

**AFPP - 8^{ème} CONFERENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS - 5 ET 6 DECEMBRE 2006**

**LA LUTTE CHIMIQUE RAISONNEE CONTRE LA MALADIE DES RAIES NOIRES DES
BANANIERES AU CAMEROUN : EVOLUTION DE LA RESISTANCE AUX FONGICIDES**

J. ESSOH NGANDO¹, L. DE LAPEYRE DE BELLAIRE^{1,2}, E. FOURÉ²

1/CARBAP, Centre Africain de Recherches sur les Bananiers et Plantains, Centre de recherches de Njombé, Bureau de liaison BP 832, Douala, Cameroun.

2/CIRAD, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. Unité de recherches "Systèmes de cultures bananes, plantains et ananas.

RESUME

La maladie des raies noires (MRN) est une des principales contraintes parasitaires des plantations agro-industrielles de bananes desserts dans le monde. Cette maladie foliaire est provoquée par un champignon ascomycète *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. En absence de cultivars résistants les pertes dues à ce champignon peuvent varier de 10 à 100% en plantation industrielle. Au Cameroun, à la fin des années 80, une méthode d'avertissement biologique s'appuyant sur l'utilisation en alternance de fongicides systémiques a permis un bon contrôle de la MRN, avec 12-14 applications par an. Dès 1996, diverses contraintes ont entraîné l'utilisation abusive de ces fongicides, provoquant ainsi le développement de phénomènes de résistances. Cette situation a entraîné l'augmentation rapide du nombre de traitements. Ainsi, en 2005, 40 à 50 traitements ont été effectués sur la plupart des plantations avec des fongicides de contact dont l'utilisation massive peut avoir des conséquences négatives sur l'environnement et la santé. De nouvelles stratégies de traitements doivent être aujourd'hui redéfinies pour gérer le développement spatial et temporel de la résistance aux fongicides systémiques.

Mots clés : bananiers, maladie des raies noires, *Mycosphaerella fijiensis*, lutte chimique, résistance fongicide.

SUMMARY

**CHEMICAL CONTROL OF BANANA BLACK LEAF STREAK DISEASE IN CAMEROON:
EVOLUTION OF FUNGICIDE RESISTANCE**

Black Leaf Streak Disease (BLS) is one of the major constraint in commercial plantations of banana. Disease is caused by a fungus ascomycete called *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. In these plantations, because of lack of resistant varieties, the losses can attend about 10 to 100%. In Cameroon, by the end of 80 years, a forecasting method using alternatively systemic fungicides was successfully use for disease control limiting to 12-14 application per year. Around 1996, there was development of resistance due to the abusive use of chemicals related to some many constraints. This situation involved increasing of treatment number from 12-14 to 40-50 applications in 2005 with protectant fungicide which massive utilisation lead negative environmental and sanitary consequences. Today, some new strategies should be redefine to the spatial and temporal management of resistance development.

Key words : bananas, Black Leaf Streak Disease, *Mycosphaerella fijiensis*, chemical control, fungicide resistance.

INTRODUCTION

La maladie de raies noires (MRN ou cercosporiose noire) se caractérise par des nécroses foliaires provoquées par un champignon ascomycète *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Cette maladie a une incidence directe sur la réduction de l'activité photosynthétique. Si aucun traitement n'est fait, elle peut entraîner une baisse importante de rendement pouvant aller jusqu'à 100% de pertes dans le cas de bananes desserts destinées à l'exportation (Cohan *et al.*, 2002). Toutefois, l'effet le plus important de la maladie est son incidence indirecte sur la réduction de la durée de vie verte des fruits, les rendant ainsi inexportables (Stover, 1974). Cette maladie foliaire constitue une contrainte majeure dans la plupart des systèmes de production dans le monde. Elle est particulièrement importante dans les plantations industrielles puisque les variétés cultivées sont la grande naine appartenant au sous-groupe cavendish particulièrement sensible à la maladie (Fouré *et al.*, 1990). Son contrôle nécessite l'emploi de quantités plus ou moins importantes de fongicides sur des grandes surfaces au moyen de traitements aériens.

