

## Inhibition de *Phytophthora palmivora*, agent de pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire, par *Trichoderma* sp.

Joseph MPIKA<sup>1,3\*</sup>, Ismaël B. KEBE<sup>1</sup>, Irina S. DRUZHININA<sup>2</sup>, Monika KOMON-ZŁAZOWSKA<sup>2</sup>, Christian P. KUBICEK<sup>2</sup> & Sévérin AKÉ<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Phytopathologie, CNRA, BP 808 Divo, Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup>Institute of Chemical Engineering, Research Area Gene Technology and Applied Biochemistry, Vienna University of Technology, Getreidemarkt 9/E1665, A-1060 Vienna, Austria.

<sup>3</sup> Laboratoire de Physiologie végétale, UFR de Biosciences, Université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan- Côte d'Ivoire.

\* Auteur pour les correspondances ( Email : jmpika@yahoo.fr)

Reçu le 16-10-2008, accepté le 17-03-2009.

### Résumé

La pourriture brune des cabosses du cacaoyer causée par *Phytophthora palmivora* entraîne en Côte d'Ivoire 30 % de pertes sur les productions. Actuellement, pour combattre cette maladie, la lutte intégrée est envisagée. Elle inclut les pratiques culturales, la sélection des variétés résistantes et l'utilisation des antagonistes contre *Phytophthora* sp. notamment les espèces du genre *Trichoderma*. Cette dernière approche nécessite l'isolement, l'établissement d'une collection des *Trichoderma* issus de la cacaoyère et l'évaluation du potentiel antagoniste de celle-ci pour le choix des antagonistes efficaces à *Phytophthora palmivora*. A cet effet, des confrontations directes *in vitro* aussi bien que *in vivo* sur feuilles et sur cabosses ont été réalisées. Quarante trois isolats de *Trichoderma* montrent une activité antagoniste vis à vis de *Phytophthora palmivora* sur milieu de culture, avec des taux d'inhibition de l'ordre de 34 à 79 % mais, aussi réduisent significativement la sensibilité foliaire de 6 clones de cacaoyer et de cabosses. Ces tests *in vitro* et *in vivo* ont permis de retenir les isolats *T. spirale* T4, *T. virens* T7, *T. asperellum* T54 et *T. harzianum* T40 à forte action inhibitrice vis à vis de *Phytophthora palmivora*, offrant une forte aptitude à réduire la sensibilité et surtout à renforcer la résistance intrinsèque du clone sensible NA32 au parasite. Ces tests d'antagonistes ont permis la sélection des *Trichoderma* sp. candidats aux essais au champ. La réalisation des essais au champ évaluera l'efficacité en milieu réel des antagonistes naturels sur le développement de la maladie.

**Mots clés** : Pourriture brune, *Phytophthora palmivora*, lutte biologique, *Trichoderma* sp, cacaoyer

### Abstract

*Inhibition of Phytophthora palmivora, causative agent of cacao black pod disease in Côte d'Ivoire, by Trichoderma isolates.*

Cocoa black pod disease in Côte d'Ivoire, due to *Phytophthora palmivora*, can cause crop losses up to 30%. At present, for controlling cocoa black pod rot, an integrated pest management strategy was envisaged, and include cultural practices, selection for resistant cocoa varieties and biological control microorganisms. The latter approach need isolation, establishment of collection microorganisms found in the cocoa ecology of Côte d'Ivoire and evaluations for their ability to control *P. palmivora* for screening biocontrol candidates. *In vitro* direct confrontation also although leaf disc and the cocoa pod biocontrol screening biotest have been carried out. Forty-three of isolates *Trichoderma* expressed *in vitro* inhibition against *P. palmivora* on high-nutrient media, with in the order of 34 to 79 % of inhibition rate but, also were significantly reduced the level of susceptibility of six clones and cocoa pods to *P. Palmivora*. The isolates *T. spirale* T4, *T. virens* T7, *T. asperellum* T54 et *T. harzianum* T40 were found to be very effective against *P. palmivora* by these *in vitro* and *in vivo* tests, exhibiting high potential to reduce the susceptibility and especially to reinforce intrinsic resistant susceptible clone (NA32) towards *P. palmivora*. These screening tests permitted the selection of *Trichoderma* isolates candidates for field trials. This field trials will assess for efficacy biocontrol candidates from cacao agrosystems on the evolution of disease.

**Keywords** : black pod disease, *Phytophthora palmivora*, biocontrol, *Trichoderma* sp, Cocoa tree

## 1. Introduction

En Côte d'Ivoire, le cacao représente la principale culture d'exportation (ICCO, 2000). Actuellement, la Côte d'Ivoire est le premier producteur mondial avec de plus de 43 % de la production mondiale (ICCO, 2003). La cacaoculture ivoirienne est soumise à de nombreuses contraintes au sein desquelles le fléau des mirides et la pourriture brune de cabosses causée par *Phytophthora palmivora* occupent une place importante. La pourriture brune des cabosses est une affection qui prend de plus en plus d'ampleur depuis la découverte de *Phytophthora megakarya* dans la zone Est du verger ivoirien. Dans cette zone, les pertes de production sont passées en moyenne de 20 à 30-45 % où aucune autre raison, autre que la pourriture brune ne pourrait justifier cette recrudescence des pertes observées (Kébé, 1999).

Pour combattre cette maladie, la lutte chimique était envisagée suite aux résultats concluants de la recherche, mais cette lutte reste toutefois difficile à vulgariser à cause des coûts onéreux des fongicides et la pénibilité du travail pour le paysan (Pereira, 1985 ; Fulton, 1989 ; Kébé, 1994). A cela, il faut ajouter les exigences de la qualité du cacao (présence de résidus) et de la protection de l'environnement qui n'encourageraient pas les applications effrénées des fongicides (Bowers *et al.*, 2001a). L'évaluation de la résistance du cacaoyer aux *Phytophthora* sp à partir d'organes autres que les cabosses a réduit considérablement le temps de sélection et a accru l'amélioration génétique du cacaoyer, mais il faut reconnaître que les clones ou les hybrides sélectionnés ne présentent qu'une tolérance vis à vis du parasite plutôt qu'une résistance totale.

