

Note technique

Méthode de surveillance des populations de *Mycosphaella musicola*, devenant plus ou moins résistantes aux fongicides utilisés dans les bananeraies martiniquaises.

Johanna VAN DEN BERG-LORIDAT*

METHOD FOR MONITORING POPULATIONS OF *MYCOSPHAERELLA MUSICOLA*, WHICH ARE BECOMING MORE OR LESS RESISTANT TO THE FUNGICIDES USED ON BANANAS IN MARTINIQUE.

Johanna VAN DEN BERG-LORIDAT.

Fruits, Nov. 1989, vol. 44, n° 11, p. 599-602.

ABSTRACT - With the use of fungicides of the benzimidazol group, populations of *Mycosphaerella musicola* which are resistant to this group have been observed for several years.

By using a quick simple technique, which consists of observing germination of the conidia on Petri dishes containing agar with different concentrations of fungicides, the development of resistant populations in the banana plantations in Martinique can be monitored.

METHODE DE SURVEILLANCE DES POPULATIONS DE *MYCOSPHAERELLA MUSICOLA*, DEVENANT PLUS OU MOINS RESISTANTES AUX FONGICIDES UTILISES DANS LES BANANERAIES MARTINIQUAISES.

Johanna VAN DEN BERG-LORIDAT

Fruits, Nov. 1989, vol. 44, n° 11, p. 599-602.

RESUME - Depuis plusieurs années, avec l'utilisation de fongicides du groupe des benzimidazoles, on a observé l'apparition de populations de *Mycosphaerella musicola* résistantes à ce groupe.

Une technique simple et rapide, par observation de la germination de conidies sur boîtes de Pétri gélosées et enrichies en diverses concentrations de fongicides, permet la surveillance de l'évolution des populations résistantes dans les bananeraies de Martinique.

La Cercosporiose causée par *Mycosphaerella musicola* (LEACH) est parmi les maladies foliaires la plus importante du bananier en zone tropicale (STOVER, 1972). Actuellement cette espèce est remplacée par *M. fijiensis* (MORELET) dans le Pacifique et dans plusieurs pays d'Afrique et d'Amérique latine (STOVER et SIMMONDS, 1987). Dans les îles de la Caraïbe, cette espèce n'est toujours pas présente (à l'exception de la Jamaïque) et *M. musicola* y reste donc le principal agent de la Cercosporiose du bananier.

Aux Antilles françaises, la lutte chimique contre la Cercosporiose est menée avec des fongicides dits systémiques. Ils sont appliqués, en mélange dans une huile minérale, sur avertissement biologique et climatique (GANRY et LAVILLE, 1983). Plusieurs groupes différents de matières actives sont utilisés : les triazoles et les morpholines (qui sont des Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stéroïdes, I.B.S.) et les benzimidazoles.

Avec l'introduction des fongicides systémiques dans l'agriculture, des phénomènes de résistance se sont rapidement manifestés, notamment en ce qui concerne les benzi-

midazoles (DEKKER, 1982). C'est le cas aux Antilles à partir des années 1980 pour les traitements aux benzimidazoles appliqués aux bananiers dès 1971 (BUREAU *et al.*, 1982).

La pérennité d'emploi et l'efficacité de ces produits, très performants à l'origine, sont dès lors soumises au contrôle de l'évolution du niveau de sensibilité de l'agent pathogène. Ce contrôle, devrait être effectué dès les premières applications du produit afin de connaître toute modification de la sensibilité initiale.

Plusieurs méthodes peuvent être mises en oeuvre pour effectuer un tel suivi. Toutes sont basées sur la confrontation, en conditions contrôlées, du fongicide et du champignon dont on observe le développement. Ces méthodes sont fonction du champignon et de la matière active mis en cause (GEORGOPOULOS, 1982). Elles permettent d'évaluer le niveau de résistance et éventuellement, en fonction de la représentativité de l'échantillon, du pourcentage d'individus résistants dans la population.

Concernant *M. musicola* et les benzimidazoles, trois méthodes ont été pratiquées :

* - IRFA/CIRAD - B.P. 153 - 97202 FORT DE FRANCE CEDEX

Germination des ascospores.

Cette méthode qui consiste à faire germer des ascospores sur milieu gélosé amendé par le fongicide est la plus utilisée. Elle a été standardisée pour mesurer la résistance de *Mycosphaerella* spp. aux benzimidazoles (JACOME, 1981) et de *M. fijiensis* aux I.B.S. (Anonyme, 1987). Il s'agit d'une technique bien adaptée aux *Mycosphaerella* si leur sporulation sexuée est abondante.

