

Isolement de champignons entomopathogènes à partir de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae)

Farida Saiah*, Boubekour Seddik Bendahmane, Mokhtar Youcef Benkadda, Abdallah Berkani, Wassima Lakhdari & Naouel Kolai

Université de Mostaganem, BP 300, 27000 ALGERIE. Tél.: +213 551 306 645. *E-mail: saiahfarida@yahoo.fr.

Le présent travail n'est qu'une initiation dans la recherche de champignons capables de freiner le développement de *Phyllocnistis citrella*, mineuse des feuilles des agrumes. Il consiste à isoler des champignons à partir de nymphes de *P. citrella* de plusieurs vergers agrumicoles, présentant des symptômes d'infection fongique. Les résultats de l'isolement et de l'identification ont mis en évidence la présence des espèces fongiques suivantes: *Metarhizium sp.*, *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger sp.* et *Cladosporium sp.* avec des taux d'abondance respectifs de 5,2 %, 55,2 %, 18,75 %, 9,37 %, 9,37 % et 2,08 %. Les observations effectuées doivent être considérées comme préliminaires. Il est important de déterminer les facteurs conditionnant l'implantation de la mycose au niveau des mines, pour lutter efficacement contre *P. citrella*.

Mots-clés: *Phyllocnistis citrella*, *Metharizium sp.*, *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*, *Aspergillus niger*, entomopathogène, lutte microbiologique.

This work is an introduction in search of fungi that can hinder the development of *P. citrella*, citrus leafminer. It consists of isolating a fungus from nymphs of *P. citrella*, with symptoms of fungal infection. The results of the isolation and identification revealed the presence of fungal species following *Metarhizium sp.*, *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger sp.* and *Cladosporium sp.* with respective rates of abundance of 5.2 %, 55.2 %, 18.75 %, 9.37 %, 9.37 % and 2.08 %. The observations should be considered preliminary. It is important to determine the factors affecting the implementation of the fungus at the mines, to fight effectively against *P. citrella*.

Keywords: *Phyllocnistis citrella*, *Metharizium sp.*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Aspergillus niger*, entomopathogen, microbial control.

1. INTRODUCTION

La mineuse des agrumes (*Phyllocnistis citrella*) constitue le dernier en date des ravageurs agrumicoles introduit en Algérie. En effet, ce micro lépidoptère a été identifié pour la première fois dans les vergers agrumicoles de l'ouest algérien en 1994 (Berkani, 1995).

La lutte contre ce ravageur pose une problématique quant à la stratégie et les moyens à utiliser; il constitue de nouveaux défis à relever. Les méthodes de lutte biologique, peuvent constituer une réponse aux attaques de cet insecte.

En plus de l'utilisation des parasitoïdes, la lutte microbiologique pourrait être envisageable en particulier après les résultats fort satisfaisants qu'elle a donné contre d'autres ravageurs des cultures. Il s'agit évidemment de la lutte par l'utilisation des entomopathogènes (champignons et bactéries) inféodés à ce parasite.

C'est dans cette perspective que notre travail a été orienté, et se consacre à :

- Isoler et identifier les champignons présents sur les nymphes de *P. citrella* enroulée naturellement par des hyphes fongiques.
- Vérifier l'influence de ces souches sur la mortalité des larves de *P. citrella*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Isolement

Les nymphes enroulées de mycélium blanc (Figure 1) ayant servi à l'isolement des champignons, furent collectées durant les mois de mars, avril de l'année 2009. Les nymphes en question ont été désinfectées avec de l'alcool éthylique (70 %); puis déposées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les colonies obtenues sont purifiées puis identifiées morphologiquement.



Figure 1: Larves de *Phyllocnistis citrella* naturellement enroulées par des hyphes blancs d'un champignon entomopathogène.

