

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Présentation de la zone d'étude

Le centre national de recherche agronomique (CNRA) se trouve dans le département de Bambey situé en plein coeur du bassin arachidier et à l'Ouest de la région de Diourbel à laquelle il fait partie. Il se positionne sur la route nationale III à 120 km Est de Dakar. Il couvre une superficie de 135.200 ha soit 1.352 km² (PAERD, Juillet 2007). La majorité de la population de Bambey est rurale et agricole. Bambey est faiblement doté en potentialités naturelles et est constitué par un relief essentiellement plat et des sols diors. Les trois grandes cultures qui y rencontrées sont le mil, l'arachide et le niébé. Le climat est de type soudano-sahélien à prédominance sahélienne. Il est chaud et sec. Les températures sont toujours élevées et variables avec un minimum de 24°C en Janvier et un maximum de 35°C en mai-Juin en moyenne. Il est caractérisé par une faible pluviosité et une forte évaporation. Quant à la pluviométrie, la variabilité inter annuelle s'est accrue. Le département est sous l'influence d'une longue saison sèche (fin octobre à fin juin) et d'une courte saison pluvieuse.

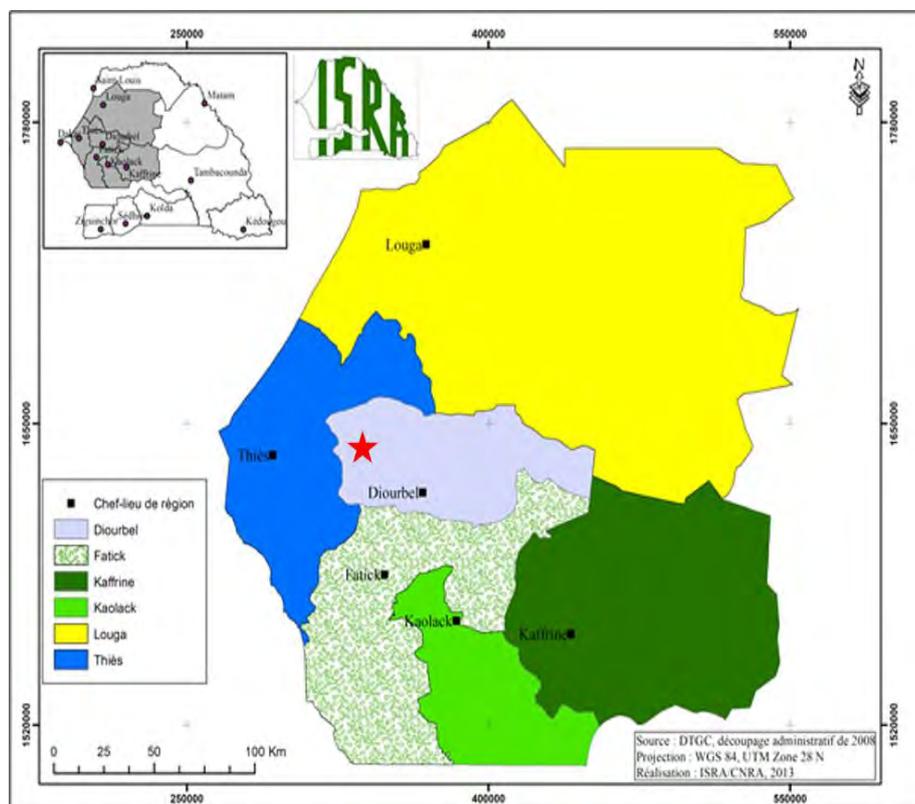


Figure 3 : Carte de localisation du CNRA de Bambey

2. Essai de criblage au champ

2.1. Matériel

Le matériel végétal est constitué par 153 lignées de niébé provenant des instituts de recherche de 5 pays : ISRA (Sénégal), INERA (Burkina Faso), IITA (Nigéria), SARI (Ghana) et UCR (Etats-Unis). L'essai a été conduit au centre national de recherche agronomique de Bambey durant l'hivernage 2017, sur une parcelle d'expérimentation infestée au champignon *M. phaseolina*.

2.2. Dispositif expérimental

Le dispositif est en blocs (07 blocs) aléatoires complets randomisés avec 3 répétitions. Les blocs sont distantes de 1 m et contiennent chacun 22 lignées à l'exception du dernier qui en a 21. Les parcelles élémentaires sont constituées de 02 lignes de 2m de long. L'écartement entre parcelle est de 0,75m ; la densité, 50cm entre ligne et 50 cm sur la ligne soit 5 poquets par ligne. Les répétitions sont distantes de 2,5 cm.

