6 |
| | Yangambi Km5 | 18,0 | 11,9 | 22,7 | 15,3 | 20,0 | 13,9 |
| Sévérité (indice d'infection) | Libanga Likale | 18,3 | 0,9 | 32,4 | 1,6 | 22,9 | 0,8 |
| | Litete | 17,4 | 0,9 | 25,2 | 0,5 | 20,7 | 1,0 |
| | Gros Michel | 19,9 | 1,1 | 29,2 | 2,2 | 25,4 | 1,3 |
| | Yangambi Km5 | 4,2 | 0,5 | 10,1 | 0,6 | 7,8 | 0,8 |

\bar{x} : Moyenne ; σ : Ecart type

L'évolution de la sévérité de la MRN sur les 7 premières feuilles de quatre cultivars de bananier et bananiers plantains, selon le système de culture dans la région de Kisangani est illustrée par la figure 5.9 tandis que l'impact du système de culture et du cultivar sur la maladie est présenté dans le tableau 5.4.

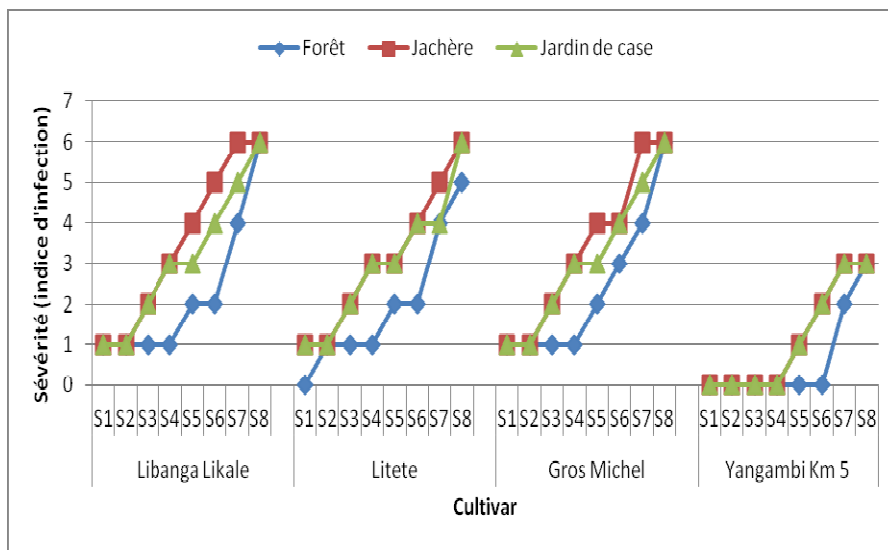


Figure 5.9. Evolution de la sévérité de la cercosporiose noire sur les 7 premières feuilles de quatre cultivars de bananier/bananiers plantains, selon le système de culture à Kisangani, Province orientale, en 2012. S1 à S8 représentent les semaines 1 à 8.

Tableau 5.4. Impact du système de culture et du cultivar sur la cercosporiose noire du bananier à Kisangani, province orientale, en 2012.

| | | Incidence partir | Sévérité | |
|--------------------|----------------|-------------------------|-------------------|---------|
| | TDM* | de 4 mois AP** | (AUDPC***) | |
| | (jours) | (%) | | |
| Cultivars | Libanga Likale | 25,8 c | 51,8 a | 497,6 a |
| | Litete | 44,7 b | 43,7 ab | 365,9 a |
| | Gros Michel | 38,5 b | 39,1 b | 342,8 a |
| | Yangambi Km 5 | 58,3 a | 20,2 c | 58,0 b |
| Système de culture | Forêt | 49,8 a | 34,4 b | 199,1 b |
| | Jachère | 33,4 a | 44,2 a | 387,8ab |
| | Jardin de case | 42,2 a | 37,5 ab | 347,9 a |

*TDM : Temps de développement de la maladie ; **AP : Après plantation ; ***AUDPC : Aire sous la courbe de progression de la maladie. Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à un niveau de probabilité de 0.05, selon le test de l'étendue studentisée de Tukey.

Des effets significatifs du système de culture et du cultivar ont été observés pour ce qui concerne, l'incidence et la sévérité de la cercosporiose noire du bananier (Tableau 5.4). Aucun effet croisé entre ces deux variables n'a été observé pour l'ensemble de paramètres étudiés. En moyenne, le développement de la cercosporiose noire est beaucoup plus lent chez le

cultivar Yangambi Km5 (58,3 jours) que chez Gros Michel (38,5 jours), Litete (44,7 jours) et Libanga Likale (25,8 jours).

L'incidence de la cercosporiose noire après 4 mois de plantation a été beaucoup plus faible chez les bananiers que les bananiers plantains. Cependant, parmi les bananiers et sur base du temps de développement de la maladie, de l'incidence et de la sévérité, le cultivar Yangambi Km5 a été significativement plus tolérant à la maladie. Quant aux systèmes de culture, des différences significatives entre l'incidence et la sévérité de la cercosporiose noire en forêt et en la jachère ont clairement été observées.

Dans le but d'évaluer l'impact potentiel de l'inoculum aérien ou du stade téléomorphe de *M. fijiensis* sur les infections (secondaires) pendant la saison subsèche et la saison de pluies, et de mieux comprendre l'épidémiologie de la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani, une mesure de l'émission des ascospores dans les trois systèmes de culture a été réalisée par la méthode de sédimentation sur boîte de Pétri.

Sur base des quelques observations effectuées, plusieurs tendances intéressantes ont été constatées. D'une part, la concentration d'ascospores de *M. fijiensis* dans l'air (Figure 5.10) varie selon l'heure de la journée, une plus grande quantité d'ascospores ayant été mesurée entre 4 heures et 8 heures du matin, une quantité nettement plus faible entre 8 et 10 heures alors qu'aucune ascospore n'a été captée entre 10 heures et 20 heures. En outre, une quantité nettement plus importante a été mesurée en saison des pluies comparativement à la saison subsèche et une relation entre l'intensité de la maladie et la quantité d'ascospores émises a été observée puisque les quantités d'ascospores émises en forêt étaient nettement moindres que celles émises dans les deux autres systèmes de cultures. Cependant, les quantités captées ont varié de 12 à 157 en forêt, 21 à 263 en jachère et 15 à 226 en

jardin de case au cours de la saison subsèche. Par contre, en saison pluvieuse, elle a oscillé entre 45 et 322 (forêt), 74 et 489 (jachère) et 59 et 411 (jardin de case).

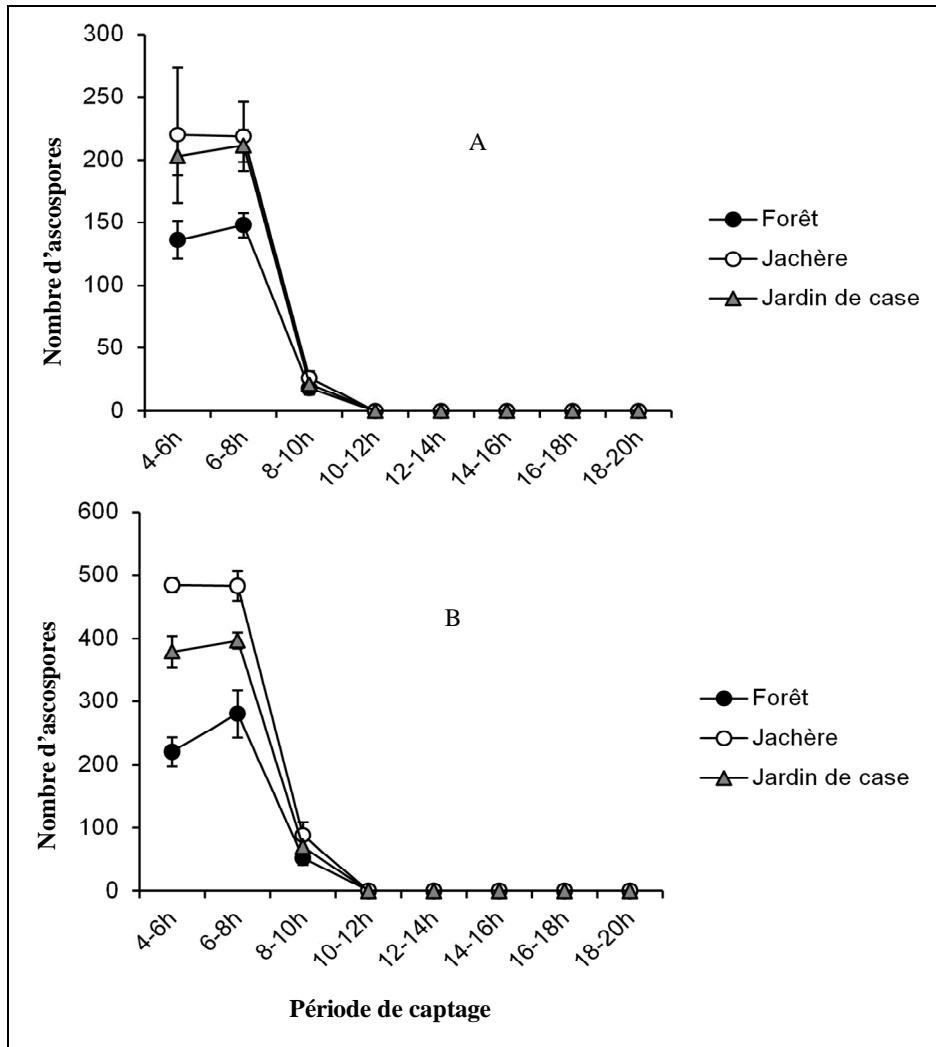


Figure 5.10. Mesures de la quantité d'ascospores de *M. fijiensis* selon les saisons et les systèmes de cultures à Kisangani, Province orientale, RDC en 2012. (a) : Saison subsèche ; (b) : Saison de pluies. Les moyennes et les

écarts-types sont ceux de 3 valeurs observées à intervalle de 19 jours chacune.

La relation entre l'intensité de la maladie des raies noires et la quantité d'ascospores en forêt, en jachère et en jardin de case à Kisangani est illustrée par la figure 5.11.

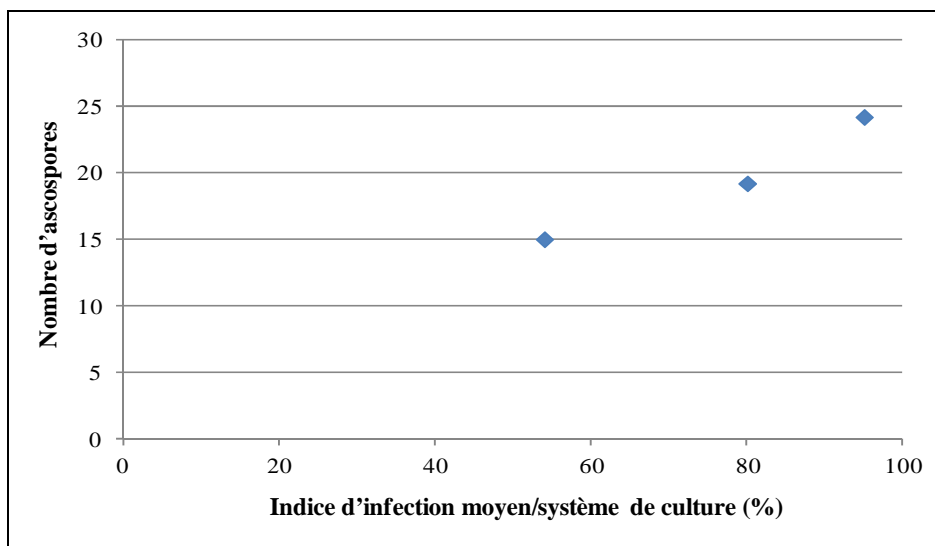


Figure 5.11. Relation entre l'intensité de la maladie des raies noires et la quantité d'ascospores dans les 3 systèmes de culture à Kisangani, Province orientale, RDC en 2012.

Au regard de cette figure, il ressort qu'en moyenne, la forêt a présenté des valeurs faibles pour l'indice d'infection et le nombre d'ascospores par rapport aux deux autres systèmes soit respectivement 15% et 54, pendant la période d'expérimentation. Par ailleurs, en jachère et en jardin de case, l'indice d'infection et le nombre d'ascospores ont été plus élevés qu'en forêt respectivement 24,2% contre 95 et 19,2% contre 80. Ces résultats suggèrent

que la pression de la maladie semble être liée à la quantité d'ascospores dans le système de culture.

5.5. Discussion

Cette étude avait pour objectif de mieux connaître l'épidémiologie de la cercosporiose noire dans la région de Kisangani et d'évaluer son incidence en fonction des saisons, des cultivars et des systèmes de culture. Les observations effectuées en 2010 ont montré que, comme dans les autres régions du monde, la saison de pluies est plus favorable au développement de la cercosporiose noire que la saison subsèche (Figure 5.3). Cependant, les conditions en saison subsèche dans la région de Kisangani sont suffisamment humides que pour permettre un bon développement de la cercosporiose. On ne doit donc pas s'attendre à une forte diminution de la pression de la maladie pendant cette période à l'image de la situation dans d'autres régions du monde.

Sur le plan épidémiologique, notre étude révèle en outre que les deux formes fongiques de *M. fijiensis*, l'anamorphe et le téléomorphe, sont détectées non seulement en saison des pluies mais également en saison subsèche dans les différentes parcelles localisées en forêt, en jachère et en jardin de case. Ces observations démontrent que ces deux formes jouent un rôle dans l'amplification de l'infection en bananeraies mais qu'en outre, les ascospores qui sont disséminées par le vent peuvent disséminer la maladie à plus grande échelle quelle que soit la saison.

La concentration des spores a été plus faible durant la saison subsèche et nettement plus grande durant la saison de pluies, permettant à la maladie de se propager de feuilles en feuilles et d'infecter les feuilles plus jeunes. Durant la saison subsèche, la rosée est sans doute un facteur important qui permet de maintenir un taux d'humidité suffisant pour favoriser la libération

d'une quantité, bien que moindre qu'en saison des pluies, suffisamment appréciable d'ascospores et des conidies, contribuant à maintenir un niveau d'inoculum.

Pendant la saison pluvieuse, la pluie est clairement un facteur déterminant pour la libération des ascospores et conidies (Jiménez, 1994). Selon cet auteur, l'alternance de périodes avec et sans pluies paraît favoriser la production des propagules infectieuses (ascospores et conidies). D'après lui, des pluies supérieures à 1 mm conduisent à un haut niveau de libération de spores bien que des faibles pluies y contribuent également.

Les recherches effectuées pendant l'année 2010 avaient déjà montré que les cultivars de bananier plantain Libanga Likale et de bananier Bisamunyo étaient les plus sensibles à la cercosporiose alors que le cultivar de bananier Yangambi Km5 était plus résistant. Par ailleurs, en 2012, les bananiers plantains sont également apparus plus sensibles que les bananiers : bien que les temps de développement de la maladie n'aient pas été systématiquement plus courts pour les bananiers plantains comparativement aux bananiers, l'incidence et la sévérité étaient plus grandes sur plantains.

Parmi les deux cultivars de bananiers testés, Gros Michel et Yangambi Km5, le cultivar Yangambi Km5 (AAA), communément appelé « Ibot » est nettement moins sévèrement infecté. Nos observations confirment donc que ce cultivar est nettement mieux tolérant. Cette caractéristique, en plus de sa résistance aux nématodes et éventuellement au charançon noir du bananier (Daniells et Bryde, 1995) lui confère un avantage certain comparativement aux autres cultivars. Des études menées à Yangambi sur les cultivars des bananiers et bananiers plantains avaient également montré que tous les

cultivars étudiés étaient sensibles à la MRN excepté le cultivar Yangambi Km5 qui était tolérant à cette maladie (Mobambo, 2002).

Les essais réalisés sur les deux années ont clairement mis en évidence que la pression de la maladie est significativement moindre en forêt comparativement à la culture en jachère et jardin de case. Les analyses du sol révèlent que la hauteur de la litière est beaucoup plus petite dans le jardin de case (2 cm) que dans la jachère (5 cm) et dans la forêt secondaire (7 cm). Ce type de litière est source de l'humus de qualité qui enrichit le sol de plusieurs éléments essentiels selon sa composition, elle-même dépendante de la densité et du type de la végétation ainsi que de l'humidité du sol.

Les valeurs observées dans nos essais rejoignent quelque peu celles de Juakaly (2008), qui a trouvé que la couche de litière à Masako, va de 5,6 cm à 18,5 cm selon les sites : en forêt primaire, une couche moyenne de 18,5 cm avait été observée, en forêt secondaire vieille, une hauteur de 6,8 cm était mesurée alors que ces valeurs étaient de 12,1 cm et 5,6 cm en jachère vieille ou jeune, respectivement. Ceci laisse voir que la hauteur de la litière dépend de la densité, du type de la végétation et de l'humidité du sol. Les épaisseurs de litière mesurées sur les sols de Masako dont les valeurs sont reprises dans le tableau 5.2, prouvent à suffisance que la matière organique s'accumule sur les sols ralentissant de ce fait leur décomposition.

En outre, une bonne litière n'incorpore pas une grande proportion de matériaux autres que ceux provenant du règne végétal. C'est ainsi que la litière des jardins de case était plus constituée des ordures ménagères. La faible épaisseur de la litière observée dans les jardins de case peut se justifier par la faible densité des arbres qui les caractérise. C'est aussi ce que démontre Lejoly (1988) qui dit que les forêts ombrophiles équatoriales sempervirentes se caractérisent par une décomposition lente de la litière par

suite de l'atténuation de la température au sol. Par conséquent, il ne se produit pas d'humus brut, mais la présence d'une couverture de feuilles et débris végétaux en décomposition est quasi constante durant toute l'année.

Nous pensons que la hauteur de la litière semble être un élément qui explique en partie la moindre sévérité de l'infection en forêt comparativement aux deux autres systèmes de cultures testés. Cependant, ce paramètre n'est pas le seul à avoir un effet sur la maladie puisque malgré une hauteur significativement différente de la litière en jachère et en jardin de case, la sévérité de la cercosporiose a été comparable dans ces deux systèmes.

Dans les conditions de champs, le niveau de fertilité du sol peut être à la base d'une diminution remarquable de l'incidence de la maladie sur les plantes. Nos résultats indiquent en effet que les quantités de nutriments du sol sont plus élevées dans la forêt que dans la jachère et le jardin de case.

Mobambo *et al.* (2010) ont montré que les quantités des nutriments du sol dans les parcelles paillées (balles de riz) étaient plus élevées que dans les parcelles non paillées avec plantes de couverture (*Vigna unguiculata*) et que les paillis de résidus de culture constituent la meilleure source de nutriment et jouent ainsi un rôle d'engrais. Pour ces auteurs, le carbone organique (3,79%), l'azote total (0,28%), le calcium (7,52 méq/100 g de sol) et le potassium (0,98 méq/100 g de sol) dans le sol avec pour résidus de culture des balles de riz étaient supérieures par rapport au sol sous plantes de couverture qui ont présenté des quantités des nutriments respectives de 2,15% , 0,22% , 4,07 méq/100 g de sol et 0,46 méq/100 g de sol. Ces valeurs sont supérieures à celles que nous avons observées à Masako mais

elles témoignent de l'importance de la couverture végétale sur la fertilité du sol.