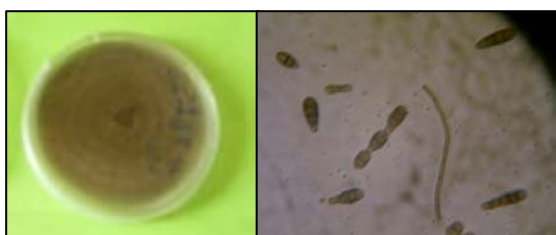


Figure 3: Aspect macroscopique (gauche) et microscopique (droite) d'*Alternaria sp.*



Figure 5: Aspect macroscopique (gauche) et microscopique (droite) de *Metarhizium sp.*

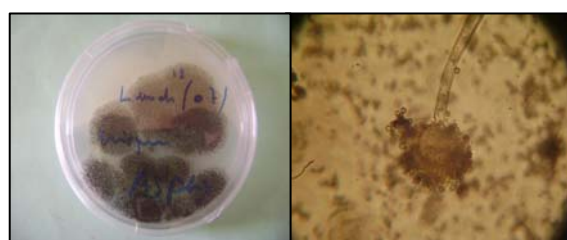


Figure 7: Aspect macroscopique (gauche) et microscopique (droite) d'*Aspergillus niger*.

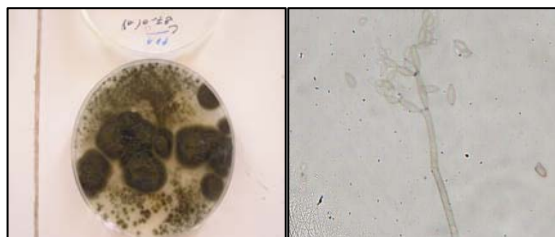


Figure 2: Aspect macroscopique (gauche) et microscopique (droite) de *Cladosporium sp.*



Figure 4: Aspect macroscopique (gauche) et microscopique (droite) de *Fusarium sp.*

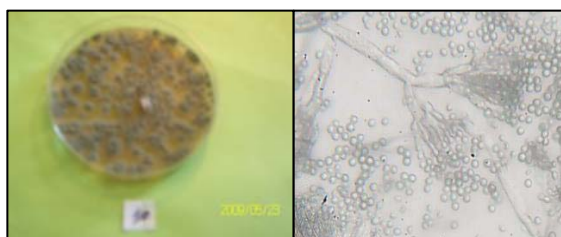


Figure 6: Aspect macroscopique (gauche) et microscopique (droite) de *Cladosporium sp.*

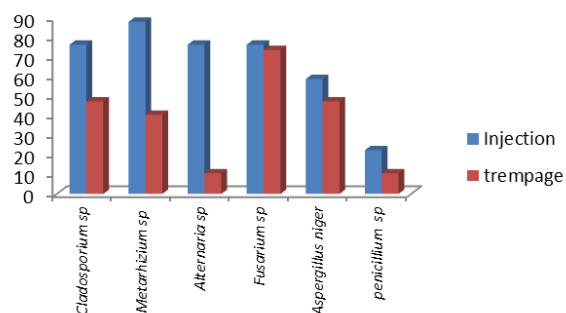


Figure 8: Effet des différents traitements sur la mortalité des larves de *Phyllocnistis citrella* par injection directe dans la mine et trempage des feuilles.

2.2. Test de pathogénicité

Une solution conidienne de 10^6 spores/ml additionné d'une goutte de Tween 80 a été inoculée par deux méthodes: injection directe des solutions de spores à l'intérieur des mines, et trempage des feuilles contaminées par les larves de *P. citrella* au stade (L3); cela afin de vérifier si les spores des champignons peuvent pénétrer à

travers les mines. Les feuilles d'agrumes contenant les insectes préalablement traitées sont mises dans des boîtes de pétri contenant du coton humidifié. 20 larves par traitement sont retenues y compris pour le témoin.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

L'isolement des champignons a mis en évidence 6 espèces fongiques: il s'agit de *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Metarhizium sp.*, *Penicillium sp.* et *Aspergillus niger* (Figures 2 à 7). Le relevé de l'abondance des espèces a démontré que l'espèce la plus abondante est *Fusarium sp.* avec 55,2 %, suivi d'*Alternaria sp.* Avec 18,75 %, puis *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* avec 9,37 % ensuite *Metarhizium sp.* avec 5,2 % et enfin *Cladosporium sp.* avec 2,06 % de présence.