Le principe consiste à stimuler la projection d'ascospores à partir des nécroses foliaires sur un milieu gélosé amendé ou non avec le fongicide. On observe ensuite leurs germinations.

Croissance des colonies.

Cette méthode a été particulièrement utilisée en Guadeloupe (BUREAU *et al.*, 1982). Les souches sont obtenues par projection d'ascospores, puis isolement monospore. Les colonies isolées sont placées sur milieu gélosé avec et sans fongicide. On observe ensuite leur croissance.

Germination des conidies.

Cette méthode a été utilisée dans les Windward Islands par CRONSHAW (1984). Les conidies utilisées proviennent de symptômes au stade 4 définis par BRUN (1963). Elles sont étalées sur de la gélose amendée ou non avec le fongicide en frottant un fragment de feuille présentant une tache sporulante. On observe ensuite leurs germinations.

Pour évaluer la résistance présente de *M. musicola* aux fongicides, la première méthode a deux inconvénients majeurs :

- la production d'ascospores de *M. musicola* est souvent très faible. On risque d'effectuer des tests sans obtenir des résultats significatifs ;
- d'autres espèces de *Mycosphaerella* (*M. minima*, *M. musae* et *M. spp.*) se développent sur les nécroses de la Cercosporiose et projettent de nombreuses ascospores très semblables à celles de *M. musicola*. Cela rend la lecture difficile et peut conduire à des erreurs.

Ces problèmes sont moins aigus pour *M. fijiensis* qui, souvent produit des ascospores en abondance et dont les nécroses sont peu polluées par d'autres *Mycosphaerella*.

La deuxième méthode est laborieuse et peu rapide à cause de la croissance très lente du champignon. La faible production d'ascospores est à nouveau un inconvénient.

La troisième méthode semble être la mieux adaptée à la biologie de *M. musicola* dont la production conidienne est abondante tout au long de l'année. Chaque tache, issue de la pénétration d'une spore peut, en effet, compter plusieurs sporodochies avec chacune une centaine de conidiophores (MEREDITH, 1970).

C'est cette technique que nous avons choisi d'améliorer pour observer l'évolution de la résistance de *M. musicola* aux benzimidazoles dans un premier temps, puis éven-

tuellement aux I.B.S.

Les adaptations effectuées ont porté sur la standardisation de la production des conidies, sur la technique d'étalement des conidies afin de limiter les pollutions bactériennes et sur l'utilisation des conidies d'une même tache étalées sur toute la gamme de concentration du fongicide. Les conidies issues d'une même tache par sporulation asexuée sont probablement génétiquement identiques, et peuvent donc être considérées comme une seule souche.

PROTOCOLE DU TEST

Préparation du milieu gélosé.

Le milieu gélosé est préparé en incorporant 20 g d'Agar-Agar par litre d'eau. Après autoclavage, le fongicide sous forme d'une solution mère est mélangé à la gélose qui sera coulée en boîte de Pétri (diamètre 9 cm).

Pour des tests de résistance aux benzimidazoles, deux solutions mères sont préparées à 10 000 et 100 µg de bénomyl/ml d'alcool (meilleure solubilité que dans l'eau). Pour des tests de résistance aux I.B.S., les solutions mères sont préparées dans de l'eau stérile (10 000 et 100 µg de tridemorphe/ml pour les morpholines, 10 000, 100 et 10 µg de propiconazole/ml pour les triazoles).

La dose de solution mère mélangée dans la gélose est ajoutée en fonction de la concentration finale désirée (1, 10, 50 et 100 µg de bénomyl/ml ; 0,05 à 100 µg de propiconazole/ml et 0,5 à 100 µg de tridemorphe/ml).

De la streptomycine (200 µg/ml) peut également être ajoutée après autoclavage afin de diminuer la pollution bactérienne. Le témoin est préparé de façon identique mais sans fongicide.

Prélèvement des feuilles au champ.

Dix à quinze feuilles sont prélevées par bananeraie en fonction de l'hétérogénéité et de la taille de la parcelle. Chaque feuille échantillonnée présente au moins 20 taches au stade 4. Le prélèvement sera effectué au moins un mois après le dernier traitement fongicide efficace.

Production des conidies.

