

Valorisation de biofongicides d'origine végétale en vue d'une gestion éco-efficace de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer causée par *Phytophthora palmivora*

Fofana Balakissa⁽¹⁾ Soro Sibirina⁽²⁾ Kassy Fernand⁽¹⁾ Silué Nakpalo⁽¹⁾ Zouzou Michel⁽¹⁾ Kone Daouda⁽¹⁾

¹ Laboratoire de Physiologie Végétale, UFR Biosciences, Université Félix Houphouët-Boigny, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

² Laboratoire de Physiologie Végétale, UFR Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

Email auteur correspondant. balakisfof@yahoo.fr (00225)08633210

Mots-clés : biopesticide, fongicide de synthèse, *Phytophthora palmivora*, Pourriture brune des cabosses

Keywords : Black Pod Rot, synthetic fungicides, biological fungicide, *Phytophthora palmivora*,

Publication date 31/05/2020, <http://m.elewa.org/Journals/about-japs/>

1 RESUME

L'utilisation des fongicides de synthèse dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer pourrait être à l'origine des problèmes de santé publique et environnementaux. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'effet de trois fongicides biologiques à savoir NECO, ASTOUN et FERCA sur la croissance mycélienne *in vitro* de *Phytophthora palmivora* agent responsable de la maladie et d'évaluer la capacité de ces biofongicides à contrôler la maladie sur des cabosses détachées. Ces trois fongicides biologiques et le fongicide de synthèse, CALLOMIL SUPER ont été utilisés chacun à quatre concentrations qui sont 100, 200, 400 et 800 ppm. Les produits ont été incorporés au milieu petit pois gélosé en surfusion puis distribués dans des boîtes de Pétri. Des rondelles mycéliennes de *Phytophthora palmivora* de 1 cm de diamètre ont été prélevées sur des cultures âgées de 7 jours et mises sur les milieux de culture. Des cabosses détachées ont été inoculées en serre avec une suspension de 3.10^5 spores/ml de zoospores du pathogène puis traitées avec les fongicides. *In vitro*, NECO, ASTOUN, FERCA et CALLOMIL SUPER ont inhibé significativement la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* avec 78,37, 78,32, 76,41 et 80,29 % respectivement après quatre jours d'incubation. Les concentrations minimales qui inhibent 50 % (CI₅₀) la croissance du champignon ont été respectivement de 233, 344, 553 et 228 ppm pour NECO, ASTOUN, FERCA et CALLOMIL SUPER. Les biofongicides NECO et ASTOUN ont été efficaces dans la lutte contre la pourriture brune sur les cabosses détachées. Cependant, NECO a été plus efficace que ASTOUN en inhibant à plus de 50 % l'évolution de la maladie à la concentration de 10 ml/l après dix jours d'incubation. Les fongicides biologiques NECO et ASTOUN ont prouvé leur capacité à contrôler la pourriture brune des cabosses de cacaoyer dans les conditions contrôlées et semi-contrôlées.

SUMMARY

The use of synthetic fungicides in the control of cocoa pod pods should cause public health and environmental problems. The objective of this work was to study the effect of three biological fungicides namely NECO, ASTOUN and Ferca on the *in vitro* mycellular growth of *Phytophthora palmivora*. The causative agent of the disease and to evaluate the capacity of these biofungicides to control the disease on detached pods. These three biological fungicides and one synthetic fungicide, CALLOMIL SUPER were each used at four concentrations that are 100, 200, 400 and 800 ppm. The products were incorporated into the medium pea agar supercooled and then distributed in petri dishes. Mycelial discs of *Phytophthora palmivora* 1 cm in diameter were taken from 7-day old cultures and placed on culture media. Spurred pods were inoculated in a greenhouse with a suspension of 3.10^5 spores/ml zoospores of the pathogen and then treated with the fungicides. *In vitro*, NECO, ASTOUN, Ferca and CALLOMIL SUPER significantly inhibited mycelial growth of *Phytophthora palmivora* with 78.37; 78.32; 76.41 and 80.29% respectively after four days of incubation. The minimum concentrations that inhibit 50% (IC₅₀) growth of the fungus were respectively 233, 344, 553 and 228 ppm for NECO, ASTOUN, Ferca and CALLOMIL SUPER. NECO and ASTOUN fungicides have been effective in controlling brown rot. However, NECO was more effective than ASTOUN in inhibiting more than 50 % disease progression at 10 ml / 1 after 10 days of incubation. NECO and ASTOUN Biological Fungicides have proven their ability to control cocoa pod brown rot under controlled and semi-controlled conditions.

2 INTRODUCTION

Appartenant à la famille des malvacées, le cacaoyer (*Theobroma cacao* L) est l'une des plantes les plus importantes dans les systèmes agroforestiers tropicaux (Motamayor *et al.*, 2008). La cacaoculture a pour objectif la production de fèves de cacao exploitées en pâtisserie, en confiserie, en parfumerie, en pharmacie et en chocolaterie. La Côte d'Ivoire est le premier producteur mondial de cacao avec plus de 40 % de la production mondiale et ce, depuis 1977 (Tano, 2012). En 2016, sa production était estimée à 1,7 million de tonnes devant le Ghana, le Cameroun et le Nigeria (FAOSTAT, 2016). Elle représente en effet, au plan macroéconomique plus de 50 % des recettes d'exportation, 22 % des recettes fiscales et contribue à hauteur de 22 % à la formation du Produit Intérieur Brut (PIB). Au plan social, environ 600 000 chefs d'exploitation font vivre près de 6 millions de personnes. Toutefois, en dépit des hausses de production enregistrées ces dernières années, la cacaoculture ivoirienne est confrontée à de problèmes qui freinent en réalité la production. La culture de cacao

