

INOCULATION AVEC *Mycosphaerella* sp., AGENT DE CERCOSPORIOSES, DE FRAGMENTS DE FEUILLES DE BANANIERS MAINTENUS EN SURVIE

Catherine Abadie, Luc Pignolet, Abdelbasset Elhadrami, Rémy Habas, Marie-Françoise Zapater et Jean Carlier.¹

Les bananiers, cultivés dans plus de 120 pays de la zone tropicale, constituent une base alimentaire majeure pour plus de 400 millions de personnes. Les cercosporioses, maladies foliaires graves dues à *Mycosphaerella fijiensis* ou *M. musicola*, affectent la totalité des zones de culture et sont considérées comme une des contraintes majeures pour les productions bananières. Bien qu'efficace, l'utilisation de fongicides est polluante, non durable (apparition de résistance) et inaccessible pour les petits producteurs. Ainsi, l'utilisation de variétés résistantes est considérée comme le moyen de lutte le plus approprié et le plus durable. Un test miniature d'interaction Bananier/*Mycosphaerella* a été mis au point afin d'étudier la résistance des bananiers et la variabilité du pouvoir pathogène.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal

1.1.a. Culture des bananiers

Les bananiers sont cultivés en conditions contrôlées pendant 6 mois, à 80% environ d'humidité relative, une température ambiante de 26 à 28°C et une photopériode de 12h sous lumière blanche d'intensité variant de 40 à 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ils sont issus de vitroplants qui sont sevrés après un traitement des racines dans un bain de benlate à 3g/l pendant 10 mn dans du terreau (Nehauss n° 9) en godets de 0.25 l puis après 1.5 mois en pot de 1 litre. A l'issue de 3 mois de culture en cellule de sevrage, les bananiers sont transplantés dans des pots de 5 litres contenant un mélange de terreau Nehauss n° 9 et de pouzzolane (3 à 5mm de granulométrie) selon une proportion 3/1. Pendant ces phases de culture, des applications d'engrais liquide (Hortal à 1g/l) et solide (2 gr de granulés d'Osmocote N10 P11 K18/ pot de 5l) sont réalisées régulièrement (tous les 3 semaines environ) et en alternance. Des traitements insecticides et acaricides sont appliqués en cours de culture si nécessaire.

Les bananiers doivent être dans des conditions physiologiques optimales avant le prélèvement de feuilles.

1.1.b. Mise en survie des fragments foliaires

Les deux plus jeunes feuilles déployées sont coupées au niveau du pétiole et déposées dans un récipient d'eau. Les deux faces des feuilles sont nettoyées à l'aide d'un coton imbibé d'eau stérile. Des carrés foliaires de 6 cm de côté sont découpés sur une plaque de verre, à l'aide d'un modèle plastique rigide et d'un scalpel tranchant.

Ces carrés sont déposés sur un milieu de survie (4g d'agar, 50 ppm de benzimidazole –Sigma B-9131-, 1l d'eau distillée) dans des boîtes de Pétri carrées ou rondes (diamètre 100 mm), la face supérieure contre le milieu de culture. Les fragments foliaires sont plaqués sur le milieu de culture à l'aide des pochoirs plastiques préalablement stérilisés et dégageant une fenêtre de 5 cm de côté.

¹ CIRAD, UMR BGPI, TA 41/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

1.2. Préparation de l'inoculum conidien

1.2.a. Préparation des cultures

Les isolats, conservés à -80°C dans une solution de glycérol à 15 %, sont après décongélation mis en croissance en boîte de Pétri sur du milieu PDA (39 g/l de potato dextrose agar additionné de 200 ppm de sulfate de streptomycine) pendant 10 jours à 25°C et une photopériode de 12h. Environ 5 implants mycéliens sont transférés sur du milieu V8 300 (300 ml de jus de légumes V8, 3g de CaCO_3 , 20 g d'agar, 700 ml eau ; 100 UI de pénicilline et 100 μg de streptomycine sont amendés par ml de milieu après autoclavage) et incubés pendant une dizaine de jours à 25°C et une photopériode de 12h.

1.2.b. Mise en sporulation

Environ 5 implants mycéliens prélevés dans les cultures de V8 300 sont mis en suspension dans un tube conique contenant 20 ml d'eau stérile, puis sont fractionnés à l'aide d'une sonde à ultrason (diamètre 3 mm) pendant 1 mn à une puissance de 80W.

Deux ml environ de la solution obtenue sont versés dans des boîtes de Pétri (diamètre 90 mm) contenant du milieu V8 sporulation (100 ml de jus de légumes V8, 0.2g de CaCO_3 , 20 g d'agar, 900 ml eau amendés des mêmes antibiotiques que le milieu V8 300). Les boîtes sont scellées et incubées à 20°C en lumière continue (d'intensité égale à 60 à 65 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 14 jours.

1.2.c. Préparation des suspensions conidiennes

L'inoculum est préparé par récupération des conidies produites à la surface du milieu V8 sporulation. Pour cela, après avoir versé 3 à 5 ml d'eau stérile par boîte, la surface de la culture est grattée légèrement (pour éviter la récupération de fragments mycéliens) à l'aide d'une spatule stérile. Cette suspension est titrée au microscope à l'aide d'une cellule de Malassez à raison de 3 comptages minimum. Des dilutions sont réalisées afin d'obtenir des suspensions conidiennes concentrées généralement à 3000 conidies/ml de suspension.