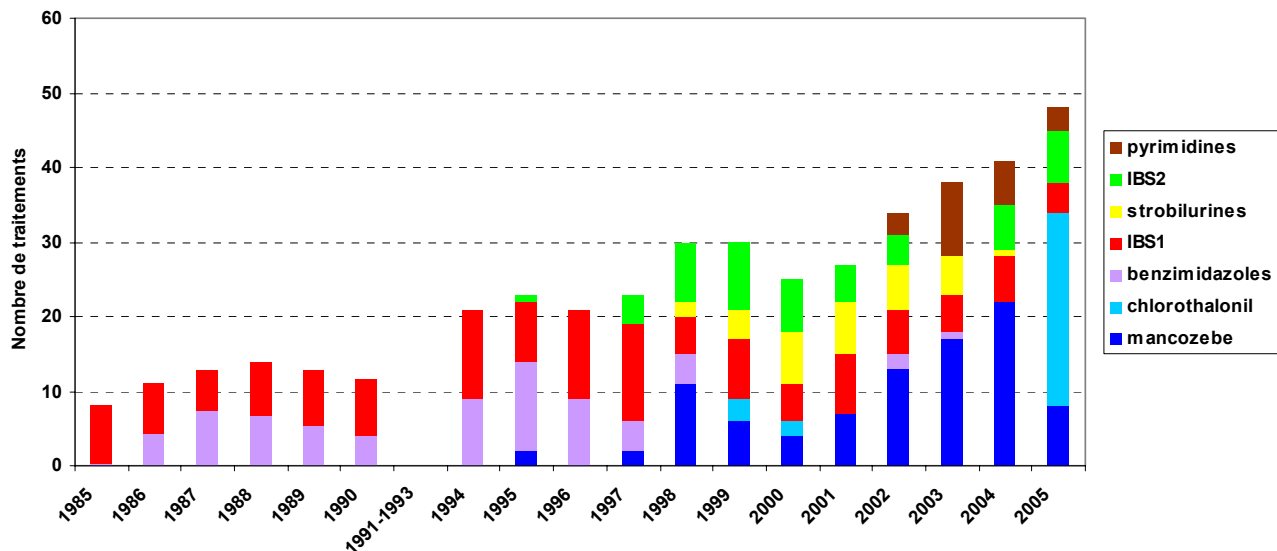
Dans la plupart des zones de production du monde, les traitements fongicides sont systématiquement appliqués suivant un programme établi à l'avance (Marin *et al.*, 2003), avec alors dans certains cas 40 à 50 traitements par an. Dans d'autres situations, un système d'avertissement basé sur des descripteurs biologiques a été établi et les traitements peuvent être déclenchés en fonction de l'état d'évolution de la maladie, ce qui permet de limiter le nombre de traitements à 12 ou 14 interventions par an. Trois types de fongicides différents : les fongicides de contact, les fongicides pénétrants et les fongicides systémiques. Les fongicides de contact (mancozèbe et chlorothalonil) sont compatibles avec la première stratégie de lutte et ceux-ci ont un effet préventif, tandis que les fongicides systémiques ont un fort effet curatif nécessaire à la stratégie d'avertissement. Parmi les fongicides systémiques on distingue les antimétabolites (benzimidazoles), les inhibiteurs de biosynthèse des stéroïdes du groupe 1 (triazoles), et du groupe 2 (morpholines) et les inhibiteurs de la respiration cellulaire (strobilurines). La plupart de ces fongicides peuvent être utilisés en émulsion dans l'huile, laquelle a un effet fongistatique et améliore l'étalement et la pénétration du produit sur les feuilles des bananiers. Enfin dans les stratégies de traitement, les fongicides systémiques sont utilisés en alternance ou en mélange, ceci dépend des conditions climatiques, de la sensibilité des populations de *M. fijiensis* et de la stratégie appliquée.

Au Cameroun, *M. fijiensis* a été signalé la première fois en 1981 (Fouré, 1984). A l'heure actuelle, la lutte contre la MRN représente le poste le plus élevé du coût de production dans les plantations industrielles. Elle peut atteindre jusqu'à 10% du coût de production (soit 37 Euro/tonne). Dans le département du Moungo, le contexte épidémiologique est particulièrement favorable entre les mois d'avril à novembre. C'est dans ce département que sont localisées les plus grandes superficies de plantations industrielles au Cameroun. À la fin des années 80, une méthode d'avertissement basée sur l'utilisation de descripteurs biologiques (Fouré, 1988) a permis de contrôler de façon satisfaisante la maladie avec seulement 12-14 applications par an avec des fongicides systémiques (figure 1). L'utilisation abusive de ces fongicides, a entraîné dès 1996 l'apparition puis la généralisation des résistances contre ces fongicides. La conséquence directe est qu'à partir de 2001, on a assisté à une augmentation progressive du nombre de traitements avec des fongicides de contact. Ainsi en 2005, 40 à 50 traitements ont été réalisés dans la plupart des plantations industrielles, avec des proportions de 90% de fongicides de contact contre seulement 10% de fongicides systémiques et pénétrants (figure 1). Ces changements de stratégies se sont traduits par une augmentation des coûts, mais surtout par une augmentation des nuisances environnementales. Ainsi les quantités de matière active par hectare a été multiplié par un facteur de 30 à 40.