souffre des effets conjugués du changement climatique à l'échelle mondiale, des contraintes biotiques liées à la production de cacao et des effets de l'utilisation intensive et non-maîtrisée des produits de synthèse censés lutter contre des maladies au nombre desquelles figure la pourriture brune des cabosses. La pourriture brune des cabosses est la maladie cryptogamique la plus importante, la plus répandue et la plus dommageable dans le monde avec une perte de production estimée à 30 % à l'échelle mondiale (Lass et Wood, 1985) et de 30 à 40 % selon l'organisation internationale du cacao (ICCO, 2009). En Côte d'Ivoire les pertes de production sont estimées entre 20 et 45 % et peuvent atteindre 60 % en absence de protection phytosanitaire (CNRA, 2017). La maladie est caractérisée par l'apparition sur le cortex d'une petite tache translucide, qui brunit en 24-48 heures (Blaha et Lotodé, 1976 ; Lass et Wood, 1985). Les cabosses infectées de coloration brune collectées au cours de nos prospections étaient recouvertes d'une poudre blanchâtre et dures au

toucher. Le champignon *Phytophthora* sp est responsable de la pourriture brune des cabosses. En Côte d'Ivoire, deux espèces, *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora megakarya* ont été identifiées. *Phytophthora palmivora* est l'espèce la plus rependue alors que *P. megakarya* n'est présente que dans quelques grandes zones de production avec plus de 77 % de perte de production (Pohe Jean et al., 2013). Face à cette menace, plusieurs stratégies de lutte ont été menées à savoir les récoltes sanitaires, la taille, l'utilisation de fongicides de synthèse et la lutte avec les antagonistes (Mpika et al., 2009). Notons que l'utilisation des produits de synthèse demeure la plus pratiquée. Pour

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Site d'étude et matériel végétal en milieu paysans :

Le matériel végétal a été constitué de cabosses saines vertes immatures sensibles à *Phytophthora palmivora*. Elles sont issues de champ de cacaoyer dans le village d'Abbè située à 7 Km d'Azaguié à 05° 39 de la latitude Nord et 04° 00 de la longitude Ouest.

3.2 Matériel fongique :

Le matériel fongique était constitué d'un isolat de *Phytophthora palmivora* isolé sur des cabosses atteintes naturellement de pourriture brune dans une parcelle à Azaguié-Abbè. Ce sont des variétés de cabosses hybrides issues de sélection par la recherche et vulgarisé à grande échelle en milieu paysan. Elles sont constituées essentiellement de la variété Amelonado et Criollo qui sont sensibles à la pourriture brune.

3.3 Matériel de lutte biologique :

Il s'agit de formulation à base d'huiles essentielles issues d'hydrodistillation des feuilles et codifiées NECO, ASTOUN et Ferca. Ces huiles essentielles constituent donc la matière active de ces formulations. CALLOMIL SUPER (600g/Kg d'oxyde de cuivre + 60 g/Kg de Métalaxyl-M) a été utilisé comme fongicide de synthèse homologué dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire.

3.4 Dispositif expérimental en serre :

Le dispositif expérimental en serre était en

autant, ce moyen de lutte s'avère onéreux pour les paysans et a des effets néfastes sur l'environnement et la santé du producteur. Coût élevé, risques sanitaires, effets systémiques dévastateurs pour la faune, la flore et l'environnement, l'utilisation des produits de synthèse engendre de nombreux problèmes d'où la nécessité de chercher d'autres moyens de lutte à la fois efficaces et respectueuse des normes environnementales et sanitaires. L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets de trois biofongicides (NECO, ASTOUN et Ferca) sur la croissance *in vitro* et *in vivo* de *Phytophthora palmivora*.

randomisation totale avec quatre traitements. Chaque produit a été appliqué à deux concentrations (C1 = 5 ml/L et C2 = 10 ml/L). Les cabosses étaient disposées verticalement sur un arbre artificiel à raison de dix cabosses par arbres et un arbre a représenté un traitement. L'arbre témoin a porté dix cabosses inoculées avec les zoospores de *Phytophthora palmivora* et non traitées avec les produits.

3.5 Isolement et purification de *Phytophthora palmivora* sur cabosse infectée :

L'agent pathogène (*Phytophthora palmivora*) a été isolé sur des cabosses vertes immatures présentant des symptômes de pourriture brune sur un milieu de culture eau gélosée à 2,2 %. La cabosse infectée est lavée à l'eau de robinet. La partie nécrosée est nettoyée avec l'alcool à 90 %. Ensuite, un fragment de forme cubique est prélevé au front de croissance de la pourriture c'est-à-dire entre la partie de cabosse infestée et la partie saine. Trois de ces fragments ont été placés sur le milieu de culture eau gélosée puis les cultures ont été incubées à 26 °C à l'obscurité pendant 4 jours. Après la formation du thalle, un fragment mycélien est prélevé sur le front de croissance et placé sur le milieu de culture petit-pois gélosé (Huguenin & Boccas, 1971) pour la purification de la souche.

3.6 Inhibition *in vitro* de la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* par les biofongicides : La technique consiste à introduire et à mélanger le produit à tester dans un milieu de culture petit-pois gélosé après autoclavage à 121 °C, à la pression de 1 bar pendant 30 min, puis coulé à raison de 18 ml dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre puis maintenu en surfusion à 45 °C. L'ensemencement est effectué avec une pastille de mycélium prélevée sur le front de croissance du champignon à l'aide d'un emporte-pièce. Cinq boîtes de Pétri ont été repiquées par concentration avec trois répétitions. Les boîtes sont incubées à l'obscurité à 27 °C pendant quatre jours. Le milieu de culture utilisé est constitué de petits pois (200 g pour 1500 ml d'eau distillée) et de gélose (11 g d'Agar). Il est appelé petit-pois gélosé. Après autoclavage à la température de 121 °C sous une pression de 1 bar pendant 30 min, les fongicides ont été ajoutés à différentes concentrations au milieu de culture en surfusion à la température de 45°C environ. Les fongicides biologiques ainsi que le fongicide de référence ont été additionnés afin d'obtenir les concentrations de 100, 200, 400 et 800 ppm. Les milieux ainsi préparés ont ensuite été distribués dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 18 ml par boîte. Des rondelles de mycélium issues de culture âgées de 7 jours ont été prélevées à l'aide d'un emporte-pièce de 7 mm de diamètre puis mis sur les milieux de culture. Les cultures ont été scellées à l'aide du papier parafilm puis incubées à la même température de 25 °C et durant quatre de jours (Neri *et al.*, 2006). Pour chaque concentration de fongicide, trois boîtes de Pétri ont été utilisées et l'expérience a été répétée trois fois dans le temps. Les taux d'inhibition des biofongicides et du fongicide de synthèse ont été déterminés à partir de la mesure journalière de la croissance mycélienne (d1 et d2) sur boîte de Pétri contenant le milieu petit-pois gélosé et dans laquelle il n'y a pas eu d'apport de fongicide ou de biofongicide (Témoin) pour le champignon *Phytophthora palmivora*. Cette expérience a été