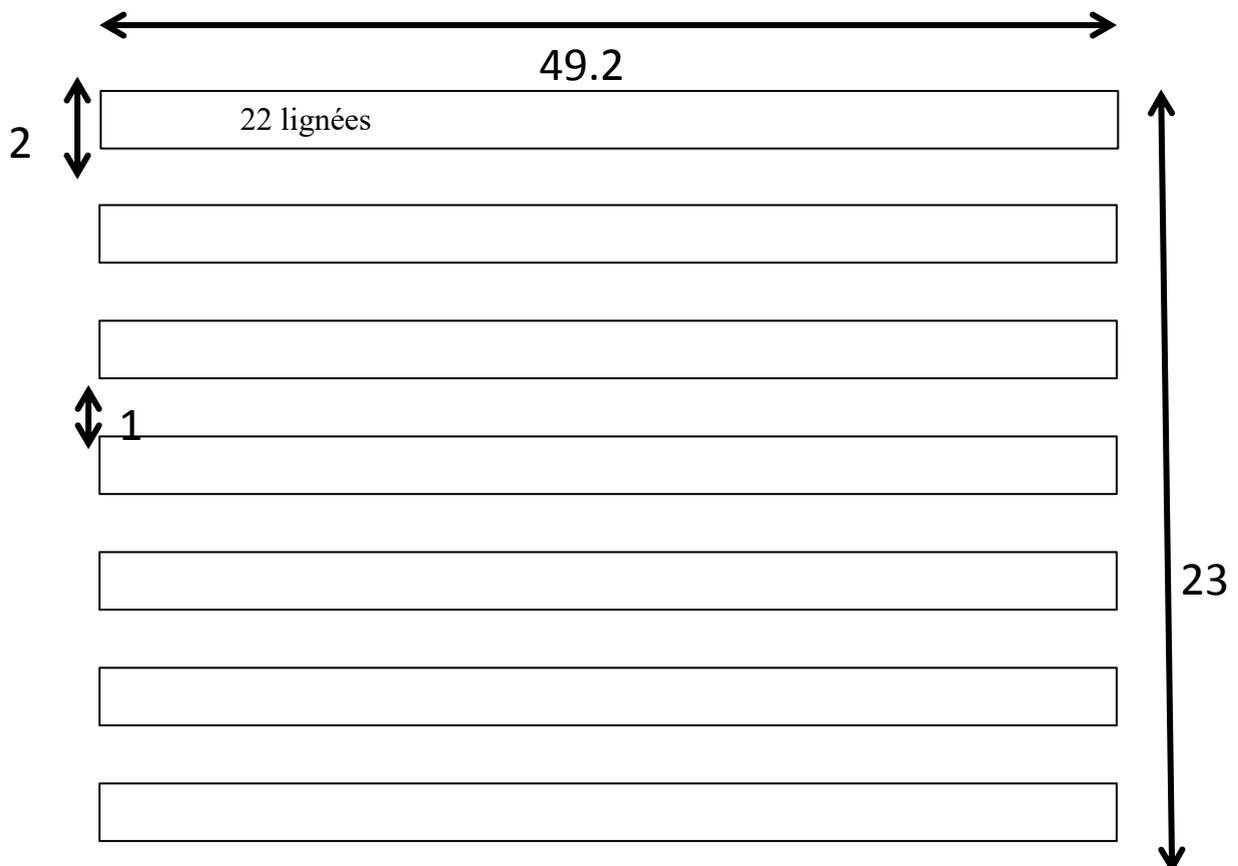


Figure 4 : Dispositif expérimental d'une répétition

2.3. Observations et mesures

Des observations et mesures sont effectuées au champ pour déterminer le taux de levée des lignées ainsi que l'incidence et la sévérité de la maladie au cours du stade de développement de la plante. Ces évaluations sur l'incidence et la sévérité sont essentiellement basées sur les symptômes notés.