Par ailleurs, nos données montrent la quantité d'ascospores est liée à l'infection dans le champ (Figure 5.9). En effet, une quantité nettement plus importante d'ascospores a été observée en jachère et jardin de case comparativement à ce qui a été mesurée en forêt. Deux éléments peuvent sans doute expliquer ce phénomène. D'une part, nos résultats montrent que le temps de développement de la maladie est nettement plus long en forêt que dans les deux autres systèmes de culture. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'infection primaire est retardée ou que le temps de latence est plus long. Les deux facteurs peuvent jouer : la diversité végétale qui caractérise la forêt peut constituer une sorte de barrière physique limitant la dispersion des spores et la plus grande fertilité du sol peut aider le bananier à mieux résister à l'infection à cause de l'abondance des éléments nutritifs rendant ainsi la plante plus vigoureuse.

D'autre part, il est possible que le taux de production d'ascospores soit lié à l'infection au sein de la parcelle. Dans le cas de la septoriose du blé, des études épidémiologiques ont en effet montré une relation entre la quantité d'inoculum aérien (ascospores) et l'infection au champ (Duvivier *et al.*, 2013). Nos résultats semblent montrer que cette relation entre l'inoculum aérien lié au cycle sexuel de *M. fijiensis* et l'intensité de l'infection au champ existe également dans le cas de la cercosporiose du bananier.

Dans tous les systèmes de culture, nos expérimentations ont également révélé que la libération de spores a été la plus forte durant les heures proches du lever du jour et les premières heures du matin. Elle a ensuite diminué, en étant très faible ou nulle à partir du moment où le feuillage a séché, durant la période diurne. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Meredith *et al.* (1973), Long (1979) et Jiménez (1994) à l'Est de

Samoa et au Costa Rica, mais différent de ceux reportés par Gauhl (2000) qui a trouvé des spores seulement entre 5 et 8 heures, les jours sans pluies, dans la région de Turrialba, au Costa Rica. Ceci peut s'expliquer par le fait que la présence d'une pellicule d'eau sur les feuilles est indispensable pour que les ascospores puissent être libérées depuis les périthèces. Cette pellicule est effectivement présente au lever du jour dans la région de Kisangani suite à l'accumulation de rosée.

Par ailleurs, étant donné que dans une plante et même dans une feuille, il existe tous les degrés de maturité possibles de périthèces, la présence de l'humectation permet que les périthèces qui arrivent à maturité par la suite libèrent les ascospores. Les différences significatives observées dans les quantités d'ascospores mesurées entre la saison sub sèche et celle de pluies peuvent s'expliquer par le fait que les conditions d'humidité favorisent non seulement l'infection mais également la libération d'ascospores.

Vu l'impact important du système de culture sur la cercosporiose noire du bananier, et notamment le fait que la cercosporiose est moindre en forêt, et bien qu'il est essentiel de conserver cet écosystème afin de réduire la déforestation, il peut être suggéré de combiner la culture du bananier à l'agroforesterie afin de concevoir une agriculture à long terme. Ce système pourrait permettre aux paysans d'utiliser un même champ pendant plusieurs années avec comme conséquences la limitation de l'intensité de la maladie et la conservation de la biodiversité. Les paillis de résidus de cultures (sciure de bois et balles de riz) (Mobambo *et al.*, 2010) et autres pratiques de gestion telles que l'introduction dans l'assolement d'une sole fourragère ou la plantation d'arbres fixateurs d'azote en croissance rapide pour assurer le maintien durable de l'activité agricole (Dembele, 1996) pourraient être utilisés en jachère et en jardin de case pour augmenter la fertilité du sol.

Par ailleurs, la résistance variétale de Yangambi Km5 nous paraît être une voie intéressante en termes de production intégrée de la culture du bananier dans la région de Kisangani. Kablan (2012) a montré que l'enrichissement du sol en silicium par l'apport du silicate de calcium pourrait permettre une réduction de l'infection des feuilles par *M. fijiensis* et un retard du développement de la maladie associés à l'accumulation de Si dans les feuilles. Ceci révèle donc l'intérêt tout particulier que peut représenter le Si dans la gestion intégrée des systèmes de production du bananier dans la région de Kisangani.

Sur le plan évolutif, la présence quasi constante de la forme sexuée au cours des saisons montre que le potentiel évolutif des populations de *M. fijiensis* est important puisque des recombinaisons peuvent avoir lieu constamment. Une étude dans ce sens et particulièrement une étude de la virulence sur le cultivar Yangambi Km5 pourrait être très utile pour évaluer, à partir de notre collection de souches, le potentiel des populations en présence dans la région de Kisangani à surpasser la tolérance de ce cultivar. Ce type d'étude peut aussi permettre d'évaluer la pertinence de promouvoir un cultivar tolérant en particulier plutôt qu'un ensemble de cultivars pour limiter les dégâts dus à *M. fijiensis*.

Le potentiel évolutif important de *M. fijiensis* pousse également à recommander d'être très vigilant pour éviter l'introduction, dans la région de Kisangani, de souches de *M. fijiensis* en provenance d'autres régions par l'importation de bananiers ou autres activités liées à l'homme. Nos travaux (chapitre 4) ont en effet montré que les populations actuelles de *M. fijiensis* dans la région de Kisangani sont sensibles aux triazoles et au carbendazime. Il semble donc qu'elles sont indemnes des gènes de résistance à ces

substances. Bien que la lutte chimique ne soit pas d'actualité dans cette région, elle pourrait à l'avenir être intégrée dans un système de protection intégrée. Dans cette perspective, des stratégies devront être mises en œuvre pour limiter le développement de résistance aux fongicides, un phénomène bien plus facile à maîtriser au départ de populations sensibles.

Discussion générale

Discussion générale

La maladie des raies noires (MRN) du bananier est l'affection parasitaire la plus dévastatrice des bananiers dans le monde (Meredith et Lawrence 1970; Jones, 2000 ; Lassoudière 2007). Cette maladie, causée par *Mycosphaerella fijiensis*, affecte gravement le système foliaire du bananier dans des conditions favorables à son développement (Ploetz, 2001). Bien que la présence de cette maladie soit signalée en RDC en général (Mourichon, 1987 ; Sebasigari et Stover, 1988) et en Province orientale en particulier (Mobambo *et al.*, 1993 ; Onautshu, 2007), plusieurs questions se posaient à l'entame de cette recherche sur les caractéristiques des populations en présence, leur niveau de sensibilité vis-à-vis des fongicides et les caractéristiques épidémiologiques de la maladie, dans la région de Kisangani en particulier. La question de l'impact des systèmes de culture et des cultivars sur le développement de la cercosporiose noire du bananier cette région était aussi soulevée. La situation particulière de la région de Kisangani, près de l'équateur et de la région de Yangambi, la diversité des cultivars des bananiers et bananiers plantains qui y sont cultivés, la richesse de sa biodiversité et la variété des systèmes de culture qu'on y trouve offrait un cadre d'étude intéressant. En outre, la menace causée par la cercosporiose noire sur la culture du bananier dans cette région où la lutte chimique n'est pas accessible invite à étudier les stratégies alternatives pour limiter la pression de cette maladie. L'objectif de notre recherche était donc de caractériser les populations de *M. fijiensis* et d'étudier l'épidémiologie de la cercosporiose noire sur les bananiers et bananiers plantains les plus communs de la région de Kisangani dans le but de développer des stratégies de protection intégrée des bananiers et bananiers plantains.

Les résultats de nos investigations et leurs implications sur la gestion de la cercosporiose noire à Kisangani sont discutés dans les lignes qui suivent, en cinq points particuliers.

1. Appartenance des souches isolées dans la région de Kisangani à *Mycosphaerella fijiensis*

Les caractéristiques phénotypiques des 296 souches isolées et notamment, leur aspect et les colorations des mycélium en croissance sur milieu PDA, ont été quelque peu variables mais la coloration noire sur la face inférieure des cultures en croissance était typique de *M. fijiensis*. En outre, les caractéristiques morphologiques des conidies et la lenteur de la croissance mycélienne observées pour un échantillon représentatif de souches correspondaient aux descriptifs de l'espèce.

La tendance de la vitesse moyenne de croissance a été presque similaire pour toutes les souches : une allure linéaire de la croissance des souches a été observée au cours des deux mois d'incubation en boîtes de Pétri, mais le niveau de croissance restait en-dessous de 25 mm après 70 jours à 25°C. Ces résultats sont comparables à la vitesse croissance de 10 mm pour 38 jours d'incubation sur PDA à une température comprise entre 24-28°C rapportée par Cooke *et al.* (2009) pour *M. fijiensis*. Les dimensions des conidies variaient en moyenne de 46,7-61,8 x 2,4-2,8 µm et le nombre des cloisons variait entre 4 et 8 pour toutes les souches. Ces valeurs sont bien dans l'intervalle reconnu pour l'espèce *M. fijiensis* (30-132 x 2,5-5µm et 1-10 septa). Ces observations corroborent les descriptions faites pour *M. fijiensis* (Ploetz *et al.* 2003; Cooke *et al.*, 2009), mais elles correspondent également aux dimensions reconnues pour *M. musicola* (10-109 µm x 2-6 µm et 0-8 septa) (Wardlaw, 1972 ; Carlier *et al.*, 2000 ; Crous et Mourichon, 2002).

En se basant sur cette caractéristique et sur base de l'aspect noir et non jaune des cultures, l'identification de *M. fijiensis* était suspectée.

Discussion générale

Nous avons confirmé notre diagnostic par une approche moléculaire. Une partie de l'ADN ribosomal incluant en particulier les régions ITS, est une partie du génome qui s'est révélée très utile pour étudier la phylogénie des espèces. Ces régions sont en effet souvent spécifiques et la connaissance de leur séquence permet, très largement dans le règne des champignons notamment, de réaliser une identification au rang de l'espèce (White *et al.*, 1990). La caractérisation moléculaire par l'amplification et le séquençage des régions ITS de l'ADN ribosomal de 58 souches isolées de la région de Kisangani a confirmé l'identification des souches comme appartenant à l'espèce *M. fijiensis* et non à *M. musicola* (Vázquez *et al.*, 2012).

C'est selon une approche moléculaire également, par amplification des gènes Mat1-1 et Mat1-2 et séquençage de l'amplicon obtenu pour quelques souches que nous avons aussi révélé l'existence des deux types de croisement, Mat1-1 et Mat1-2, dans les souches de la région de Kisangani et la similarité avec les deux idiomorphes connus de *M. fijiensis*. Vu le caractère hétérothallique de *M. fijiensis*, ce résultat témoignait de l'occurrence probable de croisements et recombinaisons via le cycle sexuel entre les souches de la population de Kisangani. L'isolement des souches par libération des ascospores présageait bien évidemment de l'occurrence de ce cycle sexuel mais il est intéressant de souligner que sur base du screening opéré sur 52 souches, 34 souches se sont révélées de type Mat1-1 et 18 de type Mat1-2. La présence de deux idiomorphes à fréquences égales est révélatrice de recombinaisons sexuelles dans une population donnée (Linde *et al.*, 2003). Cet équilibre a été confirmé dans des populations de *M. fijiensis* mexicaines (Conde-Ferraz *et al.*, 2010) et brésiliennes (Queiroz *et al.*, 2013).

Notre étude révèle qu'il n'y aurait pas cet équilibre dans la population de *M. fijiensis* de la région de Kisangani, mais une proportion plus grande de Mat1-1 que Mat1-2. Ce déséquilibre pourrait s'expliquer soit par le fait que les souches Mat1-1 sont arrivées avant les Mat1-2 dans la région de Kisangani et l'équilibre n'est pas encore atteint. Une autre hypothèse pourrait être liée à la supériorité du fitness du premier groupe par rapport au second. Ceci suggère que les mécanismes liés à la compatibilité sexuelle et le développement des gènes Mat sont liés à la virulence du pathogène (Hsueh et Heitman, 2008; Lee *et al.*, 2010). Par ailleurs, les populations qui maintiennent la reproduction sexuée sont capables de générer des combinaisons génétiques capables d'évoluer constamment et de générer des génotypes utiles au pathogène, comme par exemple le fait de pouvoir surpasser la résistance de la plante hôte (Lee *et al.*, 2010). Chez *M. graminicola*, l'agent de la septoriose du blé, des différences significatives de pathogénicité entre souches Mat1-1 et Mat1-2 ont été rapportées (Zhan *et al.*, 2007).

2. Faible diversité de séquences des régions ITS de l'ADN ribosomal au sein de la population de Kisangani

Sur base du séquençage de la région ITS, notre étude n'a quasi pas pu mettre en évidence de polymorphisme au sein de cette région : seules quelques rares variations dans les séquences ITS1 et ITS2 des souches ont été observées. Sur base des séquences déposées dans la base de données NCBI, cette région apparaît très conservée chez *M. fijiensis*. Elle permet cependant de distinguer cette espèce de *M. eumusae* et *M. musicola*.

La similarité des séquences de cette région varie selon les espèces voire même les genres. Chez *Polymyxa graminis* par exemple, une grande

diversité de ‘ribotypes’ a été rapportée et est à la base de la distinction d’au moins 5 *formae speciales* chez cette espèce (Legrève *et al.*, 2002). Dans d’autres cas, chez *Fusarium* par exemple, cette région n’est parfois même pas discriminante pour faire la distinction entre les espèces du genre (Bao *et al.*, 2002).

Afin de mieux connaître la diversité présente au sein de la population de *M. fijiensis* de Kisangani, il serait donc utile de cibler une autre zone pour le diagnostic de la diversité des souches au sein de l’espèce en réalisant par exemple une étude comparable à celles de Carlier *et al.*, (2003), Rivas *et al.*, (2004) ou Hayden *et al.*, (2003) par marqueurs RFLP ou PCR-RFLP.

La compréhension des forces influençant la diversité génétique et mesurant l’échelle spatiale de leur influence est en effet une tâche centrale dans la biologie évolutionnaire (Dione *et al.*, 2008). Parmi ces forces, la dispersion joue un intérêt particulier par le fait que d’une part, elle est directement liée aux processus de colonisation des espèces, spécialement des agents pathogènes, dans de nouveaux environnements et l’élucidation du mouvement des individus est cruciale pour comprendre l’origine et estimer la propagation d’une maladie (Rieux, 2011). D’autre part, les processus de dispersion déterminent le degré d’échange des gènes entre les populations implantées, qui conditionnent leur potentiel évolutif (Stalkin, 1987 ; Lenormand, 2002).

3. Pouvoir pathogène et différence de virulence des souches de la région de Kisangani

L’évaluation de la pathogénicité des souches a montré que toutes les souches ont un pouvoir pathogène vis-à-vis du cultivar Cavendish « Grande Naine ».

Discussion générale

Notre étude a aussi permis de ressortir une certaine différence de virulence entre les souches testées. La souche RDC215 a manifesté un impact plus élevé que les autres, elle peut donc être considérée comme la plus virulente.

Le suivi de la dynamique d'expression visuelle des symptômes a permis de comparer l'évolution de l'intensité de l'infection selon les souches. Les différences significatives observées, en conditions standardisées, dans les niveaux d'infection selon les souches, révèlent sans doute des différences intrinsèques de pathogénicité qui pourraient être liées à la nature ou aux cultivars d'origine des souches.

Il convient de signaler qu'après avoir inoculé quatre souches de *M. fijiensis* sur les cultivars Fougamu (partiellement résistant) et Grande Naine (sensible), Busogoro *et al.* (2004) ont révélé respectivement une résistance partielle et des réactions sensibles quelle que soit la souche fongique considérée. Un test de pathogénicité de la sorte réalisé sur un spectre de cultivars de bananiers et bananiers plantains pourraient affiner les caractéristiques de pathogénicité des souches et permettraient peut être de dévoiler des informations intéressantes dans l'interaction *M. fijiensis*-cultivar.

Notre étude a confirmé la sensibilité du cultivar 'Grande Naine'. au cours de notre période d'expérimentation. Les recherches ultérieures pourront être orientées dans ce sens pour avoir une vue d'ensemble du pouvoir pathogène vis-à-vis des différents cultivars de la région.

4. Contribuer à une meilleure connaissance du flux de gènes entre populations

Les résultats de la caractérisation moléculaire et morphologique des souches ne nous ont pas permis de mettre en évidence une diversité au sein de la population de *M. fijiensis* dans la région de Kisangani. L'observation d'un grand nombre d'ascospores dans les différents sites visités (Kabondo, Kisangani, Lubunga, Makiso, Mangobo, Tshopo, Masako et Ile Mbiye) et la détection des souches des deux types de croisement démontrent néanmoins l'existence de recombinaisons au sein de la population. Ces recombinaisons peuvent porter sur l'ensemble des gènes et donc l'ensemble des caractères des souches.

Afin de mettre en évidence des éventuels flux de gènes entre les populations de Kisangani et d'autres populations, processus qui permet l'introduction de nouvelles variations génétiques par la dispersion des propagules infectieuses d'une aire épidémiologique à une autre, nous avons choisi de comparer les populations sur base d'autres marqueurs qui sont associés à des pressions de sélection particulières et qui peuvent donc aider à retracer l'origine du caractère. La caractérisation de la sensibilité des souches aux fongicides a été réalisée dans cette perspective.

Les niveaux de résistance des souches issues des populations de la RDC, indemnes de traitements fongicides, ont donc été analysés et comparés aux niveaux de résistance de souches issues de populations plus lointaines en Afrique et particulièrement celles du Cameroun. Celles-ci ont été choisies parce qu'elles ont été isolées dans un périmètre géographique relativement proche de RDC et à partir de plantations de paysans ou de plantations

Discussion générale

industrielles dans lesquelles la pression en fongicides est soit nulle, soit énorme, respectivement.

Nos essais ont révélé que les souches de la RDC sont toutes sensibles aux triazoles testées et au carbendazime, mais certaines souches semblent présenter une certaine résistance à l'azoxystrobine. Cette situation est différente des souches du Cameroun analysées pour lesquelles une dérive de la sensibilité d'une proportion importante des souches a été observée. En effet, la résistance à l'azoxystrobine en RDC pourrait être due soit à la résistance naturelle des souches de la région à ce fongicide, soit au flux de gènes entre les populations des plantations industrielles du Cameroun. Vu l'absence de souches résistantes aux triazoles et au carbendazime en RDC, le flux de gènes semble limité entre les deux populations (RDC et Cameroun). Une autre explication serait que les souches résistantes en provenance du Cameroun n'ont pas trouvé un bon fitness dans la région et n'ont pas persisté dans les conditions de Kisangani.