répétée trois fois dans le temps. Lorsque pour un champignon donné aucune croissance mycélienne n'a été observée, le disque mycélien est repiqué dans une boîte de Pétri contenant du milieu petit-pois gélosé sans ajout de fongicide. L'ensemble de ces boîtes est conservé à la même température et durant le même nombre de jours (Neri *et al.*, 2006). La croissance mycélienne des colonies a été évaluée tous les jours jusqu'au recouvrement total de la surface du milieu témoin. Les mesures de la croissance radiale du mycélium ont été effectuées selon deux droites perpendiculaires tracées au revers de chaque boîte de Pétri et qui se coupent en un point au milieu de la rondelle mycélienne. Lorsqu'aucune croissance du champignon n'a été observée dans une boîte de Pétri, le disque mycélien est repiqué dans une boîte de Pétri contenant le milieu petit-pois gélosé sans apport de fongicide. Le diamètre moyen des colonies a été déterminé par la formule suivante :

$$Dm (cm) = (d1 + d2) / 2$$

E : explant de diamètre moyen connu (X) à l'instant t0 (origine du E et X)

d1 : diamètre de l'explant E sur l'axe des ordonnées (axe 1) à l'instant t1

d2 : diamètre de l'explant E sur l'axe des ordonnées (axe 2) à l'instant t1 (Camara, 2011)

L'effet des fongicides sur la croissance du champignon a été déterminé à travers le taux d'inhibition de la croissance mycélienne calculé par la formule de Hmouni *et al.*, 1996 :

$$TI (\%) = (C0 - Cn / C0) \times 100,$$

où TI = le taux d'inhibition

C0 = diamètre moyen des colonies témoins

et Cn = diamètre moyen des colonies en présence du fongicide de synthèse ou des biofongicides. Les concentrations inhibitrices ont été utilisées pour calculer les concentrations inhibitrices à 50 % et à 90 % (CI50 et CI90) à l'aide des courbes sigmoïdales du probit du logarithme de base 10 de la concentration et du taux d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule revue de Paranagama *et al.*, 2003. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne sont transformés en valeurs probit

avec les droites de régression sous la forme de $y = a \log x + b$ selon la formule transformée de Paranagama *et al* (2003). y le probit, a le coefficient de régression, b la constante, x la concentration en fongicide, \log le logarithme décimal. Les équations de ces droites de régression ont permis de déterminer le CI50 et le CI90 qui sont les concentrations en fongicide réduisant de moitié et de 90 % la croissance mycélienne du champignon (Oxenham *et al.*, 2005 ; Neri *et al.*, 2006).

3.7 Effet *in vivo* des biofongicides sur la pourriture brune des cabosses

3.7.1 Récolte et préparation des cabosses vertes saines : Les cabosses vertes ont été récoltées au champ puis transportées au laboratoire tout en évitant les frottements entre celles-ci. Au laboratoire, les cabosses ont été lavées à l'eau de robinet et disposées sur des mousses imbibées d'eau pour rendre le cortex réceptif un jour avant leur inoculation.

3.7.2 Préparation de l'inoculum de *Phytophthora palmivora* : L'inoculum de *Phytophthora palmivora* est obtenu à partir des zoospores produites par le champignon. Plus précisément, les spores sont obtenues à partir d'une culture âgée de sept jours dans les boîtes de Pétri sur milieu carotte à l'obscurité. La culture est ensuite exposée à la lumière pendant 48 heures à la température de 25 °C. Afin de créer un choc thermique, 10 ml d'eau distillée sont versées sur la culture puis elle est laissée au réfrigérateur à 4 °C pendant 15 minutes puis à la température ambiante du laboratoire pendant 2 heures. La suspension de zoospore obtenue dans le tube à essai est dénombrée à l'aide d'une cellule de Malassez et ajustée à la concentration de 3.10^5 spore/ml. Les cabosses sont disposées verticalement sur un arbre artificiel et inoculées au niveau du pédoncule avec la suspension de zoospore à raison de 1 ml d'inoculum par cabosse. En ce qui concerne le traitement antifongique, 30 minutes après inoculation, les cabosses sont pulvérisées avec 1 ml de bouillie du produit aux concentrations de 5 ml/l et 10 ml/l. De la sorte, trois biofongicides ont été testés (NECO, ASTOUN, Ferca). Deux

témoins (positif et négatif) ont été impliqués afin de déterminer le taux d'inhibition. Le témoin négatif n'a ni été inoculé par les zoospores de *Phytophthora palmivora* ni traité avec les biofongicides. Cela nous a permis d'observer le pouvoir pathogène de la souche de *Phytophthora palmivora*.