Par feuille, 20 taches au stade 4 sont prélevées et placées, face supérieure vers le haut, en boîte de Pétri. Les taches sont alors mouillées afin qu'un filet d'eau les recouvre en surface. Les boîtes sont mises à incuber pendant 24 à 48 h à température ambiante.

Etalement des conidies.

Pour chaque feuille (10 à 15 par parcelle), 6 à 10 taches sporulantes sont sélectionnées au stéréomicroscope. Les conidies d'une même tache sont prélevées avec une pipette Pasteur boutonnée et étalées sur autant de boîtes de Pétri que de concentrations testées. Pour ce dernier point, il est important que chaque tache sélectionnée ait pu produi-

re suffisamment de conidies. Cela souligne l'importance des sélections effectuées sur les feuilles au champ et les taches avant incubation.

Chaque boîte de Pétri (une concentration) est divisée en 32 secteurs bien délimités, ce qui permet l'étalement de 32 souches (conidies provenant de 32 taches différentes).

Observations de la germination et interprétation.

Les observations sont réalisées au microscope (100 x) pour chaque secteur des boîtes de Pétri.

Test de résistance aux benzimidazoles.

Trois types de germination des conidies peuvent être distingués (S, R et PR). La germination des conidies sensibles (S) est affectée et se traduit par la formation d'un tube germinatif très court et en forme de crochet. Les conidies résistantes (R) germent sur le milieu amendé au benomyl comme sur la gélose pure. Les conidies partiellement résistantes (PR) forment des tubes germinatifs non déformés mais dont la croissance est réduite par rapport au témoin.

Par échantillon (parcelle) on calcule, pour chaque concentration de fongicide, le pourcentage de secteur (taches/souches) ayant des conidies sensibles, partiellement résistantes ou résistantes. On obtient ainsi la fréquence de souches résistantes et leur niveau de résistance à partir de 60 à 150 souches isolées par parcelle.

Test de résistance aux I.B.S.

Les IBS réduisent la croissance mais ne déforment pas les tubes germinatifs. C'est donc la longueur des tubes germinatifs qui est prise en compte.

On mesure par secteur le plus long tube germinatif (il peut y avoir plusieurs tubes par conidies) de trois conidies représentatives (conidies de taille normale). La longueur moyenne obtenue par secteur, sur chaque concentration, est ensuite comparée avec la moyenne du témoin (60 à 150 souches sont analysées par parcelle, soit 900 à 2 250 mensurations effectuées). Les concentrations inhibitrices provoquant 50 p. 100 et 90 p. 100 de réduction de croissance (C. I 50 et C. I 90) peuvent être calculées et sont ensuite comparées à celles des souches dites sauvages (sensibilité initiale).

CONCLUSION

Cette technique permet donc de suivre en toute saison l'évolution de la sensibilité de populations significatives de *M. musicola*, vis-à-vis des benzimidazoles, mais également des I.B.S. (morpholines et triazoles). Elle permet par sa rapidité (4 jours), d'effectuer le choix des matières actives lors de l'élaboration d'une stratégie de lutte.

Le suivi individuel du niveau de résistance de chaque souche sur une gamme de concentrations permet d'appréhender précocement toute modification de sensibilité dans la population. Du point de vue des études plus fondamentales les souches ayant acquis un certain degré de résistance peuvent être facilement repérées et isolées pour être étudiées de façon plus approfondie.

Cette méthode permet d'établir un calendrier d'utilisation des benzimidazoles pour des bananeraies où la résistance aux benzimidazoles existe déjà.