L'objectif de la présente communication est de présenter un panorama de l'évolution de la sensibilité de *M. fijiensis* aux fongicides utilisés dans le cadre de la lutte contre la MRN dans les plantations industrielles au Cameroun. Pour ce faire, les niveaux de sensibilité ont été

évalués par des monitorings régulièrement réalisés dans plusieurs secteurs des plantations industrielles du Cameroun.

Figure 1: historique de la lutte contre la MRN au Cameroun / history of control of BLSD in Cameroon



METHODOLOGIE

Des monitorings de routine sont régulièrement réalisés dans les plantations industrielles depuis 1985 pour détecter toute dérive de sensibilité des populations de *M. fijiensis* aux fongicides systémiques. Cette méthode est un test de germination des ascospores projetées sur un milieu de culture gélosé (agar-agar) amendé ou non avec le fongicide à une concentration spécifique.

Elle commence par le prélèvement au champ de lésions de la maladie des raies noires au stade 6 (nécrotique) de leur évolution (Fouré, 1982) sur 20 à 25 bananiers d'une même parcelle. En moyenne deux fois par an, les échantillons sont collectés dans les mêmes secteurs de plantation pour suivre dans le temps l'évolution de la sensibilité aux fongicides en un lieu donné.

Au laboratoire, les échantillons sont ensuite mis en incubation à 25°C dans des sachets plastiques humidifiés pendant 48 heures pour stimuler la maturation des périthèces. Quatre à 5 fragments de nécroses sont découpés en carreaux de 1cm² et agrafés sur un disque de papier filtre de 90mm de diamètre. Les disques sont ensuite trempés dans de l'eau distillée pendant 10 minutes pour stimuler la décharge des ascospores, puis déposés dans le couvercle d'une boîte de Pétri, au dessous d'un milieu gélosé (agar-agar) amendé ou pas avec le fongicide à une concentration spécifique. Les spores sont projetées sur le milieu de culture pendant trois heures, et les boîtes sont mises en incubation pendant 48 heures. Les spores ayant germés sur le milieu sont repérées à la loupe binoculaire et les mensurations et les comptages sont faits au microscope optique muni d'une règle micrométrique.

EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX INHIBITEURS DE BIOSYNTHESE DE L'ERGOSTEROL DU GROUPE 1 (TRIAZOLES)

Ces fongicides inhibent la biosynthèse de l'ergostérol, un composant majeur de la membrane cellulaire des champignons, en bloquant la 14 α -déméthylase. L'action de ces fongicides sur la germination se traduit par une inhibition plus ou moins importante du tube germinatif. La sensibilité aux triazoles a été évaluée à la concentration de 0.1 ppm, et la longueur du tube germinatif de 50 ascospores a été mesurée à l'aide d'une réglette

micrométrique. Ainsi, des mesures ont été effectuées sur les ascospores germées sur le milieu agar simple (témoin de référence) (Lc) et sur le milieu amendé avec le fongicide (Lf). Le pourcentage d'inhibition de croissance (%Ia) a été calculé à partir de la formule ci dessous, et la proportion des ascospores dans différentes classes d'inhibition a été aussi déterminée. Par ailleurs, le pourcentage des ascospores réparties dans les classes correspondant à celles des populations de zones non traitées (%Ia > 50) a été calculé. Les données ont été collectées dans les mêmes plantations industrielles de Njombé de 1996 à 2005.

$$\% I_a = (1 - Lf/Lc) \times 100$$

EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX STROBILURINES

Ces fongicides inhibent la respiration cellulaire à cause de leur affinité avec le cytochrome b. La résistance est conférée par la mutation d'une base d'un gène mitochondrial qui code pour le cytochrome b. Cette mutation est responsable d'un changement d'un acide aminé (glycine aniline) à la position 143, qui abouti a une perte d'affinité entre la matière active du fongicide et le cytochrome b (Sierotzki et al., 2000). La sensibilité à l'azoxystrobine a été évaluée à la concentration de 1 ppm, et la longueur du tube germinatif de 50 ascospores a été mesurée à l'aide d'une réglette micrométrique sur le control (témoin de référence) (Lc) et sur le milieu amendé avec le fongicide (Lf). Le pourcentage d'inhibition de croissance (%Ia) a été calculé à partir de la formule ci dessus, et la proportion des ascospores dans différentes classes d'inhibition a été aussi déterminée. Par ailleurs, le pourcentage des ascospores réparties dans les classes correspondant à celles des populations des zones non traitées (%Ia > 70) a été calculé. Il a par ailleurs été démontré que des souches ayant une inhibition des croissance > 70% peuvent être considérées comme sensibles à l'azoxystrobine (Amil et al., 2002). Cette molécule a été introduite dans les programmes de traitements en 2001, et les données ont été collectées dans une même plantation industrielle de 2001 à 2005.

EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIMITOTIQUES

Ces fongicides bloquent le fonctionnement du fuseau achromatique indispensable pour la division cellulaire. La sensibilité au benomyl ou au méthyl-thiophanate a été évaluée à la concentration de 5 ppm, et 100 ascospores ont été observées. Celles ayant des tubes germinatifs tordus ou non germés sont considérées comme souches sensibles et celles avec des tubes germinatifs normaux sont considérées comme résistantes. La proportion des souches résistantes a alors été calculée. Les données collectées proviennent d'une même plantation industrielle, de 1993 à 2004.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESISTANCE AUX INHIBITEURS DE BIOSYNTHESE DES STEROLS DU GROUPE1 (TRIAZOLES)

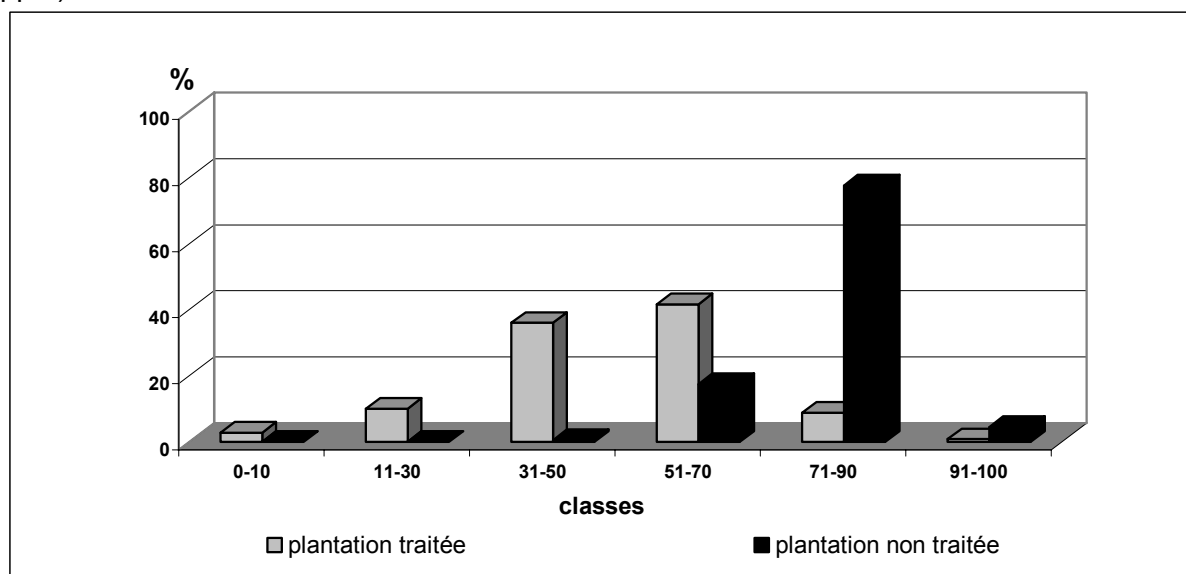
D'une façon générale, depuis 1996 la moyenne du pourcentage d'inhibition de croissance dans les plantations industrielles a souvent été au dessus de 50%, et toujours inférieur à celle mesurée dans les plantations non traitées (tableau 1). Ces pourcentages ont connu quelques fluctuations saisonnières considérables au cours desquelles on a observé les plus faibles valeurs, soit 42% en mai 1998 et 45% en octobre 2003. En fin 2004, pour le fongicide propiconazole (0.1 ppm), la répartition des spores en classes d'inhibition de croissance a montré que dans les plantations traitées, on dénombrait 49% de spores réparties dans les classes d'inhibition supérieures à 50%, tandis que dans ces mêmes classes, on avait pu dénombrier 78% de spores dans les plantations non traitées (figure 2). Ceci indique une perte d'efficacité de ce fongicide, vis à vis des souches de *M fijiensis*.

