

Effet de l'interaction *in vitro* et *in vivo* entre *Aspergillus niger*, *Mucor sp.* et *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phoma sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp*

Juliette DEDI^{1*}, Atcho OTCHOUMOU² et Kouassi ALLOU³

¹Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, Université d'Abobo-Adjamé, UFR-SN, 01 BP 8133 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

²Laboratoire de Biologie et Cytologie Animale, Université d'Abobo-Adjamé, UFR-SN, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

³CNRA Adiopodoumé, km 17, route de Dabou, 01 BP 1740 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

* Correspondance, courriel : mmededijuliette@yahoo.fr

Résumé

Les essais de confrontation directe sur milieu de culture (PDA) entre *Mucor sp.*, *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*; *Fusarium solani*; *Phoma sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* ont révélé que : *Mucor sp.* a pu réduire la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* de 65,25 % et celle de *Fusarium solani* de 54,25 % ; *Aspergillus niger* a inhibé la croissance de *Fusarium oxysporum* de 92,30 % et celle de *Phoma sp.* de 87,40 % par rapport au témoin après 10 jours d'incubation à 28,28°C. A quatre jours d'incubation, *Mucor sp.* envahit les cinq champignons sur lesquelles il sporule montrant ainsi son pouvoir myco-parasitaire. Des résultats intéressants montrant le pouvoir antagoniste de *Mucor sp.* et d'*Aspergillus niger* ont également été obtenus suite à l'inoculation de la sciure de bois stérilisée sur laquelle a été mis à incuber les œufs d'*Achatina fulica*. *Mucor sp.* et *Aspergillus niger* associés séparément à chacun des cinq champignons ont réduit le taux d'éclosion par rapport au témoin (85,17 %).

Mots-clés : *confrontation, inoculation, Mucor sp., Aspergillus niger, mycelium, inhibition.*

Abstract

Effect of *in vitro* interaction and *in vivo* between *Aspergillus Niger*, *Mucor sp.* and *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phoma sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*

Tests of direct confrontation on culture medium (PDA) between *Mucor sp.*, *Aspergillus Niger* and *Fusarium oxysporum*; *Fusarium solani*; *Phoma sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* revealed that: *Mucor sp.* could invade the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* of 65,25 % and that of *Fusarium solani* of 54,25 %; *Aspergillus Niger* has inhibited the growth of *Fusarium oxysporum* of 92,30 % and that of *Phoma sp.* from 87,40 % compared to the witness after 10 days of incubation to 28,28°C. A four days of incubation, *Mucor sp.* invaded the five mushrooms on which it sporuled thus showing its myco-parasitic capacity. Interesting results showing the antagonistic capacity of *Mucor sp.* and *Aspergillus Niger* were also obtained following the sterilized inoculation sawdust on which was put to incubate eggs of *Achatina fulica*. *Mucor sp.* and *Aspergillus Niger* separately associated with each of five mushrooms reduced the rate of blossoming compared to the witness (85,17 %).

Keywords : *confrontation, inoculation, Mucor sp., Aspergillus Niger, mycelium, inhibition.*

1. Introduction

Niger et *Mucor sp.* font partis des champignons ayant un pouvoir myco-parasitaire vis-à-vis d'un certain nombre de champignons. Le contrôle de ses deux champignons n'est pas aisé car lorsqu'ils s'installent, il est difficile de les déloger. Dans le but d'identifier ces champignons, le présent travail consiste à étudier in vitro l'interaction entre *Aspergillus niger*, *Mucor sp.* et *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phoma sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* et d'évaluer l'effet de ces deux champignons sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* sur la sciure de bois stérilisée et inoculée.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel biologique

Les isolats (**Tableau 1**) d'*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor sp.*, *Phoma sp.*, *Penicillium sp.* et *Trichoderma sp.* utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir de la litière d'élevage (LE), et des substrats d'incubation d'œufs de l'escargot *Achatina fulica* que sont le sol de forêt vierge (SFV), le sol de plantation (SP), la sciure de bois (SB), le coton hydrophile (CH), et les bourres de noix de coco (BNC). Ses substrats sont prélevés des bacs avant et après l'éclosion (2 semaines) des œufs d'*Achatina fulica*. Tous ses champignons ont été isolés sur milieu PDA à une température moyenne de 28,28°C et identifiés à l'aide de clés d'identification [1-3]. Les cultures utilisées pour ces essais sont âgées de sept jours.