3.8 Évaluation de l'effet antifongique *in vivo* des biofongicides sur cabosse inoculées par les zoospores de *Phytophthora palmivora*

3.8.1 Inoculation des cabosses avec les zoospores puis traitement par les fongicides : Dans le but de tester l'activité antifongique des biofongicides contre la pourriture brune des cabosses causée par *Phytophthora palmivora*, un essai de lutte *in vivo* a été mis en place selon la méthodologie modifiée de l'évaluation de la résistance à *Phytophthora palmivora* des cabosses détachées en laboratoire de Iwaro *et al.* (1997b, 2000). Pour cela, les cabosses sont disposées verticalement sur un arbre artificiel à raison de 10 cabosses par arbre et chaque arbre représente ainsi un traitement. Les cabosses ont été inoculées au niveau du pédoncule avec la suspension de zoospores préalablement préparée à raison de 1 ml d'inoculum par cabosse. Trente minutes après les inoculations, les cabosses ont été pulvérisées par aspersion avec 10 ml de bouillie de chaque produit pour une concentration donnée. Les concentrations de 5 ml/l et 10 ml/l ont été utilisés pour chacun des produits. Deux témoins (témoins négatif et positif) ont également été utilisés. Le témoin positif a été inoculé avec la suspension de zoospores uniquement pendant que le témoin négatif n'a reçu aucun traitement. Cette expérience a été répétée trois fois dans le temps. Quatre jours après l'apparition des premiers symptômes de pourriture brune, la sévérité de l'infection a été évaluée suivant l'échelle de notation modifiée d'Iwaro *et al.*, (1999b, 2000) qui varie de 1 (aucune lésion) à 8 (lésions fusionnées).

1 : aucune lésion visible ;

2 : 1 à 5 lésions localisées ;

3 : 6 à 15 lésions localisées ;

- 4 : > lésions localisées ;
 5 : 1 à 5 lésions en expansion ;
 6 : 6 à 15 lésions en expansion ;
 7 : > à 15 lésions en expansion ;
 8 : lésions localisées.

A l'issue de cette annotation, l'inhibition des lésions sur les cabosses, exercée par les biofongicides a été estimée par le calcul du taux d'inhibition selon la formule décrite par Whipps (1997) et reprise par Mpika *et al.*, 2009.

$$I (\%) = (1 - C_n / C_o) \times 100$$

I (%) représente l'inhibition moyenne en pourcentage, C_n est la note moyenne de la

4 RESULTATS

4.1 Effet *in vitro* des biofongicides sur la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* : Les biofongicides et le fongicide de synthèse (témoin positif) ont eu, de façon générale, un effet significatif sur la croissance radiale mycélienne de *Phytophthora* sp. En effet, la croissance mycélienne a été réduite en présence des huiles essentielles (NECO, ASTOUN, Ferca) et du fongicide de synthèse CALLOMIL SUPER comparé au témoin (Figure1). Les plus forts taux d'inhibition ont été enregistrés par NECO, ASTOUN et Ferca avec respectivement 78,37 %, 78,32 % et 79,41 % à la concentration la plus élevée (800 ppm) pendant les quatre jours d'incubation comparé au fongicide CALLOMIL SUPER qui a

sensibilité des cabosses à *Phytophthora palmivora* en présence des biofongicides

Co est la note moyenne de sensibilité à *Phytophthora palmivora* des cabosses en absence des biofongicides (témoin positif).

3.8.2 Analyses statistiques : Les données obtenues lors de cette expérimentation ont été soumises à une analyse de variance ou ANOVA avec le logiciel STATISTICA version 7.1. En cas de différence significative entre les moyennes, le test de Newman-Keuls a été utilisé au seuil de 5 % pour la séparation des moyennes.

enregistré le meilleur taux d'inhibition de 80,29 % (Figure 2). Ces différentes valeurs ne sont pas significativement différentes. Les plus petites concentrations ont montré les taux d'inhibition plus faibles voire insignifiant avec une probabilité P = 0,00. La souche fongique a été très sensible à NECO, ASTOUN, Ferca et CALLOMIL SUPER à 800 ppm. Par ailleurs le NECO, le ASTOUN et le CALLOMIL SUPER ont eu un effet fongicide à la concentration de 2000 ppm contrairement à Ferca qui a eu un effet fongistatique. Les résultats des tests *in vitro* nous ont permis de choisir les meilleurs produits et de déterminer les concentrations efficaces pour les tests *in vivo*.

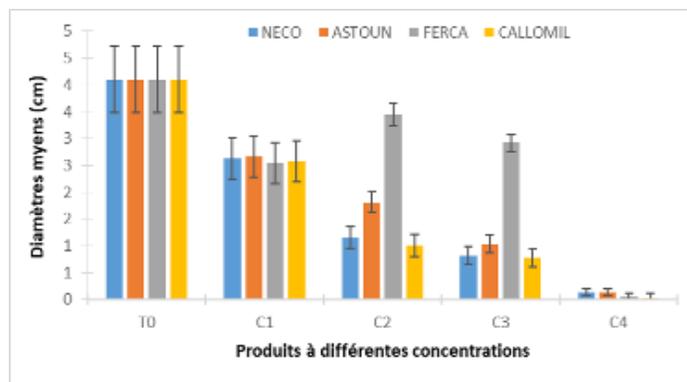


Figure 1 : Réduction de la croissance mycélienne *in vitro* de *Phytophthora palmivora* en présence de NECO, ASTOUN, Ferca et CALLOMIL SUPER comparé au témoin T0 non traité pendant quatre jours.

T0 : témoin non traité ; C1 : 100 ppm ; C2 : 200 ppm ; C3 : 400 ppm ; C4 : 800 ppm

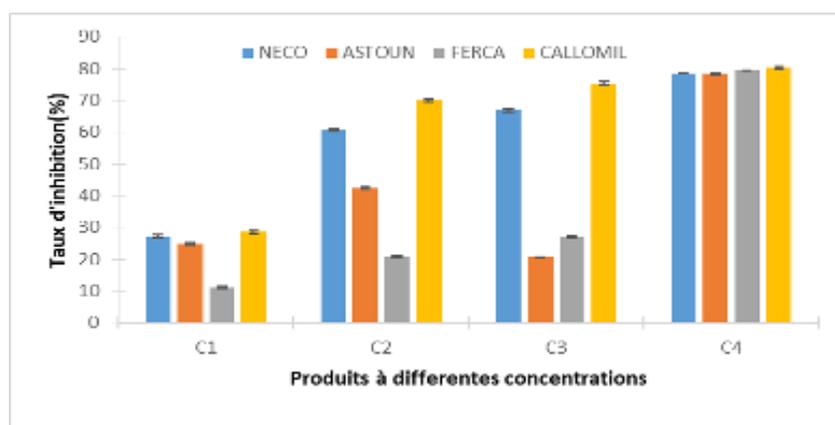


Figure 2 : Effet *in vitro* de NECO, ASTOUN, Ferca et le CALLOMIL SUPER sur la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* à différentes concentrations pendant quatre jours.