Tableau I : Evolution de la résistance au propiconazole (Tilt) en plantation industrielle de Njombé / Evolution of fungicide resistance to propiconazole (Tilt) in a commercial banana plantation located in Njombé (0.1 ppm propiconazole)

Date	moyenne IC* en plantation industrielle	moyenne IC en plantation non traitée	% ascospores avec IC > 50% en plantation industrielle	% ascospores avec IC > 50% en plantation non traitée
10/1996	61	-	-	-
05/1997	61	-	-	-
10/1997	70	-	-	-
04/1998	54	72	56	-
01/1999	49	-	50	-
01/2000	61	73	80	-
10/2000	61	73	90	100
07/2001	30	78	17	100
01/2002	56	76	60	100
01/2003	49	74	63	100
09/2003	52	72	30	100
05/2004	54	83	52	100
01/2005	61	84	72	100

*IC : inhibition de croissance

Figure 2 : Répartition des spores en classes d'inhibition de croissance en fin 2004 / distribution of spores in growth inhibition classes at the end of 2004 (propiconazole à 0.1 ppm)



Notons cependant que tous les fongicides appartenant à la classe des triazoles ne sont pas affectés de manière identique par cette perte de sensibilité. En effet, la mesure du niveau de sensibilité sur un même site a montré que la dérive de sensibilité était importante pour le fluzilazole (figure 4), moyenne pour le propiconazole et le tebuconazole (figure 2 et 3) et faible pour le difenoconazole (figure 5).

Tableau II : récapitulatif des résultats obtenus avec les différents triazoles analysés / Results from different triazoles analysed (0,1 ppm)

Plantation traitée	% inhibition de croissance	longueur filaments germinatifs (µm)	Classes d'inhibition de croissance						% spores dans classe > 50 %
			0-10	11-30	31-50	51-70	71-90	91-100	
Tilt (propiconazole)	49	105	0	10	36	42	9	1	52
Echantillon paysan	78	43	0	0	0	18	78	5	100
Folicur (tébuconazole)	53	101	4	8	34	36	13	4	53
Echantillon paysan	-	-	0	0	0	7	81	12	100
Punch (fluzilazole)	38	125	6	22	44	25	2	0	27
Echantillon paysan	77	42	0	0	0	33	66	1	100
Sico (difénoconazole)	67	66	0	1	11	37	51	0	88
Echantillon paysan	-	-	0	0	0	13	78	9	100

Figure 3: Répartition des spores en classes d'inhibition de croissance en fin 2004 / distribution of spores inside growth inhibition classes at end of 2004 (tébuconazole at 0.1 ppm)

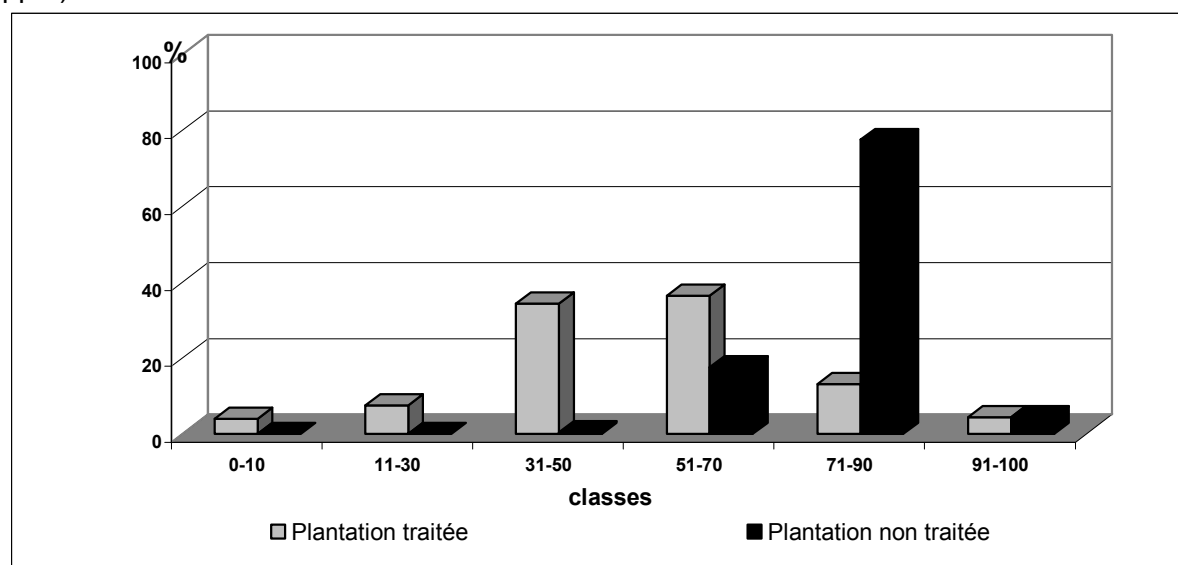


Figure 4 : Répartition des spores en classes d'inhibition de croissance en fin 2004 / distribution of spores in growth inhibition classes at end of 2004 (fluzilazole à 0.1 ppm)

