

ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE L'EXTRAIT NATUREL DE *COMBRETUM SP IN VITRO* SUR 3 ESPÈCES FONGIQUES TELLURIQUES DES CULTURES DE TOMATE EN CÔTE D'IVOIRE

Guédé Noël ZIRIHI^{1*}, Sibirina SORO², Daouda KONE³ et
Yatty Justin KOUADIO²

¹ Laboratoire de botanique, Université de Cocody, 22 BP 461 Abidjan 22 CI

² Laboratoire de biologie et amélioration des productions végétale (LBAPV),
Université d'Abobo-Adjamé, 22 BP 461 Abidjan 22 CI

³ Laboratoire de physiologie et pathologie végétale, Université de Cocody, 22
BP 461 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

(Reçu le 27 Décembre 2007, accepté le 23 Avril 2008)

* Correspondance et tirés à part, e-mail : zirih@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Les parasites fongiques telluriques en culture de tomate deviennent de plus en plus sévères vu les dégâts et dommages qu'ils causent en plantation. Un extrait brut de poudre naturel de *Combretum racemosum* a été évalué *in vitro* pour tester son efficacité d'inhibition sur trois souches fongiques (*Pythium aphanidermatum*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) et *Macrophomina phaseoli*). La croissance radiale mycélienne a été totalement inhibée par la poudre naturelle brute extraite de la plante de *C racemosum* au cours de cette expérience.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les trois souches fongiques a été évaluée à 2 g/L sur la croissance radiale mycélienne. L'extrait brut de *C. racemosum* a révélé un taux d'inhibition variant de 50 à 74 % selon les souches fongiques à la plus faible concentration (1 g/L) par rapport au témoin et ce après 7 jours d'incubation à 27±2°C. Les doses létales les plus faibles ont été évaluées à 0,04 g/L à DL₅₀ avec *Pythium* sp. et à 0,6 g/L avec *Fusarium* sp. à DL₉₀.

Mots-clés : Antifongique, *Combretum racemosum*, parasites fongiques telluriques; *Lycopersicon esculentum*, Côte d'Ivoire

ABSTRACT

Fungicidal activity of natural extract of *Combretum racemosum* P. Beauv (Combretaceae) *in vitro* on 3 species soil born fungi in tomatoes cultures in Côte d'Ivoire

The severity of soil born fungi parasites become more important in view of damages in field. A natural extract powdery of *Combretum racemosum* was evaluated *in vitro* to test the inhibition efficacy on three fungi (*Pythium aphanidermatum*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) and *Macrophomina phaseoli*). Mycelia radial growth was completely inhibited by the powdery extract from *Combretum* sp. in this experience.

The minimum inhibition of concentration (MIC) for the three fungi was evaluated at 2 g/L on the mycelia radial growth. The rate inhibition of the natural extract powdery of *C. racemosum* according to the fungi varied from 50 to 74 % at the lowest concentration (1 g/L) with regard to the control at 27±2°C from 7 days incubation. The lowest lethal doses were evaluated at 0,04 g/L with *Pythium* sp. for DL₅₀ and at 0,6 g/L with *Fusarium* sp. for DL₉₀.

Keywords : *Fungicidal, Combretum racemosum, soil born fungi parasites; Lycopersicon esculentum, Côte d'Ivoire*

I - INTRODUCTION

La politique de diversification des cultures entreprise en Côte d'Ivoire depuis plus d'une décennie a eu pour conséquence l'augmentation des surfaces de cultures maraichères particulièrement celle de la tomate [1]. Cependant, ces cultures restent largement exposées à de nombreuses attaques parasitaires surtout fongiques. Les champignons telluriques ressortent comme étant les espèces qui causent le plus de dégâts ou dommages sur les plantes de tomate [2].

Les traitements chimiques devenus de plus en plus chers avec leurs corollaires nocifs sur l'environnement et la santé du consommateur [3], il s'avère impératif de trouver d'autres méthodes de lutte plus adaptées aux conditions environnementales et soucieuses de la santé du consommateur [4,5]. Le but de cette étude est de déterminer *in vitro* le pouvoir fongicide ou fongistatique de la poudre de *Combretum racemosum* sur 3 espèces fongiques telluriques des cultures de tomate en Côte d'Ivoire. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une étude préliminaire en vue de mettre en place une stratégie de lutte alternative aux pesticides contre les mycopathogènes telluriques en

cultures de tomate. Le produit est testé sur trois souches fongiques isolées sur des plantes de tomate malades ou mortes prélevées en plantation. Ces trois champignons ont été isolés de deux localités différentes en Côte d'Ivoire. *Pythium aphanidermatum* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* proviennent des plantations de cultures de tomate de Songon-Dabou.

