UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN



Faculté des bioingénieurs

Earth and Life Institute - Applied Microbiology - Phytopathology

Les virus du bananier et plantain (*Musa* spp.) en République démocratique du Congo : occurrence, identification de nouveaux virus et diversité génétique

Lyna MUKWA FAMA TONGO

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Louvain-la-Neuve, Septembre 2016

Composition du Jury

Pr. Marie-Laurence De Keersmaecker (UCL-Belgique) : Présidente

Pr. Jacques Mahillon (UCL-Belgique) : Président

Pr. Claude Bragard (UCL-Belgique) : Promoteur

Pr. Marie-Line Iskra-Caruana (CIRAD-France) : Promotrice

Pr. Adrien Kalonji-Mbuyi wa Mbombo (UNIKIN-RDC): Promoteur

Pr. Anne Legrève (UCL-Belgique): Examinatrice

Pr. Philippe Baret (UCL-Belgique): Examinateur

Pr.Godefroid Monde (IFA-Yangambi-RDC): Examinateur

A tout ceux qui oeuvrent pour le développement
de tout homme et de tout l'homme,

A mes enfants, neveux et nièces.

Remerciements

« Chaque homme est appelé à se développer, car toute vie est vocation. Dès la naissance est donné à tous en germe, un ensemble d'aptitudes et de qualités à faire fructifier. Leur épanouissement, fruit de l'éducation reçue du milieu et de l'effort permettra à chacun de s'orienter vers sa destinée. Doué d'intelligence et de liberté, il est responsable de sa croissance. Aidé, par ceux qui l'éduquent et l'entourent, chaque homme peut grandir en humanité, valoir plus, être plus… »(PaulVI 1967).

Cette thèse n'aurait jamais pu prendre forme et s'achever sans le concours de vous tous, que je tiens à remercier.

Je remercie tout d'abord mon promoteur de thèse, le professeur Claude Bragard qui m'a fait confiance et a accepté de m'accompagner dans cette belle aventure. Il m'a offert l'encadrement nécessaire à la réalisation et à l'achèvement de cette thèse. Je le remercie également pour avoir accepté de prendre la direction scientifique de mes travaux de recherche, pour les orientations, sa rigueur scientifique qui m'a amené à m'améliorer davantage et à donner le meilleur de moi-même.

Ma reconnaissance s'adresse également au docteur Marie-Line Iskra-Caruana, qui a accepté de nous rejoindre dans ce processus de thèse et qui m'a accueillie dans son laboratoire au Cirad, en veillant à ce que je ne manque de rien pour travailler. Ses conseils riches et constructifs, sa rigueur scientifique m'ont été d'une très grande utilité.

Mes remerciements s'adressent au professeur Adrien Kalonji-Mbuyi de qui j'ai tiré le désir de me spécialiser en phytopathologie. Il m'a toujours accompagnée en bon père depuis mon cycle d'ingénieur à l'Université de Lubumbashi jusqu' à ce jour. Merci pour tout ce que vous êtes pour moi.

A vous membres du jury, j'adresse toute ma reconnaissance. Malgré vos multiples occupations, vous avez bien accepté d'évaluer la qualité de mon travail. Je vous remercie pour votre disponibilité.

Un tout grand merci au professeur Henri Maraite et à Benjamin Dieryck pour la collaboration et les conseilles dont j'ai bénéficié au début du projet Clinique des Plantes de Kinshasa.

Merci aux collègues du Centre Agronomique et Vétérinaire Tropical de Kinshasa, aux techniciens de la Clinique des plantes de Kinshasa, sans vous, le travail de terrain aurait été incomplet. Je pense à Olivier Mandefu, Joël Mukendi, Florent Adakate, Flory Nsema, Fraternel Kuyenga, Fabrice Impion, Gloire Malolo, Manu Mukoma. Aux chauffeurs qui m'ont conduit lors de toutes mes enquêtes et parfois sur des terrains dangereux : Prophete Anselm Bidi, Seba et Shupeta.

Merci aux religieuses de la congrégation Notre Dame de Lukala, qui nous avaient secourus après l'accident de circulation lors des dernières enquêtes de terrain, en décembre 2014. Votre secours m'a laissée sans voix.

A toute l'équipe du laboratoire de phytopathologie de l'UCL, de la Clinique des Plantes Corder, du Comité régional Phyto, pour la bonne ambiance qui y règne, l'esprit d'équipe, l'amitié et les blagues qui égaillaient les moments de pause. Je pense à Alain Decröes (Aldec), Charlotte Lienart (Chacha !!!), Simon Caulier (Sims), Pièrre Hellin (Peter), Samuel (Sam), Gil Colau (Gilou), Francis Amougou-Mba (Tonton Francis !), Mélanie Gaulier (Mel), Maxim Liepin (Max), Laurence Loothgeither, Nadine Vanmemrick, Jean-Marie Gerard, Louis Sandri, Elsy Lievens, Laurence Jansens, Gaston Dabire, Bénédicte Mary, Françoise Munaut, Aurelie Clinkemaille, Stéphane Deconinck (Steph), Brigitte Vampee, Marie-eve Renard, Cécile Mhore (Mme Mhore), Gustavo Romay Gonzales (Gust), Mathieu Mahillon (jackson), Adélaide Germeau, Vincent déhon et Viviane Vanhese (ma vivi de cœur !).

Votre soutien m'a beaucoup marquée ! Merci aux familles : Bavi bahoire, Ryckmans, Mongwanga : (Rebecca, Felix, Keren, Kristel et Kloé), Ntini, Mabwa, Kapita-Mba Bayiber.

A vous mes amis, pour vos encouragements, à Flore et Alain Tshilombo, Yann et Damien, Céline Jacquemain, Solange et Patrick Nsiala, Alain badibanga, Tété et Mao Ongenda, Véronique et Marck Ilunga, Jean Marie Kanda, Jean Paul Kibambe, Bob Lumanisha, Abdias Niangi, Fanny Alombong, Mafalda Arijo, Marie-Anne, Maria fabiola, Dominique Bastin, Grâce Bafoa, Lea Ilela (ma liberté !).

A toi mon cher Nicolas Kanyonga Mulumba pour ton soutien, tes conseils et ta bienveillance.

A ma famille : ma mère Georgine Kinata Mapiya et à tous les Mukwa : Thérèse & Urbain, Patricia & Jules, Alain & Nelly, Max & Nzuzi, Marie-Sayi, Viviane & Alain, Francine & Arsène, Cécile & Emmanuel, vous m'avez vu sans doute faire, défaire et refaire mes valises. Vous avez supporté avec amour mes mauvaises humeurs, je vous remercie pour l'amour que vous portez à mon endroit, pour vos encouragements, vos prières et tous vos sacrifices.

Merci à mon très cher et regretté père Patrice Mukwa Kikwidi qui a été arraché très tôt à mon affection. Tu souhaitais me voir un bon professionnel de la médecine humaine, mais ma vocation a été plus forte que ce choix que tu as fait pour moi. Me voilà désormais professionnel de médecine végétale !

Lyna Mukwa Fama Tongo



Cette thèse a été financée par l'Agence Belge de Développement (CTB/BTC) à qui, nous adressons toute notre reconnaissance.

Publications et présentations à congrès

(1) **Mukwa, L.F.T.,** Muengula, M. Zinga, I., Kalonji, A., Iskra-Caruana, M-L, Bragard, C. (2014), Occurrence and Distribution of *Banana bunchy top virus* Related Agro-Ecosystem in South Western, Democratic Republic of Congo. *American Journal of Plant Sciences, **5***, 647-658. http: //dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.55079.

(2) **Mukwa, L.F.T.,** Kalonji-Mbuyi, A., Bragard, C., Iskra-Caruana, M-L (2013), Guide d'identification des maladies du bananier en République démocratique du Congo : recueil destiné aux agriculteurs, pour l'identification rapide des viroses du bananier, CAVTK, Kinshasa, RDC.

(3) **Mukwa, L.F.T.,** Kalonji-Mbuyi, A., Bragard, C. (2014), Presence and distribution of *Banana bunchy top virus* in South Western Democratic Republic of Congo. Poster présenté au 12ème International Symposium on Plant Virus Epidemiology. Arusha, du 28 janvier au 01 février 2013, Tanzania.

(4) **Mukwa, L.F.T.,** Kalonji-Muyi, A., Iskra-Caruana, M-L., Bragard, C. (2015), Reality of virus infections in banana and plantain in Democratic Republic of Congo. Poster présenté au 15ème Congrès de virologie végétale, du 18 au 22 janvier 2015 à Aussois en France.

(5) **Mukwa, L.F.T.,** Kalonji-Mbuyi, A., Iskra-Caruana, M-L., Bragard, C. (2016), Molecular characterization of *Banana bunchy top virus* reveals widespread low genetic variation among isolates in Democratic Republic of Congo. Poster présenté au 13ème International Symposium on Plant Virus Epidemiology. Avignon, du 06 au 10 juin 2016, France.

(6) **Mukwa, L.F.T.,** Gillis, A., Laboureau, N., Galzi, S., Romay, G., Kalonji-Mbuyi, A., Iskra-Caruana, M-L, Bragrad, C. (2016), Current statut of occurrence, epidemiology and genetic diversity of banana viruses in Democratic Republic of Congo. Présentation orale au 13ème International Symposium on Plant Virus Epidemiology. Avignon, du 06 au 10 juin 2016, France.

(7) **Mukwa, L.F.T.,** Bragrad, C., Laboureau, N., Galzi, S., Gillis, A., Romay, G., Kalonji-Mbuyi, A., Iskra-Caruana, M-L (2016), Banana streak viruses and *Cucumber mosaic virus* affect banana (*Musa* spp.) in addition to *Banana bunchy top virus* in Bas Congo, DRC (manuscript submitted in *Plant Disease*).

(8) **Mukwa, L.F.T.,** Vanhese, V., Gillis, A., Laboureau, N., Galzi, S., Romay, G., Kalonji-Mbuyi, A., Iskra-Caruana, M-L., Bragrad, C. (2016), Low genetic diversity of *Banana bunchy top virus* with sub-regional pattern of variation, in Democratic Republic of Congo. *Virus genes*. DOI 10.1007/s11262-016-1383-1.

Résumé

Les virus constituent une contrainte majeure à l'amélioration et aux échanges de germplasm du bananier et plantain (*Musa* spp) dans le monde. Les études récentes rapportent que six virus affectent le bananier et plantain (*Musa* spp) dont le *Banana bunchy top virus* (BBTV), le Banana streak virus (BSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Banana mild mosaic virus* (BanMMV), le *Banana virus x* (BVX). Le BBTV est considéré comme le virus le plus dévastateur présent dans au moins 14 pays africains y compris la République démocratique du Congo (RDC) où il a été détecté pour la première fois, en 1950, à Yangambi dans la région de Kisangani. La situation des autres virus du bananier demeure inconnue malgré que certains d'entre eux aient été détectés dans les pays limitrophes de la RDC. Le principal objectif de cette thèse a été d'élucider la présence des virus impactant la culture du bananier (*Musa* spp.) en RDC, leurs origines et leurs diversités génétiques.

Les enquêtes épidémiologiques ont été menées en vue de rechercher les principaux virus du bananier. Un accent particulier a été mis sur les zones moins investiguées en RDC, particulièrement la province du Bas Congo, à cause de sa position géographique, pour la recherche des nouveaux virus. Plus de 666 échantillons de feuilles de bananier ont été collectés dans 122 sites et analysés en utilisant la PCR comme base technique. Le BBTV est un virus à génome multipartite composé d'au moins six ADN nommés ADN-R, M, N, C, U3, S. Au total 52 séquences complètes d'ADN-R et 30 séquences complètes de M, N, C, U3, S ont été étudiées en vue de comprendre son épidémiologie. Les analyses phylogénétiques et la comparaison des séquences nucléotidiques ont été réalisées pour tous les virus détectés (BBTV, BSV, CMV).

Les résultats indiquent que le BBTV est le virus du bananier le plus répandu en RDC. Le facteur humain constitue le principal moteur de dispersion de ce virus, particulièrement à travers l'échange de matériel de plantation infecté. Les données indiquent une faible variabilité génétique des isolats BBTV et leur regroupement dans le sous-groupe Sud Pacifique. Les isolats congolais de BBTV sont proches entre eux et aussi proches de ceux des autres pays d'Afrique sub-Saharienne (SSA). Les résultats confirment aussi que l'Afrique aurait subi une double introduction du

BBTV venant respectivement de Java et de Taiwan. La première introduction du BBTV fut en Egypte en 1901 et la seconde en RDC en 1950. Au niveau moléculaire, les données supportent une distribution sur le continent africain - la RDC semble être un foyer primaire de dispersion en Afrique. L'analyse des haplotypes basée sur la région codante de la protéine *m-Rep* montre la présence de 39 haplotypes (H1 à H39) avec des valeurs de diversité de 0,944±0,013 dont les plus répandus sont H17, H9, H7 et H24, représentant respectivement 31,6 ; 21,1 ; 21,1 et 27,0 % des isolats BBTV. Les symptômes de banana streak disease incluant les stries jaunes, l'éclatement du pseudo-tronc, le dépérissement de la feuille cigare ont été associés à la présence des espèces Banana streak virus (fréquence de 20 %). Les espèces BSV les plus répandues sont *Banana streak GF virus* (BSGFV) (fréquence = 68 %) et *Banana streak OL virus* (BSOLV) (fréquence = 25,5 %). Les bananiers à génome *Musa acuminata* sont les plus infectés par le BSV, ce qui suggère le développement d'une épidémie BSV suite à la transmission du virus des hybrides interspécifiques (génome B) vers le bananier dessert (génome A). La fréquence de la cochenille a été évaluée à 9,3 %, ce qui renforce l'hypothèse d'une transmission de Banana streak virus. Les isolats de BSGFV et ceux de BSOLV séquencés, se groupent dans le clade I reconnu comme un clade ressemblant les espèces BSV ayant une contrepartie endogène. *Cucumber mosaic virus* a été détecté (fréquence = 9,3%) principalement sur les échantillons asymptomatiques. L'analyse de la diversité génétique révèle une similarité élevée entre les isolats de la RDC. Ce qui appuie l'hypothèse de l'existence d'une unique souche de CMV qui se disperse à travers le pays. Malgré l'approche de collecte d'échantillons utilisée, *Banana bract mosaic virus* n'a pas été détecté dans les échantillons collectés. Ces résultats suggèrent que *Banana bract mosaic virus* demeure absent du Bas Congo, RDC.

Mots clés : Diagnostique, Banana streak virus, *Cucumber mosaic virus*, *Banana bunchy top virus*, épidémiologie, Clinique des Plantes de Kinshasa.

Abstract

Viruses are considered as major constraints to the exchange of germplasm, genetic improvement and breeding of banana and plantain (*Musa* spp) through the world. To date, six viruses are recognized to affect *Musa* spp: *Banana bunchy top virus* (BBTV), Banana streak viruses (BSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Banana mild mosaic virus* (BanMMV), *Banana virus x* (BVX). BBTV, the most devastating virus of banana, is currently spread in 14 countries of Africa including the Democratic Republic of Congo (DRC), where the virus was observed for the first time in 1950 in Yangambi, Kisangani region. The situation of others banana viruses remains unknown however, some of these viruses were observed in DRC bordering countries. The main aim of this work was to elucidate the epidemiological situation, the genetic variability and the origin of banana viruses in Democratic Republic of Congo.

Epidemiological surveys were conducted in southwestern part of DRC, with a special emphasis on Bas Congo province, in order to search major banana viruses. Up to 666 samples were collected from at least 122 locations and analysed using PCR based method. BBTV is a multi component virus, which possesses six DNA components named DNA-R, M, N, C, U3, S. To understand the BBTV epidemiology, 52 complete sequences of DNA-R and 30 full sequences of DNA-R, U3, M, N, C, S were study. Phylogenetic analysis was carried out by isolates nucleotides sequences comparison, for all viruses detected (BBTV, BSV, CMV).

Result show that BBTV is the most widespread banana virus in DRC. The main factor contributed to the spread of this threat is the human exchange of infected planting material. Data reveals a low genetic variability of BBTV isolates, which are grouped in South Pacific group. Theses BBTV isolates are close between them and with those of other sub-Saharian Africa countries. The earliest report of BBTV in Africa relates to an isolate described in Egypt in 1901. Since the earliest BBTV report in sub-Saharian Africa was in Democratic Republic of Congo in 1950, it is likely that *Banana bunchy top virus* spread from DRC to other SSA countries rather than from Egypt and that at least two *Banana bunchy top virus* introductions occurred in Africa from Java and Taiwan respectively. However, at a global scale,

molecular analyses support infrequent *Banana bunchy top virus* dispersal events among continents. Democratic Republic of Congo seems to be the primary center of *Banana bunchy top virus* spread in Africa. Haplotypes analysis based on the coding region m-Rep protein showed 39 haplotypes (H1 to H39) (haplotype diversity value of 0.944±0.013). The most frequent haplotypes were H17, H9, H7 and H24 representing 31.6, 21.1, 21.1 and 27% of the BBTV isolates, respectively. Symptoms of banana streak disease including yellow streak, splitting of pseudo-stem, death of cigar leaf, were associated to the presence of Banana streak virus species *(*frequency = 20 %). The most widespread was *Banana streak GF virus* (BSGFV) (frequency = 68%) and *Banana streak OL virus* (BSOLV) (frequency = 25.5%). *Musa acuminata* cultivars are infected although no banana streak disease epidemic was reported any more, since the study revealed the transmission of BSV species from plantain (B genome) to banana (A genome). The frequency of mealybugs was about 9.3%, suggesting transmission of the disease. The sequenced isolate of BSGFV and BSOLV gather in the clade I, recognized to gathering the BSV species with endogenous counterpart. *Cucumber mosaic virus* was detected (frequency = 9.3%) mainly on asymptomatic samples collected. Genetic diversity analysis reveals the high similarity between Congolese CMV isolates and with South African isolates. These results suggest the hypothesis of the existence of the *Cucumber mosaic virus* single strain that dispersed througthout the study area. *Banana bract mosaic virus* was not detected in the collected samples despite the targeted sampling approach developed. The result suggests that the virus still absent in Bas Congo, Democratic Republic of Congo.

Keywords: Diagnostic, Banana streak virus, *Cucumber mosaic virus*, *Banana bunchy top virus*, epidemiology, Clinique des Plantes de Kinshasa.

Table des Matières

Remerciements ..... **v**

Publications et présentations à congrès ..... **vii**

Résumé ..... **ix**

Abstract ..... **xi**

Table des Matières ..... **xiii**

Nomenclature officielle des virus ..... **xvii**

Abréviations ..... **xix**

Cadre institutionnel de la recherche **21**

Partie A : Etat de l'art **29**
Préambule 30

CHAPITRE 1: Le bananier : importance et contraintes en République démocratique du Congo **31**
1.1. La culture du bananier et du plantain (*Musa* spp.) **31**
1.1.1. Origine et diffusion du bananier 31
1.1.2. Description et taxonomie 32
1.1.3. Ecologie et culture 34
1.2. Importance économique et sociale du bananier et du plantain **36**
1.3. Les contraintes au développement de la filière de production de la banane en République démocratique du Congo **38**
1.3.1. Les contraintes agro-environnementales 38
1.3.2. Les contraintes politico-économiques 42

CHAPITRE 2: Les viroses du bananier et du plantain (*Musa* spp.) **45**
2.1. Introduction **45**
2.2. Les viroses provoquées par des virus à ADN **47**
2.2.1. Banana bunchy top disease (BBTD) 47
2.2.2. Banana streak disease (BSD) 57
2.3. Les viroses causées par les virus à ARN **66**
2.3. 1. Cucumber mosaic Disease (CMD) 66
2.3.2. Banana bract mosaic disease (BBrMD) 71
2.4. Déterminants épidémiologiques et phénomènes influençant la variabilité génétique des populations de virus du bananier **75**

Partie B: Objectifs de la recherche et Méthodologie générale **78**

CHAPITRE 3: Hypothèse, objectifs et stratégie de recherche **80**
3.1. Hypothèses **80**
3. 2. Objectifs **82**
3.3. Intérêt de l'étude **83**
3.4. Milieu d'études **83**
3.4.1. Choix et caractéristiques édapho-topographiques 83
3.4.2. Caractéristiques climatiques 84
3.5. Approche méthodologique **85**

3.5.1. Approche de terrain 85
3.5.2 Approche de laboratoire 89

Partie C: Experimentation 96

C1. Détection et distribution des virus du bananier (Musa spp.) au sud ouest de la République démocratique du Congo 98
Préambule 99

CHAPITRE 4: Occurrence and distribution of *Banana bunchy top virus* related agro - ecosystem in South Western, Democratic Republic of Congo 100
Abstract 101
Introduction 102
Materials and Methods 103
Results 106
Discussion 114
Conclusion 116
Acknowledgements 117
References 117
Préambule 120

CHAPITRE 5: Banana streak virus and *Cucumber mosaic virus* affect banana (*Musa* spp.) in addition to *Banana bunchy top virus,* in Bas-Congo province, DRC 122
Abstract 123
Introduction 124
Materials and Methods 127
Results 133
Discussion 155
Acknowledgments 159
Literature Cited 160

C2. Caractérisation moléculaire et diversité génétique des virus du bananier au sud ouest de la République démocratique du Congo. 180
Préambule 181

CHAPITRE 6: Low genetic diversity of *Banana bunchy top virus,* with a sub-regional pattern of variation, in Democratic Republic of Congo 182
Abstract 183
Introduction 184
Materials and Methods 185
Results and Discussion 186
Acknowledgements 192
References 193

Partie D: Discussion générale, conclusion et perspectives 208

CHAPITRE 7: Discussion générale 210
7.1. *Banana bunchy top virus* (BBTV) 212
7.2. Banana streak viruses (BSV) 216
7.3. *Cucumber mosaic virus* (CMV) 220
7.4. *Banana bract mosaic virus* (BBrMV) 222
CHAPITRE 8: Conclusions et perspectives 224

8.1. Vers une relance de la filière de production de la banane en RDC ? 227
8.2. Compréhension de la situation actuelle des contraintes en culture de bananier en RDC 229
8.3. Mise en place d'une stratégie de gestion intégrée des virus du bananier 230
8.4. Appuyer et renforcer les capacités des laboratoires de diagnostic, de certification et de production de matériel de plantation *in vitro* 236
8.5. Former et organiser des paysans en association 236
8.6. Police phytosanitaire, quarantaine et renforcement du cadre légal de lutte contre les nuisibles du bananier 237
8.7. Redynamiser la recherche agronomique 238
8.8. Renforcer le contrôle aux frontières 238

Partie F : Références bibliographiques.....240

Nomenclature officielle des virus

De manière générale, la nomenclature proposée par *l'International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) a été utilisée. Les noms officiels d'espèces sont proposés en italique. Lorsque l'usage le permet, cetains groupes d'espèces virales ont été fédérés sous une dénomination commune et rédiger sans le style italique, pour faciliter la lecture.

BanMMV: *Banana mild mosaic virus*

BBrMV: *Banana bract mosaic virus*

BBTD: Banana bunchy top disease

BBTV: *Banana bunchy top virus*

BCVBV: *Bougainvillea chlorotic vein banding virus*

BSACYUV : Banana streak acuminatata Yunnan virus

BSCAV: *Banana streak Cavendish virus*

BSGFV: *Banana streak GF virus, species Goldfinger, Badnavirus*

BSIMV: *Banana streak IM virus, species Imove,*

BSMYV: *Banana streak MY virus, species Mysore*

BSOLV: *Banana streak OL virus, species Obino l'Ewai*

BSV: Banana streak virus all species, Badnavirus genus

BSVNV: *Banana streak VN virus, species Viet Nam*

BVX: *Banana virus X*

CiMV: *Citrus mosaic virus*

CLNV: *Cycad leaf necrosis virus*

CMV: *Cucumber mosaic virus*

ComYMV: *Commelina yellow mottle virus*

CSSV-Agou: *Cacao swollen shoot virus* isolate from-Agou

CSSV-Wabe: *Cacao swollen shoot virus* isolate from-Wabe

DBALV: *Dioscorea baciliform virus*

DBSNV: *Dioscorea baciliform SN virus*

GVAV-SCO: *Gooseberry vein banding associated virus* GBI

PSV: *Peanut stunt virus*

SCBIMV: *Sugarcane baciliform* IM *virus*

SCBMOV: *Sugarcane baciliform mor virus*-Morocco

SPPV-B: *Sweetpotato badnavirus*-B.

Abréviations

A : Génome de l'espèce *Musa acuminata*

AA : Bananiers diploïdes à deux allèles *Musa acuminata*

AAA : Bananiers triploïdes à trois allèles *Musa acuminata*

AAB : Bananiers triploïdes à deux allèles *Musa acuminata* et un allèle *Musa balbisiana* (hybrides interspécifiques triploïdes).

AB : Bananiers diploïdes, hybrides interspécifiques à allèles *Musa acuminata* et *Musa balbisiana*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

B : Génome de l'espèce *Musa balbisiana*

BB : Bananiers diploïdes à deux allèles *Musa balbisiana*

BET: Bromure d'éthidium

BLAST: Basic local alignment search tool

Bp : Paire de base

°C : Degré Celsius

$Cacl_2$: Chlorure de calcium anhydre

CAVTK : Centre Agronomique et Vétérinaire Tropical de Kinshasa

CIRAD : Centre de Coopération Internationale pour la Recherche Agronomique et le Développement

CP : Protéine de capside

CPK : Clinique des Plantes de Kinshasa

dNTP: Desoxyribonucléotides-5'-Triphosphate

DRC: Democratic Republic of Congo

ds: Double strand ou double chaînes

DSMZ : Liebniz-Institut, Deutshe Sammlung von Mikroorganismen und Zelkulturen

EDTA : Ethylène diamine tétraacétique ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)

ELI: Earth and Life Institute

ELISA: Enzyme linked immunosorbent essay

f. sp. : Forme spéciale (*forma specialis*)

GPS: *Global positionning system*

IC-One-step-RT-PCR: Immunocapture one step reverse transcriptase Polymerase chain reaction

IC-PCR: Immunocapture-polymerase chain reaction

Kbp: Kilo paire de base

M-IC-PCR: Multiplex immunocapture polymerase chain reaction

NCBI: National center of biotechnology information

nt: Nucléotides

ORF: Open Reading Frame

PBS : Phosphate buffer saline

PCR : Polymerase chain reaction

PIF : Plante issue de fragment de tige

PKW : Pisang Klutuk wulung

RCA : Rolling circle amplification

RNaseH : Ribonucléase H

RT-PCR : Reverse transcription-polymerase chain reaction

sp: Espèce

spp: Plusieurs espèces

ss : Single strand ou simple brin

ssp: Sous – espèce

TAE : Tris-acetate-EDTA

TBE : Tris-Borate-EDTA

UCL : Université catholique de Louvain

UNIKIN : Université de Kinshasa

UNILU : Université de Lubumbashi

UV : Ultraviolet

WBI : Wallonie-Bruxelles International.

µl : Microlitre

µM : Micromolaire

i. Cadre institutionnel de la recherche

Cette recherche est le fruit d'une collaboration internationale d'une part, entre l'Université catholique de Louvain (UCL) en Belgique et le Centre Agronomique et Vétérinaire Tropical de Kinshasa (CAVTK) en République démocratique du Congo (RDC) et d'autre part, entre l'Université catholique de Louvain et le Centre de Coopération Internationale pour la Recherche Agronomique et le Développement (CIRAD), en France. Elle s'inscrit dans le cadre du projet Clinique des Plantes de Kinshasa (www.pcdrc.org), initié conjointement par l'Université de Kinshasa en République démocratique du Congo et l'Université catholique de Louvain (Belgique), avec le support financier de la Région Wallonne de Belgique et de la Wallonie-Bruxelles International (WBI). Les travaux de recherche liés à cette thèse de doctorat ont été financés par l'Agence Belge de Développement (CTB/BTC).

La Clinique des Plantes de Kinshasa est un service d'intérêt public ouvert à toutes les catégories socioprofessionnelles œuvrant dans le domaine agricole en RDC. Elle fonctionne sous la couverture juridique du Centre Agronomique et Vétérinaire Tropical de Kinshasa, CAVTK en sigle et constitue un pôle d'expertise au sein de ce dernier. Les objectifs qu'elle poursuit sont :

(1) Diagnostiquer, d'identifier, d'analyser des maladies et ravageurs des plantes, dans l'optique de prescrire des moyens de lutte efficaces et adaptés à chaque cas ;

(2) De développer des capacités normalisées d'analyse des semences, afin d'appuyer le service étatique d'analyse des semences, à diffuser des semences saines et de bonne qualité ;

(3) De former un noyau d'experts œuvrant dans le domaine de pathologie végétale.

Dans son fonctionnement, la Clinique des Plantes de Kinshasa, se situe au centre des interactions entre les agriculteurs et les activités de recherche agronomiques qui se réalisent dans les universités. Ainsi, toutes les questions complexes liées aux maladies et ravageurs sont traitées de manière approfondie, grâce à la recherche scientifique, au niveau des universités. Les résultats de recherche sont ensuite

restitués aux agriculteurs sous forme de conseils et de séances d'apprentissage (formations).

La Clinique des Plantes de Kinshasa a été fondée en juin 2009, dans le but de répondre à un besoin réel de diagnostic des maladies des plantes. L'un des objectifs était de pouvoir fonctionner comme un service ouvert aux agriculteurs afin de répondre au souci de gestion des pestes en RDC.

Au cours des années de fonctionnement, plusieurs questions agronomiques ont été identifiées, nécessitant des réponses concrètes et rapides pour aider les agriculteurs à améliorer le rendement de leurs cultures, et par conséquent, leur revenu. Parmi ces questions, se trouvaient, de manière récurrente et conséquente, celles qui touchent aux maladies et ravageurs du bananier (*Musa* spp).

Les résultats de recherche présentés dans cette thèse répondent aux contraintes d'origine virale observées en culture de bananier et du plantain en République démocratique du Congo. Ils seront utilisés pour la mise en place des stratégies intégrées de gestion des maladies et ravageurs.

ii. Contexte

En République démocratique du Congo (RDC), l'accroissement des échanges commerciaux, le changement climatique, le souci d'accès à une alimentation saine et de bonne qualité amènent les agriculteurs à diversifier leurs cultures, améliorer les systèmes de production, et utiliser des variétés moins rustiques pour maximiser la production. Des progrès très importants dans la lutte contre les agents pathogènes ont pu être réalisés. Cependant, ces évolutions accomplies depuis environ un siècle n'ont toutefois pas pris en compte les différents problèmes posés par les virus. Aujourd'hui, les virus constituent une menace liée à l'explosion possible d'épidémie et sont responsables de pertes importantes pour le bananier. Le contrôle et la limitation des épidémies virales dans des régions autrefois indemnes restent un enjeu prioritaire en zone tropicale.

Le bananier et le plantain sont parmi les plantes cultivées les plus importantes au monde. Ils sont répertoriés parmi les principaux fruits frais qui font l'objet d'importants échanges internationaux. Ils constituent la quatrième grande culture mondiale après le riz, le blé et le maïs (Faostat 2016). Plus de 400 millions de personnes dans les pays tropicaux et subtropicaux dépendent de ces espèces, tant pour leur alimentation que comme source importante de revenu généré par son commerce local et international (Panis 2009). Leur importance socio-économique et nutritionnelle est considérable, car bien loin de se limiter à un simple dessert, elles jouent un rôle essentiel pour la sécurité alimentaire dans de nombreux pays d'Afrique centrale (Arias et al. 2003). La production mondiale de la banane et du plantain était respectivement évaluée à 101,992 millions de tonnes et 37,162 millions de tonnes en 2013 (Faostat 2016). La superficie occupée par ces cultures était estimée à 10 millions d'hectares en 2012 (Lassoudière 2012). De manière générale, la banane se situe au premier rang de la production fruitière à l'échelle mondiale, avec plus de 117 millions de tonnes produites annuellement. La quantité de la production à l'échelle mondiale place cette culture devant l'ananas, les citrus, les dattes et les avocats. Elle est ainsi le fruit le plus consommé au monde (Faostat 2016). En termes d'importance alimentaire, le bananier occupe la deuxième place après le manioc en RDC (Bakelana et al. 1996, Mobambo et al. 2010). Depuis 1940,

le contrat d'exploitation signé entre les services forestiers et les entreprises privées, avait autorisé l'exploitation du bois d'œuvre dans un système agro-sylvicole où la culture de la banane était associée à d'autres essences forestières comme le *Terminalia superba*, le *Ceiba petandra* ou le *Bombax fammeum*, par exemple dans les régions forestières du pays notamment le district du Bas-Fleuve (province du Bas Congo). Malheureusement après l'annonce, en 1973 du plan d'expropriation des biens étrangers par les Zaïrois dit « la zaïrianisation », la plupart de ces sociétés ont fait faillite. Aujourd'hui, seuls des vestiges de plantation de bananiers demeurent dans ces régions autrefois productrices. La culture du bananier et du plantain est pratiquée, en majeure partie, par de petits producteurs et à petite échelle, derrière les cases. C'est une culture de base dans le monde rural (Tollens 2004), qui contribue à la stabilité économique des ménages et aux revenus des populations qui la pratiquent. La culture du bananier et du plantain participe aussi au développement économique local, en garantissant des revenus réguliers, grâce à sa production échelonnée pendant l'année, d'où son rôle important dans la sécurité alimentaire (Tushemereirwe et al. 1999).

Pourtant, dans ce système d'exploitation, le rendement du bananier n'a cessé de diminuer depuis quelques années. En 1987, le rendement du bananier était estimé à 8-10 tonnes/l'hectare (Montcel 1987), en 2006 à 3-7 tonnes/ha (Elengesa 2006) et en 2009 à 4,6 tonnes/ha en moyenne (Dowiya 2009).

Le bassin du Congo est considéré comme un centre de diversification secondaire du bananier plantain (AAB) (Mobambo et al. 2010). Ce centre s'étend sur une large partie ouest de l'Afrique Centrale, incluant le Gabon et la République démocratique du Congo. Cette dernière regorge particulièrement d'une très grande variété de conditions agro-écologiques favorables à la grande diversité de bananiers existante (bananier de génotype A : *Musa acuminata* et génotype B : *Musa balbisiana*) et combinée à une diversité de système culturaux.

Malheureusement, la culture du bananier est soumise à plusieurs contraintes d'ordre biotiques et abiotiques. Pour un pays grand comme la République démocratique du Congo, la hiérarchie des contraintes est certes variable selon la situation géographique, mais les contraintes majeures demeurent les mêmes sur toute l'étendue du pays. Parmi les contraintes biotiques, on peut énumérer les charançons (*Cosmopolites sordidus*), les nématodes (*Radopholus similis*, *Pratylenchus goodeyi*,

Pratylenchus spp, *Meloïdogyne* spp, *Helicotylenchus* spp.), les maladies fongiques (les cercosporioses dues à *Mycosphaerella fijiensis*, *M. musae*, *M. eumusae*, *M. musicola* ; la fusariose causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), les maladies bactériennes (le *Banana Xanthomonas Wilt* due à *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, *Ralstonia solanacearum*) et les maladies virales (Jones 2000, Mobambo et al. 2010).

Les virus du bananier sont responsables de pertes économiques conséquentes. Ils constituent une contrainte majeure à l'amélioration et à l'échange du germplasm. A l'heure actuelle, au moins quatre virus sont répertoriés comme impactant la culture du bananier et du plantain à travers le monde (Kumar et al. 2014). Le *Banana bunchy top virus* (BBTV), le Banana streak virus (BSV), le *Cucumber mosaic virus* (CMV), le *Banana bract mosaic virus* (BBrMV). Le *Banana mild mosaic virus* (BanMMV) est souvent associé aux autres virus et aggrave leurs effets (Gayral et al. 2008). Plusieurs auteurs ont contribué à établir la distribution mondiale du Banana streak virus, du *Cucumber mosaic virus*, du *Banana bract mosaic virus* et du *Banana mild mosaic virus* (Lockhart 1995, Tushemereirwe et al. 1999, Péréfarres et al. 2009). Le BBTV quant à lui est présent dans 33 pays, hors continent américain. Le BBrMV est restreint en Asie aux Philippines, en Inde et au Vietnam. Sa présence en Afrique et principalement en RDC demeure inconnue.

Dans la plupart des pays africains, on observe, depuis quelques années, l'émergence des viroses sur bananier, et plus particulièrement du virus considéré comme le plus dévastateur : le *Banana bunchy top virus*. Il est présent dans plus de 14 pays d'Afrique, y compris la RDC (Blomme et al. 2012). Le BSV est régulièrement rapporté, car c'est un virus qui existe aussi intégrer au génome de *Musa balbisiana* sous une forme latente et qui est capable d'infecter sa plante hôte lorsqu'elle est soumise à des conditions de stress (variation de température et d'humidité). Les travaux de Karanja (2008) ont ainsi mis en évidence la présence du BSV au Kenya, ceux de Gauhl (1999) au Cameroun, de Gatsinzi (1987) au Rwanda, de Harper (2004) en Ouganda et ceux de James (2011) en Tanzanie. Le *Cucumber mosaic virus* est quant à lui reconnu avoir plusieurs hôtes. Il est répandu au sein de nombreuses familles botaniques, ce qui contribue à son maintien sur la culture du bananier et du plantain. Ainsi, le CMV de plus en plus présent sur bananier mérite une attention particulière dans le cadre de certains agroécosystèmes favorables à son

développement. Les études d'Aka (2009) et de Kouassi (2010), en Côte d'Ivoire, celles de Ayo (2014) au Nigéria, de Opiyo (2010) au Kenya soulignent sa recrudescence sur la culture du bananier et du plantain, alors qu'autrefois, il n'était seulement présent qu'en cultures maraichères.

De manière générale, ces virus induisent des symptômes sévères à moins sévères, isolé ou lorsqu'ils sont associés à d'autres virus. Les cas d'infections mixtes ont été mis en évidence entre BBrMV et BanMMV par Iskra-Caruana (2008), entre BSV et BVX en Ouganda par Tushemereirwe (1999) et entre le CMV et le BBrMV par Rodoni (1997). En plus du statut de parasite intracellulaire des virus, leur taille microscopique, leur mode de transmission, la spécificité de leur matériel génétique et la présence des complexes viraux compliquent leur diagnostic et par conséquent, les méthodes qui permettent leur gestion.

En République démocratique du Congo, très peu d'études ont été consacrées à la réalisation d'un état des lieux des maladies du bananier et moins encore à l'épidémiologie moléculaire et à la diversité génétique des virus qui impactent la culture du bananier. Cet état des choses peut être expliqué en partie par la situation sécuritaire de certaines provinces du pays mais est principalement liée à l'absence structurelle d'un service de diagnostic. La présence de *Banana bunchy top virus* a été rapportée pour la première fois en 1950 dans la région de Yangambi, à Kisangani dans l'actuelle province Orientale (Buyckx 1962). Depuis sa découverte, peu de travaux de recherche ont été conduits sur ce problème pourtant essentiel (Kumar et al. 2011). Au stade actuel, peu d'informations sont disponibles sur cette virose. A notre connaissance, aucun autre virus du bananier n'a été rapporté sur le territoire congolais. Pourtant, selon Hauser (2007), l'étude des maladies et ravageurs ainsi que l'étude du système cultural dans le but de déterminer les contraintes économiques et sociales en culture de bananier devraient constituer des programmes prioritaires de la recherche sur le bananier.

Dans un tel contexte, la mise en place de stratégies de gestion intégrée des virus du bananier nécessite non seulement un diagnostic correct et précis de la situation des virus présents, mais aussi la connaissance de la biologie de chacun d'entre eux, leurs spécificités, leur diversité génétique, leur épidémiologie, leur distribution et/ou prévalence.

Tous ces éléments sont à la base de cette étude sur la répartition/distribution des viroses du bananier et du plantain, dans l'optique de mieux les comprendre via une étude de leur diversité génétique et la caractérisation moléculaire des espèces virales. Ces éléments sont le fondement nécessaire, permettant de mieux comprendre les raisons de l'émergence d'épidémies sur le plan local ou régional, tout en facilitant la mise en place de stratégie de contrôle durable, adaptée et cohérente.

Cette thèse est présentée sous forme d'articles scientifiques (format publication). Ces articles se rapportent aux exigences de chaque revue scientifique dans laquelle l'article a été soumis. Elle se subdivise en quatre parties (A, B, C et D).

- ⇨ Une introduction générale présente le contexte dans lequel cette étude est réalisée ;
- ⇨ La première partie (A) intitulée état de l'art, passe en revue la littérature existante sur le sujet traité ;
- ⇨ La seconde partie (B) présente les objectifs, les hypothèses et décrit les approches méthodologiques utilisées ainsi que le milieu d'études ;
- ⇨ La troisième partie (C) qui a deux sections, présente les résultats obtenus. La première section de cette partie contient deux chapitres consacrés au diagnostic moléculaire et à l'épidémiologie des principaux virus associés à la culture du bananier au Sud Ouest de la République démocratique du Congo ; la seconde section renferme un chapitre et rapporte les résultats de la caractérisation moléculaire du *Banana bunchy top virus* ;
- ⇨ Les principales contributions de cette thèse aux avancées scientifiques ainsi que les perspectives de cette recherche font l'objet d'une quatrième partie (D) qui constitue la discussion générale et les perspectives.

Partie A : Etat de l'art

Préambule

« *Mieux connaître le présent pour affronter le futur* »

La culture du bananier et du plantain (*Musa* spp) est une source de revenus et la base des systèmes de production dans plusieurs pays tropicaux et subtropicaux. Le bananier et plantain joue ainsi un important rôle dans la sécurité alimentaire des populations rurales, particulièrement en Afrique où le bananier constitue un aliment de base (Vandamme 2013, Tollens 2004). Pour ces raisons, au cours du siècle précédent, le bananier a capté, de manière soutenue, l'attention de la communauté scientifique et plusieurs évolutions ont été observées (Lassoudière 2012). Les études allant du système de production passant par les contraintes de la production, jusqu'au séquençage complet de son génome ont été réalisées (D'Hont et al. 2012).

Dans cette étude, la partie préliminaire intitulée : « Etat de l'art », une synthèse de l'état actuel des connaissances est présentée. Elle est subdivisée en deux chapitres, le premier rassemble toute l'information sur la culture du bananier, son importance dans le monde et les principales contraintes de son intensification, en République démocratique du Congo. Le deuxième chapitre synthétise les connaissances disponibles sur les virus associés aux bananiers et plantains. Il aborde spécifiquement le cas de chaque virus du bananier tout en mettant en lumière les symptômes et maladies qu'ils occasionnent, les caractéristiques génétiques de chaque virus. Les pertes économiques, les méthodes de détection et de contrôle de ces derniers sont aussi présentées.

CHAPITRE 1

Le bananier : importance et contraintes en République démocratique du Congo

1.1. La culture du bananier et du plantain (*Musa* spp.)

1.1.1. Origine et diffusion du bananier

Le bananier est une espèce naturelle de la région tropicale chaude de l'Asie du Sud-Est, où existent les espèces sauvages *Musa acuminata* Colla et *Musa balbisiana* Colla, séminifères et à fruits non comestibles. Dans ce centre d'origine, au départ, ces espèces ont servi aux usages non alimentaires tels que la construction habitations, des d'abris au moyen des feuilles, la fabrication de filets de pêche avec les fibres ou encore, à l'alimentation pour le bétail. Les multiples mouvements migratoires qui ont eu lieu au long des millénaires, a entrainé une dissémination du bananier vers les régions intertropicales humides, notamment à travers les îles du Pacifique, la Papouasie-Nouvelle-Guinée, l'Indonésie, vers la péninsule indienne et l'Afrique de l'Est (Montcel 1987, Bouman 2001, Blomme et al. 2012).

Au cours de cette diffusion, le bananier s'est adapté à différentes conditions agro environnementales, telles que les centres de diversification secondaire en Afrique de l'Ouest et Centrale dont le basin du Congo pour le plantain et dans le haut plateau d'Afrique de l'Est, pour la banane à cuire et la banane à bière. En République démocratique du Congo, le bananier était connu avant le 16ème siècle, époque à laquelle les premiers explorateurs le trouvèrent chez les populations riveraines du Fleuve Congo (Vandenput 1981). Dans d'autres parties du monde telles que le Brésil, le bananier fut introduit et disséminé de manière précoce en 1516 par les explorateurs (Vandenput 1981).

1.1.2. Description et taxonomie

1.1.2.1. Description

Le bananier est une plante herbacée, vivace dont la hauteur varie entre 1,5 à 8m. L'organe souterrain est un rhizome à partir duquel sont émis des racines et les rejets servant à la multiplication de la plante. La tige est constituée des gaines des feuilles qui s'emboîtent les unes sur les autres, d'où l'appellation du pseudo-tronc.

Le nombre de feuilles varie selon le cultivar de bananier et les conditions environnementales. Néanmoins, une nouvelle feuille est formée tous les 7 à 10 jours. Cependant, cette période peut être allongée lorsque les conditions de croissance ne sont pas optimales. Une plante porte entre 10 et 15 feuilles fonctionnelles au moment de la sortie de l'inflorescence. Du milieu du pseudo-tronc naît une inflorescence portant de nombreuses bractées membraneuses, de couleur violette ou rouge, à l'aisselle desquelles se développe une fleur sessile. Depuis l'extrémité de l'inflorescence jusqu'à sa base, on rencontre de manière successive des fleurs mâles, mixtes et femelles, à ces dernieres succèdent des fruits ou bananes (Figure 1) (Wardlaw 1961, Vandenput 1981, Montcel 1987).

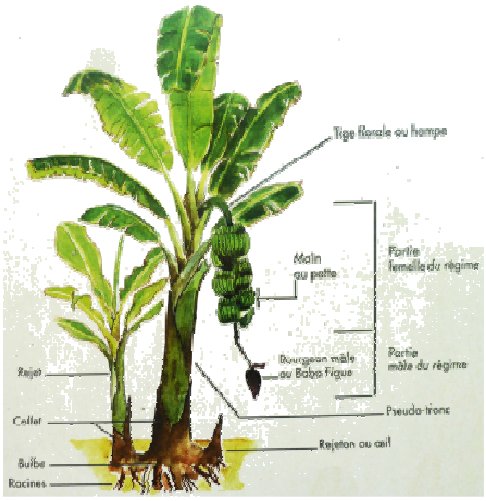


Figure 1. Structure et morphologie du bananier au stade de fructification. Le pseudo-tronc est constitué par un assemblage des gaines des feuilles. Source : adaptée de (Champion 1963, D'Hont 2012)

1.1.2.2. Taxonomie

La classe monocotylédone regroupe plusieurs ordres dont, les *Zingibérales ou Scitaminales* où se range le bananier et plantain. Ce dernier ordre rassemble six familles botaniques parmi lequelles la famille *Musaceae* avec le genre *Musa, Musella* et *Ensete* (Lassoudière 2007).

Les espèces *Musa* sont rassemblées dans quatre sections : la section *Australimusa, Callimusa, Rhodoclamys*, la sous-section *Eumusa* dont le nombre de chromosomes est 11 (n=11). La section Eumusa regroupe 10 à 12 espèces dont certaines à importance agronomique, notamment les espèces *M. acuminata*, (génome A, AA, AAA), *M. balbisiana*, (génome B, BB). Le bananier a une systématique très complexe. Il comprend plusieurs espèces dont les unes sont alimentaires, certaines ornementales (*Musa ensete*) et d'autres à fibres (*Musa textilis*) (Wardlaw 1961). Les espèces alimentaires présentent une très grande variabilité génétique et sont pour la plupart polyploïdes, provenant du croisement de deux principales espèces ancestrales *Musa* : *Musa acuminata* (génome A) et *Musa balbisiana* (génome B) distribuées à partir de l'Asie du Sud-Est. Les hybrides interspécifiques ainsi obtenus sont codés AB, AAB, ABB. Le nombre de lettres traduit le niveau de ploïdie du génome (Figure 2). *M. acuminata* donne des fruits sucrés, elle constitue ainsi un des fruits le plus appréciés des régions productrices. *M. balbisiana* donne des fruits farineux et acides, elle constitue une plante très importante dans la sécurité alimentaire des régions productrices (Montcel 1987).

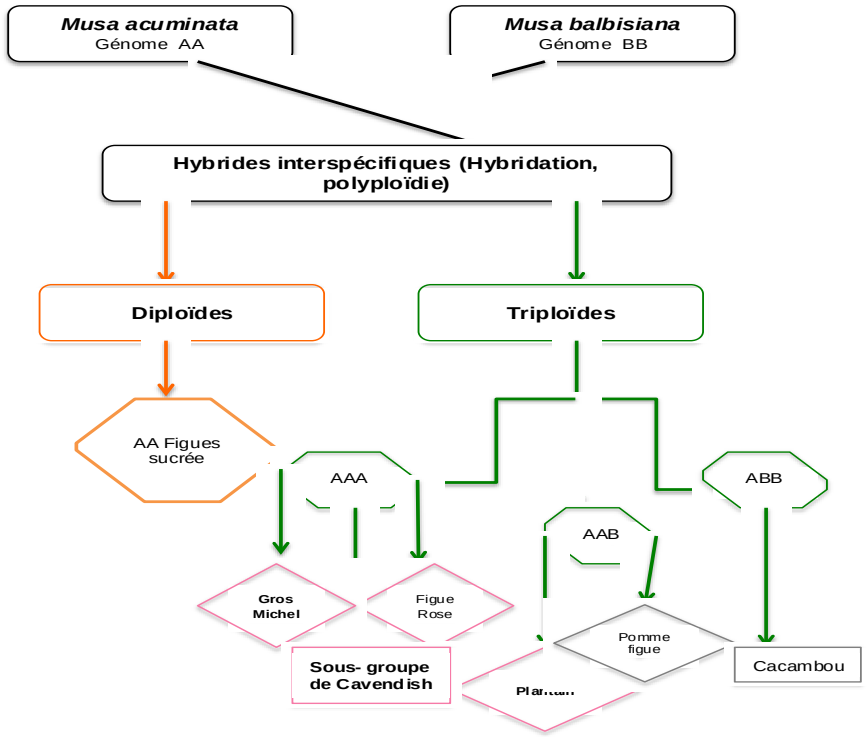


Figure 2. Schéma de classification des variétés de bananier à fruit parthénocarpique indiquant les espèces naturelles de bananier**.** *Musa acuminata* ou banane dessert à génome (AA) et *Musa balbisiana* ou banane plantain (génome BB) d'où viennent les hybrides interspécifiques diploïdes ou triploïdes cultivés et commercialisés. Source. Adapté à partir de Cirad Gret, 2002.

1.1.3. Ecologie et culture

1.1.3.1. Système cultural

Le bananier croît dans divers systèmes culturaux. La culture d'exportation est presque exclusivement basée sur les variétés du sous-groupe Cavendish (Figure 2). Dans ce système de production intensive, la culture du bananier est réalisée en monoculture nécessitant des intrants et un important investissement en termes d'irrigation, traitement aériens. La production pour les marchés locaux s'effectue dans une gamme diversifiée de systèmes culturaux qui vont de l'extensif, fondée sur

les brûlis forestiers à des associations complexes avec des cultures pérennes (cacao, café, palmier à huile), cultures vivrières et fruitières (Cirad-Gret 2002).

En Afrique Centrale et plus particulièrement en République démocratique du Congo, le bananier se développe dans un système extensif, (en plantation derrière les cases ou en plantation de forêt) où ce dernier ne bénéficie d'aucun soin particulier, mise à part la fertilisation organique. En zone forestière, le bananier est cultivé en association avec des essences forestières servant à la production du bois, par exemple avec le *Terminalia superba* ou avec d'autres cultures, notamment les céréales, les plantes à tubercules ainsi que les légumineuses qui permettent une bonne couverture du sol. Ce système permet une économie d'intrant et exige un travail intensif en termes de gestion de la diversité variétale.

En RDC, les cultures intensives de bananier ont existé dans certaines régions telles que la province du Bas Congo, la province Orientale et la province de l'Equateur. Aujourd'hui, les plantations ont vieilli et la plupart des variétés ont dégénéré. La culture du bananier est pratiquée en majeure partie par les petits producteurs, à petite échelle, autour des cases (Figure 4) (Mukwa et al. 2014). Dans ce système d'exploitation, le rendement est généralement faible, entre 3 et 4 tonnes/ha (Dowiya et al. 2009).

Les variétés cultivées dépendent de préférences des populations qui pratiquent la culture. Les variétés de plantain les plus répandues sont des faux-cornes. Au Sud-Ouest de la RDC en particulier, les french plantain et les faux-cornes occupent la majorité de plantations. La variété de bananier dessert cultivée de manière intensive a été la variété Gros Michel (Figure 3). D'autres hybrides issus de l'amélioration génétique comme FHIA-01, FHIA-025 sont présentes, mais en dégénérescence. Ils avaient été introduits dans les années 1998 à 2000 par la direction de plantes fruitières de l'Institut National d'Etude et de Recherche Agronomique, INERA (Bakelana 2005). On rencontre aussi des variétés comme « Poyo », à cycle végétatif de 12 mois et sensibles à la maladie des raies noires, ou « Yangambi » Km5, et une grande diversité de variétés locales désignées au moyen des noms vernaculaires. Les plus répandues sont : la variété « *Mboba* », une banane dessert à chaire ferme, la variété « Bitika », « Mbela » et « Silambela ». Notons que certaines variétés locales tendent à disparaître, suite à l'augmentation des attaques de BBTV.



Figure 3. Plantation de bananier autour des cases à l'Ouest de la République démocratique du Congo**. (A)** Photo prise dans la province du Bandundu en 2012 et **(B)** Photo prise dans la province du Bas Congo, en février 2015.

1.2. Importance économique et sociale du bananier et du plantain

Le bananier et le plantain sont l'une des plus importantes cultures vivrières du monde, cultivée dans 120 pays. Ils constituent une ressource alimentaire considérable, à cause de leur richesse en certaines vitamines, proteines et éléments minéraux, pour plus de 400 millions d'habitants des pays tropicaux et subtropicaux.

En République démocratique du Congo, le bananier est cultivé dans toutes les provinces du pays, à différentes échelles. En 1996, la grande partie de la production nationale de la banane était assurée par la province Orientale (480.915 tonnes), le Nord-Kivu (259.462 tonnes), le Bas Congo (126.419 tonnes), le Sud-Kivu (60.674 tonnes), l'Equateur (99.766 tonnes), le Bandundu (54.408 tonnes), le Kasaï Oriental (50.485 tonnes), le Kasaï-Occidental (49.747 tonnes) et le Katanga (34.413 tonnes) (Minagri 2012)[1]. La province Orientale occupe la première position dans la production, avec plus de 600.000 tonnes de bananes produites, principalement les bananes plantains (Dhed'a et al. 2011). En 2012, les quantités de bananes et plantains produites sont seulement estimées à 832.000 tonnes (Faostat 2016). La culture de la banane contribue à la stabilité économique des ménages et au revenu des populations qui la pratiquent. Elle occupe ainsi, en termes d'importance, au point de vue de la production agricole et des superficies cultivées, la seconde grande

[1] Notons que les statistiques agricoles récentes sont difficiles à obtenir suite au fait que les dernières enquêtes officielles n'ont eu lieu qu'en 1984.

culture après le manioc (Mobambo et al. 2010, Niyongere et al. 2012). Plus de 70% de la population congolaise consomme quotidiennement la banane, sous diverses formes. Du point de vue nutritionnel, la banane entre dans l'alimentation de base de nombreuses populations de la zone forestière du Bas Congo, du Bandundu, de l'Equateur et de la Province Orientale et de la zone d'altitude du pays pour lesquelles elle constitue la source énergétique principale (Elengesa 2006). Elle représente une source d'au moins 25% d'hydrates de carbone dans les repas journaliers des populations vivant dans les régions productrices. Le fruit hautement énergétique (90 calories/100gr) est riche en hydrate de carbone, en phosphore, calcium, fer, vitamine A, B, C. Dans les grandes agglomérations du pays, la banane plantain est considérée comme un aliment de luxe ou de fantaisie au même titre que la patate douce, le spaghetti et la semoule de blé, compte tenu de son prix (Coordination des opérations agricoles d'urgence de la FAO, n°26).

Presque toutes les parties du bananier sont potentiellement valorisables, notamment les tiges, les hampes, le pseudo-tronc, les peaux et les feuilles. La banane plantain est consommée pillée, mélangée au manioc (*lituma*), séchée sous forme des cossettes (pour certaines variétés), chips, bouillie infantile ainsi qu'après vinification traditionnelle. Les sous-produits du bananier servent à l'alimentation du bétail, la construction d'abris, à l'emballage et à la fabrication d'objets d'art ménager et artisanal (Elengesa 2006, Lassoudière 2012).

Ce rôle lui confère une place primordiale dans le système d'exploitation agricole du pays. Au Nord Kivu par exemple, le bananier constitue le centre de gravité du système agro-sylvo pastoral de la région (Vandamme 2013). Il joue un rôle antiérosif et réduit le risque de la sècheresse dans ces régions (Coordination des opérations agricoles d'urgence de la FAO, N°26).

Les statistiques des dernières années montrent que la production nationale annuelle de la banane est passée de 3.12 millions de tonnes en 2000 à 3.22 millions de tonnes en 2012, celle de la banane plantain est passée de 1.17 million de tonnes en 2000 à 5.10 millions de tonnes en 2012 (Faostat 2016). En comparaison avec d'autres cultures vivrières telles que le manioc, la production de la banane reste très faible (Faostat 2016).

Au regard de la production des autres pays ayant des conditions climatiques similaires, la production de la banane en République démocratique du Congo se révèle faible et stationnaire. Les productions du Brésil, du Cameroun et du Burundi sont largement supérieures à celles de la RDC.

Diverses contraintes limitent la production. Ces contraintes sont d'ordre agro-environnementaux (les maladies et ravageurs, la baisse de fertilité des sols, le système de culture…), les contraintes d'ordre social, politique et économique (infrastructures de conservation, transformation, le manque d'information et de formation des agriculteurs) (Swennen et al. 2000, Ortiz et al. 2002, Tollens 2004, Ploetz 2007).

1.3. Les contraintes au développement de la filière de production de la banane en République démocratique du Congo

1.3.1. Les contraintes agro-environnementales

1.3.1.1. Les maladies et ravageurs

En région tropicale et subtropicale, la pullulation des maladies et ravageurs demeure la principale contrainte à la production sur la majorité des plantes cultivées. De la même manière, en Republique démocratique du Congo, le bananier et plantain sont sujets à une gamme variée de maladies, fongiques, bactériennes et virales. Pendant les dix années (2005 à 2015), les problèmes phytosanitaires majeurs sont : la maladie des raies noires (Cercosporiose noire), le flétrissement bactérien (*Banana Xanthomonas Wilt*), la maladie de bunchy top (Tripathi et al. 2009, Viljoen 2010). Le charançon (*Cosmopolites sordidus*) et les nématodes sont aussi particulièrement dévastateurs (Bakelana et al. 1996, Swennen et al. 2000, Dowiya et al. 2009).

La maladie des raies noires (MRN) appelée Cercosporiose noire due à *Mycosphaerella fijiensis*, est l'une des plus graves affections foliaires, fongiques du bananier (Viljoen 2010). Elle est présente dans toutes les zones productrices du bananier en République démocratique du Congo (Onautshu 2013) et entraine des pertes de production considérables qui varient entre 33% et 76% (Bakelana et al. 1996).

Le bunchy top est une maladie virale due au *Banana bunchy top virus* (BBTV), un virus extrêmement dévastateur, pouvant entrainer des pertes de production jusqu'à 100% (Sharman et al. 2000, Caruana et al. 2008). Des pertes économiques importantes ont été enregistrées dans certaines parties du monde. Par exemple, en 1920 en Australie, 90 % des surfaces de production ont été détruites (Fish 1970) ; entre 1922 et 1925 en Queensland, le nombre de plantations ont été réduites de 100 à 4 (Dale et al. 1987) ; en 1990 au Pakistan, une diminution de la production évaluée à 55% a été rapportéer (Jones 1994). En 2009, une réduction de 50 à 95 % de la production a été observée au Malawi (Soko et al. 2009). A l'heure actuelle, cette maladie est présente dans toutes les provinces du pays, à des niveaux d'incidence variables. Les enquêtes menées par différentes équipes de recherche, notamment à l'Ouest du pays, ont montré que la maladie de bunchy top est très répandue dans le bassin du Congo (Kumar et al. 2011).

Le flétrissement bactérien appelé aussi *Banana Xanthomonas Wilt* (BXW), causé par le *Xanthomonas campestris pv musacearum* est une des principales contraintes du bananier au cours des dix dernières années (Tumershereirwe et al. 2004). Observée pour la première fois en 2001 à Bwere, dans le territoire de Masisi (Nord Kivu), la maladie s'est rapidement propagée dans toute la partie Est de la République démocratique du Congo (Aritua et al. 2006, Smith et al. 2008, Vandamme 2013). Aujourd'hui, les symptômes de la maladie sont observés au Nord et Sud Kivu. Le flétrissement bactérien évolue vers la province Orientale et la partie Nord de la province du Katanga. Des symptômes similaires ont été observés en 2012 dans le territoire de Fizi au Sud Kivu, dans le district de la Tshopo dans la périphérie de la ville de Kisangani, dans le territoire de Kalemi et Moba (district du Haut-Katanga) (Fao 2012). Les pertes de production occasionnées par BXW sont énormes (Minagri 2012). Les résultats des enquêtes menées par la FAO en 2010 et en 2012 dressent un bilan d'au moins 14.666 hectares, soit 36% d'emblavure de bananeraie détruite par le BXW pour la seule province du Nord Kivu, 219.990 tonnes de bananes fruits perdues soit une baisse de volume de production de 70-80%. Ces pertes sont évaluées à 23.465.600$ (Minagri 2012).

Le charançon (*Cosmopolites sordidus*) cause des pertes significatives en culture de bananier. C'est la forme larvaire du ravageur qui se nourrit en creusant des galeries

dans la partie basale du pseudo-tronc jusqu'au niveau du cylindre central, ce qui entraine le flétrissement et la chute de la plante (Gold et al. 1994).

Les nématodes sont également responsables de pertes économiques considérables. Ils sont distribués dans les régions productrices du pays et attaquent tous les cultivars du bananier. Les espèces les plus connues sont *Radopholus similis*, le nématode responsable des lésions racinaires (*Pratylenchus goodeyi et Pratylenchus coffeae).* Certaines espèces de nématodes à kyste (*Meloïdogyne* spp) et les nématodes à spirales (*Helicotylenchus multicinctus*) sont aussi repertoriées. De manière générale, les pertes liées aux maladies et ravageurs du bananier ne représentent que 30% sur l'ensemble des pertes pouvant être enregistrées de la production à la commercialisation, le 70% représente les pertes dues au transport, conditionnement, fluctuation des prix sur le marché, etc. (Bakelana et al. 1996, Kalonji-Mbuyi 2008).