2.3.1. Levée

Le nombre de pieds levés est compté sur chaque parcelle. Ainsi, le taux de levée des différentes lignées est calculé en faisant le rapport entre le nombre de pieds levés et le nombre de graines qui ont été semées (10 graines par parcelle) selon la formule ci-dessous :

$$\text{Taux de levée} = (\text{Nombre de pieds levés} / \text{Nombre de graines semées}) * 100$$

2.3.2. Incidence

Pour l'incidence, il s'agit de voir le taux d'infection des plantes. Les plants attaqués sur chaque traitement aux stades ramification, fructification et maturité sont comptés et enregistrés sur tableau Excel 2010. L'incidence de la maladie y est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Incidence} = (\text{NPA} / \text{NT}) * 100$$

NPA = nombre de plantes attaquées

NT = nombre total de plantes observées

2.3.3. Sévérité

L'évaluation de la sévérité consiste à déterminer le degré d'attaque du pathogène en affectant un score à chaque plante suivant la nature des symptômes observés. L'échelle ainsi choisie, varie du niveau 1 au niveau 5 délimitant des intervalles de pourcentages d'attaque définis.

Le score 1 est attribué aux plantes saines c'est-à-dire ne présentant aucun symptôme de la maladie.

Score 2 :] 0-25[quelques ponctuations noires sur la tige témoignant d'un début d'attaque et un léger dessèchement ne dépassant pas 25% des feuilles, sont observés à ce niveau.

Score 3 : [25-50[des feuilles présentent un dessèchement prononcé.

Score 4 : [50-75[désigne les plantes présentant un dessèchement très poussé et flétrissement.

Score 5 : [75-100] inclut les plantes mortes ou atteintes à plus de 75%.

La sévérité (SEV) de la pourriture charbonneuse au champ a été calculée selon la formule décrite par William *et al.* (1981) :

$$SEV = \frac{\sum_{i=1}^5 n_i (i-1)}{N(5-1)} * 100$$

n = nombre de plant présentant la sévérité i

i = niveau de sévérité ;

5 = étendue de l'échelle

N = nombre total de plants étudiés ;

Les photos ci-dessous présentent l'échelle d'annotation en fonction des différents symptômes observés.



Photo 2: Plante saine (score 1)



Photo 1 : Ponctuations noires sur tige et décoloration des feuilles (score 2)



Photo 3 : Dessèchement des feuilles (score 3)



Photo 4 : Dessèchement et flétrissement (score 4)



Photo 5 : Plante morte ou totalement atteinte (score 5)

3. Activité *in vitro* des extraits végétaux

Cette étude s'insère dans le cadre de la lutte biologique avec utilisation d'extraits végétaux. L'objectif est d'étudier l'activité antifongique des extraits d'*Azadirachta indica* (neem) et de *Lawsonia inermis* (henné) sur la croissance mycélienne du champignon *M. phaseolina*.

3.1. Matériel

Le matériel végétal est constitué par des feuilles d'*Azadirachta indica* et de *Lawsonia inermis*. Ces feuilles ont été cueillies au CNRA de Bambey sur un même arbre et à la même date.

Le matériel fongique : 24 isolats du champignon *Macrophomina phaseolina* obtenus à partir d'échantillons de sol infecté et de plants de niébé récoltés sur l'essai de criblage au champ et présentant les symptômes de la pourriture charbonneuse.

3.2. Préparation du milieu de culture PDA

Pour préparer le milieu de culture, 39g de Potato Dextrose Agar (PDA) sont pesés à l'aide d'une balance à précision et ajoutés dans un litre d'eau distillée contenue dans un erlenmeyer. Ce mélange est chauffé et homogénéisé sur une plaque métallique avec un barreau aimanté. Le milieu est stérilisé à l'autoclave à la température de 121°C pendant 15 minutes. Un antibiotique (chloramphénicol 500mg/L) a été ajouté au milieu afin d'éviter toute contaminations bactériennes. Le milieu ainsi préparé a été coulé dans des boîtes de Pétri sous une hotte à flux laminaire à proximité d'une flamme. Les boîtes coulées sont laissées sous la hotte jusqu'à solidification du milieu.

3.3. Isolement du champignon

L'isolement consiste à extraire un pathogène sur un tissu végétal infecté par celui-ci. Le matériel est constitué par des plants de niébé récoltés sur l'essai au champ et d'échantillons de sol composite prélevés au champ d'expérimentation suivant la méthode *W*. Pour constituer l'échantillon de sol composite, les prélèvements des sous-échantillons ont été faits à l'aide d'une tarière au milieu et aux extrémités de la lettre *W* tracées sur le sol. Ainsi les cinq échantillons prélevés dans chaque parcelle ont été regroupés dans un sachet plastique identifié par le nom de la répétition et la date de prélèvement.

Le champignon a été isolé à partir des échantillons de sol par la méthode des dilutions et à partir des plants de niébé infectés. Pour toutes les deux méthodes, la culture est faite sur un milieu nutritif Potato Dextrose Agar (PDA) favorable au développement du champignon.