Quant à *Macrophomina phaseoli*, il a été isolé pour la première fois sur des cultures de tomate à Songon-Dabou et ensuite dans la région de Korhogo. C'est un champignon qui présenterait une faible attaque parasitaire par rapport aux genres *Fusarium* et *Pythium*. *Macrophomina phaseoli* attaque la plante au niveau du système racinaire en provoquant un rétrécissement du collet et de la tige [2].

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1. Matériel végétal et fongique

Trois cultivars de tomate (Caraiïbo, Mongal et Tropimech) de l'espèce *Lycopersicon esculentum* Mill. ont été utilisées au cours du test de pathogénicité avec ces 3 différentes souches fongiques.

Les souches fongiques utilisées dans cette étude sont âgées de 7 jours et elles ont été obtenues à partir des plants de tomate présentant des symptômes de flétrissement et de pourriture du collet et / ou des racines.

Les plants de tomate ont été prélevés dans des plantations de cultures maraîchères à Songon-Dabou et à Korhogo pour le *Fusarium* sp., le *Pythium* sp. et le *Macrophomina* sp. respectivement. Ces souches fongiques ont d'abord été testées pour leur pathogénicité *in vivo* et ont été confirmés du genre *Pythium* sp. et des espèces de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) et de *Macrophomina phaseoli* [2].

II-2. Matériel de lutte biologique

La poudre utilisée pour le test d'inhibition des différentes souches fongiques est extraite de *Combretum racemosum*. C'est une plante qui se rencontre dans la zone sud forestière de la Côte d'Ivoire. Les feuilles ont été récoltées puis séchées à l'ombre à la température ambiante avant d'être transformées en poudre à l'aide d'un moulin manuel.

II-3. Multiplication des souches fongiques

La multiplication des souches fongiques s'est effectuée dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, contenant chacune 20 mL de milieu de culture

PDA. Les boîtes sont préalablement autoclavées pendant 30 min. sous une pression de 1,5 bars à la température de 121°C. Chaque souche fongique a été repiquée selon le transfert d'un disque mycélien de 5 mm d'une ancienne boîte sur les nouvelles boîtes qui ont été incubées à 27±2°C pendant deux semaines.

II-4. Production et inoculation des plants de tomate

Les graines des trois variétés de tomate ont été traitées à l'éthanol 70 % pendant 3 minutes puis elles ont été rincées à l'eau distillée stérile 3 fois pendant 3 min pour chaque rinçage. Sous la hotte en présence d'une flamme, 25 graines ont été déposées sur du papier buvard dans des boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre. Le semis est conservé à l'étuve à 27±2°C à l'obscurité et arrosé une fois par jour jusqu'à l'apparition des feuilles cotylédonaire [6]. A ce stade, les plantules sont repiquées dans des bacs contenant de la terre de Songon-Dabou stérilisée et conservées sous abri à la température ambiante jusqu'à la transplantation.

Les plants sont transplantés à l'âge de 15 jours de pépinière soit au stade de 3 à 4 feuilles suivant la méthode modifiée de [7]. Les plants sont transplantés dans des pots de 1 dm³ rempli de terre stérilisée. L'inoculation s'est déroulée le troisième jour après la transplantation de manière douce c'est-à-dire sans blessure sur les plants de tomate. L'inoculum fongique a été déposé directement tout autour de la partie hypogée de la tige du plant de tomate. Cinq plants sur les dix que compte chaque variété ont été inoculés avec 10 mL de solution mycélienne (à eau distillée stérile) de chacun des trois mycopathogènes. Cette expérience est répétée 3 fois dans le temps.

II-5. Pathogénicité des trois souches fongiques

L'indice de rabougrissement et l'indice de mortalité ont été évalués 30 jours après l'inoculation. L'évaluation des symptômes est réalisée 33 jours après la transplantation des plants de tomate [7] en se basant sur une échelle de notation de symptôme proposée par [8] et qui comprend quatre valeurs allant de zéro à trois :

- Zéro : plante saine,
- Un : léger jaunissement, légère pourriture du pivot et des racines secondaires et pourriture du collet,
- Deux : jaunissement important des feuilles avec ou sans flétrissement, rabougrissement des plantes, pourriture sévère du pivot et des racines secondaires, pourriture importante du collet et brunissement des vaisseaux de la tige,
- Trois : mort de la plante.