En ce qui concerne le Cameroun, les souches de plantations paysannes présentent en moyenne des valeurs des EC_{50} plus petites que les souches isolées des plantations industrielles, témoignant de leur plus grande sensibilité, mais certaines d'entre elles sont caractérisées par des EC_{50} élevées. Ce phénomène pourrait s'expliquer par les flux de gènes entre ces deux populations, les ascospores de *M. fijiensis* pouvant se disperser sur plusieurs kilomètres (Burt et al., 1997). Par ailleurs, les souches en provenance de plantations industrielles présentent en majorité des valeurs d' EC_{50} plus grandes et sont donc, pour la plupart, résistantes (ou présentent une dérive prononcée de la sensibilité). Cependant, la présence de souches assez sensibles dans les populations des plantations industrielles témoignent du fait que les populations n'y sont pas homogènes probablement en soit en

Discussion générale

raison de flux de gènes entre les populations, soit en raison du fitness des souches.

L'ensemble de nos résultats sur les niveaux de sensibilité des souches aux fongicides suggère que jusqu'ici, il n'y a pas ou très peu de flux de gènes conséquents entre les populations des plantations industrielles du Cameroun et les populations de Kisangani. Celles-ci seraient donc quelques peu isolées géographiquement alors que la distance entre ces populations a été évaluée à environ 1500 km. Sur base des tests de sensibilité fongicides, notre étude confirme les observations de Rieux *et al.* (2011) qui ont décrit, à l'aide de marqueurs génétiques neutres, la structuration spatiale des populations de *M. fijiensis* du Cameroun et qui ont observé l'existence de grandes populations de *M. fijiensis* s'écartant de l'équilibre mutation-dérive. Ces auteurs ont par ailleurs montré que le niveau de différenciation génétique des populations de *M. fijiensis* est plus élevé à l'échelle mondiale et moindre à l'échelle locale.

La distribution des valeurs d'EC₅₀ obtenues pour l'ensemble des souches a été différente pour les trois triazoles testées ainsi que pour la strobilurine et le benzimidazole. Ces résultats traduisent des modes d'action distincts entre les familles de fongicides différentes mais aussi au sein des triazoles. La strobilurine agit sur la respiration cellulaire, le benzimidazole inhibe la division cellulaire et les triazoles sont des inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol en inhibant la déméthylation (DMI).

En ce qui concerne les triazoles, on observe une sensibilité croisée entre le propiconazole et le tébuconazole, alors que tel n'est pas le cas entre le propiconazole et l'époxiconazole d'une part, et d'autre part entre le tébuconazole et l'époxiconazole. Ce résultat suggère que le propiconazole et le tébuconazole pourraient être appliqués en alternance avec l'époxiconazole

pour lutter contre la maladie des raies noires, ceci afin de varier la pression de sélection sur les souches. Leroux *et al.* (2007) ont en effet montré que chez *M. graminicola*, la résistance aux fongicides appartenant à la classe des inhibiteurs de la stérol 14 α -déméthylase (DMI) était associée à différentes mutations sur le gène CYP51 codant pour la 14 α -déméthylase. Ce type de mutations sur le gène CYP51 conférant les variations de sensibilité aux inhibiteurs de déméthylation (DMI) a également été signalé par Zhonghua et Michailides (2005) et Cools *et al.* (2006) pour *M. graminicola* et par Cañas-Gutiérrez *et al.* (2009) pour *M. fijiensis*.

Compte tenu de ces résultats et puisque les souches de Kisangani sont sensibles et qu'apparemment le flux de gènes à partir des populations résistantes ne semble pas être une force évolutive importante pour les populations de Kisangani, il est suggéré, dans le cas où la lutte chimique contre la cercosporiose noire en RDC est éventuellement accessible, d'utiliser des produits en adoptant directement des stratégies anti-résistances. Celles-ci consistent à utiliser les fongicides à modes d'action différents, à varier et à alterner les substances actives utilisées et enfin à ne pas utiliser plus d'une fois une substance active par saison.

5. Impact des systèmes de culture sur le développement de la cercosporiose noire

Notre étude a révélé que la cercosporiose noire du bananier est bien présente dans la région de Kisangani. Cette maladie étant à la base de pertes importantes, il nous a paru intéressant d'étudier les caractéristiques épidémiques de la maladie dans la région de Kisangani en particulier selon le cultivar et les systèmes agro-écologiques. Une étude préliminaire a d'abord été effectuée pour comparer l'incidence de la maladie sur 15 cultivars des

Discussion générale

bananiers et bananiers plantains en forêt, en jachère et en jardin de case. Cette étude nous a permis de d'isoler les souches sur ces cultivars et de constituer une collection de 296 souches. Une étude approfondie a ensuite été réalisée pour comparer la dynamique d'évolution de la cercosporiose noire sur quatre cultivars en saison subsèche et en saison de pluies dans trois systèmes de culture. Le temps de développement, l'incidence et la sévérité de la maladie ont été évalués et l'inoculum aérien de *M. fijiensis* a été quantifié.

L'essai préliminaire a révélé que l'évaluation de la distribution de *M. fijiensis* est variable suivant les deux saisons avec une incidence légèrement moindre en saison subsèche, mais plus forte en saison humide. Les deux formes (anamorphes et téléomorphes) ont été également observées avec des différences selon les sites et les systèmes de culture. Ces observations démontrent que ces deux formes jouent un rôle dans l'amplification de l'infection en bananeraies et que les ascospores, qui sont disséminées par le vent, peuvent disséminer la maladie à plus grande échelle, quelle que soit la saison.

L'étude approfondie a montré que le développement de la cercosporiose noire était plus lent en forêt qu'en jachère et en jardin de case. Par ailleurs, l'incidence et la sévérité étaient plus grandes sur plantains que sur les bananes. Parmi les cultivars testés, Yangambi Km5 a été nettement moins sensible. Notre étude confirme donc cette caractéristique, en plus de sa résistance aux nématodes et éventuellement au charançon noir du bananier (Daniells et Bryde, 1995 ; Mobambo, 2002).

La fertilité du sol est sans doute un des facteurs critiques responsable de la différence observée entre les systèmes de culture. Cette étude a montré que

Discussion générale

la pression de la maladie est significativement moindre en forêt comparativement à la culture en jachère et jardin de case. Les analyses du sol ont révélé que la hauteur de la litière est beaucoup plus petite dans le jardin de case (2 cm) que dans la jachère (5 cm) et dans la forêt secondaire (7 cm) et que les quantités d'éléments nutritifs d'origine végétale dans les sols des jardins de case et de la jachère sont relativement plus faibles. L'implication des caractéristiques minérales et biologiques du sol sur l'incidence et la sévérité de la cercosporiose noire a d'ailleurs déjà été avancée dans une étude qui mettait en relation ces caractéristiques et le niveau de la fertilité à partir de la décomposition de la litière (Yenga, 2009). L'isolement des plantations en forêt comparativement aux plantations dans des espaces plus aérés que constituent la jachère et les jardins de cases est un autre facteur explicatif de cette moindre intensité d'attaques observées en saison subsèche et en saison des pluies en forêt secondaire. La distance entre bananeraies dans ce système de culture et la richesse et diversité du couvert végétal pourraient en effet constituer deux barrières limitant l'infection en forêt secondaire. Ce système de culture n'est pas le plus courant dans la région de Kisangani mais il présente l'avantage d'être plus tolérant à la cercosporiose noire. En général, le système de culture le plus courant dans la région de Kisangani est le bananier en monoculture derrière les cases et les bananiers en association avec d'autres cultures dans les champs en forêt primaire et secondaire.

Les cultivars des bananiers et bananiers plantains n'ont pas manifesté le même comportement face à *M. fijiensis*. Le cultivar de bananier plantain Libanga Likale a été plus sensible tandis que le cultivar de bananier Yangambi Km5 a été plus résistant. Les études sur la sensibilité variétale conduites en champs par Fouré *et al.*, (1990), avaient permis de regrouper en trois catégories les variétés sauvages ou cultivées selon leur comportement face à *M. fijiensis* : (1) très résistantes (réaction incompatible) ; (2)

Discussion générale

partiellement résistantes et (3) sensibles ou susceptibles (réaction compatible). Cette étude a montré l'existence dans la région de Kisangani des cultivars sensibles et résistants à la cercosporiose noire du bananier. Il serait intéressant de développer la culture de variétés plus tolérantes en multipliant par exemple le cultivar Yangambi km5, mais il importe aussi de varier les sources de résistances et de favoriser la recherche en ce sens. Par ailleurs, la présence à Kisangani d'un laboratoire de culture *in vitro* des bananiers peut contribuer à limiter la progression de cette maladie par la multiplication des cultivars tolérants, mais aussi du matériel sain.

Sur le plan épidémiologique, nous avons pu mettre en évidence que la phase téléomorphe du champignon peut jouer un rôle dans l'épidémiologie de la maladie quelle que soit la saison. La recombinaison génétique et la dispersion à longue distance peuvent donc se faire toute l'année. Notre étude sur le captage de l'inoculum aérien a révélé que la libération des ascospores est plus forte durant les heures proches du lever du jour et diminue ensuite, à partir du moment où le feuillage a séché, durant la période diurne. Ce phénomène peut être conditionné par les exigences de *M. fijiensis* qui nécessitent des conditions d'humidité non seulement pour la libération des ascospores mais aussi pour l'infection des tissus végétaux (Burt *et al.*, 1999). Nos essais ont aussi montré que les quantités d'ascospores dans l'air a été plus faible en saison subsèche et élevée en saison pluvieuse. Cette observation a été mise en relation avec l'intensité de la maladie pendant les deux saisons. Il semble clairement que le nombre d'ascospores dans l'air est corrélé avec la pression en maladie observée au champ. Cette relation a déjà été mise en évidence pour d'autres pathogènes comme *M. graminicola* (Duvivier *et al.*, submitted ; Duvivier *et al.*, 2011), dont le cycle sexuel joue aussi un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie en saison en plus du rôle important joué dans l'infection primaire de la maladie.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Au terme de ce travail, nous pouvons conclure en ces différents points :

(1) La maladie des raies noires est bel et bien présente dans la région de Kisangani. Les caractéristiques morphologiques et les séquences des régions ITS de l'ADN ribosomal sont typiques de l'espèce *M. fijiensis*. Les souches présentent un faible nombre de variations génétiques au niveau de la région ITS, mais l'existence des deux types de croisement Mat1-1 et Ma1-2, avec une faible majorité de Mat1-1 a été remarquée.

(2) L'évaluation de la pathogénicité des souches en conditions contrôlées a révélé qu'elles sont pathogènes sur le cultivar Cavendish « Grande Naine » et présente des degrés de pathogénicité différents.

(3) Les niveaux de sensibilité des souches de la RDC et du Cameroun aux triazoles, aux benzimidazoles et aux strobilurines ne sont pas les mêmes pour ces deux pays. Les souches de la RDC étant sensibles par rapport à celles du Cameroun, mais on retrouverait déjà en RDC des souches résistantes à l'azoxystrobine. Il n'existe donc pas ou très peu de flux de gènes entre ces populations et cela suggère, d'une part, qu'il y a une relation entre le niveau de sensibilité des souches et les traitements appliqués et d'autre part, que les barrières géographiques pourraient limiter la dispersion des ascospores. La population à Kisangani serait relativement isolées de populations résistantes aux fongicides, mais l'observation des souches résistantes à l'azoxystrobine pourrait être le fait de la résistance naturelle ou de la dissémination du champignon par les ascospores via le vent.

(4) La pression de la maladie est liée aux cultivars et aux systèmes de culture. Le type de cultivar a également influencé l'incidence et la sévérité de la cercosporiose noire. De manière générale, Libanga Likale et Litete, les deux plantains ont montré une incidence supérieure à celle des bananes pour tous les trois systèmes de culture ; Yangambi Km5 a attesté sa résistance dans tous les écosystèmes. Le bananier semble être plus résistant selon le système de culture en relation avec la fertilité du sol.

Conclusion et perspectives

A la lumière des résultats de cette étude, nous pouvons formuler les recommandations suivantes afin de limiter les pertes liées à la MRN dans la région de Kisangani :

- Promouvoir la culture du bananier et bananier plantain en forêt en association avec l'agroforesterie ;
- Communiquer aux producteurs les stratégies de lutte intégrée afin de limiter les dégâts liés à l'attaque par la MRN comme la culture de cultivars tolérants (cultivar Yangambi Km5), l'intensification de la fertilisation du sol et l'utilisation du matériel sain
- Evaluer la possibilité d'intégrer une lutte chimique à certains moments du cycle épidémiologiques avec les triazoles (surtout tébuconazole) et les benzimidazoles (carbendazime) en associant des fongicides systémiques avec des contacts pour limiter résistance.

Tenant compte de l'agressivité de *M. fijiensis* une attention particulière doit être accordée à la MRN dans la région de Kisangani. Ainsi, les questions ci-dessous pourront faire l'objet des recherches en perspectives. Il s'agit notamment des celles liées à :

- La recherche d'autres cultivars tolérants dans la diversité génétique des bananiers de la région de Kisangani ;
- La promotion de cette culture dans d'autres systèmes par la plantation d'arbres fixateurs d'azote en croissance rapide pour assurer le maintien durable de l'activité agricole ;
- La recherche sur la compréhension des processus biologiques associés à la meilleure tolérance des bananiers à la cercosporiose noire en forêt en caractérisant l'effet des constituants organiques, de la faune et de la flore du sol;

Conclusion et perspectives

- La recherche sur des populations de micro-organismes indigènes antagonistes de *M. fijiensis*
- Le renforcement des activités de recherche sur la MRN par la formation et la collaboration de plusieurs spécialistes en vue de mieux informer les planteurs sur les mesures à prendre afin de limiter l'impact de la maladie.
- L'évaluation de l'incidence et des dégâts causés par la cercosporiose noire du bananier sur le rendement en fonction des systèmes de cultures. Les recherches sur l'évaluation du potentiel de la production intégrée sont en cours et les résultats seront disponibles après l'élaboration de cette thèse.

Références

Références

- Abadie, C., Zapater, M.F., Pignolet, L., Carlier, J., Mourichon, X. 2008. Artificial inoculation on plants and banana leaf pieces with *Mycosphaerella* spp., responsible for Sigatoka leaf spot disease. *Fruits* 63, 319-323.
- Adheka, G.J., 2010. Diversité morphologique de bananiers et bananiers plantains utilisés dans le bassin du Congo et leur culture en région forestière du district de la Tshopo dans la Province Orientale en RDC, D.E.A. inédit, Faculté des Sciences, UNIKIS, 984p.
- Agrios, G. N., 2005. Plant pathology. 5^e Edition. Elsevier Academic Press. 922 p. p 66-67, 127, 300,764-769.
- Amil A.F., Heaney S.P., Stanger C. and Shaw M.W., 2007. Dynamics of QoI sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica during 2000 to 2003. *The American Phytopathological Society* 97(11): 1451-1457 and Plantain, Montpellier, France.
- Anonyme, 2002. Memento de l'Agronome, CIRAD-GRET, Ministère des affaires Etrangères, imprimé en France-Jouve 11, bd de Sébastopol, 75001 Paris. 960-974.
- Arias P., Dankers C., Liu, P., Pilkauskas, P., 2003. L'économie mondiale de la banane 1985-2002. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). 102p.
- Arzanlou, M., Groenewald, J.Z., Fullerton, R.A., Abeln, E.C.A., Carlier, J., Zapater, M.F., Buddenhagen, I.W., Viljoen, A. and Crous, P.W., 2008. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphes on banana. *Persoonia*, 20, 19-37pp.
- Arzanlou, M., Abeln, E., Kema, G., Waalwijk, C., Carlier, J., De Vries, I., Guzmán, M and Crous, P., 2007. Molecular diagnostics for the Sigatokadisease complex of banana. *Phytopathology*, 97: 1112-1118.

Références

- Bakry, F., Carrel, F., Caruana, M.L., Côte, F.X., Genny, C. and Tézenas du Montcell, H., 1997. Les bananiers. *In* L'amélioration des plantes tropicales. Eds A. Charrier, M. Jacquot, S. Hamon et D. Nicolas. CIRAD/ORSTOM édition. Série repère : 109-139.
- Balint-Kurti, P.J., May, G.D., Churchill, A.C.L., 2001. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiology Letters*. 195, 9-15.
- Bao, J.R., Fravel, D.R., O'Neill, N.R., Lazarovits, G. and Berkum, P.V., 2002. Genetic analysis of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* from tomato plants. *Canadian Journal of Botany*, Volume 80, Number 3, pp. 271-279(9).
- Bennett R.S. et Arneson P.A. 2003. Black Sigatoka. *The Plant Health Instructor*.
- Bernhard-Reversat, E., 1982. Biogéochimie du cycle de l'azote dans une savane semi-aride, *Oikos*, n° 38 : Pp. 321-332.
- Bizimana, S., Ndayihanzamaso, P., Nibasumba, A. et Niko, N., 2012. Conduite culturale et Protection du Bananier au Burundi. Institut des Sciences Agronomiques du Burundi (ISABU), 67p.
- Bodian A., Koita B., Donfack P. et Yossi H., 1998. « Typologie des jachères et diversité végétale », *in* C.C.E. (éd., 1998) : pp. 37-46.
- Boysen, M., Borja, M., Del Moral, C., Salazar, O., Rubio, V. 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. *Curr. Genet.* 29, 174-181.
- Bridge, J., Fogaine, R. et Speijer, P., 1997.: Les nématodes parasites des bananiers. *In* Parasites et ravageurs de Musa. Fiche technique No 2, INIBAP, 4p.

Références

- Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, R., Knowlton, S., Mauvais, C.J. and Broglie, R., 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, 254:1194–1197.
- Brown, S. and Lugo A.E, 1990. Tropical secondary forests. *Journal of Tropical Ecology*, Cambridge university press 6, 1: 1-32.
- Brun, J., 1963. La cercosporiose du bananier en Guinée. Etude de la phase ascosporee de *Mycosphaerella musicola* Leach. Thèse de doctorat ès science. Orsay, Paris, France.
- Burt P.J.A., Rutter J. et Gonzales H. 1997. Short-distance windborne dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain. *Plant Pathology* **46**: 451-458.
- P. J. A. Burt, P.J.A., Rosenberg, L. J., Rutter, J., Ramirez, F. and Gonzales, H., 1999. Forecasting the airborne spread of *Mycosphaerella fijiensis*, a cause of black Sigatoka disease on banana: estimations of numbers of perithecia and ascospores. Volume 135, Issue 1, pages 369–377.
- Busogoro, J.P., Etame, J.J., Harelimana, G., Lognay, G., Messiaen, J., Lepoivre, P. and Van Cutsem, P., 2004. Experimental evicence for the action of *M. fijiensis* toxins on banana photosynthetic apparatus. *In* Banana improvement: cellar, molecular biology and inducing mutations. Proceedings of a meeting held in leuven, Belgium, pp. 161-170.
- Buyckx, E.J.E., 1963. Précis de maladies et insectes nuisibles rencontrés sur les plantes cultivées au Congo, au Rwanda et au Burundi. I.N.E.A.C. Bruxelles. Hors série. 708p.

