

METHODE D'EVALUATION DES BANANIERES VIS-A-VIS DES MALADIES DE CONSERVATION INDUITES PAR LE *Colletotrichum musae* (BERK. & CURT.) ARX

Luc de Lapeyre de Bellaire¹, Marc Chillet¹, Yolande Chilin-Charles¹

Les maladies de conservation (anthracnose de blessure, anthracnose de quiescence, pourritures de couronnes) sont des facteurs qui limitent fortement la commercialisation des bananes exportées. Le *Colletotrichum musae* est à l'origine des deux formes d'anthracnose, tandis qu'un complexe parasitaire plus important est impliqué dans les pourritures de couronnes : *C. musae*, mais aussi d'autres espèces parmi lesquelles des *Fusarium*, des *Verticillium*, des *Botryodiplodia*. La sensibilité à ces maladies est variable en fonction des zones de production, mais aussi en fonction du stade de maturité des fruits, et la lutte est essentiellement chimique. Les variétés de bananiers cultivées pour l'exportation, sont triploïdes et généralement fortement stériles. Ceci complique les schémas d'amélioration génétique et peu de produits issus de l'amélioration ont été diffusés à ce jour. Par le passé, les objectifs des programmes d'amélioration génétique des bananiers ont essentiellement concerné l'obtention de variétés résistantes aux cercosporioses des bananiers et à la maladie de Panama. Aujourd'hui, les caractères relatifs à la qualité des fruits sont intégrés dans les programmes d'amélioration.

1. MATERIEL ET METHODES

L'évaluation des comportements variétaux est basée sur des inoculations artificielles avec le *Colletotrichum musae* pour les deux formes d'anthracnose et pour les pourritures de couronnes. L'objectif de cette méthode est de se rapprocher au mieux des conditions des contaminations naturelles.

1.1. Préparation du matériel végétal

Pour minimiser les contaminations naturelles qui peuvent se produire au champ, les pièces florales des fruits sont éliminées à la floraison (au stade doigts horizontaux), puis les régimes sont protégés par une gaine plastique. On utilise toujours des fruits provenant de la troisième main (éventuellement aussi ceux de la quatrième main). Enfin, les fruits sont récoltés à un stade physiologique comparable. Ce stade physiologique est mesuré en sommes de températures (mesurée en base 14), et correspond à 75% de la somme thermique nécessaire pour parvenir au stade « premier fruit jaune ou mûr »². La variété sensible Grande Naine est toujours utilisée comme référence.

1.2. Echantillonnage

La situation idéale est de disposer d'un échantillon de 20 régimes de chaque cultivar (ou traitement) étudié, et chaque régime est alors considéré comme une répétition³. Pour comparer

¹ Cirad-Flhor, Station de Neufchâteau - 97130 – Capesterre belle eau - Guadeloupe

² Pour les clones du sous-groupe Cavendish, cette somme thermique est de 900°C.jours, mais cette somme diffère en fonction des différents autres génotypes de bananiers.

³ Cet échantillon peut être facilement obtenu si l'on travaille sur une parcelle d'hybrides d'au moins une centaine de plants, ou bien si l'on compare un même clone (Cavendish, par exemple) dans différentes situations pédoclimatiques ou à différents stades de maturité.

des géotypes pour lesquels le nombre de bananiers disponibles ne permet pas de récolter 20 régimes au même stade physiologique (cas des collections de bananiers), on effectue un minimum de 10 répétitions à différentes époques de l'année⁴, en récoltant à chaque fois un même nombre de régimes appartenant à la variété Grande Naine.

Pour chaque régime, on prélève sur la troisième main, en position médiane, deux fruits externes et un bouquet de 4 fruits, respectivement pour les inoculations : 'anthracnose de quiescence', 'anthracnose de blessure', et 'pourritures de couronnes'.

1.3. Préparation de l'inoculum ou du matériel « bioagresseur »

Une souche monospore de *Colletotrichum musae*⁵ est cultivée sur milieu de Mathur (Mg SO₄, 7H₂O 2.5 g ; KH₂PO₄ 2.7 g ; Peptone 1 g ; Extrait de levure 1 g ; Saccharose 10 g ; Agar 15 g). La culture ne doit pas subir plus de 5 repiquages successifs⁶. Les cultures sont incubées à 25°C pendant 10 jours, avant de préparer deux suspensions calibrées à 10⁴ et 10⁶ conidies/ml au moyen d'une cellule de comptage de Malassez.

1.4. Inoculation et incubation

1.4.a. anthracnose de blessure

- Déposer une gouttelette de 25 µl d'une suspension calibrée à 10⁶ conidies/ml au centre d'une zone identifiée sur la face latérale d'un fruit. Déposer une pastille de papier Whatman de 5 mm sur la gouttelette. Appliquer ensuite un coton humide (eau distillée stérile), puis une bande de « scell-o-frais » autour du fruit. Transférer les fruits dans une enceinte régulée à 25°C.