Ces notations ont servi de base pour calculer l'indice de mortalité qui correspond à la moyenne des valeurs attribuées aux dix plants (nombre de répétition par traitement élémentaire). De plus le pourcentage des plants qui ont une notation des symptômes supérieure ou égale à 2 est pris comme critère pour évaluer la sévérité des attaques de *P. aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis - lycopersici* et de *M. phaseoli*.

L'expérience a été répétée trois fois dans le temps.

II-6. Test d'inhibition de la croissance radiale mycélienne

Un test d'essai a été effectué en vue de déterminer les concentrations minimales et maximales à utiliser dans le futur. Cinq concentrations (1, 2, 4, 6 et 8 g/L) ont été déterminées suivant le comportement des différentes souches fongiques [9]. Un disque mycélien de 5 mm de diamètre a été prélevé sur la croissance périphérique de chaque champignon et placé dans une boîte de Pétri de 8 cm de diamètre contenant 20 mL de milieu PDA. Six boîtes de Pétri ont été repiquées par concentration et incubées à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ à la photopériode de 12 H. La croissance radiale mycélienne a été mesurée en millimètres trois fois, juste avant que les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boîte dans les lots témoin sur 5 jours.

Cette expérience a été répétée 3 fois. Quand une croissance mycélienne n'a pas été observée pour un mycopathogène donné, alors la boîte de Pétri est ouverte et le disque mycélien est repiqué dans une nouvelle boîte de Pétri contenant du milieu PDA. L'ensemble de ces boîtes est conservé à la même température ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) et à la même photopériode (12 H) durant le même nombre de jours (5). A la fin du cinquième jour, le produit (*C. racemosum*) est évalué comme étant un fongicide s'il n'y a pas de repousse mycélienne ; dans le cas contraire la poudre de *C. racemosum* est dite fongistatique. Cette expérience a été répétée 3 fois [9]; [10].

L'évaluation de l'inhibition due à *Combretum racemosum* est estimée par le taux d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule revue de [11] :

$$I (\%) = (T_o - E / T_o) \times 100 \quad (1)$$

où T_o est le diamètre moyen du lot témoin et E le diamètre moyen des lots en présence du produit de *C. racemosum* (les essais).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est calculée à partir de la plus petite concentration qui inhibe la croissance mycélienne de chaque champignon. Les concentrations suffisantes pour tuer la reprise de la croissance mycélienne ont été utilisées pour calculer les doses létales de DL_{50} et de DL_{90} à l'aide des équations linéaires d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule revue de [12].

III - RÉSULTATS

Selon R. P. Larkin et D. R Fravel [13], il est nécessaire de connaître le comportement d'un pathogène avant d'entreprendre une méthode de lutte biologique contre celui-ci. Un test d'inoculation a donc été effectué avec les trois souches fongiques (*P. aphanidermatum*, *Fusarium* sp. et *M. phaseoli*) sur des plants de tomate âgés de 15 jours avant de tester le pouvoir inhibiteur de la poudre de *Combretum racemosum* vis-à-vis de ces mycopathogènes.

III-1. Pathogénicité des trois souches fongiques

Le repiquage des plants de tomate dans les pots contenant la terre stérilisée de Songon-Dabou suivi de l'inoculation par *P. aphanidermatum*, Forl et *M. phaseoli* a montré que tous les trois mycopathogènes sont pathogènes. Ces trois cultivars ont présenté une sensibilité plus forte vis-à-vis de *Pythium* sp. par rapport à *Fusarium* sp. et encore moins à *M. phaseoli* (**Tableau 1**). Tropimech est le cultivar le plus sensible. En effet, à part *M. phaseoli* (70 %), 90 % des plants de Tropimech ont eu une notation des symptômes supérieure ou égale à 2 avec *P. aphanidermatum* et *Fusarium* sp.

L'observation des plants inoculés et ceux des plants témoins a montré que ces trois champignons attaquent tous d'abord le système racinaire de la plante pour remonter vers la tige. Ces attaques se manifestent par la pourriture du collet et de la tige chez *Pythium* sp. et *Fusarium* sp. alors que chez *M. phaseoli*, on observe plutôt un rétrécissement du collet. La plante finit toujours par mourir une fois que les symptômes apparaissent pour chacun des 3 mycopathogènes.

