

**INCUBATION IN VITRO ET IN VIVO D'ŒUFS D'ACHATINA
FULICA , BOWDICH,1820 EN PRÉSENCE DE SOUCHES PURES
DE : ASPERGILLUS NIGER, FUSARIUM OXYSPORUM, FUSARIUM
SOLANI, PENICILLIUM DECUMBENS, PENICILLIUM SP., PHOMA
SP.,TRICHODERMA SP. ET MUCOR SP.**

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

¹Université d'Abobo - Adjamé, UFR-SN Laboratoire de Biologie et Amélioration
des Productions Végétales. 01 BP 8133 Abidjan 02 Côte d'Ivoire 01

²Université d'Abobo - Adjamé, UFR-SN Laboratoire de Biologie et Cytologie
Animale. 02 BP 801 Abidjan 02 Côte d'Ivoire 01

³CNRA Adiopodoumé km 17 route de Dabou.01 BP 1740 Abidjan 01

(Reçu le 15 Décembre 2009, accepté le 27 Mars 2010)

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

RÉSUMÉ

Les essais d'incubation in vitro d'œufs d'*Achatina fulica* effectués directement sur chacune des huit souches pures de champignons donne les taux d'éclosion suivants en présence de : *Aspergillus niger* (54,06%) ; *Penicillium decumbens* (34,06%), *Mucor sp.* (38,51%) et *Trichoderma sp.* (54,36%). Ces taux sont supérieurs à ceux obtenus lors de l'incubation sur la sciure de bois stérilisée et inoculée (in vivo) avec les mêmes champignons *Aspergillus niger* (8,88%) ; *Penicillium decumbens* (23,33%), *Mucor sp.* (29,62%) et *Trichoderma sp.* (31,10%). Tous ses taux sont respectivement inférieurs à chacun des témoins (66,14%) et (75,04%). Pour les quatre autres champignons *Fusarium solani*, *Penicillium sp.* *Phoma sp.* *Fusarium oxysporum* le cas contraire se présente. Le premier lot (in vitro) de taux d'éclosion est inférieur au second (in vivo). Le meilleur et le faible taux d'éclosion sont obtenus respectivement à l'issu de l'inoculation de la sciure de bois stérilisée avec *Fusarium solani* (84,29%) et *Aspergillus niger* (8,88%).

Mots-clés : : *in vitro*, *in vivo*, œufs, incubation, pathogène, champignons, sciure de bois.

ABSTRACT

In vitro incubation and in vivo of eggs of *Achatina fulica*, Bowdich, 1820 in the presence of pure stocks of: *Aspergillus Niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium sp.*, *Phoma sp.*, *Trichoderma sp.* and *Mucor sp.*

The tests of egg in vitro incubation of *Achatina fulica* carried out directly on each of the eight pure mushroom stocks gives the following rates of blossoming in the presence of: *Aspergillus Niger* (54,06%); *Penicillium decumbens* (34,06%), *Mucor sp.* (38,51%) and *Trichoderma sp.* (54,36%). These rates are higher than those obtained during incubation on the sawdust sterilized and inoculated (in vivo) by the same mushrooms *Aspergillus Niger* (8,88%); *Penicillium decumbens* (23,1%), *Mucor sp.* (29,62%) and *Trichoderma sp.* (31,10%). All these rates are respectively lower than each witness (66,14%) and (75,04%). For the four other mushrooms *Fusarium solani*, *Penicillium sp.*, *Phoma sp.*, *Fusarium oxysporum* the contrary case is presented. The first batch of rate of blossoming is lower than the second. The best and the low level of blossoming is obtained respectively with resulting from the inoculation of the sawdust sterilized with *Fusarium solani* (84,29%) and *Aspergillus Niger* (8,88%).

Keywords : *in vitro*, *in vivo*, eggs, incubation, pathogenic, mushrooms, sawdust.