3.3.1. Isolement par la méthode des dilutions :

L'échantillon de sol a été préalablement homogénéisé et tamisé (tamis de maille 2 mm). Une quantité de 10 g de sol est ensuite pesée avec une balance de précision et trempée dans 50 ml d'eau de javel (0,5%) pendant 10 min. Le mélange est passé sous le robinet sur deux tamis superposés de mailles respectives 1 mm et 50 μ m pendant 1 min. Les résidus de sol sont récupérés et mis dans 50 ml d'eau distillée stérile. Cette solution constitue la solution mère. De celle-ci, 5ml sont prélevés et ajoutés dans un erlenmeyer contenant 45 ml d'eau distillée. La solution ainsi obtenue constitue la première dilution 10^{-1} . Les dilutions successives sont faites en prélevant à chaque fois 5 ml de la dilution précédente à verser dans un erlenmeyer contenant 45 ml d'eau distillée. A partir de ces dilutions, 1 ml de solution est prélevé avec une micropipette et mis dans des boîtes de pétri contenant un milieu de culture PDA. La solution est ensuite bien étalée sur la boîte en faisant des stries avec une pipette pasteur en plastique. Les boîtes ensemencées sont incubées à l'étuve (Fisher isotemp incubator) à une température de 30°C pendant 6 jours.

3.3.2. Isolement à partir des plants

Des échantillons de niébé (plante entière) présentant des symptômes de la pourriture charbonneuse ont été récoltés au champ. Des explants sont coupés à partir des tiges et racines au niveau du front d'avancement de la maladie de manière à prélever des parties malades et

des parties saines. Les tiges et racines découpées en petits morceaux de 0,5 à 1cm de long sont trempées par la suite dans de l'eau de javel 0,5 % pendant 15 min pour enlever les germes superficiels. Les explants sont enfin rincés deux fois à l'eau distillée et essorés sur un papier filtre avant d'être ensemencés dans les boîtes de pétri contenant le milieu PDA solide à raison de trois explants par boîte. Les boîtes sont incubées à l'étuve à la température de 30°C pendant 3 jours.

3.4. Purification et multiplication du champignon

La purification consiste à repiquer les isolats obtenus sur des boîtes de pétri contenant un milieu nutritif Potato Dextrose Agar (PDA) afin d'obtenir des colonies pures (sans contamination). Ainsi, dès le début du développement mycélien, des repiquages ont été effectués. Pour cela, des rondelles sont coupées au niveau du front d'avancement du mycélium à l'aide d'un emporte-pièce puis déposés à l'aide d'une lame scalpel au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes sont incubées à l'étuve à une température de 30°C pendant 2 à 3 jours.

La multiplication quant à elle est le processus qui nous permet d'obtenir un grand nombre d'isolats purs. Enfin, pour multiplier le nombre d'isolats, d'autres repiquages ont été faits avec les isolats purs préalablement obtenus. Un nombre assez important d'explants est prélevé et déposé dans des boîtes de pétri contenant un milieu PDA déjà solidifié. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à la température de 30°C pendant 3 jours.

3.5. Préparation des extraits végétaux

3.5.1. Stérilisation et broyage des feuilles

Des feuilles d'*Azadirachta indica* et de *Lawsonia inermis* ont été cueillies et stérilisées. Pour la stérilisation, les feuilles ont été trempées pendant 2 minutes, dans une bassine contenant de l'alcool à 70%. Elles sont rincées deux fois à l'eau distillée puis séchées à la température ambiante pendant 21 jours. Après séchage, les feuilles sont pesées et broyées dans un mortier pour obtenir de la poudre de neem et de henné.



Photo 7 : Séchage des feuilles stérilisées



Photo 6 : Broyage des feuilles sèches

3.5.2. Préparation des extraits aqueux

Pour préparer les solutions, la poudre de la plante est pesée et trempée dans de l'eau distillée. Ainsi, trois concentrations (5%, 10% et 15%) ont été préparées en raison de :

- 50g de poudre dans 1000ml d'eau distillé pour la concentration 5% ;
- 100g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée pour la concentration 10% ;
- 150g de poudre dans 1000 ml d'eau distillée pour la concentration 15%.

Le mélange est ensuite bien agité avec un barreau aimanté puis chauffé pendant 5 minutes et filtré à l'aide d'un léger tissu en mousseline stérile. Un deuxième filtrage est effectué avec du papier filtre. Les solutions ainsi préparées sont gardées au frigo à une température de 4°C pour leur conservation.