Tableau 1 : Indice de mortalité des plants de tomate 30 jours après inoculation

Traitements	Indice de mortalité des cultivars		
	Mongal	Caraïbo	Tropimech
Inoculé par <i>P. aphanidermatum</i>	1,6 (60)	1,5 (60)	2,5 (90)
Inoculé par <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	1,0 (40)	1,3 (50)	2,4 (90)
Inoculé par <i>M. phaseoli</i>	0,80 (30)	1,0 (40)	1,9 (70)
Témoin	0 (0)	0 (0)	0 (0)

NB : Les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage des plants qui ont eu une notation de symptômes ≥ 2

III-2. Test d'inhibition de la croissance radiale mycélienne

Les tests réalisés *in vitro* avec l'extrait de la poudre de *C. racemosum* ont permis d'établir des courbes de corrélation entre la concentration du produit et le taux d'inhibition de chaque mycopathogène.

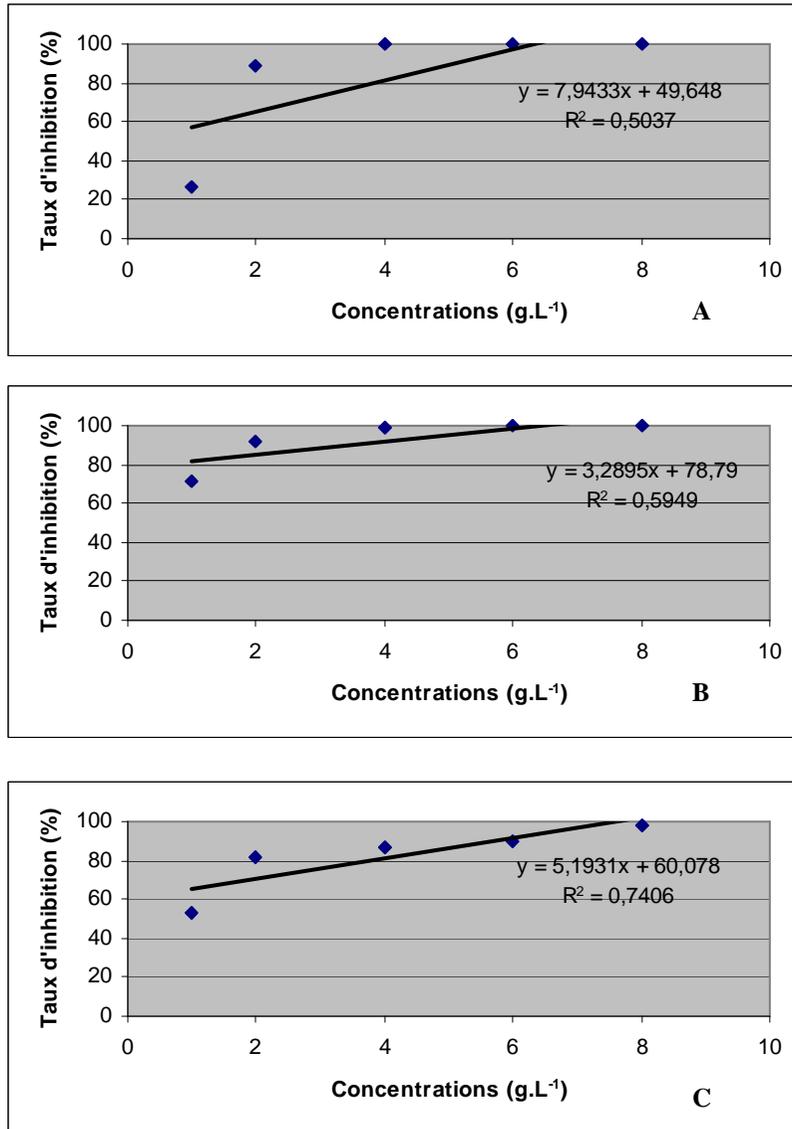


Figure 1 : Corrélation entre la concentration de la poudre de *Combretum racemosum* et le taux d'inhibition de *P. aphanidermatum* (A), de *F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* (B) et de *M. phaseoli* (C)

La corrélation entre la concentration du produit et l'inhibition de la croissance mycélienne est positive pour toutes les 3 souches fongiques.

Les coefficients de corrélation sont tous supérieurs à 50 % et c'est avec *M. phaseoli* que le produit présente le coefficient d'inhibition le plus élevé (74,1 %) suivi de *Fusarium* (59,5 %) (**Figure 1**).