Actuellement, la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacao est devenue une nécessité et une priorité nationale. La stratégie élaborée est de développer une méthode de lutte intégrée moins contraignante, moins coûteuse pour les paysans et respectueuse de l'environnement. Cette stratégie inclue l'amélioration des pratiques culturales, la sélection des variétés résistantes ou tolérantes à *Phytophthora palmivora*, et l'utilisation des microbes antagonistes naturels de *Phytophthora* sp (Bowers *et al.*, 2001a). Dans la plantation de cacaoyers, il est indiqué l'existence de certains

microbes bénéfiques qui évoluent naturellement, et qui sont des antagonistes effectifs de la majorité des pathogènes des plantes. Les espèces du genre *Trichoderma* ont été décrites comme potentiels agents bénéfiques pour contrôler *Phytophthora palmivora* (Bong *et al.*, 1996 ; Krauss *et al.*, 2003 ; Mpika, 2002). L'utilisation de *Trichoderma* sp pour abaisser la pression d'inoculum de *Phytophthora* sp en réduisant ainsi l'incidence de la pourriture brune a été entreprise depuis quelques années en particulier en Amérique latine (Hebbar *et al.*, 1999; Bong *et al.*, 2000; Krauss et Soberanis, 2002 ; Krauss *et al.* 2003). Mais la spécificité du pouvoir antagoniste chez les *Trichoderma*, et la particularité de la cible à atteindre et de son environnement exigeraient le choix des *Trichoderma* sp adaptés aux conditions agroclimatiques du pays.

Dans la présente étude, nous avons recherché à isoler les *Trichoderma* sp dans l'écosystème de la cacaoyère d'une part et d'autre part, nous avons caractérisé leur pouvoir antagoniste aussi bien *in vitro* que *in vivo* sur feuilles et sur cabosses pour permettre la sélection des *Trichoderma* sp pour les essais de lutte contre *P. palmivora* en plantation.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Matériel végétal

Six clones de cacaoyer de sensibilité variable vis à vis de la pourriture brune des cabosses ont été utilisés. Il s'agit des clones sensibles (NA32 et IFC5), des clones moyennement résistants (IMC67 et T85/799) et des clones résistants (SCA6 et PA150). Ces clones sont issus de deux parcelles expérimentales B10 et C2/2, plantées en 1979 et 1986 à la station de Bingerville. Chaque clone est représenté par 4 arbres. Huit feuilles saines sont prélevées sur les rameaux semi aoûtés de chaque arbre. Des disques foliaires de 15 mm de diamètre ont servi à tester l'effet antagoniste de *Trichoderma* sp à *P. palmivora* sur feuilles *in vivo*.

L'évaluation de l'action des isolats de *Trichoderma* sp contre *P. palmivora* a été

effectuée sur des cabosses du clone NA32 (sensibles). Sur ce clone, quatre arbres ont été retenus et une cabosse récoltée par arbre soit quatre cabosses par isolat de *Trichoderma* testé. Les cabosses saines récoltées sont issues du croisement NA32 x IFC5 après des pollinisations manuelles de fleurs.

### 2.1.2. Matériel fongique

L'isolat de l'espèce *Phytophthora palmivora* est appelé BL7/11-2. Il a été isolé sur une cabosse naturellement atteinte de pourriture brune, prélevé sur l'arbre 2 de la ligne 11 de la parcelle expérimentale BL7 plantée en 1986 à la station de Bingerville.

Les isolats de *Trichoderma* utilisés dans cette étude ont été obtenus par piégeage à partir des fragments de cortex de cabosses infectés par *P. palmivora* introduits dans les échantillons de sol. Ces échantillons sont prélevés dans les parcelles cacaoyères des stations de recherche de Divo et Bingerville. Les isolats sont repiqués, entretenus sur milieu petit pois gélosé et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans du glycérol 50%. La caractérisation moléculaire des différents isolats de *Trichoderma* obtenus a été effectuée par la méthode développée par Druzhinina *et al.* (2005). L'origine et la localité géographique des isolats sont résumées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Origine et localité géographique des isolats de *Trichoderma sp* utilisés.

Code isolat	Isolat	Numero Genbank* IST1 -2 et <i>tef1</i>	Localité géographique
<i>Trichoderma virens</i>			
146	T27	CPK 2141	Divo
162	T41	CPK 2142	"
315	T16	CPK 2148	"
318	T19	CPK 2150	"
319	T2	CPK 2151	"
317	T3		"
320	T8	CPK 2152	"
317*	T13		"
379	T9		Bingerville
321	T6	CPK 2153	Bingerville
322	T20	CPK 2154	Divo
324	T18	CPK 2156	"
336	T17	CPK 2157	"
337	T45	CPK 2158	"
343	T21	CPK 2162	Bingerville
359	T7	CPK 2168	"
360	T15	CPK 2169	"
363	T56	CPK 2171	"
365	T33	CPK 2172	"
367	T25	CPK 2173	"
372	T28	CPK 2174	"
373	T10	CPK 2175	"
374	T31	CPK 2176	"
375	T51	CPK 2177	"
376	T55	CPK 2178	"
378	T24	CPK 2179	"
380	T32	CPK 2181	"
381	T30	CPK 2182	"
383	T58	CPK 2183	"
384	T12	CPK 2184	"
385	T64	CPK 2185	"
388	T29	CPK 2186	"
340	T26		"
<i>Trichoderma spirale</i>			
304	T34	CPK 2143	Divo
308	T38	CPK 2144	"
342	T39	CPK 2161	Bingerville
349	T4	CPK 2164	"
313	T46		Divo
<i>Trichoderma harzianum</i>			
323	T42	CPK 2155	Divo
347	T44	CPK 2163	Bingerville
350	T40	CPK 2165	"
353	T36	CPK 2166	"
356	T35		"
<i>Trichoderma asperellum</i>			
338	T5	CPK 2159	Bingerville
361	T54	CPK 2170	"

**Légende:** Numero Genbank\*-Institute of Chemical Engineering, Research Are Gene Technology and Applied Biochemistry, Vienna University of Technology, Vienna,Austria.

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1. Isolement de *Phytophthora palmivora*

L'isolement est réalisé en prélevant un morceau de cabosse pourrie et en le déposant sur un milieu eau gélosée à 1,5 %. Sur ce milieu, le thalle se développe en absence de bactéries. Après que le thalle se soit formé, un fragment mycélien est prélevé sur le front de croissance de la culture et transféré dans des boîtes de Pétri sur milieu gélosé à base de petit pois (Huguenin & Boccas, 1971). L'incubation est réalisée à 26 °C pendant 4 à 5 jours. Pour éviter l'hétérogénéité évidente de zoospores, le clonage de la souche par isolement mono zoospores a été effectué selon la technique décrite par Babacauh (1980).