Références

- Canãs-Gutiérrez, P.G., Angarita-Velásquez, M.J., Restrepo-Flórez, J.M., Rodríguez, P., Moreno, C.X and Arango, R., 2009. Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag Sci* ; 65 :892-899.
- Carlier, 2004. Population genetic and dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*. *The international journal on banana and plantain* 13, 17-20.
- Carlier J., Mourichon X. and Jones D.R. 2000. *The causal agent*. In: Jones D.R., ed. *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. Wallingford, UK: CAB Publishing. pp 48-56.
- Carlier, J., Zapater, M-F, Lapeyre, F., Jones, D.R. and Mourichon, X., 2000. Septoria leaf spot of banana: a newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology* 90(7), 884-890.
- Carlier J., Mourichon X., González-de-León D., Zapater M.F. et Lebrun M.H. 1994. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. *Mol. Plant Pathol.* 84: 751-756.
- Carlier, J., De Waele, D. et Escalant, J.V., 2002. Evaluation globale de la résistance des bananiers à la fusariose, aux maladies foliaires causées par les *Mycosphaerella* spp. et aux nématodes : Evaluation approfondie (A. Vézina et C. Picq, eds). Guides techniques INIBAP 6. Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Montpellier, France. 63p.
- Carlier, J. ; De Waele, D. et Escalant, J.V., 2003a. Evaluation globale de la résistance des bananiers à la fusariose, aux maladies foliaires causées par les *Mycosphaerella* spp. et aux nématodes. Evaluation de la performance (A. Vézina et C. Picq, eds). Guides techniques INIBAP 7. Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Montpellier, France. 62p.

Références

- Carlier, J., Hayden, H., Rivas, G., Zapater, M.-F., Abadie, C. and Aitken, E., 2003b. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. *In: Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook. Proceedings of the Workshop on Mycosphaerella Leaf Spot Diseases, San José, Costa Rica, 20–23 May 2002* (Jacome, L., Lepoivre, P., Marin, D., Ortiz, R., Romero, R. and Escalant, J.V., eds), pp. 123–129. Montpellier: The International Network for the Improvement of Banana and Plantain.
- Caruana, M.L., 2003. Analyse du risque phytosanitaire (ARP). Bananiers : Banana streak badnavirus - BSV. CIRAD. 27p.
- Catur, H., Oscat, SP., Marina, PN., 2010. Assesment of Fungicide Resistance of Population of *Mycosphaerella* spp. Pn Señorita Banana Variety (Sucrier Group), Tree and Forestry Science and Biotechnology 4 (Special Issues 2), 85-90.
- César J. et Zoumana C., 1991. *In : Savanes d'Afrique, Terres Fertiles ?* Paris : Ministère de la coopération et du Développement. Savanes d'Afrique, terres fertiles ?, 1990-12-10/1990-12-14, (Montpellier, France).
- Chakrabarti, A., Ganapathi, T.R., Mukherjee, P.K. and Bapat, V.A., 2003. MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. *Planta*, 216:587–596.
- Champion, J., 1963. Le bananier. Editions G.P Maisonneuve et Larousse. Paris. 262p.
- Churchill, A.C.L., 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*. 12(4), 307-328.

Références

- Cirad-Gret, 2002. Mémento de l'agronomie. Centre de coopération Internationale en Recherches Agronomique pour le développement (CIRAD) ; Groupe de Recherches et d'Echanges Technologiques (GRET). Imprimé en France Jouve.
- CMI., 1974. Description of pathogenic fungi and bacteria. N° 413 et 414.
- Cohan, Jounot et Fouré E., 2004. Fongicides et traitements foliaires sur culture de bananes au Cameroun en 2004. Document du Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains (CARBAP).
- Conde-Ferraez L., Waalwijk C., Canto-Canché B.B., Kema G.H.J., Crous P.W., James A.C. and Abeln E.C.A. 2007. Isolation and characterization of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology* 8(1): 111-120.
- Cooke, T., Persley, D. and House, S., 2009. Diseases of fruit crops in Australian. CSIRO Publishing. P.70.
- Cools, H.J., Fraaije, B.A., Kim, S.H., Lucas, J.A., 2006. Impact of changes in the target P450 CYP51 enzyme associated with altered triazole-sensitivity in fungal pathogens of cereal crops. 8th international symposium on cytochrome P450 biodiversity and biotechnology. *Biochemical Society Transactions* 34, Part 6, 1219-1222.
- Cordeiro, Z.J.M., De Matos, A.P., De Oliveira e Silva, S., 1998. Black Sigatoka confirmed in Brazil. *Infomusa* 8 (1), 31p.
- Côte, F.X., Domergue, R., Monmarson, S., Schwendiman, J., Teisson, C. and Escalant, J.V., 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiol Plant*, 97:285–290.
- Crous, P.W. 2009. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Fungal Divers.* 38, 1–24.

Références

- Crous, P.W. and Mourichon, X., 2002. *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. nov.: causal agent of eumusae leaf spot disease of banana. *Sydowia*, 54, 35–43.
- Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Aptroot, A., Braun, U., Mourichon, X. and Carlier, J., 2003. Integrating morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on *Musa*. In: *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook. Proceedings of the Workshop on Mycosphaerella Leaf Spot Diseases, San José, Costa Rica, 20–23 May 2002* (Jacome, L., Lepoivre, P., Marin, D., Oriz, R., Romero, R. and Escalant, J.V., eds), pp. 43–57. Montpellier: The International Network for the Improvement of Banana and Plantain.
- Crous, P.W., Schoch, C.L., Hyde, K.D., Wood, A.R., Gueidan, C., de Hoog, G.S. and Groenewald, J.Z., 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Stud. Mycol.* 64, 17–47.
- Cuille, 1950. Recherche sur les charançons du bananier IFAC, Série technique n° 4. Paris.
- D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J.-M., Baurens, F.-C., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., Da Silva, C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lengelle, J., Rodier-Goud, M., Albert, A., Bernard, M., Correa, M., Ayyampalayam, S., Mckain, M., Leebens-Mack, J., Burgess, D., Freeling, M., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Chabannes, M., Wicker, T., Panaud, O., Barbosa, J., Eva Hribova, E., Helsop-Harrison, P., Habas, R., Rivallan, R., Francois, P., Poiron, C., Kilian, A., Burthia, D., Jenny, C., Bakry, F., Brown, S., Guignon, V., Kema, G., Dita, M., Waalwijk, C., Joseph, S., Dievert, A., Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi, M., Dolezel, J., Roux, N., Risterucci, A.-M., Weissenbach, J., Ruiz, M., Glaszmann, J.-C.,

Références

- Quétier, F., Yahiaoui, N. and Wincker, P., 2012. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants, *Nature*. 488, 213-217.
- Dabek AJ, Waller JM., 1990. Black leaf streak and viral streak: new banana diseases in East Africa. *Tropical Pest Management* 36, 157-158.
- Dadzie BK, Orchard JE. 1997. Routine Post-Harvest Screening of Banana/Plantain Hybrids: Criteria and Methods. INIBAP, Montpellier, France.
- Daniells, J. et N. Bryde, 1995. Un mutant demi-nain de Yangambi km5. *Infomusa* 4(2): 16-17.
- Daniells, J.W., 2009. Global banana disease management-getting serious with sustainability and food security. *Acta Hortic.* 828, 411–416.
- De Jesus, O.N., Silva, S.O., Amorim, E.P., Ferreira, C.F., De Campos, J.M.S, Silva, G.G. and Figueira, A., 2013. Genetic diversity and population structure of *Musa* accessions in *ex situ* conservation. *BMC Plant Biology*, 13:41.
- De Lapeyre de Bellaire L., 1999. Bio-écologie de *Colletotrichum musae* (Berk. et Curt.) Arx, agent de l'anthracnose des bananes, dans les conditions tropicales humides de la Guadeloupe. Thèse de doctorat en sciences de l'Université Paris XI Orsay. 100p.
- De Lapeyre de Bellaire, L., Fouré, E., Abadie, C., and Carlier, J., 2010. Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *Fruits*, Vol. 65, Pp 327-342.
- De Lapeyre de Bellaire, L., Ngando, E.J., Abadie, C., Carlier, J., Lescot, T., Fouré, E., 2006. Management of black sigatoka in Cameroon. *In*: E. Soprano, F.A. Tcacenco, L.A. Lichtemberg and M.C. Silva, eds. *Banana: A sustainable business*. Proceeding of the XVII meeting of ACORBAT held at Joinville – Santa Catarina, Brasil, from 15 to 20 october 2006. **2**: 122-132.

Références

- De Luca, F., Troccoli, A., Duncan, L.W., Subbotin, S.A., Waeyenberge, L., Coyne, D.L., Brentu, F.C. and Inserra, R.N., 2012. *Pratylenchys sperejei* n. sp. (Nematoda : Pratylenchidae), a new root-lesion nematode pest of plantain in West Africa. *Nematology*, Vol. 14(8), 987-1004.
- De Waele D., Davide R.D., 1998. Nématodes à galle de bananiers plantains. In INIBAP, 2001, Parasites et ravageurs de *Musa*, Fiche technique N° 3.
- Delvaux B. 1995. Soils. In. S. Gowen, eds., Bananas and Plantains, publ. Chapman and Hall, London. p. 230-257.
- Dembele, E., 1996. Influence du feu et du pâturage sur la végétation et la biodiversité dans les jachères en zone soudanienne nord. Cas des jeunes jachères du terroir de Missira (cercle de Kolokani), Mali, th. doct., univers. Aix-Marseille-III, 179p.
- Dhed'a, D., Moango, M. et Swennen, R., 2011 : La culture des bananiers et bananiers plantains en République Démocratique du Congo, Support didactique, Saint Paul, Kinshasa, 85p.
- Dhed'a, D., Swennen, R., Moango, M. et Blome, G., 2009. Eenquête diagnostique sur la culture des bananiers et bananiers plantains dans les zones périphériques de la ville de Kisangani et quelques villages du district de la Tshopo (RDC), Rapport N° ZRDC2008MP056, Fac. Sc., UNIKIS, 101p.
- Dionne, M., Caron, F., Dodson, J.J. and Bernatchez, L., 2008. Landscape genetics and hierarchical genetic structure in Atlantic salmon : the interaction of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology*, 17, 2383-2396.
- Duvivier, M., Dedeurwaerder, G., Marchal, G., Renard, M.E., Van Hese, V., Moreau, J.M. & Legrève, A. 2011. Two years of spatiotemporal monitoring of *Mycosphaerella graminicola* airborne inoculum in

Références

- Belgium. VIIIth International Symposium on *Mycosphaerella* and *Staganospora* diseases of Cereals, Mexico, Abstract.
- Eden-Green, S.J., 1994. La maladie du sang du bananier. In INIBAP, 2001. Maladies de *Musa*, Fiche technique N° 3, 2p.
- El Hadrami, A., 2000. Caractérisation de la résistance partielle des bananiers à la maladie des raies noires et évaluation de la variabilité de l'agressivité de l'agent causal, *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse inédite, Gembloux, 165p.
- Essis, B., Kobenan, K., Traoré, S., Koné, D. et Yatty, J., 2010. Sensibilité au laboratoire de *Mycosphaerella fijiensis* responsable de la cercosporiose noire des bananiers vis-à-vis de fongicides couramment utilisés dans les bananeraies ivoiriennes. Journal of Animal & Plant Sciences. Vol. 7, Issue 2: 822-833.
- Etebu E., Pasberg-Gauhl C., Gauhl F. et Daniel-Kalio L.A. 2003. Preliminary studies of *in vitro* stimulation of sexual mating among isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black sigatoka disease in bananas and Plantains. *Phytoparasitica* 31(1): 1-7.
- Etebu, E., Pasberg-Gauhl, C., Gauhl, F., Ayibo Daniel-Kalio, L., 2005. Effet de la lumière et de la circulation de l'air dans la sporulation et la croissance de *Mycosphaerella fijiensis*. *Infomusa*, 171p.
- Fahleson, J., Nakyanzi, M., Okori, P., Seal, S., Kenyon, L. and Dixelius, C., 2009. Genetic analysis of *Mycosphaerella fijiensis* in the Uganda Lake Victoria region. *Plant Pathology*. 58, 888-897.
- FAOSTAT., 2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
<http://faostat.fao.org/site/567/desktopdefault.aspx?pageid=567#ancor>.

Références

- FAOSTAT., 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
http://faostat3.fao.org/home/index_fr.html?locale=fr#DOWNLOAD
- Feakin D.S. (ed.). 1971. Pest Control in Bananas. PANS Manual No 1, (New Edition). 128p.
- Fernandez-Ortuno D., Torès J.A., Antonio de Vicente et Pérez-Garcia A. 2008. Mechanism of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* 11: 1-9.
- Fouré E, Grisoni M, Zurfluh R. 1984. Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportements des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet et de quelques caractéristiques biologiques de la maladie des raies noires au Gabon. *Fruits* 39: 365-378.
- Fouré E, Mouliom Pefoura A. 1988. Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Efficacités comparées de différentes molécules fongicides sur *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agent de la maladie des raies noires des bananiers et plantains au Cameroun.
- Fouré E. 1982. Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladie des raies noires). I – Incubation et évolution de la maladie. *Fruits* 37: 749-759.
- Fouré E. 1988. Stratégies de lutte contre la cercosporiose noire des bananiers et des plantains provoquée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. L'avertissement biologique au Cameroun. Evaluation des possibilités d'amélioration. *Fruits* 43: 269-274.
- Fouré E., Mouliom Pefoura A. et Mourichon X. 1990. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de

Références

- bananiers appartenant à divers groupes génétiques. *Fruits* 45(4) : 339-345.
- Fouré, E. et Moreau, A. 1992. Contribution à l'étude épidémiologique de la cercosporiose noire dans la zone bananière du Mungo de 1987 à 1989. *Fruits*, Vol.47, N°1, pp.3-16.
- Frison, E. and Sharrock, S. 1999. The economic, social and nutritional importance of banana in the world. In C. Picq, E. Fouré and E. Frison (eds): Bananas and food security. Proceedings of an International Symposium held in Douala, Cameroon, 10-14. November 1998. INIBAP, Montpellier, France. Pp. 21-35.
- Fruits* 43: 67-72.
- Fullerton R.A. et Olsen T.L. 1995. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 23: 39-48.
- Fullerton, R.A., 1994. Compendium of tropical fruit diseases. APS. 89p.
- Gaidashova, S.V., Van Asten, P.J.A., Delvaux, B., De Waele, D., 2012. The influence of the topography position within highlands of Western Rwanda on the interactions between banana (*Musa* spp. AAA-EA), parasitic nematodes and soil factors. *Scientia Horticultura*. 125, 316-322.
- Gaillard, S., 2000. Caractérisation du complexe d'espèces fongiques *Mycosphaerella* spp. associé aux bananiers. Rapport de stage de licence de Physiologie Végétale Appliquée, Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, 41p.
- Ganry, J., Fouré, E., De lapeyre de Bellaire, L. and Lescot, T., 2012. An integrated approach to control the Black leaf streak disease (BLSD) of bananas, while reducing fungicide use and environmental impact. In Dhanasekaran, D. Thajuddin, N. Panneerselvam, A. Fungicides for Plant and Animal Diseases, pp. 193-226.

Références

- Ganry J. 1992. Breeding Banana and Plantain for Resistance to Disease and Pests, 393 p. CIRAD eds, Montpellier, France.
- Gasparotto, L., Pereira, J.C.R., Urban, A.F., Hanada, R.E. and Pereira, M.C.N., 2005. *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka-negra da bananeira. *Fitopatol. Bras.* 30, 423–425.
- Gauhl, F., 1994. Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana in Costa Rica, Central America. PhD thesis originally presented in German. INIBAP, Montpellier, France. 120p.
- Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C. and Jones, D.R., 2000. Black leaf streak : disease cycle and epidemiology. In: diseases of banana, Abaca' and Enset (Jones, D.R., ed.), Pp 56-62. New-York: CABI Publishing.
- Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C., Vuylsteke, D. and Ortiz, R., 1993. Multilocational evaluation of black sigatoka resistance in banana and plantain. IITA research Guide 4, 59p.
- Geier B.M., SchaK gger H., Brandt U., Colson A.M. and von Jagow G., 1992. Point mutation in cytochrome *b* of yeast ubihydroquinone: cytochrome-*c* oxidoreductase causing myxothiazol resistance and facilitated dissociation of the iron-sulfur subunit. *Eur. J. Biochem.* 208: 375-380.
- Gisi, U., Chin, K.M., Knapova, G., Färber, K.R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H., Steinfeld, U., 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection* **19**, 863-872.
- Gold, C.S. et Messieaen, S., 2000. Charançon du bananier *Cosmopolites Sordidus*. Parasites et ravageurs de *Musa*. *Infomusa* 6(2): 19-21.

Références

- Haicour, R., Bui Trang, V., Dhed'a, D., Assani A., Bakry, F., and Cote F.X., 1998. Banana Improvement through biotechnology-ensuring food security in the 21st century. *Cahiers Agriculture* 7: 468-475.
- Halkett, F., Coste, D., Rivas Platero, G.G., Zapater, M.F., Abadie, C. and Carlier, J., 2010. Genetic discontinuities and disequilibria in recently established populations of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 19, 3909-3923.
- Hayden, H.L., Carlier, J. and Aitken, E.A.B., 2003. Genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* populations from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands. *Plant Pathol.* 52, 703-712.
- Hayward, A.C., 1983. *Pseudomonas solanacearum*: bacterial wilt and moko disease. In: Plant bacterial diseases (Ed. by Fahy, P.C.; Persley, G.J.), pp. 129-135. Academic Press, Sydney, Australie.
- Hsueh, Y.P. and Heitman, J., 2008. Orchestration of sexual reproduction and virulence by the fungal mating-type locus. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 517-524.
- Jacome, L.H., 2003. Population biology and epidemiology. In: Jacome L., P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant (eds). 2003. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, Costa Rica on 20-23 May 2002. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. Pp 107-110.
- Jacome L.H., Schuh W. and Stevenson R.E., 1991. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology* 81(12):1480-1485.
- Jiménez, F.O., 1994: Etudes agrométéorologiques appliqués à la lutte contre la Sigatoka noire (*Mycosphaerella fijiensis*) du bananier plantain (*Musa*

Références

- AAB), Thèse inédite, centro Agronomico tropical de investigacio y ensenanza, Institut national agronomique Paris-Grognon, 137p.
- Jones D.R. et Stover R.H. 2000. *Preharvest Diseases*. In D.R. Jones, ed. Diseases of Banana, Abacá and Enset .CABI Publishing, pp 173-190
- Jones, D.R., 2000. Diseases of Banana, Abacat and Enset, Londres, CABI Publishing: p 4-11, 37-39 and 173-190.
- Jones, D.R., 2002. The distribution and importance of the *Mycosphaerella leaf spot diseases of banana*. In Jacome, L, Lepoivre, P., Marin, D., Ortiz, R., Romero, R., Escalant, JV (Eds) *Mycosphaerella Leaf Spot of Bananas: Present Status and Outlook, Proceedings of the 2nd International Workshop on Mycosphaerella Leaf Spot Diseases*, 20-23 May 2002. INIBAP, Montpellier, France, pp 303-307.
- Jones, D.R., 2009. Disease and pest constraints to banana production. *Acta Hort.* 828, 21-36.
- Juakaly, M., 2007. Résilience et écologie des araignées du sol d'une forêt équatoriale de basse altitude (Réserve forestière de Masako, Kisangani, RDC). Thèse de doctorat inédite, Faculté des sciences, Unikis. 149p.
- Kablan, L., 2012. Effet protecteur du silicium sur la tolérance du bananier à deux maladies Fongiques. Thèse inédite, UCL, 237p.
- Kagy V. 1999. Importance alimentaire, socio-économique et culturelle de la banana dans la société Kanak de Nouvelle-Calédonie. In C. Picq, E. Fouré et E.A. Frison, eds. *Bananas and food security/Les productions bananières : un enjeu économique majeur pour la sécurité alimentaire*. Proceedings of an International Symposium held in Douala, Cameroon. INIBAP, Montpellier. pp 437-443.
- Karamura, E., 2006. Points of view: Banana bacterial wilt-refining the" road map" for control. The story so far-spread and impact disponible sur <http://www.new-agri.co.uk/06-5/pov.html>.