La lutte contre les maladies et ravageurs du bananier sous-entend, à court terme, le développement de stratégies biologiques incluant l'usage de prédateurs naturels, des substances naturelles de lutte contre les ravageurs. L'usage des pesticides chimiques doit être envisagé avec prudence suite au risque considérable que présentent ces produits pour la sécurité des utilisateurs et pour l'environnement lorsqu'ils sont utilisés d'une manière inappropriée. L'absence d'innovation en technique de gestion des pestes, le manque de méthodes de lutte efficace et adapté contre les maladies et ravageurs du bananier, l'insuffisance des institutions spécialisées en gestion des pestes et arthropodes ravageurs, freine l'accroissement de la production et par conséquent, décourage l'intensification de la culture de la banane (Tollens 2004). L'élaboration de méthodes alternatives durables passe par le développement de stratégies raisonnées de gestion de maladies associées à la définition des bonnes pratiques agricoles nécessaires à la réduction de la pression parasitaire (Hauser et al. 2007). La recherche des variétés résistantes à ces maladies et le développement de méthodes de lutte biologiques adaptées et plus respectueuses de l'environnement deviennent donc des urgences extrêmes (Tushemeirwe et al. 1999).

1.3.1.2. La baisse de fertilité des sols et le système cultural

Le bananier s'accommode dans un environnement humide à hygrométrie élevée, supérieure à 60%, aux sols profonds, limoneux, bien drainés à pH variant entre 4,0 et 8,0 (Cirad-Gret 2002). L'azote, le phosphore et le potassium sont des éléments majeurs indispensables à la croissance du bananier. Le calcium et le magnésium sont tout aussi nécessaires à la culture (Vandenput 1981, Montcel 1987, Cirad-Gret 2002, VanAsten et al. 2011).

Mis à part les sols de régions montagneuses de l'est du pays, les sols congolais sont en majeure partie ferralitiques, lessivés, acides et pauvres en éléments nutritifs. Les conclusions du travail de Dowiya (Dowiya et al. 2009) confirment qu'à l'est de la République démocratique du Congo, la fertilité du sol ne constitue pas une contrainte pour la culture du bananier. Au sud-ouest par contre, le sol constitue un facteur limitant qui mérite une attention particulière. La culture de bananier est réalisée sans l'apport de fumure minérale ou organique au cours du cycle de la plante, ce qui dégrade rapidement la qualité du sol et est automatiquement associée à une baisse de rendement consécutive (Hauser et al. 2007, Mobambo et al. 2010). Ce constat explique en partie l'existence d'une culture extensive chez les paysans. La productivité de la filière banane dépend des conditions naturelles contrôlées ou maitrisées au mieux par les aménagements, des techniques culturales, des traitements de protection (Lasoudière 2012). Il est dès lors important que la recherche agronomique en RDC soit redynamisée afin de mettre au point des nouveaux itinéraires techniques intégrant le facteur fertilité des sols en système de production du bananier (Hauser et al. 2007).

1.3.1.3. La qualité de matériel de plantation

Le bananier est une plante à multiplication végétative et à haut potentiel de régénération. Sa culture nécessite que le matériel de plantation utilisé soit certifié sain (Vandenput 1981, Montcel 1987, Bakelana et al. 1996, Tripathi et al. 2009). Les travaux respectifs de Dowiya en 2009 et de Elengesa (2006), ont montrés qu'il n'existe aucune structure dédiée à la sélection variétale et/ ou à la culture de tissu à l'est du pays (Dowiya et al. 2009), et sur l'ensemble du territoire congolais

(Elengesa 2006). Le diagnostic des maladies des plantes permettant de certifier l'état sanitaire des plantules est réalisé, depuis 2009, à la Clinique des Plantes de Kinshasa, un laboratoire qui fonctionne avec l'appui technique de l'Unité de Phytopathologie de l'Université catholique de Louvain (Muland et Mukwa 2009). Une initiative de la faculté des sciences de l'Université de Kinsangani a permis de developper un laboratoire de multiplication *in vitro* à Kisangani, dans la province Orientale (Dhed'a 2013, communication personnelle).

1.3.2. Les contraintes politico-économiques

1.3.2.1. Encadrement des producteurs

Depuis plus de 30 ans, la filière de production de la banane n'a pas bénéficié de l'attention des décideurs congolais (Bakelana 2005). Les producteurs sont voués à leur propre sort alors qu'il existe de sérieux problèmes et que cette culture présente d'immenses opportunités de développement. La production de la banane est ici l'apanage des paysans et rarement de quelques planteurs qui ont hérité de plantations autrefois destinées à la culture d'exportation (Vandenput 1981, Mobambo et al. 2010). Cette attitude s'explique dès lors que, les techniques culturales modernes développées dans d'autres pays demeurent inconnues des agriculteurs congolais (Chausse et al. 2012). Le matériel de plantation est dégénéré, il y a absence de grandes plantations et recrudescence des pathologies (Swennen et al. 2000). Le développement de la filière banane exigerait l'adoption des pratiques modernes, du matériel de plantation performant, l'intégration des techniques de fertilisation minérale, organique et la gestion raisonnée des maladies et ravageurs. Ceci implique un encadrement des producteurs ainsi qu'une recherche agronomique opérationnelle (Mobambo et al. 2010).

1.3.2.2. Transport, infrastructure de conservation et de transformation

La banane et la banane plantain sont des fruits à dépérissement rapidement. De nos jours, il n'existe aucun dispositif pour la conservation et/ ou la transformation de la banane (Tollens 2004). La banane est récoltée dans les zones où les routes de

dessertes agricoles sont très délabrées. Les bananes sont stockées à même le sol sous des abris de fortunes en attendant un véhicule de transport (Figure 4). Ce facteur influence négativement la production intensive de la banane. Et pourtant, l'intensification de la production agricole suppose la mise en place de moyens de transport performants en vue de l'acheminement vers les centres de consommation. Dans un contexte où, en tant que système de production, la culture autour de cases est prédominantes, la production est assez dispersée et l'accès vers les centres de production est difficile, vu l'état délabré des voies de desserte agricole. Le moyen de transport vers le centre de consommation, l'inexistence d'unités de conservation et de transformation constituent donc un goulot d'étranglement et un défi réel à relever.

La création d'unités de transformation artisanale, l'adaptation des technologies de conservation, au contexte des producteurs congolais, permettra d'éviter les pertes et de récupérer le surplus de production. La banane pourrait ainsi être transformée (Bakelana et al. 1996, Elengesa 2006).

1.3.2.3. Les acteurs de la filière banane en RDC

Actuellement, la filière banane n'est pas très organisée, les producteurs travaillent en ordre dispersé. La recrudescence du BXW à l'est du pays, ces dernières années, a mis autour de la table les acteurs impliqués dans cette filière. Il s'agit notamment des organisations non gouvernementales locales et internationales, des services étatiques chargés de l'administration, de la production, des stations de recherche, notamment l'INERA M'Vuazi, des facultés des sciences agronomiques, des secteurs privés, ainsi que des associations privées impliquées dans le contrôle de la qualité de matériel de plantation. Au niveau national, une commission de coordination des activités de lutte contre les maladies du bananier et du manioc a été mise en place pour créer un cadre de concertation et rassembler les différents acteurs.



Figure 4 (A). Stockage des bananes en bordure de la route nationale N°1 (Bas-Fleuve au Bas Congo), avant leur acheminement vers Kinshasa, le centre de consommation.



Figure 4 (B). Etat des routes de dessertes agricoles dans la province du Bas Congo, axe Tshela-Nganda sundi.



Figure 4 (C). Le transport de la banane du champ vers le bord de la route (à vélo ou à moto) et de la grande route vers le centre de consommation (gros camions).

CHAPITRE 2

Les viroses du bananier et du plantain (*Musa* spp.)

2.1. Introduction

Les maladies virales du bananier et du plantain représentent une contrainte majeure à l'amélioration et la production du bananier, par conséquent une menace pour la sécurité alimentaire des nombreuses populations des régions tropicales et subtropicales. Des pertes de rendement dues aux maladies virales dépendent largement du cultivar, des conditions agro-environnementales et de l'espèce virale associée. Les diminutions de rendement variant entre 15 à 100% peuvent être enregistrées en cas d'infection sévère sur des cultivars sensibles. A ce jour, six principaux virus [*Banana bunchy top virus* (BBTV), Banana streak viruses (BSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Banana mild mosaic virus* (BanMMV) et *Banana virus X* (BVX)] ont été répertoriés sur la culture de bananier à travers le monde, mais quatre espèces virales, BBTV, BSV, CMV et BBrMV sont réputées avoir une influence considérable sur le rendement de la culture (Kumar et al. 2014). *Banana mild mosaic virus* est majoritairement associé aux autres virus et est rarement descrit associé aux symptômes qui lui sont propres (Caruana 2003).

Certains de ces virus sont mondialement distribués, *Banana bunchy top virus* par exemple (Figure 5) et d'autres, tels que *Banana bract mosaic virus*, restent limités à certaines zones géographiques. Les lignes suivantes présentent chacun des six virus répertoriés sur le bananier.

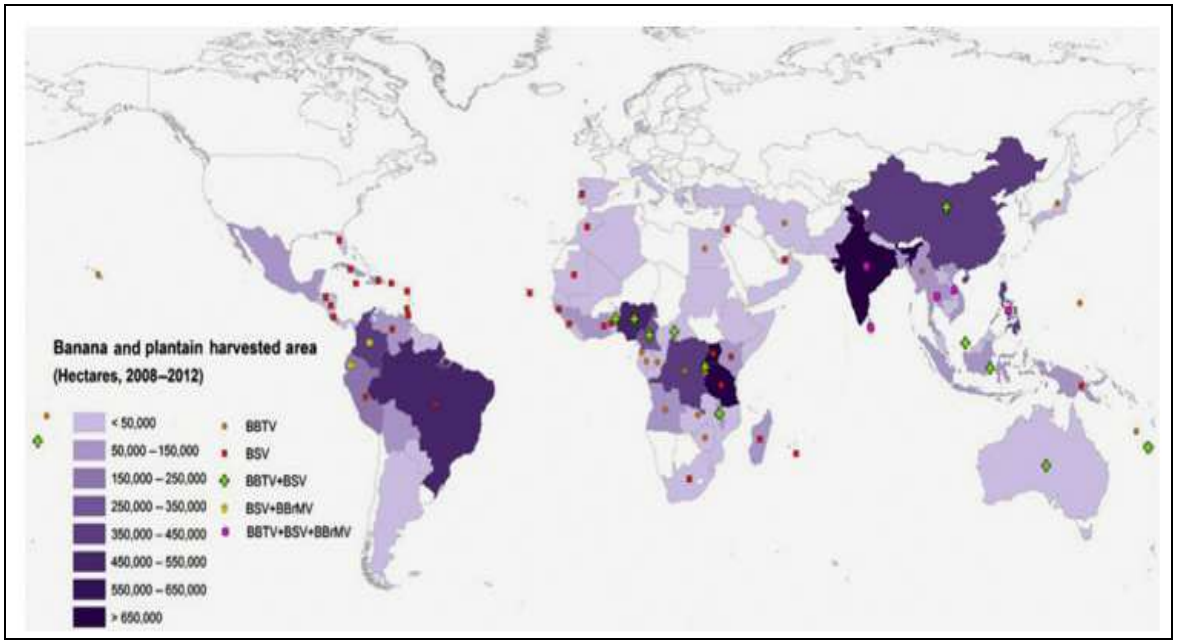


Figure 5. Distribution des principaux virus du bananier et plantain dans le monde. Les points rouges indiquent la présence du Banana streak virus, les points oranges représentent le *Banana bunchy top virus.* Les infections mixtes sont indiquées par des points oranges (Kumar et al. 2014).

2.2. Les viroses provoquées par des virus à ADN

2.2.1. Banana bunchy top disease (BBTD)

2.2.1.1. Introduction

La maladie du bunchy top appelé aussi « *la maladie du sommet buissonnant* » est causée par le *Banana bunchy top virus* (Anhalt et al. 2008). Le virus est transmis par le puceron noir du bananier *Pentalonia nigronervosa* Coquerel (Ferreira et al. 1997, Kagy et al. 2000, Anhalt et al. 2008, Harish et al. 2009, Dizon et al. 2012). Elle a été signalée pour la première fois en 1889 aux Iles Fidji et par la suite identifiée dans la région du Pacifique, en Asie et en Afrique (Vandenput 1981, Caruana 2003). L'entrée en Afrique serait plus tardive, vers 1901 en Egypte et en 1950, au Congo Belge, dans la région de Kisangani, par l'introduction de rejets infectés offerts en cadeaux (Wardlaw 1961, Buyckx 1962, Vandenput 1981, Blomme et al. 2012). La propagation vers les autres pays s'est principalement effectuée par l'échange de rejets. En Afrique, cette maladie est désormais endémique dans 14 pays dont la République démocratique du Congo (Thomas et al. 1994, Mobambo et al. 2010, Kumar et al. 2011, Blomme et al. 2012). Elle demeure la maladie la plus économiquement destructrice affectant les bananiers dans le monde (Thomas et al. 1994, Chandrassekar et al. 2011). Les pertes de production dues au *Bunchy top* peuvent être évaluées à 40% (Fao 2012). L'étude réalisée par Kumar (2011) a démontré que la fréquence du Banana bunchy top disease est très élevée dans le bassin du Congo. Environ 80% des plantes analysées étaient symptomatiques tandis que l'analyse des échantillons visiblement sains a montré que 1 échantillon sur 5 est infecté par le BBTV, soit une fréquence de 20% sur les plantes asymptomatiques (Kumar et al. 2011).

2.2.1.2. Symptômes

Les symptômes du bunchy top sont très précis, clairement identifiables de ceux causés par les autres virus du bananier. La maladie de bunchy top confère aux pieds infectés un aspect nanisant fortement marqué et les feuilles prennent un aspect dressé et se concentrent en forme de rosette en haut du plant. Les feuilles deviennent

étroites, érigées, cassantes et présentent de fortes chloroses marginales (chlorose des bords de feuilles) ainsi que l'apparition des traits discontinus verts foncés le long du pseudo-tronc, des nervures principales et secondaires (Figure 7A & 7B). Dès que le pied mère est contaminé, le virus colonise de manière systémique, très rapidement la plante hôte et se répartit dans tous les rejets. Ces derniers ont leur croissance arrêtée et présentent un nanisme important qui induit une impossibilité de production durant le cycle cultural suivant (Wardlaw 1961, Caruana 2003). Les plants de bananier peuvent être infectés à tous les stades de croissance (Figure 6A). Il existe des différences initiales entre les symptômes développés par un plant infecté par puceron et un plant issu du matériel végétal infecté. Chez un plant infecté par le puceron, les symptômes apparaissent habituellement sur la seconde feuille émergente après l'inoculation et sont caractérisé par des stries vert foncé, l'enroulement foliaire avec des bordures chlorotiques. Cependant, sur les rejets infectés, on observe des symptômes très sévères sur la première feuille émise et ces rejets connaissent un nanisme important. Les feuilles paraissent alors parfaitement dressées mais courtes. D'où cette appellation de « bunchy top » ou « sommet touffu » en français (Caruana 2003, Thomas et al. 1999, Blanc et al. 2008).

A  **B** 

Figure 6. (A). Symptômes caractéristiques de la maladie de bunchy top du bananier sur un pied infecté tardivement, photo prise sur l'axe Kinshasa –Kikwit en RDC (2011) **; (B).** Symptômes caractéristiques de la maladie de *bunchy top du* bananier sur les rejets venant d'un pied mère infecté, photo prise à Luila, sur l'axe Kinshasa - Matadi en RDC (2012).

2.2.1.3. Agent causal et taxonomie

La maladie de bunchy top des bananiers est causée par *Banana bunchy top virus* (BBTV). Un virus circulant caractérisé par un virion isométrique de 18 - 20nm, appartenant à la famille des *Nanoviridae* et au genre *Babuvirus*. Il possède un génome à ADN monocaténaire (ss) multipartite composé de 6 à 10 ADN circulaires d'au moins 1Kpb, encapsidés séparément dans des particules icosaédriques (Figure 7) (King et al. 2012). Chaque ADN possède deux régions communes « *common region* » : la région Stem-loop (CR-SL) de 69 nucléotides dont 62% sont constitués de la partie conservée et la « *Major common region* » (CR-M) située à l'extrémité 5' de la Stem-Loop region (CR-SL), de 92 nucléotides dont 76% sont une région conservée (Burns et al. 1995). Chaque ADN code pour une protéine ayant un rôle important dans le fonctionnement du virus (Gronenborn 2004). L'ADN -1 (ADN-R) joue un rôle important dans la réplication du virus. L'ADN-2 (ADN-N) code pour la proteine de la navette. L'ADN-3 (ADN-S), code pour la protéine de capside (Wanitchakorn 1997). L'ADN-4 (ADN-M) code pour la protéine de mouvement, l'ADN-5 (ADN-C) joue un rôle dans le cycle cellulaire du virus. Le rôle de l'ADN 6 (ADN-U3) reste inconnu à ce jour (King 2012).

En se basant sur l'analyse de la séquence de l'ADN-R du *Banana bunchy top virus*, deux grands groupes phylogénétiques ont été distingués : (1) le groupe Pacifique Sud (PSG) et (2) le groupe Asiatique (SG). L'ADN satellite est associé uniquement aux isolats du groupe Asiatique. L'autre différence entre ces deux grands groupes phylogénétiques réside au niveau des variations de séquences de l'ADN-R, l'ADN-N et de l'ADN-S. Le groupe Pacifique Sud regroupe les isolats d'Australie, du Burundi, de l'Egypte, des Iles Fidji, de l'Inde, de Tonga et de l'Ouest de Samoa tandis que le groupe Asiatique comprend les isolats des Philippines, de Taiwan, du Vietnam, de la Chine (Karanja et al. 2008, King et al. 2012).

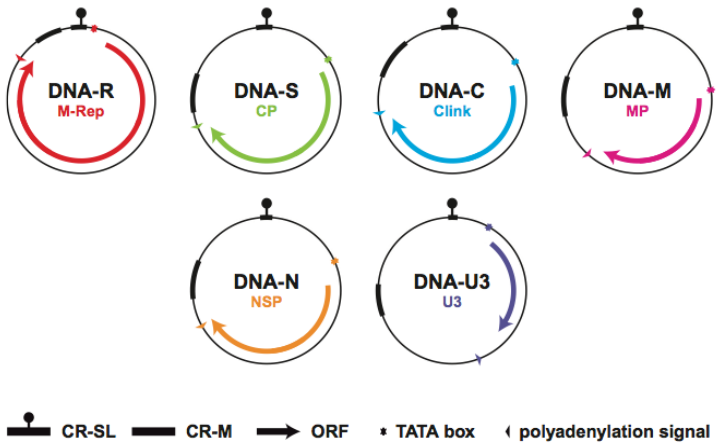


Figure 7. Diagramme illustrant l'organisation génomique des virus du genre *Babuvirus* et décrivant la structure des six ADN composant le génome viral. Dans chaque cercle représentant les ADN (1060-50nt), identifié en ADN-R, ADN-C, ADN-M, ADN-S-, ADN-U3, ADN-N est marqué le nom par lequel l'ADN est désigné, le nom de la protéine codée, la position de la « *Common steem-loop region* » (CR-SL) et de la « *major common region* » (CR-M). Les flèches se rapportent à l'emplacement et à la taille approximative du cadre ouvert de lecture (ORF) et la direction de la transcription. Des particularités ont été observées chez certaines espèces de *Babuvirus* notamment chez *Abaca bunchy top virus* (ABTV). Chez cette espèce, (i) aucun cadre ouvert de lecture (ORF) n'a été identifié sur l'ADN-U3 de deux isolats *Abaca bunchy top virus* (ABTV) et dans plusieurs isolats de *Banana bunchy top virus* du groupe asiatique d'une part. (ii) l'ADN-R de *Banana bunchy top virus* (BBTV) possède un petit ORF interne qui code pour une protéine de 5kDa (U5) et s'est avéré être potentiellement transcrit de l'ADN-R de BBTV (King et al. 2012).

2.2.1.4. Agent vecteur, cycle de la maladie et épidémiologie

Le *Banana bunchy top virus* est transmis selon le mode persistant par le puceron noir : *Pentalonia nigronervosa* Coquerel (Figure 9), connu comme un puceron spécifique du bananier, appartenant à l'ordre des homoptères, à la famille *Aphididae*, genre *Pentalonia*. La transmission du virus s'effectue de manière circulante, non propagative. Le virus se situe dans le système digestif et les glandes salivaires du vecteur (Bressan et al. 2011). La latence est estimée à au moins 18heures après acquisition pour qu'un puceron soit virulifère (Wardlaw 1961). Les récentes études ont mis en évidence l'existence d'une autre espèce du genre *Pentalonia* nommée *Pentalonia caladii*, isolée de plantes de la famille *Zingiberaceae* (Bhadra et al. 2010). Mais sa capacité de colonisation de bananier et de transmission du BBTV reste inconnue.

Pentalonia nigronervosa colonise préférentiellement (8 à 95% des cas) les gaines foliaires et dans certains cas, le bas du pseudo-tronc de la plante hôte (Robson et al. 2006). *Banana bunchy top virus* est un parasite obligatoire, spécifique au bananier et effectue son cycle de multiplication dans cette dernière. Il est préférentiellement localisé dans le tissu du phloème où il induit une désorganisation qui est à l'origine de symptôme de traits discontinus vert foncés. Le virus se réplique durant une courte période au point d'inoculation du puceron, ensuite il descend dans le pseudo-tronc vers le méristème basal, et finalement vers le bulbe, les racines et remonte dans les feuilles nouvellement formées. Cette réplication n'a pas été démontrée dans les feuilles formées avant l'infection, expliquant ainsi le fait que le puceron n'acquiert pas le virus à partir de ces feuilles. Le plant de bananier nouvellement infecté ne devient réservoir qu'à partir du moment où une nouvelle feuille présentant des symptômes est émise.

La dissémination du BBTV s'effectue de deux manières : sur des courtes distances, la diffusion de la maladie est assurée par le puceron noir *Pentalonia nigronervosa* Coquerel, alors que la diffusion sur de longues distances s'effectue principalement par le déplacement de matériel végétal infecté (rejets, souches, vitroplants) (Caruana 2003). La maladie ne peut être transmise mécaniquement par les outils de récolte, ni par le contact du sol. Tous les cultivars et espèces *Musa* testés jusqu'à présent

semblent être sensibles au *Banana bunchy top virus*, bien que la période d'incubation soit variable (Thomas et al. 1994).

Selon une étude menée en Australie sur le suivi d'infection, il a été démontré que la distance moyenne de démarrage d'un deuxième foyer d'infection dû au puceron varie entre 17.2 et 20m, partant du foyer d'infection sans ou avec l'aide de vent. La probabilité de contamination par le BBTV d'une nouvelle plantation, dans les douze premiers mois de la culture, est estimée à 88% en plantation commerciale (Allen et al. 1977, Thomas et al. 2000).

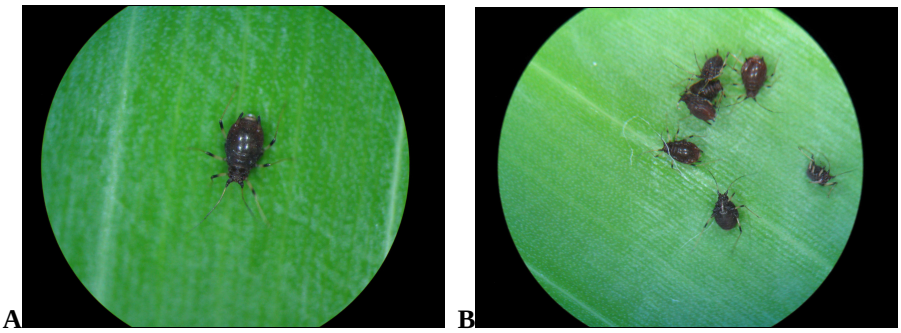


Figure 8 A&B. *Pentalonia nigronervosa* agent vecteur de *Banana bunchy top virus*.

2.2.1.5. Méthode de diagnostic du *Banana bunchy top virus*

- **Observation des symptômes et *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**

Généralement, les symptômes de banana bunchy top disease sont très clairement identifiables sur la majorité des cultivars de bananiers, cependant les bananiers de type plantain ou ayant du genome B présentent des symptômes plus difficile à observer. Dans certains cas, ce virus peut être combiné à d'autres espèces virales, ce qui rend moins fiable l'observation. De manière routinière et en contexte de laboratoire moins équipé, une observation de symptômes associée à un test Elisa (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilisant des anticorps spécifiques permet de mettre en évidence la présence du virus de manière fiable (Caruana 2003). La détection du BBTV au moyen du test ELISA est très utilisée actuellement, dans les pays africains où sévit la maladie. Des sérums polyclonaux et des anticorps

monoclonaux (anticorps ne reconnaissant qu'un seul épitope) sont disponibles et utilisables de manière performante à travers les kits commerciaux de test ELISA.

Réaction de polymérisation en chaîne et ses variants

Plusieurs auteurs ont montré que la détection moléculaire des viroses du bananier reste fiable, sensible et adaptée au traitement d'un grand nombre d'échantillons (Mansoor et al. 2005). Le BBTV en tant que virus à ADN simple brin, est facile à détecter par PCR grâce à l'usage des amorces spécifiques designées à partir des régions conservées de son génome. Mais l'étape d'amplification doit être précédée de l'extraction de l'ADN total de bananier.

En vue de contourner l'étape d'extraction d'ADN qui peut également libérer des inhibiteurs de PCR en diagnoctic de plantes, une technique combinant la réaction immunologique et moléculaire a été mise au point, pour la détection des virus : l'Immunocapture – PCR (IC-PCR) (Harper 1999). Il existe également des techniques permettant de détecter, au cours de la même réaction, deux ou plusieurs virus. Selvarajan (2008) a mis au point une technique multiplex permettant de détecter simultanément le BBTV et le BSV. Sharman (2000), quant à lui, a développé une technique colorimétrique pour la détection simultanée de BBTV, CMV et BBrMV. Malheureusement, bien qu'adaptée, cette technique pose des problèmes de reproductibilité lors des analyses de routine.

- Loop – mediated amplification (LAMP)

La Loop-mediated amplification a été rapportée pour la première fois dans l'étude de (Notomi et al. 2010). Comme technique ne nécessitant pas d'appareil PCR coûteux, est puissante pour amplifier l'ADN. Cette technique permet d'amplifier l'ADN en une étape isotherme à une température unique entre 60 et 65°C et évite les cycles de température complexe de la PCR classique. Elle présente une rapidité, une efficacité, une spécificité élevée puisque l'amplification ne s'effectue que lorsque les six régions de l'ADN cible sont reconnues par les amorces. De manière brève, la Loop-mediated amplification s'effectue en trois étapes, notamment une étape d'initiation, une étape d'amplification circulaire et une étape d'élongation. Elle

emploie une ADN polymérase et une série de quatre amorces conçues pour reconnaître six séquences sur l'ADN cible (Figure 9). Les amorces contenant des séquences à brin sens et anti-sens de l'ADN cible initie l'amplification l'ADN qui servira de matrice pour la synthèse des ADN en utilisant les autres amorces. Elle semble être une technique adaptée lorsqu'on travaille avec des moyens très limités. La Lamp a montré ses limites pour une utilisation des routines. Ainsi, elle est actuellement très utilisée pour le développement des Kits commerciaux destinés à la détection précoce des certains agents pathogènes (Mori et al. 2009).

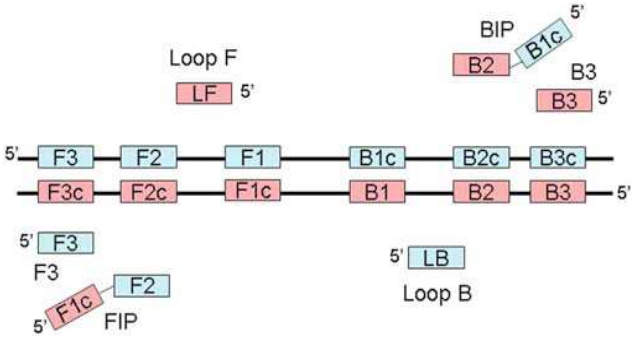


Figure 9. Représentation schématique de la loop-mediated amplification (LAMP)**.** Sur la séquence d'ADN de sens 5'-3'sont représentées les six régions de l'ADN cible F3, F2, F1, B1c, B2c, B3c. Les mêmes régions sont représentées sur le brin complémentaire de sens 3'-5'. Quatres amorces sont utilisées dont deux internes FIP (BIP) composées de F2 (B2) et F1c (B1c) et les amorces externes désignées dans la région intermédiaire F3 (B3). Les amorces Loop sont désignées entre la région F1c (B1c) et F2c (B2c). L'amplification ne se réalise que lorsque les six régions de l'ADN cible sont reconnues par les amorces. Source : (Mori et al. 2009).

- **Rolling circle amplification (RCA)**

Le Rolling circle amplification est une technique isothermale, très simple, permettant d'amplifier les ADN simple brin circulaire et adaptée pour les génomes viraux circulaires ou utilisant une replication de type rolling cercle (*Géminivirus*, *Nanovirus*, *Babuvirus* et *Badnavirus*). Elle utilise un bactériophage Phi29 DNA polymérase qui est une séquence indépendante. Le rolling circle amplification (RCA) permet d'amplifier, de caractériser et de cloner les séquences complètes des virus à génome circulaire simple brin tels que les *Geminiviridae* (Haible et al. 2006) et les *Nanoviridae*, dont le BBTV (Figure 10) (Stainton et al. 2012). Cette technique

a été élargie à la détection des virus à séquences non spécifiques dont les virus à ADN doubles brins, notamment à la détection des espèces de BSV (James 2011).

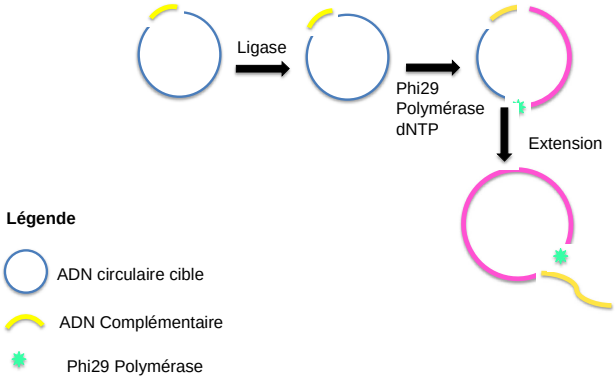


Figure 10. Représentation graphique du « Rolling Circle Amplification (RCA) »**,** pour la détection des virus à ADN simple brin circulaire comme les *Nanoviridae* et les *Geminiviridae.* Le cercle en bleu représente l'ADN circulaire cible, l'ADN complémentaire représente l'amorce qui doit se lier sur l'ADN cible et initier l'amplification sous l'action de la polymérase. Source : Adapté d'après Lapitan (2015).

2.2.1.6. Contrôle et gestion de la maladie

Une fois la maladie installée, elle est difficile à éradiquer. En Australie, la maladie de bunchy top avait été contrôlée grâce à un programme strict de quarantaine qui avait abouti dans certaines zones à une éradication totale. Aujourd'hui cependant, le BBTV est de nouveau en extension en Australie car les mesures de contrôles sont coûteuses et difficile à maintenir. La lutte contre la maladie de bunchy devrait se situer à différents niveaux :

- **Le diagnostic et la surveillance comme moyens de prévention contre le BBTV**

Le BBTV entraîne de dégâts énormes. Les pertes peuvent être importantes si la maladie n'est pas diagnostiquée précocement et si des mesures phytosanitaires strictes ne sont pas mises en place (Jones 2000). L'identification de symptômes et la suppression des plantes réservoirs sont des moyens efficaced et moins onéreux en usage dans la surveillance et le suivi d'un grand nombre de plantes. Cependant, les observateurs doivent être très bien entrainés et expérimentés pour détecter

précocément de façon fiable les plants infectés asymptomatiques. Ainsi, la mise en œuvre de programmes d'éducation et de suivi pour les planteurs semble avoir un impact significatif sur l'extension du BBTD. D'autre part, l'utilisation de tests de diagnostic au laboratoire ou de kits de détection rapide sur le terrain permet un contrôle plus affiné lors de la surveillance de la progression de la maladie. En laboratoire, les méthodes de diagnostics modernes et sensibles, sont actuellement disponibles afin de s'assurer que le matériel de plantation (rejet, vitroplant) est indemne du virus. Par exemple, la réaction de Polymérisation en Chaine (PCR) utilisant des amorces spécifiques aux séquences de BBTV peut être effectuée. Les méthodes sérologiques peuvent être préconisées à condition d'une disponibilité en anticorps spécifiques au BBTV. Il n'existe à ce jour aucune variété de bananier résistante connue. L'établissement des zones de quarantaine, la restriction du mouvement de matériel et de l'utilisation du matériel de plantation certifié ; l'inspection régulière des plantations sensibles à la maladie de *Bunchy Top* permettent de diminuer significativement le risque d'infection.

- La lutte curative

Le moyen de lutte intégrée sous une gestion participative, en adoptant les techniques mécaniques d'arrachage et de destruction des plantes attaquées, agit efficacement sur des réservoirs des virus et le foyer d'infection. Le moyen d'éradication par excellence demeure la destruction systématique des plantes visiblement infectées et la replantation avec du matériel sain. La lutte chimique utilisant les insecticides systémiques contre l'agent vecteur *Pentalonia nigronervosa*, le remplacement total des souches infectées pour éviter leur réémergence, sont autant de moyens de lutte efficaces.

Sur une étendue beaucoup plus importante à la taille de la République démocratique du Congo, la mise en place d'une approche légale permettant le contrôle du mouvement de matériel végétal de base, l'exclusion de la maladie pour les zones encore indemnes et faiblement affectées ainsi que l'éradication systématique des plants infectés pour les zones faiblement et fortement infectées doivent être mises en œuvre.

2.2.2. Banana streak disease (BSD)

2.2.2.1. Introduction

La maladie de la mosaïque en tirets appelée « Banana streak disease » est une grande contrainte à la distribution et à l'échange du germplasm sain du bananier (Caruana 2003, Thomas et al. 2015). Elle est causée par le Banana streak virus dont plus de 10 espèces distinctes sont répertoriées aujourd'hui. On parle de complexe d'espèces pour une seule et même maladie (James et al. 2011).

Les premiers symptômes de la maladie ont été observés pour la première fois entre 1958-1966 dans la vallée de Nieky en Côte d'Ivoire, où 30% des plants dont certains de cultivar « Poyo » (AAA syn. Grande naine) étaient infectés. Le virus n'a été isolé que plus tard, en 1986 (Lockhart 1986). A la même période, des symptômes similaires ont été observés au Sénégal et au Mali. Les symptômes ont par la suite été observés dans plusieurs pays d'Afrique, notamment au Maroc, au Nigéria, en Afrique du Sud, en Tanzanie (James 2011), au Malawi, à Zanzibar, en Guinée, au Ghana, au Rwanda, au Bénin, au Cameroun, au Kenya (Karanja et al. 2008), en Ouganda (Tushemereirwe et al. 1999, Kubiriba et al. 2001, Caruana 2003, Harper et al. 2004), en Australie et à Madagascar (Blomme et al. 2012). Dans le monde, la maladie en tirets est signalée également en Asie et en Amérique Centrale (Kumar et al 2015). En République démocratique du Congo, la situation du Banana streak disease reste inconnue à ce jour, aucune information n'est disponible sur sa présence, sa distribution et son incidence.

2.2.2.2. Symptômes

Les symptômes caractéristiques de la maladie de la mosaïque en tirets du bananier ont longtemps été confondus avec ceux induits par le virus de la mosaïque en plage du bananier (*Cucumber mosaic virus*) (Tushemereirwe et al. 1999). Les symptômes et leur sévérité sont variables selon le cultivar, l'espèce virale présente et les conditions environnementales (Ndowara et al. 1999). De manière générale, la maladie se caractérise par la présence de tirets jaunes sur le limbe des feuilles formant ainsi des mosaïques chlorotiques, évoluant en nécroses (Figure 11A&C). Leur reconnaissance est facilitée par l'observation en transparence des feuilles vis-à-

vis d'une source de lumière (le soleil par exemple). Dans certains cas, on observe l'éclatement du collet chez la plante infectée (Figure 11B). L'apparition des symptômes est la plupart du temps dépendante des conditions de températures (Dahal et al. 1998), ainsi des bananiers peuvent être infectés sans qu'il y ait apparition de symptômes. Les particules bacilliformes s'isolent facilement par semi-purification à partir de broyât de feuilles infectées (Lockhart 1986). Elles peuvent être observées en microscopie électronique après coloration négative (Caruana 2003).

Outre les symptômes foliaires, les plants atteints présentent une réduction de vigueur, de production et une distorsion des fruits. Dans des cas sévères de la maladie, le fruit ne se remplit pas et présente des défauts de maturation, de même certains cultivars présentent une nécrose du méristème principal qui conduit à la mort de la plante.

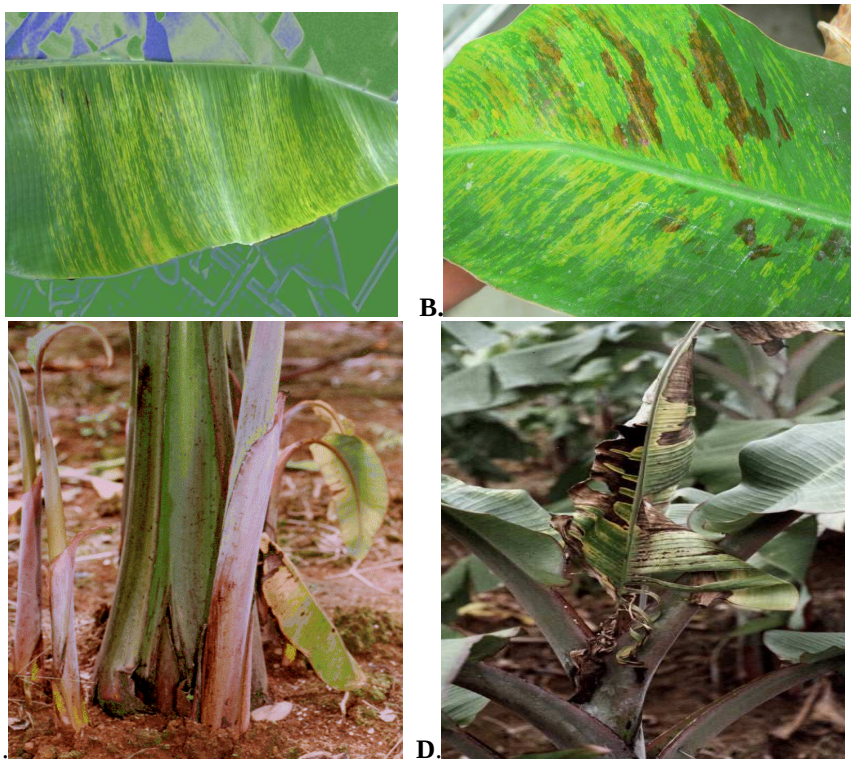


Figure 11. Symptômes caractéristiques de la maladie en tirets **: (A)** stries sur le limbe des feuilles ; **(B)** : symptômes du Banana streak disease sur la dernière déployée ; **(C)** : éclatement du pseudo-tronc ; **(D) :** dépérissement de la feuille cigare. Source : (Caruana - communication personnelle)**.**

2.2.2.3. Agent causal et taxonomie.

Le Banana streak virus (BSV), synonyme : *Banana streak mosaic virus*, est un virus possédant un génome à ADN (ds) double brin circulaire et une particule virale bacilliforme non enveloppée (Figure 12A), dont la taille varie de 30x120-150nm (Iskra-Caruana et al. 2003, Harper et al. 2004) et le génome de 7 à 8 Kbp (Lockhart 1986). Le BSV appartient à la famille *Caulimoviridae* qui répliquent leur génome grâce à la transcriptase inverse virale, via un ARN monocaténaire, les désignant sous le nom de *Pararetrovirus*[2] *(EPRV : Endogenous Pararetrovirus)* opposé aux retrovirus qui, en préalable à leur multiplication, intègrent le génome de la cellule hôte (Iskra-Caruana et al. 2003) sous forme de provirus. La famille *Caulimoviridae* comporte au moins sept genres dont le genre *Caulimovirus* représenté par le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) et le genre *Badnavirus* dont le virus type est *Commelina mottle virus* (ComMV). Le BSV appartient au genre *Badnavirus*, qui comporte 12 espèces et 4 virus potentiels (Regenmortel et al. 2000, Harper et al. 2004).

Le génome des *Badnavirus* est constitué d'au moins trois cadres ouverts de lecture (ORFs) sur un seul brin d'ADN (Figure 12B). L'ORF1 code pour une petite protéine de 20,8 kDa, associée au virion, dont la fonction est inconnue. Le second cadre ouvert de lecture (ORF2) code pour une protéine d'environ 14 kDa. Cette protéine jouerait un rôle dans l'assemblage de la particule virale (Harper et al. 1998). Le troisième cadre ouvert de lecture (ORF3) code pour une large polyprotéine de 210 KDa qui est clivée en plusieurs protéines fonctionnelles dont la protéine de capside, la ribonucléase H (RNaseH), la transcriptase inverse (RT) et la protéase aspartique (AP). L'ORF3 présente ainsi les gènes gag (protéines structurelles) et pol (fonction enzymatique) décrits chez les retrovirus animaux (Harper et al. 1998). Outre les propriétés communes aux *Badnavirus*, certains d'entre eux, tel que le BSV, ont la particularité d'être infectieux sous deux formes :

(1) La forme épisomale qui correspond au virion : il s'agit de la forme ordinaire du virus, contenant le génome viral à ADN bicaténaire, encapsidée et transmissible par la cochenille vectrice d'une plante à l'autre ;

[2] Pararetrovirus ou endogenous pararetrovirus : virus repliquant leur génome grâce à une transcriptase inverse virale, via un ARN monocaténaire.

(2) La forme ADN intégrée au génome *Musa balbisiana* (noté B) du bananier, appelée eBSV pour « endogenous Banana streak virus » : cet ADN viral plus grand qu'un génome viral présente une succession de fragments viraux de diverses tailles et orientations (sens et non sens) permettant la reconstitution d'un génome viral complet et fonctionnel produisant des virions (Iskra-Caruana et al. 2003, 2010).

Les conclusions de récentes études montrent qu'il existe au moins trois espèces BSV intégrées dans le génome du bananier. Ces intégrations sont activées par des contraintes telles que celles liées à la culture de tissus (Dallot et al. 2001) ou des stress abiotiques auxquels est soumis le bananier (stress hydriques et écarts de températures) (Dahal et al. 1997b).

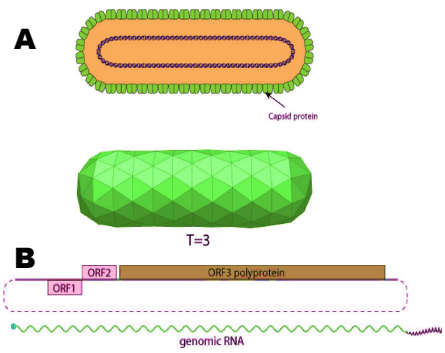


Figure 12. Organisation génomique de Banana streak virus. **(A)** L'ellipse intérieure bleue représente le génome à ADN double brin. L'extérieur vert représente la protéine de capside, **(B)** La représentation linéaire de couleur grise montre la position des trois cadres ouverts de lecture (ORF) et la ligne verte sinusoïdale indique la cartographie de l'ARN de transcription avec la position de l'extrémité 3' (Source :www.viralzone.expasy.org 2009).

L'analyse pionnière des séquences d'isolats nigériens de BSV, a montré des faibles variations nucléotidiques en fonction de l'origine géographique et en fonction du génotype de bananier hôte (Lockhart 1986). Les études suivantes ont montré une très forte hétérogénéité entre les différents isolats BSV, du point de vue sérologique et génétique alors qu'ils sont tous responsables de la même maladie. Ainsi, chez le BSV, il est fréquent de rencontrer une diversité moléculaire pouvant aller jusqu'à 40% sur la région RT et RNaseH ; on parle alors d'espèces virales distinctes induisant une même maladie la mosaïque en tirets des bananiers (Lheureux et al. 2007). La majorité des isolats BSV sont ainsi classés en espèces sur la base de

comparaison de la région conservée de l'ORFIII, codant pour la RT/RNaseH, décrivant une variabilité nucléotidique importante. L'ICTV (*Internationl Commitee on Taxonomy of Viruses*) considère que les souches d'un virus sont d'espèces différentes lorsque la région conservée de la Transcriptase inverse - ribonucléase H (RT/RNaseH) présente une différence d'indice de similarité d'au moins 20% (Regenmortel et al. 2000, King et al. 2012). Les séquences Badnavirus identifiées chez le bananier se distribuent actuellement en trois clades. Les séquences et génomes correspondant aux particules virales BSV sont réparties dans les clades 1 et 3 ; Le clade 1 contient toutes les espèces BSV répandues à travers le monde dont certaines ont des contre parties intégrées eBSV et le Clade 3 regroupe uniquement les espèces BSV observées en Ouganda sans aucune correspondance intégrées (eBSV). Le Clade 2 regroupe quant à lui des séquences badnavirus présentes dans le génome *Musa* qui ne disposent pas de correspondant épisomal et qui partagent un même virus ancêtre avec le BSV (Iskra-Caruana et al. 2013, 2014).

Les principales espèces majoritaires mondialement sont : le *Banana streak MY virus* (BSMYV), le *Banana streak GF virus* (BSGFV), le *Banana streak IM virus* (BSIMV), le *Banana streak OL virus* (BSOLV) (Geering et al. 2010, Geering et al. 2011).

2.2.2.4. Agent vecteur, cycle de la maladie et épidémiologie

Les virus phytopathogènes se disséminent soit à travers les organes de multiplication (transmission interne ou verticale), soit à travers un vecteur, généralement des insectes (transmission externe ou horizontale). La dissémination du BSV s'effectue de trois manières : (i) par l'action des vecteurs, (ii) par les matériels de plantation infectés (rejets) et (iii) par le génome de la plante ayant des eBSV.

La dispersion de ce virus par les vecteurs s'effectue en mode semi-persistant, par au moins trois espèces de cochenilles différentes : *Planococcus citri, Dysmicoccus brevipes* et *Saccharicoccus sacchari* (Lockhart et al. 1999). Cette transmission à courte distance est peu rapide en raison de la mobilité restreinte des cochenilles vectrices. La propagation de la maladie est assurée en partie par l'utilisation de matériel de plantation infecté (vitroplant, rejets), compte tenu du fait que le bananier se multiplie principalement par voie végétative. Le BSV se comporte comme un

parasite obligatoire et effectue son cycle de multiplication dans la plante hôte. Il colonise progressivement cette dernière depuis son point de pénétration suite à l'inoculation par la cochenille, en passant prioritairement par les racines, le méristème principal, remonte à travers la voie de distribution de la sève vers le bourgeon apical, et l'infection devient alors systémique. Tous les rejets issus du pied principal ou pied mère sont infestés. L'infection n'est pas strictement corrélée à la présence de symptômes. L'usage de matériel de plantation infecté est un élément déterminant dans la dissémination à longue distance de ce virus. La transmission du BSV par les outils aratoires reste très peu probable suite aux composés phénoliques et à certaines substances inhibitrices présents dans la plante hôte (Lockhart 1995).

L'infection du bananier par voie interne se réalise via les séquences virales endogènes (eBSV) présentes naturellement dans l'espèce *Musa balbisiana* (génome B). Elle concerne principalement les hybrides interspécifiques haploides pour le chromosome B (AB, AAB, AAAB) (Iskra-Caruana et al. 2010) qui sont pour la plupart du temps sains sans particule virale. Ces bananiers sont capables, sous des conditions de stress particulières (stress hydrique, stress lié à la technique de propagation de masse par culture *in vitro*), de restituer spontanément un génome viral infectieux à partir des eBSV du génome *Musa balbisiana*. La biologie de ce génome viral suit ensuite le cycle habituel de multiplication et colonisation de la plante décrit lors d'une infection virale d'origine extérieure (transmis par cochenille). Une fois la plante infectée, le virus complet peut alors être transmis à d'autres plantes selon le mode habituel via des cochenilles (iskra-Caruana 2010).
Les vitroplants de bananier ayant un chromosome B, même issus de pieds mère indemnes, sont le matériel le plus exposé pour une dispersion potentielle rapide et difficilement contrôlable du virus. En effet, les premières étapes de culture *in vitro* ont un effet déclencheur de l'activation des séquences virales endogènes (Dallot et al. 2001). Cependant, cette technique semble au contraire avoir un effet curatif par rapport à d'autres techniques de macro propagation (PIF, plants issus de fragments de tige) de part la compétition de multiplication intensive de cellules saines par rapport aux cellules infectées. Elle a ainsi pour effet de produire un grand nombre de plantes indemnes (près de 90%) (Cote et al. 2010). L'infection BSV à partir des eBSV étant spontanée, la difficulté majeure a résidé ces dernières années dans

l'incapacité à différencier un matériel à risque d'un matériel sain et d'anticiper le moment exact du déclenchement de l'infection (Iskra-Caruana et al. 2010).

2.2.2.5. Séquences endogènes de Banana streak virus (eBSV)

Certaines espèces virales subissent des transformations accidentelles suite aux interactions avec leurs plantes hôtes et peuvent ainsi évoluer simultanément. Ce phénomène de coévolution est certainement à l'origine de la présence des séquences virales dites séquences endogènes ou séquences intégrées (EPRV) dans le génome de l'hôte, puisque aucun virus végétal n'oblige à une intégration au génome hôte pour sa multiplication. Actuellement, de telles séquences sont identifiées dans différentes plantes d'intérêt agronomique, notamment chez le bananier (Banana streak virus), le pétunia (*Petunia vein clearing virus* ou PVCV), la tomate, le tabac et le riz, etc., (Jakowitsch et al. 1999, Feschotte et Gilbert 2012) ; la plupart des virus ayant les EPRV sont classés dans la famille *Caulimoviridae* (King et al. 2012*).* Les EPRV peuvent être non infectieux ou infectieux (Iskra-Caruana 2003, Staginnus et al. 2009).

Les EPRV non infectieux ou bénins ont généralement des séquences partielles de virus et/ou des mutations qui altèrent leur capacité de production de particules virales. Ils sont distribués sur de nombreux chromosomes du génome hôte, généralement insérés dans l'hétérochromatine, dans les régions centrométriques et péricentrométriques des chromosomes qui constituent en soit des régions non-transcrites (Iskra-Caruana et al. 2003, Hohn et al. 2008). Les EPRV infectieux ou pathogènes contiennent au moins un génome viral fonctionnel qui peut être restituer et induire une infection de la plante hôte (Iskra-Caruana et al. 2003, 2010, Chabannes et Iskra-Caruana 2013).

Les séquences virales endogènes infectieuses n'ont jusqu'à présent, été identifiées que sur le bananier (Gayral et al. 2008, Chabannes et al. 2013), le pétunia (Richert-Pöggeler et al. 2003) et le tabac (Lockhart et al. 2000).

Chez le bananier, les EPRV infectieux nommés eBSV sont présents uniquement dans le génome B de l'espèce *M. balbisiana* et ont été mis en évidence pour la première fois par Harper et al. (1999) et Ndowora et al. (1999).

A ce jour trois espèce BSV ont été identifiées (Goldfinger virus (BSGFV), Obino l'ewaï virus (BSOLV), Imové virus (BSIMV)) comme intégrées dans le génome B et caractérisées chez le bananier diploïde *M. balbisiana* PKW (BB). Chaque intégration est constituée de plusieurs fragments du génome viral, dupliqués et réarrangés, formant une intégration virale de taille bien supérieure au génome viral linéarisé. Chaque espèce BSV est présente à un seul et même locus sur les deux chromosomes B de PKW. BSOLV et BSGFV présentent chacune deux formes alléliques dont une seule est infectieuse contrairement à BSIMV qui a le même allèle sur les deux chromosomes. L'allèle infectieux reconstitue un génome viral suite à des recombinaisons homologues (Iskra -Caruana et al. 2010, Chabannes et Iskra-Caruana 2013). Des analyses de synténie avec la séquence du génome *Musa acuminata* disponible (D'hont et al. 2012) ont permis de localiser eBSGFV et eBSOLV sur le chromosome 1 et eBSIMV sur le chromosome 2. Des marqueurs moléculaires permettant d'identifier ces eBSV et de distinguer les allè les ont été développés. Leurs utilisation complétée d'analyses Southern blots ont montré que ces intégrations étaient fortement conservées au sein de la diversité *Musa*, (bananiers diploïdes BB et interspécifiques AB, ABB et AAB) (Duroy et al. 2016). L'ensemble de ces données a permis d'identifier ces eBSV comme des marqueurs de phylogénie et de proposer une histoire retraçant l'évolution entre les génomes viraux et bananiers (Iskra-Caruana et al. 2014).

2.2.2.6. Méthode de diagnostic de Banana streak virus

- Immunocapture - PCR

Le Banana streak virus est l'un des virus le plus complexe des végétaux, dans la mesure où ce virus est intégré naturellement au génome de la plante hôte. En effet, le diagnostic moléculaire et la détection du virus sont difficiles dans la mesure où les deux génomes viraux ont des homologies de séquences importantes, le risque de faux positifs se pose. Le bananier sain à génome B peut être considéré comme infecté et ayant des particules virales alors qu'il est bien sain et sans virion.

La détection du virus permettant de diagnostiquer la maladie se base essentiellement sur la présence de particules virales. La variabilité et la diversité génétique du BSV ont nécessité le développement d'un sérum polyvalent à partir de plusieurs espèces

BSV purifiées incluant des badnavirus de canne à sucre (Lockhart et al. 1993). Ainsi, les anticorps polyclonaux polyvalents dirigés contre les *Badnavirus* en général et particulièrement, le *Sugarcane baciliform virus,* ont été développés afin de détecter une gamme large d'espèces BSV. Ce sérum polyclonal réagit également avec des protéines de plantes dues à la difficulté d'avoir de bonnes purifications virales et limite le développement d'un test sérologique de type ELISA dû à un bruit de fond important. Enfin, ces anticorps ne sont pas en mesure de détecter certaines espèces de BSV endémiques en Ouganda du clade 3 (BSUIV, BSUJV, BSULV, BSUMV) (Kumar et al. 2014). La PCR quant à elle détecte, sans distinction, la forme intégrée du virus et la forme épisomale et ne permet pas de distinguer un sujet sain d'un sujet infecté pour les bananiers qui ont du génome B.

Pour surmonter cette limite, et discriminer les deux types de séquences, la technique d'Immunocapture-PCR (IC-PCR) a été développée afin de cibler uniquement des particules épisomales du BSV responsable de l'expression des symptômes (Harper et al. 1999). L'IC-PCR combine l'approche sérologique et l'approche moléculaire éliminant les contraintes des deux techniques utilisées seules. Elle consiste en un coating de plaques au moyen d'un anticorps polyclonal (antisérum BSV ou SCBV) qui permettra d'immunocapturer le virus présent dans le jus de plante à analyser. A l'issue de l'étape d'Immunocapture, une PCR est directement réalisée sur la plaque en utilisant des amorces spécifiques au BSV. Le Provost et al. (2006) ont développé une PCR multiplex utilisant dans un même puit des amorces spécifiques de microsatellites de bananiers afin d'avoir un témoin interne d'amplification d'ADN résiduel de plante. Aujourd'hui, un traitement DNase (95°C/10minutes) est effectué dans l'objectif d'éliminer cet ADN résiduel facilitant le diagnostic d'infection faible.

2.2.2.7. Gestion et contrôle de la maladie

La maladie de la mosaïque en tirets est l'un des problèmes biotiques les plus complexes sur la culture du bananier. Le contrôle de cette dernière est très laborieux et presque impossible sans la participation de tous les acteurs de la filière. Le contrôle du vecteur constitue un moyen de lutte qui peut être mis en place dans les régions encore indemnes. La lutte chimique contre le vecteur peut être envisagée, mais elle reste non justifiée vu la faible responsabilité du vecteur dans la propagation à grande distance de la maladie. La mise en œuvre d'un programme

d'éradication des plants infectés n'est pas un moyen pratiquement réalisable et sans intérêt dès lors de l'existence naturelle d'eBSV dans le génome des bananiers hybrides. L'utilisation de rejets de bananier indemnes en remplacement des plantes infectées reste importante même s'ils contiennent des eBSV infectieux, de manière à diminuer la quantité de BSV disponible pour les cochenilles vectrices. Dernièrement, des marqueurs (*derived cleaved amplified polymorphism sequences* : dCAPS) permettant de distinguer une plante sans eBSV et une plante renfermant des eBSV responsables d'infection BSV ont été développés (Chabannes et al. 2013, Iskra-Caruana et al. 2014). Il n'existe pas de lutte chimique ni de cultivar résistant au Banana streak virus (Caruana 2003). La plupart des variétés *Musa* à génome A sont sensibles à l'infection BSV. Au niveau scientifique, les chercheurs œuvrent à la mise en place de stratégies pour le contrôle à long terme de ce virus complexe du bananier.

2.3. Les viroses causées par les virus à ARN

2.3. 1. Cucumber mosaic Disease (CMD)

2.3.1.1. Introduction

La chlorose infectieuse du bananier ou la mosaïque en plage du concombre est l'une des affections virales responsable des pertes sur une large gamme des familles botaniques y compris les cultures maraichères et le bananier (Yu et al. 2005, Kouassi et al. 2010). Elle a été rapportée, pour la première fois, comme étant une infection du bananier, en New South Wales (Australie) en 1924 et a été considérée comme étant typique de certains types de sol (Wardlaw 1961).

Les pertes économiques importantes ont été observées dans les années 1990 en Côte d'Ivoire suite à l'utilisation intensive et nouvelle de *vitroplants* qui se sont avérés plus accessibles aux pucerons porteurs de ce virus. Depuis, peu de pertes ont été observées sur bananiers dont l'importance dépend étroitement du stade phénologique de la plante attaquée (Wardlaw 1961). Dans plusieurs pays, la présence de *Cucumber mosaic virus* a été signalée sur de nombreuses plantes hôtes de diverses familles botaniques : *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, Ombelifères légumineuses et sur les cultures ornementales. La chlorose infectieuse est souvent

désignée comme une maladie insidieuse présente dans tous les pays producteurs de banane. En Afrique, sur le bananier, la chlorose infectieuse a été observée dans différents pays notamment en Côte d'Ivoire (Aka et al. 2009, Kouassi et al. 2009), au Nigéria (Ayo-John et al. 2014), au Kenya (Opiyo et al. 2010). En République démocratique du Congo, aucun travail n'a rapporté jusqu'à ce jour, la présence, la distribution, l'incidence du *Cucumber mosaic virus*.

2.3.1.2. Symptômes

La chlorose infectieuse du bananier peut présenter des symptômes assez variables, mais les plus communs se caractérisent par des plages de décoloration chlorotique, sous forme de mosaïque chlorotique sur le limbe (Figure 13 A & B), la nervure principale ainsi que sur le pseudo-tronc des jeunes feuilles (Montcel 1987). Il n'est pas rare aussi d'observer des déformations de la feuille et un nanisme de la plante. Dans le cas d'atteintes sévères, les feuilles déployées ainsi que la feuille cigare se déforment (Wardlaw 1961). Des infections secondaires peuvent apparaître sous la forme de pourriture de type bactérien de l'intérieur des gaines constituant le pseudo-tronc. La répartition du virus dans la plante est généralement hétérogène au sein d'une souche de bananier avec des rejets sains et infectés. Une grande concentration virale se situe dans la nervure principale de la dernière feuille produite. Mais tous les rejets produits par un pied infecté ne sont pas toujours contaminés.

A  **B** 

Figure 13. Symptômes caractéristiques de la chlorose infectieuse du bananier **: (A)** : déformation accompagnée d'une mosaïque sur la dernière feuille déployée et la feuille cigare ; **(B)** tirets jaunes de grande taille, visibles sur la face supérieure des feuilles, Source : (Caruana 2013).

2.3.1.3 Agent causal et taxonomie

L'agent causal est un virus, *Cucumber mosaic virus*, membre de la famille *Bromoviridae*, du genre *Cucumovirus*, qui possède un virion polyhédrique de 28-30nm de diamètre, contenant trois ARN linéaires simples brins encapsidés et un ARN sub génomique encapsidé dans une particule distincte (Roossinck et al. 1999) (Figure 14). Le cinquième ARN, nommé ARN5 venant de la conservation imparfaite de l'extrémité 3' du génome, est présent chez certains isolats et est associé à l'expression des symptômes chez certaines plantes, notamment chez le bananier. Le CMV possède un génome composé de cinq cadres ouverts de lecture (ORF) (Figure 14). L'ORF1a et 2a, codent respectivement sur ARNs 1 et 2, ils sont des composantes virales de la réplicase. L'ARN1 et 2 jouent un rôle très important dans l'initiation de l'infection. L'ORF 2b s'exprime sur une ARN subgénomique. L'ARN3 code pour la protéine de mouvement et la protéine de capside tandis que l'ARN4 encode un suppresseur post-transcriptionel du silencing. Ainsi, l'infection d'une plante par le CMV dépend, largement, de la présence des 3 brins d'ARN. D'un point de vu sérologique, les isolats CMV sont regroupés dans deux sous groupes nommés DTL (Sous groupe I) désigné WT (présent dans les régions tropicales et subtropicales) et TRS (Sous groupe II), désigné S, correspondant à deux classifications basées sur l'hybridation de l'acide nucléique. Les souches CMV s'attaquant au bananier appartiennent toutes au sous-groupe I (Owen et al. 1990).

Le *Cucumber mosaic virus* est transmis principalement par les pucerons via le mode non persistant. La chlorose serait due à la diminution du taux de chlorophylle et à la destruction des chloroplastes dans les cellules infectées (Gallitelli 2000, Jones 2000, Dheepa et al. 2010, Kouassi et al. 2010).

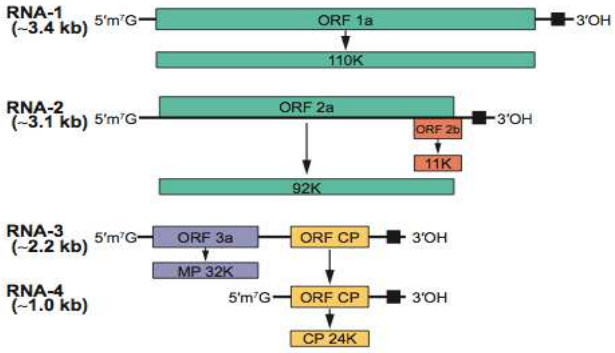


Figure 14. Organisation génomique des virus membre de la famille de *Bromoviridae* dont *Cucumber mosaic virus.* ARNs1, 2 et 3. Le cadre ouvert de lecture (ORF 2b) est spécifique au genre *Cucumovirus*, il constitue la région privilegiée pour la détection de ce virus. Source : (King et al. 2012, Roossinck 2002).