### 2.2.2. Préparation d'inoculum de *P. palmivora* et *Trichoderma* sp

L'inoculum de *P. palmivora* est constitué d'une suspension de zoospores. Elle est obtenue à partir d'une culture âgée de 5 à 6 jours dans des fioles de Roux. L'incubation est faite sous une photopériode de 12 heures pendant trois jours, la culture est inoculée avec 40 ml d'eau distillée puis placée pendant 15 minutes à une température de 4 °C. La culture est enfin exposée à la lumière d'une lampe à incandescence pendant 45 minutes. La suspension de zoospores obtenue dans la fiole de Roux est dénombrée à l'aide d'une cellule de Malassez et ajustée à la concentration de  $3.10^5$  zoospores/ml en vue d'effectuer des inoculations sur feuilles et sur cabosses.

Pour l'évaluation de l'activité antagoniste *in vivo* sur disques foliaires et cabosses détachées, le mycélium d'une colonie de *Trichoderma* âgée de 10 jours sur milieu petit pois a été gratté superficiellement à l'aide d'une spatule stérile. L'amas mycélien obtenu est mis dans un tube contenant 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension est homogénéisée par agitation sur l'agitateur mécanique pendant 1 min, filtrée sous tissu percale stérile avant de dénombrer les spores sur cellule de Malassez. La quantité de spores obtenues est calibrée à  $10^8$  spores/ml. Cette concentration optimale est retenue pour obtenir une germination rapide et des tubes germinatifs plus rigoureux (Dubos, 1986).

### 2.2.3. Activité antagoniste *in vitro* des *Trichoderma* sp vis à vis de *Phytophthora palmivora*.

#### 2.2.3.1. Confrontation directe sur milieu de culture.

Les séries d'expérience de confrontation directe, sur milieu de culture, ont été réalisées entre *Phytophthora palmivora* et les isolats de *Trichoderma*. La technique utilisée consiste à mettre en culture, dans une même boîte de Pétri contenant le milieu petit pois, des explants mycéliens appartenant à un isolat de *Trichoderma* et de *P. palmivora*. Ces explants calibrés de 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'emporte-pièce sur le pourtour de culture non sporulant âgée de 4 jours et placés à 3 cm à l'équidistance du centre de la boîte. Six boîtes de Pétri ont été ensemencées constituant chacune une répétition. L'incubation est réalisée à 26 °C pendant une semaine. Une mensuration journalière du diamètre de croissance de chaque explant mis en culture a été réalisée et s'est poursuivie jusqu'à ce que les cultures remplissent les boîtes. Les témoins sont constitués de culture de *Trichoderma* et de *Phytophthora* mis en culture séparément dans des boîtes de Pétri. Comparées aux témoins, ces mensurations journalières ont permis d'évaluer l'action antagoniste de *Trichoderma* vis à vis de la croissance mycélienne de *P. palmivora*. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne exercés par *Trichoderma* ont été calculés selon la formule décrite par Whipps (1997) :  $I (\%) = (1 - D_n/D_o) \times 100$ , où  $I (\%)$  représente inhibition moyenne de la croissance mycélienne,  $D_n$  est le diamètre moyen de *P. palmivora* en présence de *Trichoderma* et  $D_o$  est le diamètre moyen de *P. palmivora* en absence de *Trichoderma* (témoin).

#### 2.2.3.2. Survie de *P. palmivora* après la confrontation directe.

La survie de *P. palmivora* a été déterminée après une confrontation directe avec un isolat de *Trichoderma* sur milieu petit pois gélosé en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. L'explant calibré de 6 mm de diamètre d'un isolat de *Trichoderma* étant ensemencé à 5 cm de l'isolat de *P. palmivora*. Les cultures mises à incuber à l'obscurité et à 26 °C sont examinées une semaine après le contact de deux fronts de croissance des thalles de *Trichoderma* et

*P. palmivora*. Après le contact des hyphes, quatre explants sont prélevés à l'emporte-pièce sur une génératrice axiale du côté de l'explant de *P. palmivora*. Les explants prélevés sont introduits dans une cabosse verte au niveau d'une ouverture profonde de 2 cm au moins obtenue au moyen d'un emporte-pièce. Les cabosses ainsi ensemencées sont placées dans les cristallisoirs, sous une mousse imbibée d'eau distillée. Deux répétitions constituées chacune de 4 cabosses ont été réalisées. L'incubation a été réalisée à 26 °C en condition d'humidité saturante (80 %) pendant 6 jours.

A la présence des symptômes de pourriture brune sur cabosses ensemencées, les prélèvements d'explants se sont poursuivis jusqu'à sept semaines après la rencontre des hyphes. Le taux de survie *P. palmivora* a été estimé en fonction du temps par le nombre de cabosses présentant les symptômes de pourriture brune sur l'ensemble des cabosses ensemencées.

#### 2.2.3.3. Activité antagoniste *in vivo* des *Trichoderma* sp vis à vis de *Phytophthora palmivora*

L'activité antagoniste *in vivo* de *Trichoderma* sp a été évaluée sur feuilles et sur cabosses détachées au laboratoire.

##### **Test sur disques de feuilles**

La méthode d'évaluation de la résistance à *Phytophthora* sp sur feuille développée par Nyassé *et al.* (1995) a été utilisée comme base de la mensuration de l'effet des espèces de *Trichoderma* sur *Phytophthora palmivora*. Cette méthode consiste à prélever les feuilles saines sur des rameaux semi aoûtés situés dans la canopée de l'arbre à mi-ombre. Ces feuilles sont pré conditionnées afin de rendre le limbe plus réceptif, en les plaçant pendant une nuit, la face inférieure contre une mousse imbibée d'eau distillée, dans un bac hermétiquement fermé. Après le pré conditionnement, les disques de feuilles de 15 mm de diamètre sont préparés et disposés en randomisation totale dans 4 bacs (répétitions). Ainsi, 8 disques par clone et par bac ont été inoculés par isolat de *Trichoderma* soit 48 rondelles pour 6 clones de cacaoyers. Les inoculations ont été réalisées à l'aide d'une micro pipette (pipetman), par dépôt préalable de 10 µl

d'une suspension de spores de *Trichoderma* calibrée à 10<sup>8</sup> spores par ml suivie d'une inoculation d'une suspension de zoospores de *P. palmivora* calibrée à 3.10<sup>5</sup> zoospores /ml, à la face inférieure de chaque disque foliaire.