3.1. Test de pathogénicité

Les résultats du test d'inoculation des larves de *Phyllocnistis citrella* par les champignons isolés sont représentés dans la Figure 8. Ces résultats montrent que l'effet du traitement par les champignons sur la mortalité des larves est significatif ($P \leq 0,05$), comparativement au témoin. Nous avons remarqué également que la mortalité évolue en fonction du temps; c'est à partir du troisième jour après inoculation que les premières mortalités ont été enregistrées pour l'ensemble des traitements réalisés.

Pour le test d'injection directe de la solution conidienne dans la mine, confectionné par la larve, c'est *Metarhizium sp.* qui a donné la

mortalité la plus importante avec: 88,23 %, suivi par *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* et *Cladosporium sp.* avec 76,47 % et *Aspergillus niger* avec 22,4 % et enfin *Penicillium sp.* La deuxième méthode a fait ressortir l'efficacité de *Fusarium sp.* à traverser la mine et à causer la mortalité de 73,68 % des larves. Cependant l'activité des autres espèces, en particulier *Metarhizium sp.* s'est vue limitée. Par ailleurs ce test a permis de mettre en exergue plusieurs modes d'action des champignons testés. Les espèces *Alternaria sp.*, ont provoqué une lyse des larves avec un enroulement mycélien de couleur grisâtre; cela dénote l'action mécanique des champignons conjuguée à leur action enzymatique. La lyse des larves se termine par un dessèchement avec craquelure de la larve (Figure 9). *Aspergillus niger* agit par pénétration des hyphes dans le corps de la larve donnant un aspect de piqures d'aiguilles; cela provoque la destruction du corps de la larve (émiettements) (Figure 10). Par contre, *Fusarium sp.* s'enroule avec son mycélium de couleur blanchâtre sur toute la surface de la larve; quelques temps après on remarque la désintégration de la larve (Figure 11). *Metarhizium sp.* et *Cladosporium sp.*, ont causé des mortalités mais sans aucun développement de hyphes ni lyse des larves, on déduit que ces deux champignons ont agi par toxicité (Figure 12).



Figure 9: Action d'*Alternaria sp.* sur les larves de *Phyllocnistis citrella*. A: injection (lyse); B: injection: enroulement mycélien sur la tête; C: lyse par trempage.

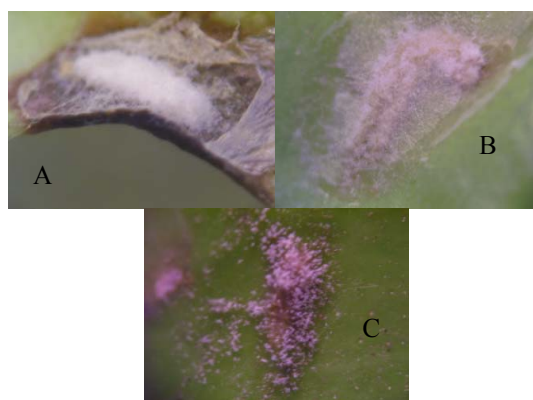


Figure 10: Action de *Fusarium sp.* sur les larves de *Phyllocnistis citrella*. A: injection; B, C: trempage.

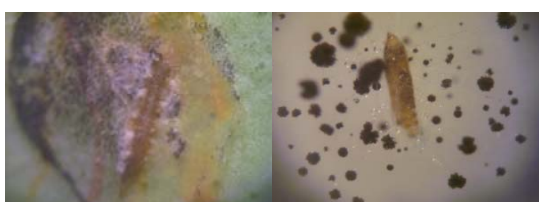


Figure 11: Action d'*Aspergillus niger* sur les larves de *Phyllocnistis citrella*. Gauche: par trempage, droite: par injection.



Figure 12: Action de *Cladosporium sp.* (gauche) et *Metarhizium sp.* sur les larves de *Phyllocnistis citrella*.