2.3.1.4. Agent vecteur, cycle de la maladie et épidémiologie

Une large gamme d'espèces de pucerons (60 espèces différentes) sont capables de transmettre le CMV, principalement l'espèce *Aphis gossypii, Rhopalosiphum maïdis, Rhopalosiphum prunifoliae, Myzus persicae et Macrosiphum euphorbia*, selon un mode non persistant. La gamme de plantes hôtes du virus est extrêmement large et comporte plusieurs espèces de solanacées et de cucurbitacées, plus de 800 espèces végétales différentes. Pour certaines familles botaniques telles que chez les légumineuses, le CMV se transmet par les semences, elles constituent ainsi un réservoir de l'inoculum (Jones 2000, Lockhart 2002). La chlorose infectieuse du bananier peut aussi être transmise mécaniquement par les outils de taille et les matériels aratoires. La transmission par le matériel de plantation (semences ou rejets) est aussi importante dans certaines cultures et les plantes adventices servent d'hôtes alternes (Gallitelli 2000).

Le *Cucumber mosaic virus* peut être acquis et transmis par au moins 60 espèces différentes de pucerons pendant de très brèves et superfcielles piqûres tests de plantes hôtes. Le puceron acquiert également le virus lorsqu'il s'alimente sur une plante infectée et peut demeurer infectieux au cours de toute sa vie. Sur les cultures maraîchères, le CMV provoque de grandes pertes dans les légumes, les plantes ornementales et les fruits. Le virus est destructeur en raison de sa propagation rapide par plus de 60 espèces de pucerons dans le champ. En Afrique, les vecteurs existent et sont présents dans les régions de production du bananier, à côté de cultures

maraîchères et des plantes sauvages qui constituent des réservoirs de ce dernier, comme par exemple : *Commelina* spp, *Bryonia*, *Stellaria*, et autres (Gallitelli 2000, Jones 2000).

Méthodes de diagnostic

Le *Cucumber mosaic virus* peut être détecté en utilisant plusieurs méthodes de diagnostic notamment l'inoculation du virus sur des plantes indicatrices (tabac, chénopodes, etc.), le test ELISA, la RT-PCR (Yu et al. 2005) et la microscopie électronique. Kouassi (2010) a développé la PCR quantitative (Real –time PCR (qRT-PCR) pour le screening de matériel de plantation en Côte d'Ivoire. Iskra-Caruana (2008) a développé une technique Immunocapture RT-PCR en une seule étape pour la détection du BBrMV. Cette technique a été étendue pour la détection des autres virus à ARN notamment le CMV et BanMMV. Elle demeure, actuellement, l'une des meilleures techniques de détection du *Banana bract mosaic virus* et de *Cucumber mosaic virus* (Yu et al. 2005).

2.3.1.6. Gestion et contrôle de la maladie

Les méthodes de lutte contre les maladies virales sont assez semblables. Seules quelques différences peuvent être observées en tenant compte des caractéristiques biologiques, génétiques et épidémiologiques spécifiques à chaque virus (Wardlaw 1961). La gestion de la maladie par la sélection des rejets sans symptômes parmi les rejets d'une souche de bananiers dont le pied cultivé est infecté, permet d'éliminer la maladie. Cette approche simple permet de diminuer significativement l'impact du virus sur la culture du bananier.

Néanmoins, le contrôle de la maladie de la mosaïque du bananier doit également être préventif. Le moyen par excellence de prévention contre la chlorose infectieuse du bananier demeure le diagnostic précoce de la maladie, avant la plantation. L'usage de matériel de plantation certifié sain diminue la propagation de la maladie. En culture de tissus, il est nécessaire de s'assurer que le rejet mère soit certifié sain et que le prélèvement se fasse à partir du méristème apical. Des techniques de détection sérologiques et moléculaires peuvent être utilisées avec succès pour prouver l'absence du CMV (Gallitelli 2000).

La destruction des adventices et le maintien de la propreté du champ permettent de perturber le cycle de vie des pucerons dont le bananier n'est pas la plante hôte, et par conséquent de lutter efficacement contre eux.

La lutte chimique peut être aussi envisagée pour diminuer les populations des pucerons, tout en rappelant qu'elle ne diminue pas assez l'inoculation de CMV suite au nombre élevé et à la spécificité des espèces de vecteurs impliqués dans la transmission de la maladie. Le bananier plantain est plus sensible à la chlorose infectieuse que le bananier dessert (Montcel 1987).

Une approche respectueuse de l'environnement pour contrôler le *Cucumber mosaic virus* est de conférer une résistance par introgréssion des gènes provenant des espèces sauvages. Il a été démontré que *Musa balbisiana* présente généralement des symptômes légers et que, même lorsque les rejets de *Musa balbisiana* présentent des symptômes, ils disparaissent lorsque la plante atteint la maturité (Stover 1972). Mais de manière générale, l'incidence de CMV est élevée sur les bananiers du type Cavendish (Lockhart et al. 2000).

2.3.2. Banana bract mosaic disease (BBrMD)

2.3.2.1. Introduction

La mosaïque des bractées est une maladie virale du bananier due au *Banana bract mosaic virus*, en sigle BBrMV (Thomas et al. 1997). Observée pour la première fois en 1979 aux Philippines, la maladie s'est répandue assez rapidement en Inde, au Sri Lanka, en Thaïlande, au Vietnam et à Samoa (Thomas et al. 2000). Néanmoins, elle reste limitée à certaines zones géographiques (Rodoni 1997, Thomas et al. 2000). Le BBrMV est un virus spécifique du bananier, transmis en mode non-persistant par trois différentes espèces de pucerons : *Aphis gossypii*, *Rhopalosiphum maidis* et *Pentalonia nigronervosa*. Des pertes de productions liées au BBrMV supérieures à 40% ont été rapportées aux Philippines (Diekmann et al. 1989, Ploetz 1994). La distribution géographique limitée, combinée à la transmission végétative de ce virus, fait de lui un important agent de quarantaine et une contrainte à l'échange de matériel de plantation. En République démocratique du Congo, la présence et la distribution du BBrMV restent inconnues.

2.3.2.2. Symptômes

La mosaïque des bractées du bananier se caractérise par l'apparition de petites lésions circulaires, de couleur noire sur les bractées de bananiers infectés (Figure 15A, B, C&D). Des décolorations type mosaïque, chlorotique ou rougeâtre du pseudo-tronc peuvent apparaître selon les cultivars, augmentant ainsi leur pigmentation : jaune/blanc. Sur un fond rouge et noir, rouge et jaune sur un fond vert. Souvent, des larges traits colorés en forme de fuseaux apparaissent sur le limbe des jeunes feuilles et disparaissent très rapidement dès que la feuille devient mature. Lorsque l'infection est très sévère, les fruits peuvent présenter des mosaïques verts/jaunes importantes. Dans certains cas, la configuration du pseudo-tronc change et les feuilles se rangent de manière aplatie. La plante présente ainsi l'aspect de l'arbre du voyageur (*Ravenala madadascariensis*) (Thomas et al. 2000).

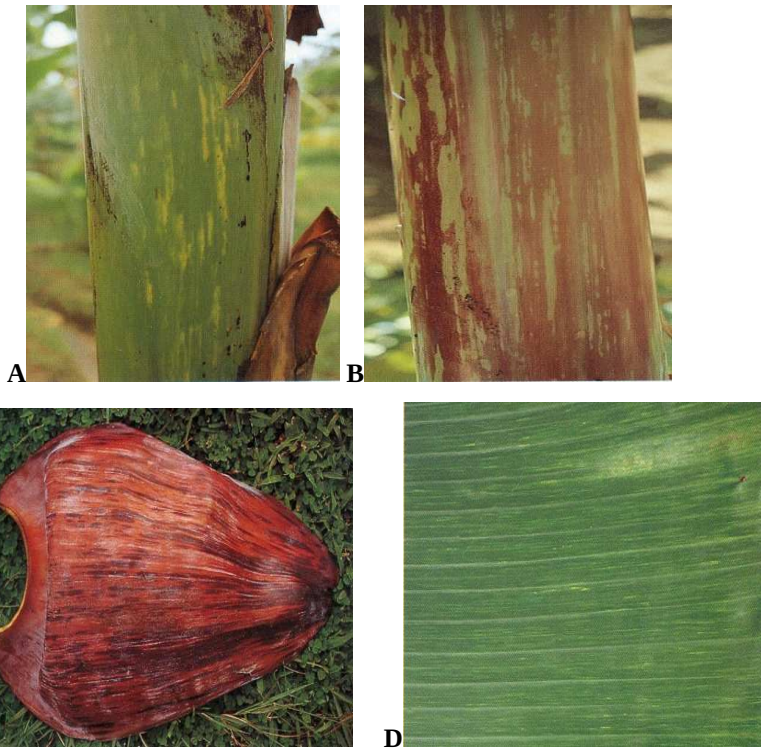


Figure 14. Symptômes caractéristiques de la mosaïque des bractées : (A) mosaïque sur pseudo-tronc de couleur vert ; (B) mosaïque sur pseudo-tronc à couleur rouge ; (C) mosaïque sur bractées ; (D) mosaïque sur feuilles. Source : (Jones 2000, Caruana 2013).

2.3.2.3. Agent causal et taxonomie

L'agent pathogène responsable de la mosaïque de bractée du bananier est un virus à ARNss, filamenteux flexueux de 750 x 11 nanomètres de taille (Figure 16 A &B). Le BBrMV contient une protéine de capside de 38-39 kDa. Il appartient à la famille *Potyviridae*, au genre *Potyvirus* (Diekmann et al. 1989).

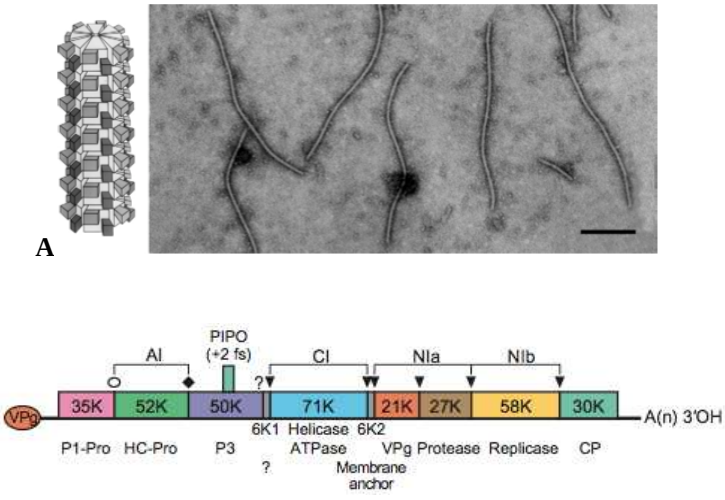


Figure 16. (A). Diagramme schématisant la particule virale des *Potyvirus* dont le BBrMV**.** Le N-terminal et le C-terminal de la protéine de capside sont exposés à la surface de la particule virale. **(B).** Organisation génomique des *Potyvirus*. La souche utilisée comme exemple est celle de *Tobacco etch virus*. Le génome présenté est constitué d'un cadre ouvert de lecture (ORF) traduit par une polyproteine. Les fonctions associées à la protéine clivée apparaissent (King et al. 2012).

Sur le terrain, ce virus apparait systématiquement associé au *Banana mild mosaic virus* – BanMMV (Iskra-Caruana et al. 2008). Dans la famille taxonomique des *Potyviridae*, la plupart des virus ont des gammes d'hôtes très proches mais un nombre de familles botaniques assez réduit (30 familles hôtes) (King et al. 2012).

La distinction visuelle entre les bananiers infectés par ce virus et ceux non infectés demeure extrêmement difficile à établir suite à l'apparition saisonnière des symptômes caractéristiques de la maladie (Rodoni 1997, Thomas et al. 1997).

2.3.2.4. Agent vecteur, cycle de la maladie et épidémiologie

Banana bract mosaic virus se dissémine à courte distance (transmission horizontale) par le puceron lors des piqûres tests précédant l'alimentation. Les espèces de pucerons décrites comme vecteur du BBrMV sont : *Aphis gossypii*, *Rhopalosiphum maidis* et *Pentalonia nigronervosa* (Thomas et al. 2000, Caruana 2003). La transmission du virus s'effectue selon le mode non persistant (King et al. 2012). Pour *P. nigronervosa*, la transmission se réalise après une période d'acquisition d'une minute et à un taux inférieur à 10%.

Le BBrMV se comporte comme un parasite obligatoire et effectue son cycle de multiplication dans la plante hôte, le bananier. Il colonise la plante progressivement depuis son point de pénétration, en passant en priorité par les racines, le méristème principal et devient rapidement systémique. Ainsi tous les rejets issus du pied principal ou pied mère sont infestés. Le seul hôte connu à ce jour est l'espèce *Musa* spp. (Thomas 2000). La dissémination de la maladie à grande distance s'effectue principalement par des rejets, drageons, contaminés (Thomas et al. 2000).

2.3.2.5. Méthodes de diagnostic

La détection par les analyses de laboratoire reste le moyen le plus fiable de diagnostic car souvent les symptômes permettant d'identifier la maladie n'apparaissent qu'une fois l'inflorescence et les bractées produites en fin de culture. Diverses méthodes de diagnostic basées sur le test ELISA et la RT-PCR sont disponibles à ce jour (Thomas et al. 1997). Des sérums monoclonaux et polyclonaux sont actuellement disponibles et un kit de détection ELISA est commercialisé pour la détection de BBrMV.

Dernièrement, la technique combinant la sérologie et les techniques moléculaires, la IC-*One-step*-RT-PCR (Immunocapture, RT-PCR en une seule étape) a été mise au point afin d'améliorer la détection du BBrMV (Iskra-Caruana et al. 2008). Des méthodes de détection multiplex ont aussi été développées afin de détecter le BBrMV lorsqu'il est combiné aux autres espèces virales notamment avec le BSV (Sharman et al. 2000, Selvarajan et al. 2011).

2.3.2.6. Gestion et contrôle de la maladie

La mosaïque des bractées est inconnue des agriculteurs congolais. Mise à part la quarantaine, aucun moyen de gestion de cette maladie n'est disponible actuellement. Dans des régions où sévit le BBrMV et où son incidence est inquiétante, le contrôle s'effectue en adoptant des mesures sanitaires strictes telles que :

(1) la quarantaine et la protection des zones encore indemnes ; (2) l'usage de matériel de plantation certifié sain est le meilleur moyen de contrôle du BBrMV ; un autre moyen de lutte pourrait être : (3) le choix variétal, mais, aucune source de résistance n'a été rapportée à ce jour (Kumar et al. 2014). Les variétés résistantes vis- à-vis de ce virus ne sont pas disponibles, aucune plante résistante n'a été décrite (Iskra-Caruanan et al. 2008). Des travaux de recherches dans ce domaine doivent être effectués en vue de parvenir à une gestion efficace de la maladie ; (4) la destruction des plantes infectées et le remplacement des plantes infectées par des pieds indemnes ; (5) la lutte contre l'agent vecteur permet de limiter les nouvelles infections. Ainsi, la lutte contre les pucerons vecteurs ne doit en aucun cas être essentiellement chimique. Celle-ci peut avoir des conséquences dans la mesure où, les prédateurs des pucerons sont affectés par les pesticides utilisés et le nombre de pucerons risque d'augmenter jusqu'à un niveau supérieur aux populations existantes.

2.4. Déterminants épidémiologiques et phénomènes influençant la variabilité génétique des populations de virus du bananier

L'épidémiologie des virus associés au bananier et plantain est assez complexe, particulièrement dans les écosystèmes très diversifiés à tout point de vue. La progression des maladies virales dans le temps et dans l'espace est influencée par plusieurs facteurs (déterminants) qui expliquent la distribution et la dynamique des virus responsables. Ces facteurs sont notamment, (i) la quantité d'inoculum primaire, (ii) le mode de dispersion, (iii) le niveau d'agressivité du virus, (iv) le niveau de résistance de la plante hôte ainsi que (v) les conditions agro-environnementales (Type de climat, système cultural...) (Corbaz 1990).

Les virus du bananier et plantain, ne sont jamais isolés totalement les uns des autres ; ils sont en perpétuelle interaction avec leur vecteur, leur réservoir naturel,

leur plante hôtes et l'environnement dans lequel croît l'hôte. La compréhension de toutes ces interactions qui régulent les épidémies, facilitent la définition des stratégies de contrôles des virus ainsi que la gestion de la résistance variétale.

De manière générale, les facteurs externes telque la nature de l'hôte, les conditions environnementales plus spécifiquement, la période d'infection peut influencer la diversité génétique des virus. D'autres facteurs plus internes, liés au virus peuvent tout aussi influencer. Ainsi, les mutations sont à l'origine de la diversité génétique des espèces virales. Chez les virus du bananier et plantain et particulièrement en ce qui concerne *Banana bunchy top virus*, à l'échelle d'un pays, tous les isolats caractérisés jusqu'à ce jour présentent une homologie supérieure à 85% (Kumar et al. 2014) et se regroupent en deux catégories nommées Pacifique Sud et Asiatique. Le Banana streak virus par contre, désigne un ensemble complexe d'espèces virales, extrêmement diversifiées. Ces espèces se regroupent en trois clades nommés clade1, clade 2 et clade 3. Les clades 1 et 3 rassemblent des espèces BSV ayant une partie épisomale tandis que le clade 2 regroupe les espèces badnavirus ayant infectées le bananier présentes sous forme de séquences dans son génome et n'ayant pas de contre partie épisomale. Le Clade 1 réunit les quatre principales espèces BSV : BSMYV, BSOLV, BSGFV, BSIMV.

La variabilité génétique de *Cucumber mosaic virus* est grande à cause de la large gamme d'hôtes qu'il infecte. Les espèces CMV sont regroupées en deux sous-groupes distincts : le sous-groupe I qui réunit tout les isolats infectant le bananier et le sous-groupe II regroupe les isolats qui infectent les autres cultures, tomate, etc. (Roossinsk 2002).

En ce qui concerne le *Banana bract mosaic virus*, les analyses phylogénétiques réalisées sur la protéine de capside des isolats collectés en Inde, aux Philippines, au Samoa et au Vietnam, montrent que leur taux d'homologie est supérieur à 90% contrairement à ceux collectés de Tamil Naidu, dont le taux de divergence de nucléotides est de 18 à 21%. Ceci indique que les populations de BBrMV sont plus diversifiées (Balasubramanian et al. 2012).

Partie B: Objectifs de la recherche et Méthodologie générale

CHAPITRE 3

Hypothèse, objectifs et stratégie de recherche

3.1. Hypothèses

Six virus ont été répertoriés sur bananier et plantain à travers le monde : le BBTV (*Banana bunchy top virus*), le BSV (Banana streak virus), le CMV (*Cucumber mosaic virus*), le BBrMV (*Banana bract mosaic virus*), le BanMMV (*Banana mild mosaic virus*), et le BVX (*Banana virus X*). En République démocratique du Congo, la seule virose connue pour ses dommages sur la culture de bananier est le BBTV, qui été observé pour la première fois en 1950 dans la région de Kisangani (Buyckx 1962).

Jusqu'à ce jour, le pathosystème bananier - *Banana bunchy top virus* reste moins documenté en RDC, probablement à cause de la situation sécuritaire du pays qui n'a pas facilité la mise en place d'investigation sur les épidémies virales du bananier. Néanmoins, Niyongere (2012) et Ngama-Boloy (2014) ont évalué respectivement à 26 et 40% l'incidence du BBTV dans les régions des grands lacs et au nord- est du pays. A notre connaissance, aucun autre virus n'avait été rapporté en culture de bananier et plantain en RDC en général et au sud-ouest, zone de culture du bananier en particulier.

Au travers de cette étude, les investigations sont réalisées autour d'un environnement à écosystèmes variés que représente le sud-ouest de la RDC. Cinq provinces sont concernées : le Katanga, le Kasaï Oriental, le Bas Congo, le Bandundu et Kinshasa.

Sur base des précédents éléments, cette étude avance l'hypothèse générale selon laquelle : en République démocratique du Congo, le bananier est soumis à une forte pression des maladies virales, provoquée par plusieurs espèces virales différentes. Mis à part le *Banana bunchy top virus*, il existerait d'autres espèces virales impactant la culture du bananier et du plantain.

❶ Pour autant que le *Banana bunchy top virus* serait le virus le plus répandu et à haute prévalence en culture de bananier et plantain, partout en RDC, cette étude vise à comprendre le statut du *Banana bunchy top virus* observé en 1950 pour la première fois. Proviendrait-il d'une introduction unique ou d'introductions multiples ? Quelle est sa prévalence ? Est-il en phase d'émergence, de réémergence ou de dispersion ? Si le BBTV est en phase de dispersion, quel est le facteur primordial qui faciliterait sa dispersion ? Existerait-il diverses voies d'introduction du BBTV en République démocratique du Congo ?

❷ Le Banana streak virus est un virus complexe qui existe intégré au génome B du bananier sous forme de sequences complexes, à partir desquelles la forme infectieuse peut être générée suite à des conditions de stress. Les variations des écosystèmes associées à la culture des bananiers hybrides interspécifiques ayant des intégrations virales, représentent un risque réel pouvant être à l'origine d'épidémies de la mosaïque en tirets du bananier. Y a-t-il du BSV en RDC ? Exprimerait-il des symptômes en champs ou existerait-il sous forme latente ? Si le BSV est présent, existe-t-il différentes espèces de BSV (BSOLV, BSGFV, BSIMV, BSMYV) ?
Sont-elles à l'origine d'épidémies ? Quelle est leur prévalence dans différents types d'agro-écologie et leur origine ?

❸ Le *Cucumber mosaic virus* serait aussi répandu que le *Banana bunchy top virus*, particulièrement dans le système cultural où le bananier est planté en association avec les cultures maraichères. Mais le *Cucumber mosaic virus* associé au bananier est-il diversifié en RDC ?

❹ Les différentes espèces virales (BBTV, BSV, CMV, et BBrMV) seraient présentes de manière isolées et en association (complexe viral). Ainsi, existe-t-il des cas de complexes viraux sur bananier ? Quelle serait leur prévalence et dans quel type de système cultural ?

❺ Le BBrMV est-il présent en RDC, malgré le fait qu'il n'ait jamais été rapporté en Afrique ?

Les réponses à toutes ces interrogations devraient permettre de mieux élucider le pathosystème bananier-virus, au sud ouest de la RDC. Elles permettront d'améliorer notre connaissance des pathosystèmes viraux associés aux bananiers et plantains en RDC. En intégrant les réponses apportées aux hypothèses formulées, il devrait être

possible de formuler des propositions pour la mise en place d'une stratégie de protection du bananier en RDC, fondée sur une connaissance approfondie des virus présents.

3. 2. Objectifs

☛ Objectif général

Cette thèse a pour objectif général de préciser la prévalence des viroses du bananier, qu'elles soient symptomatiques, à l'état latent et/ ou émergent. Nous nous sommes focalisés sur les principales viroses les plus susceptibles d'être répertoriées et pouvant être dommageables pour la culture, c'est-à-dire les viroses provoquées par le *Banana bunchy top virus* (BBTV), le Banana streak virus (BSV), le *Cucumber mosaic virus* (CMV) et le *Banana bract mosaic virus* (BBrMV). L'objectif poursuivit vise aussi à proposer une stratégie de protection intégrée basée sur une connaissance approfondie de la situation, et appuyée par le développement d'une compétence qui devra permettre l'identification précoce de ces viroses en vue d'une production satisfaisante de la banane. Les attendus de ce travail visent à contribuer à l'augmentation de la production de la banane et du plantain en RDC.

☛ Objectifs spécifiques

De manière spécifique, cette étude vise à :

(i) Effectuer un état des lieux des virus attaquant le bananier grâce aux enquêtes épidémiologiques, au diagnostic et à la détection moléculaire des virus sur les échantillons collectés ;

(ii) Etablir la distribution et la fréquence des virus présents sur la culture du bananier au sud ouest de la République démocratique du Congo ;

(iii) Comprendre l'origine des virus détectés afin de statuer sur un contexte épidémique ou non ;

(iv) Etudier la variabilité génétique et caractériser les différentes espèces virales mise en évidence, dans le double but de développer des outils de gestion intégrée pour la protection du bananier et du plantain.

3.3. Intérêt de l'étude

L'intérêt de cette recherche est considérable et particulier dans l'amélioration de la filière bananière en République démocratique du Congo, à travers la mise en évidence de contraintes biotiques émergeantes qui exercent une influence négative sur la filière bananière. Elle se réalise dans l'une des plus importantes régions productrices de la banane et du plantain, où ces derniers sont fortement diversifiés. La région a, jusqu'à ce jour, été très peu étudiée en raison de la qualité d'infrastructures routières. Ce travail apporte un complément d'information en termes d'existence des virus s'attaquant à la culture du bananier et du plantain, à leur distribution dans différents types d'agroécosystèmes, à leur épidémiologie et à leur diversité génétique. Elle a mis un accent particulier sur l'origine, le diagnostic, la détection des virus émergents, la prévalence et la diversité génétique de ces derniers.

Les éléments de réponses rassemblés dans cette étude pionnière constituent des données épidémiologiques préliminaires sur le contexte sanitaire de la culture du bananier et plantain au Sud Ouest de la République démocratique du Congo.

3.4. Milieu d'études

3.4.1. Choix et caractéristiques édapho-topographiques

La République démocratique du Congo est un vaste territoire dont l'étude est souvent considérée comme un défi du fait que, soit cette dernière est effectuée, soit sur une petite zone et fournit des informations très détaillées, soit elle est effectuée sur une très large étendue et fournit une information trop générale (Vancutsem et al. 2006). Pour ces raisons, le cadre spatial général de cette recherche a été limité à la partie sud-ouest de la République démocratique du Congo (figure 17), soit cinq provinces (Katanga, Kasaï Oriental, Bandundu, Bas Congo et Kinshasa urbain & péri-urbain). Cette dernière a été choisie en fonction de : (i) la quantité de production de la banane générée annuellement, (ii) la diversité des conditions agro-environnementales qu'il regorge, (iii) la situation sécuritaire et (iv) l'accessibilité.

Au sein de la zone d'étude, une partie beaucoup plus étroite a été choisie pour la recherche des nouvelles viroses du bananier (*Banana streak virus*, *Cucumber*

mosaic virus, *Banana bract mosaic virus*), en l'occurrence, la province du Bas Congo parce qu'elle assure une importante production nationale de bananes, soit en moyenne 126.419 tonnes (Elengesa 2006). Elle est la troisième grande province productrice de la banane en RDC. Les recherches ont systématiquement été effectuées dans différents systèmes de culture du bananier, en champs paysans, en plantations villageoises, en stations de recherche, en plantations autour des cases, en bananeraies organisées, en champs expérimentaux de facultés d'agronomie, etc.

Ce cadre spatial comprend plusieurs zones agro-écologiques dans lesquelles croissent différentes variétés de bananiers et plantains. Ces conditions fort dissemblables créent pour l'agriculture des écarts importants quant à la pullulation des agents phytopathogènes et à l'évolution des plantes cultivées. Pour la grande partie du territoire congolais, les différentiations saisonnières dépendent avant tout de la qualité et de la répartition des précipitations, des températures (Tableau 1) et du type de la roche mère qui donne lieu à des types de sol, variable selon la localisation. Le type de végétation tout aussi diversifié est constitué de formations végétales différentes. Dans la province du Bas Congo, la formation végétale est constituée d'une savane herbeuse (district de Cataract et de Lukaya) et d'une forêt dense dénommée la forêt de mayombe qui couvre tout le district du bas fleuve (Tshela, Lukula, Boma, Moanda…). Au Bandundu, la formation végétale est constituée de galeries de forêts claires, à hauteur de Kwango et d'une savane herbeuse vers le domaine pastoral de Feshi. La forêt claire est souvent à prédominance, soit des espèces végétales du genre *Julbernardia paniculata* et *Brachytegia longifolia*, soit du genre *Marquesia macroura* et *Uapaca nitida*. Au Kasaï Oriental, la végétation naturelle est une mosaïque forêt- savane constituée d'éléments de forêt et de savane. La collecte des données a été réalisée à très basse altitude, les points situés entre 50m - 350m dans le Bas Congo (plus faible altitude) en passant par les altitudes moyennes de 600m - 900m (Bandundu et Kasaï Oriental) et entre 900 et 1400m dans la province du Katanga (Haute altitude).

3.4.2. Caractéristiques climatiques

Les caractéristiques climatiques de la partie sud ouest de la RDC sont variables selon les provinces (Table 1). Différents types climatiques règnent dans chaque province : Au nord-est de la province de Bandundu sévit un climat équatorial de

type AF, selon la classification de KÖPPEN, ce type est caractérisé par l'absence de la saison sèche régulière. La partie restante de la province du Bandundu est coiffée par un climat tropical du type Aw. La ville province de Kinshasa et le Bas Congo jouissent d'un climat de type Aw_4 qui se caractérise par quatre mois de saison sèche et 8 mois de saison de pluie. Au Bas Congo, spécifiquement dans les régions de très basse altitude (littoral), règne un climat steppique avec une variabilité très élevée des précipitations. La province du Kasaï Oriental bénéfie de deux types climatiques, le type AF (climat équatorial) et le type Aw_2 (climat tropical) (Nsumbu 2005, Minplan 2005). Les caractéristiques des facteurs climatiques sont reprises dans le tableau 1.

3.5. Approche méthodologique

La présente étude a été réalisée grâce à la combinaison de plusieurs approches méthodologiques de terrain et de laboratoire.

3.5.1. Approche de terrain

De manière générale, la collecte d'échantillons et l'analyse des résultats a été réalisé à plusieurs niveaux différents. Le premier niveau a été le niveau provincial où les échantillons ont été collectés dans cinq provinces du sud ouest en vue d'avoir une idée générale des conditions de culture du bananier ces résultats sont rassemblés au chapitre 4 et chapitre 6. Le second niveau a été celui d'une province, le Bas Congo où l'analyse a été réalisée par site pour plus de précision. Les résultats sont présentés au chapitre 5.

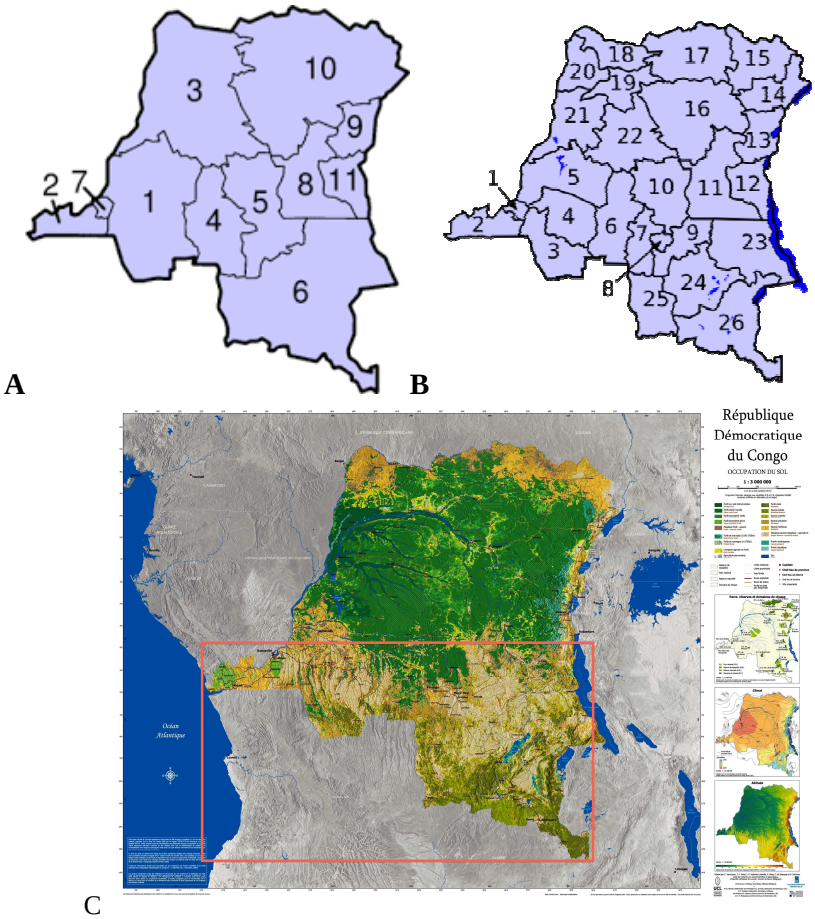


Figure 16. (A) Découpage territorial de 1960-2015 de la République démocratique du Congo, (B) Découpage territorial prévu par la constitution de 2006 et mise en application en janvier 2016. (C)Le milieu d'étude couvert par cette recherche est représenté, sous le rectangle rouge sur cette carte de la RDC illustrant l'occupation des sols. Il s'agit d'un milieu géographique à condition agro-environnementale très diversifiée, selon la localisation. ©UCL-Geomatic, 2006, with permission.

Néanmoins, la méthode d'enquête participative a été privilégie. Dans chaque village (site) enquêté, une courte discussion avec le chef du village et toute la communauté villageoise a été réalisée dans l'objectif de vérifier que les agriculteurs du milieu d'étude arrivent à reconnaître les symptômes des virus recherchés. En s'appuyant sur les symptômes des viroses rassemblés dans le guide d'identification des maladies du bananier conçu au cours de cette thèse de doctorat et au moyen des images, les villageois indiquaient les symptômes qu'ils observent. Seuls les symptômes de BBTV ont été reconnus et identifiés par les agriculteurs. Concernant

les autres viroses, ils affirmaient n'avoir jamais vu les symptômes indiqués. Ainsi, de manière randomisée, les observations portaient sur les plants de bananiers choisis suivant la méthode décrite ci-dessous :

a) Enquêtes épidémiologiques sur *Banana bunchy top virus*

Le schéma général de collecte d'échantillons de feuilles de bananier nécessaires à l'état des lieux du BBTV s'est appuyé sur la carte administrative de la RDC (découpage de 1960 voir la figure 16 A) et suivant les axes routiers des cinq provinces enquêtées au sud ouest à savoir : le Katanga, le Bandundu, le Kasaï Oriental, le Bas Congo et le Kinshasa urbain et péri-urbain (Tableau 3). Ainsi, dans chaque site ou village, un quadra de 100m sur 100m a été délimité, le nombre total des plantes au sein du quadra a été compté et trois plantes (bananier) ont été aléatoirement choisies pour les observations et la collecte des échantillons. Les paramètres observés dans chaque quadra et sur ces trois plantes ont été :

- L'état visuel de chacune des trois plantes, le nombre total des plantes dans le quadra, la présence du vecteur, la présence d'hôtes alternes aux abords des plantations, le stade phénologique de la plante, le génotype (variété, dénomination locale de la variété), la présence ou l'absence des symptômes de BBTV, les coordonnées géographiques (GPS : longitude, latitude, altitude). La sévérité des symptômes a été évaluée par cotation suivant l'échelle de cotation de 1 à 5 proposée par Haln en 1983. Avec le score : (1) absence totale des symptômes, (2) début de la maladie (enroulement foliaire), (3) les feuilles attaquées deviennent étroites et cassantes au toucher, (4) les bords des feuilles se recourbent vers le haut, jaunissent et se nécrosent, (5) les feuilles forment un bouquet.

Les échantillons collectés étaient constitués de très jeunes feuilles de bananier non déployées (la feuille cigare) dont environ 100 à 700 mg sont conservés de trois manières : une partie dans le kit Bos, une autre dans l'enveloppe du type kraft et une dans un sac plastique, maintenue à température ambiante.

Les échantillons de pucerons vecteurs, quand bien même non analysés dans le cadre de cette thèse, ont été collectés et conservés dans des cryotubes contenant 200 ml de formol 40%.

b) Enquêtes sur les virus non rapportés : Banana streak virus, *Cucumber mosaic virus et Banana bract mosaic virus*

D'une manière générale, l'observation de chaque bananier s'accompagnait d'un questionnaire et d'un temps d'échange avec le propriétaire. Les questions liées à l'origine du matériel de plantation, le génotype de bananier (dessert ou plantain, etc), la présence du vecteur, la topographie du terrain, le système cultural ont été accompagnés de la collecte d'échantillons. Les sites ou villages enquêtés sont rassemblés dans le tableau 4.

c) Conservation des échantillons

La méthode adaptée de conservation des échantillons de bananier a été choisie en fonction des contraintes rencontrées au cours des enquêtes. Il y a lieu de noter aussi la difficulté de disposer d'une chaîne de froid et de la durée des expéditions avant l'arrivée au laboratoire (expéditions de 6-8 jours). Ainsi, afin de maximiser, au mieux, les chances d'une bonne conservation, les échantillons constitués de jeunes feuilles (cigare) ont été conservés en trois exemplaires différents (3 méthodes).

Conservation des échantillons dans les kits Bos (méthode 1) : cette méthode a l'avantage d'être utilisée directement en plein champ. Elle a consisté en l'utilisation d'un système de déshydratation comprenant un tube en plastique de 50 ml avec un bouchon à vis. Dans chaque tube, un morceau de papier absorbant et environ 3g de Chlorure de calcium anhydre ($Cacl_2$) ont été placés, afin d'absorber l'humidité et d'éviter la putréfaction de l'échantillon (Bos 1969). Les échantillons ont été bien emballés dans le papier absorbant et glissé à l'intérieur du tube qui a été refermé au moyen d'un bouchon étanche.

Conservation des échantillons dans les enveloppes de type Kraft (méthode 2) : l'utilisation des enveloppes de type Kraft a été la seconde alternative à la conservation des échantillons collectés. Les échantillons des feuilles de bananier ont été placés de manière aplatie dans les enveloppes. Ce qui a permis de profiter de l'absorbance de l'enveloppe et faciliter une dessiccation lente, à l'ombre.
Conservation des échantillons dans les sacs plastiques (méthode 3) : les mêmes échantillons collectés ont été conservés dans des sacs plastiques et stockés à l'air libre pendant toute la durée des enquêtes, soit 6 à 8 jours par expédition. A l'issue de

chaque enquête, ils ont été conservés à la Clinique des Plantes de Kinshasa à -20°C, puis dans de la carboglace (-80°C) pendant la durée du voyage, jusqu'à leur acheminement au laboratoire de Phytopathologie de l'Université catholique de Louvain.

d) Identification des échantillons

Chaque échantillon collecté a été clairement identifié en utilisant une numérotation qui renvoie à la province, au territoire, au village et au numéro de l'exemplaire. Ce même numéro a été utilisé pour identifier les fiches (questionnaires) d'enquêtes utilisées pour chaque échantillon. Exemple : 1/1/Kisantu, 2/1/ Kiyongo, etc.

3.5.2 Approche de laboratoire

L'approche de laboratoire utilisée dans ce travail trouve son fondement en épidémiologie moléculaire. En effet, les échantillons collectés dans le milieu d'étude ont été analysés en utilisant différentes techniques, basées principalement sur les méthodes sérologiques et moléculaires. Les techniques de Polymérisation en chaîne (PCR), d'immunocapture-PCR (IC-PCR), immunocapture-One step-RT-PCR (IC-One step-RT-PCR) ont été utilisées. Au vu des progrès technologiques réalisés dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire et végétale, l'évaluation plus fiable de la prévalence des virus, leur répartition géographique, les études phylogénétiques ont permis d'apprécier les relations entre les isolats et d'émettre des hypothèses quant à l'origine et à la distribution spatiale des virus détectés.

Pour mener efficacement ces recherches, les compétences et l'infrastructure de trois laboratoires ont été d'un grand service. Le laboratoire de la Clinique des Plantes de Kinshasa en RDC a servi de cadre pour le maintien, la conservation des échantillons et à leur identification correcte. Le laboratoire du CIRAD (UMR-BGPI du CIRAD-Montpellier) et celui de l'Unité de phytopathologie, Earth and Life Institut de l'Université catholique de Louvain (qui a été notre laboratoire principal), ont été utilisés pour la détection, l'identification et la caractérisation moléculaire du *Banana bunchy top virus*, *Banana streak virus*, *Cucumber mosaic virus* et *Banana bract mosaic virus*.

Tableau 1 : Principales caractéristiques climatiques des cinq provinces du sud ouest de la RDC en 2011

Station	Station météorologique de la Luano/ Katanga			Station météorologique de Binza/ Kinshasa			Station météorologique du Kasaï Oriental			Station météorologique d'Inga Bas Congo			Station météorologique d'Inera Kiyaka Bandundu		
Mois	**P (mm)**	**T °C**	**Hr (%)**	**P (mm)**	**T °C**	**Hr (%)**	**P (mm)**	**T °C**	**Hr (%)**	**P (mm)**	**T°C**	**Hr (%)**	**P (mm)**	**T°C**	**Hr (%)**
Janvier	240	21	87	111,6	26	80	152	25	85	0	25,3	81	137,6	26	85
Février	260	21	88	163,1	26,2	81	135	25,1	86	33	25,7	77	190,8	26,2	84
Mars	200	21	85	159,2	26,6	80	196	25,6	85	293,4	26,5	77	95,8	27,1	84
Avril	50	20	81	252,4	26,4	82	163	25,7	85	59,3	25,7	79	178,8	28	85
Mai	0	18.5	80	216,6	25,8	85	59	25,8	87	56,8	25	84	54,3	27,6	85
Juin	0	16	78	0	21,6	85	14	24,8	86	0	24,2	74	14,6	25,8	81
Juillet	0	16	78	0	22,2	81	8	24,6	65	0,5	22,2	75	0	24,9	79
Août	0	17	79	4,2	21,7	76	31	25,1	78	1,7	22,3	74	0	25,6	77
Septembre	0	21	81	54,2	23,2	76	129	25,3	72	0	24,4	69	139,2	25,9	79
Octobre	20	23	80	273,6	24,6	81	152	25,2	76	33	25,6	70	118,9	25,7	83
Novembre	160	23	84	374,5	25	84	227	25,0	79	171	26,3	81	140	25,5	86
Décembre	250	21.5	84	260	25	86	207	25,0	80	180	25,6	77	282,3	25,7	85
Moyenne	**98,3**	**19,9**	**82**	**156,6**	**24,5**	**81,4**	**122,75**	**25,1**	**80,3**	**69**	**24,9**	**76,5**	**112,6**	**26,1**	**82,7**

(*) Sources de données : © Stations météorologique de la Luano, de Inga et de Binza

Tableau 2 : Liste des sites de collecte d'échantillons au sud ouest de la RDC (enquêtes épidémiologiques du BBTV de 2011-2012)

Cinq provinces enquêtées au sud ouest de la République démocratique du Congo

	Province du Bandundu		**Province du Bas Congo**		**Province du Kasaï Oriental**		**Province du Katanga**		**Province de Kinshasa**
N° Site	**Sites/ villages**	**N° Site**	**Site/ villages**	**N° Site**	**Sites/villages**	**N° Site**	**Sites/ Villages**	**N° Site**	**Sites/ villages**
1	Bulungu	1	4janvier Lukula		Kakumba route kayena bloc1		Champ expIIBloc1(essay1)	1	Bandalugwa
	Bulungu		4janvier Lukula	1a	Katamba route kanyana bloc1	1a	Champ expIIBloc1(essay1)		Bandalugwa
	Bulungu		4janvier Lukula		Katamba route kanyana bloc1		Champ expIIBloc1(essay1)		Bandalugwa
2	Bumbabar	2	ELVP/Lukula		Katamba route kanyana bloc2		Champ expIIBloc1(essay2)	2	Cité-verte
	Bumbabar		ELVP/Lukula	1b	Katamba route kanyana bloc2	1b	Champ expIIBloc1(essay2)		Cité-verte
	Bumbabar		ELVP/Lukula		Katamba route kanyana bloc2		Champ expIIBloc1(essay2)		Cité-verte
3	Idiofa	3a	INERA-Luki Bloc1	2	Lusanga route kananga	1c	Champ expII Bloc2	3	Nddjili-secomaf
	Idiofa		INERA-Luki Bloc1		Lusanga route kananga		Champ expII Bloc2		Nddjili-secomaf
	Idiofa		INERA-Luki Bloc1		Lusanga route kananga		Champ expII Bloc2		Nddjili-secomaf
4	Itsweme	3b	INERA-Luki Bloc2	3	Manda-mukendi	2	Champ expI	4	Ndjili-brasserie
	Itsweme		INERA-Luki Bloc2		Manda-mukendi		Champ expI		Ndjili-brasserie
	Itsweme		INERA-Luki Bloc2		Manda-mukendi		Champ expI		Ndjili-brasserie
5	Kakobola	3c	INERALukiBloc3	4	Manda muswi	3	Chem-ChemBloc1	5	Kalamu
	Kakobola		INERALukiBloc3		Manda muswi		Chem-ChemBloc1		Kalamu
	Kakobola		INERALukiBloc3		Manda muswi		Chem-ChemBloc1		Kalamu
6	Kasanzapondo	4	Luki	5	Manda-mwembia bloc1	4	Chem-ChemBloc2	6	KindeleIe, Mont Ngafula
	Kasanzapondo		Luki		Manda-mwembia bloc1		Chem-ChemBloc2		KindeleIe, Mont Ngafula
	Kasanzapondo		Luki		Manda-mwembia bloc1		Chem-ChemBloc2		KindeleIe, Mont Ngafula
7	Kasaunzadi	5	Kasangulu	6	Mbujimayi centre	5	Ferme Kasapa	7	Kingabwa
	Kasaunzadi		Kasangulu		Mbujimayi centre		Ferme Kasapa		Kingabwa
	Kasaunzadi		Kasangulu		Mbujimayi centre		Ferme Kasapa		Kingabwa
8	Kimbinga	6	Kinsantu	7a	Miabi Bloc1	6	Kipushi	8	Malueka et Kinsuka

	Kimbinga		Kinsantu		Miabi Bloc1		Kipushi		Malueka et Kinsuka
	Kimbinga		Kinsantu		Miabi Bloc1		Kipushi		Malueka et Kinsuka
9	Kingandji	7	KinzitaLukula	7b	Miabi Bloc2			9	Maluku
	Kingandji		KinzitaLukula		Miabi Bloc2				Maluku
	Kingandji		KinzitaLukula		Miabi Bloc2				Maluku
10	Kingandu	8	KokoloLukula	8	Mpemba Nzeukaloho			10	Menkao
	Kingandu		KokoloLukula		Mpemba Nzeukaloho				Menkao
	Kingandu		KokoloLukula		Mpemba Nzeukaloho				Menkao
11	KiyakaI	9	Luila	9	Mpiana Kamuanya			11	Selembao
	KiyakaI		Luila		Mpiana Kamuanya				Selembao
	KiyakaI		Luila		Mpiana Kamuanya				Selembao
12	KiyakaII	10	Madimba	10	Mulamba-dibotadiamputu				
	KiyakaII		Madimba		Mulamba-dibotadiamputu				
	KiyakaII		Madimba		Mulamba-dibotadiamputu				
13	Kiyongo vers feshi	11	Mawusa-Lukula	11	Mulamba-dikendadikunza				
	Kiyongo vers feshi		Mawusa-Lukula		Mulamba-dikendadikunza				
	Kiyongo vers feshi		Mawusa-Lukula		Mulamba-dikendadikunza				
14	Kwango	12	Mbanza Ngungu	12	Mulamba-lufuka				
	Kwango		Mbanza Ngungu		Mulamba-lufuka				
	Kwanga		Mbanza Ngungu		Mulamba-lufuka				
15	Longokumakuma	13a	Mvuazi essay1	13	Nsana-shabazen				
	Longokumakuma		Mvuazi essay1		Nsana-shabazen				
	Longokumakuma		Mvuazi essay1		Nsana-shabazen				
16	Masamuna	13b	Mvuazi essay2	14	PMKO site1				
	Masamuna		Mvuazi essay2		PMKO site2				
	Masamuna		Mvuazi essay2		PMKO site3				
17	Masimanimba	14	Mwenge	15	RouteKaseki				
	Masimbanimba		Mwenge		RouteKaseki				
	Masimbanimba		Mwenge		RouteKaseki				
18	Mongata	15	Patuzemba	16	Tshilombo				
	Mongata		Patuzemba		Tshilombo				
	Mongata		Patuzemba		Tshilombo				
19	Ndalangundu	16	Kasavubu						

Cinq provinces enquêtées au sud ouest de la République démocratique du Congo

	Province du Bandundu		Province du Bas Congo		Province du Kasaï Oriental		Province du Katanga		Province de Kinshasa
N° Site	Sites/ villages	N° Site	Site/ villages	N° Site	Sites/villages	N° Site	Sites/ Villages	N° Site	Sites/ villages
	Ndalangundu		Kasavubu						
	Ndalangundu		Kasavubu						
20	Nkara								
	Nkara								
	Nkara								
21	NkaraEwa								
	NkaraEwa								
	NkaraEwa								
	Nkiandu vers pont								
22	Louange								
	Nkiandu vers pont								
	Louange								
	Nkiandu vers pont								
	Louange								
23	Yasasecteur								
	Yasasecteur								
	Yasasecteur								

(*) Les sites notés avec mention a, b ou c sont considérés comme un seul site avec les sous-sites.

Tableau 3 : Liste des sites de collecte d'échantillons dans la province du Bas Congo/ RDC

Province du Bas Congo (enquêtes épidémiologiques de 2013)					
Territoires	**N° Site**	**Sites/ Villages**	**Territoires**	**N° Site**	**Sites/ Villages**
Tshela	1	Mbumba-Kangu	Lukula	26	Mvuangu
	2	Bengu Kiyanga		27	Boko
	3	Tshela Centre		28	Kikiaka
	4	Kiobokizu		29	Masaba
	5	Tshumba Kituti		30	Boma
	6	Kayindunda	Boma	31	Lukunga
	7	Kimwanda		32	Kinzaumvuete
	8	Nganda Sundi		33	Sengi
	9	Kikubulu		34	Ntshokoto
	10	Kimangebele		35	Numero
	11	Lukamba Mbanza	Moanda	36	Mbaka
	12	Tshudinzanza		37	Kizulu sansi
	13	Nsioni Lukambanza		38	Tiaba
	14	Tombo Yangu		39	Kelemwanza
	15	Nsundi Kunga		40	Kintwala
Lukula	16	Maduda	Sekebanza	41	Kiniati
	17	Lukula Centre		42	Kwidi
	18	Kinkuti		43	Kinkandubula
	19	Kimbianga Sud		44	Kisonga
	20	Kimpanga-Nombe	Songololo	45	Seke Mbata
	21	Nsanda centre		46	Kisenga
	22	Mwenge		47	Kisantu
	23	Patu	Mbanza Ngungu	48	Mbanza Ngungu
	24	Vunda-Kituti		49	Luila
	25	Ndalu	Kasangulu	50	Selo
			Kinshasa	51	Kimpoko
				52	Ndjili Brasserie

Partie C: Experimentation

C1. Détection et distribution des virus du bananier (Musa spp.) au sud ouest de la République démocratique du Congo

Préambule

La République démocratique du Congo regorge d'une grande diversité de variétés de bananiers, ainsi qu'une diversité élevée des conditions agro-environnementales favorables à sa culture. Elle se situe dans le basin du Congo, un centre de diversification secondaire du plantain (Mobambo 2010).

Diverses contraintes abiotiques et biotiques ont été répertoriées en culture de bananier, en plus de *Banana bunchy top virus* qui été détecté pour la première fois en 1950, à Yangambi, dans la région de Kisangani, province Orientale (Elengesa 2006, Buyckx 1962). Malgré l'évolution des connaissances sur cette culture et la mise au point des variétés de bananiers performants référés à la région de Yangambi (Yangambi Km5), les études sur la culture du bananier et du plantain n'ont pas considérée la problématique du *Banana bunchy top virus*. Sa prévalence, sa distribution et les facteurs agro-environnementaux contribuant à sa dispersion en République démocratique du Congo demeurent inconnus à ce jour. A l'entame de ce chapitre, les interrogations qui ont été soulevée sont : (i) *Banana bunchy top virus* est-il présent dans d'autres provinces de la République démocratique du Congo ? (ii) Quel serait le principal facteur favorisant la distribution de ce virus ?

Dans cette partie, les enquêtes épidémiologiques ont été réalisées en 2011 et 2012 dans la partie sud ouest de la République démocratique du Congo ; cinq provinces ont été ciblées : le Kasaï Oriental, le Bandundu, le Bas Congo, le Katanga, le Kinshasa urbain et péri-urbain en vue de présenter la situation générale de la culture du bananier en RDC. Ces provinces ont été choisies en fonction des critères décrits dans la seconde partie de cette thèse, notamment la diversité de leurs conditions agro-environnementales, le niveau de leur production et leur accessibilité. Les informations épidémiologiques et les échantillons collectés ont permis d'évaluer la prévalence et la distribution de *Banana bunchy top virus*. Le facteur primordial qui contribue à sa dispersion, dans des conditions agro-environnementales diversifiées a été mis en évidence.

Les données relatives à ce travail ont permis d'orienter la mise en place des études suivantes, présentées aux chapitres 5 et 6 de cette thèse.

CHAPITRE 4

Occurrence and distribution of *Banana bunchy top virus* related agro - ecosystem in South Western, Democratic Republic of Congo

L.F.T. Mukwa[1,2*], M. Muengula[3], I. Zinga[5], A. Kalonji[3], ML. Iskra-Caruana[4], C. Bragard[2]

[1]Clinique des Plantes de Kinshasa, D.R. of Congo ; [2] Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Applied Microbiology -Phytopathology, Croix du Sud 2 Bte L07.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve Belgium ; [3]Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université de Kinshasa. [4]Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement. [5]Laboratoire des Sciences Biologiques et Agronomiques pour le Développement (LASBAD), Université de Bangui. (*) Corresponding author : lynamukwa@yahoo.fr

Cet article adapté de celui publié dans *American journal of plant science AJPS en 2014.*

Abstract

Banana bunchy top virus (BBTV) is one of the most severe and widespread virus limiting production and distribution of banana (*Musa* spp) germplasm in the world. In Democratic Republic of Congo (DRC), banana plays a major role in daily life of more than 70% of citizen. However, many factors influence negatively banana production. These factors included Banana bunchy top disease. Surveys were conducted in farmers' fields and in experimental stations, for two consecutive seasons in 2011 and 2012. A total of 72 sites were surveyed and 216 bananas leaves samples collected from different sites located in five South Western provinces (Bas Congo, Bandundu, Kasaï Oriental, Katanga and Kinshasa urban and perurban) of Democratic Republic of Congo. The objective of this study was to confirm the presence of *Banana bunchy top virus* in theses fives provinces, to assess the prevalence and distribution of *Banana bunchy top virus*, with emphasis on the agro-ecological factors. Collected banana (*Musa* spp) leaves samples were analysed by PCR. The results revealed the presence of BBTV in all provinces investigated. The frequency of *Banana bunchy top virus* was of 18.7% (13/69) in Bandundu, 54.1% (26/48) in Kasaï Oriental, 79.1% (38/48) in Bas Congo, 16.6% (3/18) in Katanga and 47.9% (16/33) in Kinshasa Urban and periurban. Results also revealed that BBTV occur both in experimental station and farmers' fields, both in plantain (cooking banana) and in dessert banana. The distribution of *Banana bunchy top virus* is mostly linked to the exchange of infected planting materials between farmers. The high frequencies of *Banana bunchy top virus* seem to be linked to multiple introduction of planting material in the Bas Congo province during 1990 and 2002. However, the province of Katanga has not experienced the introduction of planting material. This factor would explain the lowest prevalence of *Banana bunchy top virus* in this province. The results indicate that there is a real need to facilitate access to genetically improved and healthy and certified planting material in these provinces.

Keywords: "Banana and plantain, farmers' fields, prevalence, Africa, research stations.

Introduction

Banana and plantain (*Musa* spp) are one of the major crops in Democratic Republic of Congo. Plantain is considered as the second most important staple food after cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [1, 2, 3]. More than 70% of the Congolese population consumes daily banana in various forms such as chips, crushed mix with cassava, or in manufacture of traditional wine [4]. Banana and plantain is grown in all provinces of Democratic Republic of Congo, under different agro ecological conditions. Additionally, the western part of Democratic Republic of Congo is located in the basin of Congo and considered as a secondary centre of diversity of plantain [5].

Ten years ago, banana production and cultivated areas have been reported to decline respectively between 20 à 60% [5]. Production of banana and plantain appears to be negatively influenced by agro-ecological factors. Numerous pests and diseases affect banana. These, including nematodes, weevils, black leaf streak disease, Xanthomonas wilt disease and Banana bunchy top disease (BBTD).

In most cases, the yield losses of 90-95% were observed in Cavendish variety [6]. Banana bunchy top disease (BBTD) can cause yield losses up to 100% [7]. Therefore, it is recognized as the most devastating viral disease of banana in the word, particularly in Democratic Republic of Congo. Also it is one of the major constraints in the distribution of planting material [5,8, 9, 10, 11].

Banana bunchy top disease (BBTD) caused by *Banana bunchy top virus* (BBTV), a virus of *Nanoviridae* family, genus: *Babuvirus*. Viral capsid has multi-component genomes composed with at least six DNA single-stranded named DNA-R, DNA-N, DNA-U3, DNA-S, DNA-C, DNA-M, encapsidated in small isometric particles of 18-20nm [12, 8]. BBTV is transmitted plant-to-plant, in persistent, circulative and propagative mode by the aphid vector *Pentalonia nigronervosa* Coquerel [13, 14, 15, 16]. Symptoms of banana bunchy top disease are usually clearly identifiable. Dwarfing, narrow leaf, chlorosis of leaf margins and discontinuous dark-green streaks on leaves, petioles and pseudo-stem characterize the disease. The leaves of infected plants become progressively smaller and stand more erect giving the plant a bunchy

appearance [17]. Early infected do not produce fruit resulting in total lost of yield, while late infected plants may (depending on the severity of the disease) produce normal or deformed fruits.

In Democratic Republic of Congo, *Banana bunchy top virus* has been observed for the first time, around 1958, in Yangambi, in the Kisangani region, Province Orientale [6, 18]. From there, the disease quickly spread to other regions, specifically in South Kivu, the information about other provinces is unavailable. To date, the distribution of BBTV and the agro-ecological factors favouring or limiting its distribution in Democratic Republic of Congo remains unknown. The aim of this study therefore was to investigate about the distribution of BBTV in five South Western provinces of DRC, with indications on the agro-ecological factors contributing to the spread of the *Banana bunchy top virus*.

Materials and Methods

Surveys

Five South Western provinces of the Democratic Republic of Congo (Bas Congo, Bandundu, Kasaï Oriental, Katanga and Kinshasa urban and periurban), under different pedo-climatic conditions were choosen as the study area. Theses provinces were selected according to their accessibility, the quantity of banana production and the agro-ecological conditions.

In the Katanga and the Kasaï Oriental provinces prevails a tropical climate type Aw_6 according to Köppen climate classification. The average daily temperature varies between 19°C and 20°C and the average annual rainfall is up to 1.226mm. The soil of Katanga province is mostly constituted with three different geological types. The soils of Kasaï Oriental province belong to the Kaolisoils order [19]. The Bandundu, the Bas Congo and the Kinshasa urban and periurban provinces, are located in the natural setting of the Central Basin, which have two types of climatic zones: the tropical and the equatorial climate. In theses three provinces, the daily temperature of 25°C is recorded with very little variation. Average annual rainfall amounts to 1.500mm. The

soils of three provinces are extremely diverse.

Epidemiological surveys were conducted in farmer's fields over a 2-year period, in 2011 and 2012, in Bas-Congo and Kinshasa urban and periurban areas, in Katanga, Kasaï - Oriental and Bandundu. A total of 72 sites were surveyed (Figure 1): 6 sites in Katanga, 16 sites in Kasaï – Oriental, 11 sites in Kinshasa urban and periurban areas, 16 sites in Bas Congo and 23 sites in Bandundu. In each site three farmers' fields were randomly selected (Table 1). Using a questionnaire, each owner farmer was individually interviewed.

Results of interviews of farmers, three symptomatics and asymptomatics banana leaves samples were collected from each location. All samples were stored in Bos kits containing the calcium choride ($CaCl_2$).

Detection of *Banana bunchy top virus* by PCR

The total DNA was extracted from 100 mg of banana leaves using the method described by Dellaporta [20]. *Banana bunchy top virus* detection was performed by polymerase chain reaction using the primer pair BBTV1f/BBTV1r (GCGTGAAACGCACAAAAGGCC and GCATACGTTGTCAAACCTTCTCCTC) designed to amplify a 240 bp product corresponding to the coding region of DNA-R. The PCR conditions described by Mansoor, 2005 [12] were used, with an initial cycle of denaturation at 95°C for 10 minutes followed by 34 cycles of (95°C for 30 secs, 55°C for 45 secs, 72°C for 30 sec) and the finally extension at 72°C for 10 minutes [11, 12].

For each province, the frequencies of *Banana bunchy top virus* were separately calculated by establishing the ratio between the total number of positive samples and the total number of tested samples by province, multiplied by 100. Thus 48 samples from Bas Congo, 48 samples from Kasai Oriental, 69 samples form Bandundu, 33 samples from Kinshasa and 18 samples from Katanga, were tested.

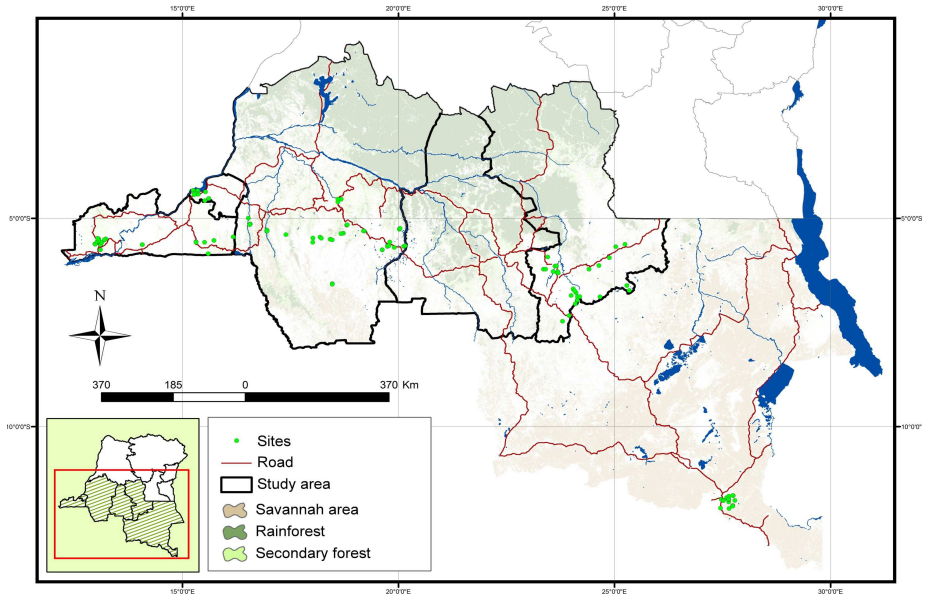


Figure 1. Map of five provinces of Democratic Republic of Congo showing the 72 locations surveyed in 2011 and 2012 in Bas Congo, Bandundu, Katanga, Kasaï Oriental and Kinshasa urban and periurban. The green dots show the geographical localisation of the surveyed sites.

Agro-ecologicals factors

For each surveyed location (field), agro-ecological characteristics have been considered, including the banana cropping system, the genotype, the variety, source of planting material, health status of planting material before planting, the fertilization, the number of fertilization during the growing cycle, the type of maintenance, treatment plant, intercropping system, altitude and crop age.