I - INTRODUCTION

Aspergillus niger, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium sp.*, *Phoma sp.*, *Trichoderma sp.* et *Mucor sp.* sont des champignons cosmopolites car fréquemment présents dans : l'air, le sol arable ou non cultivé, les céréales, les matières organiques en décomposition, les fruits et les produits laitiers. *Fusarium oxysporum* très répandu dans les sols du monde entier, est l'espèce la plus importante de la flore des champs. [1]. Ce champignon peut envahir une plante avec son tube germinatif (spores ou mycélium) par l'invasion des racines de la plante [1]. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* composent l'essentielle de la flore de stockage [2]. La flore intermédiaire quand à elle est prédominée par les Mucorales tel que *Mucor*. Ses champignons microscopiques sont des organismes qui peuvent engendrer des problèmes dans l'élevage. Ces champignons sus mentionnés peuvent également infectés les œufs.

L'œuf désigne l'objet pondue par les femelles de nombreuses classes d'animaux entre autre les escargots. Dans celui-ci, l'embryon se développe

au détriment des réserves nutritives qu'il contient jusqu'à ce que le naissain sorte de sa coquille.

Les œufs d'une ponte sont en général blancs nacrés et bien individualisés. La mycose des pontes se manifeste par des modifications de couleur et de turgescence des œufs. La présence de vers de terre dans le substrat d'incubation est préjudiciable à l'éclosion des œufs qui deviennent lourds parce que gorgés d'eau et présentant des traits rouges sur la coquille [3]. Le fort pourcentage d'œufs non éclos après incubation, pourrait s'expliquer par le fait qu'ils sont parasités, desséchés ou non fécondés [4].

Parfois, dans la ponte certains œufs sont agglomérés, peuvent être de couleur rose, plus ou moins intense, d'où le nom de pontes roses, mais aussi jaunes, beiges ou grisâtres. De tels œufs sont de consistance plus faible et n'évoluent pas normalement et doivent être retirés du lot sinon mis à incuber ils entraînent la contamination de l'ensemble des œufs ce qui conduit à de faibles taux d'éclosion [5]. Des champignons, du genre *Fusarium* ou *Verticillium*, pourraient être responsables de ces anomalies.

Un examen histologique de ces pontes a montré la présence de mycélium envahissant le chorion, le vitellus et parfois même l'embryon. Le champignon en cause est un Hyphomycète, *Fusarium sp.* qui donne des colonies d'aspect cotonneux devenant rosâtres en 10 à 15 jours [6].

Le but du travail est d'identifier lequel ou lesquels de ses champignons réduit le plus le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1. Matériel biologique

Les isolats (**Tableau 1**) d'*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor sp.*, *Phoma sp.*, *Penicillium sp.*, *Penicillium decumbens* 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 suivantes : [7-9]. 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 regia*), l'Acajou (*Khaya ivorensis* ou *Khaya grandifoliola*) et le Samba (*Triplochiton scleroxylon*) [5]. 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 séchés, de se briser et donne le meilleur taux d'éclosion [3].

Tableau 1: *Isolats des différents champignons utilisés dans cette étude.* [8]

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>Penicillium decumbens</i> (P.d)	SP	2007
<i>Trichoderma sp.</i> (T.sp.)	SFV	2007

Les reproducteurs (*Achatina fulica*) recueillis dans la forêt de l'Université d'Abobo Adjamé (UAA) sont repartis dans deux bacs d'élevage à raison de 7 animaux par bac soit à une densité de 50 escargots par m². Les enceintes d'élevage sont remplies au ¼ (environ 4cm d'épaisseur) d'une litière stérile. La litière est composée d'un mélange de sol noir de plantation prélevé à environ 10cm de profondeur plus le sable de construction. Les animaux sont nourris avec des feuilles de laitue (*Lactua sativa* : Apiaceae) à raison de 180g/bac. Tous les deux jours, la nourriture est renouvelée, la litière débarrassée des déchets produits par les escargots et les pontes décelées sont délicatement prélevées à l'aide d'une cuillère.