T0 : témoin non traité ; C1 : 100 ppm ; C2 : 200 ppm ; C3 : 400 ppm ; C4 : 800 ppm

4.2 Concentrations inhibitrices à 50 et à 90 % (CI₅₀ et CI₉₀) de la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora*:

Les concentrations inhibitrices à 50 et 90 % de la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* diffèrent selon les produits (Tableau 1). Parmi les fongicides biologiques, NECO a enregistré la plus faible concentration (233 ppm) qui inhibe 50 % la croissance mycélienne

du pathogène. Cette concentration est très proche de la CI₅₀ du fongicide de synthèse CALLOMIL SUPER qui est de 228 ppm. La CI₅₀ la plus élevée qui est de 553 ppm a été obtenue avec FERCA. La CI₉₀ a été de 862, 915, et 1015 ppm respectivement pour CALLOMIL SUPER, ASTOUN, NECO et FERCA.

Tableau1 : Concentrations inhibitrices à 50 % et 90 % (CI₅₀ et CI₉₀) de NECO, ASTOUN, FERCA et CALLOMIL SUPER

Produits	CI ₅₀ (ppm)	CI ₉₀ (ppm)
NECO	233	915
ASTOUN	344	902
FERCA	553	1015
CALLOMIL SUPER	228	862

4.3 Effet *in vivo* des biofongicides sur le développement de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer :

Les premiers symptômes visibles de la pourriture brune ont été observés quatre jours après inoculation sur les cabosses de cacaoyer contaminées uniquement avec la suspension de zoospores de *Phytophthora palmivora* (témoin). Par contre, les premiers symptômes des cabosses inoculées avec la suspension de zoospores de *phytophthora palmivora* puis traitées avec les fongicides ont été vus cinq jours après inoculation. Les cabosses

traitées avec les biofongicides et le fongicide de synthèse ont réduit significativement l'extension des nécroses causées par *Phytophthora palmivora*. Ces produits ont montré des notes de sensibilité moyenne qui varient de 0 à 2,7±0,91 comparativement à la note 5±0 enregistrée avec le témoin pendant les dix jours d'expérimentation (Figure 3 et 4), ce qui correspond à des taux d'inhibition variant de 29,88±19 à 100 %±00 pour les doses de C1=5 ml/l et C2=10 ml/l (Figure 5).

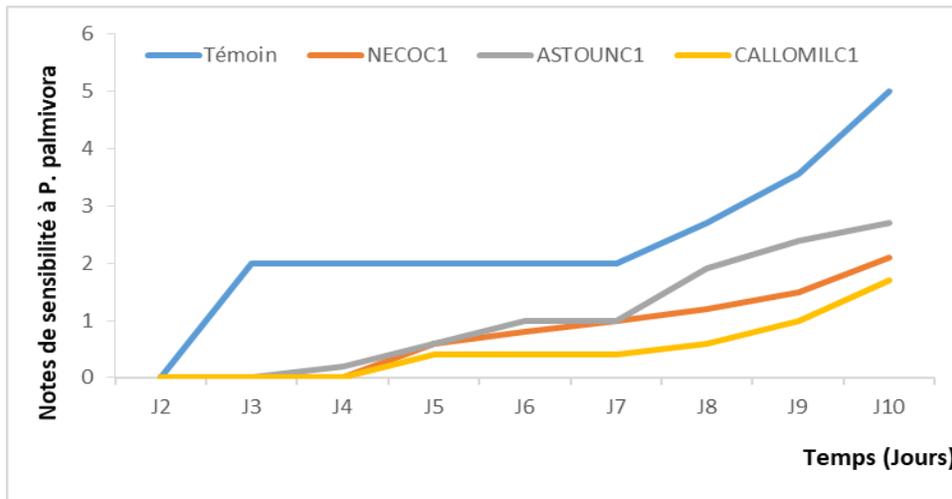


Figure 3 : Evolution journalière des notes de sensibilité des cabosses à *Phytophthora palmivora* en présence ou non des fongicides à la concentration de 5ml/L

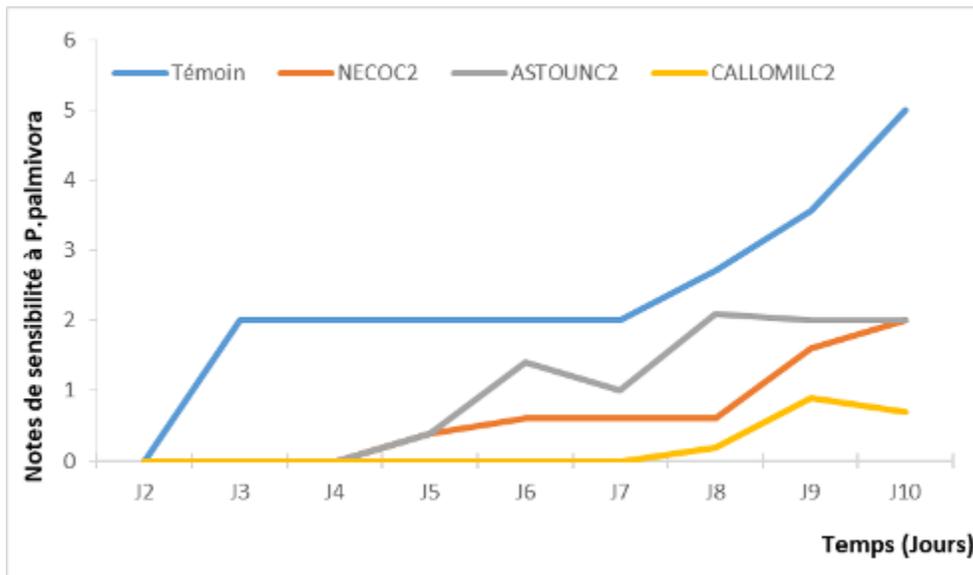


Figure 4 : Evolution journalière des notes de sensibilité des cabosses à *Phytophthora palmivora* en présence ou non des fongicides à la concentration de 10 ml/L