Data Analysis

Data analysis was performed for results from investigations on the agro-ecological factors and from the detection of BBTV. Proportions of each parameter were calculated by comparing the number of observed parameter on the total number of

fields investigated in the province. The R software was used for analysis of each parameter, the standard deviation was calculated, and the variance and the correlation between different parameters were established.

This analysis has allowed assessing each parameter and highlights the main constraints affecting banana culture in South Western, Democratic Republic of Congo.

Results

Detection of *Banana bunchy top virus*

A total of 216 symptomatics and asymptomatics samples, collected from 72 locations of five South Western of provinces Democratic Republic of Congo. The result revealed that 96 samples, or 44.4% (96/216) of the plantations surveyed, analysed were positive to *Banana bunchy top virus* (Figure 2 & 3).

The expected BBTV DNA fragment of 240 bp was amplified from leaf tissue samples.

Banana bunchy top virus distribution in South Western Democratic Republic of Congo

In the five South Western provinces study, *Banana bunchy top virus* was detected in all types of cropping system (Figure 2 & 3). In farmer's field, in experimental station, in organised plantation located both in forest and savannah area (Figure 3). BBTV was also detected in all genotypes (Plantain and dessert) (Figure 2).

Results indicate that the BBTV frequency is variable in each province. Considering the number of positives samples by total samples collected by province, frequencies were respectively about (79.1% = 38/48) in Bas-Congo province, (54.1%= 26/48) in Kasai-Oriental, (47.9%= 16/33) Kinshasa urban and periurban, (18.7%= 13/69) and (16.6%= 3/18) in Katanga. Comparison the total number of samples collected in five provinces, results show the highest BBTV frequency Bas-Congo province (17.5% = 38/216) (X^2 = 69.27; ddl = 4; p=0) and lowest BBTV frequency was observed in the Katanga province (3.7%= 3/216). The mean frequencies were recorded in Kasai-Oriental (12.03%= 26/216) and Kinshasa urban and periurban (10.6%= 16/216) and Bandundu (4.1%= 13/216) (Figure 2)**.** To understand the current distribution of

Banana bunchy top virus in theses provinces, agro-ecological factors related to each surveyed location were studies; the results are summarized in the Table 2 below.

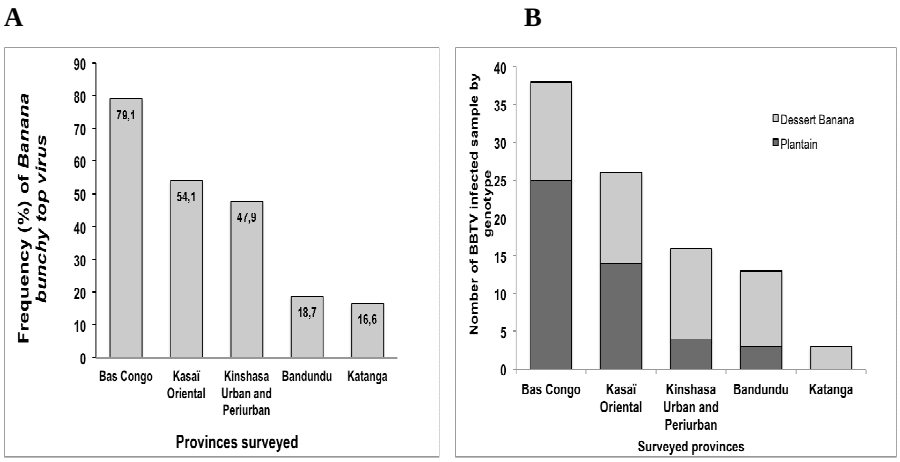


Figure 2. (A) Frequency (%) of *Banana bunchy top virus* in five South Western provinces of Democratic Republic of Congo; (B) Number of BBTV infected sample by genotype in each province.

Agro-ecologicals factors analysis

-Planting material quality origin and varieties

Banana and plantain are vegetative propagation plants. Thus, the yield optimisation requires the use of healthy and certified planting material. Results of this investigation indicate that, in the five South Western provinces of Democratic Republic of Congo, farmers always use the planting materials with unknown sanitary status. Also, the planting material use in experimental station is not certified.

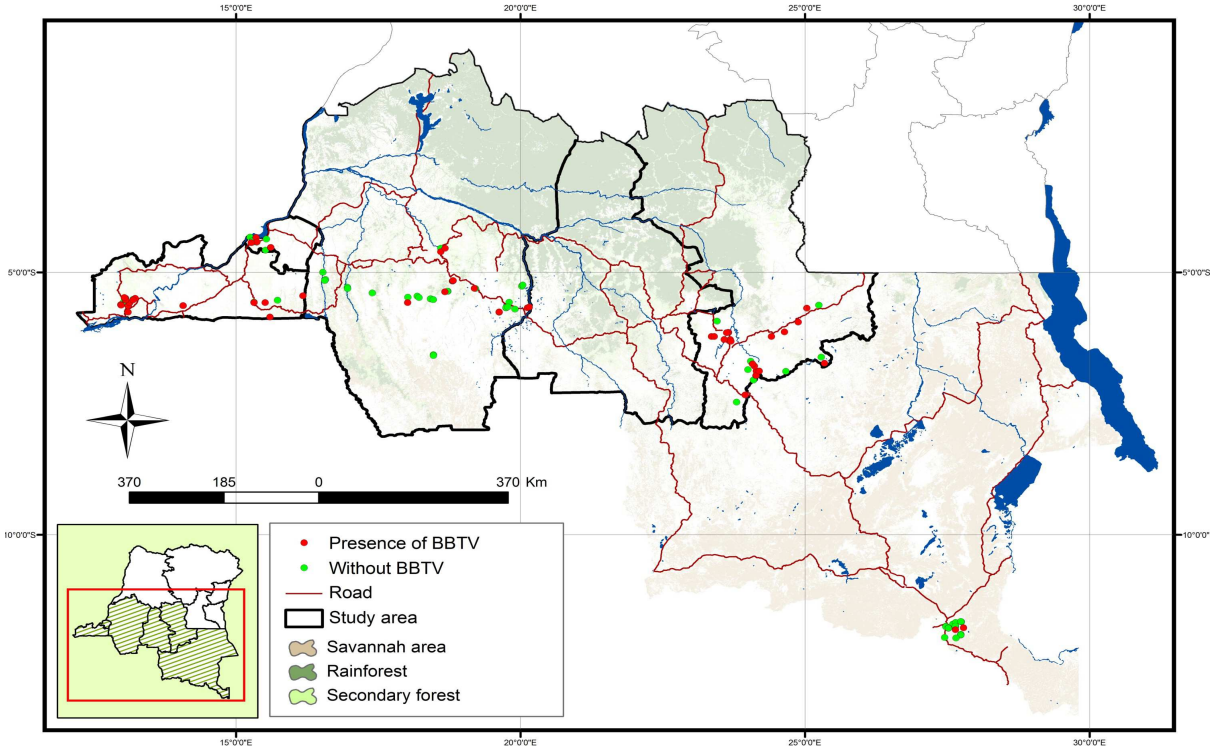


Figure 3. Map of Democratic Republic of Congo, showing the geographical distribution of *Banana bunchy top virus* in five South -Western provinces. The red dots show the locations where samples are positive to BBTV and the green dots show the location where samples are negatives**.**

- **Origin of planting material and varieties**

In 100% of cases of study cases, the health status of planting materials was unknown. Data related to the origin of planting material and the cultivated varieties reveal that, farmer's use always varieties named in local languages as showed in Table1 in Bas Congo province. These planting material are mostly from previously plantation or from unknown origin (Table 2). However, in few cases, in research station, local varieties used are from their collection.

In the five provinces surveyed, the variable frequency of cooking banana and banana dessert were recorded. Plantain is the widespread genotype in Kasaï Oriental and Bas Congo (71.9% and 62.5%) dessert banana is predominant in Bandundu, Katanga and Kinshasa urban and periurban (frequencies of 67.2%; 83.3%; 57.1%). Banana grown for beer has not been observed in the surveyed sites

-Cropping system, fertilization in banana culture

The survey of 72 locations in five provinces of the South Western of the country indicate that the banana and plantain are grown mostly around dwelling, where fertilization is mostly organic with a low frequency of fertilization. Most of the time, the supply of organic fertilizer is done before planting. This observation was performed in all types of cropping system.

In Katanga and Kinshasa urban and periurban, in respectively 50% and 57.1% of cases, the banana is fertilized before plantation and during the cycle. The regular intake of leaves and waste are carried out (Table 2). The plant remains longer in the same place without fertilization.

The age of the plantation is usually more than 12 months, and management of banana are not made or they are limited to weeding-ridging (25.9% Bandundu, Kinshasa urban and periurban 21.4%, Bas Congo, 12.5%). The banana adapts in a moist environment at high humidity greater than 60%, with deep, loamy, well-drained pH between 4.0 and 8.0.

Nitrogen, phosphorus and potassium are major elements essential to the growth of the

banana. The Ca and Mg are also needed for the culture [21]. Aside from soils mountainous regions of the country, the Congolese soils are mostly lateritic, leached, acid and poor. The conclusions of the work of Dowiya (2009) [23] have shown that, in Eastern Democratic Republic of Congo, soil fertility was not a constraint for banana cultivation. In South Western, the soil is a limiting factor that needs special attention. Culture of banana made without the input of mineral or organic fertilizer in the cycle of the plant, rapidly degrades soil quality and yield reduction was observed consecutively. This partly explains the existence of extensive cultivation among farmers.

Productivity of the banana depends on natural conditions controlled or mastered by the best facilities, cultivation techniques, pesticides treatments etc. [9].

- **Use of chemical treatment**

Results of the investigations presented in Table 1 shows that 100% of farmers do not use chemical pesticides despite the high pest pressure. Only experimental stations in Katanga province use fungicides for control of foliar pests. Management of pests and diseases of banana implies the short-term use of chemical pesticides with significant environmental risks. The lack of chemical pesticides and non-pesticide use inhibit the growth of production and therefore discourages intensification of banana cultivation. This result suggests that a sustainable alternatives and/ or effective would be the development of rational strategies of disease management, the definition of good agricultural practices necessary to reduce pest's pressure. The search for varieties resistant to these diseases and the development of biological control methods suitable and more efficient are way to sustainable disease control.

- **Care cropping**

Banana cultivation is carried out in bulk without additional crop tending. In the study area, Bandundu, Katanga, Kasaï Oriental, Kinshasa urban and peri- urban, bas Congo, bananas do not receive any cultural care, respectively in 74.1% of cases, 100%, 100%, 78.6% and 87.5%. In the remaining cases, in the province of Bandundu, Kinshasa urban and periurban, bas Congo, the banana is just weeded, stumbled and staked to prevent the fall of the plant, related to the wind.

Table 1: List of banana and plantain varieties found in South Western provinces of Democratic Republic of Congo.

Local name of varieties	Genotype	Type	Distribution Provinces / location
Dessert banana			
Cowbell fruit or Gros Michel (green)	AAA	Dessert banana	**Bandundu**/ Longo kuma kuma, Kwango, Bita, **Bas Congo**/Kisantu, Kinzita, Tshela, Kasangulu, Lukula, Mvuazi
Gros Michel (with balck dots)	AAA	Dessert banana	**Kasai Oriental**/Mulamba, Mpiana**, Bas Congo/** Mwenge, Patuzemba, **Katanga,** Kinshasa peri-urbain,
Gros Michel (rouge)	AAA	Dessert banana	**Bandundu**/ Feshi, Massimanimba, Kiyaka **Bas Congo**/Sekembata,
Yangambi Km 5	AAA	Dessert banana	**Bas Congo**/ Mwenge, Patuzemba, Kinzauvuete
Mbela (figue pomme)	AAB	Dessert banana	**Bas Congo**/ Patu, Ndalu, Luki, Kiyaka
Silambela	AAA	Dessert banana	**Bas Congo**/ EPLV, Mbanza Ngungu
Mboba	AAA	Dessert banana	**Bas Congo**/ Quatre janvier, axe Tshela
Yina	AAA	Dessert banana	**Bas Congo**/ Patuzemba **Kasaï oriental**
Ndongila	AAA	Dessert banana	**Bas Congo**/ Madimba
Boboto	AAA	Dessert banana	**Bas Congo**/ Luki **Kasaï oriental/**Kaseki, Thilombo
Others varieties locals	-	Dessert banana	**Kinshasa periurban, Bas Congo** /Maduda, Kikiaka, Kisantu, Tshela, Mbanzangungu
Bitika	AAB	Dessert banana	**Bas Congo**/ Tshokoto, Mwenge
Bisamunyo	AAA	Cooking banana	**Bas Congo**/ Lukula, **Kasaï oriental/**Miabi,
Plantain			
Faux cornes	AAB	Plantain	**Bas Congo**/ Kisantu, Lukula centre, Kinzita, Mvuazi.
Bitebi	AAB	Plantain	Bas Congo/ Kisantu, Manza ngungu
Ngangila	AAB	Plantain	Bas Congo/ Luki, **Kasaï oriental**/Mbujimayi centre
Tebi	AAB	Plantain	Bas Congo/ Tshokoto, Mwenge,
Diyimba	AAB	Plantain	Kimangebele Lufu, Sengongayila
Makemba	AAB	Plantain	Bas Congo/ Kisantu, **Kasaï oriental/**Manda mukendi
Local plantain (faux corne)	-	Plantain	Bas Congo/ Maduda, Tshumba, patu,
Nseluka	AAB	Plantain	Bas Congo, Kimpanga Nombe
Kisele	AAB	Plantain	Bas Congo/ Boko **Kasaï oriental/**Manda mwembia, Miabi
Vrai cornes	AAB	Plantain	Bas Congo/ Lukula **Kasaï oriental/**Miabi, Mpiana

Table 2: Agro-ecological characteristics of the farmer's fields in five provinces surveyed

	Provinces surveyed					BBTV Frequencies	
Observed parameters	**(%) Bandundu**	**(%) Katanga**	**(%) Kasai Oriental**	**(%) Kinshasa urban and periurb**	**(%) Bas Congo**	**Ratio of positives samples**	**(%) of positives samples by analysed parameters**
1. **Cropping System**							
Planting around dwellings	89.7	60.0	100	100	70.0	70/160	43,7
Forest plantation	5.2	0	0	0	15.0	6/21	28.5
Experimental plantation	5.2	40.0	0	0	15.0	20/35	57.1
2. Genotype							
Plantain	32.8	16.7	71.9	42.9	62.5	43/117	36.7
Dessert banana	67.2	83.3	28.1	57.1	37.5	53/99	53.5
Banana beer	0	0	0	0	0	0	0
3.Type of variety (Planting material)							
Locale varieties	72.4	76.7	87.5	100	100	90/194	46.3
Improved varieties	27.6	23.3	12.5	0	0	6/22	27.2
4.Health status of planting material							
Known (certified planting material)	0	0	0	0	0	0	0
Unknown (not certified plantaing material)	100	100	100	100	100	96/216	44.4
5.Origin of planting material							
Research center	5.2	0	0	0	15.0	4/15	26.6
ONGDs or farmer's association	0	0	0	0	0	0	0
Previously plantations	94.8	100	100	100	85.0	92/201	45.7
6.Age of plantation							
1 to 6 months	6.9	0	12.5	0	5.0	3/9	33.3
7 to 12 months	13.8	55.5	31.2	21.4	35.0	17/45	37.7
More than 12 months	79.3	44.4	56.2	46.7	60.0	76/162	46.9
7.Type of fertization							
Organic	86.2	56.7	100	78.6	77.5	69/136	50.7
Mineral	0	0	0	0	0	0	0
Organic and Mineral fertilization	1.7	33.3	0	0	7.5	5/10	50
No fertization	12.1	10.0	0	21.4	15.0	22/70	31.4
8.Number of Fertilizer application							
Once at planting	72.4	33.3	87.5	28.6	57.5	43/111	38.7
Twice times : before plantation and during the cultural cycle	1.7	0	0	0	0	24/45	53.3
No fertilisation	13.8	16.7	0	14.3	15.0	29/60	43.3
9. Phytosanitairy Treatment							
No phytosanitary treatment	100	96.6	100	100	100	96/214	44.8
Phytosanitary treatment	0	3.4	0	0	0	0/2	0

	Provinces surveyed					BBTV Frequencies	
Observed parameters	**(%) Bandundu**	**(%) Katanga**	**(%) Kasai Oriental**	**(%) Kinshasa urban and periurb**	**(%) Bas Congo**	**Ratio of positives samples**	**(%) of positives samples by analysed parameters**
10. Crops Association							
Yes	67.2	30.0	59.4	64.3	80.0	40/104	38.4
Not	32.8	70.0	40.6	35.7	20.0	56/112	50
11. Topography of the land							
Slope	15.5	0	0	7.1	5.0	4/12	33.3
Flat land	37.9	66.7	56.2	21.4	30.0	47/109	43.1
Top of Hill	22.4	10.0	0	21.4	32.5	20/40	50
Valley	24.1	23.3	43.8	50.0	32.5	26/55	47.2
12. Other type of maintenance (weeding, hilling, desuckering, coppicing, staking)							
Yes	25.9	0	0	21.4	12.5	25/59	42.3
Not	74.1	100	100	78.6	87.5	70/157	44.5
13. Distribution of BBTV							
BBTV positive samples on 216 samples	**13**	**3**	**26**	**16**	**38**		

Discussion

Banana bunchy top virus is an important disease, with economic impact. It is one of the major constraints for *Musa* germplasm movement and exchange of improved varieties in the world [9, 1, 23-27]. Numerous factors, including virus isolate, host genotype, crop management and agro-ecological conditions influence the variability of symptoms expression [28]. Conventional controls such as quarantine, eradication and certified virus free planting materials have been successfully used to reduce crop losses caused by this virus. For example, in Australia, the early symptoms observation associated to the early destruction of infected plant has led to the eradication of disease [9, 29].

The control of Banana bunchy top disease requires that, knowledge of the current geographical distribution, the agro-ecological characteristics of banana growing areas and the factors promoting the distribution of the disease. Here, these parameters have been studied with the aim to understand the situation of BBTV and in order to develop the strong strategies of BBTD management.

The work reported here established the level of BBTV infection and distribution in different agro-ecological conditions of five provinces of Democratic Republic of Congo.

This study reveals that, *Banana bunchy top virus* is present in all provinces and is highly distributed.

A total, 44.4% (96/216%) of banana plantations in the South Western of the country are *Banana bunchy top virus* infected. This result is similar to the conclusions of other authors [10]. Comparing the level of infection of five provinces, result shows the highest BBTV frequency in the Bas Congo, where 79.1% (38/48) of samples are BBTV infected. These results seem to be linked to multiple introductions of improved varieties in each territory of this province between 1990 and 2002 [31].

The province of Katanga has not experienced of the introduction of improved planting material and the country, which shares the border with the Katanga province, has been infected recently [32]. This factor would explain the low frequency of *Banana bunchy*

top virus (16.6%) or (3/18).

Also the Bandundu province, where the frequency of BBTV is low, has been disconnected from other provinces, because of the disrepair of the road that, connects it to Kinshasa, Kasaï Occidental. This isolation allowed maintaining the low level of infestation.

Observation during our investigation confirmed that, planting material use in all provinces of South Western of Democratic Republic of Congo are local varieties, with unknown health status. These results join the conclusions of the work of other authors [22], which stated that there is not, in Eastern of Democratic Republic of Congo, the institution, which provide the improved varieties of banana, although the Plant Clinic of Kinshasa currently provides the sanitary control of planting material. But 100% of planting materials are no certified and most are the banana suckers.

Surveys revealed also that the exchange of non-certified and healthy planting materials, the use of local varieties of unknown origin, contributes significantly to the spread of *Banana bunchy top virus*. Such observation was made Lava Kumar [10]. For example, the collected samples from experimental fields of the faculty of Agronomy, collected in different parts of the Katanga province, have been experimented for their potential agronomic.

Although the low level of BBTV in this province, it appears that, in the experimental fields 2/10 samples are BBTV positives or (20%). While, in the province of Bas Congo, in research station two samples on three are BBTV positive.

Banana (*Musa* spp) is a culture of high agricultural potential in DRC [31, 33]; Results obtained in this study suggest that, *Banana bunchy top virus* influence the banana crop in South Western of DRC. It is probably one of the major's factors responsible of the decline of banana yield. Banana is cultivated several years at the same place. This practice contributes not only to a decrease of soil fertility, but also to the accumulation of other diseases like BBTV [27]. The poor performance of techniques of production, the poor quality of planting material, the high incidence of *Banana bunchy top virus* and widespread status of Banana bunchy top disease (in all provinces studied) influences negatively the performance of banana and are the majors constraints in banana production in South Western DRC. Thus, it appears that there is a real need

for: (i) improved and certified planting material, (ii) the strengthened of the diagnosis institutions shuch as the Plant Clinic International in Kinshasa, (iii) the developpement of the adapted diagnostic tools. (iv) The need for improving conditions of banana production particularly the technical itineraries which consider all identified constraints [33]. This work is only the preamble to the development of management strategies for the effective control of *Banana bunchy top virus* and the improvement of banana sector in the Democratic Republic of Congo.

Conclusion

Finally, *Banana bunchy top virus* is established and is spreading across agro-ecological conditions, in all banana-growing areas particularly in South Western Democratic Republic of Congo. BBTV is also present in experimentation and research stations (in Katanga and Bas Congo). Considering the major role of the research institutions, the frequency of BBTV observed is very high and worrying.

There is a real need for establishing control strategies at different levels: among farmers, instutitions and state level: (i) **Farmer's level**: the use of healthy planting material, the destruction of BBTV infected plants and the training of farmers to recognition of BBTV symptoms, the destruction of BBTV infected plants and the use of healthy and certified planting material.

(ii) **Institutional level**: The skills of different institutions in the country must converge for the effective strategy of BBTV control. The Animal and Plant Quanrantine Service (SQAV) have to ensure the importation of safe plants and limite the importation of susseptible banana varieties in all boder points of DRC. The Plant Clinic or Kinshasa could help for the detection and diagnosis of planting material before plantation or multiplication. With SENASEM (National service of Seed Control) the Plant Clinic could help for certification of banana planting material. The INERA (National research centre) could work for the multiplication-distribution of healthty planting material. The laboratory of invitro culture, in Faculty of Science in Kisangani University can be use for the selection of tolerant local varieties. Finaly the universities have the big role in the promotion of BBTV research, which results could be, extend by the National Service of Extension (SNV);

(i) **State level**: controls strategies including the creation of buffer zones or quarantine areas, the development of biological control methods against the vector (*Pentalonia nigronervosa* Coquerel), the development of resistant varieties, the development of sensitive, effective and appropriate diagnostic tools, adapted to the Congolese agricultural context, the support of institutions dedicated to the control of planting material; The implementation of all the strategies will support the control of *Banana bunchy top virus* and then will reviving the banana sector in DRC.

(ii) **Regional level:** All control strategies of BBTV in Democratic republic of Congo should be carried out according to the vue of all concerned countries at regional levels. For more efficiency, the participation of international institutes such as IITA, FAO or USAID are very usefull.

Acknowledgements

Our thank you to the Direction of Statistics of the National Institute of Agronomic Research of INERA/ DRC, to the Belgian Development Agency which funded this study, the technical staff and all the technicians of the International Plant Clinic and any person who, in one way or another to contribute to this study.

References

[1] Tushmereirwe, W.K. and Bagabe, M. 1999 review of disease distribution and pest status in Africa, in review of IPM research activities – pathology, pp.139-147.

[2] Van Damme, J. 2008. Analyse systémique des contraintes en culture bananière au Rwanda, *mémoire inédit*, Université catholique de Louvain, Belgique, pp 107.

[3] Website: www.faostat.org

[4] Institut national de Statistique. 2006. Rapport annuel de la direction des statistiques démographiques et Sociales, Kinshasa, RDC, pp 203.

[5] Mobambo, P., Staver, C., Hauser, S., Dheda B. ans Vangu, G. 2010. An innovation capacity analysis to identificatify strategies for improving plantain and banana (Musa spp) productivity and value addition in the Democratic republic of Congo, *Acta Horticulturae*, 879, pp.821-828.

[6] Caruana-Iskra, M.L. 2003. Analyse du Risque Phytosanitaire (ARP). Organisme *nuisible, Banana bunchy top Babuvirus*-BBTV zones ARP: Martinique, Guadeloup, and Guyane/ *Cirad*, pp.7-14.

[7] FAO. 2009. Travailler ensembles lutté contre les maladies de la banana en Afrique Subsaharienne, Bulletin d'information : www.fao.org.

[8] Shiragi, H. Baque A. and Nasiruddin, K. 2010. Eradication of banana bunchy top virus (BBTV) through meristem culture of infected plant Banana cv. Sabri, *Horticulturae environnemental biotchnology*, 51 (3), pp.212-221.

[9] Lassoudière, A., 2012. Le bananier, un siècle d'innovations technique, *ed. Quae*, Versailles, France, Pp 352.

[10] Lavakumar, P., Hanna, R., Alabi, O.J., Soko, M.M., Oben, T.T., Vangu G.H.P. and Naidu, R.A. 2011.Banana bunchy top virus in Sub-Saharan Africa: Investigations on virus distribution and diversity, Virus Research, 159, pp.171-182,

[11] Aritua, V., Nanyonjo, A. Kumakech, F. and Tushemereirwe, W. 2007. Rep-PCR revels High homogeneity among Ugandan issolates of Xanthomonas campestris pv. Musacearum. African Journal of biotechnology, Nairobi, Kenya, pp 179-183.

[12] S. Mansoor, J. Qazi, I. Amin, A. Khatri, A.I. Khan, S. Raza, Y. Yusuf Zafar and BW Bridon, A PCR- Based Method, with Internal Control, for the detection of banana bunchy top virus in Banana. *Molecular biotechnology*, 30, 2005, pp. 167-170.

[13] Amine, I., Ilyas, M., Qazi, J., Bashir, R., Yadav, J., Mansoor, S., Fauquat M.C. and Briddon, W. 2011. Identification of a major pathogenicity determinant and suppressors of RNA silencing encoded by a South Pacific isolate of Banana bunchy top virus originating from Pakistan, *Virus gens*, 42, pp.272-281.

[14] Lockhart, B.E.L. 2002. Management of viral diseases of banana. Correspondance scientifique (Conference magistral) department of plant pathology, University of Minnesota, USA, pp.217-221.

[15] Anhalt, M.D. and Almeida, R.P.P. 2008. Effect to temperature, vector Life stage, and plant access period on transmission of banana bunchy top virus to banana. American phytopathological society, 98 (6), pp.743-746.

[16] Padmalatha C. and Sigh, A.J.A.R.1998. Aphidophagus coccinellids on Pentalonia nigronervosa, a vector of Banana bunchy top virus in the banana plants of Southwest India. Tropical ecology, 39 (2), 239-242.

[17] Gatsinzi, F.1987. Les principales maladies et ravageurs du bananier au sein de la CEPGL in séminaire sur les maladies et ravageurs des principales cultures vivrières d'Afrique centrale, *Iraz, CTA, Bujumbura, Burundi*.

[18] Buycks, E.J.E. 1962. Précis des maladies et des insects nuisibles rencontrés sur les plantes cultivées au Congo, au Rwanda et au Burundi, *I. N.E.A.*C.

[19] Kabulu, J.P. 2006. Evaluation et cartographie de la déforestation au Katanga (RDC), *mémoire on line*, ULB, belgique, pp.84.

[20] Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. 1983. A plant DNA mini preparation: version II. Plant Mol. Biol. Rep.4, 19-21.

[21] Anonyme. 2009. Memento de l'agronome, CTA, Paris France. Pp 1689.

[22] Dowiya, N.B., Rweyemamu, C.P. and Maerere, A.P. 2009. Banana (Musa spp colla), cropping systems, production Constraints and cultivars preferences in eastern Democratic republic of Congo, pp 341-355.

[23] Sharman, M., Thomas J.E. and Dietzgen, G.R. 2000. Development of a multiplex Immunocapture PCR with Colourimetric detection for viruses of banana. *Journal of virological methods* 89, pp.75-88.

[24] Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Saravanakumar, D., Soorianathasundaram, K., Samiyappan, R. 2008. Biohardening with plant growth promoting Rhizosphere and Endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana bunchy top virus, *applied soil ecology*, 39, pp.187-200.

[25] Diekmann M. and Putter, C.A.J. 1996. *Musa* spp: technical guidelines for the safe movement of germoplasm, N°15, FAO/IPGRI.

[26] Wardlaw, C.W. 1961. Banana diseases: Including Plantains and Abaca, longmans, London.

[27] Teycheney, P.Y., Acina, I., Lockhart B.E.L., and Candresse, T. 2007. Detection of Banana mild mosaic virus and Banana virus X by polyvalent degerate oligonucleotides RT-PCR (PDO RT-PCR. Journal of Virological methods, 142, pp 41-45.

[28] Harper G., Hart, D., Moult, S. and Hull, R. 2004. Banana streak virus is very diverse in Uganda, *Virus research*, 100, pp.51-56.

[29] Kablan, L.2012. Effet protecteur du silicium sur la tolérance du bananier aux deux maladies fongiques, UCL, Belgium, pp.177.

[30] Bakelana, B. 2005. Participation of farmers in the evaluation and dissemination of improved banana cultivars in Bas Congo province, DRC: results of the first three years of activity, *Musafrica*, Vol (2), 1, pp. 11-13.

[31] Tollens, E. 2004. Les défis : Sécurité alimentaire et culture de rente pour l'exportation : principale orientations et avantage comparatives, de l'agriculture en RDC, Kinshasa, République Démocratique du Congo, pp.34.

[32] Gondwe, W.T., Mwenebanda, B.M.L., Natha, E. and Mutale, P. 2007. Banana bunchy top disease in Mozambique and Zambia Infomusa, 16:1-2

[33] Swennen, R. and Vuylsteke, D. 2001. Bananier. In ramaekers, H.R (ed) Agriculture en Afrique Tropicale. DGCI Bruxelles, pp 611-636.

[34] Selvarajan, R., Sheeba, M.M., Balasubramanian, V. 2011. Simultaneous detection of episomal Banana streak Mysor virus and Banana bunchy top virus using multiplex RT-RCP, Current sciences, 100 (1).

Préambule

La globalisation des échanges commerciaux, le changement climatique, l'évolution des agents phytopathogènes, et la modification des agro-écosystèmes impliquent un risque accru pour l'introduction, l'émergence et la réémergence des agents phytopathogènes dans des régions autrefois indemnes. Au cours des dernières années, les virus ont représenté 47% d'organismes introduits et/ou émergents dans le monde (Anderson et al. 2004, Miller et al. 2009).

Chez le bananier, les virus constituent un facteur limitant de premier ordre (Diekmann et al. 1989, Burns et al. 1995). Certains à distribution restreinte *Banana bract mosaic virus*) et d'autres plus mondialement distribués (*Banana bunchy top virus*). Le *Banana bunchy top virus* appartient au groupe de 10 virus à impact économique élevé (Rybicki 2015), ainsi une attention toute particulière lui a été accordée dans le précèdent chapitre 4. Les résultats ont montré que : (i) *Banana bunchy top virus* sévit dans les cinq provinces du sud ouest de la République démocratique du Congo, à des fréquences variables. (ii) La province du Bas Congo enregistre la fréquence la plus élevée et que (iii) le facteur humain constitue le principal moteur de dispersion du BBTV au Sud-Ouest de la République démocratique du Congo.

A ce jour, à notre connaissance, aucun autre virus du bananier n'a été rapporté en République démocratique du Congo. Au cours des enquêtes épidémiologiques conduites dans les cinq provinces en 2011 et 2012, des symptômes inhabituels ont été observés sur le bananier en champs paysan au Bas Congo. Ce qui a soulevé les interrogations quant à l'existence des autres virus du bananier à part *Banana bunchy top virus.*

Par souci de précision, favorisé par sa position géographique et au vu de la forte fréquence du *Banana bunchy top virus* dans la province du Bas Congo, les enquêtes épidémiologiques plus ciblées y ont été réalisées au mois de mai et juin 2013, en vue de rechercher les virus émergeants du bananier et plantain. En plus du *Banana bunchy*

top virus, dont la fréquence a été évaluée une seconde fois. Les espèces de Banana streak virus (*Banana streak GF virus, Banana streak OL virus, Banana streak IM virus, Banana streak MY virus),* le *Cucumber mosaic virus* et le *Banana bract mosaic virus* ont été recherchées.

Ainsi, elles ont été mises en évidence pour la première fois dans la province du Bas Congo. Et l'absence du *Banana bract mosaic virus* a été confirmée dans l'échantillon cible. Ces résultats donnent ainsi, un aperçu du statut actuel des viroses du bananier en République démocratique du Congo.

CHAPITRE 5

Banana streak virus and *Cucumber mosaic virus* affect banana (*Musa* spp.) in addition to *Banana bunchy top virus*, in Bas-Congo province, DRC

L.F.T. Mukwa[1,2], C.G. A. R. Bragard[1,2]*, N. Laboureau[4], S. Galzi[4], A. Gillis[3], G. Romay[1], A. Kalonji-Mbuyi[2,5], M-L. Iskra-Caruana[4]

(1) Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Applied Microbiology - Phytopathology, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2 Bte L07.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve Belgium; (2) Clinique des Plantes de Kinshasa, 8842, wangata, Kin I, Kinshasa, D.R. of Congo; (3) Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Croix du Sud 2 Bte L07.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve Belgium ; (4) Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement ; (5) Université de Kinshasa, Faculté des Sciences Agronomique, D.R.Congo
(*) Corresponding author: claude.bragard@uclouvain.be

Ce manuscrit est soumis dans le journal « *Plant disease* ».

The nucleotide sequences reported here have been deposited in the GenBank database under accession numbers KU759862 to KU759867; KX216857 to KX216874 and KX611406 to KX611412

Abstract

To date, apart from the presence of *Banana bunchy top virus* (BBTV) in the Democratic Republic of Congo (DRC), there are no official reports of the occurrence of other banana viruses in the country. Targeted surveys were organized in the Bas-Congo province in DRC. A total of 450 banana leaf samples were collected and analysed using PCR-based techniques developed to detect *Banana bunchy top virus*, the four main species of Banana streak virus (BSV) uncountered worldwide (*Banana streak GF virus, Banana streak OL virus, Banana streak IM virus, Banana streak MY virus*), *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Banana bract mosaic virus* (BBrMV). In addition to BBTV, which is prevalent in banana and plantain in Bas-Congo (frequency of 26%), the four BSV species are found associated with banana streak symptoms. They all infected both inter-specific hybrids (AAB and AB) and dessert banana (AA, AAA) with no evidence of any epidemics of BSV. BSGFV is the most prevalent BSV species with a frequency of 13.5%. BSGFV, BSOLV, BSIMV, and BSMYV infection could result from infective endogenous BSV sequences (eBSV) present in the B genome of inter-specific banana hybrids. The frequency of the BSV species mealybug vector's association with banana streak symptomatic samples is about 9.3%, suggesting a possible vector transmission of the disease. CMV is widespread in all banana-cropping systems in DRC. BBrMV has not been detected in spite of the targeted

Additional Key words: Banana viruses, Detection, Diagnostic, Vector transmission, Mealybug

Introduction

Viruses are one of the major constraints to banana (*Musa* spp.) production and limit the exchange of banana and plantain germplasm worldwide, in addition to their effects on yield and quality. Several viruses are currently listed as impacting banana and plantain cultivation around the world. The most economically important is *Banana bunchy top virus* (BBTV), considered to be one of the top 10 viruses destroying local banana genotypes in several countries in sub-Saharian Africa (Rybicki 2015, Blomme et al. 2012), followed by *Banana bract mosaic virus* (BBrMV) and, depending of either environmental context or banana genotypes, by Banana streak virus (BSV), and *Cucumber mosaic virus* (CMV). Two viruses of minor significance are *Banana mild mosaic virus* (BMMV) and *Banana virus X* (BVX) (Jones 2000).

Banana (*Musa* spp) is a valuable agricultural commodity globally and is especially important, for income and food security in DRC. Plantain is the second most important staple food after cassava (*Manihot esculenta*). More than 70% of Congolese population consumes banana daily (Mobambo et al. 2010). Twenty years ago, the banana production was decrease about 20% and the cultivated areas declined up to 60% in DRC (Mobambo et al. 2010).

In DRC, the first BBTV outbreak was reported in 1950 in Yangambi in the Kisangani region (Blomme et al. 2012) and until now remains the major viral constraint limiting the banana production (Mukwa et al. 2014). The virus is a multi-components virus, having six single-stranded DNA genomes of 1kb packadged each into small isometric particles (18-20 nm) consisting of a coat protein (Thomas and Dietzgen 1991). BBTV induces characteristic discontinuous dark green flecks, streaks of variable length on the leaf sheath. The leaves of infected plants progressively become smaller, like arrows and erected, giving the plant a bunchy appearance at the top in addition of a strong dwarfism. On susceptible cultivars, a severe BBTV attacks can result in yield losses of 50-100% (Lokossou et al. 2012, Soko et al. 2009, Darnell-Smith 1924, Selvarajan & Balasubramanian). The virus is efficiently dissiminated by an aphid, *Pentalonia nigronervosa*.

BSV cause the banana streak disease (BSD) characterized by yellow streaks on leaves, mosaics, chlorosis pitcher necrosis, cracking of the collar of the pseudo-stem, abnormal bunch development and death of the cigar leaf and distortion of the fruit. BSD was detected for the first time in Africa in the Nieky valley in Ivory Coast in 1958 (Lockhart and Jones 2000). The virus is now endemic in at least 16 African countries, including Burundi and Rwanda (Gauhl et al. 1999; James et al. 2011; Kubiriba et al. 2001; Tushemereirwe and Bagabe 1999). Even if BSV is mealybug-vector transmitted, the BSV epidemiology remains unclear because no epidemics have been reported worldwide (Iskra-Caruana et al. 2014; Kumar et al. 2015) and BSV situation in DRC is still unknown. BSV possesses a bacilliform (30 x 130-150 nm) particle a double strand (ds) non-covalent circular DNA genome. It belongs to the family *Caulimoviridae* and the genus *Badnavirus* (Geering and Hull 2012). The badnaviruses are highly variable both serologically and genomically (Harper et al. 2004). The infection can result from two origins: (1) one from classic viral multiplication following the natural infection of a plant by mealybug transmission; (2) the other from endogenous BSV sequences (eBSV) existing in the B genome of the banana plant and able to release a functional viral genome used to a virus multiplication (Iskra-Caruana et al. 2003).

To date, nine distinct BSV species are recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV 2014); four of them occur worldwide (BSGFV, BSOLV, BSMYV, BSIMV) (Iskra-Caruana et al. 2010; James et al. 2011) and the three first have an endogenous counterpart within the B banana genome. Symptoms severity depends of the virus species as well as banana genotypes. Infection is difficult to observe because it is characterized by periodic appearance and disappearance of symptoms related to changes in environemental conditions (Pichaut et al. 2013). The economic importance of BSV results from both the direct effect of the disease on crop yield (estimated to be 40-60%) and the restrictions imposed on deploying improved hybrids having eBSVs due to the occurrence of the causal virus in many of these genotypes (Lockhart and Jones 2000).

CMV is a *Cucumovirus* (Singh et al. 1999, Szilassy et al. 1999, Chou et al. 2009), which attacks not only banana and plantain, but also a wide range of other plants (Dheepa and Paranjothi 2010). CMV has been reported from Kenya, Nigeria and in industrial banana plantations in southern Ivory Coast (Aka et al. 2009; Opiyo et al. 2010; Ayo-John et al. 2014), but not yet in DRC in banana. Based on serological relationships, peptide mapping of the coat protein, CMV isolates have been described and grouped into Subgroups I and II (Yu et al. 2005). CMV isolates infecting bananas all belong to Subgroup I. Banana infected by CMV exhibits chlorosis and mosaic of the leaves, pseudo-stem splitting and fruits with heart rot (Chou et al. 2009; Dheepa and Paranjothi 2010). This virus is present in most banana-growing regions of the world (Dheepa and Paranjothi 2010; Lockart and Jones 2000).

BBrMV was first reported in the Philippines in 1979, where it naturally infects banana and abaca (Sharman et al. 2000b). BBrMV belonging to the family *Potyviridae* and the genus *Potyvirus*, causes characteristic spindle-shaped, purplish streaks on bracts, pseudo-stems, midribs, peduncles and fruits (King et al. 2012; Rodoni 1997; Thomas et al. 1997). Yield losses of 30-70% have been recorded in India and the Philippines (Kumar et al. 2015). It was initially confined to Asia, but was recently reported in Ecuador (Quito-Avila et al. 2013) and detected in ornamental ginger plants in the USA (Wang et al. 2010). It has not yet been reported in Africa.

All of these banana viruses are transmitted plant-to-plant by insects and the infected planting materials used as seeds to re-plant insure the long-distance distribution (Amin et al. 2008; Harper et al. 2004; Natsuaki and Furuya 2007; Chou et al. 2009; Rodoni 1997).

In DRC, the only virus reported so far on banana and plantain is BBTV. During a BBTV survey carried out by Mukwa et al. (2014) in the south-western part of DRC, virus-associated symptoms other than ones of BBTV were observed, likely indicating the presence of other viruses. The objective of this study was to seek the presence of the viruses involved in the major diseases on banana and plantain in DRC, with the particular focus on the Bas-Congo province. This region is one of the major banana-growing areas in the country (Latham and Konda 2006), established in the

Congo basin, which is the second centre of diversification of plantain in Africa (Mobambo et al. 2010).

Materials and Methods

Sample collection and symptoms evaluation. Epidemiological surveys were carried out during the period corresponding to the end of the rainy season and the beginning of the dry season (May-June) in 2013 for BBTV, BSV, CMV and BBrMV. In Bas-Congo, this period matches with a change in agro-climatic conditions. Farmers change cropping and the temperature and precipitation decrease. It is the period when viral symptom expression is optimal. All the banana leaf samples were obtained from plants in clumps that were more than 12 months old, located in farmers' fields in the study areas. A total of 450 asymptomatic and symptomatic banana leaf samples were collected in 50 Bas-Congo villages (Figure 1). At each collection location randomly chosen, a 100 x 100 m square was delimited for observing symptom expression and collecting nine samples for BBTV, BSV, CMV and BBrMV analysis.

Virus detection. BBTV detection was performed following the method described by Mukwa et al. (2014) using specific BBTV primers BBTVF/BBTVR (Table 1) targeting the partial sequence of DNA-R; that generated a product of 290bp. The initial cycle of denaturation was at 94°C/5min, followed by 30 cycles of (94°C/30 sec, 58°C/30 sec, 72°C/30 sec) and the finally extension of 72°C/10 min.

The following four BSV species, BSGFV, BSOLV, BSIMV and BSMYV were specifically detected using theimmunocapture PCR (IC-PCR) method described by LeProvost (2006), slightly modified by the use of a DNase step to eliminate plant DNA residues. Each targeted BSV species was detected using specific primer pair (Table 1): Gfr/Gff for BSGFV, Olr/Olf for BSOLV, Imr/Imf for BSIMV, and Mysr/Mysf for BSMYV (Chabannes et al. 2013). The immunocapture step used polyclonal antibody raised against a mixture of the main BSV species (1/8000 kindly supplied by Bioversity from South-Africa) diluted at 1/100 (pH 6.8). Thirty microliters of DNAse mix (3µl 10Xbuffer (400mM Tris-HCl [pH 8.0 at 25°C], 100mM $MgSO_4$, 10mM $CaCl_2$); 3µl of DNAse I (1U/µl) and 24 µl of water) was

added to the coated tubes and incubated for 1h at 37°C. The supernatant was removed and the tubes washed once with water. DNAse I was inactivated by incubation at 95°C for 10 min. The PCR cycle was performed directly on the plates using specific BSV species primers (Table 1). The PCR cycle involved an initial denaturation step at 94°C for 10 min, then 30 cycles (94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 30 sec,) followed by a final elongation step for 10 min at 72°C. The PCR products (10 µl each) were analysed by electrophoresis on an agarose gel (1.5%). At each step of the test, positives and negatives controls have been included. For the Immunocapture step, banana infected by each BSV species tested, was used as positive BSV control. The *Musa balbisiana* diploid PKW (BB) and *Musa acuminata* cultivar Cavendish (AAA), both virus free, were used as negative controls. For the PCR step only, DNA of PKW (containing eBSGFV, eBSOLV, eBSIMV) was used as positive eBSV control of DNA amplification.

CMV as well as BBrMV detection was separately performed using IC- One–step RT-PCR. For CMV detection, plates were coated for 4 h at 37°C using a specific polyclonal antibody supplied by Agdia Biofords France, before the samples were added and incubated at 4°C overnight. The RT-PCR reaction mix was prepared in a total volume of 28 µl (1.5 µl of each primers, 1 µldNTP, 5 µl buffer 5x, 1 µl enzyme mix and 18 µl of H_2O), using 10 pM of primers HU1/HU2 (Table 1) designed to amplify a product of 750 bp of CMV coat protein (Hu 1995). The RT-PCR conditions were optimized following the protocol described by the manufacturer: reverse transcription step at 50°C for 30 min, then at 95°C for 15 min, followed by 30 cycles (94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 45 sec), with a final extension at 72°C for 10 min. The products from this assay were electrophoresed in 1.5% agarose gel. The infected and virus-free banana leaves, from the UMR/BGPI-Cirad greenhouse, were used as positive and negative control respectively.

IC-One-step RT-PCR was done, also for BBrMV detection using the method previously described for CMV. Two different primer set BBrMV1F/BBrMV1R and Bract N1/Bract NR (Table 1), were used in distinguish reactions at the respectively annealing temperature of 55°C for 20 sec and 57°C for 1 min, in order to confirm results (Iskra-Caruana et al. 2008; Rodoni 1997). Banana leaves infected by BBrMV

and virus-free banana leaves, from the UMR-BGPI, Cirad Montpellier were used respectively as positive and negative controls.

eBSV genotyping in the B genome of banana sample. All inter-specific hybrids indexed as BSV-infected containing B genome, were analysed using specific PCR and derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS) markers designed to genotype eBSGFV, eBSOLV known to be infective (Gayral et al., 2008; Chabannes et al., 2013). All PCRs were performed as described by Gayral et al. (2008) and Chabannes et al. (2013) on 5 to 20 ng of plant DNA using a common mix composed of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.1 mM each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM $MgCl_2$, 400 nM of the forward and reverse primers, and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium) in a final volume of 25 µl. The targeted eBSV, the name and the sequence of the primer as well as the size of the PCR product are given in the table 1. For allelic markers allowing discrimination between infective and non-infective eBSV, PCR products from BSOLV and BSGFV species were respectively digested using specific enzymes: *Hae* III and *Taa*I as described by Chabannes et al. (2013) and Gayral et al. (2008).

Amplicons were visualized after migration of 8 µl of PCR products on an agarose gel (1–3% according to the expected size of the amplicon) in 0.5X TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA [pH 8]). The gel was stained with ethidium bromide and amplified bands visualized under UV light. Only Pisang Klutuk Wulung (PKW) was used as a positive control because it naturally contains both alleles for BSGFV and BSOLV.

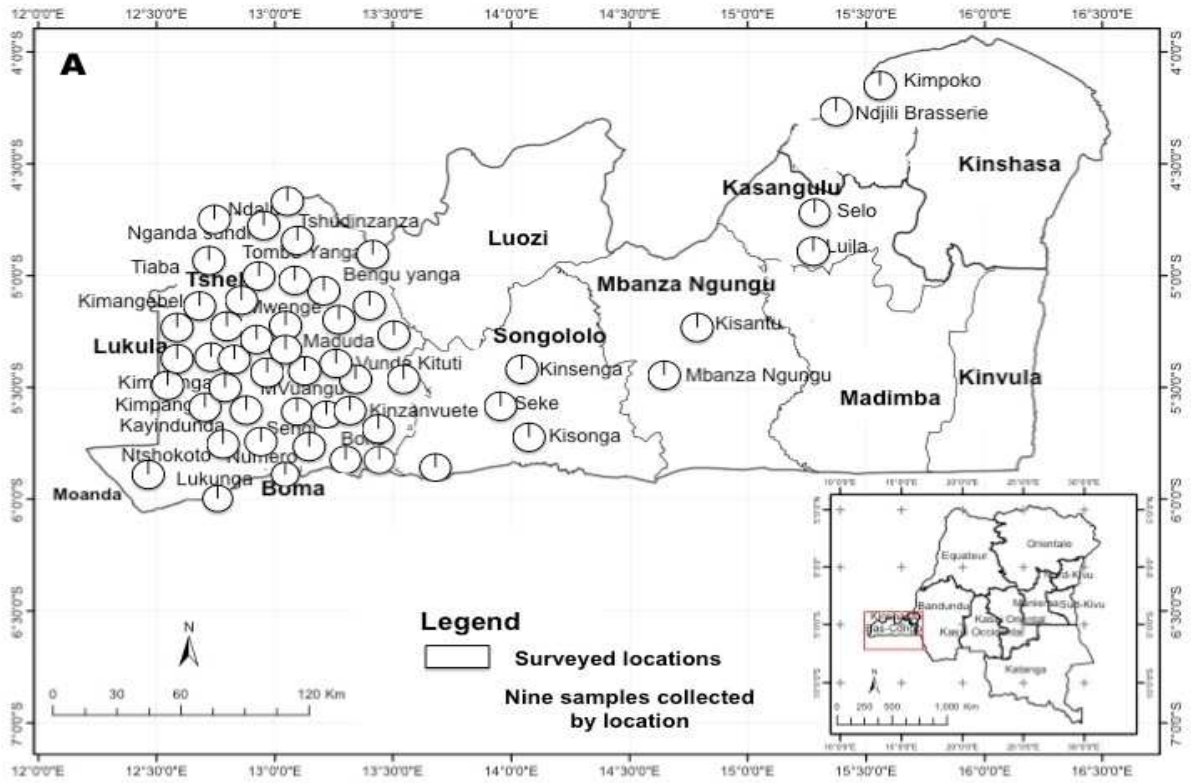


Figure 1 Map of Bas Congo province showing the localisation of 50 sites surveyed . For information, two sites are located in Kinshasa provinces.

Table 1. List of primers used to detected banana viruses (BBTV, BSGFV, BSOLV, BSIMV, BSMYV and CMV) in Bas-Congo province, DRC**.** Derived cleaved amplified polymorphism sequences (dCAPS) markers were used to detect junctions between eBSVs and *Musa* genome. The predicted size of PCR product and the origin of all primers and markers listed is indicates with a number on the reference column and on the bottom of the table.

Primer	Sequences (5'- 3')	Targeting site (gene)	Expected amplicon size (bp)	Annealing temperature TM	References
BBTV- F	-GGCGCGATATGTGGTATGCTGG-	DNA-R	290 bp	58°C	*In this study (1)*
BBTV - R	-CCAAACTCGAAGGGACCTTCG -				
BSGFV Forward	-TCGGTGGAATAGTCCTGAGTCTTC-	RNase H	476bp	58°C	(2)
BSGFV Revers	-ACGAACTATCACGACTTGTTCAAGC				
BSOLV Forward	- ATCTGAAGGTGTGTTGATCAATGC-	RNase H	522bp	58°C	
BSOLV Revers	-GCTCAATCCGCATCTTATCAGTC-				(2)
BSIMV Forward	-TGCCAACGAATACTACATCAAC-	RNase H	384bp	58°C	
BSIMV Revers	-CACCCAGACTTTTCTTTCTAGC-				
BSMYV Forward	-TAAAAGCACAGCTCAGAACAAACC-	RNase H	589bp	58°C	(2)
BSMYV Reverse	-CTCCGTGATTTCTTCGTGGTC-				
HU1 (CMV Forward)	-CATCGACCATGGAAATCTGAATCAAC-			60°C	(3)
HU2 (CMV Revers)	CTCTCCATGGCGTTTAGTGACTTCAGCAG-	Coat protein	750bp		
BBrMV1F	-GGRACATCAAATTTRAATGG-			55°C	(4)
BBrMV1R	-GTGTGCYTCTCTAGCCCTGTT-	Coat protein	604bp		
Bract N1	-GACATCACCAAATTTGAATGGCACATGG-			57°C	(5)
Bract NR	-CCATTATCACTCGATCAATACCTCACAG-	Coat protein	280bp		
dCAPS- Musa OL For	-TGCATTAGATGGTCTGGGAAA-	Junction *Musa* -		58°C	(6)
dCAPS-Musa OL Rev	-ACTTCACGATGCCCATGTTT-	eBSOLV	564bp		
VM1 for	-TTGTCCAAAATCTGCTCGTG-	Junction VM1	481bp	60°C	
VM1rev	-TGTAATTCCTGCTCCTGCAA-				(6)
VM2 for	-TTCTCCCTTTTCGATCCGTA-	Junction VM2	374bp	60°C	
VM2 rev	-TTTTGATGCATCTCCAGCAG-				(6)
VV3 for	-AAGTTCTTGTCGGCAAGGTG-	Junction VV3	376bp	60°C	
VV3 rev	-TTGCCAAGAATTCCTCCAAG-				(6)

(1) Developped in this study (2) Geering et al. 2000, (3) Hu et al. 1995, (4) Rodoni et al. 1999, (5) : Iskra-Caruana et al. 2008, (6) : Chabannes et al. 2013 ; Gayral et al. 2008.

Nucleotide sequences analysis of BSGFV and BSOLV isolates. In this study BSGFV and BSOLV isolates were sequenced because of their high prevalence on *M. balbisiana*. Naturally, BSGFV and BSOLV occurs integrated to *M. balbisiana* (B genome) but not to *M. acuminata* (A genome). The seven BSGFV PCR products (2 isolates from *M. acuminata* hybrids and 5 of interspecific hybrids AAB) and six BSOLV PCR products (from 5 isolates of *M. acuminata* hybrids and one of interspecific hybrids AAB) obtained respectively with BSGFV and BSOLV specific primers, from the RT-RNase H region, were directly sequenced and compared with other badnaviruses using BLASTn searches. A multiple-nucleotide-sequence alignment between theses isolates from DRC and worldwide isolates retrieved from GenBank was performed using the MUSCLE algorithm (Edgar 2004). The general time-reversible plus gamma model of nucleotide substitution was chosen using MODELTEST (Posada and Crandall 1998), implemented online as Find Model at http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html. A nucleotide sequences analysis tree was constructed from the aligned partial nucleotide sequences using the maximum likelihood (ML) method with a value of 1.000 bootstrap resamplings with MEGA (v6.0) software (Tamura et al. 2013). For more clarity, a graphical representation of the percentage of pairwise nucleotide sequence identity of BSGFV and BSOLV isolates from DRC and oher from GenBank was made using the Sequence Demarcation Tool (SDT v1.2) (Muhire et al. 2014). The GenBank accession numbers of the badnaviruses used for the nucleotide sequence analysis are given in Figure 4.

Nucleotide sequences analysis of CMV isolates. The CMV amplicons using specific primers were directly sequenced and compared with those of other CMV isolates, chosen according to their geographical origin, using BLASTn Searches. A multiple-nucleotide-sequence alignment between CMV isolates from DRC and 21 worlwide isolates retrieved from GenBank was performed using the CLUSTALW algorithm implemented in DAMBE software (Xia 2013). A distance tree was constructed from aligned partial nucleotide sequence of the CP (RNA3) using the neighbour-joining method (1.000 boostrap resamplings) and the Kimura two-

parameters correction model for multiple substitutions with the MEGA (v6.0) program (Tamura et al. 2013). A graphical representation of the percentage of pairwise nucleotide sequence identity was made using the Sequence Demarcation Tool (SDT v1.2) (Muhire et al. 2014). The GenBank accession numbers of CMV isolates used for sequence analysis are given in Table 3.

Results

Detection of *Musa balbisiana* genome by PCR in samples. We used the PCR markers, *Musa*-OLF and *Musa*-OLR (Table 1) designated to specifically amplify the junction between the *Musa* B genome and eBSOLV existing only in the B genome (Duroy et al. 2016) to determine whether the sample has a B genome in its genotype. The virus-free banana leaf of both *Musa balbisiana* (Pisang Klutuk Wulung [PKW], BB genome) and *Musa acuminata* (Cavendish cv, AAA genome) were used as positive and negative controls respectively. The genotyping of 450 collected banana samples showed that 56.2% (253/450) were *Musa acuminata* hybrids and only 43.8% (197/450) were inter-specific hybrids (AAB, AB) confirming for the most of samples the preliminary field identifications given by farmers (Supplementary Table 3).

Viral Symptoms. Out of 450 randomly collected samples, 296 showed symptoms of known banana viruses as described in the literature and 154 were asymptomatics. A total of 228 samples (77%) showed BSV symptoms, 46 samples (15%) showed CMV symptoms and 18 samples (6%) showed yellow streaks difficult to assign to either BSD or CMV. Four plants (1.3%) showed typical BBTV symptoms of discontinuous dark-green streak symptoms on the leaf midribs (Fig 2A), severe stunting of plants, with narrow and brittle leaves forming a top rosette. The BBTV-vector, *Pentalonia nigronervosa* (Fig. 2B and 2C) was frequently observed as well as the presence of various other virus-transmitted aphids and mealybugs.

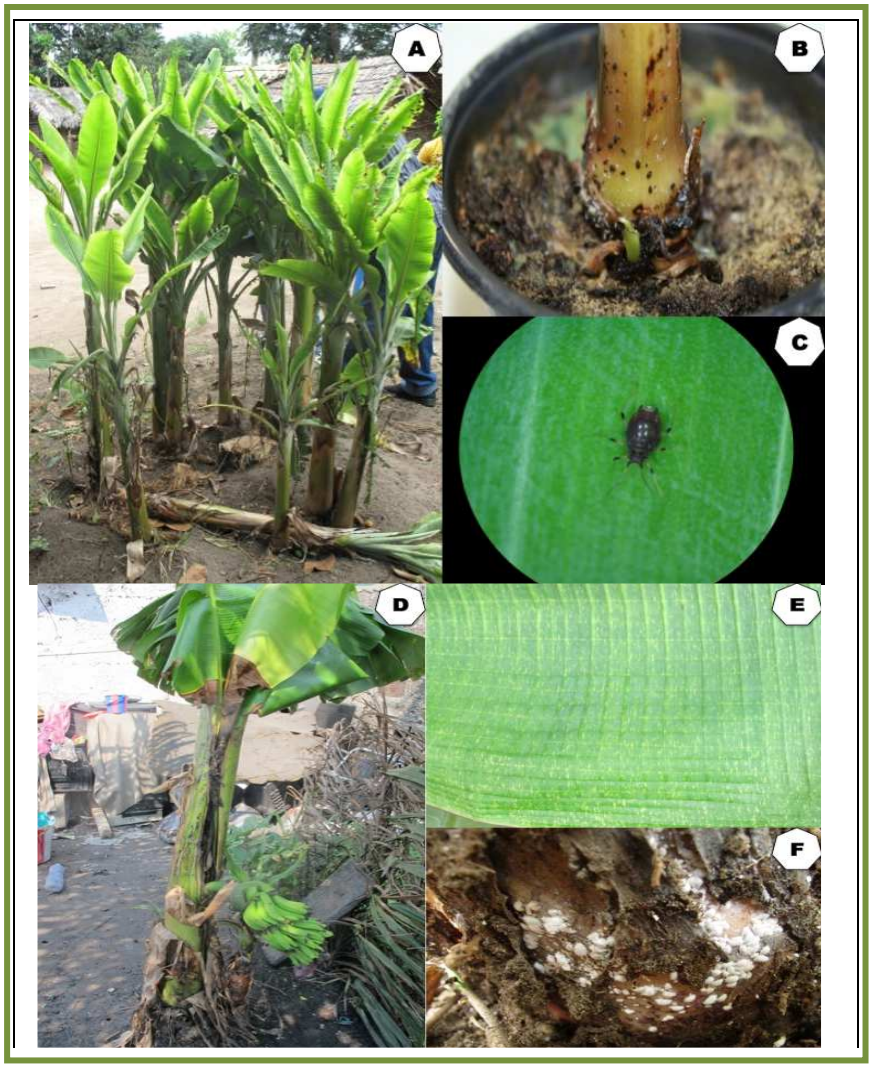


Fig.2. Symptoms of *Banana bunchy top virus* and Banana streak disease observed in natural conditions in Bas-Congo province. **A,** Symptoms of *Banana bunchy top virus* on young banana, in residential gardens in luila location, Bas-Congo, DRC. **B and C**, *Pentalonia nigronervosa*, aphid vector of *Banana bunchy top virus*. **D,** Pseudo-stem splitting as the symptoms of banana streak disease. **E,** yellow streaks on the leaves of the triploid *Musa acuminata* cv Gros Michel cultivar. **F**, Mealybug vectors of BSVspecies, observed on plantain.

The main symptoms associated with BSV remains yellow streaks on the leaves 53.5% (122/228) and pseudo-stem splitting 36.8% (84/228including as minor abnormal bunch and death of the cigar leaf 2.6% (6/228), (Fig.2D) (Fig.2E) and immature fruit dieback. In 7% (16/228) of cases, pseudo-stem splitting was associated with yellow streaks on the same plant. These various BSV-induced symptoms were observed in the natural growing conditions of banana crops, in the vegetative phase and the harvest phase and in intra as well as in inter-specific *Musa acuminata* and/or *M. balbisiana* (AAA, AAB ABB). The frequencies of the mealybug population (Fig. 2F) on banana plants with pseudo-stem splitting symptoms, with yellow streak and with no symptoms were 19% (16/84), 21.3% (26/84) and 18.2% (28/84), respectively, with an average of 15,5% (70/450) in banana sample.

We also observed that 15.5% (46/296) of the samples showed typical CMV-chlorosis symptoms. Among these, 47.8% (22/46) had yellow streaks on the leaves and 52% (24/46) showed cigar leaf deformation. A limited number of 6% (18/296) of infected samples expressed chlorotic symptoms difficult to associate either to BSV rather than CMV because both kinds of symptoms can be confused, or as the result of abiotic stresses.

No symptoms of BBrMV were observed during the epidemiological surveys. The presence of various aphids was also recorded.

Virus detection, prevalence and characterization.

All 450 cooking and dessert banana samples (AAA, AB, AAB) collected in 50 sites across Bas-Congo were tested by IC-PCR using both specific antisera and primers. The banana samples showing symptoms were all tested positive for the suspected viruses. The 18 samples non-assigned to either BSV or CMV was confirmed as BSGFV and the mixte infection BSGFV and CMV.

BBTV. BBTV was detected in all types of cropping systems, including forest plantation and dwelling garden. The frequency was of 26% (representing 117/450) (Table 2) with high BBTV spots in Kinkuti and Nsioni locations in the Bas-Fleuve

district (Fig. 3A). Overall, the samples were collected from clumps of plants whose average age was more than 12 months. Genotypes analysis of cultivated banana plants revealed that BBTV prevalence is higher in interspecific hybrids (AAB, AB), 29.4% (58/197), than in dessert banana (AAA), at 23.3% (59/253) (Fig. 3A). Mixed infections in a same plant also occured with both CMV and BSV species with a frequency of 1.5% and 4% respectively (Table 2).