Elle va également permettre de connaître la sensibilité initiale de *M. musicola* aux I.B.S. et de suivre de très près toute modification de cette sensibilité afin de prendre les mesures nécessaires pour essayer de retarder un développement de résistance aux I.B.S.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme. 1987.
Method for sensitivity monitoring of *Mycosphaerella fijiensis* towards D.M.I. fungicides.
Miami meeting on use strategies for D.M.I. fungicides in bananas between D.M.I. manufacturers and banana companies. September 15-17, 1987.
- BRUN (J.). 1963.
La cercosporiose du bananier en Guinée.
Thèse de Doctorat es Sciences, IFAC, Paris, 196 p.
- BUREAU (E.), GANRY (J.), ZAPATER (M.F.) et LAVILLE (E.). 1982.
Les cercosporioses du bananier et leurs traitements.
Evolution des populations pathogènes.
Distribution géographique et évolution des populations de *Mycosphaerella musicola* résistantes aux benzimidazoles dans les zones bananières de Guadeloupe.
Fruits, 37 (11), 665-672.
- CRONSHAW (K.). 1984.
Monitoring of Sigatoka disease (*Mycosphaerella musicola* LEACH ex MULDER) in the Windward Islands for tolerance to fungicides.
Tropical Pest Management (UK), 30 (3), 225-229.
- DEKKER (J.). 1982.
Introduction. Fungicide resistance in crop protection.
Ed. Dekker (J.) and Georgopoulos (S.G.), Pudoc, Wageningen, The Netherlands, 1-6.
- GANRY (J.) et LAVILLE (E.). 1983.
Les cercosporioses du bananier et leurs traitements.
Evolution des méthodes de traitement.
Fruits, 38 (1), 3-20.
- GEORGOPOULOS (S.G.). 1982.
Detection and measurement of fungicide resistance.
Fungicide resistance in crop protection.
Ed. Dekker (J.) and Georgopoulos (S.G.), Pudoc Wageningen, The Netherlands, 24-31.
- JACOME (L.). 1981.
Standardized technique for monitoring tolerance of *Mycosphaerella* spp. to Benlate (Benomyl).
Tropical Research, La Lima, Honduras, dec. 1981.
- MEREDITH (D.S.). 1970.
Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* (LEACH).
Phytopathological papers, n° 11, C.A.B. England, 147 p.
- STOVER (R.H.). 1972.
Banana, plantain and Abaca diseases.
C.M.I. Kew, Surrey, England, 316 p.

BEAUFICHTIGUNGSMETHODE FÜR POPULATIONEN VON MYCOSPHAERELLA MUSICOLA, DIE GEGEN FUNGIZIDE, WIE SIE IN DEN BANANENPLANTAGEN VON MARTINIQUE EINGESETZT WERDEN, MEHR ODER MINDER RESISTENT WERDEN.

Johanna VAN DER BERG-LORIDAT.

Fruits, Nov. 1989, vol. 44, n° 11, p. 599-602.

KURZFASSUNG - Im Zuge des Einsatzes von Fungiziden der Benzimidazol-Gruppe hat man seit mehreren Jahren das Auftreten von benzimidazolresistenten M.m.-Populationen beobachtet.

Diese Populationen der Bananenplantagen von Martinique lassen sich anhand eines einfachen und schnellen Verfahrens beobachten : Beobachtung der Keimung von Konidien in Petri-Schalen, die mit Agar-Agar und verschiedenen Fungizidkonzentrationen angereichert sind.

METODO DE VIGILANCIA DE LAS POBLACIONES DE MYCOSPHAERELLA MUSICOLA, CONVIRTIENDOSE EN MAS O MENOS RESISTENTES A LOS FUNGICIDAS UTILIZADOS EN LOS PLATANALES MARTINIQUESES.

Johanna VAN DER BERG-LORIDAT.

Fruits, Nov. 1989, vol. 44, n° 11, p. 599-602.

RESUMEN - Desde hace varios años, con la utilización de fungicidas del grupo de los benzimidazoles, se ha observado la aparición de poblaciones de *Mycosphaerella musicola* resistentes a este grupo.

Una técnica simple y rápida, por observación de la germinación de conidias en cajas de Pétri gelosadas y enriquecidas en diversas concentraciones de fungicidas, permite la vigilancia de la evolución de las poblaciones resistentes en los platanales de Martinica.



COMMUNIQUE DE PRESSE

Le numéro 1 de 1989 de la revue AGRITROP vient de paraître.

Cette revue éditée par le CIRAD change de formule, puisqu'elle devient trimestrielle et comporte un comité de rédaction élargi à des organismes français et étrangers travaillant dans le domaine de l'agriculture et du développement rural des régions chaudes.

Deux éditions (français, anglais) sont disponibles.

Ce premier numéro recense plus de 400 articles, études, thèses, ouvrages et rapports provenant de chercheurs francophones, et propose pour chacun d'eux un résumé analytique. Un article original sur le cacaoyer (recommandations de l'IRCC pour la culture du cacaoyer) y est inclus.

Cette revue est vendue par abonnement annuel (4 numéros) au prix de 400 F (France, Europe, Afrique) et 470 F (autres pays). Les commandes et demandes de spécimen doivent être adressées à :

CIRAD-CIDARC - AGRITROP - B. P. 5035 - 34032 MONTPELLIER CEDEX 01 - France.