Le repiquage simultané des mycopathogènes dans les boîtes de Pétri à différentes concentrations à montrer une inhibition plus forte chez Forl par rapport à *P. aphanidermatum* et *M. phaseoli* aux concentrations inférieures à 3 g/L. L'extrait brut de la poudre de *Combretum* sp. est significativement efficace sur Forl à la concentration de 0,7 g/L. Quant à *M. phaseoli* et *P. aphanidermatum* ils ont des concentrations minimales de 0,9 g/L et 1,9 g/L respectivement. Le taux d'inhibition à 100 % est atteint à 6 g/L pour les souches de *Fusarium* et de *P. aphanidermatum*; par contre *M. phaseoli* atteint son taux d'inhibition maximum à 8 g/L. Au-delà de 6 g/L toutes les 3 souches fongiques sont totalement inhibées et on ne note aucune autre reprise du mycopathogène (**Figure 2**).

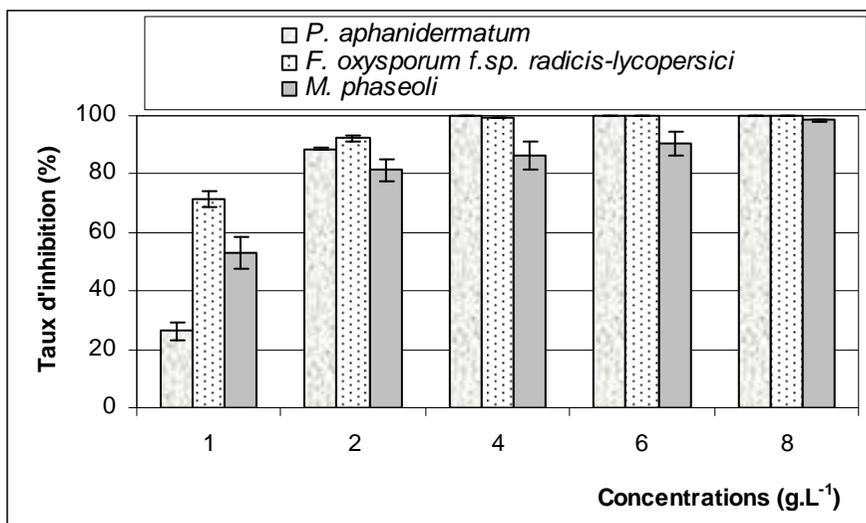


Figure 2 : Taux d'inhibition de *P. aphanidermatum*, de *F. oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* et de *M. phaseoli* par la poudre de *Combretum racemosum*

Les différentes barres représentent les erreurs standards des différentes moyennes des taux d'inhibition.

L'extrait brut naturel de la poudre de *Combretum racemosum* peut donc être utilisé aussi bien comme un fongicide tout comme un antifongistatique pour

ces trois mycopathogènes. Les doses létales pour les trois mycopathogènes varient de 0,04 g/L à 0,5 g/L (DL₅₀) et de 0,6 à 1,7 g/L (DL₉₀) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Concentrations inhibitrices minimales (CIM), DL₅₀, DL₉₀ (g.L⁻¹) de la poudre brute de *Combretum racemosum*. sur *P. aphanidermatum*, Forl et *M. phaseoli*

Mycopathogènes	Croissance mycélienne		
	CMI (g.L ⁻¹)	DL ₅₀ (g.L ⁻¹)	DL ₉₀ (g.L ⁻¹)
<i>P. aphanidermatum</i>	1,9	0,04	1,7
Forl	0,7	0,4	0,6
<i>M. phaseoli</i>	0,9	0,5	0,8

IV - DISCUSSION

Les différents résultats observés lors des expériences *in vivo* suite à l'inoculation des plants de tomate avec la solution mycélienne de *P. aphanidermatum*, de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* et de *M. phaseoli* ont montré une sensibilité variétale. La pathogénécité de ces trois souches fongiques a relevé que *P. aphanidermatum* est le mycopathogène le plus virulent et que Tropimech est la variété la plus sensible. Pour un même mycopathogène, l'indice de mortalité varie d'un cultivar à un autre; ce qui pourrait s'expliquer par les caractères agronomiques de chacune des variétés.

En effet, Tropimech est un cultivar à croissance indéterminée alors que Caraïbo et Mongal sont des cultivars à croissance déterminée [2].