II-2. MÉTHODES

II-2-1. Isolement des champignons

Les champignons sont isolés sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA). Le milieu est ensemencé avec les suspensions – dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁶ de la litière d'élevage et des différents substrats d'incubation. L'acide citrique (bactéricide : 0,25 g / 250 mL d'extrait) est ajouté au milieu au moment de sa distribution dans les boîtes de Pétri sous la hotte en présence d'une flamme. Toutes les opérations sont faites dans des conditions d'asepsie rigoureuses en récipients stérilisés. L'identification est basée sur les caractéristiques microscopiques que sont la morphologie du mycélium (cloisonnement, ramification ou non du mycélium), son aspect (lisse ou grumeux), la coloration et la forme des spores ou conidies.

L'incubation directe c'est-à-dire *in vitro* consiste à répartir 15 œufs d'*Achatina fulica* débarrassés de la litière d'élevage sur la souche pure du champignon âgée d'une semaine exemple à suivre : (**Figure 1**). Le témoin est constitué du milieu de culture (PDA) sur lequel est également ensemencé 15 œufs issu de la même ponte.



Figure 1 : Incubation directe d'œufs d'*Achatina fulica* sur *Trichoderma sp.*

L'inoculation du substrat consiste à mélanger dans un erlen stérile contenant 600 ml d'eau distillée stérile, la souche pure (2 boîtes) du champignon âgé d'une semaine. 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 avec chacune des souches. Les bacs reçoivent chacun 15 œufs (**Figure 2**) provenant de la ponte du jour d'*Achatina fulica* et sont mis à incuber à l'obscurité à une température moyenne de 28,28°C. Le témoin non traité reçoit également 15 œufs.

Trois essais à raison de 3 boîtes de Pétri ou 3 bacs d'incubation par essai est réalisés pour chaque type d'incubation. Après 14 jours d'incubation à l'obscurité, le nombre d'éclos est déterminé et le pourcentage d'éclosion calculé suivant la formule :

$$TE(\%) = \frac{NN}{NO} \times 100 \quad (1)$$

TE = Taux d'Éclosion ; NN = Nombre de Naissains ; NO = Nombre d'œufs



Figure 2 : *Éclosion d'œufs d'Achatina fulica mis à l'incubation sur la sciure de bois stérilisée infectée par Fusarium oxysporum*

II-2-2. Traitement des résultats

L'analyse statistique des valeurs a été réalisée grâce au logiciel SPSS Duncan nous a permis de faire une comparaison des moyennes deux à deux et nous donne le comportement des champignons par groupe homogène. La différence entre les moyennes est considérée statistiquement significative au seuil de 5% ($p < 0,05$).

III – RÉSULTATS

III-1. Incubation des œufs d'*Achatina fulica* sur la sciure de bois stérilisée et inoculée

Le taux d'éclosion obtenu avec chacun des 7 champignons à savoir *Aspergillus niger* (8,88%), *Penicillium decumbens* (23,33%), *Mucor sp.* (29,62), *Trichoderma sp.* (31,10%), *Penicillium sp.* (67,40%), *Phoma sp.* (57,40%) et *Fusarium oxysporum* (51,84%) est inférieur à celui du témoin (75,04%). Les trois derniers mycètes donnent des taux supérieurs à la moyenne. Le huitième champignon *Fusarium solani* a un taux d'éclosion (84,29%) supérieur à celui de la référence.

III-2. Incubation directe des œufs d'*Achatina fulica* sur la souche pure

Le taux d'éclosion obtenu avec chacun des huit champignons est inférieur à celui du témoin (66,14%). Cependant les taux d'éclosion que donnent

l'inoculation avec *Aspergillus niger* (54,06%), *Fusarium solani* (57,77%) et *Trichoderma sp.* (54,03%) sont au dessus de la moyenne.

III-3. Comparaison des deux inoculations

Les taux d'éclosion obtenus après l'incubation directe sur *Aspergillus niger* (54,06%), *Penicillium decumbens* (34,06%), *Mucor sp.* (38,51%) et *Trichoderma sp.* (54,03%) sont supérieurs à ceux obtenus avec la sciure de bois stérilisée et infectée avec les mêmes champignons.