Références

- Kennang, A., 2009. Reproduction du cycle sexuel *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet et caractérisation des différentes populations du Cameroun. Mémoire de Gembloux, 76p.
- Koné, D., Badou, O.J., Bomisso, E.L., Camara, B., Ake, S., 2008. Activité *in vitro* de différents fongicides sur la croissance chez *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* Staver et Dickson, *Cladosporium musae* Morelet et *Deightonielle torulosa* (Syd.) Ellis, parasites isolés de la phyllosphère des bananiers en Côte d'Ivoire. C.R. Biologies 332, 448-455.
- Kovács, G., Sági, L., Jacon, G., Arinaitwe, G., Thiry, E., Strosse, H., Swennen, R. and Remy, S., 2013. Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. Transgenic Res., 22(1): 117–130.
- Krishnamoorthy, V., 2002. Amélioration du bananier (*Musa* spp.) pour la résistance à la maladie de Sigatoka et aux Nématodes, Thèse inedite, Departement of Fruit Crops Horticultural College and Research Institute, Tamil Nadu Agriculture University, Inde, 156 P.
- Kung'u, J., Seif, A. et Waller, J., 1992. Black leaf streak and other foliage diseases of bananas in Kenya. Tropical Pest Management, 38(4):359-361.
- Kunianga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., Yokosawa, R. 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. Curr. Genet. 32, 237-243.
- Laprade C.S. & R. Ruiz B. 1999. Productive behaviour of FHIA-01 (AAAB) and FHIA-02 (AAAB), under inorganic and organic fertilization programmes. Pp. 171-176 in Organic/environmentally friendly banana production. Proceedings of a workshop held at EARTH, Guácimo,

Références

- Costa Rica, 27-29 July 1998 (F.E. Rosales, S.C. Tripon & J. Cerna, eds). INIBAP, Montpellier, France.
- Larpent, J.P. et Larpent G.M., 1985. Elément de microbiologie, Herman, 324p.
- Lassois, L, Busogoro, J.P., Jijakli, H., 2009. La banane : de son origine à sa commercialisation. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 575-586.
- Lassoudière, A., 2007. Le bananier et sa culture. Editions Quae. 384p.
- Lassoudière A., 2010. L'histoire du bananier. Editions Quae. 351p.
- Lassoudière A., 2012. Le bananier : Un siècle d'innovations techniques. Editions Quae. 352p.
- Lee, S.B., Milgroom, M.G. et Taylor, J.W. 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newsletter* **35**: 23-24.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W. and Shertz, C., 2010. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 298-340.
- Legrève, A., Delfosse, P. and Maraite, H., 2002. Phylogenetic analysis of *Polymyxa* spp. based on nuclear 5.8S and internal transcribed spacers ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **106**: 138-147.
- Lejoly, J., Lisowski, S. et Ndjele, M. 1988. Catalogue des plantes vasculaires des sous-regions de Kisangani et de la Tshopo (Haut-Zaïre). 3ème édition, Labor. Botan. Syst. Phytos. ULB, 122p.
- Lenormand, T., 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 183-189.
- Lepoivre, P., 2003. La phytopathologie. Ed. De Boeck. 427p.
- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker A.S., 2007. Mutations in the *CYP51* gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* **63**, 688-698.

Références

- Lheureux F., Carreel F., Jenny C., Lockhart B.E.L., Iskra-Caruana M-L. 2003. Identification of genetic markers linked to Banana streak disease expression in inter-specific Musa hybrids. *Theor. Appl. Genetic*; 106: 594-598.
- Linde, C.C., Zala, M., Ceccarelli, S. and McDonald, B.A., 2003. Further evidence for sexual reproduction in *Rhynchosporium secalis* based on distribution and frequency of mating-type alleles. *Fungal Genet. Biol.* 40: 115-125.
- Lissingi, A.J., 2010. Etude quantitative des peuplements forestiers de la Réserve de Masako (Kisangani, R.D.Congo), Mémoire D.E.S. inédit, Faculté des Sciences Agronomiques, UNIKIS, 100p.
- Loeillet, D., 1998. Banane. *In: Cyclope*, (Chalmin P. ,ed.). *Economica*: 288-291.
- Long, P.G., 1979. Banana black leaf steak disease (*Mycosphaerella fijiensis*) in Western Samoa. *Tans. Br. Mycol. Soc.* 72:299-310.
- Lorena, I., Salazar, O., González V., Julián, M. C., Ribio, V., 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology.* 75, 187-194.
- Madden, L.V., Hughes, G., and van den Bosch, F. 2007. *The Study of Plant Disease Epidemics*. The American Phytopathological Society, APS Press St. Paul, Minnesota, 421p.
- Marciel Cordeiro, Z.J. and Pires de Matos, A., 2003. Impact of *Mycosphaerella* spp. in Brazil. *In: Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook*. Proceedings of the Workshop on Mycosphaerella Leaf Spot Diseases, San José, Costa Rica, 20–23 May 2002 (Jacome, L., Lepoivre, P., Marin, D., Ortiz, R., Romero, R. and Escalant, J.V., eds), pp. 91–97. Montpellier: The International Network for the Improvement of Banana and Plantain.

Références

- Marin, D.H., Romero, R.A., Guzman, M., Sutton, T.B., 2003. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87:208-222.
- Martinez G., J. Hernández, Tremont, O., Pargas, R., Manzanilla, E., 2002. The spread of black Sigatoka throughout Venezuela, 1997-2000. *Infomusa* 11 (1), 6-9.
- Martinez, G., 1997. The present situation with regard to Black Sigatoka in Venezuela, *Infomusa* 6 (1), 16-17.
- Martinez, G., Pargas, R., Manzanilla, E, Mu, D., 1998. Report on black Sigatoka status in Venezuela. *Infomusa* 7 (1), 31-32.
- Mate, M. 2001, Croissance, phytomasse et minéralomasse des haies des légumineuses améliorantes en cultures en allées à Kisangani. Thèse de doctorat inédite, 273p.
- Mavroeidi, V.I., Shaw, M.W., 2004. Sensitivity distributions and cross-resistance patterns of *Mycosphaerella graminicola* to fluquinconazole, prochloraz and azoxystrobin over a period of 9 years. *Crop Protection* 24, 259-266.
- Maxwell, A., Jackson, S., Dell, B. and Hardy, G.E.J., 2005. PCR-identification of *Mycosphaerella* species associated with leaf diseases of Eucalyptus. *Mycol. Res.*, 109: 992-1004.
- McDonald, B.A. and Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40, 349-379.
- Meredith D.S. 1960. Studies on *Gloesporium musarum* Cke and Masee causing storage rots of Jamaican bananas. I. Anthracnose and its chemical control. *Annals of Applied Biology*, 48: 279-290.
- Meredith, D.S. and Lawrence, J.S., 1970. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): susceptibility of cultivars. *Tropical Agriculture* 27: 275-287.

Références

- Meredith, D.S., 1970. Banana Leaf Spot Disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. Phytopathological Papers No. 11, commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 147 pp
- Meredith, D.S., Lawrence, J.S. and Firman, I.D., 1973. Ascospore release and dispersal in black streak of banana *Mycosphaerella fijiensis*. Trans. Br. Mycol. Soc. 60:547-554.
- Mobambo, P.K.N., Naku, M. & Nganga, Z., 1993. Situation de la maladie des raies noires des bananiers et bananiers plantain au Zaïre. *Infomusa 2* : 14-15.
- Mobambo, P.K., Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C., Swennen, R. and Staver, C., 2010. Factors Influencing the Development of Black Streak Diseases and the Resulting Yield Loss in Plantain in the Humid Forests of West and Central Africa. Tree and Forestry Science and Biotechnology, Global Science Books, Pp. 47-52.
- Mobambo, P.K.N., 2002. Stratégies de gestion intégrée des cultures pour la production de bananes plantains et le contrôle de la cercosporiose noire en République Démocratique du Congo. *Infomusa 11* (1) : 3-6.
- Morlon, P. et Siquat, F., 2008. La troublante histoire de la jachère, Quae, 328p.
- Mouliom Pefoura A. et Mourichon X. 1990. Développement de *Mycosphaerella musicola* (maladie de Sigatoka) et *M. fijiensis* (maladie des raies noires) sur les bananiers et plantains. Etude du cas particulier des productions d'altitude. *Fruits 45*(1). Pp 17-24.
- Mouliom-Pefoura A, Lassoudière A, Foko J and Fontem DA. 1996. Comparison of development of *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola* on banana and plantain the various ecological zones in Cameroun. *Plant Dis.* 80: 950-954.
- Mourichon X, Carlier J, Fouré E. 1997. Sigatoka leaf spot disease, *Musa* Disease fact Sheet n° 8 Inibap, Montpellier, France, 4p.

Références

- Mourichon, X., Peter, D. and Zapater, M.F. 1987. Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet sur des jeunes plantules de bananiers issues de cultures *in vitro*. *Fruits*, 42: 195-198.
- Mourichon, X., Zapater, M.F., 1990. Obtention *in vitro* du stade *Mycosphaerella fijiensis* forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. *Fruits* 45: 553-557.
- Mourichon, X., 2003. Overview of progress and results since the first international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas in 1989. In: L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Romero et J.V. Escalant, eds. *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*. Proceedings of the 2nd international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. pp 11-18.
- Mourichon X., Peter, D. et Zapater, M. 1987. Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*. *Fruits* 42:195-198.
- Mourichon, X. et Fullerton, R., 1990. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease and black leaf streak disease in banana and plantains. *Fruits* (Paris), 45 (3):213-218.
- Mourichon, X., 1986. Mise en évidence de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agent de la maladie des raies noires (black leaf streak) des bananiers plantains au Congo. *Fruits*, 41:371-374.
- Mourichon, X., Carlier, J., Fouré, E., 1997. Sigatoka leaf spot disease. Black leaf streak disease (black Sigatoka), Sigatoka disease (yellow Sigatoka). *Musa* Disease Fact Sheet 8, 1-4.
- Mourichon, X., Lepoivre, P. and Carlier, J., 2000: Black leaf streak: host-pathogen interactions, pp 67-72.

Références

- Ndowora T., Dahal G., LaFleur D., Harper G., Hull R., Olzsewski N., Lockhart B.E. L., 1999. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology*; 255: 214-220.
- Ndungo, V., 2004. La situation de la culture de bananier et bananier plantain en République Démocratique du Congo, communication présentée à la septième réunion du comité de pilotage de MUSACO, Limbé, Cameroun, 7-11 juin 2004.
- Ngama B.J-F., 2010. Etude diagnostique de banana bunchy top disease (BBTD) dans la région forestière du bassin du Congo en district de la Tshopo dans la Province Orientale en RDC. DEA inédit, Fac. IFA-Yangambi, 78p.
- Noupadja, P., Tomekpe, K. et Youmbi, E. 2007. Evaluation d'hybrides tétraploïdes de bananiers plantains (*Musa* spp.) résistants à la maladie des raies noires créés au Cameroun. *Fruits* 62(2): 77-88.
- Nwauzoma, Akagbuo, B., Uma, S., Saraswathi, M.S. and Mustafa, M., 2011. Developing markers for Sigatoka leaf spot disease (*Mycosphaerella musicola* Leach) resistance in banana (*Musa* spp.). *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(33), pp. 6213-6219.
- Nyabyenda, P. 2006. Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique. Cultures industrielles et exploitation, cultures fruitières, cultures maraîchères. Les Presses Agronomiques de Gembloux. 238p
- Onautshu O., 2007. Etude de l'incidence des maladies et ravageurs chez les bananiers (*Musa* spp.) de la région de Kisangani (R.D.CONGO), D.E.A. inédit, Faculté des Sciences, UNIKIS, 54p.
- Orellena, P.P., Carabaloso, I.B., L.G. Rodríguez and Novisel Veitía Rodríguez, N.V., 2002. Evaluación de características agronómicas en clones híbridos de platanos (*Musa* spp). *In* Acrobat : Memorias XV

Références

- Reunión . Medellín (COL): Asociación de bananeros de colombia, 4p.
- Padmanaban, B. and Sathiamoorthy, S., 2001. Le charançon du pseudotrunc du bananier *Odoiporus longicollis*. Parasites et ravageurs de *Musa*. Fiche technique N° 5
- Pauwels, J.M., Van Ranste, E., Verloo, M. et Mvondo Ze, A. 1992. Manuel de laboratoire de pédologie: Méthodes d'analyses de sols et de plantes, Equipement, Gestion de Stock de Verrerie et de Produits Chimiques, Publications Agricoles-28, 159p.
- Pennisi, E., 2010. Armed and dangerous, *Science*, Vol.327, pp. 804–805.
- Perea I., Arango E.R., Marquez E. et Arango R. 2005. La diversité génétique des isolats colombiens de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet analysée des microsatellites. *Infomusa* 14(2): 18-21.
- Pérez Hernández, J.B., Remy, S., Swennen, R. and Sági, L., 2006. Banana (*Musa* spp.). *In*: Wang K (ed) *Agrobacterium* protocols, vol 2 (methods in molecular biology, vol 344). Humana Press Inc., pp. 167–175.
- Pérez Vicente, L., Alvarez, J.M. et Pérez, M., 2003. Economic impact and management of black leaf streak disease in Cuba. *In*: L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Romero et J.V. Escalant, eds. *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*. Proceedings of the 2nd international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. pp 71-84.
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakrya, F., Carreel, F., Hippolyte, I., Horry, J.P., Jenny, C., Lebot, V., Risterucci, A.M., Tomekp, K., Doutrelepont, H., Ball, T., Manwaring, J., De Maret, P. and Denham, T., 2011. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. National Museum of Natural

Références

- History and Smithsonian Tropical Research Institute, Panama City, PNAS Early Edition, 8p.
- Ploetz R.C. & K.G. Pegg. 2000. *Fusarium* wilt. Pp. 143-159 in Diseases of Banana, Abacá and Enset (D.R. Jones, ed.). CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Ploetz, R.C. (2004) First report of black Sigatoka of banana caused by *Mycosphaerella fijiensis* on Grand Bahama Island. *Plant Dis.* 88, 772.
- Ploetz, R.C., 2001. Black Sigatoka of Banana: the most important disease of a most important fruit. The Plant Health Instructor, DOI: 0.1094/PHI-I-2001-0126. Available at <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/blacksigatoka.aspx>.
- Ploetz, R.C.; Zentmyer, G.A.; Nishijima, W.T.; Rohrbach, K.G.; Ohr, H.D., 1994. Compendium of tropical fruit diseases. APS PRESS.
- Porras, A. and Perrez, L., 1997. The role of temperature in the growth of the germ tubes of ascospores of *Mycosphaerella* spp., responsible for leaf spot diseases of banana. *Infomusa* 6 (2), 27-32
- Queiroz, C.B., Miranda, E.C., Hanada, R.E., Sousa, N.R., Gasparotto, L., Soares, M.A. and Silva, G.F., 2013. Distribution of mating-type alleles and M13 PCR markers in the black leaf spot fungus *Mycosphaerella fijiensis* of bananas in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 12 (1): 443-452.
- Rambelli A., Persiani AN., Maggi O., Lunghini D., Onofri S., Riess S., Dowgiallo G., Puppi G., 1983. Comparative studies on microfungi in tropical ecosystems. Mycological studies in South Western Ivory Coast forest. Chair of Mycology, University of Rome - Mm, UNESCO; Rapport Nol, 102 p.

Références

- Remy, S., Buyens, A., Cammue, B.P.A., Swennen, R. and Sági, L., 1998. Production of transgenic banana plants expressing antifungal proteins. *Acta Hortic.*, 490:433–436.
- Rhodes, P., 1964. A new banana disease in Fiji. *Commonwealth Phytopathological News*, 10, 38-41.
- Rieux, A., Halkett, F., De lapeyre de Bellaire, L., Zapater, M-F., Rousset, F., Ravigne, V. and Carlier, J., 2011. Inferences on pathogenic fungus population structures from microsatellite data : new insights from spatial genetics approaches. *Molecular Ecology* 20, 1661-1674.
- Risède, J-M and Simoneau, P., 2004. Pathogenic and genetic diversity of soilborne isolates of *Cylindrocladium* from banana cropping systems. *European Journal of Plant Pathology* 110: 139–154.
- Rivas, G.-G., Zapater, M.-F., Abadie, C. and Carlier, J., 2004. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 13: 471-482.
- Riveros, A.S., Giraldo, C.I. and Gamboa, A. 2003. Microbiological control of black leaf streak disease. *In*: L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Romero et J.V. Escalant, eds. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. pp 287-296.
- Robert, S., Ravigne, V., Zapater, M-F., Abadie, C. and Carlier, J., 2012. Contrastin introduction scenarios among continents in the worldwide invasion of the banana fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 21, 1098-1114.
- Romero R.A. 2000. Control. *In*: D.R. Jones, ed. *Diseases of Banana*, Abacá and Enset. Wallingford, UK: CABI Publishing. Pp 72-79.