La sciure de bois (SB) est constituée du mélange des espèces suivantes : l'Iroko (*Milicia excelsa* ou *Milicia rejia*), l'Acajou (*Khaya ivorensis* ou *Khaya grandifoliola*) et le Samba (*Triplochiton scleroxylon*) [4]. La sciure de bois est choisie comme substrat d'incubation parce que c'est un très bon conservateur d'humidité qui assure une bonne aération, empêche les œufs de sécher, de se briser et donne le meilleur taux d'éclosion [5].

Tableau 1 : Isolats des différents champignons utilisés dans cette étude [4]

| Isolats | Substrats | Date d'isolement |
|--------------------------------------|-----------|------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> (An) | BNC | 2007 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> (FO) | LE | 2006 |
| <i>Fusarium solani</i> (FS) | LE | 2006 |
| <i>Mucor sp.</i> (M.sp.) | SB | 2007 |
| <i>Phoma sp.</i> (PHO.sp) | SP | 2006 |
| <i>Penicillium sp.</i> (P.sp.) | CH | 2007 |
| <i>Trichoderma sp.</i> (TRICHO. Sp.) | SFV | 2007 |

2-2. Méthodes

L'activité antagoniste in vitro a été utilisée selon la méthode de confrontation directe. La confrontation par contact directe sur milieu de culture consiste à placer dans la même boîte de Pétri contenant le PDA deux pastilles gélosées (1 cm de diamètre). Les deux pastilles sont placées de part et d'autre de la boîte de Pétri et à équidistance du centre de la boîte. Les repiquages sont effectués en même temps [6]. L'incubation est réalisée à 28,28°C pendant dix jours. Des notations concernant l'inhibition de la croissance des colonies de

FO, FS, PHO.sp., P.sp. et *TRICHO.sp.* par *Aspergillus niger* et *Mucor sp.* sont effectuées tous les deux jours. Le témoin est constitué par le repiquage du champignon non traité dont la croissance du mycélium est inhibée. La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée lorsque les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boîte dans les lots témoins. L'évaluation de l'inhibition est calculée suivant la formule :

$$I\% = \left(1 - \frac{C_n}{C_o}\right) \times 100 \quad (1)$$

C_n = diamètre moyen des colonies en présence de *Mucor sp.* ou d'*Aspergillus niger*.

C_o = diamètre des colonies témoins de *Phoma sp., Penicillium sp., Fusarium oxysporum, Fusarium solani* et *Trichoderma sp.*

Dans le but de tester l'effet antagoniste d'*Aspergillus niger* et *Mucor sp.* sur les cinq champignons, un assai d'association (2 à 2) in vivo de ses champignons sur la sciure de bois stérile est mis en place. Dans ce cas les champignons sont repiqués séparément dans des boîtes de Pétri stériles sur milieu PDA avant d'être associés dans le même bac.

L'inoculation du substrat : dans un erlen stérile contenant 600 mL d'eau distillée stérile, la souche pure (2 boîtes) du champignon âgé d'une semaine est bien mélangée à l'eau. La suspension homogène obtenue est l'inoculum. Chacun des trois bacs d'incubation contenant 40 g du mélange homogène «substrat plus maïs» est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes à une barre. L'inoculum est bien incorporé au substrat à raison de 200 mL par bac à l'aide d'une spatule stérile (à chaque suspension du même champignon sa spatule). L'opération est effectuée sous la hotte. L'inoculation est faite séparément d'abord avec chacune des souches et ensuite associé à *Aspergillus niger* puis à *Mucor sp.* Les bacs reçoivent chacun 15 œufs provenant de la ponte du jour d'*Achatina fulica* et sont mis à incuber à l'obscurité à 28,28°C pendant 14 jours. Le témoin non traité reçoit également 15 œufs. Après le temps d'incubation, le nombre d'éclos est déterminé et le pourcentage d'éclosion calculé suivant la formule :

$$TE (\%) = \frac{NN}{NO} \times 100 \quad (2)$$

NN = Nombre de Naissains

TE = Taux d'Éclosion

NO = Nombre d'œufs

3. Résultats

Croissance de *Penicillium sp., Fusarium solani, Trichoderma sp. Phoma sp.* et *Fusarium oxysporum* par rapport à *Aspergillus niger*.

Au bout de quatre jours, d'incubation, *Aspergillus niger* occupe plus de la moitié de la boîte (**Figures 1 et 2**) Au 10^{ième} jour, seul *Phoma sp.* est envahit par *Aspergillus niger*.