Les taux d'éclosion obtenus après l'incubation de la sciure de bois inoculée avec *Fusarium solani* (84,29%), *Penicillium sp.* (67,40%), *Phoma sp.* (57,40%) et *Fusarium oxysporum* (51,84%) donnent des taux supérieurs à ceux obtenus après l'incubation directe avec les mêmes champignons (**Tableau 2**).

Le type d'incubation n'a aucune influence sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*

$p = 0,130 > 0,05$. Cependant il y'a une différence au niveau du comportement des champignons $p = 0,00 < 0,05$

Tableau 2 : Taux d'éclosion des œufs d' *Achatina fulica* sur substrats infectés

Champignons	Taux d'éclosion (%)	
	Incubation des œufs sur la sciure de bois stérilisée et infectée avec chacun des 8 champignons	Incubation des œufs directement sur la souche pure de chacun des 8 champignons
<i>Aspergillus niger</i>	8,88 ± 2,11	54,06 ± 2,89
<i>Penicillium decumbens</i>	23,33 ± 3,70	34,06 ± 2,55
<i>Mucor sp.</i>	29,62 ± 3,7	38,51 ± 3,07
<i>Trichoderma sp.</i>	31,10 ± 4,89	54,03 ± 3,44
<i>Fusarium solani</i>	84,29 ± 1,22	57,77 ± 4,97
<i>Penicillium sp.</i>	67,40 ± 2,61	44,44 ± 4,32
<i>Phoma sp.</i>	57,40 ± 3,27	24,32 ± 1,80
<i>Fusarium oxysporum</i>	51,84 ± 4,36	47,40 ± 5,25
Témoin	75,04 ± 1,78	66,14 ± 1,27

IV - DISCUSSION

Quelque soit le substrat inoculé, ses champignons sont des agents pathogènes dans la mesure où ils influent sur le taux d'éclosion des œufs en le réduisant considérablement [10]. Selon [4] le fort pourcentage d'œufs non éclos pourrait s'expliquer par le fait qu'ils sont parasités, desséchés ou non fécondés. Seul *Fusarium solani* incorporé à la sciure de bois stérilisée n'a pas d'effet sur les œufs car le taux d'éclosion (84,29 %) en sa présence est supérieur à celui du témoin (75,04%).

Après l'incubation directe, en présence de chacun des 8 champignons utilisés, les taux d'éclosion sont inférieurs à celui du témoin (66,14%). Ceci nous amène à dire que ses champignons sont pathogènes pour les œufs d'*Achatina fulica* mais à un degré moindre pour *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.* et *Fusarium solani*. Cependant sur la sciure de bois stérilisée et inoculée à l'exception de l'inoculation avec *Fusarium solani* qui a donné un taux d'éclosion (84,29%) supérieur à celui du témoin, la présence des sept autres champignons donne des taux d'éclosion inférieurs au témoin. Ils peuvent donc être considéré comme pathogènes mais à un degré moindre pour *Penicillium sp.* *Phoma sp.* et *Fusarium oxysporum*.

Aspergillus niger (8,88%), *Penicillium decumbens* (23,33%), *Mucor sp.* (29,62%) et *Trichoderma sp.* (31,10%) sont les plus pathogènes lorsqu'ils sont incorporés à la sciure de bois stérilisée. Sur le substrat sciure de bois, ses champignons se développent très très vite. Ses quatre champignons possèdent une vitesse de croissance naturelle très importante. La sciure de bois favorise encore plus leur développement parce que c'est un substrat qu'ils affectionnent. Les champignons envahissent rapidement le substrat, étouffent les œufs qui finissent par se dessécher. *Fusarium oxysporum* (47,40%), *Penicillium sp.* (44,44%) et *Phoma sp.* (24,32%) sont plus virulents lorsqu'ils reçoivent directement les œufs que quand ils sont incorporés à la sciure de bois stérilisée probablement parce qu'à ce stade et dans cet état ils sont déjà très actifs. Il y a une différence significative ($p = 0 < 0,05$) lorsqu'on compare les différentes moyennes au témoin (75,04%) pour l'incubation sur la sciure de bois stérilisée et infectée à l'exception de la moyenne obtenue avec *Fusarium solani* (84,04%). Cependant il y'a une différence entre les champignons au niveau de leur comportement $p = 0,00 < 0,05$.