1.3. Inoculation et incubation

Les suspensions conidiennes sont soit déposées sous forme de goutte de 3 μl (à raison de 4 gouttes réparties régulièrement sur chaque fragment foliaire), soit pulvérisées sur la totalité de la surface foliaire. La pulvérisation est réalisée à l'aide d'un aérographe (Badger air-brush n°150-1-M) relié à un compresseur délivrant une pression d'air de l'ordre de 1,5 kg.cm^2 . Un ml de suspension conidienne est pulvérisé sous forme de très fines gouttes (buse de 0.2 mm de diamètre) verticalement à une distance de 40 cm du fragment foliaire. Ces conditions permettent de répartir de façon homogène l'inoculum sur toute la surface foliaire de 25 cm^2 .

Les boîtes de pétri contenant les fragments foliaires inoculés sont scellées avec du cellophane et mises en incubation dans une cellule climatique à 25°C dont le niveau d'éclairage (tubes Sylvania blancs et Grolux violets) est de 4000 Lux, la photopériode de 12h et une circulation d'air à fort taux de brassage (assurés par 2 ventilateurs centrifuges) pour éviter la production de condensation à l'intérieur des boîtes de Pétri.

1.4. Observations

Les lésions, typiques des cercosporioses des bananiers apparaissent 3 semaines après inoculation (photo 1). Un dénombrement des lésions est réalisé sur chaque fragment foliaire, chaque semaine pendant 8 à 10 semaines. Selon la même fréquence, la taille de 5 lésions choisies au hasard sur le fragment sera déterminée visuellement à l'aide d'un calibre

millimétré. En cas d'inoculation par goutte, seule la surface des lésions produites au point d'inoculation sera suivie.

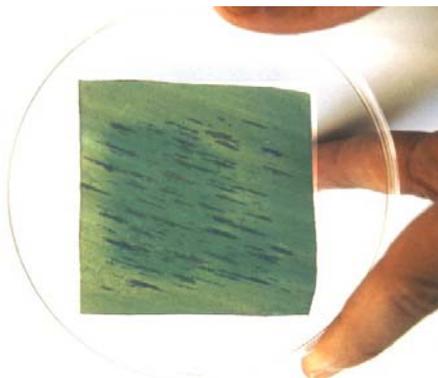


photo 1 : Symptômes de la maladie des raies noires obtenus sur un fragment de feuille de bananier sensible à la maladie, 49 jours après inoculation.

1.5. Interprétation des résultats

Les cinétiques d'évolution du nombre et de la surface des lésions permettent de déduire différents paramètres : le nombre maximum et la surface maximum des lésions (valeurs du plateau des cinétiques), la durée d'incubation 50 (permettant d'atteindre 50% du nombre maximum de lésions) et la vitesse d'extension des lésions. Les 2 derniers paramètres sont calculés après linéarisation des courbes d'évolution.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

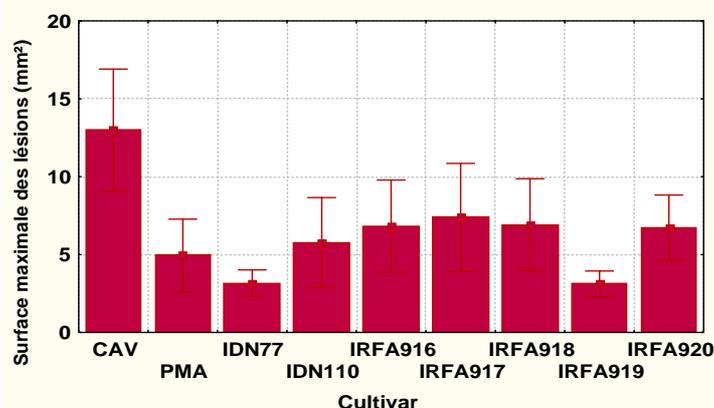


Figure 1 : Evaluation de la résistance à *M. fijiensis* de 5 hybrides. Surface maximale des lésions obtenue par inoculation en condition contrôlées (moyenne sur 3 isolats)

L'analyse des résultats dépend de l'objectif de l'étude. Dans le cas de la recherche de composantes de résistance partielle, l'analyse des résultats portera sur l'ensemble des paramètres observés. La surface maximale des lésions est le paramètre principal dans les études de sensibilité variétale. Une surface moyenne des lésions inférieure à celle obtenue sur le témoin sensible exprimera le caractère de résistance pour la variété évaluée. Dans une évaluation vis-à-vis de la maladie des raies noires, la taille des lésions était 2 à 3 fois plus petite pour des géniteurs résistants (PMA, IDN77 et IDN110) et les hybrides créés (à partir de ces géniteurs) en comparaison avec le génotype sensible –CAV– (figure 1). Ces résultats

montrent également la transmission des caractères de résistance. Pour les études de variabilité du pouvoir pathogène, l'inoculation est réalisée sous forme de goutte et seule la surface des lésions produites au point d'inoculation est comparée entre les différents isolats.

3. CONCLUSION

Cette méthode d'inoculation permet de reproduire le développement des symptômes dans les cas d'interactions compatibles et incompatibles, qui est similaire à celui observé en conditions naturelles d'infestation.

Cette méthode permet d'acquérir différents types d'informations portant sur l'évaluation de la résistance des bananiers (composantes de résistance partielle, sources de résistance, recherche de QTL de résistance), le niveau de sensibilité de nouvelles variétés (sélection variétale) ainsi que sur la variabilité du pouvoir pathogène et l'évolution des populations pathogènes (durabilité des résistances).