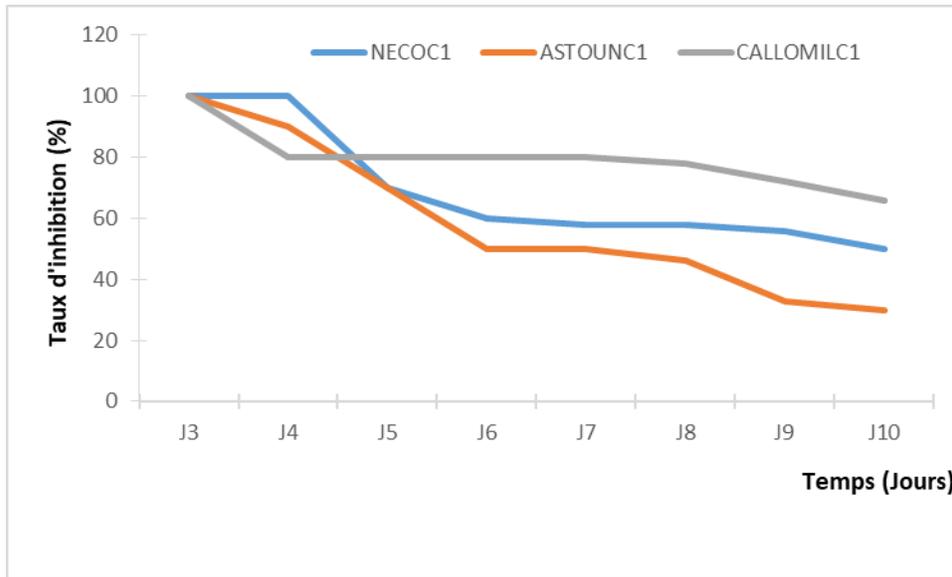


Figure 5 : Taux d'inhibition de la pourriture brune des cabosses inoculées avec la suspension de zoospores puis traitées avec les fongicides NECO, ASTOUN et CALLOMIL SUPER à C1=5 ml/l

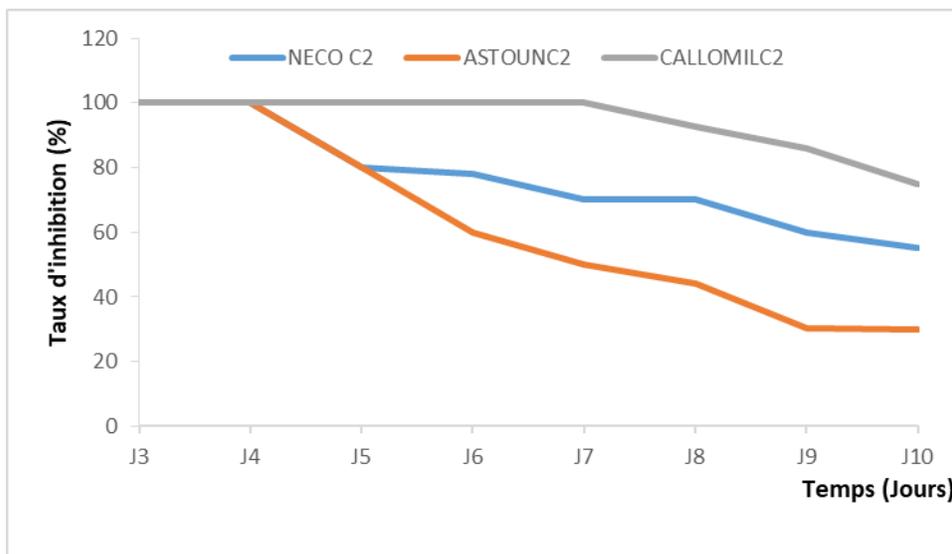


Figure 6 : Taux d'inhibition de la pourriture des cabosses inoculées avec la suspension des zoospores puis traitées avec les fongicides NECO, ASTOUN et CALLOMIL SUPER à 10 ml/l

5 DISCUSSION

L'activité *in vitro* des biofongicides NECO, ASTOUN et Ferca contre *Phytophthora palmivora* responsable de la pourriture brune des cabosses de cacao a été étudiée et comparée à celle du fongicide de synthèse CALLOMIL SUPER à base d'oxyde de cuivre et de métalaxyl sur milieu petit pois. Ces produits ont réduit significativement la croissance radiale

mycélienne de *Phytophthora palmivora*. Les plus forts taux d'inhibition ont été enregistrés avec les concentrations les plus élevées (800 ppm). Les produits biologiques formulés à partir des huiles essentielles sont connues pour leurs actions fongicides, bactéricides et insecticides. Nos résultats sont similaires à ceux de plusieurs auteurs. Ils convergent notamment avec les