L'incubation est réalisée à l'obscurité et à 26 °C. Après 7 jours d'incubation, la lecture des symptômes a été faite selon une échelle de sensibilité foliaire qui varie de 0 (absence de symptômes) à 5 (tache vraie) (Nyassé *et al.*, 1995, Blaha *et al.*, 2000).

L'action antagoniste des isolats de *Trichoderma* vis-à-vis de *P. palmivora* a été évaluée en comparant les valeurs moyennes de notes de sensibilité foliaire en présence de *Trichoderma* par rapport au témoin inoculé uniquement du pathogène.

##### **Test sur cabosses détachées**

L'aptitude des isolats de *Trichoderma* sp à réduire la fréquence et la taille de lésions due par *Phytophthora palmivora* sur cabosses a été évaluée en suivant une modification de la méthode d'évaluation de la résistance à *P. palmivora* des cabosses détachées en laboratoire développée par Iwaro *et al.* (1997b, 2000). La modification implique l'introduction de deux étapes d'inoculation de cabosses. Dans la première étape, après un séjour de 24 heures sur une mousse imbibée d'eau distillée afin de rendre le cortex plus réceptif, les cabosses sont pulvérisées sur la face latérale par une suspension de spores de *Trichoderma* à 10<sup>8</sup> spores /ml. Ensuite dans la deuxième étape, une seconde inoculation a été faite, à l'intervalle de 4 heures, en les aspergeant d'une suspension de zoospores de *Phytophthora palmivora* à 3.10<sup>5</sup> zoospores/ ml. La cabosse aspergée est située à près de 30 cm de l'asperseur. Une moyenne de 1ml d'inoculum est déposée par cabosse. Les cabosses ainsi inoculées sont placées dans les bacs sur la mousse gorgée d'eau distillée. Dans un bac, 43 cabosses sont disposées en ligne à raison d'une cabosse par isolat de *Trichoderma* testé. Une randomisation totale est effectuée entre lignes et les cabosses d'une même ligne.

L'incubation des cabosses inoculées est réalisée à la température ambiante (28-30 °C) pendant 6 jours. Après quatre jours d'incubation, la sévérité de l'infection est évaluée sur une échelle de

notation d'Iwano *et al.* (1997b, 2000) qui varie de 1 (lésion non visible) à 8 (lésions fusionnées). La réaction à l'inoculation simultanée de *Trichoderma* et *P. palmivora* est estimée sur la fréquence et la taille des lésions formées sur la face latérale de la cabosse. L'évaluation d'inhibition de lésions sur cabosses exercée par un isolat de *Trichoderma* est estimée par le calcul du taux d'inhibition selon la formule décrite par Whipps (1997) :  $I(\%) = (1 - Cn/Co) \times 100$ . Où  $I(\%)$  représente inhibition moyenne en pourcentage,  $Cn$  est la note moyenne sensibilité à *P. palmivora* des cabosses en présence de *Trichoderma* et  $Co$  est la note moyenne sensibilité à *P. palmivora* des cabosses en absence de *Trichoderma* (témoin).

Les témoins sont constitués des cabosses inoculées uniquement par la suspension de zoospores de *P. palmivora*.

#### **Analyses statistiques.**

Toutes les données ont été analysées en utilisant un logiciel Xlstat version 7.5.3. L'évaluation de l'effet de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne de *P. palmivora* a été effectuée par comparaison des taux moyens d'inhibition de la croissance de *P. palmivora*. Sur les disques de feuille de 6 clones, l'effet des isolats de *Trichoderma* sur la nécrose foliaire causée par *P. palmivora* a été classifié par l'analyse ascendante (cluster analyse, Everitt, 1980). Cette analyse a été appliquée aux données du test sur disque de feuille dans le but de regrouper les isolats de *Trichoderma* ayant les mêmes valeurs moyennes de sensibilité à *P. palmivora*, en utilisant la méthode « Ward's methods » avec distance de mesure, la distance Euclidienne. Sur les cabosses, ces notes ont permis de calculer le taux d'inhibition pour lesquels les isolats de *Trichoderma* ont été comparés. La comparaison entre les moyennes a été faite par le test de Newman Keuls Student avec une probabilité de 5 %.

### **3. Résultats**

#### **3.1. Effet *in vitro* des *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora***

Généralement, le diamètre moyen des colonies de *P. palmivora* a été réduit en présence des

isolats de *Trichoderma* (Tableau 2). Au bout de quatre jours d'incubation, ces réductions atteignent 51 mm et 15,92 mm pour les isolats *T. harzianum* T35 et *T. virens* T7, traduisant une inhibition respectivement de l'ordre de 33,91 % et 79,37 %. Cette action inhibitrice de la croissance mycélienne de *P. palmivora* a été variable et dépend de l'isolat de *Trichoderma*. Une analyse de variance portant sur les taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *P. palmivora* révèle une différence hautement significative ( $P < 0,0001$ ). Cependant, il a été identifié plusieurs groupes de signification relativement chevauchants. Les isolats *T. virens* (T9, T51, T8, T32, T27, T7), *T. spirale* (T34, T4), *T. asperellum* T54 et *T. harzianum* T44 ont une forte action antagoniste vis-à-vis de *P. palmivora*. Ces isolats ont inhibé significativement la croissance mycélienne de *P. palmivora* de plus de 64 % par rapport au témoin.