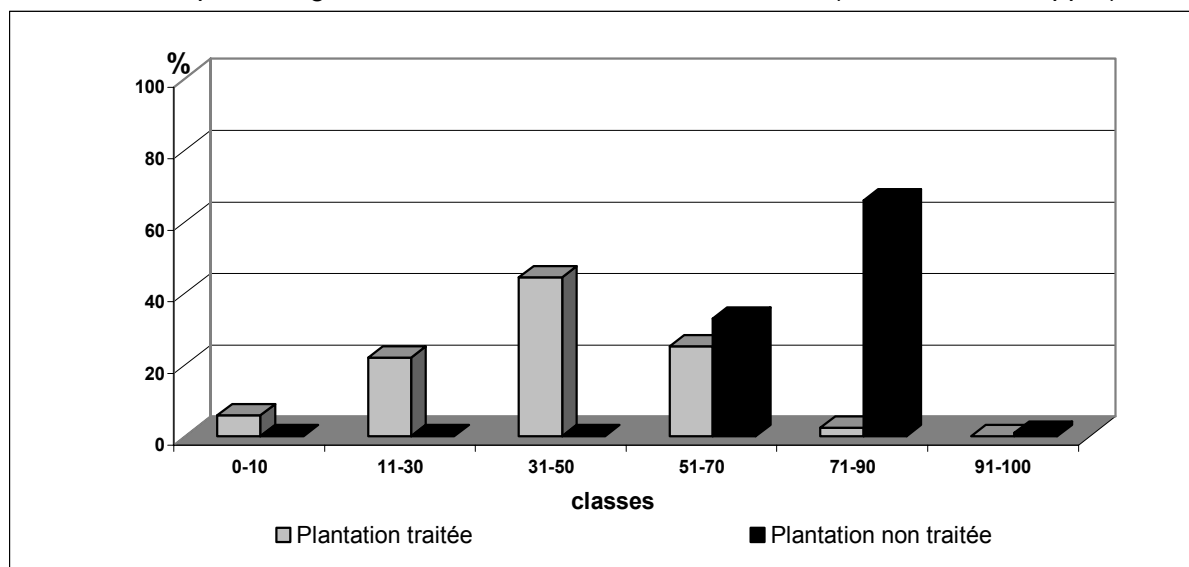
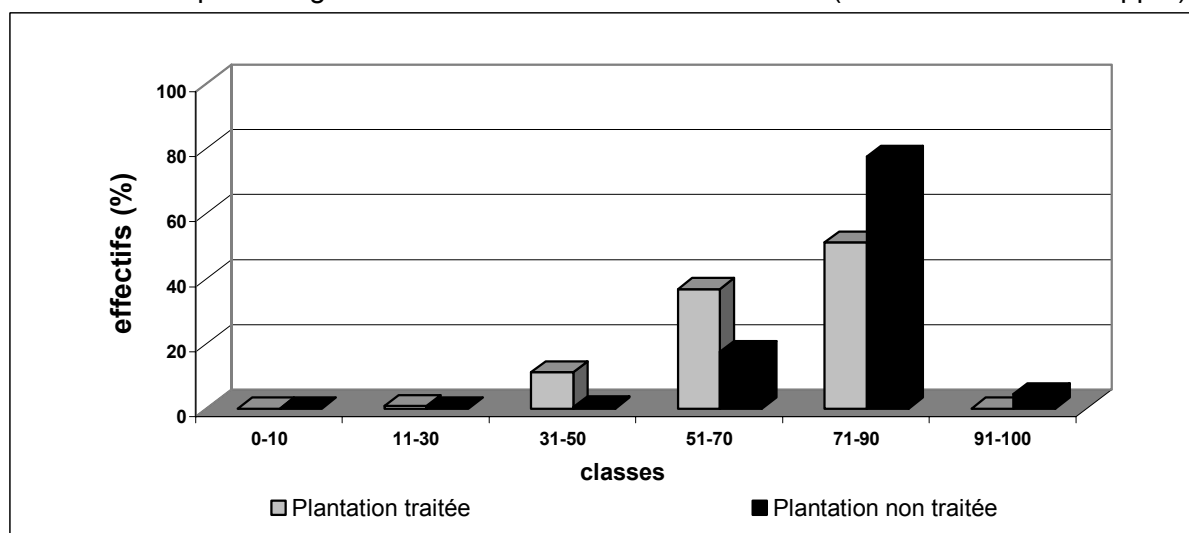