Références

- Rufyikiri G. 2000. Contraintes nutritionnelles chez le bananier (*Musa* spp.) cultivé en milieux riches en aluminium soluble et conséquences sur sa croissance. Université catholique de Louvain. Thèse inédite. 158p.
- Rutter, J., Burt, P.J.A. et Ramirez, F., 1998. Movement of *Mycosphaerella fijiensis* spores and sigatoka disease development on plantain close to an inoculum source. *Aerobiologia* **14**: 201-208.
- Sebasigari K (1990) Effect of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on bananas and plantains in the Imbo Plain in Rwanda and Burundi. In 'Sigatoka leaf spot diseases of bananas: Proceedings of an international workshop'. Costa Rica. (Eds RA Fullerton, RH Stover). (INIBAP).
- Sanchez, C.L.C., Zapata, J.C., 2002. Frequency of *Paracercospora fijiensis* and *Pseudo cercospora musae* in Dominico hartón plantain. *Infomusa* 11 (1), 9-13.
- Sarah, J-L, Pinochet, J. et Stanton, J., 1996. Résistance à la fusariose, aux maladies foliaires causées par les *Mycosphaerella* spp. et aux nématodes, Guide technique INIBAP N°7, 57p.
- Sarah, J.L., Hugon, R., Simon, S., 1990. Les viroses des bananiers. La mosaïque en plages des bananiers = Virus diseases in banana. Banana mosaic. *Fruits* (spéc.) : 51-56. Schoofs, 1997, *The origin of embryogenic cell in Musa*, Doctoraat proefschrift Nr 330 an de Faculteit Landbawkundige in toegepaste biologische wetenschappen van de K.U. Leuven.
- Schoofs, 1997. The origin of embryogenic cell in *Musa*. Doctoraat proefschrift, Nr 330 an de Faculteit Landbawkundige in toegepaste biologische wetenschappen van de K.U. Leuven.
- Sharrock, S. and Lusty, C., 2000. Nutritive value of banana. In Inibap annual report 1999. Inibap: Montpellier, France. Pp. 28-31.

Références

- Sierotzki H., Parisi S., Steinfeld U., Tenzer I., Poirey S. et Gisi U. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc₁ enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science* **56**: 833-841.
- Simmonds, N.W., Shepherd, K., 1955. Taxonomy and origins of cultivated bananas. *J. Linn. Soc. Bot.* 55: 302-312.
- Skiredj, A. ; Walali, D.M. et Hassan, E.A. ; 2005. La culture sous serre au Maroc. Disponible sur www.legume-fruit-maroc.com.
- Slabaugh W.R. 1994. *Cigar-End Rot*. In: Ploetz R.C., Zentmyer G.A., Nishijima W.T., Rohrbach K.G. and Ohr H.D., eds. *Compendium of Tropical Fruit Diseases*. APS Press, USA. Pp 6-7.
- Soki K., 1994. Biologie et écologie des termites (Isoptera) des forêts ombrophiles du Nord- Est du Zaïre (Kisangani). Thèse de doctorat inédite, ULB. 329p.
- Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
- Stewart, E.L., Liu, Z., Crous, P.W. and Szabo, L.J., 1999. Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycol. Res.* 103, 1491–1499.
- Stover, R.H. 1972. *Banana, Plantain and Abacá Diseases*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK, London. 316p.
- Stover R.H., 1989. Effet du cercospora noir sur les plantains en Amérique centrale. *Fruits* 38:326-329.
- Stover, R.H., 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease* 64: 750-755.
- Suwan, N., Nuandee, N., Akimitsu, K., and Nalupang, S., 2012. Analysis of β -tubulin from carbendazim resistant isolates of *Cercospora lactucae-sativae* on Lettuce in Thailand. *Journal of Agricultural Technology*, Vol. 8(2): 711-723.

Références

- Swennen, R. and Vuylsteke, D., 2001. Bananier. *In* Raekemaekers R.H., eds., *Agriculture en Afrique tropicale*, DGCI, Bruxelles, Belgique. p.611-637.
- Swennen, R. and Vuylsteke, D., 2001. Breeding black sigatoka resistant plantains with a wild banana. *Tropical Agriculture* 70, 74-78.
- Takamatsu, S., 1998. PCR applications in fungal phylogeny. *In*: Bridge, P.D., Arora,D.K.,Reddy,C.A.,Elander,R.P.(Eds), *Applications of PCR in mycology*. CAB International, Oxon, UK, pp. 125-152.
- Tchango Tchango, J. et Ngalani, J.A., 1999. Transformations et utilisations de la banane plantain en Afrique Centrale et Occidentale. *In*: C. Picq, E. Fouré et E.A. Frison, eds. *Bananas and food security/Les productions bananières : un enjeu économique majeur pour la sécurité alimentaire*. Proceedings of an International Symposium held in Douala, Cameroon. INIBAP, Montpellier. pp 361-373.
- Tenkouano A., Crouch J.H., Crouch H.K., Vuylsteke D. and Ortiz R. 1999. Comparison of DNA marker and Pedigree-based methods of genetic analysis of plantain and banana (*Musa* spp.) clones. *Theor Appl Genet*, 98: 62-68.
- Tezenas du Montcel, H., 1985. *Le bananier plantain*. Le technicien d'agriculture tropical. Maisonneuve et Larose. 143p.
- Thomas, J.E., and Iskra Caruana, M.L., 2000. Bunchy Top. *In* D.R. Jones (ed): *Diseases of banana, abaca and enset*. CABI Publishing: Wallingford, U.K. pp. 241-253.
- Thomas J.E., Iskra-Caruana M.L, Magnaye L.V., Jones D.R., 1999. Bract mosaic. *In* Jones D.R. (ed): *Diseases of banana, abacà and enset*. london, CABI publishing, , pp 253-263.
- Thomas, J.E., Caruana, I. et Jones, D.R., 1994. *Maladies de Musa : Le Bunchy top du bananier*, Fiche technique N° 4.

Références

- Thomas, J.E, Magnaye, L.U., 1996. La mosaïque des bractées du bananier. In INIBAP, 2001 Maladie de Musa- fiche technique N° 7.
- Tushemereirwe, W.K., Waller, J.M. 1993. Black leaf streak (*Mycosphaerella fijiensis*) in Uganda. *Plant Pathology* 42, 471-472.
- Ude, G., Pillay, M., Nwakanma, D. and Tenkouano, A. 2002a. Analysis of genetic diversity and sectional relationships in *Musa* using AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 104: 1239-1245.
- Ude, G., Pillay, M., Nwakanma, D. et Tenkouano, A. 2002b. Genetic Diversity in *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and some of their natural hybrids using AFLP Markers. *Theor Appl Genet*, 104: 1246-1252.
- Upoki, A., 2001. Etude du peuplement de bulbuls (Pycnonotidae, Passériformes) dans la réserve forestière de Masako à Kisangani (R.D.Congo). Thèse de doctorat inédite, Fac. des Sciences, UNIKIS, 160p.
- Vadenput, 1981. Les principales cultures en Afrique centrale. Presse de l'imprimerie Lesafre, B7500, Belgique.
- Vázquez-Euán, R., Grijalva-Arango, R., Chi-Manzanero, B., Tzec-Simá, M., Islas-Flores, I., Rodríguez-García, C., Peraza-Echeverría, L., James, A.C., Manzo-Sanchez, G. and Canto-Canché, B., 2012. Direct colony polymerase chain reaction (PCR) : An efficient technique to rapidly identify and distinguish *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola*. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 11(33), pp. 8172-8180.
- Vermeire, M.L., Kablan, L., Dorel, M., Delvaux, B., Risède, J.M. & Legrève, A. 2011. Protective role of silicon in the banana-*Cylindrocladium spathiphylli* pathosystem. *European Journal of Plant Pathology*, 31 (4): 621-630.

Références

- Vicente, L.P., 1998. Black Sigatoka disease control in banana and plantain plantations in Cuba. *Infomusa* 7 (1), 27-30.
- Vishnevetsky, J., White, T.L., Palmateer, A.J., Flaishman, M., Cohen, Y., Elad, Y., Velcheva, M., Hanania, U., Sahar, N., Dgani, O. and Perl, A., 2011. Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. *Transgenic Res.*, 20:61–72.
- Wardlaw, C.W., 1961. *Banana diseases*. Longmans. 648p.
- Wiersum, K.F., 1981. Outline of the agroforestry concept. In “K.F. Wiersum, ed. Viewpoints on agroforestry. Syllabus of lectures series. Wagenigen, the Nederland’s: agricultural University, “Hinkeloord””: 1-23.
- Wilson, G., 1987. Status of bananas and plantains in West Africa. pp. 29-35 in *Banana and plantain breeding strategies* (G.J. Persley & E.A. De Langhe, eds). Proceedings of an International Workshop, 13-17 octobre 1986, Cairns, Australie. ACIAR Proceedings No. 21.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols : A guide to Methods and Applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 315±322. Academic Press : San Diego, U.S.A.
- Yenga, B., 2009. Prévalence de la cercosporiose du bananier et bananier plantain dans les systèmes agroforestiers autour de la réserve forestière de Masako (RDC), DEA inédit, Fac. IFA-Yangambi, 86p.
- Yirgou, D. and Bradbury J.F., 1968. Bacterial wilt of Ensete (*Ensete ventricosa*) incited by *Xanthomonas mussearum*. *Phytopathology* 58:111-112.

Références

- Zihahirhwa, K.P., 2011. Evaluation de la situation phytosanitaire du bananier (*Musa* spp.) dans les systèmes culturaux des zones agroécologiques de la Province du Sud-livu à l'Est de la R.D. Congo. Mémoire inédit, UCL, 111p.
- Zhan, J., Mundt, C.C. and McDonald, B.A., 2007. Sexual reproduction facilitates the adaptation of parasites to antagonistic host environments: Evidence from empirical study in the wheat-*Mycosphaerella* graminicola system. *Int. J. Parasitol.* 37: 861-870.
- Zhonghua, M., Michailides, T.J., 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **24**, 853-863.

Annexes

Annexe 1. Classification des principaux cultivars du genre *Musa* à fruits comestibles (Bakry *et al.*, 1997).

| Groupe | Sous-groupe | Cultivars | Type de fruit |
|---------------|--------------------|---|----------------------|
| AA | Sucrier | Pisang Mas, Frayssinette, Figue Sucrée | Dessert |
| | Pisang Lilin | Pisang Lilin | Dessert |
| | Pisang Berangan | Pisang Berangan | Dessert |
| | Lakatan | Lakatan | Dessert |
| AAA | Cavendish | Lacatan, Poyo, Williams, Grande Naine Petite Naine | Dessert |
| | Gros Michel | Gros Michel, Cocos, Highgate | Dessert |
| | Figue Rose | Figue Rose rose Figue Rose verte | Dessert |
| | Lujugira | Intutu, Mujuba | à bière, à cuire |
| | Ibota | Yangambi Km5 | Dessert |
| AB | Ney Poovan | Safet Velchi, Sukari | dessert acide |
| AAB | Figue Pomme | Maçà, Silk | dessert acide |
| | Pomme | Prata | dessert acide |
| | Mysore | Pisang Ceylan | dessert acide |
| | Pisang Kelat | Pisang Kelat | Dessert |
| | Pisang Rajah | Pisang Rajah Bulu | à cuire |
| | Plantains | French, Faux corne, corne | à cuire |
| | Popoulou | Popoulou | à cuire |
| | Laknao | Laknao | à cuire |
| | Pisang Nangka | Pisang Nangka | à cuire |
| ABB | Bluggoe | Bluggoe, Matavia, Poteau, Cacambou | à cuire |
| | Pelipita | Pelipita | à cuire |
| | Pisang Awak | Fougamou | Dessert |
| | Peyan | Peyan | à cuire |
| | Saba | Saba | à cuire |
| AAAA | | Champa Nasik | Dessert |

Annexes

Annexe 2. Souches caractérisées sur le plan moléculaire.

| Région ITS | Gène Mat | | Test de pathogénicité | Test de sensibilité | |
|---------------|----------|--------|--------------------------|---------------------|----------|
| | Mat1-1 | Mat1-2 | | RDC | Cameroun |
| RDC8 | RDC8 | RDC54 | RDC53 | RDC53 | CAM1 |
| RDC53 | RDC53 | RDC86 | RDC58 | RDC63 | CAM2 |
| RDC54 | RDC58 | RDC93 | RDC63 | RDC108 | CAM3 |
| RDC58 | RDC64 | RDC95 | RDC80 | RDC150 | CAM4 |
| RDC64 | RDC72 | RDC115 | RDC108 | RDC169 | CAM5 |
| RDC72 | RDC91 | RDC131 | RDC121 | RDC232 | CAM6 |
| RDC86 | RDC97 | RDC133 | RDC126 | RDC248 | CAM7 |
| RDC91 | RDC99 | RDC151 | RDC140 | RDC252 | CAM8 |
| RDC93 | RDC184 | RDC153 | RDC142 | RDC272 | CAM9 |
| RDC95 | RDC190 | RDC159 | RDC150 | RDC285 | CAM10 |
| RDC97 | RDC192 | RDC180 | RDC162 | RDC293 | CAM11 |
| RDC99 | RDC207 | RDC203 | RDC169 | - | CAM12 |
| RDC110 | RDC220 | RDC225 | RDC186 | - | CAM13 |
| RDC115 | RDC221 | RDC239 | RDC196 | - | CAM14 |
| RDC129 | RDC222 | RDC255 | RDC215 | - | CAM15 |
| RDC131 | RDC232 | RDC288 | RDC230 | - | CAM16 |
| RDC132 | RDC236 | RDC292 | RDC248 | - | CAM17 |
| RDC133 | RDC249 | RDC296 | RDC272 | - | CAM18 |
| RDC141 | RDC254 | - | RDC285 | - | CAM19 |
| RDC142 | RDC266 | - | RDC293 | - | CAM20 |
| RDC149 | RDC268 | - | - | - | CAM21 |
| RDC150 | RDC269 | - | - | - | CAM22 |
| RDC151 | RDC275 | - | - | - | CAM23 |
| RDC153 | RDC281 | - | - | - | CAM24 |
| RDC156 | - | - | - | - | CAM25 |
| RDC159 | - | - | - | - | CAM26 |
| RDC167 | - | - | - | - | CAM27 |
| RDC180 | - | - | - | - | CAM28 |
| RDC184 | - | - | - | - | CAM29 |
| RDC190 | - | - | - | - | CAM30 |
| RDC192 | - | - | - | - | CAM31 |

Annexes

| | | | | | |
|--------|---|---|---|---|-------|
| RDC203 | - | - | - | - | CAM32 |
| RDC207 | - | - | - | - | CAM33 |
| RDC220 | - | - | - | - | CAM34 |
| RDC221 | - | - | - | - | CAM35 |
| RDC222 | - | - | - | - | CAM36 |
| RDC225 | - | - | - | - | CAM37 |
| RDC232 | - | - | - | - | CAM38 |
| RDC236 | - | - | - | - | CAM39 |
| RDC239 | - | - | - | - | |
| RDC249 | - | - | - | - | |
| RDC254 | - | - | - | - | |
| RDC255 | - | - | - | - | |
| RDC266 | - | - | - | - | |
| RDC268 | - | - | - | - | |
| RDC269 | - | - | - | - | |
| RDC275 | - | - | - | - | |
| RDC281 | - | - | - | - | |
| RDC288 | - | - | - | - | |
| RDC292 | - | - | - | - | |
| RDC296 | - | - | - | - | |

Annexe 3. Protocole d'extraction d'ADN génomique (Lee et al., 1988).

Extraction d'ADN génomique

Lee et al. (1988)

1. Notions théoriques de la méthode

Les différentes étapes ont pour buts successifs de casser les cellules pour en faire sortir l'ADN, puis de le purifier (le séparer des protéines et des ARN).

Le SDS présent dans le tampon d'extraction est détergent et provoque la lyse des membranes et le Na₂EDTA inhibe les DNases.

La solution phénol / chloroforme : alcool iso amylique élimine les protéines et acides nucléiques insoluble

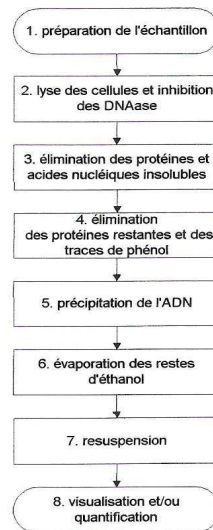
On distingue une phase aqueuse surnageante contenant les acides nucléiques en solution, une phase organique au fond du tube : phénol + lipides, et à l'interface un « gâteau » de protéines précipitées.

L'ADN est lavé par un mélange de chloroforme : alcool iso amylique (700 µl) afin d'éliminer les protéines restantes et les traces de phénol.

L'ADN se trouve en solution dans la phase aqueuse et la phase organique contient les restes de phénol, de protéine et de lipides.

L'ADN est précipité à l'aide d'éthanol 100 % glacial.

Les restes d'éthanol doivent être évaporés et le culot d'ADN resuspendu dans l'eau.



2. Mode opératoire

2.1. Matériel

Tubes 1,5 ml stériles
 Pipette automatique 200-1000µl
 Pipette automatique 50-200 µl
 Embouts 1000 µl stériles bouchés
 Embouts 200 µl stériles bouchés
 Pipettes Pasteur bouchées et stérile ou piston propre

2.2. Produits

| <i>Produits</i> | <i>N°</i> | <i>local</i> | <i>situation</i> |
|-------------------------|-----------|--------------|------------------|
| Phénol pH 7.9 | 795 | d.189 | (78) |
| Alcool iso amylique | 290 | d.189 | hotte |
| Chloroforme | 218 | d.164.10 | |
| Ethanol 100 % (glacial) | 520 | d.164.10 | |
| Tris base | 274 | d.189 | [198,199] |
| EDTA (Kerstanal 2s) | 392 | d.189 | [198,199] |
| SDS 10% | 401 | d.189 | [198,199] |
| Béta-mercapto | 230 | d.189 | hotte |
| HCl (fumant) | 215 | d.164 | |
| NaOH (perles) | 62 | d.168 | [198,199] |
| Eau milliQ | | d.168 | |

2.3. Equipement

| <i>Appareils</i> | <i>Numéros des appareils</i> |
|---|------------------------------|
| Centrifugeuse Eppendorf réfrigérée 5415R | 12 |
| Speed Vac SC 110 Savant | 14 |
| Blockthermostat BT 100 kleinfeld Labortechnik | 80 |

2.4. Préparations

2.4.1. Tampon d'extraction = tampon de lyse + béta-mercapto

| <u>Tampon de lyse :</u> | <u>Solution stock</u> |
|----------------------------|---|
| 50 mM Tris-HCl | 5 ml 1M Tris-HCl |
| 50 mM Na ₂ EDTA | 10 ml 0.5 M Na ₂ EDTA |
| 3 % SDS | 30 ml SDS 10% |
| H ₂ O | 55 ml d'H ₂ O |
| 1% béta-mercapto | 100µl dans 10 ml de tampon (à ajouter au moment de l'utilisator |

Tris-HCl à pH 7.2 / mettre à pH avec HCl fumant
 EDTA pH 8 / mettre à pH avec NaOH pellets

3.4.2. Solution Tris HCl 1M

Tris HCl 1 M pH 7,2 ou 8
MM : 121,14

Pour 500 ml de solution
1000 ml \Rightarrow 121,14 g

500 ml \Rightarrow 66,55 g 60,55 g de Tris base dans 400 ml d'H₂O milliQ. Ajuster le pH avec de l'HCl fumant (concentré). Porter à 500 ml. Autoclaver.