Aspergillus niger est une espèce toxique et pathogène [11]. Le taux le plus faible (8,88%) lui est attribué. En sa présence, les œufs qui arrivent à éclore donnent de très très petits naissains qui après deux semaines d'incubation restent enfermer dans leur coque. Les œufs non éclos se ramollissent. Nous

pouvons donc dire qu'*Aspergillus niger* est très pathogène pour les œufs d'*Achatina fulica*. *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma sp* et *Trichoderma sp* sont connus comme des champignons phytopathogènes de plantes. Nous constatons à l'issue des incubations qu'ils influent sur le taux d'éclosion des œufs en le réduisant. Ils peuvent donc être considérés comme des pathogènes des œufs d'*Achatina fulica*. *Fusarium oxysporum* parasite les embryons à partir d'œufs d'*Achatina fulica* qui provoque la maladie appelée ponte rose caractérisée par une modification de la coloration typiquement blanche d'une ponte saine. Il en résulte la dessiccation des œufs et la mort des embryons [10]. Au cours de notre travail, *Fusarium oxysporum* mis en contact avec les œufs d'*Achatina fulica* a entraîné seulement la dessiccation de certains œufs. *Mucor sp.* est connu comme un champignon opportuniste. En sa présence, les taux d'éclosion sont faibles (29,62% ; 38,51%) c'est dire qu'il nuit également à l'éclosion des œufs. Bien que naturellement saprophyte, *Mucor sp.* peut dans certains cas se comporter en parasite, se développer sur des organismes animaux ou des végétaux, les tuer et finalement passer à un développement saprophyte.

V - CONCLUSION

Cette étude a permis d'estimer le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* en présence d'*Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor sp.*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium sp.*, *Phoma sp* et *Trichoderma sp* et leur degré de pathogénicité par rapport à un témoin non inoculé. *Aspergillus niger* (incubation in vivo) et *Phoma sp* (incubation in vitro) sont à l'issue de notre étude les plus pathogènes.

RÉFÉRENCES

- [1] - G. N. ANGRIOS, Plant Pathology, 3rd. éd. Academic. Press, Inc: New York. (1988) 803pp.
- [2] - C. KARUNAKARAN, W. E. MUIR, D. S. JAYAS, N. D. G. WHITE, D. ABRAMSON, Safe storage time of high moisture wheat. Journal of Stored Products Research (2001) 37, 303-312.
- [3] - J. T. C. CODJIA, C. G. N. NOUMOVI, Guide technique d'élevage N°2 sur les escargots géants. Editeur B.E.D.I.M, Gembloux. (2002) 8p.
- [4] - M. DAAMI-REMADI, M. EL MAHJOUB, Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. Ann. L'INRAT 74, (2001) p. 167-186.

- [5] - 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) 54p.
- [6] - P. DEGEZ, Contribution à l'étude de la pathologie des pontes associée aux pontes anormales 15 *Ielix aspersa*. Th.: Med,vet. : Lyon.1992
- [7] - H. L. BARNETT and B. HUNTER BARRY, Illustrated genera of imperfecti fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, USA, (1972) 241p.
- [8] - B. BOTTON, A. BRETON, M. FEVRE, PH. GUY, J. P. LARPENT, P. VEAU, Moisissures utiles et nuisibles –importance industrielle. Collection biotechnologies. 2^e édition, Masson. Paris Milan Barcelone Mexico (1990) 498p.
- [9] - 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) 398p.
- [10] - M. J. MATEO, Les ennemis des escargots. Héliciculture à St Jory (31). Gireaud. 42 chemin de la plaine 31790 St Jory. Toulouse. (2006) 10p.
- [11] - C. CALVO, J. GUARRO, G. SUAREZ, C. RAMIREZ , Air- borne fungi in the air of Barcelona (Spain) III. The genus *Aspergillus* Link. *Mycopathologia* 71 (1), 41-43.