Figure 5 : Répartition des spores en classes d'inhibition de croissance en fin 2004 / distribution of spores in growth inhibition classes at end of 2004 (difenoconazole à 0.1 ppm)



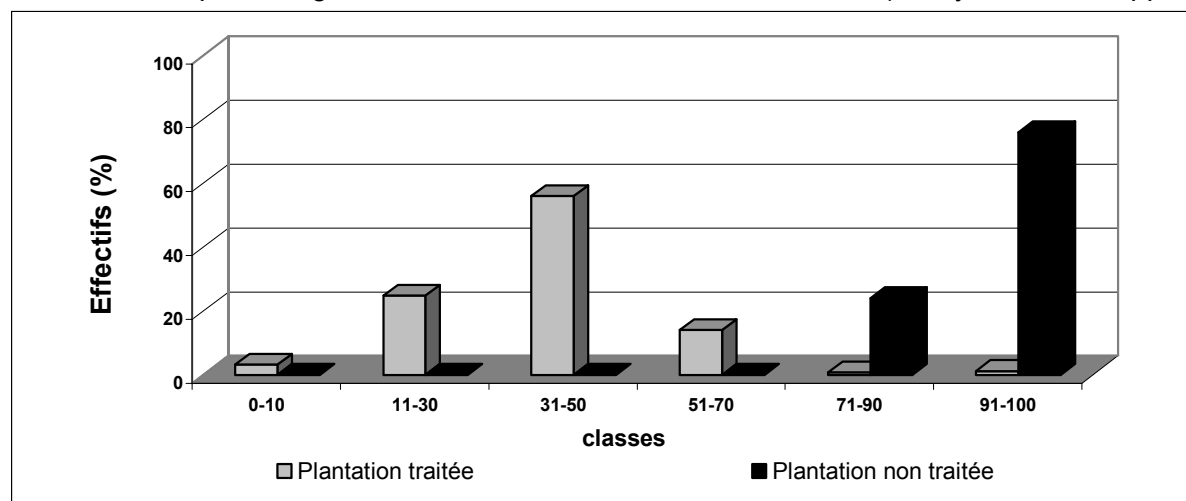
RESISTANCE AUX STROBILURINES

Ces fongicides ont été introduits dans les plantations industrielles en 2001 (figure 1 et tableau III). Trois ans seulement après leur introduction (octobre 2003) on a noté une dérive importante de la sensibilité des populations de *M. fijiensis* à ces fongicides avec une moyenne de pourcentage d'inhibition égale à 46% (tableau III). En fin 2004, la distribution des spores dans les classes d'inhibition de croissance montre que la quasi-totalité des spores sont présentes dans les classes des souches résistantes (figure 6). Cependant, on a constaté que cette perte de sensibilité était tout de même sujette à des fluctuations saisonnières, en octobre 2003 on a mesuré 46% d'inhibition de croissance et en mai 2004 on a enregistré 74% (tableau III). Les récents monitorings réalisés en fin 2005 montrent une importante diminution de la résistance des souches dans les plantations traitées.

Tableau III: Evolution de la résistance à l'azoxystrobine (Bankit) en plantation industrielle de Mbanga / Evolution of fungicide resistance to azoxystrobine (Bankit) in a commercial banana plantation located in Mbanga (1 ppm azoxystrobine)

Date	moyenne IC* en plantation industrielle	moyenne IC en plantation non traitée	% ascospores avec IC > 70% en plantation industrielle	% ascospores avec IC > 70% en plantation non traitée
08/2001	90	100	100	100
09/2003	96	98	100	100
04/2004	86	95	74	100
10/2004	34	98	2	100
06/2005	41	97	23	100
11/2005	81	96	73	100

Figure 6: Répartition des spores en classes d'inhibition de croissance en fin 2004 / distribution of spores in growth inhibition classes at the end of 2004 (azoxystrobine à 1 ppm)



RESISTANCE AUX ANTIMITOTIQUES

Les premières souches résistantes ont été détectées en 1996 dans les plantations industrielles. Au cours des premières années, cette résistance était localisée dans quelques secteurs de plantations, elle s'est ensuite généralisée avec des fréquences atteignant parfois 51% de résistance en septembre 2002 (tableau IV). Les souches résistantes n'ont jamais été observées dans les plantations non traitées. Lors des derniers monitorings, on a remarqué une légère diminution de la proportion des souches résistantes.