résultats des travaux de Doumbia *et al.*, 2012) et Soro, 2013 qui ont montré l'efficacité de ces produits sur la croissance mycélienne *in vitro* de *Fusarium*. D'autre part, Gadj *et al.* (2015) ont montré la sensibilité de *Phytophthora* sp vis à vis des produits biologiques. L'effet inhibiteur de ces produits serait dû à la présence des composés majoritaires qui entrent dans la composition des huiles essentielles. En effet, l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* (L.), collectée au Sud du Bénin est majoritairement composée de géraniol (41,3%), de néral (33%), de myrcène (10,4%), et d'acétate de géranyl (2,4%) (Konfo, 2012). Les travaux de Kobenan *et al.*, 2018 ont à leur tour montré que les composés majoritaires de *Ocimum gratissimum* sont des monoterpènes oxygénés dont le Thymol (24,57 %) et le Camphre (5,53 %) et les monoterpènes hydrocarbonés que sont le p-Cymène (37,79 %) et le Sabinène (6,60 %). Or, Yoshimura *et al.*, 2010 ont montré que les huiles essentielles riches en monoterpènes oxygénés possèdent des effets toxiques sur les membranes mitochondriales des moisissures, ce qui provoque une inhibition du métabolisme énergétique mitochondrial et entraîne des perturbations des processus physiologiques et biochimiques de la cellule. L'activité antifongique modérée de l'huile essentielle de *Eucalyptus citriodora* serait due à sa composition chimique qui diffère de celles des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* (L.) et de *Ocimum gratissimum*. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est non seulement le résultat de ces composés majoritaires mais aussi de l'effet de synergie entre les composés minoritaires (Soumanou and Adjou, 2016). Les plus faibles concentrations inhibitrices à 50 et 90 % ont été enregistrées par NECO, CALLOMIL SUPER et ASTOUN. La sensibilité de *Phytophthora* sp aux fongicides à base d'oxyde de cuivre a été prouvée à maintes reprises, par plusieurs auteurs. Nos résultats corroborent ceux de Pohe *et al* (2013) qui ont trouvé que, associé à l'oxyde de cuivre et le métalaxyl réduit considérablement le taux d'attaque de *Phytophthora* sp sur les cabosses de

cacaoyer. Des chercheurs du CNRA (2017) ont également souligné l'action fongicide de l'oxyde de cuivre associé au métalaxyl. Ils stipulent que ce produit est un fongicide systémique qui pénètre dans les premières couches du cortex, conférant une meilleure protection au fruit. Les biofongicides NECO et ASTOUN ont enregistré un taux d'inhibition très significatif sur la pourriture brune des cabosses en serre aux concentrations de 5 ml/l et 10 ml/l comparé au fongicide de synthèse CALLOMIL SUPER. Ces taux ont diminué progressivement jusqu'au dixième jour. Ces résultats apparaissent comme une preuve de plus quant aux propriétés fongicides ou fongistatiques des produits biologiques déjà mentionnées par un certain nombre de chercheurs. Ainsi que l'ont démontré Kassi *et al.*, 2014, les bananiers des parcelles traitées avec le biofongicide NECO se sont révélés moins sujets à l'infection de *Mycosphaerella fijiensis*, agent responsable de la cercosporiose noire que ceux des parcelles témoins. Les premiers symptômes (rang de la PJFT) ont été majoritairement observés sur les feuilles de rang 2 dans les parcelles témoins et de rang 3 dans les parcelles traitées, rendant ainsi compte de la baisse de la pression parasitaire suite aux applications de NECO. Un an plus tôt, Pohe et Agneroh (2013) avaient également prouvé la sensibilité de *Phytophthora* sp vis-à-vis des huiles essentielles. Les résultats de leurs travaux ont montré un effet positif significatif de l'extrait d'huile de neem sur la réduction des attaques de *Phytophthora* sp sur les cabosses de cacaoyer. Gadj *et al.* (2015) ont eux aussi mis en évidence un effet inhibiteur significatif de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD-1 (Btk HD-1) à la fois sur la germination de zoospores et la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* dans un milieu gélosé contenant du petit pois. Par ailleurs, nos résultats viennent une fois de plus, corroborer ceux de Mpika *et al.* (2009) et entériner par suite, l'hypothèse des vertus antifongiques reconnues aux huiles essentielles. Ces derniers ont révélé l'activité inhibitrice des isolats de *Trichoderma* (T) sur les cabosses. Les isolats de

Trichoderma spirale, *Trichoderma asperellum* et *Trichoderma virens* ont montré un effet fongicide, donc un plus fort pouvoir mycoparasitaire à *P. palmivora*. L'application de *Trichoderma* spp sur les disques de feuilles et sur les cabosses a permis la réduction de la sensibilité foliaire de six clones et la sévérité des attaques sur cabosses de *P. palmivora*. En somme, la réduction de la sévérité des attaques sur cabosses de *Phytophthora palmivora* pourraient s'expliquer par la présence de composés majoritaires contenus dans ces deux fongicides.

6 CONCLUSION

Au total, les travaux préliminaires réalisés au laboratoire sur les biofongicides NECO, ASTOUN et Ferca comparés aux fongicides de synthèse nous ont permis d'avoir une idée nette des concentrations à utiliser en serre. Nous avons découvert que les biofongicides NECO et ASTOUN sont plus réactifs que Ferca sur la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora*. Ces substances se sont révélées efficaces sur les cabosses inoculées avec les zoospores de *Phytophthora palmivora* et traitées ensuite aux biofongicides. En tout état de cause, ces expériences ont une fois de plus, fait montre de l'efficacité du fongicide de référence, déjà

Les résultats de nos travaux donnent beaucoup d'espoirs aux producteurs de cacao en Côte d'Ivoire avec l'utilisation de NECO et ASTOUN qui sont des biofongicides homologués sur la banane en Côte d'Ivoire et qui pourraient l'être sur le cacaoyer à condition que des essais soient réalisés en plein champ. Ces biofongicides joueraient un rôle important dans la recherche de stratégies de lutte durable et pour des productions saines.

homologué dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire. Aussi les résultats obtenus ont-ils permis de mettre en évidence l'efficacité de ces produits contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer avec les doses efficaces pour les tests en milieu réel. Ils pourraient constituer une alternative à la lutte chimique car, contrairement aux pesticides de synthèse, leur utilisation présenterait une sécurité pour l'environnement et n'aurait aucun effet sur la faune bénéfique et serait non toxique pour l'homme.