Par rapport à An les cinq champignons n'occupent respectivement qu'une surface de 5,28 cm, 3,4 cm, 3,38 cm, 1,14 cm et 0,70 cm de diamètre (**Figure 3**).

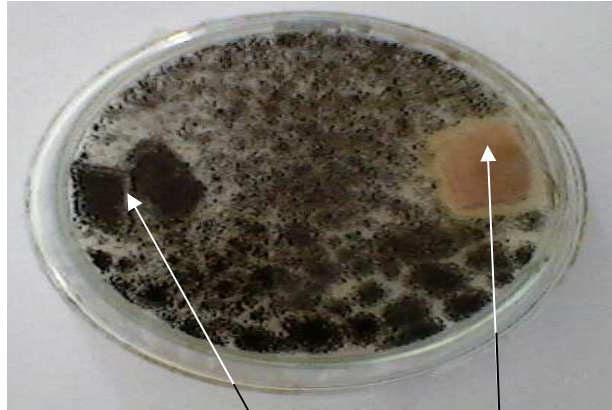


Figure 1 : *Aspergillus Niger* + *Phoma sp*

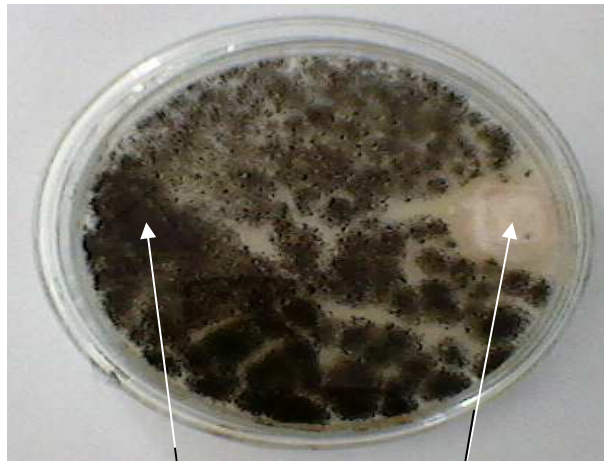


Figure 2 : *Aspergillus Niger* + *Fusarium Oxysporum*

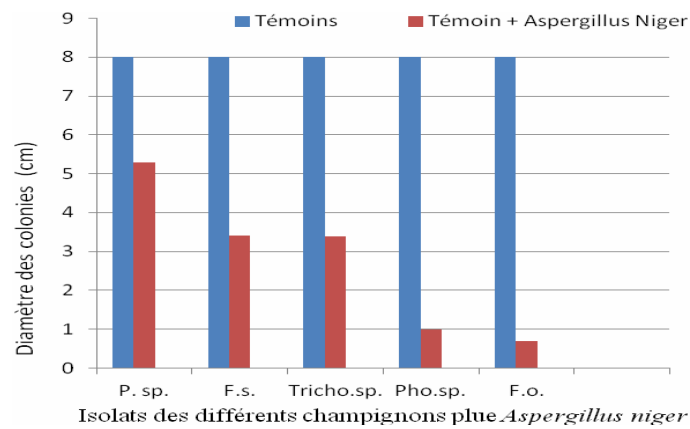


Figure 3 : Diamètre des colonies de: *P. sp.*, *F.s.*, *Tricho. sp.*, *Pho. sp.* et *F.o.* en présence d'*Aspergillus Niger* après 10 jours d'incubation

Croissance de *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Phoma sp.*, *Fusarium solani.*, et *Fusarium oxysporum* par rapport à *Mucor sp.*

Au bout de 4 jours, *Mucor sp.* a totalement envahi les cinq champignons (**Figures 4 et 5**) qui n'occupent respectivement qu'une surface de 7,9 cm, 7,68 cm, 6,44 cm, 3,66 cm et 2,78 cm de diamètre. *Mucor sp.* envahit *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* et *Phoma sp.* mais n'affecte pas vraiment leur croissance. La croissance d'*Aspergillus niger* et de *Mucor sp.* est de 8 cm (**Figure 6**).