- Au terme de 24 h, meurtrir la zone d'inoculation en effectuant une compression standardisée. Cette dernière est réalisée avec un piston à bout arrondi, de 1 cm de diamètre, qui exerce, durant 4 secondes et avec une vitesse de 5 mm/s, une déformation de 5mm. Le piston est piloté par un analyseur de texture TA-XT2 couplé au logiciel X-TRAD. Transférer les fruits dans une enceinte régulée à 20°C.

1.4.b. anthracnose de quiescence

Réaliser l'étape 1 de l'inoculation pour l'anthracnose de blessure comme au § 1.4.a. Ne pas effectuer les meurtrissures réalisées à l'étape 2.

1.4.c. pourritures de couronnes

Après la découpe du bouquet, attendre 20 minutes pour permettre l'écoulement du latex. Rafraîchir alors la couronne sur chaque face avec un couteau. Tremper la couronne dans de l'alcool 50%. Déposer une gouttelette de 50 µl d'une suspension calibrée à 10⁴ conidies/ml au sommet de la couronne. Appliquer une pastille de papier Whatman de 5 mm sur la gouttelette. Laisser les fruits à température ambiante pendant 3 h avant de les transférer à 13°C pendant 10 jours. Au terme de ces 10 jours, traiter les fruits à l'éthylène (1000 µl/l) pendant 24 h à 20°C. Aérer les fruits qui seront ensuite conservés encore 2 jours à 20°C.

⁴ Veiller à ce que ces récoltes soient échelonnées et balayent les différences saisonnières.

⁵ Plusieurs espèces de *Colletotrichum* cohabitent sur les bananiers. L'identification de l'espèce *C. musae* doit être établie auparavant. Les cultures de ce champignon ont généralement une croissance rapide (plus de 60 mm en 5 jours, à 25°C), un mycélium peu cotonneux et une sporulation abondante qui confère une coloration orangée à la culture. Un test de pouvoir pathogène sur fruits verts blessés doit obligatoirement être effectué. La comparaison des séquences des zones ITS1 et ITS2 avec des souches de références peut aussi confirmer l'appartenance à cette espèce.

⁶ Au-delà, de nouvelles cultures sont initiées à partir de suspensions conidiennes conservées à -80°C, dans du glycérol 30%.

1.5. Système de notation et interprétation des résultats

1.5.a. anthracnose de blessure et de quiescence : Dix jours après l'inoculation, commencer à mesurer la longueur (L) et la largeur (l) des nécroses, qui ont une forme elliptique. Leur surface (S) est estimée par la formule suivante : $S = L \times l \times \pi/4$. Répéter cette mesure de surface tous les 2-3 jours, jusqu'à ce que les fruits soient mûrs⁷. Les valeurs des surfaces (S) sont ensuite soumises à une analyse de variance.

1.5.b. pourritures de couronnes

- Au terme des 10 jours de conservation à 13°C, faire une notation du développement externe des lésions (SEL)⁸. Cette évaluation correspond à celle qui est faite en entrée de mûrisserie. Les valeurs des SEL sont ensuite soumises à une analyse de variance.

- Trois jours après le traitement à l'éthylène, mesurer la progression interne des lésions (PIL) : couper la couronne du bouquet en deux parties et mesurer la surface interne de la couronne (SC) et la surface interne de la nécrose (SN). Calculer alors $PIL = (SN/SC) \times 100$. Cette évaluation correspond à l'évaluation faite en sortie mûrisserie. Les valeurs des PIL sont transformées en arc Sinus racine carrée, si nécessaire, avant d'être soumises à une analyse de variance.

1.5.c. précautions pour les analyses de variance : Dans les cas où tous les régimes ont été récoltés à la même date, en dehors des vérifications d'usage, l'analyse de variance peut s'effectuer normalement sur les variables observées, et un test de comparaison de moyenne adapté permet de comparer les différents génotypes entre eux et à la variété de référence. Dans le cas où les régimes sont récoltés à des dates différentes, les génotypes sont évalués comparativement à la Grande Naine qui sert de contrôle des effets saisonniers⁹.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Anthracnose de blessure et de quiescence

Stade de récolte (°C.J)	S (mm ²)
700	644 (b)
900	1002 (a)

S (mm²) moyenne des surfaces des lésions. Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas selon le test de Newman-Keuls

Tableau 1: Comparaison du niveau de sensibilité à l'anthracnose de blessure de fruits récoltés à différents degrés de maturité (700 ou 900°C.J.)