BSV. Data analysis showed that BSV infection were detected in 20% (90/450) of the banana sample where the BSV frequency in interspecific hybrids is of 20,3% (40/197) and of 21,7% (55/253) in dessert bananas with 5 samples showing mixed infection of BSGFV and BSOLV. BSGFV is the most present with a prevalence of 14% and BSOLV one with a frequency of 5.7% (Table2).

IC-PCR/DNase analysis indicated variable frequencies of BSGFV, BSOLV, BSIMV and BSMYV across the surveyed areas. BSGFV was the most frequent (68% - 61/90), followed by BSOLV (25.5% - 23/90) and then lower by BSIMV and BSMYV (3.3 % - 3/90 each) (Table 2). Cases of mixed infection of BSGFV and BSOLV, and with BBTV and CMV in the same plant were reported in Bas-Congo (Table 2). BSGFV infection appears slightly higer in banana dessert with 57% (35/61) versus 43% (26/61) in interspecific hybrids. BSOLV infection affects mainly dessert banana with 65% (15/23) recorded versus 35% (8/23) in interspecific hybrids. In addition, BSGFV appeared in 4.7% of the mixed infections compared to BSOLV only present in 2.5%. The mixed infections with BSGFV occurred mainly in dessert bananas (AAA) (16/22) whereas those with BSOLV similarly occured in the two kinds of genotypes (7/12). Only two plants were infected by both BBTV and BSMYV. BSV species were also found in different agro-ecological conditions, such as residential gardens, bananas grown in association with vegetables, in savannah (Cataract and Lukaya districts of Bas-Congo) and in forest areas. Among the 31 sites/villages that tested BSGFV positive (Fig. 3B), and the 15 sites/ villages tested BSOLV positive, the highest prevalences for BSGFV were found in Kiniati (5/9) and Kimwanda (4/9) and for BSOLV in Vunda Kintuti village (3/9) and Kizulu Sansi village (3/9) in the Bas-Fleuve district. The BSGFV prevalence seems to be slightly

higer than those of BSOLV. The results also indicate few mixed infections could exist in the same plant with similar frequencies between BSV and BBTV (Table 2).

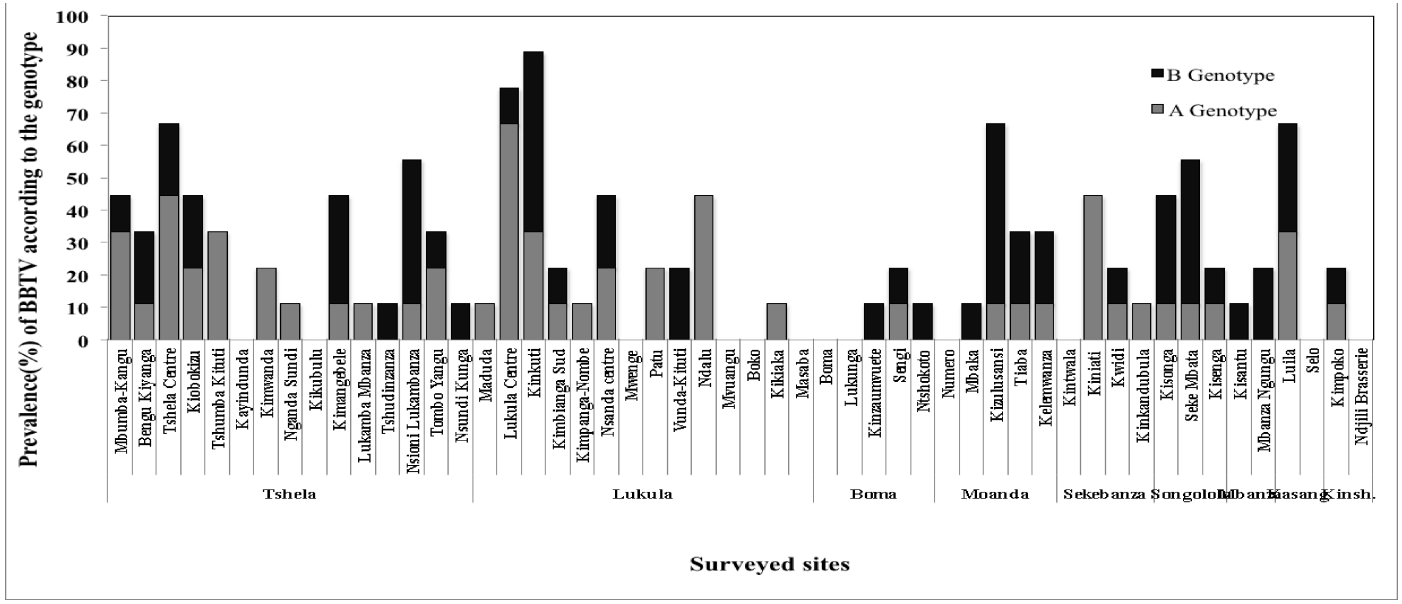
eBSGFV and eBSOLV genotyping in interspecific banana hybrids.

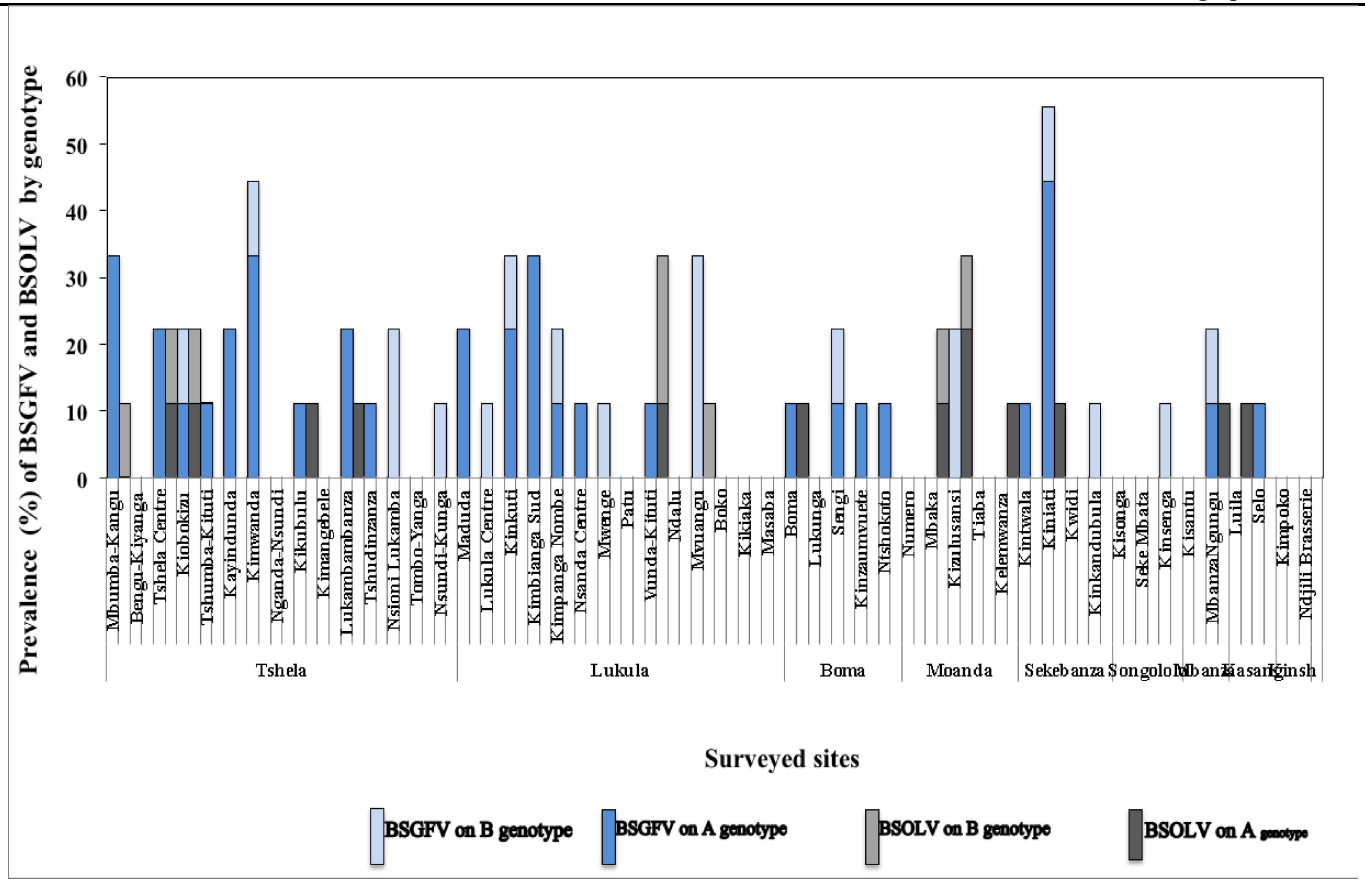
The B genome of interspecific banana hybrids contains infective eBSV known to be involved in the release of BSV infection (Gayral et al., 2008; Chabannes et al., 2013) such as eBSGFV-7 and eBSOLV-1 alleles involved into BSGFV and BSOLV infection respectively. We firstly seek for the presence of eBSV in all BSV-infected interspecific banana hybrid samples by using PCR markers specific of the two *Musa*-eBSV junctions and of internal rearrangments (Supplementary data 1). The data showed as expected no eBSV in the A genome of dessert banana hybrids (AAA). In addition, dCAPS markers, specific of infective eBSV alleles, were also used. These markers also reacted against episomal viral genomes when they belong to eBSV counterparts.

However, we observed that sample 25 showing BSIMV infection harbors the eBSGFV-7 allele, that sample 113 only infected by BSGFV harbors eBSOLV and likely eBSGFV and in opposite that sample 281 only infected by BSOLV harbors eBSGFV and likely eBSOLV.

Table 2: Prevalence of BBTV, BSGFV, BSOLV, BSIMV, BSMYV, CMV, BBrMV and their complex according to the genotype of sample. Other mixt infections not mentioned have not been observed

Sample	**Viruses and mixed infection**	**Dessert banana (AAA)**	**Interspecific hybrid (AAB/AB)**	**Total infected banana**	**Prevalence (%) Infected /450**
Virus distribution over infected samples	**BBTV**	46	46	92	20.4
	BSGFV	19	20	61	8.6
	BSOLV	8	3	11	2.4
	BSIMV	0	3	3	0.6
	BSMYV	1	2	3	0.6
	CMV	13	15	28	6.2
	BBrMV	0	0	0	0
Virus mixed infection observed over the infected samples	**BBTV + CMV**	3	3	6	1.3
	BBTV + BSGFV	8	4	12	2.6
	BBTV + BSOLV	0	4	4	0.8
	BBTV + BSMYV	1	1	2	0.4
	BSGFV + BSOLV	5	0	5	1.1
	BSGFV+ CMV	2	2	4	0.8
	BSOLV + CMV	2	1	3	0.6
	BBTV+ BSGFV+ CMV	1	0	1	0.2


Prevalence(%) of BBTV according to the genotype
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
B Genotype
A Genotype
Mbumba-Kangu
Bengu Kivanga
Tshela Centre
Kiobokizu
Tshumba Kituti
Kayindunda
Kinwanda
Nganda Sundi
Kikubulu
Kimangebele
Lukamba Mbanza
Tshudinzanza
Nsioni Lukambanza
Tombo Yangu
Nsundi Kunga
Maduda
Lukula Centre
Kinkuti
Kimbianga Sud
Kimpanga-Nombe
Nsanda centre
Mvenge
Patu
Vunda-Kituti
Ndalu
Mvuangu
Boko
Kikiaka
Masaba
Boma
Lukunga
Kinzaumvuete
Sengi
Nshokoto
Numero
Mbaka
Kizulusansi
Tiaba
Kelenwanza
Kintwala
Kiniati
Kwidi
Kinkandubula
Kisunga
Seke Mbata
Kisenga
Kisantu
Mbanza Ngungu
Luila
Selo
Kimpoko
Ndjili Brasserie
Tshela
Lukula
Boma
Moanda
Sekebanza
Songolo
Mbanza
Kasangu
Kinsh.
Surveyed sites


Prevalence (%) of BSGFV and BSOLV by genotype
60
50
40
30
20
10
0
Mbumba-Kangu
Bengu-Kyanga
Tshela Centre
Kiobokizu
Tshumba-Kituti
Kayindunda
Kimwanda
Nganda-Nsundi
Kikubulu
Kimangbele
Lukambambanza
Tshudinzanza
Nsiani Lukamba
Tombo-Yanga
Nsundi-Kunga
Maduda
Lukula Centre
Kinkuti
Kimbianga Sud
Kimpanga Nombe
Nsanda Centre
Mwange
Pani
Vunda-Kituti
Ndalu
Mvuangu
Boko
Kikiaka
Masaba
Boma
Lukunga
Sengi
Kinzaumvuele
Nshokoto
Numero
Mbaka
Kinlusansi
Tiaba
Kelemwanza
Kinfwala
Kiniati
Kwidi
Kinkandubula
Kisonga
Seke Mbata
Kinsenga
Kisantu
MbanzaNgungu
Luila
Selo
Kimpoko
Ndjili Brasserie
Tshela
Lukula
Boma
Moanda
Sekebanza
Songolo
Mbanza
Kasangu
Ginsh
Surveyed sites
BSGFV on B genotype
BSGFV on A genotype
BSOLV on B genotype
BSOLV on A genotype

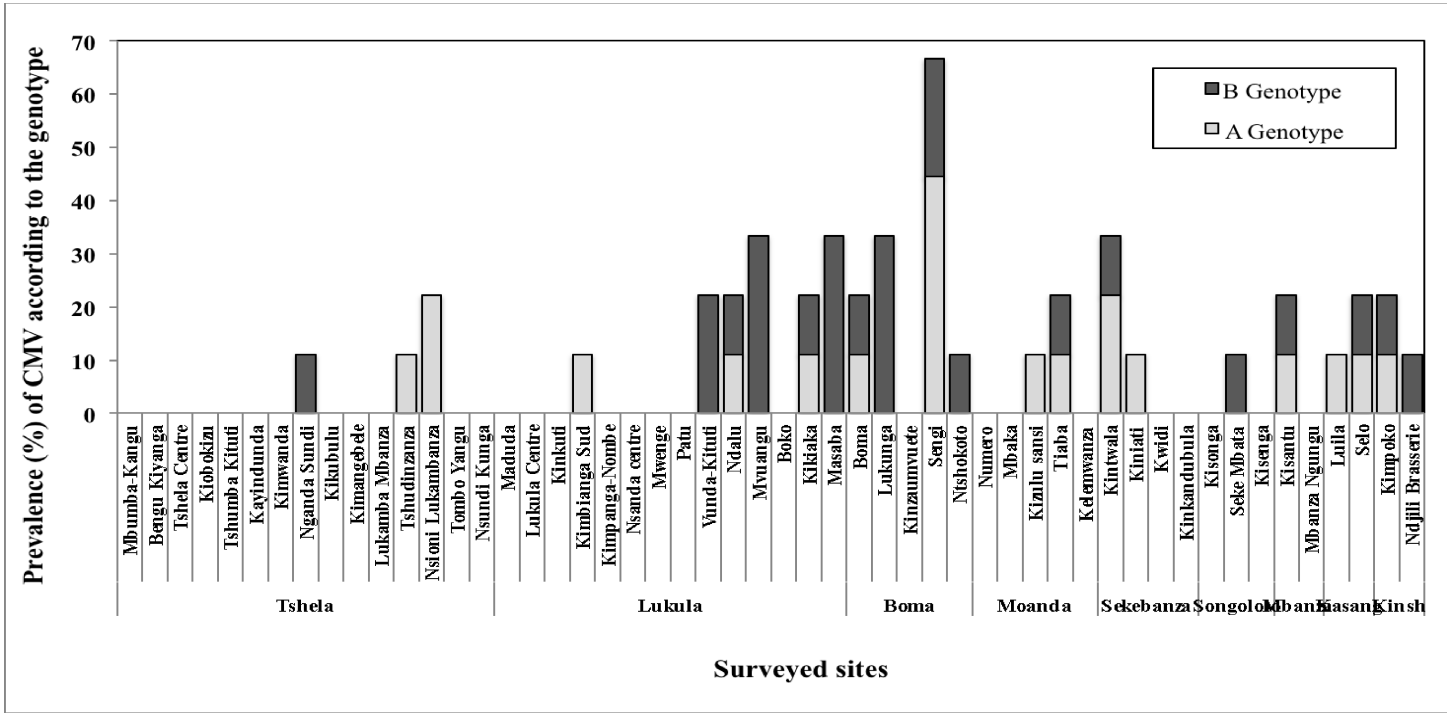


Figure. 3. Prevalence of different banana viruses detected by site surveyed. **A.** Prevalence of BBTV infection in sites surveyed in May and June 2013, in Bas-Congo province. **B.** Prevalence of two main BSV species (BSGFV and BSOLV) detected in Bas-Congo by site. **C.** Prevalence of CMV in Bas-Congo, 20 infected sites, with the highest rate of CMV infection in Selo, located in savannah area. Two sites of Kinshasa (Kimpoko and Ndjili Brasserie) were add in this analysis because it is the large space of Vegetables cultures.

Identity of BSGFV and BSOLV isolates. We choosed to analysed the partial sequence of the RT-RNaseH region (ORFIII) of BSGFV and BSOLV for 13 infected isolates collected in separate villages and districts in order to study the variability of BSV infecting dessert banana (AAA) and interspecific hybrid (AAB) in Bas-Congo (Fig 4).

The tree, using the maximum likelihood (ML) method, revealed the high percentage of nucleotide identity (100%) between all BSOLV sequences for the six samples analysed (Fig 4 C and D). All the BSOLV isolates from GenBank and those sequenced in this study are grouped in Clase 1 with BSOLV genome of reference (Fig 4C and D). No difference existed among BSOLV sequences whatever the genotype of the banana plants they infected.

The BSGFV sequences grouped into three different clades among the BSGFV clade. The three infecting interlocal plantain (188, 232, 258) showed a high nucleic acid sequence identity up to 99%. They grouped with BSGFV sequences belonging from BSVisolates as well as eBSV (Fig 4A and B). The four other sequences formed two distinct and closed groups depending of the banana cultivar they infect. 169 and 424 infected interspecific hybrids while 239 and 146 infected dessert banana (AAA).

CMV. The analysis of the banana leaf samples using IC-One step RT-PCR detection targeting a CMV product of 750 bp revealed the presence of the virus across various agro-ecological conditions in Bas-Congo. CMV infection varied depending of the site with a high spot in Sengi (Fig. 3C). The CMV prevalence was 9.3% (42/450) with a similar distribution in both kinds of banana genotypes (20/21). One hot spot having 66.6% (6/9) of infection were observed in Sengi (6/9), Mvuangu (3/9) and Kikiaka (2/9). The results also indicate few mixed infections could exist in the same plant with similar frequencies between BSV and BBTV (Table 2)

In most locations, CMV was detected when banana was associated with vegetables in intercropping systems (Kisantu...), except for one of the most important vegetable areas (Mbanzangungu) where no CMV infection in banana was recorded. CMV was also detected in locations where banana was not associated with vegetables (Tiaba, Ndalu, Kizulusansi, Masaba and Nganda Nsundi).

Nucleotide sequences analysis of CMV isolates. Sequences comparison of CMV isolates sequenced from various locations of Bas-Congo in DRC showed a high similarity between them (Table 3). Broadly, CMV isolates from DRC revealed a high percentage of nucleotide identity (> 96%) with the South African strain (CMV_KZN-BM1-SA-[KJ789892], the Colombian strain (CMV_*Musa*-Balb-Colombia-[CMU32858]), CMV_*Musa*-acc Colombia-[U32859]) and the US strain (CMV_Fny-USA-[D10538]) strains) (Fig.5A). The DRC CMV isolates grouped in Subgroup 1A recognized to gather all CMV isolates from *Musa* spp. (Fig. 5B).

BBrMV. The analysis by IC-One-step-RT-PCR gave negative results for all collected samples whereas healthy banana and BBrMV infected banana used as respectively negative and positive control were correct. This result confirmed the absence of BBrMV in Bas-Congo.

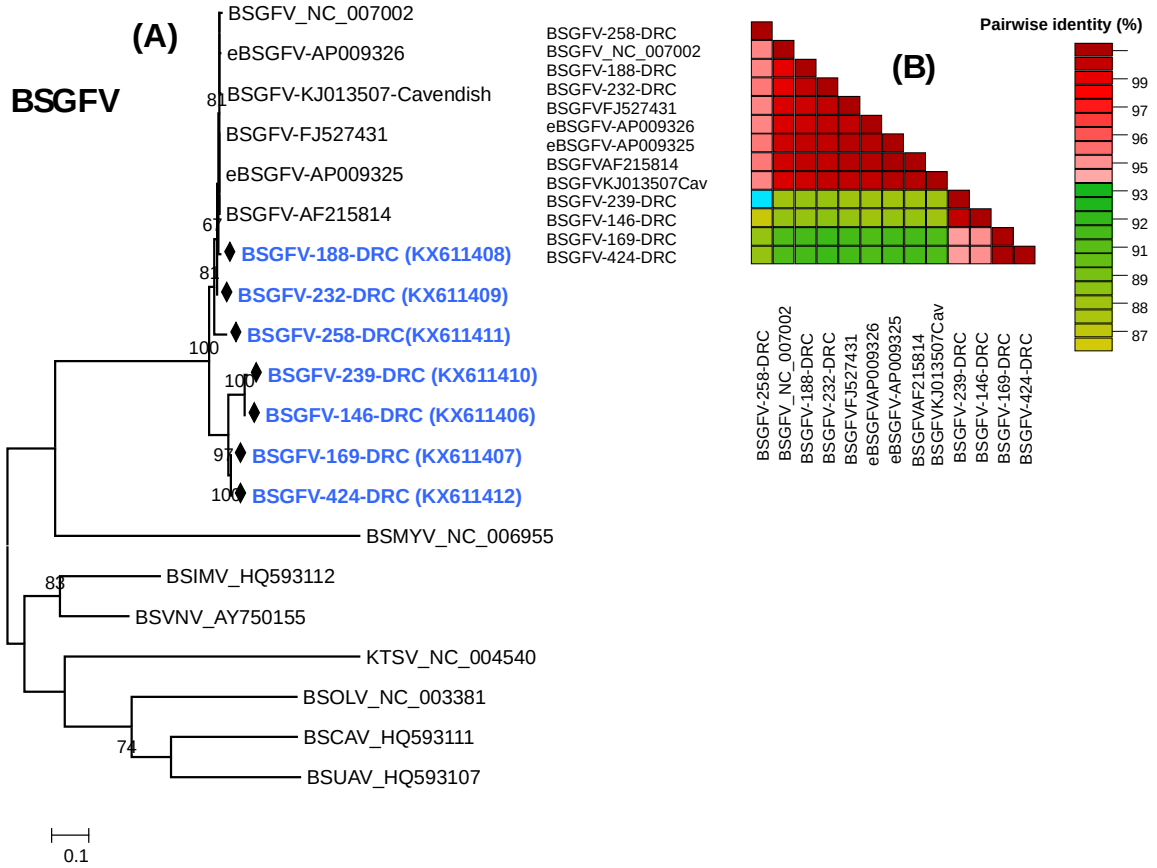
Spatial distribution of BBTV, BSV and CMV. The data collected and presented in the map (Fig. 6) shows clearly that BBTV is widespread over the Bas-Congo province (Fig. 6A). CMV (Fig. 6B) and BSV species (BSGFV, BSOLV, BSIMV, BSMYV) (Fig. 6 C) were distributed in savannah and forest areas and mix infections were also recorded (Fig. 6. D). However, in some villages, no banana streak symptoms were observed, for exemple in Lukunga, Ndalu, Patu, Kisantu, Kisonga (Fig 3B).

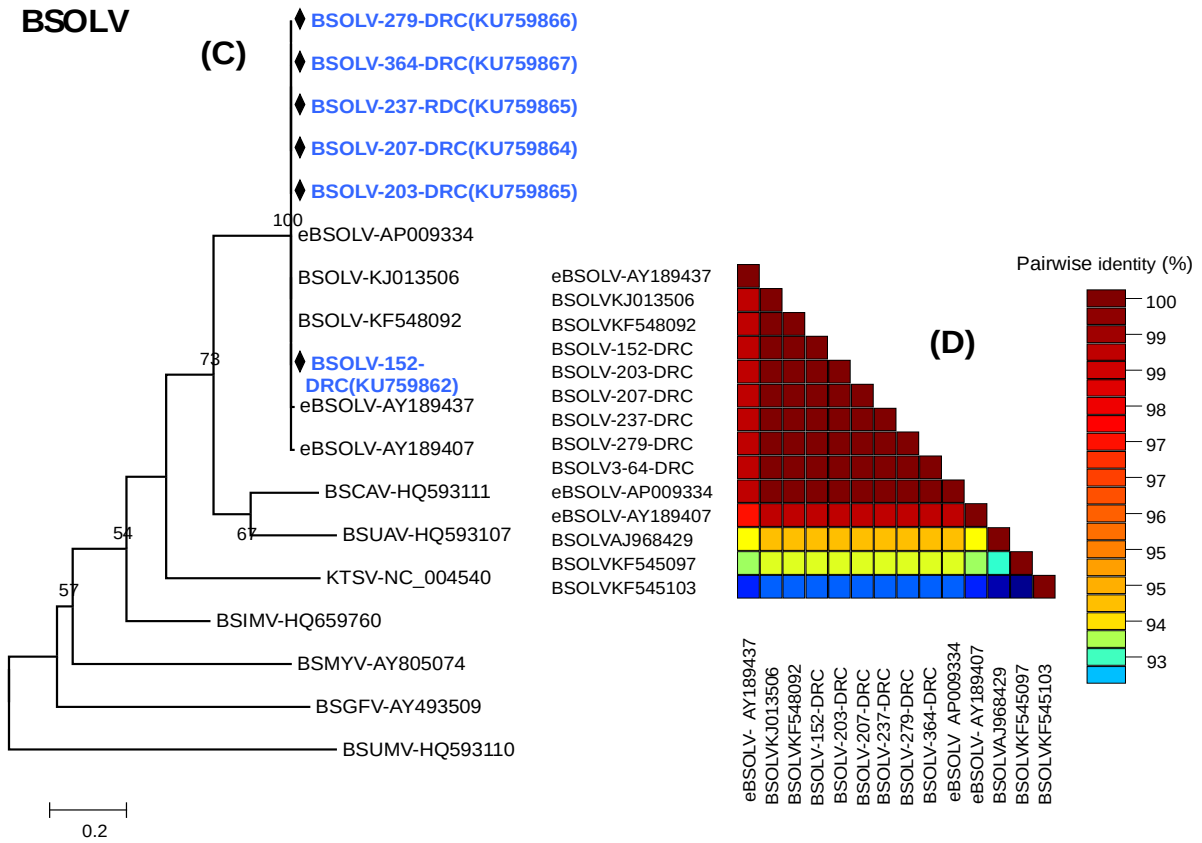
Table 3. Geographical origin and genotypes of *Cucumber mosaic virus*- infected *Musa spp*. Samples

Geographical origin	Environmental conditions	Cultural system	Name of isolates	Presence of B allele un the genome (OL-Junction)	Genbank Accession number
Kimbianga sud	Forest area	Residential garden	CMV_100Kimb	A	KX 216866
Sekembata	Savannah area	Residential garden	CMV_122Seke	B	KX216865
Luila	Savannah area	Residential garden	CMV_135Luila	A	KX 216874
Ntshokoto	Forest area	Residential garden	CMV_198Nt	B	KX216862
Kizulu sansi	Forest area	Residential garden	CMV_229Kiz	A	KX216857
Kizulu sansi	Forest area	Residential garden	CMV_232-Kiz	A	KX216863
Vunda kintuti	Forest area	Residential garden	CMV_277Vunda	B	KX216861
Tiaba	Forest area	Residential garden	CMV_295Tiaba	B	KX216868
Tiaba	Forest area	Residential garden	CMV_300Tiaba	A	KX216872
Ndalu	Forest area	Residential garden	CMV_325Ndalu	A	KX216871
Mvuangu	Forest area	Forest plantation	CMV_353Mvuangu	B	KX216873
Sengi	Forest area	Residential garden	CMV_388Seng	B	KX216870
Sengi	Forest area	Residential garden	CMV_393Seng	A	KX216869
NGanga Nsundi	Forest area	Residential garden	CMV_414NS	B	KX216867
Kimpoko	Savannah	Mixed with vegetables	CMV_439Kimp	B	KX216864
MASABA	Savannah	Residential garden	CMV_447Mas	B	KX216859
MASABA	Savannah	Mixed with vegetables	CMV_448Mas	B	KX216860
N'djili Brasserie	Savannah	Mixed with vegetables	CMV_450Ndjil	A	KX216858

(A): Dessert banana tested genome *Musa acuminata;* (B): Cooking banana tested genome *Musa balbisiana.*

Fig.4. Identity of BSGFV and BSOLV isolates from Democratic Republic of Congo. In bleue, all BSGFV and BSOLV sequences from the DRC. **A,** Distance tree showing relationship of seven BSGFV isolates from *M. acumintata* (BSGFV-239, BSGFV-146) and interspecific hybrids (BSGFV-424; BSGFV-188, BSGFV-258, BSGFV-169, BSGFV-232) from Bas Congo in DRC. The distance tree was generated using the Maximum Likelihood method and General Time Reversible plus Gamma model of nucleotide substitution. Bootstrap values (1,000 iterations) above 65% are indicated for each node. For the analysis, 13 sequences were used: two endogenous BSGFV sequences from *M. balbisiana* (eBSGFV-OP009326, eBSGFV-AP009325), BSGFV sequences (NC_007002, KJ13507, FJ527531), *Banana streak CA virus* (BSCAV), *Banana streak IM virus* (BSIMV), *Kalanchoe top-spotting virus* (KTSV), *Banana streak UA virus* (BSUAV), *Banana streak VN virus* (BSVNV). **B and D,** Graphical representation of percentage pairwise nucleotide sequence identity of the RT-RNaseH region (ORFIII). Colors scales bar indicates respectively the percentage identity of DRC BSGFV and BSOLV isolates. **C,** Distance tree showing relationship of six BSOLV isolates from banana and plantain in Bas-Congo in DRC and other badnaviruses based on partial sequences of the RT-RNaseH region (ORFIII). The distance tree was generated using the Maximum Likelihood method and General Time Reversible plus Gamma model of nucleotide substitution. Bootstrap values (1,000 iterations) above 65% are indicated for each node. For the analysis, 12 sequences and 404 aligned positions were used. Rice tungro bacilliform virus (RTBV; genus *Tungrovirus*) and Cauliflower mosaic virus (CaMV; genus *Caulimovirus*) were used as out-groups. *Banana streak CA virus* (BSCAV), *Banana streak IM virus* (BSIMV), *Banana streak OL virus* (BSOLV), *Banana streak MY virus* (BSMYV), *Banana streak UA virus* (BSUAV), *Banana streak UI virus* (BSUIV), *Banana streak UL virus* (BSULV), *Banana streak UM virus* (BSUMV), *Kalanchoe top-spotting virus* (KTSV), *Banana streak VN virus* (BSVNV), *Banana streak GF virus* (BSGFV), *Commelina yellow mottle virus* (ComYMV), *Cacao swollen shoot virus* (CSSV), *Citrus yellow mosaic virus* (CiYMV), *Dioscorea bacilliform SN virus* (DBV), *Taro bacilliform virus* (TaBV), *Bougainvillea chlorotic vein banding virus* (BCVBV), *Sugarcane bacilliform IM virus* (SCBIMV) and *Sugarcane bacilliform MO virus* (SCBMOV) were selected as representatives of the *Badnavirus* genus. GenBank accession numbers are provided in brackets.


(A)
BSGFV
BSGFV_NC_007002
eBSGFV-AP009326
BSGFV-KJ013507-Cavendish
BSGFV-FJ527431
eBSGFV-AP009325
BSGFV-AF215814
BSGFV-188-DRC (KX611408)
BSGFV-232-DRC (KX611409)
BSGFV-258-DRC(KX611411)
BSGFV-239-DRC (KX611410)
BSGFV-146-DRC (KX611406)
BSGFV-169-DRC (KX611407)
BSGFV-424-DRC (KX611412)
BSMYV_NC_006955
BSIMV_HQ593112
BSVNV_AY750155
KTSV_NC_004540
BSOLV_NC_003381
BSCAV_HQ593111
BSUAV_HQ593107
81
67
81
100
100
97
100
83
74
0.1
BSGFV-258-DRC
BSGFV_NC_007002
BSGFV-188-DRC
BSGFV-232-DRC
BSGFVFJ527431
eBSGFV-AP009326
eBSGFV-AP009325
BSGFVAF215814
BSGFVKJ013507Cav
BSGFV-239-DRC
BSGFV-146-DRC
BSGFV-169-DRC
BSGFV-424-DRC
(B)
Pairwise identity (%)
99
97
96
95
93
92
91
89
88
87


BSOLV
(C)
BSOLV-279-DRC(KU759866)
BSOLV-364-DRC(KU759867)
BSOLV-237-RDC(KU759865)
BSOLV-207-DRC(KU759864)
BSOLV-203-DRC(KU759865)
100
eBSOLV-AP009334
BSOLV-KJ013506
BSOLV-KF548092
73
BSOLV-152-DRC(KU759862)
eBSOLV-AY189437
eBSOLV-AY189407
BSCAV-HQ593111
54
67
BSUAV-HQ593107
KTSV-NC_004540
57
BSIMV-HQ659760
BSMYV-AY805074
BSGFV-AY493509
BSUMV-HQ593110
0.2
(D)
Pairwise identity (%)
100
99
99
98
97
97
96
95
95
94
93
eBSOLV-AY189437
BSOLVKJ013506
BSOLVKF548092
BSOLV-152-DRC
BSOLV-203-DRC
BSOLV-207-DRC
BSOLV-237-DRC
BSOLV-279-DRC
BSOLV-364-DRC
eBSOLV AP009334
eBSOLV-AY189407
BSOLVAJ968429
BSOLVKF545097
BSOLVKF545103

(A)

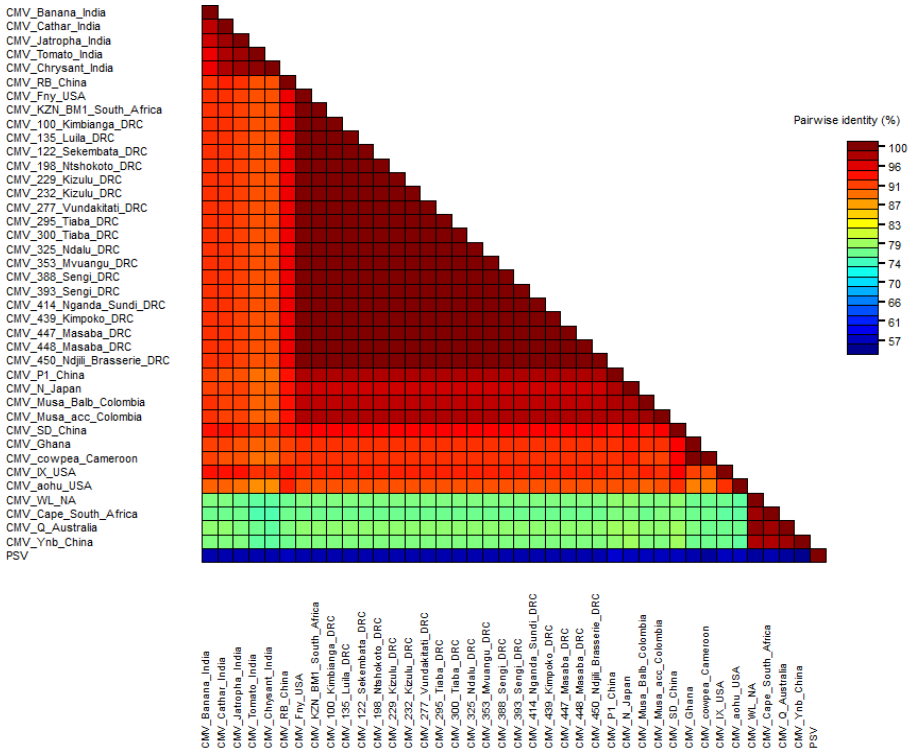
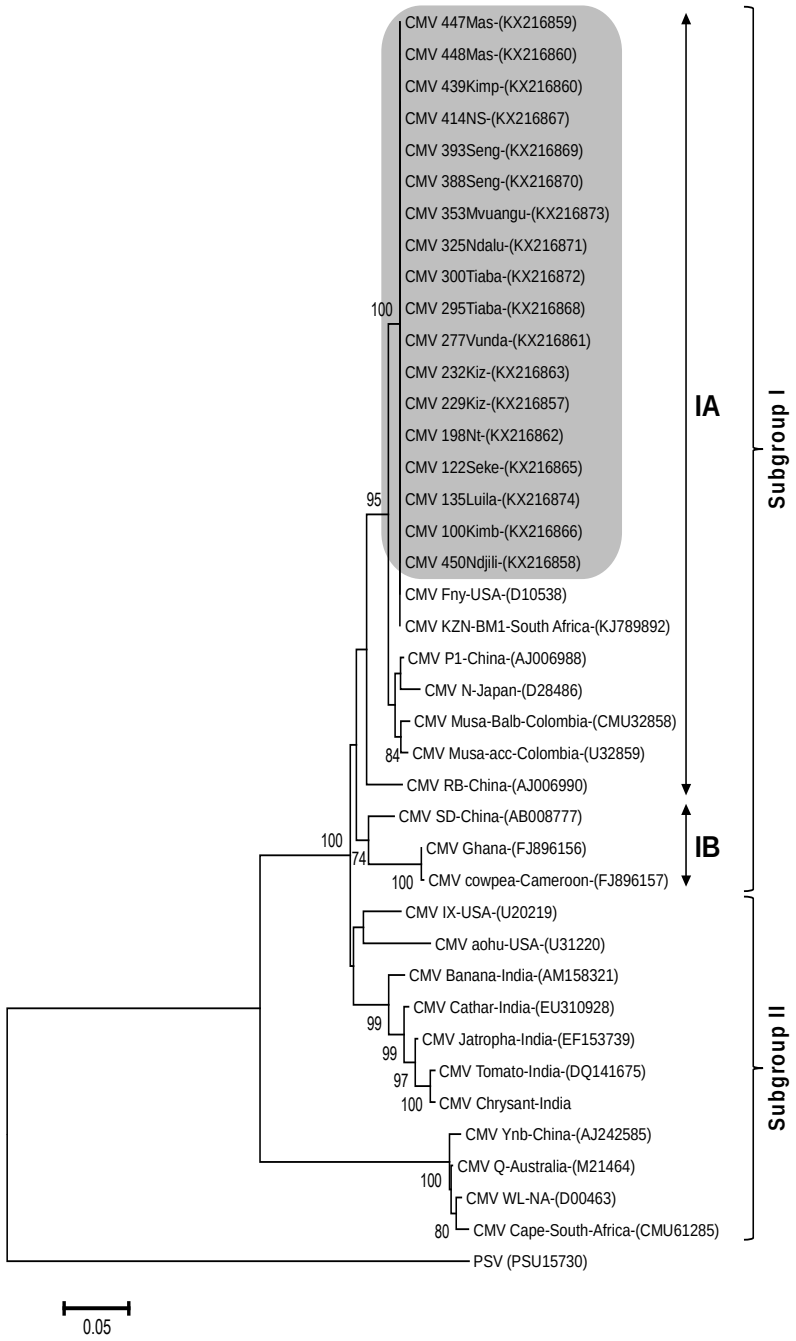
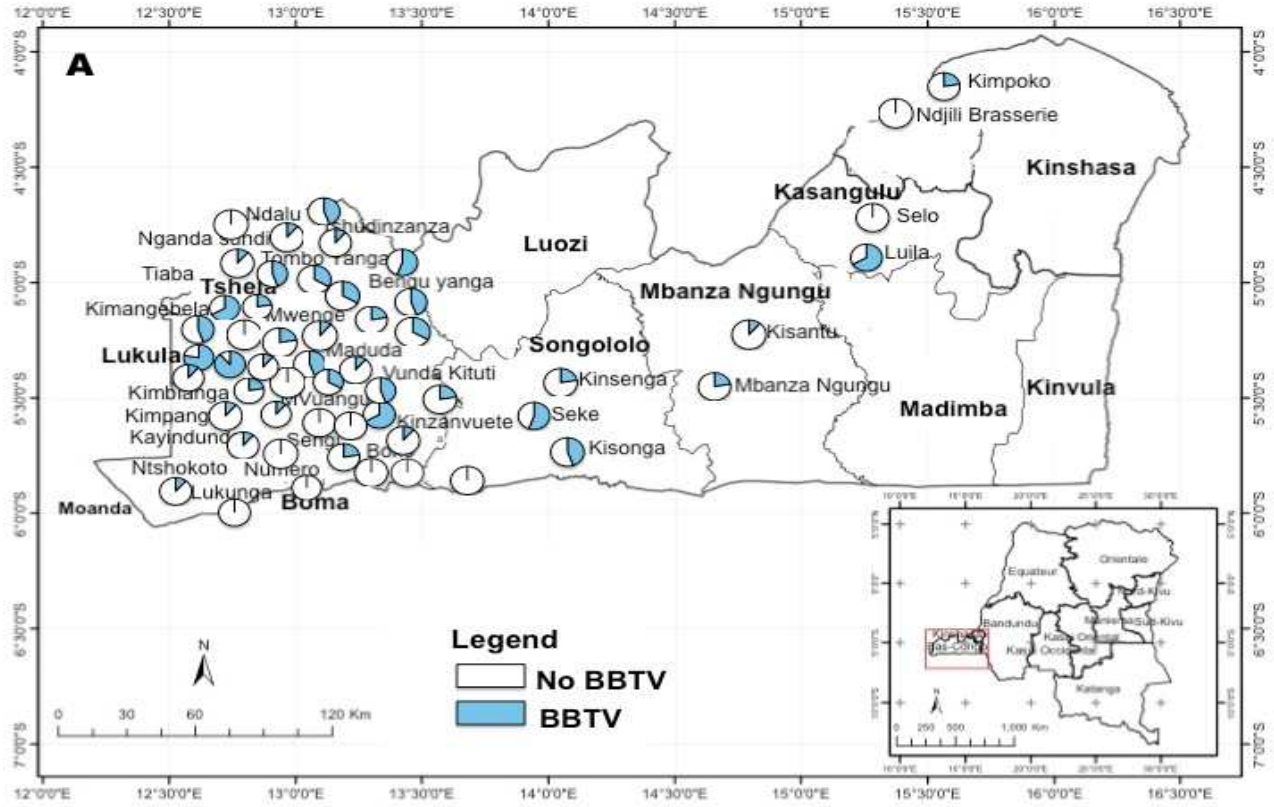
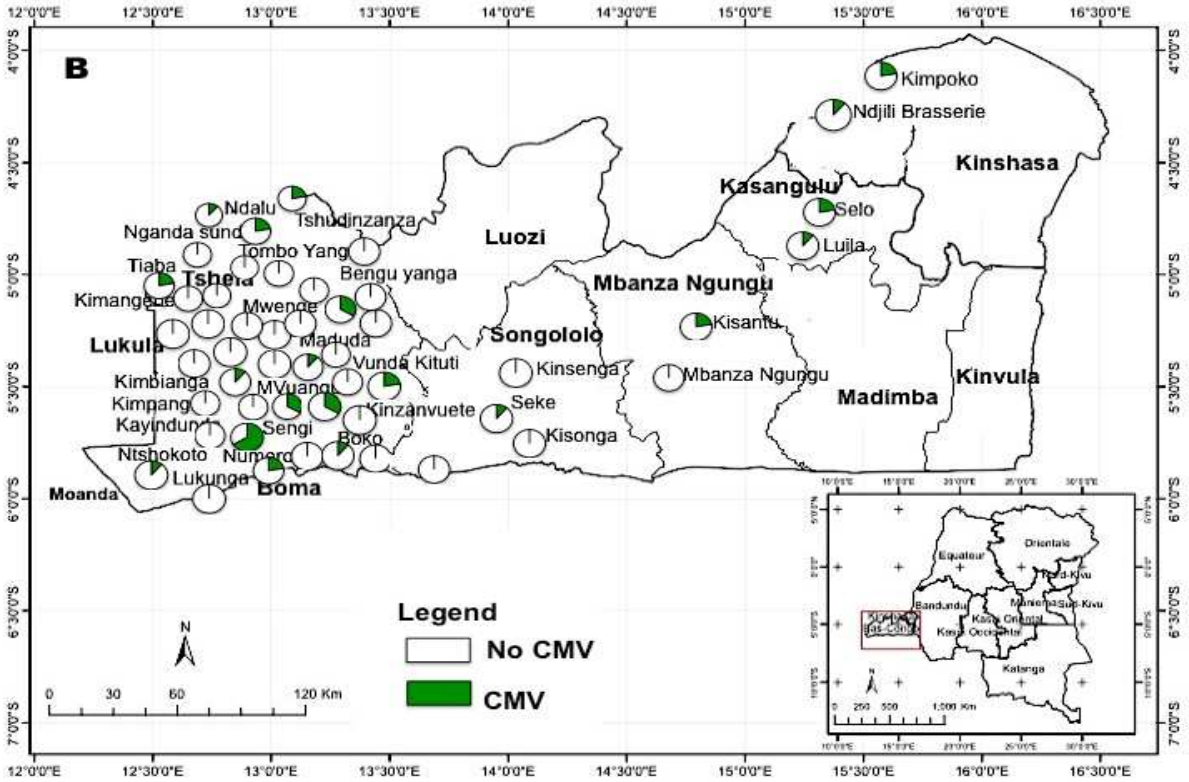


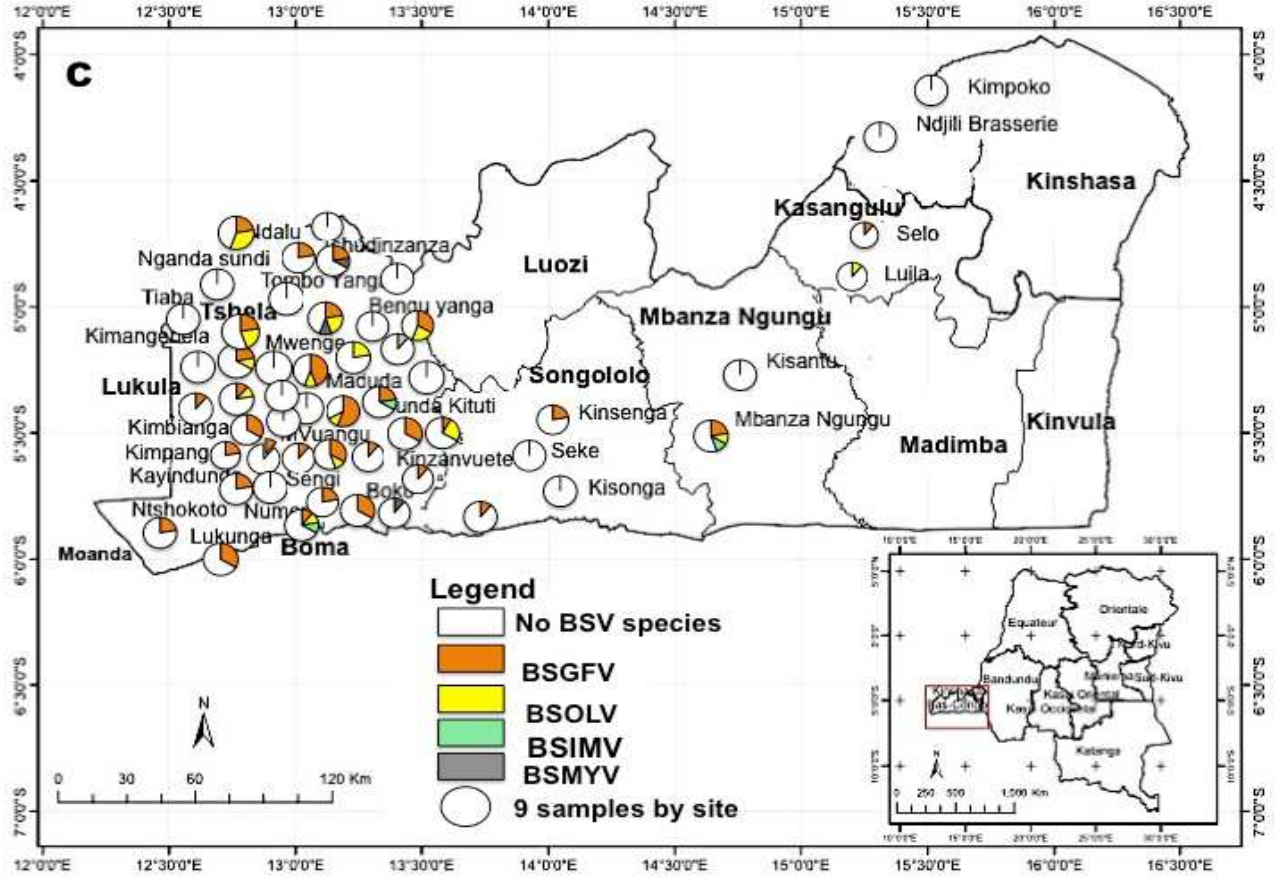
Fig. 5. **A**. Graphical representation of percentage pairwise nucleotide sequence identity of the coat protein (CP) genes. The color scale bar indicates the percentage identity of 18 DRC CMV isolates. The last line blue (identity between 0 and 57) represents the outgroup, which was *Peanut stunt virus*. **B.** Distance tree showing the relationships of 18 CMV isolates (highlighted in grey) infecting banana and plantain in Bas-Congo DRC with 21 CMV sequences from worldwide isolates available in GenBank. The neighbour-joining tree was built based on the partial nucleotide sequence of the coat protein (CP) (RNA3). Bootstrap values (1,000 iterations) above 70% are indicated for each node. Sequences are identified by their acronym, geographic origin and GenBank accession number. *Peanut stunt virus* (PSV) was used as the outgroup.

(B)


CMV 447Mas-(KX216859)
CMV 448Mas-(KX216860)
CMV 439Kimp-(KX216860)
CMV 414NS-(KX216867)
CMV 393Seng-(KX216869)
CMV 388Seng-(KX216870)
CMV 353Mvuangu-(KX216873)
CMV 325Ndalu-(KX216871)
CMV 300Tiaba-(KX216872)
100
CMV 295Tiaba-(KX216868)
CMV 277Vunda-(KX216861)
CMV 232Kiz-(KX216863)
CMV 229Kiz-(KX216857)
CMV 198Nt-(KX216862)
CMV 122Seke-(KX216865)
95
CMV 135Luila-(KX216874)
CMV 100Kimb-(KX216866)
CMV 450Ndjili-(KX216858)
CMV Fny-USA-(D10538)
CMV KZN-BM1-South Africa-(KJ789892)
CMV P1-China-(AJ006988)
CMV N-Japan-(D28486)
CMV Musa-Balb-Colombia-(CMU32858)
84
CMV Musa-acc-Colombia-(U32859)
CMV RB-China-(AJ006990)
CMV SD-China-(AB008777)
100
74
CMV Ghana-(FJ896156)
100
CMV cowpea-Cameroon-(FJ896157)
CMV IX-USA-(U20219)
CMV aohu-USA-(U31220)
CMV Banana-India-(AM158321)
CMV Cathar-India-(EU310928)
99
CMV Jatropha-India-(EF153739)
99
CMV Tomato-India-(DQ141675)
97
100
CMV Chrysant-India
CMV Ynb-China-(AJ242585)
CMV Q-Australia-(M21464)
100
CMV WL-NA-(D00463)
80
CMV Cape-South-Africa-(CMU61285)
PSV (PSU15730)
0.05
IA
IB
Subgroup I
Subgroup II


A
Kimpoko
Ndjili Brasserie
Kinshasa
Kasangulu
Selo
Luila
Luozi
Mbanza Ngungu
Kisantu
Songololo
Kinsenga
Mbanza Ngungu
Madimba
Kinvula
Seke
Kisonga
Ndalu
Nganda sundi
Tiaba
Tshela
Kimangebela
Mwenge
Lukula
Maduda
Vunda Kituti
Kimbianga
Kimpang
Kayindund
Kinzanvuete
Ntshokoto
Numero
Lukunga
Boma
Moanda
Legend
No BBTV
BBTV
N
0 30 60 120 Km


B
Kimpoko
Ndjili Brasserie
Kinshasa
Kasangulu
Selo
Luila
Luozi
Mbanza Ngungu
Kisantu
Songololo
Kinsenga
Mbanza Ngungu
Kinvula
Madimba
Seke
Kisonga
Kinzanvuete
Lukula
Moanda
Boma
Ndalu
Tshudinzanza
Nganda sund
Tombo Yang
Tiaba
Bengu yanga
Kimangeue
Mwende
Maduda
Vunda Kituti
Kimbianga
Kimpang
Kayindun
Sengi
Boko
Ntshokoto
Numero
Lukunga
Legend
No CMV
CMV
N
0 30 60 120 Km
Orientale
Equateur
Nord-Kivu
Sud-Kivu
Bandundu
Maniema
Kasai Oriental
Kasai Occidental
Katanga
Bas-Congo


C
Kimpoko
Ndjili Brasserie
Kinshasa
Kasangulu
Selo
Luila
Luozi
Mbanza Ngungu
Kisantu
Songololo
Kinsenga
Mbanza Ngungu
Kinvula
Madimba
Seke
Kisonga
Kinzanvuete
Lukula
Tshela
Moanda
Boma
Nganda sundi
Tiaba
Kimangenela
Mwenge
Maduda
Kimbianga
Kimpang
Kayindun
Sengi
Ntshokoto
Lukunga
Legend
No BSV species
BSGFV
BSOLV
BSIMV
BSMYV
9 samples by site
N
0 30 60 120 Km
12°0'0"E
12°30'0"E
13°0'0"E
13°30'0"E
14°0'0"E
14°30'0"E
15°0'0"E
15°30'0"E
16°0'0"E
16°30'0"E
4°0'0"S
4°30'0"S
5°0'0"S
5°30'0"S
6°0'0"S
6°30'0"S
7°0'0"S

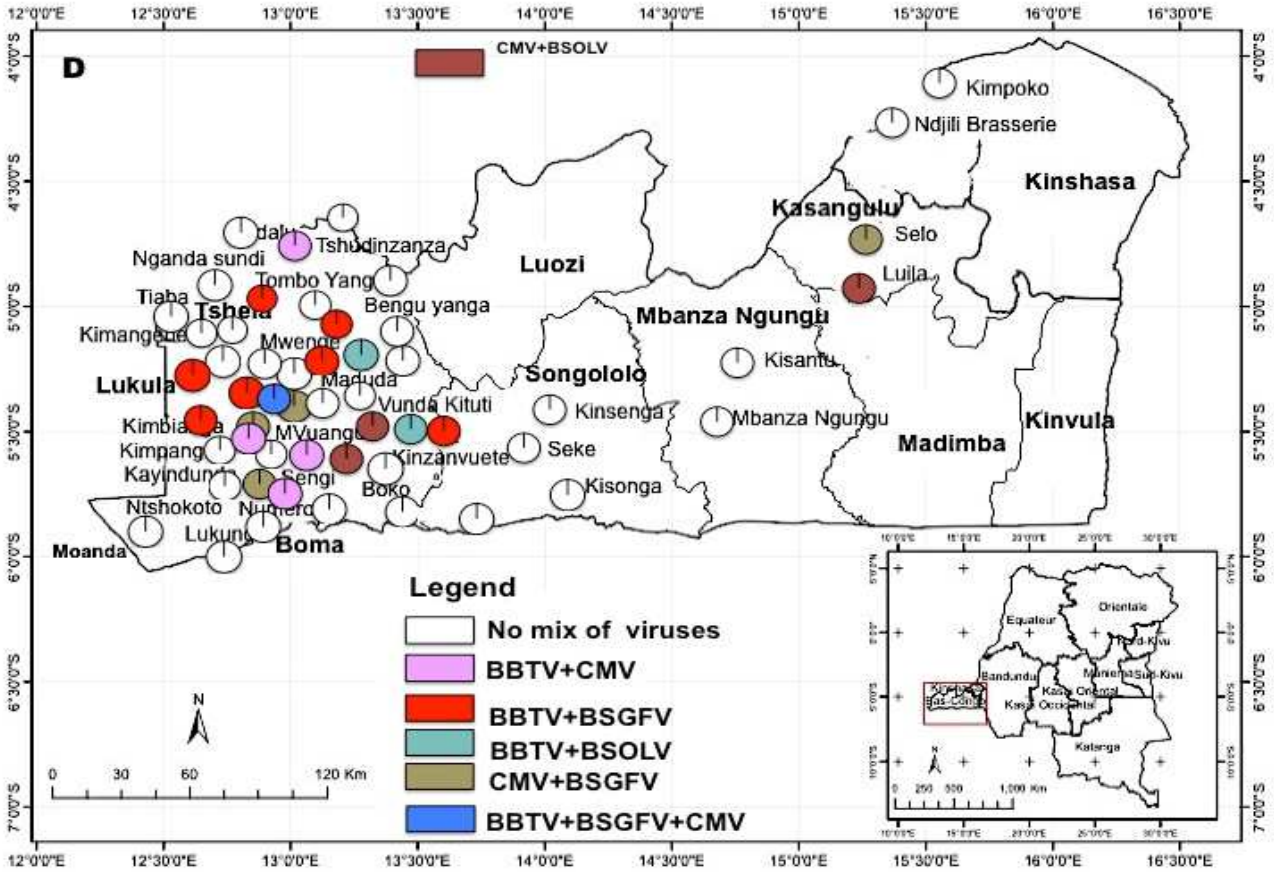

D
CMV+BSOLV
Kimpoko
Ndjili Brasserie
Kinshasa
Kasangulu
Selo
Luila
Luozi
Mbanza Ngungu
Kisantu
Songololo
Kinsenga
Mbanza Ngungu
Kinvula
Madimba
Seke
Kisonga
Tshela
Lukula
Moanda
Boma
Nganda sundi
Tombo Yang
Tiaba
Bengu yanga
Kimangeme
Mwende
Maduda
Vunda Kituti
MVuangi
Kimpang
Kinzanvuete
Kayindun
Sengi
Boko
Ntshokoto
Numero
Lukun
Legend
No mix of viruses
BBTV+CMV
BBTV+BSGFV
BBTV+BSOLV
CMV+BSGFV
BBTV+BSGFV+CMV
N
0 30 60 120 Km
Orientale
Equateur
Nord-Kivu
Sud-Kivu
Maniema
Bandundu
Kasai Oriental
Kasai Occidental
Katanga
Bas-Congo

Fig.6. Spatial distribution of six main banana (*Musa* spp.) viruses species detected in Bas-Congo. (A) Banana bunchy top virus distribution, (B): Cucumber mosaic virus distribution, (C) BSV species distributions. The Bas-Congo province is represented in the red rectangle of the general map of Democratic Republic of Congo (right bottom of the map). Clircles represented 9 collected samples in each location grouped according to the eigth territories of Bas-Congo provinces where, 2 locations were surveyed in Kasangulu (Luila, Selo), 2 locations in Mbanza-Ngungu (Kisantu, Mbanzangungu,), 3 locations in Songologo (Kinsenga, Kisonga, and Seke), 3 locations in Sekebanza (Kintwala, Sekembata, Kwidi), 5 locations in Moanda (Numero, Mbaka, Kizulu-sansi, Tiaba, Kelemwanza), 3 locations in Boma (Boma, Lukunga, Kinzaumvuete), 14 location in Lukula (Maduda, Kiniati, Lukula centre, Kinkuti, Kimbianga sud, Kimpanga-nombe, Nsanda-centre, Mwenge, Patu, Vunda-kituti, Kimangebele-Lufu, Kinkandubula, Mvuangu, Boko), and 15 locations in Tshela (Mbumba-kangu, Tshela-centre, Kiobokizu, Tshumba-kituti, Kayindunda, Kimwanda, Ntshokoto, Kikubulu, Ndalu, Bengu-yangu, Lukambambanza, Tombo-yango, Nganda-Nsundi). Two additional locations in Kinshasa (Kimpoko and Ndjili-brasserie) are represented for information. The percentage indicates the prelavence of each virus species in the surveyed territory of Bas-Congo.

Discussion

Using molecular diagnosis and symptom observation, we established the widespread status of BBTV in Bas-Congo, DRC. The frequency of BBTV was found to be 26%. We also identified, for the first time, several BSV species (BSGFV, BSOLV, BSIMV, BSMYV) and CMV on banana (*Musa* spp.) under natural conditions. BBrMV was not detected in Bas-Congo in this study.

The methodological approach used to collect samples in this study was based on randomization. The results in terms of banana cultivation systems in Bas-Congo showed great variability in these systems. Banana grows in residential gardens, in forest plantations and organized plantations, along horticultural perimeters and at research stations. It is intercropped with vegetable crops. In Bas-Congo the major sites surveyed were residential gardens, as was the case in the study by Bakelana (1996).

The diagnostic techniques used in this study were based on the characteristics of each virus, hence the plurality of methods used. BBTV was reliably detected using PCR (Mansoor et al. 2005), but this was not so with BSV because of the endogenous viral sequences present within the B genome that also reacts, giving false positives (Geering and Hull 2012). In order to detect infection, we used IC-PCR associated with a DNase step. The first step of the technic consists in an immunocapature of episomal viruses by the interaction between the antibodies and the viral coat protein. This step limits the plant DNA adsorption and the DNase digestion used before the viral genome amplification by PCR eliminates them definitively. The CMV and BBrMV were also searched using the IC-One step-RT-PCR method, with each specific primer and appropriate positive and negative controls (Iskra-Caruana et al. 2008). CMV was detected but BBrMV was not detected however positive control was positif and negative control was negative.

This study showed clearly that BBTV, first observed in the 1950s in the Kisangani region, is currently distributed in the major banana-growing areas under various cultivation systems. In previous study (Mukwa et al. 2014, Mukwa et al.

2016), the dispersion of BBTV from infected-symptomatic banana plants to asymptomatic banana plants was suspected, with symptomless plants being infected in some cases. In this area, the health status of planting materials is not always certified and farmers exchange asymptomatic planting material, meaning that BBTV is in a state of constant dispersion or epidemic. In addition, the use of unhealthy suckers in research stations and in farmers' field and the exchange of local varieties of non-certified planting material have also contributed significantly to the long-distance spread of BBTV (Kumar et al. 2011; Mukwa et al. 2014).

BSV species have been observed observed on banana and plantain, in residential gardens and in forest plantations, but they are prevalent mainly on *M. acuminata* (AAA genome). BSV species are present under natural conditions and are responsible for the expression of banana streak. Among the four main BSV species (BSGFV, BSOLV, BSIMV and BSMYV) detected in this study, data showed some cases of mixed infection between BSGFV and BSOLV in the same plant, mostly in *M. acuminata*. A similar situation has been reported in Cuba, between BSMYV- BSIMV and between BSIMV- BSGFV (Javer-Higginson et al. 2014), but the BSGFV-BSOLV combination was not observed there.