#### **3.2. Effet de *Trichoderma* sur la pathogénie de *Phytophthora palmivora* après la confrontation directe.**

Les cabosses inoculées avec les fragments mycéliens de *P. palmivora* issus de la confrontation directe avec les isolats de *Trichoderma* ont produit des taux des cabosses pourries relativement différents d'une espèce à l'autre (Tableau 3). Ainsi, pour *P. palmivora* en culture mixte avec *T. virens*, trois groupes des isolats ont été relativement identifiés par les taux des cabosses atteintes de pourriture brune. Premier groupe a été composé des isolats *T. virens* T2, *T. virens* T6, *T. virens* T7, *T. virens* T9, *T. virens* T10, *T. virens* T15, *T. virens* T17 et *T. virens* T20, caractérisé par une destruction de *P. palmivora*, dès la première semaine. Avec ces isolats, les cabosses inoculées avec des fragments mycéliens *P. palmivora* n'ont présenté aucun symptôme de la pourriture brune. Le second groupe est constitué des isolats T12, T19, T24, T16, T18 et T8 marqués par une élimination du mycélium de *P. palmivora* entre la deuxième et la septième semaine. Le troisième a été représenté par les restes des isolats de *T. virens* qui n'ont pas révélé un effet sur le pouvoir pathogène de *P. palmivora*. Cependant, *Phytophthora palmivora* en présence des isolats des autres espèces de *Trichoderma* a provoqué des symptômes de la pourriture brune sur toutes les cabosses inoculées soit un taux de 100 %. A l'exception des isolats T4 de *T. spirale* et T5 de *T. asperellum* qui ont respectivement détruit le

mycélium de *P. palmivora* après une semaine et deux semaines de confrontation directe. Le mycoparasitisme nécrotrophique des isolats T4

et T5 est confirmé par l'absence de la pourriture brune sur les cabosses inoculées exprimant ainsi un taux de 0 %.

**Tableau 2** : Classification de l'effet inhibiteur des isolats de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne de *Phytophthora palmivora* après 4 jours de confrontation.

Isolats	Diamètre de croissance (mm)	Taux d'inhibition (%)
<i>Phytophthora palmivora</i> (Témoin)	77,17	0
<i>Trichoderma harzianum</i> (T35)	51,00	33,91 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T45)	49,75	35,53 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T12)	46,92	39,20 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T28)	44,17	42,77 <sup>ab</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T42)	43,42	43,74 <sup>bc</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T26)	43,17	44,06 <sup>bc</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T20)	42,58	44,82 <sup>bcd</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T21)	41,92	45,68 <sup>bcd</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T33)	40,75	47,19 <sup>ode</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T3)	40,33	47,73 <sup>ode</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T16)	39,17	49,25 <sup>odef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T30)	39,00	49,25 <sup>odef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T2)	38,83	49,68 <sup>odef</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T40)	36,50	52,70 <sup>defh</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T6)	36,42	52,81 <sup>defh</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T18)	35,33	54,21 <sup>efgh</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T46)	34,42	55,40 <sup>efgh</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T29)	33,92	56,05 <sup>fghij</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T13)	32,92	57,35 <sup>fghij</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T58)	32,67	57,67 <sup>fghij</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T56)	32,42	57,99 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T25)	31,92	58,64 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T39)	31,33	59,40 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T15)	30,58	60,37 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T19)	30,50	60,48 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T31)	30,17	60,91 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T55)	30,17	60,91 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T10)	29,67	61,56 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T24)	29,67	61,56 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T36)	29,67	61,56 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T17)	29,58	61,66 <sup>ghijk</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T38)	28,75	62,74 <sup>hijklm</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T44)	27,83	63,93 <sup>hijklm</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i> (T54)	27,83	63,93 <sup>hijklm</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i> (T5)	27,33	64,58 <sup>hijklm</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T4)	27,08	64,90 <sup>hijklm</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T9)	26,00	66,31 <sup>ijklm</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T51)	25,67	66,74 <sup>ijklm</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T8)	24,83	67,82 <sup>ijklm</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T32)	22,50	70,84 <sup>ikm</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T34)	22,25	71,17 <sup>ikm</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T27)	20,25	73,76 <sup>k</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T7)	15,92	79,37 <sup>m</sup>
Anova	F= 40,80	P < 0,0001

\* les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon test de Newman & Keuls.

**Tableau 3** : Effet de *Trichoderma* sur la pathogénie de *Phytophthora palmivora* sur cabosses détachées.

Isolats de <i>Trichoderma</i>	Taux (%) des cabosses atteintes de pourriture brune en fonction du temps de confrontation (semaines)						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Trichoderma virens</i>							
T2	0						
T6	0						
T20	0						
T17	0						
T7	0						
T15	0						
T10	0						
T12	50	0					
T19	25	25	25	0			
T24	100	50	25	0			
T16	25	25	25	25	0		
T18	25	25	25	25	0		
T8	50	50	50	50	50	0	
T55	25	25	25	25	25	25	
T51	50	25	25	25	25	25	
T58	50	50	25	25	25	25	25
T30	50	50	50	50	50	50	50
T25	100	50	50	50	50	25	25
T56	100	100	50	50	25	25	25
T32	100	50	50	50	25	25	25
T29	100	50	50	50	50	50	25
T33	100	50	50	50	50	50	50
T31	100	100	100	100	50	50	25
T27	100	100	100	100	100	100	100
T45	100	100	100	100	100	100	100
T28	100	100	100	100	100	100	100
<i>Trichoderma spirale</i>							
T4	0						
T34	100	100	100	100	100	100	100
T38	100	100	100	100	100	100	100
T39	100	100	100	100	100	100	100
<i>Trichoderma harzianum</i>							
T42	100	100	100	100	100	100	100
T44	100	100	100	100	100	100	100
T40	100	100	100	100	100	100	100
T36	100	100	100	100	100	100	100
<i>Trichoderma asperellum</i>							
T5	100	0					
T54	100	100	100	100	100	100	100