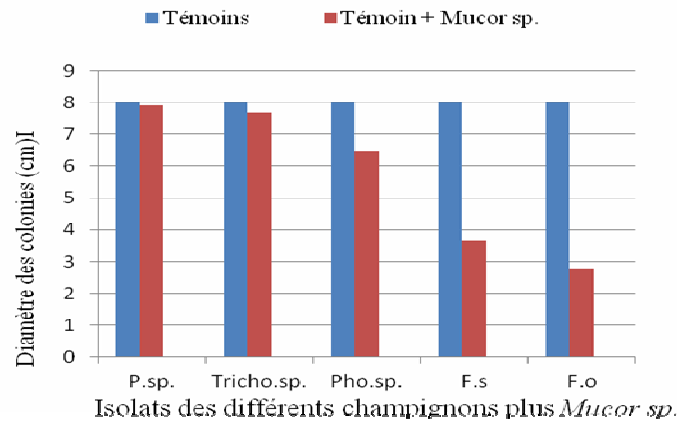


Figure 4 : Diamètre des colonies de *P.sp.*, *Tricho.sp.*, *Pho.sp.*, *F.s* et *F.o.* en présence de *Mucor sp.* après 10 jours d'incubation

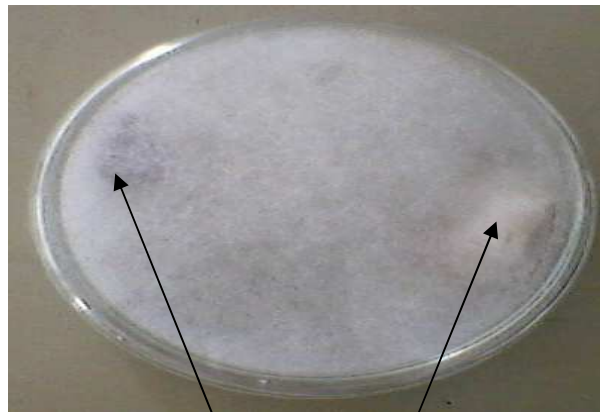


Figure 5 : *Mucor sp* + *Fusarium Oxysporum*

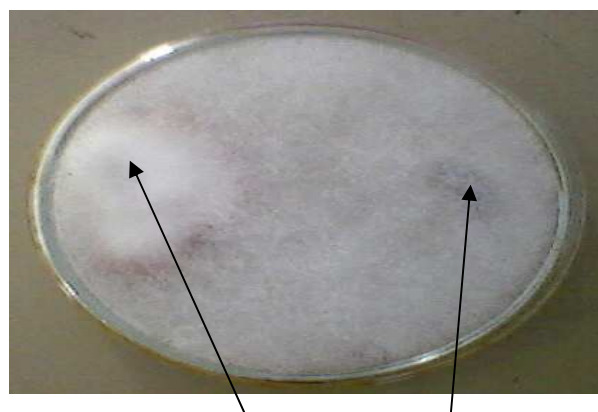


Figure 6 : *Fusarium Solani* + *Mucor sp*

Inoculation de la sciure de bois stérilisée par les différents champignons

L'inoculation de la sciure de bois par *Aspergillus niger* et *Mucor sp.* donnent les taux d'éclosion les plus faibles (8,88 % et 29,62 %) par rapport au témoin (85,17 %). Associé séparément aux cinq champignons, ils n'améliorent pas le taux d'éclosion. Ses derniers sont plutôt réduits (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* après inoculation

| Champignons | Taux d'éclosion (%) |
|--|---------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 8,88 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 51,84 |
| <i>Fusarium solani</i> | 84,29 |
| <i>Mucor sp.</i> | 29,62 |
| <i>Penicillium sp.</i> | 67,40 |
| <i>Phoma sp.</i> | 57,40 |
| <i>Trichoderma sp.</i> | 31,10 |
| <i>Aspergillus niger</i> + <i>Fusarium oxysporum</i> | 35,55 |
| <i>Aspergillus niger</i> + <i>Fusarium solani</i> | 28,88 |
| <i>Aspergillus niger</i> + <i>Penicillium sp.</i> | 15,55 |
| <i>Aspergillus niger</i> + <i>Phoma sp.</i> | 42,21 |
| <i>Aspergillus niger</i> + <i>Trichoderma sp.</i> | 0,00 |
| <i>Mucor sp.</i> + <i>Fusarium oxysporum</i> | 13,33 |
| <i>Mucor sp.</i> + <i>Fusarium solani</i> | 0,00 |
| <i>Mucor sp.</i> + <i>Penicillium sp.</i> | 44,44 |
| <i>Mucor sp.</i> + <i>Phoma sp.</i> | 24,44 |
| <i>Mucor sp.</i> + <i>Trichoderma sp.</i> | 0,00 |

4. Discussion

Au bout de quatre jours d'incubation, *Mucor sp.* envahit les cinq colonies mais n'empêche pas vraiment le développement de *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* et *Phoma sp.* Cependant, la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* est inhibée à 65,25 % et celle de *Fusarium solani* à 54,25 %. Au delà de cette période, *Mucor sp.* sporule sur celles-ci et révèle son pouvoir parasitaire et antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* à cause de son taux d'inoculum élevé dans le milieu.