The results showed that most of samples infected by BSV were the *M. acuminata* hybrids (A genome). Futhermore, endogenous sequences of BSGFV and BSOLV responsible for spontaneous banana infections were present in all the inter-specific hybrids (AAB, AB) analysed.

The high frequency of mealybugs on symptomless banana plants indicates the potential of BSV species dispersion, as mealybugs are not very mobile insect vectors.

BSV species infections of *M. acuminata* genomes could result from mealybug transmission from spontaneous BSV outbreaks caused by inter-specific hybrids becoming infected after variations in climatic conditions, such as those observed in May and June of the study year (Dahal et al. 1998; Pichaut et al. 2013). The presence of mealybug's vectors in different areas was recorded and suggested the beginning of a small epidemic in Bas-Congo. Seven BSGFV isolates and six BSOLV isolates obtained from banana and plantain in Bas-Congo were sequenced in this study. For the BSOLV, distance analysis showed a high percentage of identity (100%)

between them and with the NC_003381 isolate from Nigeria. These six isolates are very similar, however, although they come from different *Musa* genotypes. The BSOLV-152-Mbanzangungu, BSOLV-203-Kikubulu, BSOLV-237-Kizulusansi, BSOLV-279-VundaKintuti and BSOLV-207-Kikubulu banana isolates (A genome) and the BSOLV-364-Selo plantain isolate (B genome) have a percentage of identity exceeding 98%. These results show that Vunda Kintuti, one of the locations with the highest prevalence of BSOLV infection in Bas-Congo, had episomal BSOLV. These isolates from different sites in the surveyed area indicate the existence of a small BSD epidemic in Bas-Congo, with Vunda Kintati as the primary location.

CMV has a large host range. In this study, CMV was observed in *Musa* spp. in most locations, but surprisingly not in the important vegetable growing area where banana is mixed with vegetables. This could be explained by the high diversity of plant species in the study area. It is common to find banana mixed with crops or vegetables, and farmers have been sufficiently trained and supported by many projects and NGOs to control such viruses. In other vegetable areas, however, the professional level of farmers is comparatively low. Another possible explanation could be related to the genetic characteristics of CMV, which fall into two subgroups. It known that the CMV isolates infecting in banana belong to Subgroup I (Roossinck 2002). It is usual to find varying CMV levels in banana-growing areas, ranging from 5 to 25%, for example, in young banana in Ivory Cost (Aka et al. 2009). In this study, the CMV frequency in banana and plantain was within this range, at 9.3%. It would be useful to study the overall genetic diversity of CMV in banana in the DRC.

Analysis of the partial sequencing of RNA3, targeting the CP gene, in the 18 DRC CMV isolates revealed the great similarity among them. These results suggest that only a single strain of CMV has dispersed in Bas-Congo area despite the diversity of banana genotype variability and the environmental conditions. They also suggest that CMV was introduced on a single occasion.

Between 2001 and 2002, the national Agricultural and Research Institute implemented a project to evaluate resistant hybrids against black sigatoka (FHIA-01, FHIA-03, FHIA-21, FHIA-23, FHIA-25, Cardaba, Orishele, Saba, SH3640 and Bita3 from South Africa), all varieties that had been developed by the Fondacion Hondurena of

Investigation Agricola. Some of these varieties were obtained from a South African laboratory (variety: Bita 3). About 8,700 releases were distributed to farmers in 14 locations in Bas-Congo, including some locations covered in this study (Mbanza Ngungu, Sekembata, Boma, Lemba, Lukula, Tshela, Sonabata, Madimba, Kisantu, Kimpese) (Bakelana, 2005).

A comparison of the 18 DRC CMV isolates with those from African countries, including South Africa, Ghana (CMV_Ghana_FJ896156) and Cameroon (CMV_Cameroon_[FJ896157]) isolates from diverse hosts, reveal that the DRC isolates of CMV differ from strains from China (CMV_SD-China-[AB008777]), US (CMV_IX-[U20219] and CMV_aohu-USA-[U31220]) and India (Banana-India-[AM158321], CMV_Cathar-India-[EU310928], CMV_Jatropha-India-[EF153739] CMV_Chrysant-India [EF153733], CMV_Tomato-India-[DQ141675]). Nevertheless, these isolates differ greatly from Australian CMV strains (CMV_Q-Australia-[M21464]), other Chinese strains (CMV_Ynb-China-[AJ242585]), US strains (CMV_WL-[D00463]) and South African strains isolated from Cape Town (CMV_Cape - South Africa [CMU61285]).

CMV isolates can be grouped into Subgroups IA, IB and II (Owen et al. 1990; Singh et al. 1995; Roossinck et al. 1999; Szilassy et al. 1999). In this study, distance analysis revealed that the DRC CMV isolates all fell within Subgroup IA. Our results are in accordance with those reported by Singh (1995), who found that CMV isolates from banana belong to Subgroup I. CMV is an emerging virus in banana-growing area in western DRC

The search for BBrMV was conducted with both positives and negative control, using molecular-sensitive tools and all the samples were negative. This indicates an absence of BBrMV in the study area. Up to now, the virus has not been reported in Africa. It is worth noting, however, that BBrMV remains a threat and quarantine measures should be in place in DRC.

The result of our study has allowed to precise the current status of banana viruses in Bas-Congo. Extending the search for additional viruses in Central Africa would certainly be useful and offer new insights into the constraints of banana cultivation. An improvement in the quality of planting materials through varietal

selection and early diagnosis will help to prevent the spread of the viruses observed in this study. Border controls in DRC should include BBrMV quarantine measures.

Acknowledgments

This study was made possible by Plant Clinic – International – Kinshasa/ Democratic Republic of Congo and financial support from the **Belgian Agency of Development, BTC/CTB**. The authors are grateful to Wallonie-Bruxelles International, for support, to Antoine Mfumu (CGEA/CRENK) and all the technical staff at the Plant Clinic-International (in Louvain-la-Neuve /Belgium, Kinshasa/DRC).

Literature Cited

Aka, A.R., Kouassi, N.K., Agnéroh, T.A., Amancho, N.A., and Sangare, A. 2009. Distribution et incidence de la mosaïque du concombre (CMV) dans les bananeraies industrielles au Sud-Est de la Côte d'Ivoire. Sciences et Nature 6:171-183.

Amin, I., Qazi,J., Mansoor, S., Ilyas, M., and Briddon, R.W. 2008. Molecular characterisation of *Banana bunchy top virus* (BBTV) from Pakistan. Virus Genes 36:191-198.

Ayo-John, E.I., and d'A Hughes, J. 2014. Identification of *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates infecting *Musa* spp and vegetable crops in southern Nigeria. International Journal of Virology, 10(3), 204-210.

Bakelana, B. K. 2005. "*Évaluation et dissémination de cultivars améliorés de bananiers dans la province du Bas-Congo, RDC* : *Résultats des activités des trois premières années*." MusAfrica 2: 12-16.

Bakelana, B.K., and Muyunga, T. 1996. *La production de bananes et bananes plantain en République Démocratique du Congo*. Infomusa 103-112.

Blomme, G., Ploetz,R. Jones, D., De Langhe, Price, N., Gold, C., Geereing, A., Viljoen,A., Karamura, D., Pillay, M., Tinzaara, W., Teycheney,P-Y., Lepoint, P., Karamura,E., and Buddenhagen, I. 2012. A historical overview of the appearance and spread of *Musa* pests and pathogens on the African continent: Highlighting the importance of clean *Musa* planting materials and quarantine measures. Ann. Appl. Biol. 162:4-26.

Chabannes, M., Baurens, F-C., Duroy, P-O, Bocs, S., Vernerey, M-S., Rodier-Goud, M., Barbe, V., Gayral, P., and Iskra-Caruanan, M-L. 2013. Three infectious viral species lying in wait in the banana genome. J. Virol. 87:8624-8637.

Chou, C.N., Chen, C.E., Wu, M.L., Su., H.J., and Yeh, H.H. 2009. Biological and molecular characterization of Taiwanese isolates of *Cucumber mosaic virus* associated with Banana mosaic disease. J. Phytopathol. 157:85-93.

Dahal, G., Hughes, A.J., Thottappilly, G., Lockhart, B.E.L. 1998. Effect of temperature on symptom expression and reliability of Banana streak badnavirus detection in naturally infected plantain and banana (*Musa* spp). Plant Dis. 82:16-21.

Darnell-Smith, G. P. 1924. " Bunchy top" disease in banana. *Queensland Agricultural Journal*, *2*, 169-179.

Dheepa, R., and Paranjothi, S. 2010. Transmission of *Cucumber mosaic virus* (CMV) infecting banana by aphid and mechanical methods. Emir. j. food agric. 22:117-129.

Duroy, P-O., Perrier, X., Laboureau, N. Jacquemoud-Collet, J-P., Iskra-Caruanana, M-L. 2016. How endogenous plant pararetroviruses shed ligth on *Musa* evolution. Ann. of Bat. 117: 625- 641.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32:1792-1797.

Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C., Bopda-Waffo, A., Hughes, J.D.A., and Chen, J.S. 1999. Occurrence of banana streak badnavirus on plantain and banana in 45 villages in southern Cameroon, Central Africa. Z. Pflanzenk. Pflanzen. 106:174-180.

Gayral, P., Carlos, J., Carrazana,N., Lescot, M., Lheureux, F., Lockhart, E.L.B., Mutsumoto, Piffanelli, P., and Iskra-Caruana, M.L. 2008. A single Banana streak virus integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. J. Virol. 82:6697-6710.

Geering, A.D.W., Hull, R. 2012. Familly *Caulimoviridae*. In M.Q. King, A. Adams, M.J. Carstens, E.B., Lefkowitz (eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses (Vol. 9th Report, pp. 429-443). Amsterdam: International Committee on Taxonomy of Viruses: International Union of Microbiological Societies Virology Division.

Harper, G., Hart,D., Moult, S., and Hull, R. 2004. *Banana streak virus* is very diverse in Uganda. Virus Res. 100:51-56.

Hu, J.S., Li, H.P., Barry,K., Wang, M., and Jordan, R. 1995. Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. Plant Dis. 79:902-906.

International committee on Taxonomy of Viruses. 2014. Master species list 2014, http://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists

Iskcra-Caruana, M.L., Baurens, F.C., Gayral, P., and Chabannes, M. 2010. A four-partner plant-virus interactions: enemies can also come from within. Mol. Plant Microbe Interact. 23:1394-402.

Iskra-Caruana, M.L., Chabannes, M., Duroy, P.O., and Muller, E. 2014. A possible scenario for the evolution of Banana streak virus in banana. Virus Res. 186:155-162.

Iskra-Caruana, M.L., Galzi, S., Laboureau, N. 2008. A reliable IC One-Step RT-PCR method for the detetction of BBrMV to ensure safe exchange of Musa germplasm. J.Virol. Meth. 153, 223-231.

James, A.P., Geijskes, R.J., Dale, J.L., and Harding, R.M. 2011. Molecular characterisation of six badnavirus species associated with leaf streak disease of banana in East Africa. Ann. Appl. Biol. 158:346-353.

Javer-Higginson, E., Acina-Mambole, I., Gonzalez, J.E., Font, C., Gonzalez, G., Echemendia, L.A., Muller, E., and Teycheney, P.Y. 2014. Occurrence, prevalence and molecular diversity of Banana streak viruses in Cuba. Eur. J. Plant. Pathol. 138:157-166.

Jones, D.R. (ed.). 2000. Diseases of Banana, Abaca and Enset: CABI Publishing.

Kubiriba, J., Legg, J.P., Tushemereirwe,W., and Adipala, E. 2001. Disease spread patterns of Banana streak virus in farmers' fields in Uganda. Ann. Appl. Biol. 139:31-36.

Kumar, L.P., Hanna, R., Alabi,O.J., Soko, M.M., Oben,T.T., Vangu, G.H.P., and Naidu, R.A. 2011. *Banana bunchy top virus* in Sub-Saharan Africa: Investigations on virus distribution and diversity. Virus Res. 159:171-182.

Kumar, L.P., Selvarajan,R., Iskra-Caruana, M-L., Chabannes, M., and Hanna, R. 2015. Biology, etiology, and control of virus diseases of banana and plantain. Adv. Virus Res. 91:229-69.

Latham, P., and Konda, M.K. 2006. Quelques plantes utiles du Bas-Congo Province, République Démocratique du Congo (2nd edn). Perthshire, UK.

LeProvost, G., Iskra-Caruana, M.L., Acina,I., and Teycheney, P.Y. 2006. Improved detection of episomal *Banana streak viruses* by multiplex immunocapture PCR. J. Virol. Methods 137:7-13.

Lockhart, L.E.B., and Jones, D.R. 2000. Banana mosaic. In D.R. Jones (ed.), Diseases of Banana, Abaca and Enset (pp. 256-263). UK: CABI Publishing.

Lokossou, B., Gnanvossou, D., Ayodeji, O., Akplogan, F., Saflore, A., Migan, M.Z., Proura, A.M., Hanna, R., and Lava, P. 2012. Occurrence of *Banana bunchy top virus* in banana and plantain (*Musa* sp.) in Benin. New Dis. Rep. 25:13.

Mansoor, S., Qazi, J., Amin, I., Khatri, A., Khan, A.I., Raza, S., Zafar, Y., and Briddon, R.W. 2005. A PCR-based method, with internal control, for the detection of *Banana bunchy top virus* in banana. Mol. Biotechnol. 30:167-170.

Mobambo, P., Staver, C., Hauser, S., Dheda, B., Vangu, G. 2010. An innovation capacity analysis to identify strategies for improving plantain and banana (*Musa* spp) productivity and value addition in the democratic Republic of Congo. Acta.Hort.879, 821-828.

Muhire, B. M., Varsani, A. and Martin, D.P. 2014. "SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation." PLoS ONE 9 e108277.

Mukwa, L.F.T., Gillis, A., Vanhese, V., Laboureau, N., Galzi, S. Romay, G., Kalonji-Mbuyi, A., Iskra-Caruana, M-L., Bragard, C. 2016. Low genetic diversity of *Banana bunchy top virus*, with a sub-regional pattern of variation, in Democratic Republic of Congo. Virus genes, DOI: 10.1007/s11262-016-1383-1.

Mukwa, L.F.T., Muengula, M., Zinga, I., Kalonji, A., Iskra-Caruana, M.L., and Bragard, C. 2014. Occurrence and distribution of *Banana bunchy top virus* related agro-ecosystem in south western Democratic Republic of Congo. Am. J. Plant Sci. 5:647-658.

Natsuaki, K.T., and Furuya, N. 2007. The genera *Babuvirus* and *Badnavirus* in Asia. Plant. Pathology Journal 23:227-232.

Opiyo, S.A., Ateka, E.M., Owuor, P.O., Manguro, L.O.A, and Karuri, H.W. 2010. Survey of Sweet Potato Viruses in Western Kenya and detection of *Cucumber mosaic virus*. J. Plant Pathol. 92:797-801.

Owen, J., Shintaku, Aeschleman, P., Ben Tahar, P., Palukitis, P. 1990. "Nucleotide sequence and evolutionary relationships of *Cucumber mosaic virus* (CMV) strains : CMV RNA 3." J. Gen. Virol. 71: 2243-2249

Pichaut, J.P., Umber, M., Laboureau, N., Farinas, B., Chabannes, M., Duroy, P.O., Bonheur, L., Solmon, F., Jenny, C., Iskra-Caruana, ML., and Teycheney, P.Y. 2013. Toward the end of BSV constraint for breeding banana inter-specific hybrids. Paper presented at the XX Reuniao Internacional da Associaçao para a cooperaçao em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das *Musaceas* (Bananas e Platanos), Fortaleza, Brazil.

Posada D., and Crandall, K.A. 1998. MODELTEST/ testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14:817-818.

Quito-Avila, D.F., Ibarra, M.A., Alvarez, R.A., Ratti, M.F., Espinoza, L., Cevallos-Cevallos, J.M., and Peralta, E.L. 2013. First report of *Banana bract mosaic virus* in Cavendish banana in Ecuador. Plant Dis. 97:1003.

Rodoni, B.C. 1997. Identification and characterization of *Banana bract mosaic virus* in India. Plant Dis. 81:669-672.

Roossinck, M. J., Lee, Z., Hellwald,K.H. 1999. "Rearrangements in the 5' npntranslated region and phylogenetic analyses of cucumber mosaic virus RNA3 indicate radial evolution of three subgroups." J. of Virol.73: 6752-6758

Roossinck, M.J. 2002. Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. J.Virol. 76:3382-3387.

Selvarajan, R., & Balasubramanian, V. (2014). Host interaction host–virus interactions in banana-infecting viruses. In R. K. Gaur, Thomas Hohn, & Pradeep Sharma (Eds.), Plant virus–host interaction molecular approaches and viral evolution (pp. 57–78). MA, USA: Elsevier Academic Press.

Sharman, M., Gambley, F.C., Oloteo, O.E., Abgona, R.V.J., and Thomas, J.E. 2000b. First record of natural infection of abaca (*Musa textilis*) with *Banana bract mosaic potyvirus* in the philippines. Australas. Plant Path. 29:69.

Singh, P. R., Jones, R.A.C., Jones M.G.M. 1995. "Identification of *Cucumber mosaic virus* Subgroup I isolates from Banana Plant affected by infectious Chlorosis Disease Unsing RT-PCR." Plant Disease 79: 713-716.

Soko, M. M., Dale, J., Kumar, P. L., James, A., Izquierdo, L., Fiaboa, K., et al. (2009). Banana bunchy top disease survey reports, previous control efforts and the way forward (p. 200). Limbe, Malawi: Bvumbwe Agricultural Research Station, P.O. Box 5748.

Szilassy, D., Salanki,K & Balazs, E. 1999. "Molecular evidence for the existence of two distinct subgroups in Cucumber mosaic cucumovirus." Virus genes 18: 221-227.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. Filipski, A., and Kamur, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol 30:2725-2729.

Thomas, J.E., and Dietzgen, R.G. 1991. Purification, characterization and serological detection of virus like particules associated with banana bunchy top disease in Australia. J. Gen. Virol. 72:217-224.

Thomas, J.E., Geering, A.D.W., Gambley, C.F., Kessling, A.F., and White, M. 1997. Purification, properties, and diagnosis of *Banana bract mosaic potyvirus* and its distinction from Abaca mosaic potyvirus. Phytopathology 87:698-705.

Tushemereirwe, W.K., and Bagabe, M. 1999. Review of disease distribution and pest status in Africa. Review of IPM Reseach Activities-Pathology, 139-147.

Wang, I-C., Sether, D.M., Melzer, M.J., Both, W.B., and Hu, J.S. 2010. First report of *Banana bract mosaic virus* in flowering ginger in Hawaii. Plant Dis. 94:921.

Xia, X. 2013. "DAMBES5:A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution " Mol. biol. and Evol. 30: 1720-1728).

Yu, C., Wu, J., and Zhou, X. 2005. Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. J. Virol. Methods123:155-161.

Supplementary data table 1: Discrimination of EPRV-7 and EPRV-9 on BSGFV and Allele 1 and 2 on BSOLV

			eBSGFV			**eBSOLV**				**eBSGFV**		**eBSOLV**	
Geographic Origin	**Samples N°**	***Musa* genome**	**J- VM1**	**J- VM2**	**S- VV3**	**J- 16-17**	**J- 25-26**	**S- 29-30**	**BSVInfection**	**Allele 7**	**Allele 9**	**Allele 1**	**Allele 2**
Maduda	25	B	+	-	-	+	-	-	BSIMV	+	-	-	-
Maduda	26	A	-	-	-	-	+	+	BSGFV	-	-	-	-
Maduda	27	A	-	+	-	-	-	+	BSGFV	-	-	-	-
Kintuala	34	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Mbumba Kangu	38	A	+	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Mbumba Kangu	40	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV+ BSOLV	-	-	-	-
Mbumba Kangu	42	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Mbumba Kangu	43	B	-	-	-	+	+	+	BSOLV	-	-	+	-
Tshela centre	48	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV+ BSOLV	-	-	-	-
Tshela centre	52	B	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	+	-
Tshela centre	54	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kiobo-Kizu	56	A	-	-	-	-	-	-	BSMYV	-	-	-	-
Kiobo-Kizu	59	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kiobo-Kizu	61	B	-	-	-	+	+	+	BSOLV	-	-	+	-
Kiobo-Kizu	62	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Kiobo-Kizu	63	B	+	-	-	-	-	-	BSGFV	+	-	-	-

Kiniati	65	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kiniati	67	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kiniati	68	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kiniati	69	B	+	+	-	-	-	-	BSGFV	+	-	-	-
Kiniati	72	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Lukula centre	74	B	-	-	-	-	-	-	BSGFV	+	-	-	-
Kinkuti	82	B	-	-	-	-	-	-	BSGFV	+	-	-	-
Kinkuti	86	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kinkuti	87	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kimbianga sud	94	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kimbianga sud	97	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kimbianga sud	98	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kimpanga nombe	102	B	-	+	+				BSGFV	+			
Kimpanga nombe	108	A			-				BSGFV				
Tsumba kituti	113	B	-	+	-	+	+	+	BSGFV	+	-	-	+
Tsumba Kituti	114	A	+	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Luila	135	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Boma	137	B	-	-	-	-	-	-	BSIMV	-	-	-	-
Boma	140	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Boma	142	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Boma	144	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-

			eBSGFV			eBSOLV				eBSGFV		eBSOLV	
Geographic Origin	**Samples N°**	***Musa* genome**	**J- VM1**	**J- VM2**	**S- VV3**	**J- 16-17**	**J- 25-26**	**S- 29-30**	**BSVInfection**	**Allele 7**	**Allele 9**	**Allele 1**	**Allele 2**
Mbanza Ngungu	146	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Mbanza Ngungu	147	B	-	+	-	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-
Mbanza Ngungu	148	B	-	-	-	-	-	-	BSIMV	-	-	-	-
Mbanza Ngungu	152	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Lukunga	168	B	+	-	-	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-
Lukunga	169	B	-	+	-	+	+	+	BSGFV	-	-	-	-
Lukunga	170	B	-	+	-	+	+	+	BSGFV	+	-	-	-
Kayindunda	175	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kayindunda	180	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kayindunda	181	A	-	-	-	-	-	+	BSGFV	-	-	-	-
Kimwanda	183	A	-	-	-	-	-	+	BSGFV	-	-	-	-
Kimwanda	186	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV+ BSOLV	-	-	-	-
Kimwanda	188	B	+	+	-	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-
Kimwanda	189	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Ntshokoto	193	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Kikubulu	203	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV+ BSOLV	-	-	-	-
Kikubulu	207	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
MBAKA	212	B	-	-	-	+	+	+	BSOLV	-	-	+	+

Kizulu sansi	229	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Kizulu sansi	232	B	-	+	-	+	+	+	BSGFV	-	-	+	-
Kizulu sansi	234	B	-	-	-	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-
Kizulu sansi	235	B	-	+	-	-	-	+	BSOLV	+	-	-	-
Kizulu sansi	237	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Kizulu sansi	239	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Nsanda centre	248	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Nsanda centre	251	A	-	-	-	-	-	+	BSOLV	-	-	-	-
Mwenge	258	B	-	+	-	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-
Mwenge	259	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Vunda Kintati	274	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Vunda Kintati	276	B	-	-	-	-	+	-	BSOLV	-	-	-	-
Vunda Kintati	280	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV+ BSOLV	-	-	-	-
Vunda Kintati	281	B	-	+	+	+	+	+	BSOLV	+	-	+	-
Kelemwanza	302	B	-	+	-	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-
Kelemwanza	306	A	+	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Kinkandubula	313	B	+	+	-	-	-	-	BSGFV	+	-	-	-
Lukamba Mbanza	337	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Lukamba Mbanza	338	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Lukamba Mbanza	343	A	-	-	-	-	-	-	BSOLV	-	-	-	-
Mvuangu	347	B	+	+	-	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-

			eBSGFV			eBSOLV				eBSGFV		eBSOLV	
Geographic Origin	**Samples N°**	***Musa* genome**	**J- VM1**	**J- VM2**	**S- VV3**	**J- 16-17**	**J- 25-26**	**S- 29-30**	**BSVInfection**	**Allele 7**	**Allele 9**	**Allele 1**	**Allele 2**
Mvuangu	349	B	-	-	-	-	-	+	BSGFV	-	-	-	-
Mvuangu	353	B	-	-	-	-	-	+	BSGFV	-	-	-	-
Mvuangu	354	B	-	-	-	-	-	+	BSOLV	-	-	-	-
Boko	361	B	-	-	-	-	-	-	BSMYV	-	-	-	-
Selo	364	B	-	-	-	+	+	+	BSOLV	-	+	+	-
Sselo	366	B	+	-	+	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-
Tsudinzanza	370	B	+	-	+	-	-	-	BSGFV	+	-	-	-
Sengi	386	B	+	+	-	-	-	-	BSGFV	+	-	-	-
Sengi	393	A	-	-	-	-	-	-	BSGFV	-	-	-	-
Nsioni-Lukamba Mbaza	396	B	-	-	-	-	-	-	BSMYV	-	-	-	-
Nsioni-Lukamba Mbaza	402	B	+	-	-	-	-	-	BSGFV	+	-	-	-
Nsioni-Lukamba Mbaza	403	B	-	-	-	-	-	+	BSGFV	+	-	-	-
Kinsenga	424	B	-	+	-	-	-	+	BSGFV	+	+	-	-
Nsundi Kunga	430	B	-	+	-	-	-	-	BSGFV	+	+	-	-

(+): Allele or junction detected; (-) Allele or junction not detected; J: Musa and eBSV genome junction; S: eBSV structure; *Musa* genome: identificationof B genomebased on *Musa* eBSV junction; BSV infection: define by IC-PCR

Supplementary data table 2: Prevalence of banana viruses according to the surveyed site. Each location is presented with the number of infected sample. Nine samples collected in each site (n=9).

Location	BBTV	CMV	BSGFV	BSOLV	BSIMV	BSMYV	BBrMV	BBTV+ CMV		BBTV+ BSGFV		BBTV+ BSOLV		BSOLV+ CMV		BBTV+ BSMYV		BSGFV + BSOLV		BSGFV + CMV		BBTV+ BSGFV+ CMV			BBTV+ BSGFV + BSOLV	
									B		B		B		B		B		B		B			A	
n=9								A		A		A		A		A		A		A		A	B		B
Kisonga	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kisantu	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maduda	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kintuala	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mbumba Kangu	4	0	3	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tshela centre	6	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Kiobo Kizu	4	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kiniati	4	1	5	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Lukula centre	7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kinkuti	8	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kimbianga sud	2	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kimpanga Nombe	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tsumba Kituti	3	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Seke Mbata	5	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Luila	6	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Boma	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mbanza Ngungu	2	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Numero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lukunga	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kayindunda	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kimwanda	2	0	4	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Ntshokoto	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kikubulu	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Mbaka	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kuidi	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kizulu sansi/Diyimba	6	1	2	3	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kinza Mvuete	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nsanda Centre	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mwenge	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Patu	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vunda Kintati	2	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Kimangebele											0															
Lufu	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tiaba	3	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kelemwanza	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kinkandubula	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ndalu	4	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bengu Kiyanga	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lukamba																									
Mbanza	1	0	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mvuangu	0	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Boko	0	0	0	0	0	1	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Selo	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Tshudinzana	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kikiaka	1	2	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sengi	2	6	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Nsioni-																									
Lukambambaza	5	2	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tombo-yanga	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nganda-Nsundi	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kisenga	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sengongayila	1	0	1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kimpoko	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Masaba	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ndjili Brasserie	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	**117**	**42**	**61**	**23**	**3**	**3**	**0**	**3**	**3**	**8**	**4**	**0**	**4**	**2**	**1**	**1**	**1**	**5**	**0**	**2**	**2**	**1**	**0**	**0**	**0**

Supplementary data table 3 : Geographical origin, genotype of indexed BSV species positive samples

District	Location	Sample No	Type of natural vegetation in the site	Genotype tested by dCAP markers (Junction OL)	Cultivar declared by farms	BSV symptoms expression	Severity	Cropping system	Phenological stage of plant	BSGFV	BSIMV	BSOLV	BSMYV	Presence of four main BSV Species
BAS FLEUVE	Maduda	25	Forest	B	Local plantain	Yellow streak on the leaves	Low	Residential garden	Vegetative stage	0	1	0	0	1
BAS FLEUVE	Maduda	27	Forest	A	Local plantain	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Mbumba Kangu	38	Forest	A	Gros Michel	No symptoms	None	Residential garden	Harvest	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Mbumba Kangu	42	Forest	A	Gros Michel	Cracking of the collar part of the pseudo- stem and yellow streak on the leaves	Low	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Tshela Centre	54	Forest	A	Gros Michel	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Mean	Residential garden	Harvest	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kiobo Kizu	56	Forest	A	Locale	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Strongly expressed	Residential garden	Vegetative stage	0	0	0	1	1
BAS FLEUVE	Kiniati	65	Savannah	A	Locale	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kiniati	67	Savannah	A	Gros Michel	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kiniati	72	Savannah	A	Local plantain	Cracking of the collar part of the pseudo-stem and yellow streak on	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1

						the leaves								
BAS FLEUVE	Tsumba Kituti	113	Forest	A	Local plantain	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Strongly expressed	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Tsumba Kituti	114	Forest	B	Locale	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
LUKAYA	Luila	135	Savannah	A	Locale	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Boma	140	Savannah	A	Gros Michel	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Mean	Residential garden	Harvest	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Boma	144	Savannah	A	Vrai corn	Yellow streak on the leaves	Mean	Plantation mixed with vegetables	Vegetative stage	0	0	1	0	1
CATARACT	Mbanza Ngungu	146	Forest	A	Locale	No symptoms	None	Plantation mixed with vegetables	Vegetative stage	1	0	0	0	1
CATARACT	Mbanza Ngungu	147	Forest	B	Local plantain	No symptoms	None	Plantation mixed with crops	Vegetative stage	1	0	0	0	1
CATARACT	Mbanza Ngungu	152	Forest	A	Locale	No symptoms	None	Plantation mixed with vegetables	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Lukunga	168	Forest	B	Gros Michel	No symptoms	None	Plantation mixed with vegetables	Harvest	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Lukunga	169	Forest	B	Gros Michel	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Mean	Residential garden	Harvest	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Lukunga	170	Forest	B	Plantain faux corne	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Low	Residential garden	Harvest	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kaindunda	175	Forest	A	Faux corne	Yellow streak on the leaves	Low	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1

District	Location	Sample No	Type of natural vegetation in the site	Genotype tested by dCAP markers (Junction OL)	Cultivar declared by farms	BSV symptoms expression	Severity	Cropping system	Phenological stage of plant	BSGFV	BSIMV	BSOLV	BSMYV	Presence of four main BSV Species
BAS FLEUVE	Kaindunda	180	Forest	A	Locale	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kaindunda	181	Forest	A	Locale	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kimwanda	183	Forest	A	Plantain local	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Low	Residential garden	Harvest	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kimwanda	186	Forest	A	Locale	Cracking of the collar part of the pseudo- stem and yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kimwanda	188	Forest	B	Plantain local	Yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kimwanda	189	Forest	A	Plantain local	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Ntshokoto	193	Forest	A	Faux corne	Yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kikubulu	203	Forest	A	Bisamunyo	Yellow streak on the leaves	Very low	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kikubulu	207	Forest	A	Locale	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Mbaka	212	Savannah	B	Bisamunyo	Yellow streak on the leaves	Low	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kizulu sansi	229	Forest	A	Locale	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kizulu sansi	232	Forest	B	Locale	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1

BAS FLEUVE	Kizulu sansi	234	Forest	B	Local plantain	Yellow streak on the leaves	Strongly expressed	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Kizulu sansi	235	Forest	B	Local plantain	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kizulu sansi	237	Forest	A	Gros Michel	No symptoms	None	Residential garden	Harvest	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kinzau Mvuete	239	Forest	A	Plantain local	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Nsanda Centre	248	Forest	A	Plantain local	No symptoms	None	Plantation mixed with crops	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Nsanda Centre	251	Forest	A	Locale	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Very low	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Mwenge	258	Forest	B	Plantain Diyimba	Cracking of the collar part of the pseudo-stem and yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Mwenge	259	Forest	A	Gros Michel	Yellow streak on the leaves	Low	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Vunda Kintati	274	Forest	A	Locale	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Very low	Plantation mixt with crops	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Vunda Kintati	276	Forest	B	Locale	Cracking of the collar part of the pseudo-stem and yellow streak on the leaves	Very low	Plantation mixt with crops	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Vunda Kintati	279	Forest	A	Faux corne	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Vunda Kintati	280	Forest	A	Faux corne	Yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Vunda Kintati	281	Forest	B	Faux corne	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kelemwanza	302	Forest	B	Locale	Yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1

BAS FLEUVE	Kelemwanza	305	Forest	A	Locale	Yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
BAS FLEUVE	Kelemwanza	306	Forest	A	Bitika	No symptoms	None	Residential garden	Harvest					
BAS FLEUVE	Lukamba/Mbanza	337	Forest	A	Silambela	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Lukamba/Mbanza	338	Forest	A	Bitika	No symptoms	None	Residential garden	Harvest	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Lukamba/Mbanza	339	Forest	A	Bitebi	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Mvuangu	347	Forest	B	Plantain faux corne	Yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Mvuangu	349	Forest	B	Plantain faux corne	Yellow streak on the leaves	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Mvuangu	353	Forest	B	Plantain Bitebi	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Mvuangu	354	Forest	B	Plantain Bitebi	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
CATARACT	Selo	364	Savannah	B	Plantain local	Yellow streak on the leaves	Very low	Residential garden	Vegetative stage	0	0	1	0	1
LUKAYA	Selo	366	Savannah	B	Locale	Cracking of the collar part of the pseudo-stem	Mean	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
LUKAYA	Sengi	393	Savannah	A	Gros Michel	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
CATARACT	Nsioni/Lukamba	403	Forest	B	Diyimba	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
CATARACT	Kisenga	424	Savannah	B	Gros Michel	Yellow streak on the leaves	Very low	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1
BAS FLEUVE	Nsundi Kunga	430	Forest	B	Diyimba	No symptoms	None	Residential garden	Vegetative stage	1	0	0	0	1

Legend: (1): presence; (0): absence; (B): interspecific hybrid; (A): *Musa acuminata*; (L): not analysed for this parameter.

C2. Caractérisation moléculaire et diversité génétique des virus du bananier au sud ouest de la République démocratique du Congo.

Préambule

L'étude de la variabilité génétique est un préalable indispensable à la compréhension de la dynamique et de l'épidémiologie des virus phytopathogènes (Lefort-Buson 1988).

Dans la partie précédente de cette thèse, trois virus ont été associés au bananier (*Musa* spp.) au sud ouest de la République démocratique du Congo ; cinq virus ont été détectés pour la première fois et associé à leurs symptômes en conditions naturelles : *Banana streak GF virus*, *Banana streak OL virus*, *Banana streak IM virus*, *Banana streak MY virus* et *Cucumber mosaic virus*, un virus, *Banana bract mosaic virus*, dont l'absence dans le milieu d'étude, a été confirmée.

Ces virus émergents sont-ils une résultante des échanges de matériels de plantation entre la RDC et les autres pays ? Sont-ils diversifiés ?

L'usage des outils d'épidémiologie moléculaire a permis d'évaluer la diversité génétique de chacun des virus détectés en l'occurrence, *Banana bunchy top virus* (BBTV), Banana streak virus (BSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV).

Cette deuxième partie de la recherche est centrée sur la caractérisation moléculaire et la diversité génétique des virus détectés. Elle retrace leur origine, dans le but de comprendre leur dynamique et par conséquent leur épidémiologie. La diversité génétique du *Banana bunchy top virus* basée sur l'analyse de la séquence complète de l'ADN-R de 52 isolats collectés dans cinq provinces du Sud Ouest de la RDC (Bas-Congo, Kasaï Oriental, Bandundu, Katanga, Kinshasa périurbain) a été étudié. Cinq isolats provenant de différents clusters ont été entièrement séquencés afin d'identifier les différences génétiques, sur la base de l'ensemble du génome.

Par ailleurs, la diversité génétique du Banana streak virus basée sur l'analyse de la séquence partielle de la reverse transcriptase (RT) et de la ribonucléase H (RNase H), ainsi que celle de *Cucumber mosaic virus* basée sur la séquence partielle de la protéine de capside, ont aussi été comparés (Partie C1).

CHAPITRE 6

Low genetic diversity of *Banana bunchy top virus*, with a sub-regional pattern of variation, in Democratic Republic of Congo

L.F.T. Mukwa[1,2], A. Gillis[3], V. Vanhese[1], G. Romay[1], S. Galzi[4], N. Laboureau[4], A. Kalonji-Mbuyi[2, 5], ML. Iskra-Caruana,[4] C. Bragard[1, 2]*

(1) Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Applied Microbiology - Phytopathology, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2 Bte L07.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve Belgium; (2) Clinique des Plantes de Kinshasa, 8842, wangata, Kin I, Kinshasa, D.R. of Congo; (3) Université catholique de Louvain, Earth and Life Institute, Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Croix du Sud 2 Bte L07.05.03, 1348 Louvain-la-Neuve Belgium ; (4) Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement ; (5) Université de Kinshasa, Faculté des Sciences Agronomique, D.R.Congo
(*) Corresponding author: claude.bragard@uclouvain.be

Ce manuscrit a été publié dans *Virus Genes*

Abstract

Banana bunchy top virus (BBTV), belonging to the genus *Babuvirus*, is the most devastating and widespread banana virus. Banana and plantain are major crops in terms of household income and food security in Democratic Republic of Congo (DRC). Despite the large area under banana and plantain cultivation in the country, before this study the genetic characterization of BBTV isolates had only been undertaken for two provinces. In this study, genetic variation in BBTV was assessed from 52 BBTV isolates collected in five out of 11 provinces in DRC (Bandundu, Bas-Congo, Katanga, Kinshasa and Kasaï Oriental) and in two provinces using sequences previously described in databases. Full genome sequencing of DNA-R components was performed, revealing low genetic variation (98-100% nucleotide identity) among the BBTV isolates detected. The phylogenetic analyses showed that all the DRC isolates were clustered in the South Pacific clade of BBTV. Based on the coding region for the replication initiator protein, haplotype diversity was estimated to be 0.944±0.013, with 30 haplotypes from 68 isolates in DRC. Such diversity shows a haplotype distribution mainly at the sub-regional level in DRC. In addition, the sequence determination from the whole genome of selected isolates confirmed low genetic variation among isolates from seven DRC provinces (97-100% nucleotide identity). This study strengthened the hypothesis of a single BBTV introduction some time ago, followed by the spread of the virus in the country.

Key words: *Babuvirus*, Banana crops, Democratic Republic of Congo, genetic diversity, *Nanoviridae*

Introduction

Banana bunchy top disease (BBTD) is one of the most devastating diseases in banana and plantain crops, sometimes resulting in 100% yield loss [1]. The causative agent of BBTD is *Banana bunchy top virus* (BBTV), considered to be one of the top 10 viruses worldwide in terms of economic impact [2]. BBTV is the type species of the genus *Babuvirus* in the family *Nanoviridae*, whose genome is composed of multiple circular single-stranded DNA segments [3, 4, 5]. The genome of BBTV is composed of at least six DNA components, each about 1 kb long and referred to as DNA-R (encoding for the replication initiator protein), DNA-S (encoding for the coat protein), DNA-C (encoding for a protein associated with cell-cycle regulation), DNA-M (encoding for the cell-to-cell movement protein), DNA-N (encoding for a nuclear shuttle protein) and DNA-U3 (of unknown function) [5]. Each DNA component of BBTV has a similar genome organization, a stem-loop acting as the site of the origin of viral replication (CR-SL), a major common region (CR-M) involved in the second strand synthesis of circular ssDNA genomic components and a potential TATA box [4]. BBTV is vectored by the aphid *Pentalonia nigronervosa* Coquerel in a circulative persistent manner and its transmission efficiency is affected by temperature, vector life stage and plant access period [6]. The long-distance dissemination of BBTD, however, is more closely linked to the transport of infected plant material for vegetative propagation [1]. In sub-Saharan Africa, BBTV was first reported in Democratic Republic of Congo (DRC) in the 1950s [7, 8]. Since then, it has spread throughout the country [9, 10]. Recently, 16 BBTV isolates from Orientale and Sud-Kivu provinces (north-eastern and central DRC) were compared in a study of the global distribution of BBTV, revealing a major human contribution in the long-distance dispersal events [11]. In DRC, however, BBTV is not confined to Orientale and Sud-Kivu provinces [10]. In the present study, the genetic diversity of BBTV isolates was assessed across a large area of the country, including the five south-western provinces.

Materials and Methods

Leaf samples of 52 BBTV-infected plants from Bandundu, Bas-Congo, Katanga, Kasaï Oriental and Kinshasa provinces were selected from a previous survey [10]. Total DNA was extracted from 100 mg of banana leaf samples, using a FastDNA® kit (MP, Biomedicals, France) following the manufacturer's instructions. Rolling circle amplification (RCA) was used to preferentially enrich circular DNA using phi29 DNA polymerase (GE Healthcare, Germany) [11]. In this study, DNA-R was selected for genetic studies because this component codes for a crucial multifunctional protein, which plays an important role in the replication of BBTV [12], and it is the most frequent component sequenced for genetic analyses among BBTV isolates worldwide. In order to complete the full-length sequence of DNA-R components, overlapping PCR assays with two sets of specific back-to-back primers (Supplementary Table 1) were performed using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific™, USA). The PCR conditions were 30 s at 98°C, 30 cycles at 98, 55 and 72°C for 10, 30 and 20 s, respectively, and a final extension of 10 min at 72°C. In addition, for one BBTV isolate collected from each province, all components of the genome were sequenced using component-specific back-to-back primers, as described above (Supplementary Table 1). All BBTV amplicons were directly sequenced at Macrogen Inc. (Amsterdam, The Netherlands).

For genetic analyses, nucleotide sequences from DNA-R components were aligned with BBTV isolates collected worldwide and available in the GenBank database, using MUSCLE [13]. Pairwise sequence comparisons were performed using SDT v.1.0 software [14] and neighbour-joining phylogenetic trees were built with MEGA 6 [15]. Kimura's two-parameter correction was used as a substitution model and 1,000 replicates were used for bootstrap analyses. Since a representative number of complete DNA-R of DRC isolates was available (16 from studies by Stainton et al. [11] and 52 from this work), the potential positive selection on the coding region of this genome component was explored by estimating the ratio of non-synonymous to synonymous substitution rates (ω) for each codon, using the single likelihood ancestor counting (SLAC) method [16] in the HyPhy package (http://www.datamonkey.org/).

In addition, haplotype diversity for BBTV DNA-R from Africa was estimated using the methods implemented in DnaSP v5 software [17]. Alongside these DNA-R analyses, nucleotide pairwise comparisons were carried out with the other components of the five BBTV isolates sequenced in this work, following the same protocol as for DNA-R. The phylogenetic relationships among the full genomes of BBTV isolates were estimated by concatenating the aligned sequences of each one following the order suggested by Stainton et al. [11]: DNA-R, DNA-U, DNA-S, DNA-M, DNA-C and DNA-N. Potential recombination events throughout the DNA components sequenced were evaluated using the detection methods BoostScan, Chimera, GENCOV, MaxChi, RDP, SiScan and 3Seq which are implemented in RDP4 software [18].

Results and Discussion

Complete sequences of all BBTV DNA components obtained in this study were deposited in the GenBank database (Supplementary Table 2). The nucleotide identity (NI) of DNA-R ranged between 98 and 100% (n=68) for DRC BBTV isolates, indicating low genetic diversity. Sequence analyses show that BBTV isolates from Africa, together with isolates from around the world, form two major phylogenetic groups, the South Pacific Group (hereafter, SPG) and the Asian Group (hereafter, AG) [19, 20, 21] (Supplementary Figure 1). All 52 DRC isolates fall into the SPG together with all the other sub-Saharan African BBTV isolates, displaying a low diversity among their DNA-R components. This low diversity might be explained by the lack of quarantine regulations governing the movement of banana seeds and the lack of virus-free plantlets for replanting banana fields [10, 22]. According to Wardlaw [23], a BBTV isolate was reported in DRC in the *Musa* collection at the Yangambi research station in the 1950s and it seems to be the starting point for its dissemination to several provinces over the country. In addition, the most recently reported BBTV isolates from Rwanda, Burundi and Republic of Congo are closely related to those found in DRC. This supports the hypothesis of a single introduction of BBTV and its subsequent dissemination in sub-Saharan Africa, probably without any selection

pressure. SLAC analysis was performed to identify positive selection in the coding region of DNA-R. Seven negative selected sites and no positive sites were found (at significance level 0.1), with an average ω value of 0.13.

The earliest report of BBTV in Africa relates to an isolate described in Egypt in 1901 [24]. The Sahara Desert probably represented a natural barrier stopping the spread of the disease beyond the Nile valley in North Africa [24]. Given that the earliest BBTV report in sub-Saharan Africa was in DRC in 1950, it is likely that BBTV spread from DRC to other sub-Saharan African countries rather than from Egypt and that at least two BBTV introductions occurred in Africa, one from Java and the other from Taiwan [11].

Further analyses revealed 39 haplotypes (H1 to H39) in Africa on the basis of the coding region of the replication initiator protein (haplotype diversity value of 0.944±0.013) (Figure 1A). The distribution of haplotypes observed in Central Africa is shown in Figure 1B. The most frequent haplotypes were H17, H9, H7 and H24, representing 31.6, 21.1, 21.1 and 27% of BBTV isolates, respectively (Supplementary Figure 2). It is worth noting that H17 was not present in Bandundu province, from which more than half (28/52) of the BBTV isolates were sampled. Orientale province had the widest diversity of haplotypes, with 13 of the 39 haplotypes detected. One explanation for this might be that BBTV was first introduced in the 1950s at the Yangambi research station, close to Kisangani in Orientale province [8]. Moreover, each surveyed province shows particular haplotypes, occurring at low frequency, such as H9 in Kinshasa and Bandundu, or H17 in Kasaï Oriental, Bas Congo and Katanga (Figure 1B). This probably reflects the exchange of planting material, but it also reveals differences among regions.

The haplotypes observed in other African countries were H22 and H23 (GenBank accession numbers JQ820459 and JQ820465, respectively) in Rwanda, H35 (KM607603) in Republic of Congo, H1 (AF102780 and AF416465), H2 (HQ259074) and H3 (KM607613) in Egypt, H20 (JQ820453) in Malawi, and H36 (KM607601) and H8 (KM607602) in Burundi. Most of the haplotypes were present in DRC (30 of 39 haplotypes). Ten haplotypes were found in other African countries and two were found in DRC as well as in two other African countries (Burundi and Republic of

Congo) (Figure 1B). This might be due to the larger number of DRC isolates included in this work, but further surveys are needed to assess BBTV haplotype diversity throughout the continent.

The diversity of other components fully sequenced for five BBTV isolates corresponding to Kwg-31 (H15), Bmul-77 (H17), Mvz-80 and Lubum-9 (H17) and Mbk-24 (H24) was also analysed and compared with the full BBTV genome component sequences available in GenBank database. Sequence comparisons among 21 BBTV DRC isolates showed a range of NI for DNA-U3, DNA-S, DNA-M, DNA-C and DNA-N of 95-99.1%, 98.3-99.4%, 93.8-98.7%, 97.2-99.9% and 97.1-99.5%, respectively. When comparing the full genome sequence, the average of pairwise identity was 98.2%, showing a close relationship among isolates from the north-eastern provinces of Orientale and Sud-Kivu, as previously described [11], and the isolates from the five south-western provinces reported in this study. Stainton et al. (2015) described four subgroups within the SPG (B1, C1, C2 and C3) on the basis of full-genome analyses [11]. All fully sequenced BBTV isolates from DRC belonged to subgroup C2 (Supplementary Figure 3), indicating the spread of this subgroup across the country. The global movement of SPG BBTV isolates in Africa seems to be associated with the importation of planting materials during the British colonial era [24]. The same observation was made for BBTV isolates from the Hawaiian Islands [25]. In recent decades, improved banana plant materials have been introduced into DRC in order to manage fungal diseases such as black sigatoka. At least 8,400 seedlings were multiplied at research stations and distributed to 168 household and farmer associations at 14 sites in Bas-Congo province [26], but the resistance of these banana cultivars and hybrids to BBTV remains unclear. Two factors can therefore be linked to BBTV dispersion across the country: (i) the introduction of BBTV-infected cultivars resistant to fungal diseases, but susceptible to BBTV; and (ii) the vegetative propagation of plant material in areas where the virus was already present. The vegetative propagation appears to be the most important factor based on NI analysis. This underlines the need to increase the capacity to implement indexing methods for BBTV-free plant material.

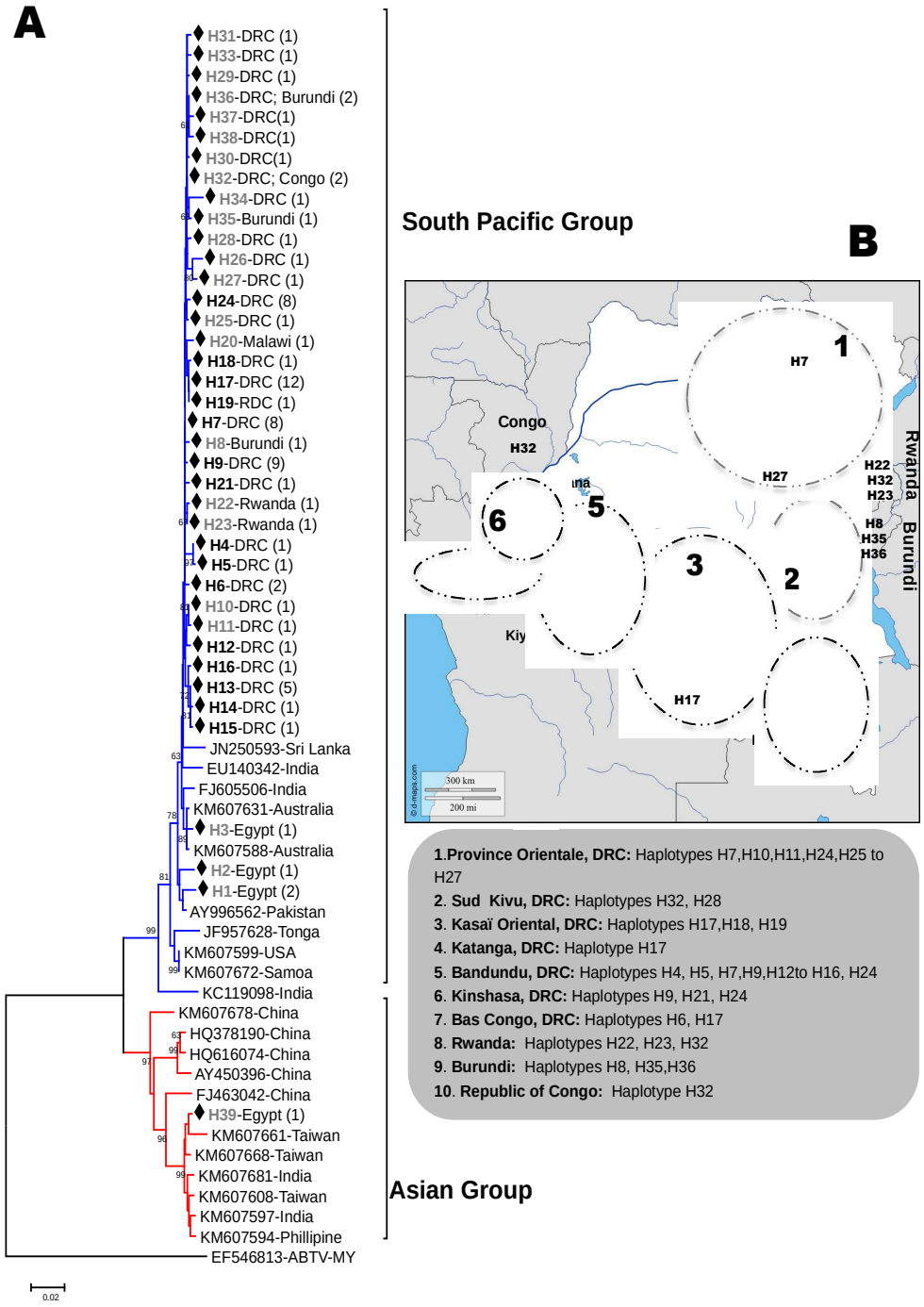

A
H31-DRC (1)
H33-DRC (1)
H29-DRC (1)
H36-DRC; Burundi (2)
H37-DRC(1)
H38-DRC(1)
H30-DRC(1)
H32-DRC; Congo (2)
H34-DRC (1)
H35-Burundi (1)
H28-DRC (1)
H26-DRC (1)
H27-DRC (1)
H24-DRC (8)
H25-DRC (1)
H20-Malawi (1)
H18-DRC (1)
H17-DRC (12)
H19-RDC (1)
H7-DRC (8)
H8-Burundi (1)
H9-DRC (9)
H21-DRC (1)
H22-Rwanda (1)
H23-Rwanda (1)
H4-DRC (1)
H5-DRC (1)
H6-DRC (2)
H10-DRC (1)
H11-DRC (1)
H12-DRC (1)
H16-DRC (1)
H13-DRC (5)
H14-DRC (1)
H15-DRC (1)
JN250593-Sri Lanka
EU140342-India
FJ605506-India
KM607631-Australia
H3-Egypt (1)
KM607588-Australia
H2-Egypt (2)
H1-Egypt (1)
AY996562-Pakistan
JF957628-Tonga
KM607599-USA
KM607672-Samoa
KC119098-India
KM607678-China
HQ378190-China
HQ616074-China
AY450396-China
FJ463042-China
H39-Egypt (1)
KM607661-Taiwan
KM607668-Taiwan
KM607681-India
KM607608-Taiwan
KM607597-India
KM607594-Phillipine
EF546813-ABTV-MY
0.02
South Pacific Group
Asian Group
B
Congo
H32
H7
1
H27
H22
H32
H23
Rwanda
Burundi
H8
H35
H36
6
5
3
2
Kiy
H17
300 km
200 mi
1.Province Orientale, DRC: Haplotypes H7,H10,H11,H24,H25 to H27
2. Sud Kivu, DRC: Haplotypes H32, H28
3. Kasaï Oriental, DRC: Haplotypes H17,H18, H19
4. Katanga, DRC: Haplotype H17
5. Bandundu, DRC: Haplotypes H4, H5, H7,H9,H12to H16, H24
6. Kinshasa, DRC: Haplotypes H9, H21, H24
7. Bas Congo, DRC: Haplotypes H6, H17
8. Rwanda: Haplotypes H22, H23, H32
9. Burundi: Haplotypes H8, H35,H36
10. Republic of Congo: Haplotype H32

Figure 1. Genetic relationships and distribution of the BBTV haplotypes from Democratic Republic of Congo. **(1A)** Phylogenetic relationships of 98 sequences of coding region of BBTV worldwide. Sequences retrieved from GenBank are identifies by their accession numbers and geographic origin. BBTV isolates from Africa are presented with a black diamond. BBTV haplotypes from this study are written in black (**ex.H17**) and BBTV haplotypes from other authors are written in grey (**ex.H26**). The number of closely haplotypes is in brackets after the accession number. The tree was built using the neighbour-joining method. Bootstrap values (1,000 iterations) above 60% are indicated for each node. *Abaca bunchy top virus* was included as an outgroup. Branches in blue represent isolates from the South Pacific Group (SPG) and branches in red represent isolates from the Asian Group (AG). **(1.B)** Map of DRC and the bordering countries showing the distribution of BBTV haplotypes in seven out of 11 provinces and in Rwanda, Burundi and Republic of Congo. Light blue zones on the map represent provinces where BBTV has been reported. Light blue box indicates which BBTV haplotypes were found in each province.

Additionally, evidences of recombination were found in DNA-U3 and DNA-S components of the five BBTV isolates fully sequenced in this study. The five isolates showed recombination in DNA-U3 (the highest probability with SiScan, $p = 2.69 \times 10^{-27}$), while four out of five isolates showed recombination in DNA-S (the highest probability with 3Seq, $p = 1.41 \times 10^{-20}$) (Table 1). For DNA-U3, the potential parental viruses were related to isolates from Taiwan and for DNA-S the potential parental viruses were related to isolates from Sri Lanka and India. Analyses of DNA-R did not reveal any recombination event, likely due to the fact that this component codes for a crucial protein involved in the virus replication and, therefore, some recombination events in this component may have deleterious effect on BBTV. Similar results have been obtained for BBTV isolates from Tonga and Hawaii Islands [21, 25].

Recombination events have been identified as frequent for South Pacific BBTV isolates [3, 21] and were inferred by at least three recombination methods (Table 1).

Table 1. Recombination events detected in DNA components of BBTV isolates from DRC using methods included in the RDP package

Recombinant DNA	Isolates	Geographic region	Recombination breakpoints	Potential major parent	Potential minor parent	p-Value	Detection Methods
DNA-S	Kwg-31	Bandundu	130-1019	BBTV-LK (KM607537)	BBTV-IN (EU589459)	1.41×10^{-20}	B <u>S</u> T
	Mvz-80	Bas-Congo					
	Bmul-77	Kasaï Orientale					
	Lubum-9	Katanga					
DNA-U3	Kwg-31	Bandundu	247-1002	BBTV-TW (KM607814)	BBTV-TW (EU366170)	2.69×10^{27}	R G B M C S <u>T</u>
	Mvz-80	Bas-Congo					
	Bmul-77	Kasaï Orientale					
	Lubum-9	Katanga					
	Mbk-24	Kinshasa					

Recombination method abbreviations: B: BoostScan; C: Chimera; G: GENCOV; M: MaxChi; R: RDP; S: SiScan; T: 3Seq. Methods showing the lowest *P-value* are underlined. Kwg-31: BBTV isolate number 31 from Kwango in Bandundu province, Mvz-80: isolate number 80 form Mvuazi in Bas Congo province, Bmul-77: isolate number 77 from Bakwa-Mulumba in Kasaï Oriental province, Lubum-9: isolate number 9 from Lubumbashi in Katanga province.

Further recombination tests using the full genome of the five BBTV isolates enabled us to assess the reassortment events (i.e., component exchange), for which no evidence was found. Both recombination and reassortment events have been reported for BBTV isolates belonging mainly to the phylogenetic AG [11, 21], which is more diverse than the SPG. Recombination is a driving force in plant virus diversification and has consistently been associated with the emergence of economically important viral strains with variable host ranges and biological properties [26]. The impact of genetic reassortment and recombination in BBTV, however, remains unknown and further research is required. Infectious clones of BBTV have not yet been developed [1]. The use of infectious clones from different isolates of the main phylogenetic groups, SGP and AG, could lead to a better understanding of the role of recombination and reassortment events reported in BBTV isolates worldwide [11, 20, 21].

Overall, this study showed low genetic diversity of BBTV isolates in DRC based on the full-length sequencing of five isolates and the DNA-R of 47 additional isolates. Genetic differences were observed, however, among isolates from north-eastern and south-western DRC when analysing the coding region of the DNA-R of 68 isolates. Our results strengthen the need to implement measures at the sub-regional level, with disease management programs involving quarantine strategies, the production of BBTV-free plantlets and the development of indexing methods.

Acknowledgements

The Belgian Agency of Development (CTB/BTC) funded this research work through a scholarship to LM. The authors are very grateful to Wallonie Bruxelles International (WBI), the BeCA-ILRI-Hub, the technicians in the 1/UMR-BGPI team, Campus International de Baillarguet, Cirad-Montpellier/ France, and Pierre Hellin at ELI/UCL, who contributed to the phylogenetic analysis.

References

1. J. Qazi, *Banana bunchy top virus* and the bunchy top disease. J. Gen. Plant Pathol. **82,** 2–11 (2016)

2. E.P. Rybicki, A top ten list for economically important plant viruses. Arch. Virol. **160**, 17–20 (2015)

3. A. Banerjee, A. Roy, G.T. Behere, S.S. Roy, S.K Dutta, S.V. Ngachan, Identification and characterization of a distinct Banana bunchy top virus isolate of Pacific-Indian Oceans Group from North-East India Virus Res. **183**, 41–49 (2014)

4. M.T. Burns, R.M. Hargind, J.L Dale, The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six DNAss components J. Gen. Virol. **76**, 1471–82 (1995)

5. H.J. Vetten, J.L. Dale, I. Grigoras, B. Gronenborn, R. Harding, J.W. Randles, Y. Sano, J.E. Thomas, T. Timchenko, H.H. Yeh, In: A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz, (eds). 2012. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp 351-373. (Elsevier/Academic Press, Amsterdam, 2012).

6. M.D. Anhalt, R.P. Almeida, Effect of temperature, vector life stage, and plant access period on transmission of banana bunchy top virus to banana. Phytopathology **98**, 743–748 (2008)

7. E.J.E. Buyckx, (ed.), Précis des maladies et des insectes nuisibles rencontrés sur les plantes cultivées au Congo, au Rwanda et au Burundi. (I.N.E.A.C., Leopoldville, 1962), pp 457–459.

8. L.P. Kumar, R. Hanna, O.J. Alabi, M.M. Soko, T.T. Oben, G.H.P. Vangu, R.A. Naidu, Banana bunchy top virus in sub-Saharan Africa : investigations on virus distribution and diversity. Virus Res. **159**, 171–82 (2011)

9. C. Niyongere, T. Losenge, M.E. Ateka, D, Nkezabahizi, G. Blomme, P. Lepoint, Occurrence and distribution of banana bunchy top disease in the Great Lakes Region of Africa. Tree For. Sci. Biotech. **6**, 102–107 (2012)

10. L.F.T. Mukwa, M. Muengula, I Zinga, A. Kalonji, M.L. Iskra-Caruana, C. Bragard, Occurrence and distribution of banana bunchy top virus related agro-ecosystem in south western Democratic Republic of Congo. AJPS **5**, 647–-658 (2014)

11. D. Stainton, D. Martin, B. Muhire, S. Lolohea, M. Halafihi, P. Lepoint, G. Blomme, K.S. Crew, M. Sharman, S. Kraberger, A. Dayaram, M. Walters D.A. Collings, B. Mabvakure, P. Lemey, G. Harkins, J.E. Thomas, A. Varsani, The global distribution of Banana bunchy top virus reveals little evidence for frequent recent, human-mediated long distance dispersal events. Virus Evol. (2015) doi:10.1093/ve/vev009

12. B. Gronenborn, Nanoviruses: genome organisation and protein function. Vet. Microbiol. **98,** 103–109 (2004)

13. R.C. Edgar, MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics **5**, 1–19. (2004)

14. B.M. Muhire, A. Varsani, D.P. Martin, SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PLOS One 9:e108277 (2014)

15. K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. **30**, 2725–2729 (2013)

16. P.S.L. Kosakovsky, S.D. Frost, S.V. Muse, HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. Bioinformatics **21**, 676–679 (2005)

17. P. Librado, J. Rozas, DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics **25**, 1451–1452 (2009)

18. D.P. Martin, B. Murrell, M. Golden, A. Khoosa, B. Muhire, RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evol. (2015) doi: http://dx.doi.org/10.1093/ve/vev003.