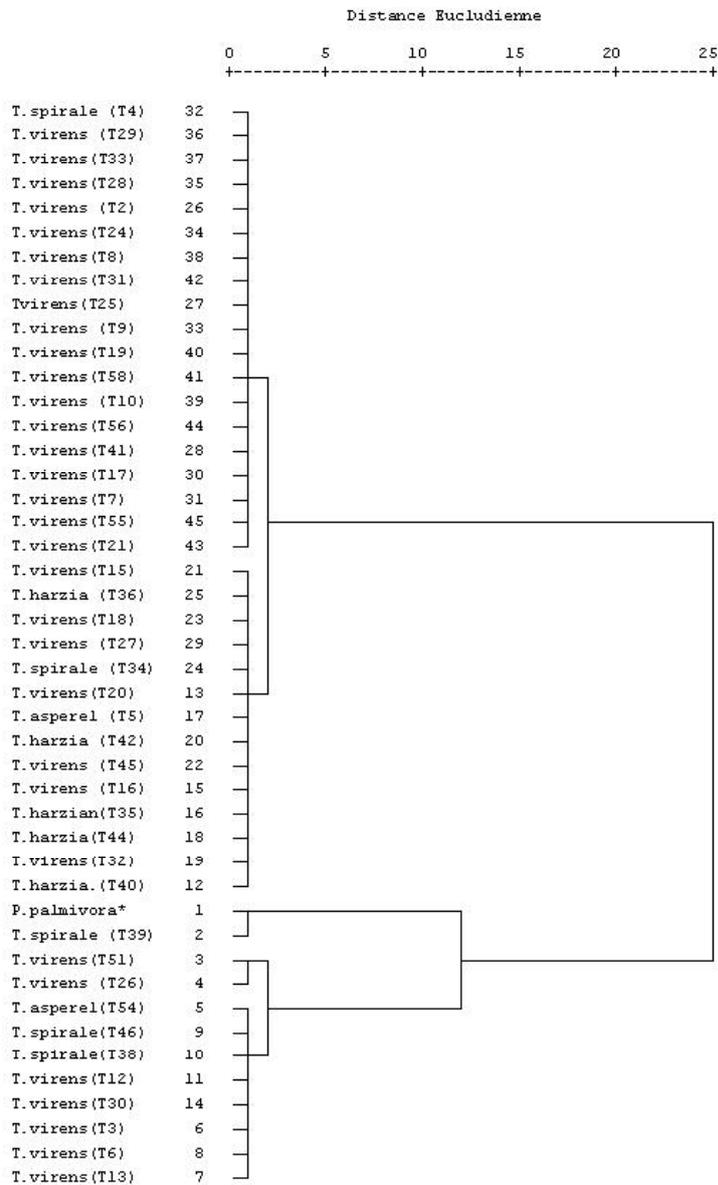
### 3.3. Effet de l'application de *Trichoderma* sur la nécrose des disques de feuille et cabosses causée par *Phytophthora palmivora*

Une large proportion des isolats de *Trichoderma* testés a réduit sur les disques foliaires de six clones de cacaoyer les attaques de *Phytophthora palmivora* utilisé dans cette expérience (Tableau 4). Trente-deux isolats de *Trichoderma* ont montré une forte action réductrice de la sensibilité à *P. palmivora* des disques de feuilles traitées par rapport aux témoins non traités. L'application des conidies de *Trichoderma* sur les disques foliaires n'ont engendré aucun symptôme visible de *P. palmivora* (notation de symptôme : 0). Un petit point de pénétration de *P. palmivora* (notation symptôme : 1) a été observé sur les disques de feuilles pré inoculées avec dix autres isolats de *Trichoderma*, tandis que avec l'isolat de *T. spirale*, les points en réseau (notation symptôme : 2) causé par *P. palmivora* ont été observés sur les disques

de feuilles de six clones de cacaoyer. L'analyse du dendrogramme (Fig.1) fait ressortir trois groupes des isolats de *Trichoderma* ayant plus ou moins les mêmes valeurs moyennes de sensibilité à *P. palmivora* de 6 clones de cacaoyer utilisés. Le groupe 1 comprend les isolats de *Trichoderma* ayant réduit significativement l'attaque de la nécrose des feuilles due par *P. palmivora*. Il est constitué de 32 isolats de *Trichoderma*. Les isolats *T. virens* T51, *T. virens* T26, *T. asperellum* T54, *T. spirale* T46, *T. spirale* T38, *T. virens* T12, *T. virens* T30, *T. virens* T3, *T. virens* T6 et *T. virens* T13 pourraient composer le groupe 2. Ces isolats réunis dans ce groupe ont réduit aussi l'incidence des symptômes de la maladie causée *P. palmivora* sur disques de feuilles traitées. Le groupe 3 est constitué d'un seul isolat n'ayant aucun effet réducteur de la sensibilité foliaire à *P. palmivora*. Il s'agit de l'isolat *T. spirale* T39.

**Tableau 4 :** Distribution des notes de sensibilité à *Phytophthora palmivora* après l'application de spores des isolats de *T. harzianum* sur disques de feuilles de six clones de cacaoyer.

	Notation des symptômes		
	0	1	2
Nombre des isolats de <i>Trichoderma</i>	34	9	2



**Figure 1.** Dendrogramme des isolats de *Trichoderma* obtenu à partir des valeurs moyennes de sensibilité à *P. palmivora* de 6 clones de cacaoyer.

La pulvérisation des cabosses avec une suspension des spores de *Trichoderma* sp a eu un effet protecteur variable vis-à-vis de *P. palmivora*, lequel dépendait pour l'isolat de *Trichoderma* éprouvé. Une analyse de variance a confirmé qu'il existe une différence significative en relation entre les isolats de *Trichoderma* pulvérisés et la réduction de symptômes de la pourriture brune des cabosses enregistrée. Les cabosses traitées avec les isolats *T. virens* T7, *T. virens* T19, *T. virens* T8, *T. virens* T13 et *T. virens* T20 ont réduit significativement l'extension des nécroses causée

par *P. palmivora*. Ces isolats ont montré les notes de sensibilité entre 1 et 1,75 comparées à la note 6,34 enregistrée avec le témoin, ce qui correspond à une inhibition de la lésion variant entre 72,44 et 84,25 % (Tableau 5). Par ailleurs, les isolats *T. harzianum* T40, *T. asperellum* T54 et *T. spirale* T4 ont aussi exprimé une forte action inhibitrice. En revanche, l'application de la suspension des spores de *T. virens* T26, *T. spirale* T39 et *T. asperellum* T5 sur les cabosses n'a pas permis la réduction des attaques de *P. palmivora*, traduisant une inhibition inférieure à 20 %.

**Tableau 5** : Classification de l'effet des isolats de *Trichoderma* sur la nécrose des cabosses causée par *Phytophthora palmivora* chez le clone NA32.