Au bout de quatre jours d'incubation, *Aspergillus niger* n'envahit aucune des colonies. Le dixième jour, seul *Phoma sp.* est envahit par *Aspergillus niger*. Le pouvoir antagoniste *Aspergillus niger* va croissant de *Penicillium sp.* à *Fusarium oxysporum* ce qui correspond à une inhibition comprise entre 41,40 % à 92,30 %. Le pouvoir antagoniste d'*Aspergillus niger* est très importante vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* et de *Phoma sp.* qui s'est très peu développés en présence de An. An est devenue impropre au développement de *Fusarium oxysporum* et de *Phoma sp.* parce qu'il occupe vite tout le milieu au détriment des autres champignons.

Chez les champignons, la chitine est un constituant essentiel de la paroi qui entoure et protège les cellules fongiques vis-à-vis de l'environnement. La paroi cellulaire est donc essentielle pour la croissance fongique et pour la résistance du champignon aux agressions externes. Son altération liée à la virulence de

l'inoculum par exemple, entraînerait une altération du mycélium, filament qui forme de longues chaînes de cellules qui se traduira par une agrégation, une rétraction et une vacuolisation du cytoplasme [6] ce qui illustre le pouvoir hautement myco-parasitaire que possède *Aspergillus niger* et *Mucor sp.* Une importante lyse au niveau du mycélium [8], ou une dissolution du cytoplasme [9] pourrait également être la cause de l'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et de *Phoma sp.*

5. Conclusion

Cette étude a montrée l'effet antagoniste de *Mucor sp.* et d'*Aspergillus niger* vis-à-vis de *Phoma sp.*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium sp.* et *Trichoderma sp.* *Mucor sp.* et *Aspergillus niger* responsables du faible taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* sur la sciure de bois stérilisée et inoculée. En effet, les effets de confrontation directe entre *Mucor sp.*, *Aspergillus niger* et les cinq autres champignons sur milieu de culture ou incorporé au substrat d'incubation des œufs d'*Achatina fulica*, a montré un développement de *Mucor sp.* et d'*Aspergillus niger* réduisant ou inhibant la croissance mycélienne des champignons d'une part et d'autre part réduisant le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* sur la sciure de bois stérilisée et inoculée. Nous pouvons dire que *Mucor sp.* et *niger* ont un pouvoir hautement parasitaire vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Phoma sp.* En se basant sur ses résultats, *Aspergillus niger* et *Mucor sp.* pourraient être utilisés en tant qu'agent de lutte biologique contre *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et à un degré moindre contre *Phoma sp.*

Références

- [1] - H. L. BARNETT and B. HUNTER BARRY, Illustrated genera of imperfecti fungi. Third edition. *Burgess Publishing Company*. Minneapolis, USA, (1972) 241.
- [2] - B. BOTTON, A. BRETON, M. FEVRE, PH. GUY, J. P. LARPENT et P. VEAU, Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Collection biotechnologies. 2^e édition, Masson. Paris Milan Barcelone Mexico (1990) 498.
- [3] - R. CHAMPION, Identifier les champignons transmis par les semences. INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) 147, rue de l'Université, 75338 Cedex 07, (1997) 398.
- [4] - J. K. DEDI, Inventaire et influence des champignons d'une litière d'élevage et de substrats sur la durée d'incubation et le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* Bowdich. DEA. Option : Biologie et Protection des Végétaux. Université d'Abobo-Adjamé (Côte d'Ivoire), (2007) 54.
- [5] - J. T. C. CODJIA et C. G. N. NOUMOVI, Guide technique d'élevage N°2 sur les escargots géants. Éditeur B.E.D.I.M, Gembloux. (2002) 8.
- [6] - N. BENHAMOU and L. CHET, Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86, (1996) p. 405-416.
- [7] - A. HMOUNI, MR. HAJLAOUI et A. MLAIKI, Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull.* 26, (1996) 697-705.
- [8] - M. DAAMI-REMADI, M. EL MAHJOUR, Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. Ann. L'INRAT 74, (2001) 167-186.
- [9] - CR. HOWELL, Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87, (2003) 4-10.