Tableau IV : Evolution de la résistance au benomyl ou methyl-thiophanate (Benlate ou Callis) en plantation industrielle de Njombé / Evolution of fungicide resistance to benomyl or methyl-thiophanate (Benlate or Callis) in a commercial banana plantation located in Njombe

Années	% souches résistantes en plantation industrielle (Min-Max)	% souches résistantes en plantation non traitée
1993	0	0
1994	0	0
1995	0	0
1996	15 (0-60)	0
1997	22	0
1998	46	0
2000	18 (14-21)	0
2002	52 (33-71)	0
2003	56	0
2004	37	0

CONCLUSION

La résistance aux triazoles est soumise à des fluctuations. Elle varie aussi entre les différents produits mis sur le marché. Le FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) recommande un maximum de 8 applications de triazoles par an en alternance. Le CARBAP qui assure un suivi régulier de la situation de la résistance dans les plantations industrielles recommande quant à lui de limiter au maximum l'emploi de ces fongicides avec une préférence donnée pour le difenoconazole car il est le fongicide le moins affecté par la dérive de sensibilité. Compte tenu des fluctuations dans le niveau de sensibilité des populations de *M. fijiensis* aux triazoles on peut se poser la question de savoir si cette résistance est totalement réversible. Est il possible de retrouver des niveaux de sensibilité compatibles avec une réintroduction de ces fongicides dans les stratégies de lutte contre la MRN ?

La résistance aux strobilurines s'est fortement développée dans le Moungo. Ces fongicides sont des produits très fragiles. Les recommandations du FRAC limitent l'usage des strobilurines à 4 applications par an. Compte tenu de la généralisation de la résistance, il est maintenant recommandé d'écarter toute utilisation de ce produit. La question de la réversibilité de la résistance à ces fongicides se pose également.

La résistance aux antimétabolites est généralisée dans la zone du Moungo avec des proportions différentes. Cette résistance est supposée stable, mais on a pu observer des fluctuations au cours du temps. Deux mécanismes sont à même d'expliquer ces fluctuations :

- (i) une perte de compétitivité des souches résistantes par rapport aux souches sensibles. De tels mécanismes ont déjà été observé pour les triazoles
- (ii) des flux de gènes entre les zones traitées et les zones non traitées

en effet, la présence importante du bananier plantain cultivés selon les itinéraires techniques extensifs (pas de traitements fongicides), dans l'environnement proche des plantations industrielles, est à même de générer des flux de gènes favorisant l'introgression des souches sauvages (sensibles).

Références bibliographiques

- Amil, A., Cook, A., Stanger, C., Knight, S., Wirz, M., and Shaw, M. 2002. Las dinamicas de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a estrobilurinas (Qol's) en Costa Rica. In Proceedings of XVth Reunion of the ACORBAT. Medellin, Colombia, 27 oct-2 nov 2002. p. 158- 162.
- Bureau E. 1990. Adaptation d'un système d'avertissement à la lutte contre la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plantation de banane plantain au Panama. *Fruits*, 45, 329-338.
- Cohan, J.P., Fouré, E., Mouliom-Pefoura, A., et Abadie, C. 2002. Stratégies de lutte contre la Maladies des Raies Noires du bananier au Cameroun. Méthodes de l'avertissement biologique. Document CARBAP, 266, p2.
- de Lapeyre de Bellaire L., Mourichon X., Ganry J. 2000. Forecasting less fungicide for Sigatoka disease in Guadeloupe. *Biocontrol News and Information*, 21, 3, p. 68N-69N.
- Fouré, E. (1982) Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etudes de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (Maladie des Raies Noires): Incubation et évolution de la maladie. *Fruits* 37, 12, 749-759.
- Fouré E. 1984. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *M. fijiensis* Morelet et de quelques caractéristiques biologiques de la maladie au Gabon. *Fruits*, 39, 365-378.
- Fouré E. 1988. Stratégies de lutte contre la cercosporiose noire des bananiers et plantains provoquée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. L'avertissement biologique au Cameroun. Evaluation des possibilités d'évaluation. *Fruits*, 43, 269-274.
- Fouré E., Mouliom-Pefoura A., et Mourichon X. 1990. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *M. fijiensis* Morelet au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant à divers groupes génétiques. *Fruits*, 45, 339-345.
- Fouré E., Moreau A. 1992. Contribution à l'étude épidémiologique de la cercosporiose noire dans la zone de Mounjo au Cameroun de 1987 à 1989. *Fruits*, 47, 3-16.
- 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.
- Stover, R.H. 1974. Effect of measured levels of Sigatoka disease of bananas on fruit quality and leaf senescence. *Tropical agriculture*, 51, 531-542.