2.4.3. Solution Na₂EDTA 0.5 M

EDTA 0,5 M pH8
MM 372,24

500 ml de solution

1 mol \Rightarrow 372,24 g
0,5 mol \Rightarrow 186,12 g

1000 ml \Rightarrow 186,12 g
500 ml \Rightarrow 93,06 g

Dissoudre 93,06 g dans 400 ml, mettre à pH 8 avec NaOH perles. Ajuster à 500 ml. (le Na₂EDTA se dissout lorsque le pH est à 8).

2.4.4. Solution de SDS 10 %

Dissoudre 10 g de SDS dans 90 ml d'eau. Chauffer à 68°C (pas si vous autoclavez). Ajuster le volume à 100 ml.

2.4.5. Chloroforme :alcool iso amylique

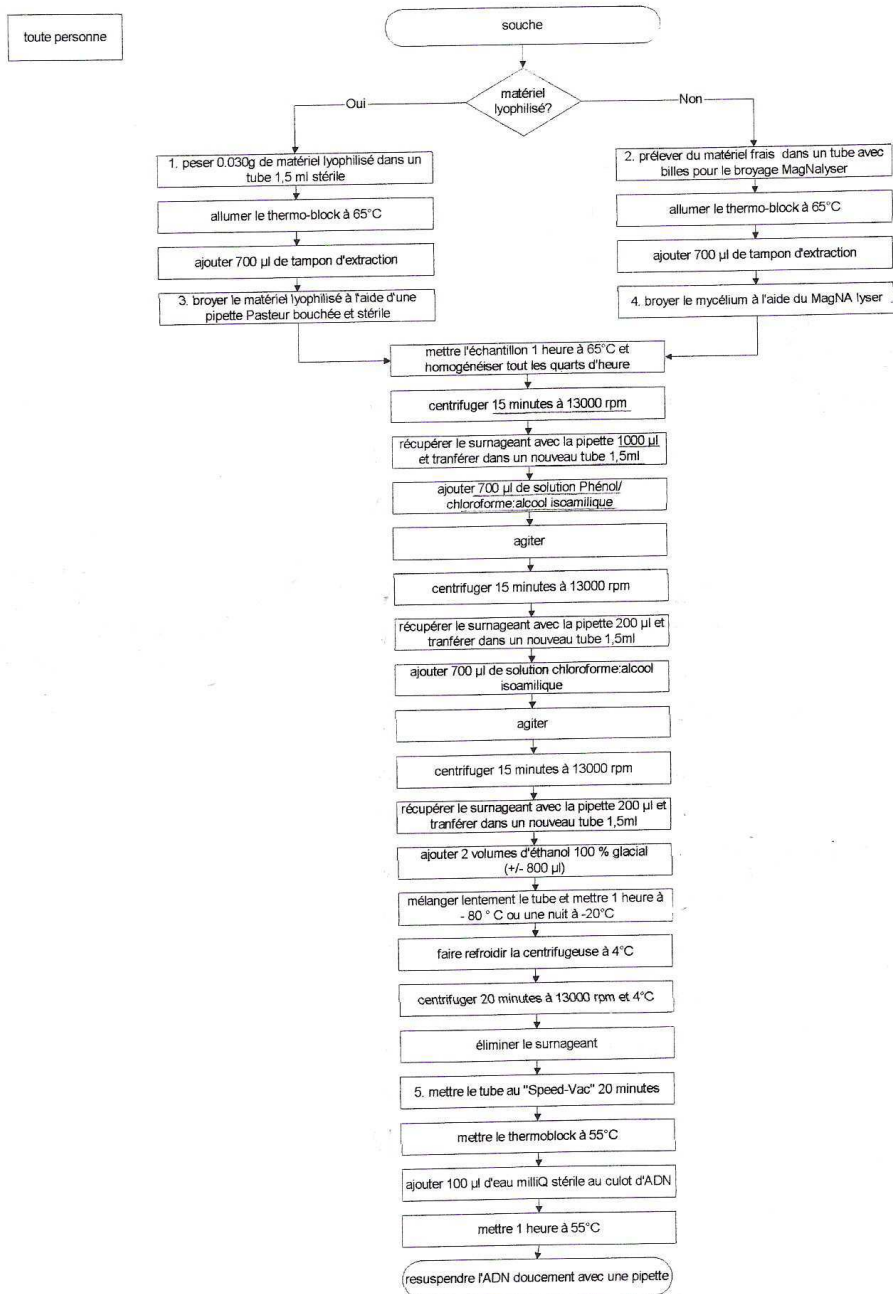
24 volume chloroforme pour 1 volume alcool iso amylique

2.4.6. Phénol / Chloroforme : alcool iso amylique

1 volume de phénol pour 1 volume de la solution Chloroforme : alcool iso amylique.

Cette solution se prépare au moment de l'utilisation.

2.5. Flowchart



Annexes

2.6. Tableau

OU : d.189

QUAND : extraction ADN génomique

| N° | ACTION |
|----|--|
| 1 | Broyer le matériel lyophilisé avant de le peser |
| 2 | Prélever le mycélium frais et le mettre dans un tube avec des billes de céramique, centrifuger 10 minutes à 13000 rpm. Eliminer le surnageant et vérifier la quantité de mycélium récolté, si celle-ci est insuffisante répéter l'opération une nouvelle fois dans le même tube. |
| 3 | Broyer à nouveau le mycélium lyophilisé dans le tampon d'extraction pour casser les cellules. La pipette Pasteur bouchée et stérile est suffisante pour broyer. |
| 4 | Voir le protocole d'utilisation du MagNalyser ci-joint |
| 5 | Voir le protocole d'utilisation du Speed-Vac ci-joint |

3. Consignes de sécurité spécifiques

Porter des gants.

Effectuer la totalité des extractions sous une hotte chimique, le bloc chauffant ainsi que la centrifugeuse se trouvant sous celle-ci.

Annexe 4. Protocole des tests de sensibilité aux fongicides en milieu liquide (FYMY).

Sensibilité aux fongicides de *Mycosphaerella graminicola*.

Test en milieu liquide (EC 50).

1) Préparation de l'inoculum.

Sortir les souches de collection et repiquer sur boîte PDA. Laisser pousser quelques jours à l'obscurité à 25°C.

Repiquer sur tube YMA incliné (Difco yeast extract 4 g, Difco malt extract 4 g, sucrose 4 g et 1 l d'eau distillée) et laisser pousser une semaine à 25°C à l'obscurité.

Ajouter 15 à 20 ml d'eau distillée + Tween 20 stérile (1 goutte/100ml) et gratter la surface du milieu avec une pipette Pasteur stérile afin de libérer les spores, filter à l'aide d'un filtre stérile (pores de 100 µm). Récolter dans un falcon de 50 ml.

Effectuer deux comptages en cellule de Thomas.

Diluer les suspensions conidiales avec de l'eau distillée stérile + tween 20 pour obtenir une concentration finale de 20 000 conidies/ml.

Conserver à 4°C à l'obscurité pendant +/- 15 h.

2) Préparation du milieu PDB + fongicides.

La veille, préparer et autoclaver du milieu PDB (Difco Potato dextrose Broth, 24 g/l eau). Prépare 2 x 350 ml pour tester 24 souches avec 2 fongicides.

Préparation des dilutions de fongicides :

- Amistar : peser 9 gouttes dans un falcon.

$$\frac{X \text{ poids (mg)}}{1.09} = Y \text{ vol (ml)} \quad (1.09 = \text{densité de l'Amistar})$$

$$\text{vol Y} \times 0.25 = \text{vol Z} \quad (0.25 \text{ est la concentration en matière active})$$

$$\frac{\text{vol Z}}{3.16 \times 4/3} = \frac{\text{vol Z}}{4.2133} = \text{vol d'eau en ml à ajouter pour obtenir une conc de 31.6 mg/l}$$

Facteur 4/3 car 150 µl PDB + 50 µl susp conid

- Tilt :

Mettre 250 µl de Tilt (densité +1) dans un falcon.

Ajouter 14.83 ml d'éthanol absolu pour obtenir une concentration de 3.16 g/l .

$$250 \times 0.25 = 62.5 \text{ ml}$$

$$\frac{62.5}{4.2133} = 14.83 \text{ ml}$$

$$4.2133$$

- Effectuer les dilutions, séparément et pour les 2 fongicides :

3.16 ml + 6.84 ml H₂O pour l'Amistar.

3.16 ml + 6.84 ml d'éthanol pour le Tilt, 8 fois de suite

= dilutions au 1/3

Placer dans 9 autres falcons

19.8 ml PDB + 0.2 ml de la dilution du fongicide.

Concentrations finales dans le milieu (PDB + susp conid) :

31.6 mg/l 10 3.16 1 0.33 0.11 0.03 0.01 0.003 mg

Annexes

Concentrations finales dans le milieu (PDB + susp conid) :

31.6 mg/l 10 3.16 1 0.33 0.11 0.03 0.01 0.003 mg

Conserver à 4°C pendant 24 h.

3) Remplissage des plaques multipuits.

Remplir les plaques multipuits (Greiner, à 96 puits) avec 150 µl de PDB contenant 1 % des dilutions de fongicides puis ajouter 50 µl de suspension conidiale à 20 000 c/ml.

Dispositif expérimental des tests en plaque multi-puits. Le blanco est le milieu non inoculé (150 µl PDB + 50 µl H₂O+Txreen 20), le témoin est inoculé mais ne contient pas de fongicides et les autres cellules correspondent aux concentrations en matière active (µg/ml). La partie supérieure (en blanc) correspond à une souche testée différente de celle dans la partie inférieure de la plaque (en gris).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco |
| B | Blanco | Témoin | Témoin | 0.003 | 0.01 | 0.03 | 0.1 | 0.3 | 1 | 3.16 | 10 | 31.6 |
| C | Blanco | Témoin | Témoin | 0.003 | 0.01 | 0.03 | 0.1 | 0.3 | 1 | 3.16 | 10 | 31.6 |
| D | Blanco | Témoin | Témoin | 0.003 | 0.01 | 0.03 | 0.1 | 0.3 | 1 | 3.16 | 10 | 31.6 |
| E | Blanco | Témoin | Témoin | 0.003 | 0.01 | 0.03 | 0.1 | 0.3 | 1 | 3.16 | 10 | 31.6 |
| F | Blanco | Témoin | Témoin | 0.003 | 0.01 | 0.03 | 0.1 | 0.3 | 1 | 3.16 | 10 | 31.6 |
| G | Blanco | Témoin | Témoin | 0.003 | 0.01 | 0.03 | 0.1 | 0.3 | 1 | 3.16 | 10 | 31.6 |
| H | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco | Blanco |

Incuber 3 jours à l'obscurité à 20°C.

4) Mesures et estimations des EC₅₀.

Après ces trois jours d'incubation, on procède à la lecture optique de l'absorbance de chaque puits à la longueur d'onde de 595nm. Un milieu blanco a permis, pour chacune des concentrations, de mesurer l'absorbance du milieu en l'absence d'inoculum.

Le pourcentage d'inhibition par rapport au témoin est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{inhibition} = 100 * [1 - (\text{absorbance} - \text{absorbance}_{\text{blanco - fongicide}}) / (\text{absorbance}_{\text{témoin}} - \text{absorbance}_{\text{blanco - témoin}})]$$

Annexe 5. Origines des souches de *M. fijiensis* isolées en RDC et du Cameroun.

| Souches | Pays | Localité | Année | Lieu d'isolement |
|----------------|-------------|-----------------|--------------|-------------------------|
| RDC58 | RDC (*) | Kisangani | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC30 | RDC (*) | Rte Yangambi | 2009 | Parcelle paysanne |
| RDC206 | RDC (*) | Kabondo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC95 | RDC (*) | Lubunga | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC292 | RDC (*) | Ile Mbiye | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC250 | RDC (*) | Mangobo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC99 | RDC (*) | Ile Mbiye | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC110 | RDC (*) | Ile Mbiye | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC113 | RDC (*) | Ile Mbiye | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC156 | RDC (*) | Masako | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC157 | RDC (*) | Masako | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC220 | RDC (*) | Makiso | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC222 | RDC (*) | Makiso | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC187 | RDC (*) | Lubunga | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC228 | RDC (*) | Ile Mbiye | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC184 | RDC (*) | Lubunga | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC121 | RDC (*) | Masako | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC177 | RDC (*) | Lubunga | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC228 | RDC (*) | Makiso | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC274 | RDC (*) | Tshopo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC123 | RDC (*) | Tshopo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC190 | RDC (*) | Kabondo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC137 | RDC (*) | Masako | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC308 | RDC (**) | Kabare | 2011 | Parcelle paysanne |
| RDC317 | RDC (**) | Kalehe | 2011 | Parcelle paysanne |
| RDC53 | RDC (*) | Kisangani | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC272 | RDC (*) | Tshopo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC248 | RDC (*) | Mangobo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC150 | RDC (*) | Kabondo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC63 | RDC (*) | Ile Mbiye | 2010 | Parcelle paysanne |

Annexes

| | | | | |
|--------|----------|-----------|------|-------------------------|
| RDC232 | RDC (*) | Makiso | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC252 | RDC (*) | Mangobo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC285 | RDC (*) | Tshopo | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC169 | RDC (*) | Masako | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC108 | RDC (*) | Ile Mbiye | 2010 | Parcelle paysanne |
| RDC293 | RDC (*) | Ile Mbiye | 2010 | Parcelle paysanne |
| CAM1 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne* |
| CAM2 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne* |
| CAM3 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne* |
| CAM5 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne" |
| CAM6 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM7 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM8 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM9 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM10 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM15 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM16 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM17 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM18 | Cameroun | Mbanga | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM19 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM20 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM21 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM22 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM23 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM24 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM25 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM26 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM27 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM28 | Cameroun | Njombé | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM29 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne" |
| CAM30 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne" |
| CAM31 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne" |
| CAM32 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne" |
| CAM33 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne" |
| CAM34 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne" |

Annexes

| | | | | |
|-------|----------|--------|------|-------------------------|
| CAM35 | Cameroun | Njombé | 2008 | Parcelle paysanne" |
| CAM36 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM37 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM38 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM39 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM40 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM41 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM42 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM43 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |
| CAM44 | Cameroun | Ekona | 2008 | Plantation industrielle |

* : Plantation paysanne sans historique d'application fongicide

" : Plantation paysanne proche des plantations industrielles

RDC (*) : Province orientale, RDC (**): Province du Sud-Kivu

Annexe 6. Valeurs des EC50 des triazoles, Strobilurines et Benzimidazoles des souches de la RDC et du Cameroun.

| N° | Souches | Valeurs EC50 | | | | |
|----|---------|--------------|------|------|------|------|
| | | Epox | Prop | Tébu | Azox | Carb |
| 1 | RDC99 | 0,03 | 0,01 | 0,03 | 2,9 | 0,01 |
| 2 | RDC110 | 0,03 | 0,01 | 0,05 | 0,7 | 0,01 |
| 3 | RDC113 | 0,03 | 0,02 | 0,03 | - | - |
| 4 | RDC288 | 0,05 | 0,02 | 0,04 | - | - |
| 5 | RDC292 | 0,06 | 0,01 | 0,03 | 3,7 | 0,02 |
| 6 | RDC190 | 0,07 | 0,02 | 0,04 | - | - |
| 7 | RDC206 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,03 | 0,2 |
| 8 | RDC308 | 0,05 | 0,01 | 0,02 | - | - |
| 9 | RDC58 | 0,08 | 0,02 | 0,04 | 5,4 | 0,2 |
| 10 | RDC317 | 0,04 | 0,01 | 0,02 | - | - |
| 11 | RDC32 | 0,05 | 0,02 | 0,03 | - | - |
| 12 | RDC174 | 0,08 | 0,03 | 0,04 | - | - |
| 13 | RDC187 | 0,06 | 0,01 | 0,03 | 3,2 | 0,01 |
| 14 | RDC177 | 0,07 | 0,02 | 0,05 | - | - |
| 15 | RDC220 | 0,04 | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,01 |
| 16 | RDC222 | 0,03 | 0,01 | 0,47 | - | - |

Annexes

| | | | | | | |
|----|--------|-------|-------|-------|-------|------|
| 17 | RDC228 | 0,03 | 0,02 | 0,03 | - | - |
| 18 | RDC250 | 0,07 | 0,02 | 0,06 | - | - |
| 19 | RDC132 | 0,11 | 0,06 | 0,1 | 4,9 | 0,2 |
| 20 | RDC121 | 0,04 | 0,02 | 0,06 | - | - |
| 21 | RDC232 | 0,1 | 0,04 | 0,03 | 4,8 | 0,07 |
| 22 | RDC156 | 0,15 | 0,25 | 0,13 | - | - |
| 23 | RDC157 | 0,17 | 0,11 | 0,18 | - | - |
| 24 | RDC308 | 0,06 | 0,01 | 0,05 | - | - |
| 25 | RDC274 | 0,05 | 0,01 | 0,03 | - | - |
| 27 | CAM1 | 0,044 | 0,027 | 0,099 | 0,081 | - |
| 28 | CAM2 | 0,024 | 0,012 | 0,046 | 0,08 | - |
| 29 | CAM3 | 0,031 | 0,011 | 0,084 | 0,162 | - |
| 30 | CAM4 | 0,12 | 0,091 | 0,303 | 0,173 | - |
| 31 | CAM5 | 0,206 | 0,334 | 0,612 | 0,226 | - |
| 32 | CAM6 | 0,493 | 0,854 | 1,152 | 0,24 | - |
| 33 | CAM7 | 0,151 | 0,175 | 0,367 | 0,087 | - |
| 34 | CAM8 | 0,05 | 0,033 | 0,083 | 0,127 | - |
| 35 | CAM9 | 0,154 | 0,204 | 0,46 | 0,104 | - |
| 36 | CAM10 | 0,028 | 0,014 | 0,051 | 0,078 | - |
| 37 | CAM11 | 0,158 | 0,23 | 0,372 | 0,073 | - |
| 38 | CAM12 | 0,118 | 0,211 | 0,36 | >31,6 | - |
| 39 | CAM13 | 1,271 | 1,037 | 1,996 | >31,6 | - |
| 40 | CAM14 | 1,697 | 1,646 | 1,84 | >31,6 | - |
| 41 | CAM15 | 0,647 | 0,921 | 0,912 | >31,6 | - |
| 42 | CAM16 | 0,874 | 2,875 | 7,013 | >31,6 | - |
| 43 | CAM17 | 0,988 | 2,194 | 4,82 | >31,6 | - |
| 44 | CAM18 | 0,23 | 0,77 | 0,788 | >31,6 | - |
| 45 | CAM19 | 0,658 | 0,99 | 1,701 | >31,6 | - |
| 46 | CAM20 | 1,168 | 2,533 | 3,376 | >31,6 | - |
| 47 | CAM21 | 0,09 | 0,038 | 0,225 | >31,6 | - |
| 48 | CAM22 | 0,101 | 0,047 | 0,16 | >31,6 | - |
| 49 | CAM23 | 0,239 | 0,286 | 0,516 | >31,6 | - |
| 50 | CAM24 | 0,291 | 0,5 | 0,735 | >31,6 | - |
| 51 | CAM25 | 0,077 | 0,038 | 0,221 | >31,6 | - |
| 52 | CAM26 | 0,003 | 0,008 | 0,051 | >31,6 | - |
| 53 | CAM27 | 0,467 | 0,951 | 1,605 | >31,6 | - |

Annexes

| | | | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 54 | CAM28 | 0,366 | 0,795 | 1,054 | 21,21 | - |
| 55 | CAM29 | 0,267 | 0,704 | 0,975 | 0,133 | - |
| 56 | CAM30 | 1,657 | 2,247 | 4,378 | >31,6 | - |
| 57 | CAM31 | 0,586 | 0,894 | 1,78 | 0,225 | - |
| 58 | CAM32 | 1,171 | 1,415 | 1,684 | 0,075 | - |
| 59 | CAM33 | 0,356 | 0,528 | 0,731 | 0,136 | - |
| 60 | CAM34 | 0,633 | 1,597 | 1,759 | 0,079 | - |
| 61 | CAM35 | 0,389 | 0,636 | 1,403 | 0,15 | - |
| 62 | CAM36 | 2,029 | 1,734 | 2,46 | 0,221 | - |
| 63 | CAM37 | 0,415 | 0,577 | 0,409 | 0,076 | - |
| 64 | CAM38 | 0,324 | 0,632 | 1,304 | 0,153 | - |
| 65 | CAM39 | 0,304 | 0,753 | 1,657 | 0,104 | - |

Epox : Epoxiconazole, Prop : Propiconazole, Tébu : Tébuconazole, Azox : Azoxystrobine, Carb : Carbendazime. Les valeurs des EC₅₀ sont calculées à partir des moyennes de pourcentage d'inhibition de 3 répétitions pour les souches de la RDC et 6 répétitions pour les souches du Cameroun, après 6 jours d'incubation.