7 REMERCIEMENT à la Banque Mondiale pour le financement de ces travaux

8 REFFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blaha G. et Lotode R: 1976. Un critère primordial de sélection du cacaoyer au Cameroun : la résistance à la pourriture brune des cabosses. Variations des réactions à la maladie en liaison avec les données écologiques et l'état physiologique des fruits. Café Cacao Thé, 20 (2) : 97-116.
- Camara B: 2011. Contribution à la caractérisation des parasites fongiques foliaires et telluriques en Côte d'Ivoire chez le bananier (*Musa* spp) et recherche de méthodes de lutte. Thèse de doctorat, Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire. 231 p.
- Doumbouya M, Abo K, Lepengue AN, Camara B, Kanko K, Aïdara D. et Koné D : 2012. Activités comparées *in vitro* de deux fongicides de synthèse et de deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraîchères en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 50: 3520–3532.
- Gadji AAG, Yapo OB, Abo K, Coulibaly K, Kébé BI, Gnepe JR. et Tyagi RD : 2015. *In vitro* assessment of biopesticide *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki hd-1 effectiveness on *Phytophthora palmivora*, agent of cocoa black pod rot in Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*

- vol.11, No.21 ISSN : 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431.
- Hmouni A, Hajlaoui M. et Mlaiki A : 1996. Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. OEPP/EPPO bulletin 26 : 697-705.
- Huguenin G. et Boccas B : 1971. Rôle de quelques facteurs dans la formation et la germination des zoospores chez le *Phytophthora palmivora* Bult. Ann. *Phytopathol* 3 (3) : 353-71.
- Iwaro AD, Ireenivasan TN. et Umaharan P : 1997b. *Phytophthora* spp resistance in cacao (*Theobroma cacao*), influence of pod morphological characteristics. Plant pathology, 46 (4) : 557-565.
- Iwaro AD, Sreenivasan TN, Butler DR, Thevénin JM, Mooleedhar V, Bekele F, Sounigo O. et Umaharan P : 2000. Rapid screening for *Phytophthora* pod rot resistance by means of detached pod inoculation. In : Eskes A.B. & Efron Y. Eds. Proceedings of the CFI/ICCO/IPGRI Projet Workshop on Workin procedures for cocoa germplasm evaluation and selection. 1-6 February 1998. Montpellier (France). pp. 109-111.
- Kassi FM, Badou OJ, Tonzibo ZF, Salah Z, Amari L, Dadé GE. et Koné D : 2014. Action du fongicide naturel NECO contre la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) chez le bananier plantain (AAB) en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 75: 6183– 6191 ISSN 1997–5902.
- Kobenan KC, Tia EV, Ochou CEG, Bini NKKKM, Dagnogo M, Dick EA. et Ochou GO : 2018. Comparaison du potentiel insecticide des huiles essentielles de *Ocimum gratissimum* L. et de *Ocimum canum* Sims sur *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera : Gelechiidae), insecte ravageur du cotonnier en Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*, vol.14, n°21 ISSN : 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857-7431.
- Konfo C, Ahoussi-Dahouenon E, Sessou P, Yehouenou B, Djenontin S, De Souza C. et Sohounhloue D : 2012. Stabilization of Local Drink "Tchakpalo" produced in Benin by addition of Essential Oil Extracted from Fresh leaves of *Cymbopogon citratus*. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8) : 40-49.
- Kpatinvoh B, Adjou ES, Dahouenon-Ahoussi E, Konfo C, Atevi B, Soumanou MM. et Sohounhloue D CK : 2017. Efficacité des huiles essentielles de trois plantes aromatiques contre la mycoflore d'altération du niébé collecté dans les magasins de vente du Sud-Bénin. *Journal of Applied Biosciences* 109: 10680-10687.
- Lass RA : 1985. Disease. In : *Cocoa*. (Wood GA R et Lass RA, editors). 4e édition, Longman, 265-365.
- Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva e Mota JW, Loor R, Kuhn DN, Brown SJ. et Schnell RJ : 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). PLoS ONE 3(10) : e3311.doi:10.1371/journal.pone.0003311.
- Mpika J, Ismaël B Kébé, Irina S Druzhinina, Monika Komon-Zélazowska, Christian P Kubicek. et Séverin Aké : 2009. Inhibition de *Phytophthora palmivora*, agent de pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire, par *Trichoderma* sp. *Sciences et Nature* Vol. 6 N°1 : 49 – 62.
- Neri F, Mari M. et Brigati S : 2006. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant pathology* 55: 100-105.
- Oxenham SK, Svoboda KPN et Walters DR. : 2005. Antifungal activity of essential oil Basil (*Ocimum basilicum*). *Phytopathology*, 153: 174 – 180.

- Paranagama PA, Abeysekera KHT, Abeywickrama K et Nugaliyadde L : 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice. Letter in *Applied Microbio.* 37 : 86 – 90.
- Pohé J et AGneroh TA : 2013. L'huile des graines de neem, un fongicide alternatif à l'oxyde de cuivre dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 62: 4644-4652.
- Pohé J, Koula J, Rabe GR. et Dezai LR : 2013. Agressivité de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer dans le sud-est de la Cote d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, vol. 20, Issue 2: 3126-3136.
- Soro S, Abo K, Koné D, Coffi K, Kouadio JY. et Aké S : 2011. Comparaison de l'efficacité antifongique de l'huile essentielle d'*ocimum gratissimum* L. et du fongicide de synthèse mancozèbe contre le mycopathogène tellurique, *fusarium oxysporum* f. sp. *Radici-lycopersici* en cultures de tomate (*lycopersicon esculentum* mill.) sous abri en côte d'Ivoire. *Agronomie Africaine* 23 (1) : 43 – 52.
- Soumanou MM. et Adjou ES : 2016. Sweet Fennel (*Ocimum gratissimum*) Oils. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, 765–773.
- Tano AM : 2012. Crise cacaoyère et stratégies des producteurs de la sous-préfecture de Méadji au Sud-Ouest ivoirien. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France. 239 p.
- Whipps JK : 1997. Developpement in the biologique control of soil-borne plant pathogens. *Advances in botanical research* 26, p1-134.
- Yoshimura H, Sawai Y, Tamotsu S. et Sakai A : 2010. 1,8 cineole inhibits both proliferation and Elongation of BY-2 cultured tobacco cells. *J. Chem Ecol.* 37(3) :320-3