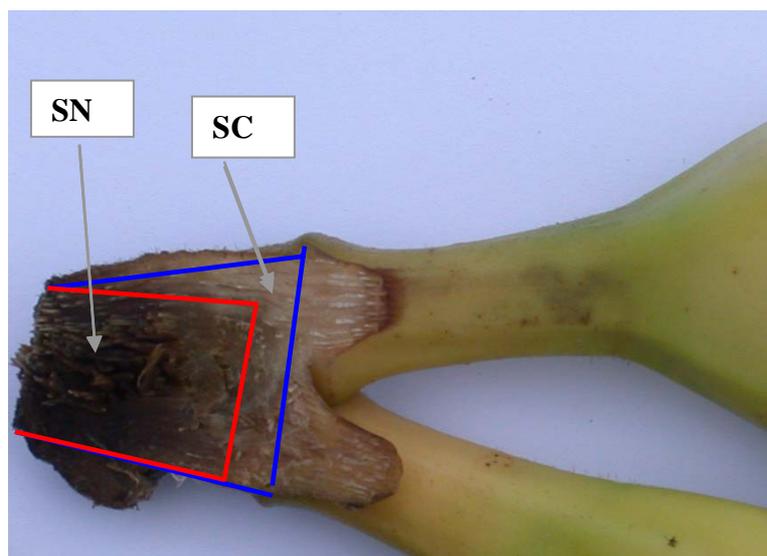
Ce résultat montre que le niveau de sensibilité des fruits à l'anthracnose de blessure est influencé par leur stade de maturité physiologique.

⁷ Pour les tests de comparaison entre lots de bananes de type Cavendish, conserver les fruits 10 jours à 13°C, puis 10 jours à 20°C, avant de mesurer les surfaces des lésions.

⁸ Note qualitative de 0 à 4 : 0, pas de symptômes ; 1, nécrose inférieure à 25% de la surface ; 2, nécrose comprise entre 25 et 50% de la surface ; 3, nécrose comprise entre 50 et 75% de la surface ; 4, plus de 75% de la surface est nécrosée.

⁹ Si les écarts par rapport à la grande Naine sont constants entre dates, additivité entre effet saisonnier (contrôlé par la Grande Naine) et effet génotype on peut conduire l'analyse de variance sur les écarts à la Grande Naine ou réaliser une analyse de covariance avec les valeurs de Grande Naine en covariable. Si les écarts sont proportionnels à la valeur de la moyenne, multiplicativité des effets, il faut alors analyser le rapport génotype/Grande Naine, et on se ramène à une situation d'additivité pour l'analyse de variance ou de covariance en analysant les transformés logarithmiques des valeurs observées. On choisit entre ces deux situations en testant la nullité de la pente de la droite de régression entre les écarts des valeurs génotype-Grande Naine et les valeurs de la Grande Naine.

2.2. Pourritures de couronnes



Mesure de la PIL sur une couronne découpée en deux.

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La méthode décrite permet d'apprécier le niveau de sensibilité de différents génotypes de bananiers (clones cultivés, géniteurs, hybrides) à ces différentes maladies. Elle est utilisée pour mesurer le niveau de sensibilité aux maladies de conservation des hybrides obtenus par le Cirad-Flhor. Cette méthode est aussi utile pour évaluer la sensibilité de différents lots de fruits d'un même clone cultivé, en fonction de leur origine géographique ou de leur stade de maturité physiologique. Elle a été utilisée en Guadeloupe pour mettre en évidence des niveaux de sensibilité à l'antracnose de blessure en fonction des zones de production.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bakry F, Carreel F, Caruana ML, Côte FX, Jenny C, Tezenas du Montcel H (1997) Les bananiers. In *L'amélioration des plantes tropicales*, edited by Charrier A, Hamon S, Jacquot M, Nicolas D. Montpellier: CIRAD et ORSTOM.
- Chillet M, de Lapeyre de Bellaire L, Dorel M, Joas J, Dubois C, Marchal J, Perrier X (2000) Evidence for the variation in susceptibility of bananas to wound anthracnose due to *Colletotrichum musae* and influence of edaphic conditions. *Scientia Horticulturae* 86:33-47.
- de Lapeyre de Bellaire L, Nolin J (1994) Amélioration du contrôle du chancre sur les bananes d'exportation et traitements post-récolte. *Fruits* 49 (3):179-185.
- de Lapeyre de Bellaire L, Chillet M, Dubois C, Mourichon X (2000) Importance of different sources of inoculum and dispersal methods of conidia of *Colletotrichum musae*, the causal agent of banana anthracnose, for fruit contamination. *Plant Pathology* 49:782-790.
- Finlay AR, Brown AE (1993) The relative importance of *Colletotrichum musae* as a crown-rot pathogen on Windward Island bananas. *Plant Pathology* 42:67-74.
- Marin DH, Sutton TB, Blankenship SM, Swallow WH (1996) Pathogenicity of fungi associated with crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. *Plant Disease* 80:525-528.
- Meredith DS (1960) Studies on *Gloeosporium musarum* Cke and Massee causing storage rots of Jamaican bananas. I. Anthracnose and its chemical control. *Annals of Applied Biology* 48:279-290.
- Muirhead IF, Deverall BJ (1981). Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. *Physiological Plant Pathology* 19:77-84.