Photo 9 : Pesage de la poudre et homogénéisation du mélange



Photo 8 : Filtrage des solutions



Photo 10 : Extraits aqueux préparés

3.6. Evaluation de l'activité antifongique des extraits de neem et henné

L'évaluation *in vitro* des extraits végétaux a été faite sur 24 isolats du champignon *Macrophomina phaseolina* suivant deux méthodes :

3.6.1. Première méthode

Des extraits aqueux de neem ont été utilisés pour cette méthode. Les isolats du champignon sont testés sur les différentes concentrations (5, 10 et 15%) préparées en raison de 3 répétitions pour chaque isolat. Deux répétitions (témoins) ont été également testées sur un milieu sans extraits. La méthodologie est la suivante :

Un milieu nutritif (PDA + glucose) est préparé et réparti dans des bouteilles en raison de 100 ml par bouteilles. Ensuite, un volume de 5 ml de solution d'extrait végétal est prélevé avec une micropipette et ajouté dans 100 ml de milieu de culture (PDA). Le mélange est bien agité à l'aide d'un barreau aimanté. Un milieu de culture sans extrait a été prévu comme témoin. Les milieux sont stérilisés à l'autoclave à une température de 121°C pendant 15 min puis refroidis au bain marie 55°C. L'antibiotique (chloramphénicol) est ajouté au milieu (5mg pour chaque 100 ml de milieu). Le milieu est réparti dans des boîtes de pétri à raison de 10 ml par boîte. Les boîtes sont laissées sous la hotte jusqu'à solidification du milieu. Pour ensemercer le champignon, un explant du mycélium est coupé avec l'emporte-pièce, saisi avec une aiguille et déposé au centre de la boîte de pétri. Les boîtes sont incubées à l'étuve à une température de 30°C pendant 6 jours.

3.6.2. Deuxième méthode

Cette méthode consiste à ajouter directement la poudre de neem ou de henné au milieu de culture. Une quantité de poudre est pesée et ajoutée sur un milieu nutritif (PDA liquide) déjà préparé. Cette quantité est fonction de la concentration que l'on veut obtenir. Ainsi, pour avoir une concentration de 5%, 50 g de poudre sont ajoutés dans 1000 ml de milieu. La concentration de 10% est préparée en ajoutant 100 g de poudre dans 1000 ml de PDA. Une quantité de 150 g de poudre végétale dans 1000 ml de milieu PDA a permis d'obtenir la concentration 15%. Un milieu témoin sans extrait a été également prévu. Le mélange est bien agité et stérilisé à 121°C pendant 15 minutes. Après stérilisation, le milieu est réparti dans des boîtes de pétri en raison de 10 ml par boîte. Un explant d'isolat du champignon est coupé avec l'emporte-pièce et déposé au centre de la boîte en contact avec le milieu déjà solidifié. Comme lors de la première méthode, trois répétitions ont été effectuées pour chaque isolat.

Des boîtes sans extraits sont prises comme témoins. Les boîtes sont incubées à l'étuve à une température de 30°C pendant 6 jours.



Photo 11 : Extraits mélangés au PDA et ensemencement du champignon

3.6.3. Détermination du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne

Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne ont été évalués au bout de 6 jours d'incubation correspondant au remplissage de la boîte témoin par le mycélium du champignon. Les mesures sont faites avec une règle graduée en traçant les deux diamètres perpendiculaires du mycélium au revers de la boîte de pétri avec 3 répétition pour chaque

traitement. Les taux d'inhibition moyens de la croissance mycélienne ont été déterminés selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(Dt-De)/Dt] * 100$$

Dt= diamètre du témoin

De= diamètre sur l'extrait

4. Analyse et traitement des données

Après les observations effectuées sur l'essai de criblage au champ, l'essai a été récolté en trois lots : un lot de plantes mortes sans gousse, un lot de plantes mortes avec gousses et un lot de gousses mûres de plantes vivantes. Les informations sur les observations, la nature des récoltes pour chaque traitement ainsi que le poids des graines ont été enregistrés sur tableaux Excel 2010. L'incidence et la sévérité de la maladie ont été déterminées pour chaque lignée aux différentes dates d'observations.

Les taux d'inhibitions obtenus sur les isolats du champignon ont été calculés sur Excel 2010. L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel GenStat 9^{ème} Edition. La comparaison des moyennes est faite avec le test de Student-Newman-Keuls au seuil de significativité $\alpha = 5\%$.