3.2 Discussion

L'espèce la plus abondante lors de l'isolement est *Fusarium* sp, ceci explique les hyphes de couleur blanche qui entouraient les nymphes collectées du verger ayant servi à l'isolement. Les résultats obtenus suite au test d'inoculation par injection à travers la mine au contact des larves de *P. citrella* par les champignons, attestent que les champignons isolés étaient capables d'infecter les larves de *P. citrella* et causer leur mort. Il en ressort que toutes les espèces testées peuvent être considérées comme entomopathogène. En effet d'après (George *et al.*, 1984; Wright & Roberts, 1987; Gottel, 1992; Vincent & Coderre, 1992), les espèces *Metarhizium* sp. sont connues pour leur grande pathogénicité envers plusieurs ordres d'insectes, des souches entomopathogènes ont été également retrouvées chez les espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp. et *Fusarium* sp. Le test du trempage des feuilles de citrus infestées par les larves de *P. citrella*, montre que c'est l'espèce *Fusarium* sp. qui a provoqué le plus grand nombre de mortalité. Par contre on remarque que l'efficacité d'*Alternaria* sp. et *Metarhizium* sp. a diminué nettement par rapport au premier test, on en déduit que ce champignon n'arrive pas à surmonter la mine creusée par la larve malgré, que ce dernier possède à l'instar de *Beauveria* sp., des capacités étonnantes à contrôler les populations d'insectes d'ordres différents. Cependant, cette particularité se trouve réduite en ce qui concerne les larves de *Phyllocnistis citrella*, qui sont protégées par leur mine. A la lumière de ces résultats, nous pouvons affirmer que seul le mode d'action de *Fusarium* sp. a été efficace pour détourner la stratégie de défense de *Phyllocnistis citrella*; il représente de ce fait un agent potentiel de lutte microbiologique contre cet insecte. La mortalité des insectes peut être causée par une ou toutes les actions suivantes: l'action des toxines libérées, l'obstruction physique de la circulation, l'invasion des organes et la destruction des tissus de l'insecte, ou une déficience nutritionnelle (Ramoska, 1984; Riba & Marcandier, 1984; Khachatourians, 1986; Poinar & thomas, 1985; Cloutier, 1992).

4. CONCLUSION

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que c'est le mode d'action de ces champignons qui influe sur l'efficacité de ces derniers. Ces résultats doivent être confirmés par des expériences in situ, afin de valider l'efficacité de ces champignons dans les conditions climatiques de la région de Mostaganem, ainsi que pour d'autres régions d'Algérie; et de mettre en place un programme de lutte microbiologique adéquat.

Bibliographie

- Berkani A. (1995). Apparition en Algérie de *Phyllocnistis citrella* Stainton, chenille mineuse nuisible aux agrumes. *Fruits* 50, p. 347-352.
- Cloutier C. (1992). Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In : C. Vincent & D. Coderre Chicoutimi, *La lutte biologique*, Québec, Canada: Gaétan MORIN, . 19-88.
- George O., Poinar J., & Gerard M.T. (1984). *Laboratory Guide to insect Pathogens and Parasites*. Plenum Presses. New York., 392 p.
- Goettel M.S. (1992). Des champignons comme agent de lutte biologique. In: Plbadam, CAB International, IITA, *La lutte biologique contre les acridiens*, Nigeria, p. 122-131.
- Khachatourians G. (1986). Production and use of biological pest control agents. *Trends Biology Technics* 4, p. 20 -124
- Poinar G.O. & Thomas G.M. (1985). *Laboratory guide to insect pathogens and parasite*, Plenum Presses, New York, 329 p.
- Ramoska W.A. (1984). The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the ching bug, *Blissus leucopterus*. *Journal Invertebral Pathology* 43, p. 89-394.
- Riba G. & Marcandier C. (1984). Influence de l'humidité relative sur l'agressivité des souches de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin et de *Metarhizium anisoplaie* (Metsh.), Sorokin Hyphomycètes pathogènes de la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* Hübn. *Agronomie* 4, p.189- 194.
- Vincent C. & Coderre D. (1992). *La lutte biologique*. Gaston Morin, Québec, 671 p.
- Wright R.J. & Roberts D. (1987). Insect control effort with fungi. *Developments in industrial microbiology* 28, p. 77-87.

(10 réf.)