Le test *in vitro* a relevé une corrélation positive entre l'extrait naturel brut de la poudre de *Combretum racemosum* et le taux d'inhibition de la croissance mycélienne sur l'ensemble des 3 souches fongiques. Les résultats *in vitro* montrent l'efficacité inhibitrice de *C. racemosum* sur Forl, *P. aphanidermatum* et *M. phaseoli*.

La concentration inhibitrice minimale de la poudre de *C. racemosum* pour les trois souches fongiques reste inférieure à 2 g/L et on ne note aucune autre reprise mycélienne après transfert de la pastille mycélienne sur un milieu neutre. Le mode d'action de la poudre de *Combretum racemosum* diffère selon le mycopathogène.

En effet, l'activité inhibitrice du produit se manifeste rapidement sur la croissance mycélienne chez *Fusarium* par rapport à *M. phaseoli*. Par contre, le coefficient de corrélation de l'inhibition mycélienne est largement supérieur chez *M. phaseoli* que chez *Fusarium* et *Pythium*. Certains

champignons réagiraient différemment à cause des différents constituants qui composent le produit [14]). Bien que *C. racemosum* ne présente pas de composés aromatiques, la poudre extraite de ses feuilles a montré un taux d'inhibition largement supérieur à celui de certaines huiles essentielles testées *in vitro* (résultats non publiés) [15].

V - CONCLUSION

Cette étude a montré l'effet inhibiteur de *Combretum racemosum* sur *Forl*, *P. aphanidermatum* et *M. phaseoli*, tous des mycopathogènes telluriques des cultures de tomate. Ce sont des agents responsables de la pourriture des racines, du collet et de la tige de tomate. Les tests d'inhibition réalisés avec l'extrait naturel brut de la poudre de *C. racemosum* ont révélé une activité antifongistatique et fongicide significative sur ces trois mycopathogènes. La forte corrélation observée entre la concentration de la poudre de *C. racemosum*

- [3] - N. BENHAMOU, P. REY, M. CHERIF, J. HOCKENHULL et Y. TIRILLY "Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*", *Phytopathology*, 87 (1997) 108-121.
- [4] - N. PASTER, S. DROBY, E. CHALUTZ, M. MENASHEROV, R. NITZAN et C. L. WILSON, "Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* of stored soya beans", *Mycol. Res.*, 97 (1993) 1210-1216.
- [5] - N. PASTER, M. MENASHEROV, U. RAVID et B. JUVEN "Antifungal activity of Origanum and Thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain", *J. Food Protect.*, 58 (1995) 81-85.
- [6] - K. HIBAR, D. R. MEJDA, K. HAIFA et El M. MOHAMED « Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* », *Biotech. Agro. Soc. Environ.*, Série 3, Vol. 9 (2005) 163-171.
- [7] - S. L. WOO, A. ZOINA, G. Del SORBO, M. LORITO, B. NANNI, F. SCALA et C. NOVEIELLO "Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races", VCGs, RFLPs, and RAPD, *Phytopathology*, 86 (1996) 966-972.
- [8] - D. J. VAKALOUNAKIS et G. A. FRAGKIADAKIS "Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber, differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD fingerprinting", *Pathology*, 89 (1999) 161-168.
- [9] - F. NERI, M. MARI et S. BRIGATI "Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds", *P. Pathology*, 55 (2006) 100-105.
- [10] - S. K. OXENHAM, K. P. SVOBODA et D. R. WALTERS "Antifungal activity of essential oil of Basil (*Ocimum basilicum*)", *J. Phytopath.*, 153 (2005) 174-180.
- [11] - A. HMOUNI, M. R. 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.
- [12] - P. A. PARANAGAMA, K. H. T. ABEYSEKERA, K. ABEYWICKRAMA et L. NUGALIYADDE "Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Lik. Isolated from stored rice", *Soc. App. Microbio.*, 37 (2003) 86-90.

- [13] - R. P. LARKIN and D. R. FRAVEL, Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of Tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp, *Phytopathology*, 89 (1999) 1152-1161.
- [14] - R. R. CARLTON, S. G. DEANS and P. G. WATERMANN, “Antifungal activity of the leaf gland volatile oil of sweet gale (*myrica gale*)”, *Chemoecology*, 3 (1992) 55-59.
- [15] - H. S. HITOKOTO, T. MOROZUMI S. WAUKE and H. K. SAKAI, “Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi”, *App. Environ. Microbio.*, 39 (1980) 812-822.