Isolats	Notes de sensibilité des cabosses	Taux d'inhibition (%)*
<i>Phytophthora palmivora</i> (Témoin)	6,34	0
<i>Trichoderma virens</i> (T26)	6	5,51 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T39)	5,62	11,42 <sup>ab</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i> (T5)	5,62	11,42 <sup>ab</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T34)	5	21,26 <sup>abc</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T51)	4,87	23,23 <sup>abcd</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T35)	4,75	25,20 <sup>abcd</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T12)	4,37	31,10 <sup>abcde</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T44)	4,25	33,07 <sup>abcde</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T56)	4,25	33,07 <sup>abcde</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T33)	4,25	33,07 <sup>abcde</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T18)	4	37,01 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T42)	4	37,01 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T38)	3,75	40,94 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T36)	3,62	42,91 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T28)	3,5	44,88 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T6)	3,5	44,88 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T2)	3,5	44,88 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T21)	3,37	46,85 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T10)	3,37	46,85 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T46)	3,37	46,85 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T 3)	3,25	48,82 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T24)	3,12	50,79 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T16)	3,12	50,79 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T17)	3	52,76 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T9)	3	52,76 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T31)	3	52,76 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T55)	2,87	54,72 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T27)	2,87	54,72 <sup>abcdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T45)	2,75	56,69 <sup>bdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T15)	2,5	60,63 <sup>bdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T30)	2,37	62,60 <sup>cdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T32)	2,25	64,57 <sup>cdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T29)	2,25	64,57 <sup>cdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T25)	2,12	66,54 <sup>cdef</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i> (T40)	1,87	70,47 <sup>cdef</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i> (T54)	1,87	70,47 <sup>cdef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T20)	1,75	72,44 <sup>def</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T13)	1,75	72,44 <sup>def</sup>
<i>Trichoderma spirale</i> (T4)	1,75	72,44 <sup>def</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T8)	1,5	76,38 <sup>ef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T19)	1,5	76,38 <sup>ef</sup>
<i>Trichoderma virens</i> (T7)	1	84,25 <sup>f</sup>
Anova	F= 1,67	P < 0,012

\* les moyennes suivies des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon test de Newman & Keuls.

#### 4. Discussion

Dans cette étude, la sélection des isolats de *Trichoderma* en fonction de leur potentiel antagoniste à *P. Palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses de cacao a été effectuée en laboratoire.

Pour sélectionner les 43 isolats de *Trichoderma* isolés en laboratoire, les activités antagonistes vis à vis de *Phytophthora palmivora* sont mesurées *in vitro* sur la croissance mycélienne et la survie après confrontations directes. Sur la croissance mycélienne, les résultats montrent une nette réduction du diamètre des colonies de *P. palmivora* en présence de tous les isolats de *Trichoderma*. Les actions inhibitrices les plus fortes ont été observées avec les isolats de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma spirale*, et en particulier de *Trichoderma virens*. Cette activité antagoniste des isolats de *T. asperellum* rejoint celle obtenue par Tondje *et al* (2007) qui ont signalé une forte action inhibitrice sur *Phytophthora megakarya*, agent plus agressif de la pourriture brune des cabosses. Cette action de *T. asperellum* serait due à la pénétration directe dans les sporocystes, à l'enroulement sur l'hyphes de *P. megakarya* entraînant leur destruction, et une activité substantielle de laminarinase. La très forte sensibilité de *P. palmivora* à *Trichoderma virens* observée a été déjà démontrée par Krauss and Soberanis (2001a). Ces résultats montrent aussi un intérêt des isolats *T. spirale* dans la sélection des candidats antagonistes vis à vis de *Phytophthora* sp. Cependant, les isolats de *Trichoderma harzianum* T35, T42 et T40 ont révélé une activité inhibitrice moindre sur la croissance mycélienne de *P. palmivora*. Cet effet observé est confirmé par le taux de survie de *P. palmivora* à 100 % bien que les isolats de *Trichoderma harzianum* envahissent les colonies de *P. palmivora* dans les boîtes de Pétri. Cette action fongistatique des isolats de *T. harzianum* contraste avec l'activité mycoparasitaire nécrotrophique reconnue vis à vis d'autres champignons telluriques pathogènes (Deacon & Berry, 1992 ; Chet *et al.* 1997 ; Harman, 2000 ; Kulling *et al.* 2000). Cette activité fongistatique observée au cours de cette étude est probablement due à leur aptitude à coloniser et à leur forte compétition des éléments nutritifs sur milieu de culture. De même, la sécrétion des enzymes, des antibiotiques et des

protéines reconnues par *T. harzianum* sur milieu de culture inhibent mais ne détruisent pas la paroi de *Phytophthora palmivora*. La cellulose, constituant essentielle de la paroi cellulaire des oomycètes, incluant *Phytophthora* pourrait constituer un obstacle à l'utilisation du contenu intracellulaire de *P. palmivora* par les isolats de *T. harzianum*. Treize isolats de *T. virens*, un isolat de *T. asperellum* T5 et *T. spirale* T4 pour leur part présentent une activité fongicide donc un fort pouvoir mycoparasitaire nécrotrophique contre *P. palmivora*. Comme pour la croissance mycélienne et la survie *in vitro* de *P. palmivora*, tous les isolats de *Trichoderma* se sont révélés antagonistes ne permettant pas la sélection d'un nombre restreint de candidats aux essais au champ.

La sélection des espèces de *Trichoderma* a été réalisée au laboratoire par inoculation artificielle des disques foliaires. Les notes de sensibilité foliaire des clones du cacaoyer, en présence des espèces de *Trichoderma* ont été inférieures à 1,7. Ces faibles valeurs moyennes de sensibilité foliaire à *P. palmivora* par rapport au témoin traduisent l'action inhibitrice des isolats de *Trichoderma*. Ces isolats ont réduit significativement la taille et la fréquence des lésions nécrotiques dues à *P. palmivora*. Des résultats similaires ont été obtenus par Bowers *et al.* (2001b) qui ont montré que l'application de *Trichoderma* sp sur les disques de feuilles permettait la réduction de la sensibilité foliaire à *Phytophthora megakarya*. Cette action réductrice résulterait de la germination des spores de *Trichoderma* sur la surface foliaire qui probablement inhibe ou gêne la germination des zoospores de *Phytophthora palmivora*. Cette aptitude germinative de spores des isolats de *Trichoderma* stimulerait les mécanismes de défense par conséquent renforcerait la résistance à la pénétration et à la propagation du parasite. Il faut noter que des résultats similaires ont été obtenus par Bigirimana *et al.* (1997), Howell *et al* (2000), Sid Ahmed *et al.*, 2000 et Harman *et al* (2004) chez l'haricot, le coton, le piment et le maïs pré inoculés de *T. virens* et *T. harzianum*, soumis aux attaques de *Rhizoctonia* sp, *Colletotrichum* sp et *Phytophthora* sp. Il en résulte sur feuilles une diminution considérable des attaques, par conséquent des lésions nécrotiques dues par *P. palmivora*.