Annexe 7. Souches isolées dans la région de Kisangani en 2009 et 2010.

| N° | Souche | Origine | Cultivar | Date isolement |
|----|------------|---------------|----------|----------------|
| 1 | CDROMUK009 | PK 10 Rte Opa | MUKU | 27/01/2009 |
| 2 | CDROMUK109 | PK 10 Rte Opa | MUKU | 4/02/2009 |
| 3 | CDROMUK209 | PK 10 Rte Opa | MUKU | 5/02/2009 |
| 4 | CDROMUK309 | PK 10 Rte Opa | MUKU | 6/02/2009 |
| 5 | CDRYMAG009 | PK 14 Rte Ybi | L. LIB. | 27/01/2009 |
| 6 | CDRYMAG109 | PK 14 Rte Ybi | L. LIB | 17/02/2009 |
| 7 | CDRYMAG209 | PK 14 Rte Ybi | L. LIB | 27/01/2009 |
| 8 | CDRYMAG309 | PK 14 Rte Ybi | L. LIB | 18/02/2009 |
| 10 | CDRYMAG409 | PK 14 Rte Ybi | L. LIB | 19/02/2009 |
| 11 | CDRULIT109 | PK 14 Rte Udu | LITETE | 10/02/2009 |

Annexes

| | | | | |
|----|-------------|---------------|-----------|------------|
| 12 | CDRULIT209 | PK 14 Rte Udu | LITETE | 11/02/2009 |
| 13 | CDRULIT309 | PK 14 Rte Udu | LITETE | 12/02/2009 |
| 14 | CDRULIT409 | PK 14 Rte Udu | LITETE | 13/02/2009 |
| 15 | CDRULIT509 | PK 14 Rte Udu | LITETE | 14/02/2009 |
| 16 | CDRULIT609 | PK 14 Rte Udu | LITETE | 15/02/2009 |
| 17 | CDRYAKO109 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 17/02/2009 |
| 18 | CDRYAKO209 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 18/02/2009 |
| 19 | CDRYAKO309 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 19/02/2009 |
| 20 | CDRYAKO409 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 20/02/2009 |
| 21 | CDRYAKO509 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 21/02/2009 |
| 22 | CDRYAKO609 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 22/02/2009 |
| 23 | CDRYAKO709 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 23/02/2009 |
| 24 | CDRYAKO809 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 24/02/2009 |
| 25 | CDRYAKO909 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 25/02/2009 |
| 26 | CDRYAKO1009 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 26/02/2009 |
| 27 | CDRYAKO1109 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 27/02/2009 |
| 28 | CDRYAKO1209 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 28/02/2009 |
| 29 | CDRYAKO1309 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 1/03/2009 |
| 30 | CDRYAKO1409 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 2/03/2009 |
| 31 | CDRYAKO1509 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 3/03/2009 |
| 32 | CDRYAKO1609 | PK 14 Rte Ybi | AKOTO | 4/03/2009 |
| 33 | CDROAMB109 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 17/02/2009 |
| 34 | CDROAMB209 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 18/02/2009 |
| 35 | CDROAMB309 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 19/02/2009 |
| 36 | CDROAMB409 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 20/02/2009 |
| 37 | CDROAMB509 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 21/02/2009 |
| 38 | CDROAMB609 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 22/02/2009 |
| 39 | CDROAMB709 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 23/02/2009 |
| 40 | CDROAMB809 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 24/02/2009 |
| 41 | CDROAMB909 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 25/02/2009 |
| 42 | CDROAMB1009 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 26/02/2009 |
| 43 | CDROAMB1109 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 27/02/2009 |
| 44 | CDROAMB1209 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 28/02/2009 |

Annexes

| | | | | |
|----|-------------|---------------|-----------|------------|
| 45 | CDROAMB1309 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 1/03/2009 |
| 46 | CDROAMB1409 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 2/03/2009 |
| 47 | CDROAMB1509 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 3/03/2009 |
| 48 | CDROAMB1609 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 4/03/2009 |
| 49 | CDROAMB1709 | PK 10 Rte Opa | LIBANGA | 24/03/2009 |
| 50 | CDROAMB1809 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 25/03/2009 |
| 51 | CDROAMB1909 | PK 10 Rte Opa | L. LIKALE | 26/03/2009 |
| 52 | CDIMGDN910 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 53 | CDKIFIR110 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 54 | CDKIFIR210 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 55 | CDKIFIR310 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 56 | CDKIFIR410 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 57 | CDKIFIR510 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 58 | CDKIFIR610 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 59 | CDKIFIR710 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 60 | CDKIFIR810 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 61 | CDKIFIR910 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 62 | CDKIFIR1010 | Kisangani | F. ROSE | 7/01/2010 |
| 63 | CDIMAMA110 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 64 | CDIMAMA210 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 65 | CDIMAMA310 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 66 | CDIMAMA410 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 67 | CDIMAMA510 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 68 | CDIMAMA610 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 69 | CDIMAMA710 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 70 | CDIMAMA810 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 71 | CDIMAMA910 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 72 | CDIMAMA1010 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 73 | CDIMAMA1110 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 74 | CDIMAMA1210 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 75 | CDIMAMA1310 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 76 | CDIMAMA1410 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 77 | CDIMAMA1510 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |

Annexes

| | | | | |
|-----|-------------|-----------|-------|------------|
| 78 | CDIMAMA1610 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 79 | CDIMAMA1710 | Ile Mbiye | AMAK. | 4/03/2010 |
| 80 | CDLUAKO110 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 81 | CDLUAKO210 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 82 | CDLUAKO310 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 83 | CDLUAKO410 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 84 | CDLUAKO510 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 85 | CDLUAKO610 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 86 | CDLUAKO710 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 87 | CDLUAKO810 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 88 | CDLUAKO910 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 89 | CDLUAKO1010 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 90 | CDLUAKO1110 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 91 | CDLUAKO1210 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 92 | CDLUAKO1310 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 93 | CDLUAKO1410 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 94 | CDLUAKO1510 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 95 | CDLUAKO1610 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 96 | CDLUAKO1710 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 97 | CDLUAKO1810 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 98 | CDLUAKO1910 | Lubunga | AKOTO | 20/02/2010 |
| 99 | CDIMAPO110 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 100 | CDIMAPO210 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 101 | CDIMAPO310 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 102 | CDIMAPO410 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 103 | CDIMAPO510 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 104 | CDIMAPO610 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 105 | CDIMAPO710 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 106 | CDIMAPO810 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 107 | CDIMAPO910 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 108 | CDIMAPO1010 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 109 | CDIMAPO1110 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 110 | CDIMAPO1210 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 111 | CDIMAPO1310 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |

Annexes

| | | | | |
|-----|-------------|-----------|-----------|-----------|
| 112 | CDIMAPO1410 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 113 | CDIMAPO1510 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 114 | CDIMAPO1610 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 115 | CDIMAPO1710 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 116 | CDIMAPO1810 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 117 | CDIMAPO1910 | Ile Mbiye | APOKA | 4/03/2010 |
| 118 | CDMSBOS110 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 119 | CDMSBOS210 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 120 | CDMSBOS310 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 121 | CDMSBOS410 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 122 | CDMSBOS510 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 123 | CDMSBOS610 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 124 | CDMSBOS710 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 125 | CDMSBOS810 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 126 | CDMSBOS910 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 127 | CDMSBOS1010 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 128 | CDMSBOS1110 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 129 | CDMSBOS1210 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 130 | CDMSBOS1310 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 131 | CDMSBOS1410 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 132 | CDMSBOS1510 | Masako | BOSUA | 4/03/2010 |
| 133 | CDKAAMB110 | Kabondo | L. LIKALE | 7/01/2010 |
| 134 | CDKAAMB210 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 135 | CDKAAMB310 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 136 | CDKAAMB410 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 137 | CDKAAMB510 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 138 | CDKAAMB610 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 139 | CDKAAMB710 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 140 | CDKAAMB810 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 141 | CDKAAMB910 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 142 | CDKAAMB1010 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 143 | CDKAAMB1110 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 144 | CDKAAMB1210 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |

Annexes

| | | | | |
|-----|-------------|---------|------------|------------|
| 145 | CDKAAMB1310 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 146 | CDKAAMB1410 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 147 | CDKAAMB1510 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 148 | CDKAAMB1610 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 149 | CDKAAMB1710 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 150 | CDKAAMB1810 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 151 | CDKAAMB1910 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 152 | CDKAAMB2010 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 153 | CDKAAMB2110 | Kabondo | L. LIKALE | 4/03/2010 |
| 154 | CDMSLIF110 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 155 | CDMSLIF210 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 156 | CDMSLIF310 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 157 | CDMSLIF410 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 158 | CDMSLIF510 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 159 | CDMSLIF610 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 160 | CDMSLIF710 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 161 | CDMSLIF810 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 162 | CDMSLIF910 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 163 | CDMSLIF1010 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 164 | CDMSLIF1110 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 165 | CDMSLIF1210 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 166 | CDMSLIF1310 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 167 | CDMSLIF1410 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 168 | CDMSLIF1510 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 169 | CDMSLIF1610 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 170 | CDMSLIF1710 | Masako | L. LIFOMBO | 20/02/2010 |
| 171 | CDLULIT110 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 172 | CDLULIT210 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 173 | CDLULIT310 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 174 | CDLULIT410 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 175 | CDLULIT510 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 176 | CDLULIT610 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 177 | CDLULIT710 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 178 | CDLULIT810 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |

Annexes

| | | | | |
|-----|-------------|---------|-----------|------------|
| 179 | CDLULIT910 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 180 | CDLULIT1010 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 181 | CDLULIT1110 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 182 | CDLULIT1210 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 183 | CDLULIT1310 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 184 | CDLULIT1410 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 185 | CDLULIT1510 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 186 | CDLULIT1610 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 187 | CDLULIT1710 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 188 | CDLULIT1810 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 189 | CDLULIT1910 | Lubunga | LITETE | 7/01/2010 |
| 190 | CDKALIK110 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 191 | CDKALIK210 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 192 | CDKALIK310 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 193 | CDKALIK410 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 194 | CDKALIK510 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 195 | CDKALIK610 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 196 | CDKALIK710 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 197 | CDKALIK810 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 198 | CDKALIK910 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 199 | CDKALIK1010 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 200 | CDKALIK1110 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 201 | CDKALIK1210 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 202 | CDKALIK1310 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 203 | CDKALIK1410 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 204 | CDKALIK1510 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 205 | CDKALIK1610 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 206 | CDKALIK1710 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 207 | CDKALIK1810 | Kabondo | L. LIKOKO | 20/02/2010 |
| 208 | CDMAMAG110 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 209 | CDMAMAG210 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 210 | CDMAMAG310 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 211 | CDMAMAG410 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |

Annexes

| | | | | |
|-----|-------------|--------|-----------|-----------|
| 212 | CDMAMAG510 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 213 | CDMAMAG610 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 214 | CDMAMAG710 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 215 | CDMAMAG810 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 216 | CDMAMAG910 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 217 | CDMAMAG1010 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 218 | CDMAMAG1110 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 219 | CDMAMAG1210 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 220 | CDMAMAG1310 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 221 | CDMAMAG1410 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 222 | CDMAMAG1510 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 223 | CDMAMAG1610 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 224 | CDMAMAG1710 | Makiso | MAGBOBA | 5/01/2010 |
| 225 | CDMATAL110 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 226 | CDMATAL210 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 227 | CDMATAL310 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 228 | CDMATAL410 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 229 | CDMATAL510 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 230 | CDMATAL610 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 231 | CDMATAL710 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 232 | CDMATAL810 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 233 | CDMATAL910 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 234 | CDMATAL1010 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 235 | CDMATAL1110 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 236 | CDMATAL1210 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 237 | CDMATAL1310 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 238 | CDMATAL1410 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 239 | CDMATAL1510 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 240 | CDMATAL1610 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 241 | CDMATAL1710 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 242 | CDMATAL1810 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 243 | CDMATAL1910 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 244 | CDMATAL2010 | Makiso | TALA LOLA | 7/01/2010 |
| 245 | CDMSBIS109 | Masako | BISAMUNYO | 9/10/2009 |

Annexes

| | | | | |
|-----|-------------|---------|-----------|-----------|
| 246 | CDMGBIS210 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 247 | CDMGBIS310 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 248 | CDMGBIS410 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 249 | CDMGBIS510 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 250 | CDMGBIS610 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 251 | CDMGBIS710 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 252 | CDMGBIS810 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 253 | CDMGBIS910 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 254 | CDMGBIS1010 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 255 | CDMGBIS1110 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 256 | CDMGBIS1210 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 257 | CDMGBIS1310 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 258 | CDMGBIS1410 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 259 | CDMGBIS1510 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 260 | CDMGBIS1610 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 261 | CDMGBIS1710 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 262 | CDMGBIS1810 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 263 | CDMGBIS1910 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 264 | CDMGBIS2010 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 265 | CDMGBIS2110 | Mangobo | BISAMUNYO | 5/01/2010 |
| 266 | CDTSGRM110 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 267 | CDTSGRM210 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 268 | CDTSGRM310 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 269 | CDTSGRM410 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 270 | CDTSGRM510 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 271 | CDTSGRM610 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 272 | CDTSGRM710 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 273 | CDTSGRM810 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 274 | CDTSGRM910 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 275 | CDTSGRM1010 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 276 | CDTSGRM1110 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 277 | CDTSGRM1210 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 278 | CDTSGRM1310 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |

Annexes

| | | | | |
|-----|-------------|-----------|-----------|-----------|
| 279 | CDTSGRM1410 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 280 | CDTSGRM1510 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 281 | CDTSGRM1610 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 282 | CDTSGRM1710 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 283 | CDTSGRM1810 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 284 | CDTSGRM1910 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 285 | CDTSGRM2010 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 286 | CDTSGRM2110 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 287 | CDTSGRM2210 | Tshopo | G. MICHEL | 5/01/2010 |
| 288 | CDIMGDN110 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 289 | CDIMGDN210 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 290 | CDIMGDN310 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 291 | CDIMGDN410 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 292 | CDIMGDN510 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 293 | CDIMGDN610 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 294 | CDIMGDN710 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 295 | CDIMGDN810 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |
| 296 | CDIMGDN910 | Ile Mbiye | G. NAINE | 4/03/2010 |

Annexe 8. Conditions climatiques au cours de la période d'essai en 2010.

| Année | 2010 | | | | |
|----------|-------|-------|-------|------------|-----------|
| | T°C | | | P° (mm) | HR (%) |
| | Tmax. | Tmin. | Tmoy. | | |
| Janvier* | 33,4 | 20,4 | 26,9 | 0,9 | 78,9 |
| Février* | 32,7 | 21,1 | 26,9 | 55 | 83 |
| Mars* | 33,4 | 21,5 | 27,5 | 68,9 | 81 |
| Avril** | 32,3 | 21,7 | 27 | 199,8 | 61 |
| Mai** | 32,9 | 22 | 27,5 | 153,6 | 81 |
| Juin* | 30,8 | 21 | 25,9 | 175,4 | 82 |
| Juillet* | 33 | 20,6 | 26,8 | 71,4 | 84 |

Annexes

| | | | | | |
|-------------|------|------|------|-------|----|
| Août** | 30,7 | 20,6 | 25,7 | 41,4 | 84 |
| Septembre** | 30,7 | 20,5 | 25,6 | 83,8 | 83 |
| Octobre** | 31,2 | 20,6 | 25,9 | 252,6 | 82 |
| Novembre** | 31,5 | 20,4 | 26 | 159,6 | 83 |
| Décembre* | 31,9 | 20 | 26 | 38,4 | 82 |

T°C : Température (en °C) ; Tmax. : Température maximale ; Tmin. : Température minimale, P° : Précipitations (en mm) ; HR : Humidité relative ; * : Saison subsèche ; ** : Saison de pluies. Source : Station MASAKO de la Faculté des sciences UNIKIS.

Annexe 9. Conditions climatiques au cours de la période d'essai en en 2012.

| Année | 2012 | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|------------|-----------|
| | T°C | | | P° (mm) | HR (%) |
| | Tmax. | Tmin. | Tmoy. | | |
| Janvier* | 32,6 | 19,9 | 26,3 | 0,23 | 81 |
| Février* | 32,4 | 20,4 | 26,4 | 106 | 79 |
| Mars* | 32,8 | 20,8 | 26,8 | 92,4 | 80 |
| Avril** | 33,2 | 21,0 | 33,2 | 41 | 81 |
| Mai** | 31,4 | 20,7 | 26,1 | 90,8 | 81 |
| Juin* | - | - | - | - | - |
| Juillet* | - | - | - | - | - |
| Août** | - | - | - | - | - |
| Septembre** | - | - | - | - | - |
| Octobre** | - | - | - | - | - |
| Novembre** | - | - | - | - | - |
| Décembre* | - | - | - | - | - |

T°C : Température (en °C) ; Tmax. : Température maximale ; Tmin. : Température minimale, P° : Précipitations (en mm) ; HR : Humidité relative ; * : Saison subsèche ; ** : Saison de pluies. Source : Station MASAKO de la Faculté des sciences UNIKIS.