19. M. Karan, R.M. Harding, J.L. Dale, Evidence for two groups of *Banana bunchy top virus* isolates. J. Gen. Virol. **75**, 3541–3546 (1994)

20. J.M. Hu, H.C. Fu, C.H. Lin, H.J. Su, H.H. Yeh, Re-assortment and concerted evolution in Banana bunchy top virus genomes. J. Virol. **81**, 1746–1761 (2007)

21. D. Stainton, S. Kraberger, M. Walters, J.E. Wiltshire, K. Rosario, M. Halafihi, S. Lolohea, I. Katoa, H.T. Faitua, W. Aholelei, L. Taufa, J.E. Thomas, D.A. Collings, D.P. Martin, A. Varsani, Evidence of inter-component recombination, intra-component recombination and reassortment in banana bunchy top virus. J. Gen. Virol. **93**, 1103–19 (2012)

22. F.Ngama-Boloy, B.I. Nkosi, J.K. Losimba, C.L. Bungamuzi, H.M. Siwako, F.W. Balowe, J.W. Lohaka, B.D. Djailo, P. Lepoint, C. Sivirihauma, G. Blomme, Assessing incidence, development and distribution of banana bunchy top disease across the main plantain and banana growing regions of the Democratic Republic of Congo. Afr. J. Agric. Res. **9**, 2611–2623 (2014)

23. C.W. Wardlaw, (ed.), Banana Diseases: Including Plantains and Abaca. (Longmans, London) pp 68 – 115.

24. G. Blomme, R. Ploetz, D. Jones, E. De Langhe, N. Price, C. Gold, A. Geereing, A. Viljoen, D. Karamura, M. Pillay, W. Tinzaara, P.Y. Teycheney, P. Lepoint, E. Karamura, I Buddenhagen, A historical overview of the appearance and spread of *Musa* pests and pathogens on the African continent: highlighting the importance of

clean *Musa* planting materials and quarantine measures. Ann. Appl. Biol. **162**, 4–26 (2013)

25. R.P. Almeida, G.M. Bennett, D.M. Anhalt, C.W. Tsai, P. O'Grady, Spread of an introduced vector-borne banana virus in Hawaii. Mol. Ecol. **18**, 136–146 (2009).

26. B.K. Bakelana, Évaluation et dissémination de cultivars améliorés de bananiers dans la province du Bas-Congo, RDC: résultats des activités des trois premières années. MusAfrica **2**, 12–16 (2005).

Supplementary Table 1. List of primers used to amplify DNA components of DRC BBTV isolates

Primer	**Sequences (5'- 3')**	**DNA Component**	**Expected amplicon size (bp)**	**References**
DNA-R_2rdc	AGATGTCCCGATTTAGTGCG -	DNA-R	1068	In this study
DNA-R_2rdc	GATCTCGCCGTTCATTGCTC			
DNA-R-SLF	CGAAGGCGATGAATAGCTG	DNA-R	1065	Selvarajan et al. 2010
DNA-R-LMR	CCTTCGTTTTATTCATCTCTGC-			In this study
DNA-U3-SLF	WWTTAATTCGTAGGACACGTGGACG	DNA-U3	1089	Stainton et al. 2012
DNA-U3 reverse	WWTTAATTCGTGTWKCTTGCTGCGC			
DNA-U3-LMF	AGCATGATTAACAGGTGTTTAGGT	DNA-U3	1073	In this study
DNA-U3-LMR	TGCTTCGCCTATCATTTATTAC			
DNA-S forward	GGTTCCTGAAAAYACCGTC	DNA-S	1080	Stainton et al. 2012
DNA-S reverse	AATATTGAYCCTARMGACGAGYAGTC			
DNA-S-LMF	GCAGGAGTCGCAACAGGGACATCA	DNA-S	1090	In this study
DNA-S-LMR	TTGCGACTCCTGCTTCAAGTTCCC			
DNA-M forward	GAATKGTTTYTGTTYWTYGVAGC	DNA-M	1043	Stainton et al. 2012
DNA-M reverse	RAAGAATAGTTTMACCCGCTC			
DNA-M forward	TARCGATCTAGGGCCGAAGGC	DNA-M	1060	In this study
DNA-M reverse	GGATACCTAATCAGATACCCGT			
DNA-C forward	GCGAATAYYTGAAGAAACCATG	DNA-C	1075	Stainton et al. 2012
DNA-C reverse	TATACGAATRATAGAAGTCTTCAWAYC			
DNA-C forward	TATATTAACCCCTTAAGGGCCG	DNA-C	1018	Selvarajan et al. 2010
DNA-C reverse	GCCCAATCAAATACCCGTACAT			
DNA-N forward	TCAAGACMTGTACYCATGG	DNA-N	1018	Stainton et al. 2012
DNA-N reverse	RTTGTGATTCYGCCCAATCC			
DNA-N-forward	GTATTAGTAACAGCAACAAC	DNA-N	1100	Zhuang Jun and Zhi-Xin, 2005
DNA-N-forward	TAACTTCCATGTCTCTGCTCC			

Selvarajan R., Sheeba M., Balasubramanian V., Rajmohan R., Lakshmi Dhevi N., Sasireka T. Molecular characterization ofgeographically different *Banana bunchy top virus* (BBTV) isolates in India. Indian J Virol. 2011; 21(20):110–6.

Stainton D., Kraberger S., Walters M., Wiltshire J.E., Rosario K., Halafihi M., Lolohea S., Katoa I., Faitua H.T., Aholelei W., Taufa L., Thomas J.E., Collings D.A., Martin P.D. & Varsani A., 2012. Evidence of inter-component recombination, intra-component recombination and reassortment in *Banana bunchy top virus*. Journal of General Virology 93, 1103-19.

Zhuang Juna T.E., Zhi-Xina L. (2005) Cloning and sequencing of DNA components of *Banana bunchy top virus* Hainan isolate. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology 2(2) 91-97.

Supplementary Table2. Geographic distribution and hosts of BBTV isolates collected in Democratic Republic of Congo during 2011-2012

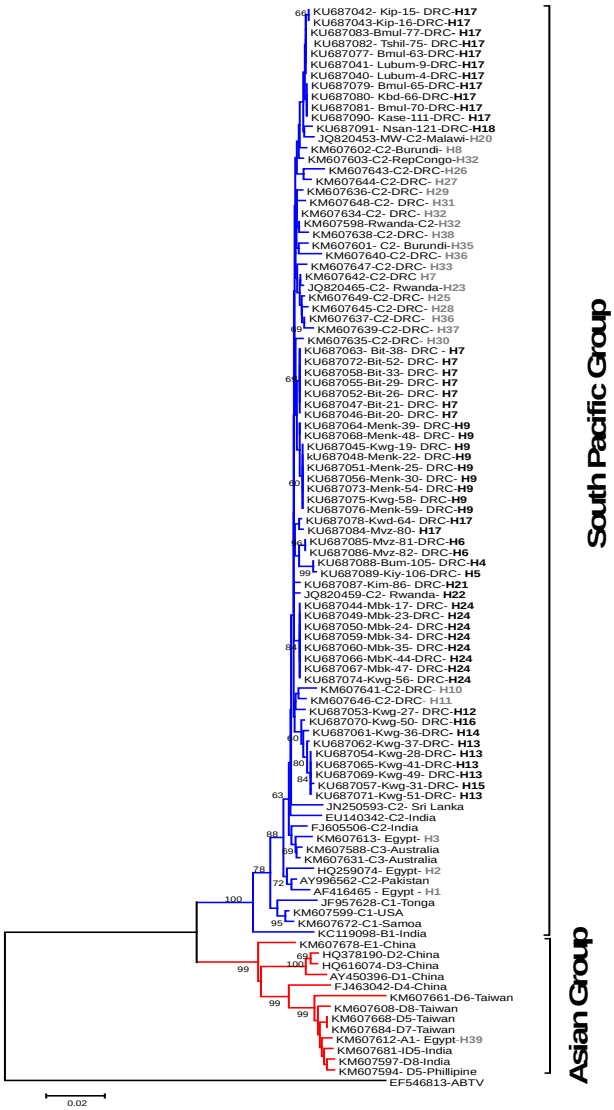
Country/ Province	**Ecosystem**	**Locality**	**Host**	**Isolate name**	**Year**	**Hap (H)**	**DNA accession nr**
Bandundu/DRC	Residual forest	Kwango2	Plantain	Kwg-19	2012	H9	DNA-R (KU687045)
Bandundu/DRC	Savanna	Bita	Banana	Bit-20	2012	H7	DNA-R (KU687046)
Bandundu/DRC	Savanna	Bita	Banana	Bit-21	2012	H7	DNA-R (KU687047)
Bandundu/DRC	Savanna	Menkao centre	Banana	Menk-22	2012	H9	DNA-R (KU687048)
Bandundu/DRC	Savanna	Menkao centre	Banana	Menk-25	2012	H9	DNA-R (KU687051)
Bandundu/DRC	Savanna	Bita	Banana	Bit-26	2012	H7	DNA-R (KU687052)
Bandundu/DRC	Residual forest	Kwango	Banana	Kwg-27	2012	H12	DNA-R (KU687053)
Bandundu/DRC	Residual forest	Kwango	Banana	Kwg-28	2012	H13	DNA-R (KU687054)
Bandundu/DRC	Savanna	Bita	Plantain	Bit-29	2012	H7	DNA-R (KU687055)
Bandundu/DRC	Savanna	Menkao Centre	Plantain	Menk-30	2012	H9	DNA-R (KU687056)
Bandundu/DRC	Savanna	Kwango	Plantain	Kwg-31	2012	H15	DNA-R (KU687057), DNA-S (KU759881), DNA-U3 (KU759870), DNA-N (KU759884), DNA-M (KU759882), DNA-C (KU759883)
Bandundu/DRC	Savanna	Bita	Banana	Bit-33	2012	H7	DNA-R (KU687058)
Bandundu/DRC	Savanna	Kwango	Banana	Kwg-36	2012	H14	DNA-R (KU687061)
Bandundu/DRC	Forest	Kwango	Plantain	Kwg-37	2012	H13	DNA-R (KU687062)
Bandundu/DRC	Savanna	Bita	Banana	Bit-38	2012	H7	DNA-R (KU687063)
Bandundu/DRC	Savanna	Menkao centre	Banana	Menk-39	2012	H9	DNA-R (KU687064)
Bandundu/DRC	Savanna	Kwango	Banana	Kwg-41	2012	H13	DNA-R (KU687065)
Bandundu/DRC	Savanna	Menkao centre	Plantain	Menk-48	2012	H9	DNA-R (KU687068)

Bandundu/DRC	Savanna	Kwango	Plantain	Kwg-49	2012	H13	DNA-R (KU687069)
Bandundu/DRC	Savanna	Kwango	Plantain	Kwg-50	2012	H16	DNA-R (KU687070)
Bandundu/DRC	Savanna	Kwango	Banana	Kwg-51	2012	H13	DNA-R (KU687071)
Bandundu/DRC	Savanna	Bita8	Banana	Bit-52	2012	H7	DNA-R (KU687072)
Bandundu/DRC	Savanna	Menkao centre5	Plantain	Menk-54	2012	H9	DNA-R (KU687073)
Bandundu/DRC	Savanna	Kwango15	Banana	Kwg-56	2012	H24	DNA-R (KU687074)
Bandundu/DRC	Savanna	Kwango	Banana	Kwg-58	2012	H9	DNA-R (KU687075)
Bandundu/DRC	Savanna	Menkao centre	Banana	Menk-59	2012	H9	DNA-R (KU687076)
Bandundu/DRC	Savanna	Bumba bar	Banana	Bum-105	2011	H4	DNA-R (KU687088)
Bandundu/DRC	Forest	Kiyaka II	Banana	Kiy-106	2011	H5	DNA-R (KU687089)
Bas Congo/DRC	Forest	Inera M'Vuazi	Plantain	Mvz-80	2012	H17	DNA-R (KU687084), DNA-S (KU759889), DNA-U3 (KU759872), DNA-N (KU759892), DNA-M (KU759890), DNA-C (KU759891)
Bas Congo/DRC	Forest	Inera M'Vuazi	Plantain	Mvz-81	2012	H6	DNA-R (KU687085)
Bas Congo/DRC	Forest	Inera M'Vuazi	Plantain	Mvz-82	2012	H6	DNA-R (KU687086)
Kasaï oriental/DRC	Forest	Bakwa mulumba	Plantain	Bmul-63	2012	H17	DNA-R (KU687077)
Kasaï oriental /DRC	Forest	Kwadi	Plantain	Kwd-64	2012	H17	DNA-R (KU687078)
Kasaï oriental/DRC	Forest	Bakwa Mulumba	Plantain	Bmul-65	2012	H17	DNA-R(KU687079)
Kasaï oriental/DRC	Forest	Kabanda	Banana	Kbd-66	2012	H17	DNA-R (KU687080)
Kasaï oriental/DRC	Forest	Bakwa mulumba	Plantain	Bmul-70	2012	H17	DNA-R (KU687081)
Kasaï oriental/DRC	Forest	Tshilenge	Plantain	Tshil-75	2012	H17	DNA-R (KU687082)

Kasaï oriental/DRC	Forest	Bakwa Mulumba	Plantain	Bmul-77	2012	H17	DNA-R (KU687083), DNA-S (KU759885), DNA-U3 (KU759871), DNA-N (KU759888), DNA-M (KU759886), DNA-C (KU759887)
Kasaï Oriental/DRC	Forest	Kaseki	Plantain	Kase-111	2011	H17	DNA-R (KU687090)
Kasaï Oriental/DRC	Forest	Nsana shabane	Banana	Nsan-121	2011	H18	DNA-R (KU687091)
Katanga/DRC	Savanna	Lubumbashi Centre	Banana	Lubum-4	2012	H17	DNA-R (KU687040)
Katanga/DRC	Savanna	Lubumbashi Centre	Banana	Lubum-9	2012	H17	DNA-R (KU687041), DNA-S (KU759873), DNA-U3 (KU759868), DNA-N (KU759876), DNA-M (KU759874), DNA-C (KU759875)
Katanga/DRC	Savanna	Kipushi	Banana	Kip-15	2012	H17	DNA-R (KU687042)
Katanga/DRC	Savanna	Kipushi	Banana	Kip-16	2012	H17	DNA-R (KU687043)
Kinshasa/DRC	Savanna	Mbankana	Banana	Mbk-17	2012	H24	DNA-R (KU687044)
Kinshasa/DRC	Savanna	Mbankana	Banana	Mbk-23	2012	H24	DNA-R (KU687049)
Kinshasa/DRC	Savanna	Mbankana	Banana	Mbk-24	2012	H24	DNA-R (KU687050), DNA-S (KU759877), DNA-U3 (KU759869), DNA-N (KU759880), DNA-M (KU759878), DNA-C (KU759879)
Kinshasa/DRC	Savanna	Mbankana	Banana	Mbk-44	2012	H24	DNA-R(KU687066)
Kinshasa/DRC	Savanna	Mbankana	Banana	Mbk-47	2012	H24	DNA-R (KU687067)
Kinshasa/DRC	Savanna	Mbankana	Banana	Mbk-34	2012	H24	DNA-R (KU687059)
Kinshasa /DRC	Savanna	Mbankana	Banana	Mbk-35	2012	H24	DNA-R (KU687060)
Kinshasa /DRC	Savanna	Kimwenza	Banana	Kim-86	2012	H21	DNA-R (KU687087)
South Kivu/DRC	-	Kamanyola	Yangambi Km5	BU1	2012	H32	KM607634
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	Libanga Liaboel.	BU10	2012	H30	KM607635
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	FHIA 03	B11	2012	H29	KM607636
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	Libanga Likale	B12	2012	H36	KM607637
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	Yangambi	B13	2012	H38	KM607638

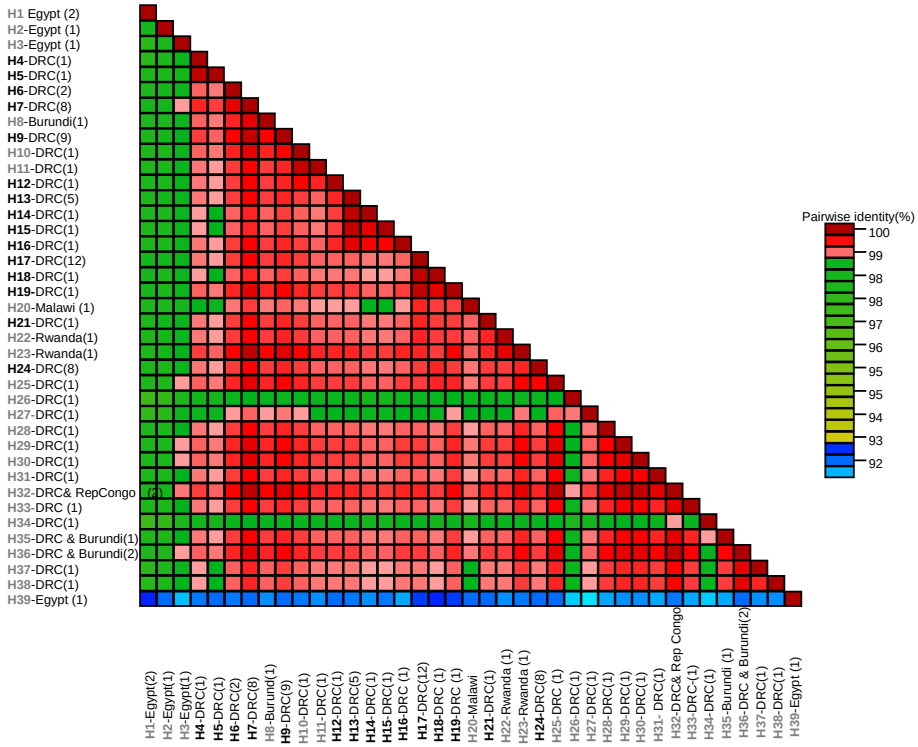
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	Km5 Yangambi Km5	B14	2012	H37	KM607639
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	Libanga Likale	B15	2012	H36	KM607640
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	Pisang awake	B16	2012	H10	KM607641
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	Gros Michel	BU17	2012	H7	KM607642
P/Orientale/DRC	-	Kabondo	Gros Michel cv.	BU18	2012	H26	KM607643
P/Orientale/DRC	-	Kabondo	Bisamonyo	BU19	2012	H27	KM607644
South Kivu/DRC	-	Kamanyola	Yangambi Km5	BU2	2012	H28	KM607645
P/Orientale/DRC	-	Kisangani	Libanga Likale	BU20	2012	H11	KM607646
P/Orientale/DRC	-	Yangambi	Yangambi Km5	BU6	2012	H33	KM607647
P/Orientale/DRC	-	Yangambi	Libanga Likale	BU7	2012	H31	KM607648
P/Orientale/DRC	-	Yangambi	-	BU9	2012	H25	KM607649
Rwanda	-	-	-	Rwanda 138	2009	H22	JQ820459
Rwanda	-	-	-	Rwanda 142	2009	H23	JQ820465
Egypt	-	-	-	Kalubia	1997	H1	AF102780
Egypt	-	-	-	-	-	H1	AF416465
Malawi	-	-	-	Malawi73	2008	H20	JQ820453
Burundi	-	-	-	R-548-BI	1995	H36	KM607601
Burundi	-	-	-	R-549-BI	1995	H8	KM607602
Egypt	-	-	-	9-150510	2010	H3	KM607613
Egypt	-	-	-	HQ259074	2008	H1	HQ259074
Republic of Congo	-	-	-	-550	-1995	H32	KM607603
Egypt-	-	-	-	KM607612	-	H39	KM607612

Supplementary Figure 1.



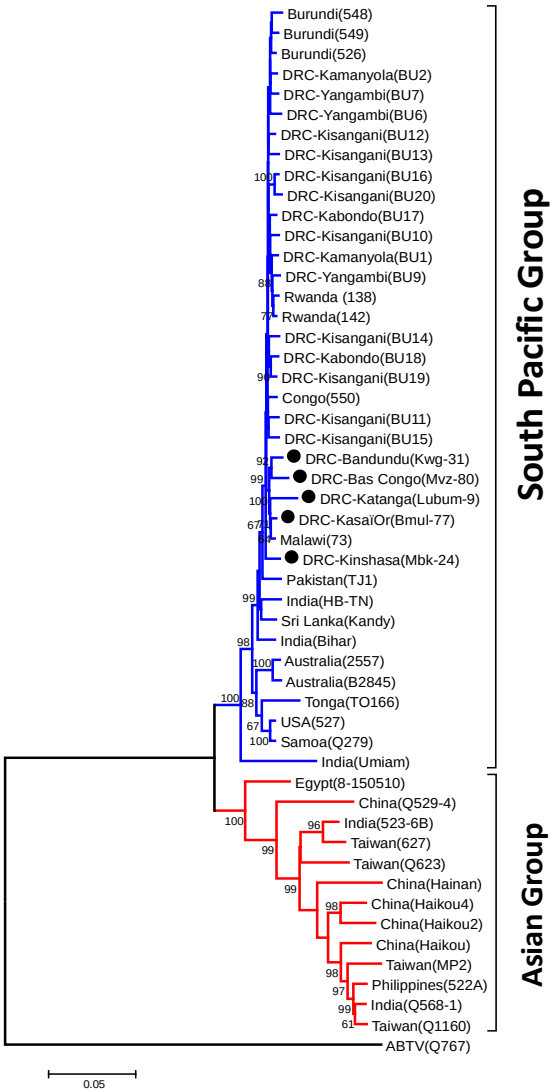
Supplementary Figure 1. Phylogenetic relationships of 98 complete DNA-R sequences of BBTV worldwide. Sequences retrieved from GenBank are identified by their geographic origin; accession numbers are in brackets. The tree was built using the neighbour-joining method. Bootstrap values (1,000 iterations) above 60% are indicated for each node. *Abaca bunchy top virus* was included as an outgroup. Branches in blue represent isolates from the South Pacific Group (SPG) and branches in red represent isolates from the Asian Group (AG). Isolates with black circle were sequenced in this study.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Graphical representation of pairwise nucleotide sequence analysis of haplotypes based on the coding region from DNA-R of African BBTV isolates. The color scale bar indicates the percentage of nucleotide identity of haplotypes. To each haplotype the geographical origin was added.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3. Phylogenetic relationships of 51 fully sequenced genomes of BBTV worldwide. Sequences are identified by their geographic origin and isolate names in brackets. The phylogenetic tree was built using the neighbour-joining method. Bootstrap values (1,000 iterations) above 60% are indicated for each node. *Abaca bunchy top virus* was included as an outgroup. Branches in blue represent isolates from South Pacific Group (SPG) and branches in red represent isolates from the Asian Group (AG). Isolates with black circles were sequenced in this study.

Partie D: Discussion générale, conclusion et perspectives

CHAPITRE 7

Discussion générale

Les virus constituent une contrainte majeure pour la production et l'amélioration du bananier et plantain dans le monde (Thomas et al. 1994, Pennazio et al. 1996, Rybicki 2015). En République démocratique du Congo (RDC), l'unique virus du bananier rapporté en 1950, dans la région de Yangambi, est le *Banana bunchy top virus* (Buyckx 1962). La situation sécuritaire du pays couplée à l'absence structurelle d'un service de diagnostic n'ont pas facilité leurs études, malgré l'importance de la banane sur le plan alimentaire et la priorité que constitue cette plante pour la RDC.

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer si, au-delà du BBTV, d'autres virus impactent la culture du bananier et plantain en RDC. A cette fin, une démarche d'enquêtes expérimentales, combinant une approche de terrain et des analyses en laboratoire pour identifier les principaux virus connus sur le bananier a été développée. Plus spécifiquement, l'objectif était de déterminer via une première approche simple, compte tenu de l'étendue du territoire congolais à appréhender, les virus existants ou émergents, de proposer une première évaluation de leur prévalence, de préciser leur distribution, et d'analyser leur variabilité génétique pour pouvoir initier une analyse sur le plan épidémiologique.

Nos travaux se sont focalisés sur le *Banana bunchy top virus* (BBTV), le complexe de Banana streak virus responsables de la mosaïque en tirets (BSV), le *Cucumber mosaic virus* (CMV) et le *Banana bract mosaic virus* (BBrMV). Ces virus jouent un rôle important au plan économique suite (i) aux pertes de rendement qu'ils occasionnent (Table 4) (Jones 2000) et (ii) aux difficultés de déploiement des stratégies de lutte (Tushemereirwe and Bagabe, 1999, Lokosous et al. 2012, Lockhart 2000, Aka et al. 2009, Cherian et al. 2002).

Table 4. Estimation des pertes de production occasionnées par les virus du bananier

Virus	**Sigle**	**Genre**	**Année et lieu**	**Perte de production estimée et Réference**
Banana bunchy top virus	BBTV	*Babuvirus*	Fidji, 1889	Première détection (1)
			Australie, 1920	90% de la surface de production (2)
			S.Queensland 1922-1925	Nbre de plantation réduit de100 à 4 (3)
			Tamil Nadu, 1980	Réduction de–18000 ha à 2000 ha (4)
			Pakistan, Sindh, 1990	55% de réduction (5)
			1999	50-100% (6)
			India 2007-2010	Perte annuelle estimée à 50 million US$ (7)
			Malawi 2009	50-95% de réduction de la production (8)
Banana streak viruses	BSV			
(1) *Banana streak GF virus*	BSGFV			
(2) *Banana streak OL virus*	BSOLV	*Badnavirus*	1999	40-60% (9)
(3) *Banana streak IM virus*	BSIMV			
(4) *Banana streak MY virus*	BSMYV			
Cucumber mosaic virus	CMV	*Cucumovirus*	2009	5-25% (10)
Banana bract mosaic virus	BBrMV	*Potyvirus*		30-70% (11)

(1) Darnell-Smith 1924, (2) Fish, 1970, (3) Dale et al. 1987, (4) Kesavamoorthy 1980, (5) Jones 1994, (6) Tushemereirwe and Bagabe 1999, Lokosou 2012, (7) Selvarajan & Balasubramanian, (8) Soko et al. 2009, (9) Lockart 2000, (10) Aka et al. 2009 ; (11) Cherian et al. 2002,

Pour appréhender la diversité des virus présents et proposer une première estimation réaliste, nous avons choisi de travailler de manière complémentaire à d'autres études déjà réalisées sur le BBTV au Nord-Est de la RDC (Ngama-Boloy et al. 2014). L'étude des virus non rapportés en RDC a été réalisée de manière plus systématique sur la province du Bas Congo.

Les différents virus ont été détectés en utilisant des approches PCR adaptées aux caractéristiques génomiques de chaque virus. La détection du BBTV a été réalisée en utilisant la PCR directe avec des amorces ciblant des parties spécifiques de son génome (Mansoor et al. 2005). Les différentes espèces de BSV ont été recherchées en

utilisant la technique d'IC-PCR/DNase qui permet de mettre en évidence, uniquement, les particules épisomales responsables de l'expression des symptômes (Le Provost et al. 2006, Chabannes et al. 2013). La détection de CMV et celle de BBrMV a été réalisée séparément par IC-One-step RT-PCR, en utilisant les amorces spécifiques à chacun des virus (Iskra-Caruana et al. 2008).

La situation pour chaque virus détecté est ainsi présentée, discutée et mise en perspective quant à ses conséquences en matière de stratégie globale de protection de la culture du bananier. La détection d'infections mixtes et leurs conséquences sont aussi abordées.

7.1. *Banana bunchy top virus* (BBTV)

Les symptômes de BBTV ont été systématiquement associés à sa détection dans les échantillons collectés. De plus, le virus a été identifié sur des échantillons asymptomatiques. La prévalence et la distribution du *Banana bunchy top virus*, (Mukwa et al. 2014) révèlent que le BBTV est le virus du bananier (*Musa* spp) le plus répandu dans les zones sud ouest du pays, avec une fréquence estimée à 44,4%. Le BBTV est largement présent au Bas Congo, Bandundu, Kasaï Oriental et à Kinshasa urbain périurbain et Katanga, dans des conditions agro-environnementales très diversifiées (savane, forêt, moyennes et basses altitudes). L'analyse de la fréquence du BBTV indique des valeurs plus élevées au Bas Congo, situées entre 17,5% (soit 38 cas positifs sur 216 plantes analysées) en 2014 (Mukwa et al. 2014) à 26% (117/450) en 2016 (Mukwa et al. 2016). La fréquence de BBTV est, par contre, moyenne dans les provinces du Bandundu, de Kasaï Oriental, est intermédiaire à Kinshasa urbain & péri-urbain, tandis qu'elle est faible dans la province du Katanga. Ces différentes fréquences montrent l'ampleur de la contrainte que constitue le BBTV, pour la production de la banane dans cette zone d'étude. Ces résultats se rapprochent de ceux de Kumar (2011) dans la région d'Afrique sub-Saharienne (SSA), ceux de Ngama-Boloy (2014) dans la partie Nord-Est de la RDC et ceux de Niyongere (2012), dans la région des grands lacs d'Afrique. En considérant les différents systèmes culturaux du bananier, notamment (i) les plantations autour des cases, (ii) en association avec les

cultures vivrières, (iii) en association avec les cultures maraîchères, (iv) les plantations de savane et de forêt, la fréquence du virus s'est révélée variable. Cette variabilité peut être expliquée par l'influence que peut avoir l'agrosystème sur le complexe virus-vecteur-plante hôte (Hooper et al. 2005). En effet, Niyongere (2013) a démontré que certains environnements notamment les régions de hautes altitudes sont peu favorables à la progression des populations de pucerons, ou représentent des barrières naturelles avant que les pucerons ne rencontrent de nouveau un bananier, seul hôte de cette espèce. Le résultat de la fréquence de BBTV rapportés au chapitre 4 de cette étude a révélé une fréquence d'environ 9,3% dans les stations de recherche et champs expérimentaux (soit 20/216) par rapport à l'ensemble de l'échantillon.

En première analyse, nos résultats semblent indiquer que la dispersion du BBTV à l'échelle parcellaire est principalement assurée par *Pentalonia nigronervosa* et que la dispersion à grande distance est assurée par l'usage de matériel de plantation infecté. En analysant par exemple, la situation de BBTV dans les sites enquêtés au Bas Congo (Figure 18), sur 50 sites enquêtés, 11 sur 50 sites enregistrent une fréquence de 0 échantillons infectés. La majorité des sites enquêtés enregistrent au moins 1 à 8 échantillons infectés sur les 9 collectés ; soit (1=13 sites, 2= 9 sites, …).

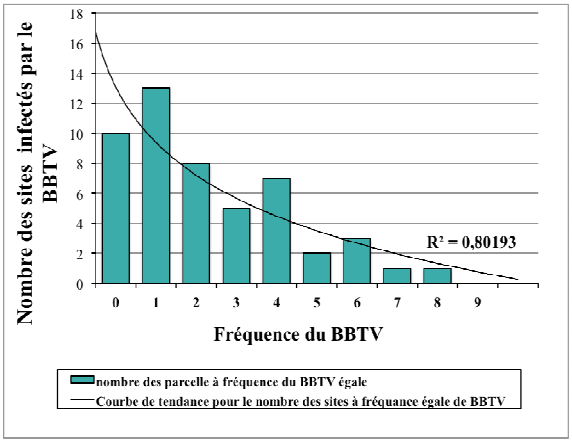


Figure 18. Nombre d'échantillons positifs au BBTV sur 9 échantillons collectés par site**.** Chaque barre d'histogramme indique le nombre de sites qui ont une fréquence égale de BBTV (1 à 9). Au total, 50 sites situés dans la province du Bas Congo, dont 10 sites ayant 0 échantillon positif et aucun site avec une fréquence absolue de BBTV.

Les enquêtes réalisées dans les cinq provinces étudiées, ont montré que : dans 100% des cas, le matériel de plantation (essentiellement les rejets de bananier) provient de cultures antérieures et n'est par conséquent pas certifié/garanti sans virus. En plus, le transport routier constitue le moyen de déplacement par excellence, dans la zone d'étude. Ainsi, l'état délabré de certains axes routiers a sans doute remarquablement ralenti l'expansion du BBTV ; par exemple, l'axe Kinshasa - Kikwit, dans la province du Bandundu, qui était en mauvais état de 1992 à 2008, a ainsi maintenu cette province, isolée (Minagri 2012). Ceci pourrait expliquer la faible fréquence du BBTV dans la province du Bandundu, en comparaison au Kasaï Oriental, au Bas Congo et à Kinshasa urbain et péri-urbain. Cette barrière physique a joué un important rôle en freinant l'expansion de la maladie de bunchy top. Ces résultats sont aussi confirmés par l'analyse des haplotypes (chapitre 6), qui montrent une distribution des différents variants singulièrement liée aux différentes provinces étudiées, corroborant ainsi cette analyse. Il serait intéressant d'affiner les questions liées à la contribution effective du puceron vecteur pour la transmission du bananier relativement à la transmission par voie végétative, pour mieux comprendre comment contrôler la virose. Parmi ces questions, celle de la vitesse de ré-infestation d'une parcelle de bananiers « sains » dans un environnement de forte pression virale, comme au Bas-Congo, garde tout son sens. La figure 18 indique clairement un rôle pour la dispersion via le vecteur au sein de certaines parcelles, à mettre en relation avec la durée de vie des bananiers au sein de l'exploitation.

La caractérisation moléculaire des isolats BBTV, basée sur les séquences complètes d'ADN-R de 52 isolats et le génome complet de cinq isolats collectés dans chaque province étudiée révèlent que la diversité nucléotidiques inter-isolats de *Banana bunchy top virus* rassemblés dans les différents clusters varie entre 0 et 2% et que l'identité est de 98,8%. Dès lors, il est difficile d'inférer la dispersion de différentes souches d'origine différente, mais plutôt la diffusion d'une seule et même souche originale, dont les faibles variations des caractéristiques génétiques sont faiblement liées aux conditions agro-environnementales auxquelles est associé l'isolat. L'augmentation rapportée des symptômes du BBTV ainsi que les prévalences élevées

mesurées indiquent que le BBTV serait en phase de dispersion et que la RDC servirait de foyer primaire de dispersion, au départ d'une introduction vieille de plusieurs dizaines d'années. Les régions frontalières de la RDC sont des zones de forts échanges entre les agriculteurs des pays frontaliers et les agriculteurs congolais (exemple entre le Rwanda, Burundi et le Kivu).

Le programme fruits et légumes de la station de recherche de M'Vuazi (INERA) a réalisé de multiples introductions de variétés améliorées, résistantes à la maladie des raies noires (MRN) obtenues de la *Fundacion Hondurena* de *Investigaciôn Agricola* et de l'Afrique du Sud, entre 1990 et 2002 (Bakelana 2005). Ces variétés ont été distribuées chez les agriculteurs de 14 sites (Kinzaunvuete, Sekebanza, Boma, Lemba, Lukula, Tshela, Kasangulu, Sonabata, Madimba, Kisantu, Nkiende, Kimpese, Mbanza-Ngungu, Zumba), dont certains enquêtés dans le cadre de cette thèse (Kinzauvuete, Boma, Lukula, Tshela, Kasangulu, Kisantu, Mbanza Ngungu). Cependant, les informations sur la sensibilité ou la résistance de ces variétés au BBTV n'ont pas été révélées. Etant donné qu'aucune source de résistance contre le BBTV n'a été identifiée à ce jour (Kumar et al. 2014), l'introduction de ces variétés améliorées au Bas Congo conduit à formuler deux hypothèses différentes et peut-être complémentaires : (i) soit ces variétés sont fortement sensibles au BBTV, soit (ii) certaines d'entre elles étaient préalablement infectées avant leur arrivée au Bas Congo.

Les résultats de l'analyse de la diversité génétique des isolats BBTV collectés dans cinq provinces du sud ouest de la RDC, ont montré une très faible diversité génétique inter-isolats, preuve de l'existence d'une souche virale unique qui se disperserait dans tout le pays et peut être dans les autres pays de l'Afrique sub-Saharienne. Il semble plus plausible qu'un pathogène à haute virulence, dans une population de bananiers sensibles se disperse plus rapidement dans un laps de temps plus court (Sastry et al. 2014). Ces résultats expliqueraient, dans une large mesure, l'explosion actuelle de la maladie de bunchy top ainsi que le rapprochement génétique des isolats BBTV collectés, dans cette étude, au Bas Congo, Bandundu, Katanga, Kasaï Oriental et

Kinshasa periurbain, et ceux collectés à Yangambi, Kisangani (Stainton et al. 2015) en RDC, au Cameroun, au Malawi, au Gabon et au Rwanda (GenBank).

L'analyse des haplotypes basée sur la séquence complète de l'ADN-R de 52 isolats BBTV révèle des variants disséminés à travers tout le pays (chapitre sixième). La province Orientale rassemble à elle seule 13 haplotypes différents sur les 30 identifiés. Cette situation est expliquée en partie, par la primo introduction du BBTV dans une localité de cette province en 1950, la multiplicité des systèmes culturaux ainsi que la très grande diversité génétique des cultivars de bananiers présents dans cette région (Dhed'a et al. 2011). La province Orientale servirait donc de centre de « diversité » consécutif à la primo-introduction de 1950, suivie par une évolution très lente, mais progressive liée à cette diversité, ainsi que des dispersions ultérieures vers d'autres provinces.

7.2. Banana streak viruses (BSV)

Les enquêtes épidémiologiques réalisées pour la mise en évidence des virus émergents notamment le BSV, le CMV et le BBrMV ont été concentrées sur une zone réduite de la partie sud ouest du Congo : la province du Bas Congo. Ce choix s'est appuyé sur le constat de Vancutsem (2006) qui a montré que la plupart des études cartographiques réalisées en RDC présentent des faiblesses liées à la précision de l'information. Ainsi, sur une petite zone qui est la province du Bas Congo, un nombre plus élevé d'échantillons a été collecté et analysé.

Durant ces travaux, des symptômes de BSV clairement exprimés sur le bananier ont été observés en conditions naturelles, surtout sur les bananiers situés en zone de forêt (vers Tshela, Vuangu, Lukula, dans le Bas Fleuve…). En comparant la symptomatologie du BSV décrit dans la littérature et rassemblé dans le guide d'identification des maladies du bananier en RDC publié au cours de cette thèse, les symptômes ont été similaires. Des stries chlorotiques de petites tailles sur l'avant-dernière feuille déployée évoluant en nécrose, l'éclatement du collet de pseudo-tronc, la chute prématurée des régimes, le dépérissement de la feuille cigare ont été observés. Ces symptômes correspondent exactement à ceux décrits par Lockhart (1995). Il est

bien connu que le BSV ne cause pas des symptômes aussi spectaculaires que le BBTV et que ces symptômes peuvent disparaître tandis que le virus reste présent. Mais au cours des enquêtes, un bon nombre d'agriculteurs ont exprimé une inquiétude quant à la perte de production à laquelle ils font face, dus en majeure partie due à la chute de régime avant maturité et au dépérissement du pseudo-tronc.

A partir des plantes symptomatiques et asymptomatiques collectées, les espèces BSV (*Banana streak GF virus, Banana streak OL virus, Banana streak IM virus, Banana streak MY virus*) ont été détectées par IC-PRC/DNase au cours de réactions séparées. Ceci a permis la mise en évidence pour la première fois en RDC d'infection par le BSV, espèces BSGFV, BSOLV, BSIMV et BSMYV.

La distribution des espèces BSV présentées dans le chapitre cinq « Banana streak viruses and *Cucumber mosaic virus* affect banana (*Musa* spp) in addition to *Banana bunchy top virus* in Bas Congo, RDC », ainsi que l'évaluation de leur prévalence indiquent que le BSV constitue le second virus le plus important sur la culture de bananier au Bas Congo. En considérant les quatre principales espèces : BSGFV, BSOLV, BSIMV, BSMYV, la fréquence a été estimée à 20% pour la seule province du Bas Congo. Considérant chaque espèce séparément, l'espèce BSV la plus fréquente est BSGFV (68%), puis BSOLV (25,5%), suivi de BSIMV et BSMYV (3,3%). Il y a lieu de noter aussi que, des infections mixtes inédites ont aussi été observées entre BSOLV et BSGFV et leur fréquence est évaluée à 3,2%. Les travaux de Javer-Higginson (2014) ont montré auparavant des cas d'infection mixte entre l'espèce BSGFV-BSIMV et entre BSIMV et BSMYV.

De manière intéressante, les résultats ont révélé qu'aussi bien les bananiers à génome (AA, AAA= *Musa acuminata*) et les hybrides interspécifiques qui sont des bananiers contenant au moins un allèle B dans leur génome (AB, AAB= hybrides interspécifiques), sont porteurs des espèces BSV. Dans l'état actuel des connaissances, le BSV est un virus intégré au génome du bananier contenant l'allèle B, qui ne peut restituer une infection que lorsque le bananier est soumis à des conditions de stress (Température, humidité, eau, culture *in vitro*, …) (Hughes 1997). La zone dans laquelle l'étude a été menée est une partie du bassin du Congo qui, en soit, est un

centre de diversification secondaire du plantain, où prévaut une diminution de la température, des précipitations au cours du mois de mai - juin, et une augmentation de octobre–novembre (Minplan 2005, Mobambo et al. 2010). Les enquêtes épidémiologiques ont été réalisées pendant la période comprise entre mai–juin. Ainsi, l'expression des symptômes et des infections de BSV observées serait probablement provoquée par cette variation des conditions climatiques, notamment, la température et la précipitation. Les travaux de Dahal (1997b) montrent que le stress hydrique ainsi que les basses températures seraient à l'origine de l'expression avancée des symptômes de BSV (Dahal et al. 1997b, Hughes et al. 1997).

Il n'était pas rare de remarquer la présence de cochenilles vectrices, au niveau des collets et des régimes des bananiers asymptomatiques. Les cochenilles vectrices, ont été observées sur 49,3% des plantes asymptomatiques collectées. Mais il a été difficile de démontrer avec précision l'importance de l'action du vecteur (vecteur virulifère ou pas) et son implication dans la dispersion de la maladie. Dans cette région où les agriculteurs échangent et utilisent les rejets de bananier non certifiés, rejets obtenus majoritairement des cultures précédentes, cette pratique constitue le moyen de transmission privilégié. Le même constat a été réalisé au Nigeria par Dahal (1997). Mieux comprendre la contribution des cochenilles à la dispersion intra- et inter-parcellaire reste un enjeu tout aussi important.

En ce qui concerne l'origine du BSV détecté, les allèles infectieux eBSGFV-7 et eBSOLV-1 connus pour leur implication dans l'expression du virus ont été recherchés dans tous les échantillons. Une attention particulière a été portée aux hybrides interspécifiques collectés et révélés positifs au BSV, puisque qu'ils renferment, naturellement, l'entièreté du génome viral. De l'analyse, il ressort que le BSV détecté proviendrait des intégrations (eBSV). Il semble évident que le BSV présent dans la zone d'étude provient de l'activation des séquences endogènes (eBSV) naturellement présent chez les bananiers à allèle B, suite à la variation des conditions climatiques, et relayé par une transmission par les cochenilles vectrices au départ des hybrides interspécifiques (bananier à génotype B) vers le bananier à génotype A. La

transmission de BSV de bananier à génome A vers le bananier à génome A et/ou B, a été assuré tour à tour par la cochenille et les multiples échanges de rejets infectés.

Si le caractère endémique des BSV au Bas Congo est indiscutable, l'analyse du nombre de plantes à génome A infectées par BSGFV et BSOLV montre que 23 sites présentent de 1 à 4 échantillons infectés par le BSGFV (Figure 19 A &B) et 14 sites présentent 1 à 2 échantillons infectés par BSOLV (Figure 19 C&D). Ceci révèle le caractère pré-épidémique, voire épidémique du BSGFV et du BSOLV dans la province du Bas Congo. Ces résultats complètent ainsi la liste des pays infectés par le complexe viral, Banana streak virus.

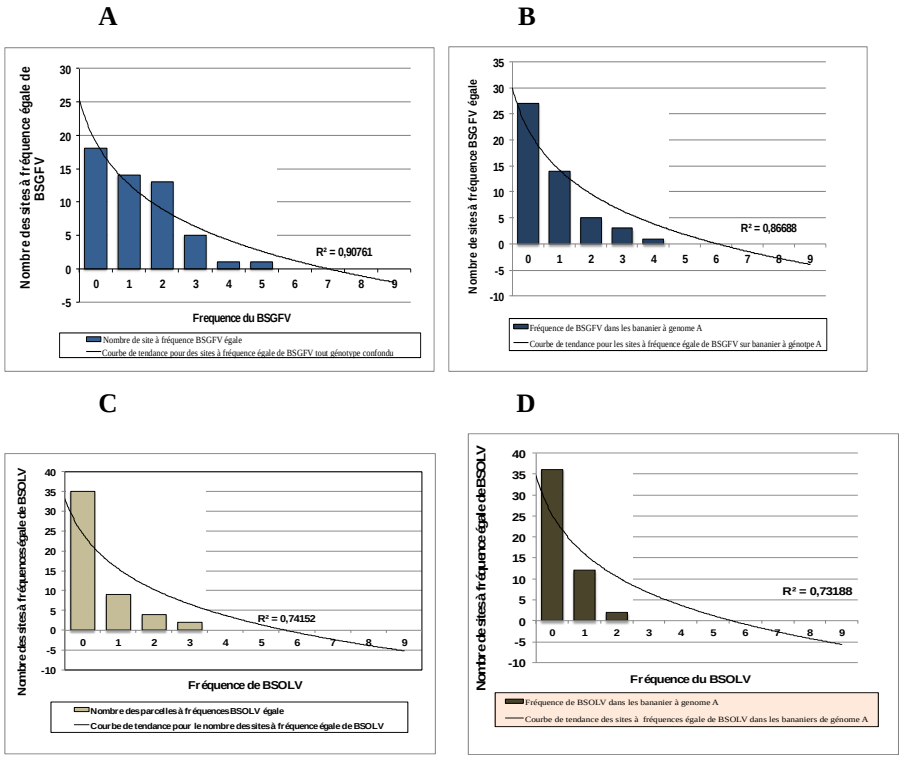


Figure 19. Nombre moyen des sites à fréquence égale de BSGFV ou BSOLV, sur le nombre total de 50 sites enquêtés pour le BSV**.** Sur l'axe des abscisses est présenté le nombre d'échantillons positifs au BSGFV ou BSOLV par rapport à 9 échantillons collectés dans chaque site (A). Nombre des sites ayant la même fréquence de BSGFV dans tous les échantillons sans distinction de génotypes (B). Fréquence de BSGFV dans tous les échantillons à génome A. (C). Nombre des sites ayant la même fréquence de BSOLV dans tous les échantillons sans distinction de génotypes (D). Fréquence de BSOLV dans les échantillons à génome A.

7.3. *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Le CMV, quant à lui, a été détecté majoritairement sur des plantes asymptomatiques collectées en zone de forêt (Système de culture : sylvo - bananier) et celles collectées en zone de savane (système de culture autour des cases). Il a aussi été détecté sur des bananiers plantés en association avec les cultures maraîchères et sur des bananiers plantés en association avec les cultures vivrières, tout génotype confondu. Cependant, de manière très surprenante, le CMV n'a pas été détecté sur des bananiers venant d'un des plus grands sites de production des cultures maraichères (site de Mbanza Ngungu). Ce résultat s'expliquerait par la différence génétique entre les souches du CMV du bananier et celles associées aux cultures maraichères. Les deux types appartiennent à deux sous-groupes différents (Roossinck 2002).

Dans certains échantillons symptomatiques présentant des stries jaunes, il a été difficile de différencier visuellement les symptômes de Banana streak viruses de ceux de *Cucumber mosaic virus*. Des cas d'infections mixtes entre le CMV-BSV ont été observés, particulièrement sur des plantes présentant des symptômes imprécis. Cette confusion dans la différentiation des symptômes a rendu le travail laborieux. Ce constat rejoint celui réalisé par Hughes (1997). Les résultats relatifs à l'absence des symptômes sur les plantes infectées soulèvent l'interrogation quant au rôle des plantes asymptomatiques dans la dispersion des virus, particulièrement dans cette zone où les agriculteurs échangent le matériel de plantation dont le statut sanitaire est inconnu (Mukwa et al. 2014).

La prévalence du CMV dans les 50 sites enquêtés a été évaluée à 9,3% soit 42/450 (voir chapitre cinquième). La majorité des sites infectés (respectivement, 8 sites) rassemblent 1 ou 2 plantes infectées par le CMV sur 9 plantes collectées par site (Figure 20), ce qui, de nouveau comme pour les autres virus investigués, semble indiquer l'importance de la transmission du virus via les rejets ou le matériel de plantation.

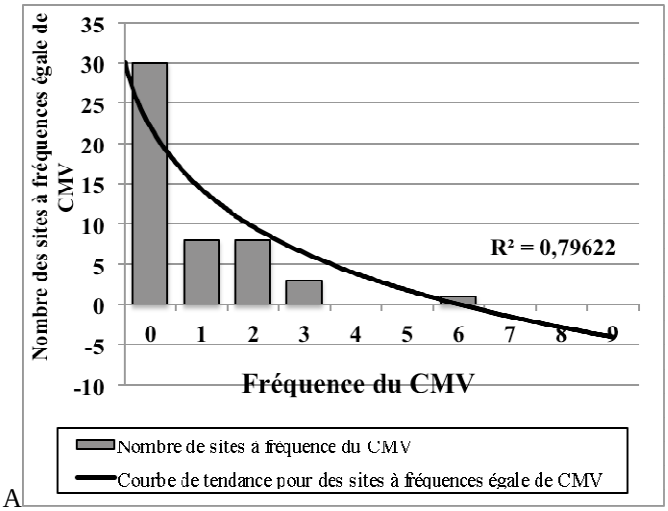
A 

Figure 20. (A) Nombre de sites à fréquence égale de CMV sur le nombre total 50 de sites enquêtés**.**

L'analyse phylogénétique des isolats CMV montre que ces derniers sont très proches et identiques entre eux, avec des pourcentages d'homologie > à 96%. Ils sont tout aussi proches de la souche sud-africaine CMV_KZN-BM1 (KJ789892) isolée au Kwazulu Natal et de la souche de référence CMV_Fny_USA (D10538). Ils se regroupent dans le sous-groupe IA. Cette phylogénie monophylétique des isolats congolais de CMV s'explique en partie par l'origine unique probable (par exemple par les matériels de plantation améliorés mais infectés) et par une évolution lente du virus dans un environnement fermé qui est le Bas Congo.

Par ailleurs, les résultats de la distribution du CMV complétés par ceux de la phylogénie qui rassemblent les isolats CMV dans le sous-groupe IA sont confirmés par Jones (2000) et par le travail de Roossinck (2002) sur l'histoire évolutive de *Cucumber mosaic virus* (Roossinck 2002, Jones 2000).

7.4. *Banana bract mosaic virus* (BBrMV)

Le BBrMV a été recherché mais n'a pas été détecté, malgré le nombre élevé et l'approche de collecte d'échantillons utilisés. Aucun symptôme n'a été observé. Il est connu que la distribution du BBrMV est restreinte au continent Asiatique (Thomas et al. 2000, Lockhart et al. 2002). A ce jour, aucun auteur n'a recherché la présence du BBrMV en Afrique sur base d'analyses de laboratoire. Nos résultats confirment donc l'absence de BBrMV dans les échantillons analysés, et d'une manière générale, au Bas Congo. Il est dès lors plausible d'affirmer que le BBrMV n'existe pas dans la province du Bas Congo, en RDC. Des résultats similaires et un avis similaire ont été émis dans d'autres parties du monde, telle que les Iles françaises (Caruana 2003).
Notons cependant que l'analyse des risques liés au BBrMV a été étudiée par Baker (2008) sur les îles françaises, qui en soit présentent des conditions climatiques semblables à celles qui prévalent dans la province du Bas Congo. Et que l'un des vecteurs de ce virus, *Pentalonia nigronervosa* Coquerel est présent en RDC. Dès lors, le *Banana bract mosaic virus* devrait sans doute être considéré comme un organisme de quarantaine en RDC, vu son importance économique, la présence de la plante hôte et des potentiels vecteurs capables de disperser le virus.

7.5. Fréquences de BBTV, BSV et CMV dans différentes variétés et système de culture bananier

Il est difficile de fournir avec précision la fréquence des virus dans différentes variétés et systèmes cultural de bananier au sud ouest de la RDC à cause de faible de fiabilité de l'information donné par les agriculteurs. En effet, au cours des investigations épidémiologiques de 2013, les agriculteurs ont été interrogés quant aux variétés cultivées. Cependant, il a été relevé que certains agriculteurs ignoraient les variétés cultivées, probablement parce que le bananier reste au même endroit pendant des décennies, ce qui fait que la culture passe d'une génération de propriétaire à l'autre. Selon nos données, plusieurs variétés de bananiers ont été répertoriées (Chapitre 4) et pour lesquelles des fréquences virales variables ont été enregistrées. Par exemple

lorsque on considère une variété telle que le Gros Michel, le nombre des cas positifs par virus est variable, mais reste assez élevée (Chapitre 4).

Les données relatives au système cultural, rassemblées au chapitre 4, ont révélées que dans la majeure partie des cas, le bananier est cultivé autour des cases. Cette observation n'est certes pas nouvelle, puisque d'autres auteurs ont réalisé le même constat et fustigent ce système de production qui n'encourage pas une intensification de la production pour cette culture à potentiel élevé (Mobambo et al. 2010, Dowiya et al. 2009, Bakelana et al. 1996). D'autres systèmes culturaux ont été aussi rencontrés, mais difficiles à catégoriser. Par exemple, dans certains sites, les échantillons ont été collectés dans les essais de centre de recherche ou les champs expérimentaux de l'université, ce qui ne constitue peut-être pas un système de culture à proprement parler.

Le choix variétal ainsi que le système cultural sont fortement dépendants de la volonté de l'agriculteur. Toutes ces observations mènent à déduire que la réussite d'une stratégie, de contrôle des viroses du bananier doit s'appuyer principalement sur tous les acteurs de la filière et principalement sur les agriculteurs. A travers les actions de formation, de vulgarisation, d'animation rurale, encadrement et inspection. Le choix des approches participatives demeurera la clé de l'efficacité des actions ultérieures.

CHAPITRE 8

Conclusions et perspectives

A l'issue de cette étude, nous retiendront que (i) Les enquêtes épidémiologiques réalisées en République démocratique du Congo ont permis la mise en évidence de trois espèces virales sur les quatre principaux virus connus sur la culture de bananier et plantain (*Musa* spp), le *Banana bunchy top virus*, le Banana streak virus, et le *Cucumber mosaic virus*. Relevons que les deux dernières espèces sont rapportées pour la toute première fois en RDC. (ii) La faible variabilité génétique des isolats congolais de *Banana bunchy top virus* a été aussi révélée, sur base des séquences complètes des ADN-R, et sur l'ensemble du génome des cinq isolats collectés dans les provinces du Sud-Ouest de la RDC (Katanga, Bas Congo, Bandundu, Kasaï Orientale et Kinshasa). Ces isolats sont très proches entre eux et proches de tous les autres isolats des pays d'Afrique Sub-Saharienne (<3%). Basés sur le fait que le BBTV a été observé pour la première fois en Afrique sub-saharienne (SSA), en RDC, nos résultats suggèrent que le continent africain a connu deux introductions indépendantes de BBTV. La première introduction aurait été réalisée en Egypte, détectée en 1901 et la seconde en RDC avec une publication en 1950. Les résultats d'analyse phylogénétique des isolats Africains de BBTV montrent une différence entre les isolats Egyptiens et ceux de SSA. Ainsi, la RDC aurait servi de foyer de dispersion primaire. Les différents haplotypes de BBTV observés en RDC, proviendraient de la seule souche qui s'adapte selon les différentes conditions environnementales. En se basant sur l'analyse du composant ADN-R, aucune recombinaison n'a pu être mise en évidence. Par contre l'analyse du génome complet des isolats BBTV montre des évènements de recombinaison sur les séquences des ADN-U3 et S. L'étude des haplotypes présent en RDC, montre une diversité importante d'haplotypes, particulièrement dans la province Orientale et du Bandundu où les échantillons ont été collectés dans des zones de forêt. Cette étude a montré l'intérêt de l'analyse d'haplotypes pour illustrer les différences entre isolats du BBTV. Cette technique pourrait être facilement appliquée au niveau continental ou mondial.

(iii) Le *Banana bunchy top virus* est en phase de dispersion car de nombreux bananiers ont été identifiés comme infectés alors qu'ils ne présentaient pas encore de symptômes de la maladie.

(iv) Le facteur humain constitue l'élément primordial qui contribue à la dispersion rapide de BBTV à longue distance, dans la mesure où, les agriculteurs échangent le matériel de plantation souvent infectés et non certifiés, obtenus lors des cultures précédentes.

(v) Les quatre principales espèces BSV (BSGFV, BSOLV, BSMYV, BSIMV) ont été observées pour la première fois en RDC. L'espèce la plus fréquente est le BSGFV (68% - 61/90). (vi) La plupart des bananiers infectés par les espèces BSV sont des *Musa acuminata* qui ne contiennent pas, naturellement, des séquences endogènes BSV. Leur infection provient vraisemblablement d'une transmission par la cochenille vectrice du virus depuis un bananier hybride interspécifique infecté suite à un stress par activation d'eBSV. Le BSV est présent de manière endémique, en association avec les cochenilles dans la province du Bas Congo. Pour deux des espèces considérées, Le BSGFV et BSOLV, une présence pré-épidémique à épidémique est suspectée.

(vi) Le *Cucumber mosaic virus* observé pour la première fois sur bananier en RDC est très peu diversifié génétiquement. Cette très faible variabilité génétique pourrait être expliquée par un événement d'introduction unique et une évolution lente dans un environnement fermé.

(vii) De manière générale, du point de vue de la lutte contre les maladies virales du bananier, les résultats générés par cette étude montrent une faible diversité nucléotidique (inférieure à 5%) pour toutes les espèces virales : BBTV, BSV, CMV. Par contre, des complexes viraux au sein d'une même plante ont été observés.

(viii) Le BBrMV n'a pas été détecté et est sans doute absent de notre zone d'étude. Il doit être considéré comme un virus de quarantaine.

Si cette thèse n'a pas traité toutes les questions liées aux viroses du bananier en RDC, elle constitue une base exploratoire ouvrant la voie à des études plus précises, notamment pour mieux comprendre le développement épidémique de ces viroses.

Néanmoins, plusieurs questions, concernant ces virus, demeurent sans réponse notamment :

⇒ ***Banana bunchy top virus : (i)*** Quelle est la proportion des infections de BBTV liées à la transmission végétative et celles dues aux pucerons vecteurs ? Il serait primordial de clarifier la contribution du puceron/ matériel de plantation infecté, dans la dispersion du BBTV en RDC. ***(ii)*** La province de l'Equateur/ RDC est une zone isolée et fermée, située à proximité de la région de Yangambi. Cette région regorge des conditions agro-environnementales très particulières (forêt dense, etc.) cette particularité constituerait-elle un facteur additionnel pour la compréhension de l'épidémiologie et de la diversité génétique du BBTV en RDC ? Quels sont les haplotypes de BBTV qui sont présents dans cette zone ? ***(iii)*** Dans un pays comme la RDC à la législation sanitaire peu élaborée et avec un système de cartographie des maladies limité, le recours aux variétés résistantes constitue un moyen efficace de contrôle du BBTV. A ce jour, aucune source de résistance contre le BBTV n'a été identifiée. En situation de forte prévalence du BBTV et en l'absence de variétés résistantes, la question de la vitesse de ré-infestation de matériel de plantation sain mérite une réponse. Plus clairement combien de temps faut–il à un bananier préalablement sain pour s'infecté par le BBTV. Cette question devrait permettre de mieux définir les stratégies de gestion de BBTV dans différents agro-écosystèmes en RDC et peut-être éviter le recours inapproprié à l'usage d'insecticide.

⇒ **Banana streak virus :** dans ce travail, le BSV est rapporté, pour la première fois, dans la province du Bas Congo. Il s'agit de la deuxième zone importante de production de la banane, après la province Orientale en RDC. La présence de la station de recherche de M'Vuazi a favorisé les introductions des variétés améliorées de bananiers. Cet aspect soulève, d'une part, (i) la question de l'existence et de la prévalence du BSV dans les autres provinces du pays d'une part, et (ii) le niveau d'implication de la cochenille vectrice dans la transmission de BSV d'autre part. (iii) Quels facteurs de stress (température, humidité) influencent l'expression des symptômes de BSV sur plantains placés en conditions naturelles dans cette région de

la RDC ? **(iv)** Quel est le rôle potentiel du changement climatique sur l'émergence et/ou la dispersion de ce virus ?

⇒ **Sur *Cucumber mosaic virus* : *(i)*** le CMV est-il présent dans les autres provinces de la RDC et à quelle prévalence ? Etant donné que toutes les souches de CMV (sous-groupe I et II) sont transmises par les mêmes vecteurs, (ii) quel lien génétique il y a t-il entre les isolats CMV du bananier et ceux présent sur culture maraichères en RDC ? (iii) Existe-t-il des mécanismes génétiques favorisant leur évolution ?

⇒ **Sur *Banana bract mosaic virus*** : cette étude n'a pas permis de montrer une présence du *Banana bract mosaic virus* dans la province du Bas Congo. (i) Quelle est la situation dans les autres provinces de la RDC qui partagent des frontières avec les autres pays africains ? (ii) Quel est le niveau réel du risque d'introduction du BBrMV en RDC ?

De manière plus globale, cette étude soulève la question des actions concrètes nécessaires pour redynamiser la production de la banane et plantain en RDC. A cet effet, un plan de relance de la filière de production de la banane peut être proposé.

8.1. Vers une relance de la filière de production de la banane en RDC ?

« Dans un état, les humains ont faim parce qu'ils ne peuvent pas s'offrir les vivres disponibles sur le marché ou parce qu'ils ne peuvent pas produire eux-mêmes leurs vivres » (Sen 1981). Cette dernière assertion reflète bien la situation de la RDC, vu le grand potentiel de production agricole qu'il dispose, soit 80 millions d'hectares de terres arables, un réseau hydrographique dense et reparti sur tout le pays, une grande diversité des conditions édapho-climatiques, favorable à de nombreuses cultures (IFPRI 2014). La République démocratique du Congo continue à faire face à une production agricole faible. Et pourtant, en 2003 à Maputo, les chefs d'états africains se sont engagés à affecter au moins 10% de leur budget national à l'agriculture et à des politiques de développement rural, dans les cinq années suivant la signature de cet engagement. Et ainsi, les états devaient arriver à un taux de croissance agricole annuel de 6% à l'échéance 2015 (Chausse 2012). Malheureusement, dans bien des cas les

décideurs politiques prennent des décisions irrationnelles et l'agriculture congolaise reste prisonnière des dites décisions. En 2003, la part de l'agriculture dans le budget national de la RDC était seulement de 1,44% (Tollens 2004) et de 3,4% en 2012. Un effort national très important reste donc à faire et les bailleurs de fonds doivent également respecter l'engagement de 10% de leur propre financement. Puisque au stade actuel de son développement économique, l'agriculture est le seul secteur qui peut, avec équité, procurer de l'emploi à la population, procurer un revenu sûr et rendre disponible une plus-value substantielle tout en touchant toutes les couches sociales. Le pays dispose d'immenses ressources et opportunités de développement de l'agriculture en générale et plus spécifiquement de la banane. Le taux de consommation de la banane continue à augmenter et la banane devient une denrée de luxe. Le bananier ainsi que ses sous-produits peuvent être grandement valorisés non seulement pour rendre disponible la nourriture et assurer la sécurité alimentaire, mais également comme source d'emploi pour les populations au chômage.

La réorganisation de la filière banane et la relance de la culture de la banane nécessitent la mise sur pied des stratégies holistiques, prenant en compte à la fois la gestion intégrée des maladies et ravageurs, la gestion de la fertilité des sols, le besoin des producteurs, le prix de la banane, ainsi que toutes les contraintes présentées à la figure 21. Le plan de redressement de la filière banane présenter dans cette étude propose un ensemble d'actions à mettre en œuvre en vue de redynamiser la production de la banane. Ces stratégies permettront en même temps de réduire l'impact négatif des facteurs limitant et de concilier les politiques irrationnelles, incohérentes ou presque inexistantes dans la filière banane en RDC.

Les décideurs politiques devront s'atteler à la formulation de politiques claires dont les priorités pourraient être, outre une série d'éléments essentiels à la filière banane (organisation des producteurs en associations, coopérative, politique des prix adaptée, dynamisation de la filière et stimulation de la confiance des producteurs par une limitation des taxes, stimulation des entreprises impliquées dans la conservation et la transformation de la banane) :

(i) le déploiement d'une stratégie de gestion intégrée des maladies et ravageurs ;

(ii) la mise sur pied d'une police phytosanitaire comme une unité spécialisée de contrôle à la frontière et sur le territoire national;

(iii) l'appui et le renforcement des capacités de travail des laboratoires de contrôle de la qualité de matériel de plantation telle que le service Nationale des semences (SENASEM), la Clinique des Plantes de Kinshasa ;

(iv) le renforcement de la capacité de travail des laboratoires de production de matériel de plantation sain, telle que celui de production de culture *in vitro* de la faculté des sciences, à l'Université de Kisangani ;

(v) susciter l'intérêt pour la recherche agronomique. Cette dernière devrait être orientée vers la recherche des sources de résistances aux virus par la sélection des variétés locales et la mise en place des itinéraires techniques adaptés aux conditions de production de la RDC.

8.2. Compréhension de la situation actuelle des contraintes en culture de bananier en RDC

A l'entame de cette étude en 2011, il pouvait être tentant d'énumérer principalement les facteurs abiotiques et quelque quatre facteurs biotiques, comme étant les majeurs facteurs limitant la culture du bananier. Diverses études rapportaient l'impact hautement négatif des facteurs abiotiques, notamment celui du système cultural et de la baisse de fertilité des sols (Mobambo 2010, Dowiya 2009, Elengesa 2006). Les résultats obtenus au cours de cette étude révèlent aussi une forte pression virale à laquelle est soumis le bananier en République démocratique du Congo. Elle renouvelle ainsi la compréhension des contraintes en culture du bananier et se résume dans le schéma présenté à la figure 21. Dans un tel contexte, une démarche de gestion intégrée des maladies et ravageurs (*Integrated Pest Management*) apparaît comme le meilleur moyen de diminution gestion de la pression parasitaire.

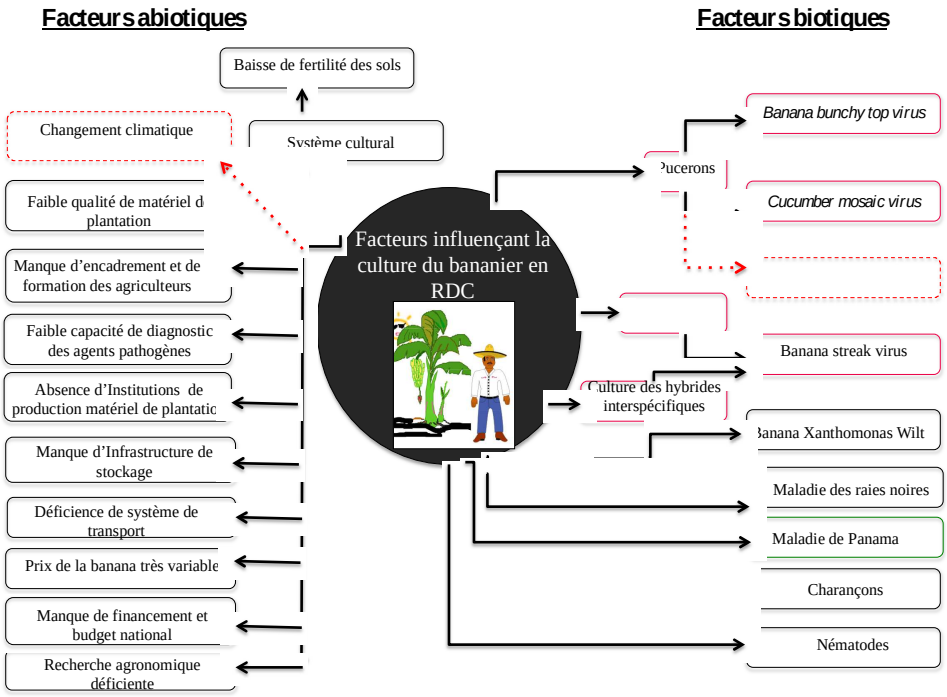


Figure 21. Compréhension actuelle des contraintes de la filière banane en République démocratique du Congo. Les cadres de couleur rouge, montrent les contraintes de nature virale étudiées dans cette thèse, celui en vert montre une maladie à faible impact presque oubliée, qui risque d'émerger. Les cadres en pointillés rouges représentent des facteurs à risque qui méritent une attention soutenue. La *Banana bract mosaic virus* est absent sur le territoire congolais, mais son vecteur est présent dans toutes les provinces du pays, et les conditions agro-climatiques de la RDC sont favorables à l'émergence de ce virus. Il constitue dès lors un virus de quarantaine. Le changement climatique constitue également un risque, dans la mesure où ce dernier stimulerait l'émergence des virus telle que Banana streak virus, suite à culture des hybrides interspécifiques. Il s'agit d'un facteur incontrôlable, mais pour lequel des mesures de prévention peuvent réduire l'impact.

8.3. Mise en place d'une stratégie de gestion intégrée des virus du bananier

La gestion intégrée consiste en la combinaison raisonnée de toutes les méthodes de lutte, ayant une action régulatrice sur les nuisibles d'une culture, afin de les maintenir à un niveau faible et rendre économiquement tolérable leur seuil (Corbatz 1999). Elle

inclut donc, l'usage combiné des moyens de lutte cohérents basés prioritairement sur les méthodes de luttes écologiques et biologiques et un recours raisonné à la lutte chimique.

Au regard des résultats obtenus dans ce travail et au moyen d'une compréhension renouvelée des contraintes en culture du bananier en RDC, les principales actions de la stratégie de gestion intégrée doivent s'insérer dans le cadre global de lutte contre les maladies et ravageurs en RDC. Sur bananier, à côtés des autres contraintes majeures comme la maladie des raies noires et le BXW, les moyens de lutte seront aussi dirigés contre les virus et leurs vecteurs (figure 22). Toutefois, elle inclut les ravageurs et tient compte des précautions à prendre afin d'éviter l'émergence des nouveaux problèmes.

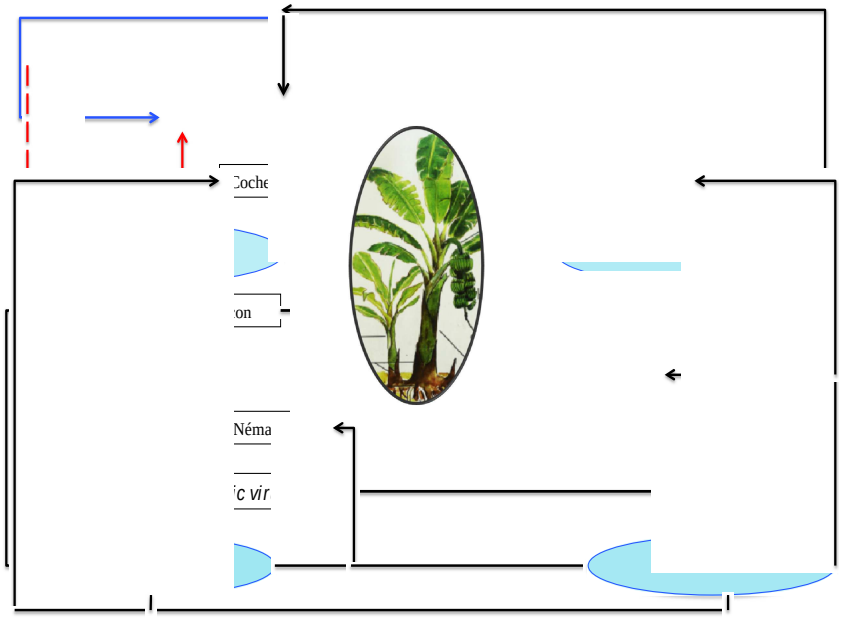


Figure 22. Modèle de gestion intégrée des virus du bananier et du plantain**.** Les cadres ovales en bleu, représentent les différents moyens de lutte à mobiliser. Les cadres de forme rectangulaire représentent les virus, vecteurs et les ravageurs du bananier qui constituent des facteurs limitants pour culture du bananier. Dans l'état actuel, le seul virus de quarantaine est le *Banana bract mosaic virus* dont la pénétration sur le territoire doit absolument être évitée. D'où la nécessité des contrôles aux frontières. La lutte biotechnologique et génétique concerne tous les virus du bananier. La lutte contre le BSV nécessite la prise en compte de ses particularités génomique, les moyens de luttes spéciaux devront s'appliquer à ce virus.

❶ Lutte contre *Banana bunchy top virus* et *Pentalonia nigronervosa*

♦ A court terme

La lutte préventive incluant l'utilisation de matériel de plantation certifié sain, l'instauration d'une politique de plants fermiers, qui permettrait à l'agriculteur de produire lui-même ses plants localement, tout en limitant drastiquement les possibilités d'échanges d'exploitation à exploitation sans contrôle préalable de la qualité de plants. La mise en place d'une telle politique implique alors de développer, en amont, une production de plants suffisante pour répondre aux besoins du marché, d'où la nécessité de développer alors vraisemblablement des exploitations spécialisées dans la production de plants sains. L'interdiction de plantation des rejets d'origine inconnue ou des cultures antérieures et le diagnostic est moins couteux et efficace. La formation et l'apprentissage aux agriculteurs, à reconnaître les premiers symptômes de BBTV est aussi une piste intéressante dans le contexte de forte prévalence comme dans la province du Bas Congo, pour autant qu'elle s'accompagne alors d'une politique qui favorise l'élimination des plants atteints de viroses.

Dans les autres provinces où le BBTV est déjà présent, les méthodes suivantes pourraient aussi être appliquées : (i) la destruction systématique des plantes symptomatiques et le remplacement des plantations, (ii) l'usage de coupes vent qui auront pour rôle de limiter la dispersion du puceron vecteur, (iii) la lutte contre *Pentalonia nigronervosa* en favorisant le développement des ennemis prédateurs ou parasitoïdes naturels tels que les coccinelles (Voelkl et al. 1990). (iv) En saison sèche conseiller et encourager l'arrosage foliaire, afin de limiter les populations des pucerons vecteurs.

♦ A moyen et long terme

Actuellement les variétés résistantes contre le BBTV n'existent. Néanmoins, des perspectives prometteuses de luttes biotechnologiques et génétiques se dessinent. Outre la création des lignées de bananiers transgéniques (Tripathi 2013, communication personnelle) et l'usage de l'approche d'activation des petits ARN

(ARNi) qui semblent se révéler prometteurs pour la création future des variétés résistantes (Mware 2016), mais dont l'adoption pourrait être liée à d'autres questions problématiques, une meilleure compréhension des différences de susceptibilité observées entre variétés, y compris au cours de ce travail, serait sans aucun doute utile.

Les perspectives de lutte biologique dirigée contre *Pentalonia nigronervosa* au moyen des composés organiques volatiles (substances sémiochimiques) ouvrent aussi uen piste intéressante. Des résultats ont été obtenus en étudiant l'attractivité de *Pentalonia nigronervosa* vis-à-vis des différentes sources olfactives. Les conclusions de ces travaux ont révélé, par exemple, que le bananier dessert infecté (BDI) attirait plus les pucerons que le bananier dessert sain (Figure 23A), que le plantain infecté (BPI) attirait plus le puceron noir que le plantain sain (Figure 23 B) et que le bananier dessert sain (BDS) attirait de manière plus significative *P. nigronervosa* que le bananier plantain sain (BPS) ($F= 314$ et $p < 0,05$) (Figure 23C).

De la même manière, *P. nigronervosa* était plus attiré par le plantain infecté que par la banane dessert infectée ($F= 379,5$ et $p= 0,2966$), mais sans une différence significative entre les traitements (Figure 23 D). Ce qui suggère qu'en présence de deux types de bananiers infectés (BPI et BDI), *P. nigronervosa* n'a pas de préférence pour tel ou tel génotype infecté (Figure 23). Ce travail demeure donc une voie à explorer pour la mise au point d'un contrôle biologique vis-à-vis de *Pentalonia nigronervosa*. Ainsi, la lutte contre ce dernier par usage des répulsifs ou des substances attractives semble intéressant.

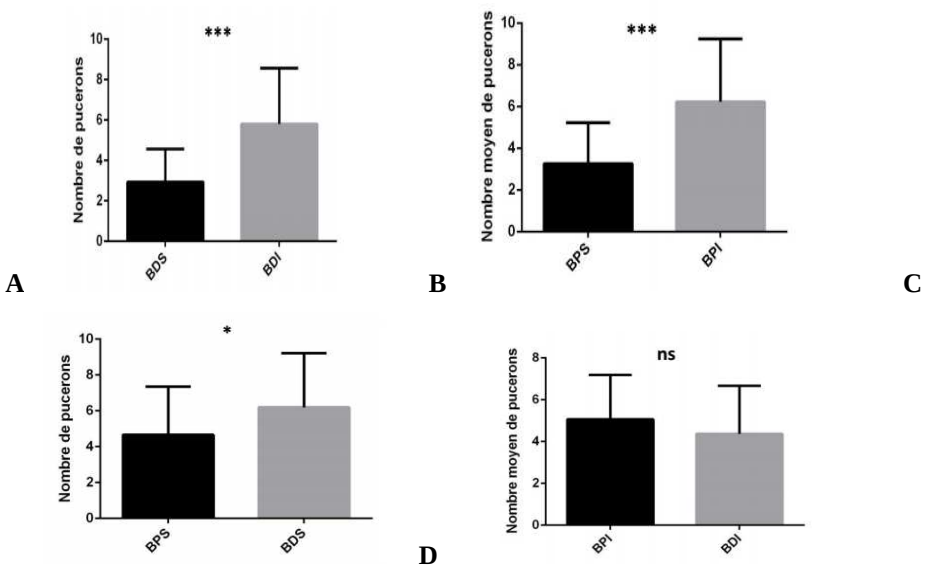


Figure 23 : Attractivité de Pentalonia nigronervosa vis-à-vis de deux types de bananier. (A) Attractivité de *P. nigronervosa* vis-à-vis (A) du bananier dessert infecté au BBTV par rapport, résultats *** hautement significatif à $p < 0,000$. (B) du bananier plantain infecté au BBTV, par rapport au bananier plantain sain, résultats *** hautement significatif à $p < 0,0001$, (C) du bananier dessert sain par rapport au bananier plantain sain, résultats * significatif à $p < 0,05$, (D) du bananier dessert infecté au BBTV par rapport au bananier plantain infecté au BBTV, résultats ; ns : non-significatif.

❶ Lutte contre Banana streak virus et les cochenilles vectrices

♦ A court et moyen terme

De manière générale, la gestion de espèces de Banana streak virus semble extrêmement compliquée et très laborieuse. Le moyen de contrôle du BSV devrait considérer conjointement sa forme épisomale et sa forme intégrée. En champ, il est utile : (i) de limiter la culture des hybrides interspécifiques qui constitue la source d'inoculum, (ii) de développer des techniques culturales atténuant l'effet du stress climatique, telle que l'arroges du bananier pendant la période critique (au sud ouest de la RDC : mi-mai à mi-octobre), (iii) d'encourager l'association des cultures en vue de

limiter la dispersion du vecteur, (iv) d'utiliser des répulsifs ou des insecticides systémiques pour lutter contre la cochenille, (v) d'éliminer les hôtes alternes, (vi) d'interdire les échanges de matériel de plantation, (vii) d'exiger la destruction systématique des plantes présentant des symptômes (viii) de désinfecter les rejets et leurs certifications avant la replantation.

♦ **A long terme**

(i) Il est généralement connu que les gènes de résistance aux virus phytopathogènes sont présent dans les espèces sauvages, il est donc nécessaire de scruter les possibilités de croissement de bananier avec les espèces *Musa* non domestiquées. La recherche de gènes de résistance dans les variétés de bananiers locales et dans les bananiers sauvages serait utile (exploration de la forêt de Mayombe dans le Bas Congo, de Yangambi dans la province Orientale et l'Equateur pourrait permettre la découverte des *Musaceae* proche du bananier ayant des caractéristiques intéressantes pour la résistance aux virus).

(ii) Rechercher et favoriser le développement des parasitoïdes des cochenilles,

❶ **Lutte contre *Cucumber mosaic virus* et les pucerons vecteurs**

L'inspection des plantations dès le 15ème jour et la destruction systématique des plantes symptomatiques. En effet, l'étude d'Aka (2009) en Côte d'Ivoire, sur la cinétique d'évolution de la chlorose infectieuse a démontré que l'apparition des symptômes de CMV s'observe entre le 15ème et le 30 ème jour après la plantation. Les autres méthodes de lutte proposées contre le BBTV peuvent être aussi être efficace contre le CMV.

❶ **Lutte préventive contre *Banana bract mosaic virus* et les pucerons vecteurs**

Quarantaine et diagnostic : *Banana bract mosaic virus* doit être systématiquement recherché, à l'importation, sur toutes les plantes de la famille de *Musacae* (*Strelizia*, *Heliconia*, ...). Un contrôle strict aux frontières de la RDC doit être d'application.

8.4. Appuyer et renforcer les capacités des laboratoires de diagnostic, de certification et de production de matériel de plantation *in vitro*

Les conclusions de l'étude de Dowiya (2009) ont montré que, pour un grand pays comme la RDC, il n'existe aucun laboratoire de production de matériel de plantation sain de bananier. Des efforts menés d'une part entre l'Université de Kinshasa et l'Université catholique de Louvain qui ont abouti à la création, en 2009, de la Clinique des Plantes de Kinshasa, dédiée entièrement au diagnostic, à l'identification des maladies et ravageurs ; en 2010, la mise en place du laboratoire de culture *in vitro* à la Faculté des Sciences de l'Université de Kisangani. Il est donc primordial que les capacités de laboratoire de ce type soient renforcées en s'appuyant sur les services existants, tel que le Service national de quarantaine animale et végétale (SQAV), le Service National de Semences (SENASEM). La formation de technicien de laboratoire, le recyclage des experts et la mise à jour des infrastructures doivent être réalisés. Ainsi, le réseau national de production de matériel de plantation certifié sain pourrait fonctionner selon le schéma proposé à la figure 24 ci-dessous.

8.5. Former et organiser des paysans en association

Pour plus d'efficacité dans la stratégie d'intervention, les producteurs congolais de bananier doivent être regroupé en association, selon trois niveaux : (i) les producteurs qui réalisent l'agriculture de subsistance derrière les cases, (ii) les exploitants ayant au moins 1ha de plantation et (iii) les fermiers qui réalisent la production destinée à l'exportation sur plus d'1ha. Ainsi, les activités de formation, information, le transfert de technologie (techniques de production, de lutte contre les maladies et ravageurs, variétés performantes) pourront atteindre tous les niveaux de la filière. De même, les besoins des agriculteurs pourront bien être appréhendés et discutés avec ces acteurs impliqués dans cette filière. Les décideurs pourront choisir les voies à suivre pour une meilleure production.

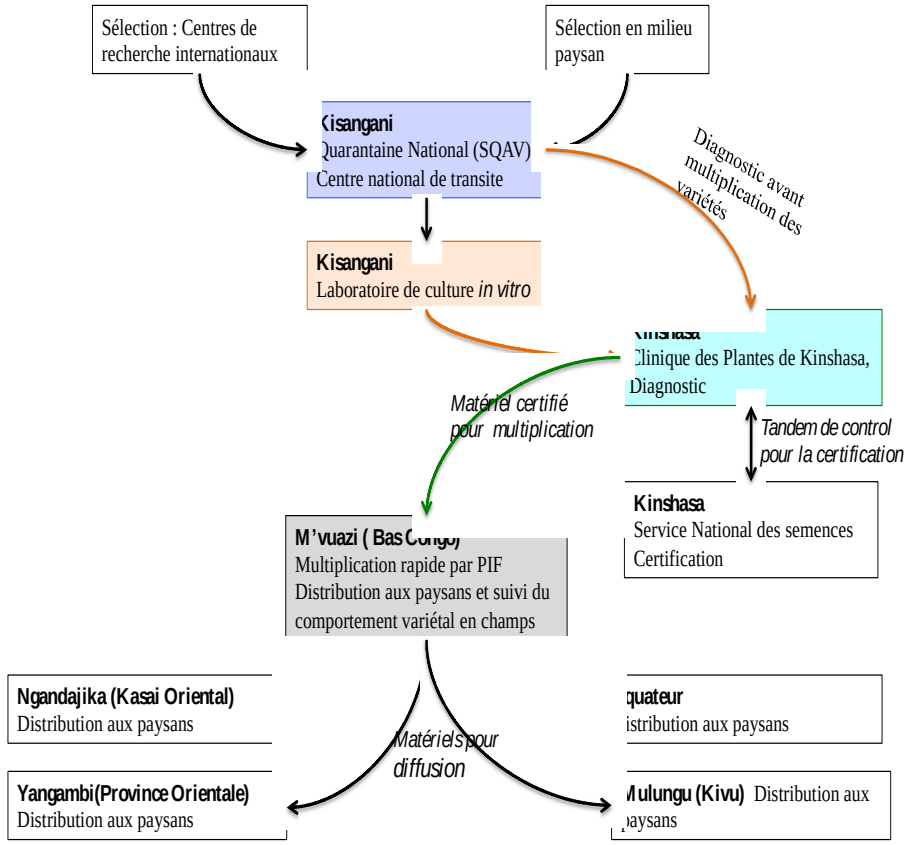


Figure 24. Réseau institutionnel de compétence pour la production de matériel de plantation de bananier sain en République démocratique du Congo**.** Le centre national de transit n'existe pas pour le moment, ce modèle suggère la création d'un tel centre national de transit de variétés.

8.6. Police phytosanitaire, quarantaine et renforcement du cadre légal de lutte contre les nuisibles du bananier

En Australie, l'application stricte de la législation phytosanitaire associée à la destruction des plantations infectées avait donné des résultats satisfaisants (Jones 2000). La RDC est un pays où l'application de la législation est souvent lente. De ce fait, cette dernière doit renforcer le cadre légal de lutte contre les nuisibles, en

s'appuyant, non seulement sur la législation, mais également sur un organe d'exécution tel qu'une police phytosanitaire. Sans cet organe, les efforts risquent d'être incompris et vains. Par ailleurs, la création d'une police phytosanitaire comme organe d'exécution et d'appui au Service National de Quarantaine Animale et Végétale (SQAV) existant, permettrait la gestion efficace des virus du bananier. Cette unité spécialisée qui sera formée à la reconnaissance visuelle des symptômes (inspection) et à l'usage des techniques rapides de détection des viroses du bananier (Exemple : Immunostrip) aurait pour principale mission d'inspecter les plantations à une fréquence déterminée, afin de décider l'évaluation de seuil de nuisibilité des pathogènes.

8.7. Redynamiser la recherche agronomique

La redynamisation de la recherche agronomique stimulerait la relance de la filière de production de la banane. Elle devrait notamment s'orienter vers (i) la sélection et multiplication des variétés locales et leurs diffusions : il est connu que la RDC regorge d'une grande diversité variétale de bananiers et plantains, dont le niveau de résistance aux virus n'a jamais été rapporté. Une étude sur le niveau de résistance des variétés locale contribuerait à percer le mystère de gènes de résistances contre le BBTV, le BSV et le CMV. (ii) En outre, l'étude des itinéraires techniques adaptés aux conditions de production de la RDC demeure également une priorité.

8.8. Renforcer le contrôle aux frontières

Depuis environ cinquante ans, les exportations agricoles de la RDC ont chuté pour laisser place aux importations qui approvisionnent les marchés intérieurs. En plus, la porosité des frontières de la RDC accroît le risque d'introduction des agents pathogènes. A l'heure où les échanges régulent le commerce mondial, la RDC doit renforcer le contrôle dans les multiples points d'accès de son territoire en mettant un accent particulier sur la recherche des nuisibles de quarantaine. Dans la filière de production de la banane, le contrôle aux frontières doit plus particulièrement viser le BBrMV dans les végétaux, des familles botaniques proches de bananier. La création

de zones tampons aux frontières ou sur le territoire, comme les centres de transit de variétés de bananiers, proposé à la figure 24 est vivement recommandée.

Partie F : Références bibliographiques

Aka, A.R., Kouassi, N.K., Agnéroh, T.A., Amancho, N.A., Sangare, A. 2009. Distribution et incidence de la mosaïque du concombre (CMV) dans les bananerais industrielles au Sud-Est de la Côte d'Ivoire. Sciences et Nature 6, 171-183.

Allen, R.N.B., Barnier, N.C. 1977. The spread of bunchy top disease between banana plantation in the tweed rivers district during 1975-1976 in NSW. Gouvernement document, pp 27-28.

Anderson, P.K.,Cunningham, C.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R. et al. 2004. Emerging infections diseases of plants : pathogen pollution, climate change and agrotechnolodical drivers. Trends Ecol. Evol 19, 535-544.

Anhalt, M.D.A., Almeida, R.P.P. 2008. Effect of temperature, vector life stage and plant access period on transmission of *Banana bunchy top virus* to banana. Archive of Virology 153, 135-146.

Arias, P., Dankers, C., Lie, P., Pikauskas, P. 2003. L'économie mondiale de la banane de 1985-2002. Service des matières et des produits tropicaux et horticoles (ESCR) Division des produits et du commerce international. FAO, Rome, Italie.

Aritua, V., Nanyonjo, A., Kumarkech, F., Tushemereirwe, W. 2006. Rep-PCR reveals a highgenetichomogeneityamongUgandanisolates of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. African journal of Biotechnology 6, 179-183.

Ayo-John, E.I.H., Hugues, A. J. 2014. Identification of *Cucumber mosaic virus* (CMV) isolates infecting*Musa* spp and vegetablescrops in Southern Nigeria. International Journal of Virology 10, 204-210.

Bakelana, B.K. 2005. Evaluation et dissémination de cultivars améliorés de bananiers dans la procince du Bas-Congo, RDC : Résultats des activités des trois premières années. MusAfrica 2, 12-16.

Bakelana, B.K.M., Muyunga, T. 1996. La production des bananes et bananes plantain en République démocratique du Congo. Infomusa, pp 103-112.

Baker, R., Caffier, D., Choiseul, W.J., Declercq, P., Dormannsné, S., Gerowitt, B., Karadjova, O., Lovei, G., Lansnki, A.O., Makowski, D., Manceau, C., Manici, L., Perdikis, D., Purglia, A.P., Schans, J., Scrader, G., Steffek, R., Stromberg, A., Tilikkala, K., Lenteren, J., Vloitoglou, I. 2008. Pest risk assessment made by France on *Banana bract mosaic virus*considerd by France as harmful in French overseasdepartments of French, Guiana,

Guadeloup, Martinique and Réunion. The EFSA, journal European Food Safety Autority 651, 1-23.

Balasubramaniam, V., Selvarajan, R. 2012. Complete genomesequence of a *Banana bract mosaic virus*isolateinfecting the French plantain cv. Nendran in India. Archives of Virology 157, 397-400.

Bhadra, P.A., Agarwala, K.B. 2010. A comparison of fitness characters of two host plant-based congeneric species of the banana aphid, *Pentalonia nigronervosa* and *Pentalonia caladii.* Journal of Insect Science 10,140.

Blomme, G., Ploetz, R., Jones, D., De Langhe, E., Price, N., Gold, C., Geering, A., Viljoen, A., Karamura, D., Pillay, M., Tinzaara, W., Teycheney, P-Y., Lepoint, P., Karamura, E., Buddenhagen, I. 2012. A Historicaloverview of the appearance and spread of *Musa*pests and pathogens on the African continent: Highlighting the importance of clean Musa plantingmaterials and quarantinemeasures. Annals of Applied Biology 162, 4-26.

Bos, L. 1969. Experiences with a collections of plant viruses in leafmaterialdried and stored over calcium chloride and a discussion of literature on virus preservation. Meded.Rijksfak. Lanbouwwetensch. Gent 34, 875-887.

Bouman, K.H. 2001. Impact de la culture du bananier sur l'environnement : influence des sytsèmes de culture bananier sur l'érosion, le bilan hydrique et les pertes en nutriments sur un sol volcanique de Martinique, cas des sols brun rouille à halloysites. Thèse de doctorat, Ensam, France.

Bressan, A., Watanabe, S. 2011. Immunofluorescence locatisation of *Banana bunchy top virus* (Family Nanoviridae) within the aphidvector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct fromaphid-transmittedluteoviruses. Virus Research 155, 520-525.

Burns, M.T., Harding, R.M., Dale, L.J. 1995. The genomeorganization of *Banana bunchy top virus:* analysis of six DNAss components. Journal of General Virology 76, 1471-1482.

Buyckx, E.J.E. 1962. Précis des maladies et des insectes nuisibles rencontrés sur les plantes cultivées au Congo, au Rwanda et au Burundi. Leopoldville, I. N.E.A.C.

Caruana, I.M-L. 2003. Analyse de risque phytosanitaire (ARP) : Banana bunchy top babuvirus-BBTV. Cirad, France.

Caruana, I.M-L. 2003. Analyse de risque phytosanitaire (ARP) : Banana streak badnavirus-BSV. Cirad, France.

Caruana, I.M-L. 2003. Analyse de risque phytosanitaire (ARP) du Banana bract mosaic potyvirus-BBrMV dans la région de Martinique, Guadeloupe, Guyane, Réunion. Cirad, Montpellier, France.

Caruana, I.M-L. 2013. Les virus de bananier recherchés en RDC, communication personnel, Cirad, France.

Caruana, I.M-L., Galzi, S., Laboureau, N. 2008. A reliable IC-One-Step RT-PCR method for the detection of BBrMV to ensure safe exchange of *Musa* germplasm. Journal of Virological Methods 153, 223-231.

Chabannes, M., Baurens, F-C., Duroy, P-O., Bocs, S., Vernerey, M-S., Rodier-Goud, M., Barbe, V., Gayral, P., Iskra-Caruana, M-L. 2013. Three infectious viral species lying in wait in the banana genome. Journal of Virology 87, 8624-8637.

Chabannes M., Iskra-Caruana M.-L. 2013 Endogenous pararetroviruses – a reservoir of virus infection in plants. Virus replication in animals and plants. Current Opinion in Virology, 3 (6): 615-620

Champion, J. 1963. Le bananier. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 263pp.

Chandrassekar, A., Kalaiponnani, K., Elayabalan, S., Kumar, K.K., Angappan, K., Balasubramanian, P. 2011. Screening of banana bunchy top virus through multiplex PCR approach. Archives of Phytopathology and Plant Protection 44, 1920-1925.

Chausse, J.P., Kembola, T., Ngonde, R. 2012. Agriculture, pièrre angulaire de l'économie de la République démocratique du Congo. In Accélérer la croissance et promouvoir l'emploi en République démocratique du Congo. Media St Paul, Kinshasa, RDC.

Cherian, A. K., Menon, R., Suma, A., Nair, S., & Sudheesh, M. V. 2002. Impact of banana bract mosaic diseases on the yield of commercial banana varieties of Kerala. In Global conference on banana and plantain, Bangalore, 28–31 October, 2002, Abstract pp. 155.

Corbaz, R. 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et Universitaire Romande, Lausane, Suisse.

Côte FX, Galzi S, Folliot M, Lamagnere Y, Teycheney PY, Iskra-Caruana ML. 2010. Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous Banana streak virus sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. Mol. Plant Pathol. 11:137–144.

D'Hont,A., Denoeud, F., Aury, J-M., Baurens, F-C., 1, Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., Da Silva, C., Jabbari, K., Cardi1, C. Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lengelle, J., Rodier-Goud, M., Alberti, A., Bernard, M. Correa, M., Ayyampalayam, S., Mckain, M.R., Leebens-Mack, J., Burgess, D., Freeling, M., Mbeguie-A-Mbeguie, D., Chabannes, M., Wicker, T., Panaud, O., Barbosa, J., Hribova, E., Heslop-Harrison, P., Habas, R., Rivallan, R., Francois, P., Poiron, C., Kilian, A., Burthia, D., Jenny, C., Bakry, B., Brown, S., Guignon, V., Kema, G., Dita, M., Waalwijk, C., Joseph, S., Dievart, A., Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi1, M., Dolezel, J., Roux, N., Risterucci, A-M., Weissenbach, J., Manuel Ruiz, M., Glaszmann, JC., Francis Quetier, F., Yahiaoui1, N., Wincker, P. 2012. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. Nature, vol 488, p 213-219.

Dahal, G. Hughes, J.d'A., Thottappilly, Lockhart, B.E.L. 1997b. Effect of temperature on symptoms expression and detection of *Banana streak badnavirus*. Phytopathology 87, S22.

Dahal, G., Hughes, J. d'A., Thottappilly, Lockhart, B.E.L. 1998. Effect of temperature on symptoms expression and reliability of *Banana streak badnavirus* detection in naturally infected plantain and banana (*Musa* spp).

Dale, L.J. 1987. Banana bunchy top : An Economically important tropical plant virus disease, Advances in virus Research 33, pp 301-325.

Dallot, S., Acuna, P., Rivera, C., Ramirez, P., Cote, F., Lockhart, B.E.L., Iskra-Caruana, M-L. 2001. Evidence that the proliferation stage of micro propagation procedure is determinant in the expression of Banana streak virus integrated into the genome of the FHIA21 hybrid (*Musa* AAAB). Archive of Virology 146, 2179-2190.

Darnell-Smith, G. P. 1924. " Bunchy top" disease in banana. *Queensland Agricultural Journal*, *2*, 169-179.

Dhed'a, D., Moango, M., Swennen, R. 2011. La culture de bananiers et bananiers plantains en République démocratique du Congo, support didactique. Media St Paul, Kinshasa, République démocratique du Congo.

Dheepa, R.P., Paranjothis, S. 2010. Transmission of *Cucumber mosaic virus* (CMV) infecting banana by aphid mechanical methods. Emir. Journal of Food Agriculture 22, 117-129.

Diekmann, M.P., Jeffries, C. 1989. *Musa* spp*:* Technical guidelines for the safe movement of germplasm, N°15, IPGRI, FAO.

Dizon, O.T., Damasco, P.O., Lobina, T.Irish, Pinilis, S.M., Lalusin, G.A., Natsuaki, T., Keiko, A. 2012. Induction of putative resistance lines of abaca (*Musa textilis*. Nee) to Banana bunchy top virus and Banana bract mosaic virus through in vitro mutagenesis. J.ISSAAS 18, 87-99.

Dowiya, N.B., Rweyemamu, C.L., Maerere, A.P. 2009. Banana (*Mus*a spp. Cola) cropping systems, production, constraints and cultivars preferences in Eastern Democratic Republic of Congo. Journal of Animal and Plant Science (JAPS) 4, 341-356.

Duroy P.-O, Perrier X., Laboureau N., Jacquemoud-Collet J.-P., Iskra-Caruana M.-L. 2016 How endogenous plant pararetroviruses shed light on Musa evolution. Annals of Botany, 117 (4): p. 625-641

Elengesa, M.B. 2006. Etude des filières du sous-secteur des cultures vivrières : Profil de filière de production des bananes. FAO-Projet GCP-DRC/031Bel. 46pp. RDCongo.

FAO. 2010. Développer des villes plus vertes en République démocratique du Congo. Coopération belge au développement, Italie.

FAOSTAT. 2016. Agricultural productions indices. Janvier, http://www.faostat.org.

Ferreira, A.S., Trujillo, E.E., Ogata, Y.D. 1997. *Banana bunchy to virus*. Plant Disease. University of Hawaii at Manao, Cooperative Extension Service Plant. PD-12.

Feschotte C., Gilbert C., 2012 Endogenous viruses : insights into viral evolution and impact on host biology. Nature Publishing group 13, 283-296.

Fish, S. 1970. The History of Plant Pathology in Australia. Annual Review of Phytopathology 8: 13–36.

Gatsinzi, F. 1987. Les principales maladies et ravageurs du bananier au sein de la C.E.P.G.L. Séminaire sur les maladies et les ravageurs des principales cultures vivrières d'Afrique Centrale. CTA et AGCD, Bujumbura, Burundi.

Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C., Bopda-Waffo, A., Hughes, J.D.A., Chen, J.S. 1999. Occurrence of *Banana streak badnavirus* on plantain and banana in 45 villages in southern Cameroon, Central Africa. Zeitschrift fur Pflanzenkran Kheiten und Pflanzenschutz 106, 174-180.

Gayral, P., Carlos, J., Noa-Carrazana, N., Lescot, M., Lheureux, F., Lockhart, E.L.B., Mutsumoto, Piffanelli, P., Iscra-Caruana, M-L. 2008. A single Banana streak virus integration event in the banana genome as the Origin of infectious endogenous Pararetrovirus. Journal of Virology 82, 6697-6710.

Geering, A.D.W., Parry, N.J., Thomas, E.J. 2011. Complete genome sequence of a novel Badnavirus, *Banana streak Imove virus.* Archives of Virology 156, 733-737.

Geering, A.D.W., Scharaschkin, T., Teycheney, P-Y. 2010. The classification and nomenclature of endogenous viruses of the family *Caulimoviridae*. Archives of Virology 155, 123-131.

Gold, C.S., Speijer, P.R., Karamura, E.B., Rakazambuga, N.D. 1994. Assessment of banana weevils in East African highland banana systems and strategies for control. Banana nematodes, borer weevil conference. Kuala Lumpur, Malaysia, 18-22 April INIBAP.

GRET. 2002. Memento de l'agronome. Cirad, CTA, Montpellier, France.

Gronenborn, B. 2004. Nanoviruses: genome organization and protein function. Veterinary Microbiology 98, 103-109.

Haible, D., Kober, S., Jeske, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnostic and genomic of geminiviruses. Journal of Virological Methods 135, 9-16.

Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, N.P., Samiyappan, R. 2009. Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus* Biological control 51, 16-25.

Harper, G., Dahal, G., Thottappilly, G., Hull, R. 1999. Detection of episomal *Banana streak badnavirus* by IC-PCR. Journal of Virological Methods 79, 1-8.

Harper, G., Hull, R. 1998. Cloning and sequence analysis of Banana streak virus DNA. Virus Genes 17, 271-278.

Harper, G.H., Hart, D., Moult, S., Hull, R. 2004. Banana streak virus is very diverse in Uganda. Virus Research 100, 51-56.

Harper, G., J. O. Osuji, J. S. P. Heslop-Harrison, and R. Hull. 1999. Integration of Banana streak badnavirus into the Musa genome: molecular and cytogenetic evidence. Virology 255:207–213.

Hauser, S., Sonder, K., Binsika Bi, M., Mafuka, M.M., Lema, K.M., Coyne, D., Van Asten, P., Legg, J., Abele, S., Allen, A., Hanna, R., Ajala, S., Abaidoo, R., Ingelbrecht, I., Dixon, A., Sanni, L., Winter, S., Kadiata, B., Janssens, M. 2007. Programme prioritaire de recherche agricole. Programme de réhabilitation de la recherché agricole et forestière en République démocratique du Congo. Projet n° 9 FAO, 91pp. Kinshasa, RDC.

Hohn, T., K. R. Richert-Po¨ggeler, G. Harper, T. Schwarzacher, C. H. Teo, P. Y. Techeney, M. L. Iskra-Caruana, and R. Hull. 2008. Evolution of integrated plant viruses, p. 58–81. In M. Roossinck (ed.), Plant virus evolution. Springer, Heidelberg, Germany

Hooper, D.U., Chapin, F.S.I., Ewel, J.J., Hector, A., inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J.H., Lodge, D.M., Loreau, M., Naeem, S., Wardle, D.A. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge and needs for future research. Ecological Monographs 75, 3-35.

Hu, J.S., Li, H.P., Barry, K., Wang, M., Jordan, R. 1995. Comparison of dot blot, ELISA and RT-PCR assays for detection of two *Cucumber mosaic virus* isolates infecting banana in Hawaii. Plant Disease 79, 902-906.

Hughes, J.d'A. 1997. *Banana streak badnavirus* research at the International Institute of Tropical Agriculture. Banana streak virus a unique virus-*Musa* interaction? Workshop of the Promusa virology-working group held. Inibap, Montpellier, France.

IFPRI. 2014. Republique démocratique du Congo : Analyse approfondie de las sécurité alimentaire et de la vulnérabilité (CFSVA), Kinshasa, DRC.
In C. R. Muthukrishnan, Abdul Chaser, & J. B. M. Md (Eds.), Proc. 13th national seminar

INIBAP. 1998. Les bananes. Cirad 16, Montpellier, France.

Iskra-Caruana M.-L., Baurens F.C., Gayral P., Chabannes M. 2010. A four-partner plant-virus interaction: enemies can also come from within. Molecular Plant-Microbe Interactions, 23(11) : 1394-1402.

Iskra-Caruana, M-L., Chabannes, M., Duroy, P-O., Muller, E. 2014. A possible scenario for the evolution of Banana streak virus in banana. Virus Research 186, 155-162.

Iskra-Caruana, M-L., Duroy, P-O., Chabannes, M., Muller, E. 2013. The common evolutionary hystory of badnaviruses and banana. Infection, Genetics and evolution 21, 83-89.

Iskra-Caruana, M-L., Lheureux, F., Teycheney, P-Y. 2003. Les pararétrovirus endogènes (EPRV), voie nouvelle de transmission des virus des plantes. Virologie 7, 255-265.

Jakowitsch J., Mette M.F., Van der Winden J., Matzke M.A., Matzke M.J. 1999. Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. PNAS 96,13241-13246.

James, A.P. 2011. Viruses of Banana in East Africa. Center for Tropical Crops and Biocommodities. PhD thesis, Queensland University of Technology, Australia.

James, A.P., Geijskes, R.J., Dale, J.L., Harding, R.M. 2011. Molecular scharacterisation of six badnavirus species associated with leaf streak disease of banana in East Africa. Annals of Applied Biology 158, 346-353.

Javer-Higginson, E., Acina-Mombole, I., Gonzalez, J.E., Font, C., Gonzalez, G., Echemendia, L.A., Muller, E., Teycheney, P-Y. 2014. Occurrence, prevalence and molecular diversity of *Banana streak viruse* in Cuba. Europ.J. Plant. Pathol 138, 157-166.

Jones, D. R. 1994. Risks involved in the transfer of banana and plantain germplasm. In: Jones, D. R. (ed.) The Improvement and Testing of Musa: a Global Partnership, Proceedings of the First Global Conference of the International Musa Testing Program held at FHIA, Honduras, 27-30 April 1994. INIBAP, Montpellier, France

Jones, D.R. 2000. Diseases of banana, abaca and enset. Ed. Cabi Publishing, London, UK.

Kagy, V., Mille, C., Mademba-Sy, F. 2000. Le puceron du bananier *Pentalonia nigronervosa* Coquerel (*Homoptera : Aphididae*) l'insecte vecteur de la maladie virale du bunchy top, protection phytosanitaire des cultures fruitières en Nouvelles Calédonie. Fiche technique n°3.5, Nouvelle Calédonie.

Kalonji-Mbuyi, A. 2008. Pathologie des principales plantes cultivées et principes de défense des végétaux. Notes de cours, Université de Lubumbashi,

Lubumbashi, République démocratique du Congo.

Karanja, L., Wangai, A., Harper, G., Pathak, R. 2008. Molecular identification of Banana streak virus isolates in Kenya. Journal of phytopathology 156, 678-686.

Kesavamoorthy, R. C. 1980. Radical changes in ecosystem in the Pulney hills.

King, M.Q., Adams, M. J. Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. 2012. Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of viruses. 9th Report of International Committee on Taxonomy of viruses. London, UK.

Kouassi, N.K., Wendy, M., Boonham, N., Smith, J. 2010. Developement of diagnostic protocol for *Cucumber mosaic virus* for screening banana (*Musa* spp) planting material in Ivory Coast. Acta Hortculturae 879, 547-552.

Kubirika, J., Tushemereirwe, W. 2001. Occurrence of virus diseases on bananas and plantain in Africa. Naro, Kampala, Uganda. pp 312-316.

Kumar, L.P., Hanna, R., Alabi, O.J., Soko, M.M., Oben, T.T., Vangu, G.H.P., Naidu, R.A. 2011. *Banana buchy top virus* in Sub-Saharan African: Insvestigations on virus distribution and diversity. Virus Research 159, 171-182.

Kumar, L.P., Selvarajan, R., Iskra- Caruana, M-L., Chabannes, M., Hanna, R. 2015. Biology, etiology and control of virus diseases of banana and plantain. Advances in Virus Research 91, 229-269.

Kuriba, J., Legg, J.P., Tushemereirwe, W., Adapala, E. 2001. Disease spread patterns of Banana streak virus in farmer's fields in Uganda. Annals of Applied Biology 139, 31-36.

Lafleur, D.A., Lockhart, B.E.L., Olszewski, N.E. 1996. Portion of Banana streak badnavirus genome are integrated in the genome of its host Musa sp. Phytopathology (supplement) 86, 100.

Lapitan, L.D.S., Guo, Y., Zhou, D. 2015. Nano-enabled bioanalytical approaches to ultrasensitive detection of low abundance single nucleotide polymorphisms. Analyst 140, 3872.

Lassoudière, A. 2007. Le bananier et sa culture. Ed. Quae, 383p, Versailles, France, 383p

Lassoudière, A. 2012. Le bananier, un siècle d'innovations techniques. Ed Quae, 380p, Versailles, France.

Lefort-Buson, M., Hebert, Y., Damerval, C. 1988. Les outils d'évaluation de la diversité génétique et phénotypique. Agronomie, EDP Sciences 8, 173-178.

LeProvost, G., Iskra-Caruana, M-L., Acina, I., Teycheney, P-Y. 2006. Improved detection of episomal Banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. Journal of Virological Methods 137, 7-13.

Lheureux, F., Careel,F., Jenny,C. Lockhart, B.E.L, and Iskra-Caruana, M.L (2003). Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific Musa hybrids TAG Theoretical and applied Gentics 106, 594-598.

Lheureux, F., Laboureau, N., Muller, E., Lochart, E.L., Iskra-Caruana, M.L. 2007. Molecular characterization of *Banana streak acuminata Vietnam virus* isolated from *Musa acuminata* siamea (banana cultivar). Archive of Virology 152, 1409-1416.

Lockhart, B.E.L. 1986. Purification and serology of a bacilliform virus associated with Banana streak disease. Phytopathology 76, 995-999.

Lockhart, B.E.L. 1995. *Banana streak badnavirus* infection in *Musa*: Epidémiology, diagnostic and control. Departement of plant pathology, Université of Minnesota, USA.

Lockhart, B.E.L. 2002. Management of viral diseases of banana. Associacion de bananeros de Colombia, Augura. Colombia. pp217-221.

Lockhart, B.E.L., Jones, D.R. 2000. Banana mosaic *in* Diseases of banana, abaca and enset. Cabi Publishing, UK. pp256-263.

Lockhart, B. E., J. Menke, G. Dahal, and N. E. Olszewski. 2000. Characterization and genomic analysis of Tobacco vein clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. J. Gen. Virol. 81:1579–1585.

Lockhart, B.E.L., Olszewski, N.E. 1993. Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak badnavirus* : implications for virus detection in *Musa* germplasm. Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pest. International network for the improvement of banana and plantain. Conference procedeengs, Montpellier, France.

Mansoor, S.Qazi, J., Amin, I., Khatri, A., Khan, A.I., Raza, S., Zafar, Y., Bridon, R.W. 2005. A PCR- based method, with internal control for the detection of *Banana bunchy top virus* in banana. Molecular

biotechnology 30, 167-169.

Matthew, R.E.F.1992. Fundamental plant virology. Academic press, Sandiego, USA

Miller, S.A., Beed, F.D., Harmon, C.L. 2009. Plant disease diagnostic capabilities and networks. Ann. Rev. Phytopathol 47, 15-38.

Minagri. 2012. Rapport annuel de production agricole. Unpublish data, Kinshasa, République démocratique du Congo. 203p

Minplan 2005. Monographie de la province du Bas-Congo. UPPE-SRP, Kinshasa, République démocratique du Congo. 204p

Minplan 2005. Monographie de la ville province de Kinshasa, UPPE-SRP, Kinshasa, République démocratique du Congo. 172p.

Mobambo, P., Staver, C., Hauser, S., Dheda, B., Vangu, G. 2010. An innovation capacity analysis to identify strategies for improving plantain and banana (*Musa* spp.) productivity and value addition in the Democratic Republic of Congo. Acta Horticulturae 879, 821-828.

Monde, G. 2010. Epidémiologie, diversité génétique et phylogéographie des virus de la mosaïque africaine du manioc dans la région de Yangambi en République démocratique du Congo. phD thesis, Earth and Life Institute –Applied Microbiology- Phytopathology. Université catholique de Louvain, Belgique. 177p

Montcel, T.H. 1987. Plantain bananas. The tropical agriculturalist, CTA. 106p

Mori, Y., Notomi, T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. Japanese society of chemotherapy and the Japanese association for infectious diseases 15, 62-69.

Mukwa, L.F.T., Muengula, M. Zinga, I., Kalonji, A., Iskra-Caruana, M-L., Bragard, C. 2014. Occurrence and Distribution of *Banana bunchy top virus* related Agro-ecosystem un South Western, Democratic Republic of Congo. American Journal of Plant Sciences 5, 647-658.

Mware, O.B. 2016. Developpement of Banana bunchy top virus resistance in Banana: RNAi Approach. Thesis. Queensland university of technology.

Ndowara, T., Dahal, G., Lafleur, D., Harper, G., Hull, R., Olszewski, N.E., Lockhart, B.E.L. 1999. Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated Pararetroviral Sequences. Virology 255, 214-220.

Niyongere, C., Losenge, T., Ateka, M.E., Nkezabahizi, D., Blomme, G., Lepoint, P. 2012. Occurrence and distribution of Banana bunchy top disease in the great lakes region of Africa. Tree and Forestry Science and Biotechnlology 6, 102-107.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hse, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28, 12- 63.

Nsumbu, M.F. 2005. Monographie de la province du Bas-Congo. Ministère du Plan, Republique démocratique du Congo, 203pp.

on banana production technology (pp. 23–28). Coimbatore : TNAU.

Onautshu, O.D. 2013. Caractérisation des populations de *Mycosphaerella fijiensis* et épidémiologie de la Cercosporiose noire du bananier (*Musa* spp) dans la région de Kisangani, République Démocratique du Congo. pHD thesis, Earth and life Institute-Applied Microbiology-Phytopathology, Université catholique de Louvain, Belgique. 319p.

Opiyo, S.A., Ateka, E.M., Owuor, P.O., Manguro, L.O.A., Karuri, H.W. 2010. Survey of sweet potato viruses in western Kenya and detection of Cucumber mosaic virus. Journal of Plant pathology 92, 797-801.

Ortiz, R., Frison, E., Sharrock, S. 2002b. Future harvest programm for *Musa* in Africa. Chronica Horticulturae 42, 18-24.

Owen, J., Shintaku, Aeschleman, P., Ben Tahar, P., Palukitis, P. 1990. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of *Cucumber mosaic virus* (CMV) strains: CMV-RNA3. Journal of General Virology 71, 2243-2249.

Panis, B. 2009. Cryoconservation de matériel génétique de bananier. Guide techniques, Biodiversity International, Montpellier, France. 48p.

PapaKin 2013. Document de conception de programme : Rapport principal et annexes. Programme d'approvisionnement de Kinshasa en produits vivriers et maraichers. Kinshasa, République démocratique du Congo. 172pp.

Paul VI. 1967.Lettre encyclique sur le developpement des peuples : *Populorum progression*. *Libreria edictrice vaticana*, Vatican.

Pennazio, S., Roggoro, P., Conti, M. 1996. Yield losses in virus-infected crops. Arch phytopathology, 30, pp283-296.

Péréfarres, F., Leprovost, G., Acina, I., Lockhart, B.E.L., Allah, D.A., Iskra-Caruana,

M-L., Canderesse, T., Teycheney, P-Y. 2009. Detection, incidence and diversity of Banana streak viruses, Banana mild mosaic virus and Banana virus x in Guadeloupe. Acta Horticulturae 828, 205-212.

Ploetz, R. 2007. Disease of tropical perrenial crops. Challenging problems in diverses environments. Plant Disease 91, 644-663.

Ploetz, R.C. 1994. Bract mosaic. *In* Compedium of tropical fruit diseases. Ed. APS, London, UK.

Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B. 2000. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on taxonomy of viruses. International Committee on taxonomy of viruses, USA.

Richert-Po¨ggeler, K. R., F. Noreen, T. Schwarzacher, G. Harper, and T. Hohn. 2003. Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia. EMBO J. 22:4836–4845

Robson, D.J., Wright, G.M., Almeida, P.P.R. 2006. Within-Plant distribution and binomial sampling of *Pentalonia nigronervosa* (Hemiptera: Aphididae) on banana. Journal of econ. Entomology 99, 2185-2190.

Rodoni, B.C. 1997. Identification and characterization of *Banana bract mosaic virus* in India. Plant Disease 81, 669-672.

Roossinck, M.J. 2001. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution. Molecular Plant Pathology 2, 59-63.

Roossinck, M.J. 2002. Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by Phylogenetic analyses. Journal of Virology 76, 3382-3387.

Roossinck, M.J., Bujarski, S.W., Ding, R., Hajimorad, K., Hanada, S., Scott, Tousignant, M. 1999. Family Bromoviridae, pp 923-935, Virus Taxonomy-Seventh report of the International Committee on taxonomy of viruses, In Regenmortel, M.H.V., Fouquet, C.M., Bishop, D.H.L. Academic Press, SanDiego. Pp 923-935.

Rybicki, E.P. 2015. A top ten list for economically important plant viruses. Arch. Virol. 160, 17-20.

Sastry, K.S. 2014. Plant virus and viroid diseases in the tropics: Epidemiology and Managment. Vol II, Springer, India. 489P

Selvarajan, R., Balasubramanian, V. 2014. Host interaction host–virus interactions in banana-infecting viruses. In R. K. Gaur, Thomas Hohn, & Pradeep Sharma (Eds.), Plant virus–host interaction molecular approaches and viral evolution (pp. 57–78). MA, USA: Elsevier Academic Press.

Selvarajan, R., Balasubramanian, V., Kavitha, K.S. Sathiamoorthy, S., Ahlawat, Y.S. 2008. Detection of *Banana bunchy top virus* and Banana streak Mysore virus by PCR: impact of storing virus infected banana samples. Indian journal of virology 19, 155-115.

Selvarajan, R., Sheeba, M.M., Balasubramanium, V. 2011. Simultaneous detection of episomal *Banana streak Mysore virus* and *Banana bunchy top virus* using multiplex RT-PCR. Current Science 100, 31-34.

Sen, A.K. 1981. Poverty and famines an essay on entitlement and deprivation. Oxfrod. Univers. Press. Oxford. UK.

Sharman, M., Gambley, F.C., Oloteo, O.E., Abgona, R.V.J., Thomas, J.E. 2000. First record of natural infection of abaca (*Musa textilis*) with Banana bract mosaic potyvirus in the philippines. Australian Plant Pathology 29, 69.

Sharman, M., Thomas, J.E., Dietzgen, G.R. 2000. Development of a multiplex Immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. Journal of Virology Methods 89, 75-88.

Smith, J.J., Waage, J., Woodhall, W.J., Sam, J., Bishop, J.S., Spence, J.N. 2008. The challenge of provinding plant pest diagnostic services for Africa. Europ. J. Plant. Pathol 121, 365-375.

Soko, M.M., Dale, J., Kumar, P.L., James, A., Izquierdo, L., Fiaboa, K., et al. 2009. Banana bunchy top disease survey reports, previous control efforts and the way forward (p. 200). Limbe, Malawi: Bvumbwe Agricultural Research Station, P.O. Box 5748.

Stainton, D., Kraberger, S., Walters, M., Wiltshire, J.E., Rosario, K., Halafihi, M., Lolohea, S., Katoa, I., Faitua, H.T., Aholelei, W., Taufa, L., Thomas, J.E., Collings, D.A., Martin, P.D., Varsani, A. 2012. Evidence of inter-component recombinations, intra-component recombination and reassortment in *Banana bunhy top virus*. Journal of General Virology 93, 1103-1119.

Stainton, D., Martin, D.P., Muhire, B.M., Lolohea, S., Halafihi, M., Lepoint, P., Blomme, G., Grew, S.K., Sharman, M., Krabergers, S., Dayaram, A., Walters, M., Collings, A. Mabvakure, B., Lemey, P., Harkins, W., Thomas, J.E., Varsani, A. 2015. The global distribution of *Banana*

bunchy top virus reveals little evidence for frequent recent, Human-mediated long distance dispersal events. Virus Evolution 1, vev009.

Swennen, R., Sharrock, S., Frison, E. 2000. Biotechnology in support of smallholders cultivating bananas in the tropics. Sustainable agriculture in the new millenium : the impact of biotechnology on developing countries. Conference proceddengs, 28-31may, Brussels, Belgium.

Teycheney, P-Y., Laboureau, N., Iskra-Caruana, M-L., Candresse, T. 2005. High genetic varaibility and evidence for plant-to plant transfer of *Banana mild mosaic virus*. Journal of general Virology 86, 3179-3187.

Teycheney, P-Y., Marais, A., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M-J., Candresse, T. 2005. Molecular characterization of *Banana virus x* (BVX) a novel member of the flexiviridae family. Archives of Virology 150, 1715-1727.

Thomas, J.E. 2004. Les défis : sécurité alimentaire et cultures de rente pour l'exportation, principales orientations et avangates comparatifs de l'agriculture en République Démocratique du Congo. Kinshasa, RDC. 34p.

Thomas, J.E., Geering, A.D.W., Gambley, C.F., Kessling, A.F., White, M. 1997. Purification, properties and diagnosis of Banana bract mosaic potyvirus and its distribution from abaca ùosaic potyvirus. Phytopathology 87, 698-705.

Thomas J, M-L Iskra-Caruana, P Lava Kumar, N Roux, M Chabannes, S Massart, Y Mathieu, R Chase, I Van den houwe. 2015 Position paper on a strategy to distribute banana (Musa) germplasm with endogenous Banana streak virus genomes. Musanet. https://sites.google.com/a/cgxchange.org/musanet/news/finalpositionpaperonthestrategytodistributebananastreakvirusbsvinfectedgermplasm

Thomas, J.E., Iskra-Caruana, M-L. 2000. Consultancy on the eradication of BBTV in New Caledonia. Cirad, pp1-25, Montpellier, France.

Thomas, J.E., Iskra-Caruana, M-L., Jones, D.R. 1994. Maladies de bunchy top du bananier. Fiche technique n°4. Inibap, Montpellier, France.

Thomas, J.E., Iskra-Caruana, M-L., Magnaye, L.V., Jones, D.R. 2000. Bract mosaic. *In* Disease of banana, abaca and enset. Pp 253-256, Cabi Publishing, London, UK.

Thomas, J.E., Lockhart, B.E.L., Iskra-Caruana, M-L. 2000. Banana mild mosaic. *In* Diseases of banana, abaca and enset. Cabi Publishing, London, UK. pp

275-278.

Tollens, E. 2004. Les défis : sécurité alimentaire et cultures de rente pour l'exportation. Pricipales orientations et avantages comparatifs de l'agriculture en R.D.Congo. Alliance Belgo-Congolaise, K.U.Leuven. Leuven, Belgique.

Triparthi, L., Mwangi, M., Abele, S., Aritua, V., Tushemereirwe, K.W., Bandyopadhyay. 2009. Xanthomonas wilt, a threat to banana production in East and Central Africa. Plant disease 93, 440-451.

Tushemereirwe, W., Kangire, A., Ssekiwoko, F., Offord, L.C., Crozier, J., Boa, E., Rutherford, M., and Smith, J.J. 2004. First report of Xanthomonas campestris pv musacearum on banana in Uganda. Plant Pathol.53: 802.

Tushemereirwe, W.K., Bagabe, M. 1999. Review of disease distribution and pest statut in Africa. Review of IPM Research Activities-Pathology, 139-147.

Tushemereirwe, W.K., Karamura, B.K., Karyeija, R. 1999. Association du virus de la mosaîque en tirets (BSV) et d'un virus filamenteux non identifié sur les bananiers d'altitude en Ouganda. Infomusa ,5, 8-12.

Van Asten, P.J.A., Wairegi, L.W.I., Mukasa, D., Uringi, N.O. 2011. Agronomic and economic benefits of coffee-banana intercropping in Uganda's smallholder forming systems. Agricultural Systems 104, 326-334.

Vancutsem, C., Pekel, J-F., Evrad, C., Malaise, F., Defourny, P. 2006. Carte de l'occupation du sol de la République démocratique du Congo au 1 : 300.000, Notice explicative, Presse Universitaire de Louvain. Université catholique de Louvain, Louvain, Belgique.

Vandamme, J. 2013. Analyse systémique des processus d'innovation dans les systèmes agraires de la région des grands lacs basés sur la culture de la banane. Thèse de doctorat, Université catholique de Louvain, Belgique.

Vandenput, R.1981. Les principales cultures en Afrique centrale. Les presses de l'imprimerie Lesaffre, Tournai, Belgique.

Viljoen, A. 2010. Protecting the African banana (*Musa* spp.): Prospects and challenges. Acta Horticulturae 879, 305-313.

Voelkl, W., Stechmann, D.H., Stary, P. 1990. Suitability of five species of Aphidiidae (Hymenoptera) for the biological control of the banana aphid Pentalonia nigronervosa Coq. (Homoptera, Aphididae) in the South Pacific.

Tropical Pest Management, 36: 249-257.

Wanitchakorn, R., Hargin, R.M., Dale, J.L. 1997. *Banana bunchy top virus* DNA-3 encodes the viral coat protein. Arch. Virol.142, 1673-16780.

Wardlaw, C.W. 1961. Banana diseases including plantains and abaca. Longmans, London, UK.

WWW.Viralzone. Expasy.org

Yu, C., Jianxiang, W., Zhou, X. 2005. Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. Journal of Virological Methods 123, 155-161.