L'activité inhibitrice de ces isolats de *Trichoderma* a été observée sur cabosses. Les cabosses pré inoculées par pulvérisation d'une suspension de

*Trichoderma* ont été inoculées par une suspension de zoospores de *P. palmivora*. Les résultats ont révélé une hétérogénéité de l'action inhibitrice de la population de *T. virens*. Cette hétérogénéité signalée par Howell et al (2000) est due à la capacité différente des isolats de *T. virens* à sécréter les substances antifongiques et à être mycoparasitaires. Les isolats *T. virens* T20, *T. virens* T8, *T. virens* T19 et *T. virens* T7 ont montré une forte aptitude à réduire la sensibilité des cabosses du clone NA32 à *P. palmivora*. Ainsi, la pré inoculation des isolats de *T. virens* sur cabosses renforce la résistance à la pénétration et à la post-pénétration de *P. palmivora*. Cet effet bénéfique s'est traduit par la réduction de la fréquence et la taille des lésions dues à *P. palmivora* sur cabosses. Des résultats analogues ont été obtenus par Tondje et al. (2005) qui révèlent qu'après une pré inoculation de *T. asperellum* sur des fragments de cabosses dans les boîtes de Pétri, les lésions nécrotiques causée par *P. megakarya* ont été réduites. Cependant, l'application des isolats de *T. harzianum* T40, *T. asperellum* T54 et *T. spirale* T4 sur les cabosses ont réduit significativement les taches nécrotiques dues à *P. palmivora*. L'activité mycoparasitaire de *Trichoderma* vis à vis de *P. palmivora* sur les cabosses devrait donc pouvoir être au laboratoire, les tests les mieux indiqués pour sélectionner les candidats efficaces aux essais en plantation. Cependant les essais *in vitro* ont permis de mettre en évidence une corrélation positive des effets antagonistes observés sur feuilles et cabosses sur les symptômes de la maladie. Ainsi, cette étude a permis de sélectionner quatre isolats de *Trichoderma* antagonistes à *P. palmivora*, en fonction de leur forte aptitude à inhiber la croissance mycélienne, à baisser la sensibilité, et à renforcer la résistance intrinsèque des clones de cacaoyer NA32, ICF5, IMC67, T85/799, SCA6 et P7 testés.

## 5. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence en laboratoire l'efficacité antagoniste des isolats de quatre espèces de *Trichoderma* vis à vis de *P. palmivora*, agent responsable de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer. Ces isolats de *Trichoderma*, antagonistes naturels, sont isolés parmi les saprophytes des sols sous

cacaoyers. Les essais de confrontations directes réalisés entre les isolats de *Trichoderma* et *P. palmivora* ont révélé une forte action inhibitrice des espèces *T. virens*, *T. asperellum* et *T. spirale* sur la croissance mycélienne et un effet fongistatique marqué des isolats de *T. harzianum*. Les isolats de *T. spirale*, *T. asperellum* et *T. 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 cabosses a permis la réduction de la sensibilité foliaire de six clones et la sévérité des attaques sur cabosses de *P. palmivora*. Les résultats encourageants obtenus au cours de notre étude constitueraient une contribution dans la lutte biologique contre la pourriture brune de cabosses dans la mesure où la présence des *Trichoderma* renforce la résistance intrinsèque du matériel végétal à *P. palmivora*. L'utilisation effective des antagonistes naturels de *Phytophthora spp* dans la lutte contre la pourriture brune nécessite l'évaluation de leur efficacité en milieu réel. En se basant sur des résultats obtenus, les isolats de *T. spirale* T4, *T. harzianum* T40, *T. virens* T7 et *T. asperellum* T54 à fort pouvoir antagoniste vis à vis de *Phytophthora palmivora* ont été sélectionnés dans la collection pour les essais au champ. Ces isolats offrent une forte aptitude à réduire la sensibilité et surtout à renforcer la résistance intrinsèque du clone NA32 au parasite.

## Remerciements

Docteurs Kouassi Allou et Koné Daouda pour la relecture de ce manuscrit. Nous remercions aussi le technicien de recherche, Mr. Bakary Coulibaly, et les Auxiliaires de recherche au laboratoire de Phytopathologie, Mr. Bernard Abe, Mr Ouglan Traoré et Laurent Touré, pour l'aide appréciable apportée lors de la réalisation des tests d'inoculation sur feuilles et cabosses.

## Références citées

Babacauh K. D., 1980. *Structure et dynamique des populations de Phytophthora sp parasite du cacaoyer (Theobroma cacao L.)*. Thèse d'Etat. Université de Paris –Sud., Paris, France.153 pp

- Bigirimana J., De Meyer G., Poppe J., Elad Y., & Hofte M., 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **62**: 1001-1007.
- Blaha G., Eskes A. B., Kébé B. I., Tahi G. M., & Nyassé S., 2000. Early screening of resistance to *Phytophthora* spp. by means of disc inoculation. In: Eskes A.B & Efron Y., *Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI Project workshop on working procedures for cocoa germplasm evaluation and selection*. 1-6 February 1998. Montpellier (France), pp.103-107.
- Bong, C. L., Julia Lamdin, Voo, C.C., & Rosmen, A.H., 1996. Antagonism with potential for integrated management of pathogens of cocoa and other crops. *Abstracts of 2<sup>nd</sup> International pesticides conference. Crop protection Towards 2000*. 23-25 April 1996. Kuala Lumpur (Malaysia): MACA-GIFAP, pp.33-35.
- Bong C. L., Wong A., Chu F., Tiko T. J., & Milin S., 2000. Field evaluation of *Trichoderma* spp. and *Gladiolium* and *Beauveria bassiana* for the control of black pod disease and cocoa pod borer of *Theobroma cacao*. In: *Proceeding of the 13<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference*. 9-14 October 2000. Kota Kinabalu, Sabal (Malaysia), pp.481-485.
- Bowers J.H., Bailey B.A., Hebbar P. K., Sanogo S., & Lumsden R.D., 2001a. The impact of plant diseases on world chocolate production. Online. *Plant Health Progress* doi: 10. 109:PHP-2001-0709-O1-RV.
- Bowers J.H., Sanogo S., Tondje P.R., Hebbar P. K., & Lumsden R.D., 2001b. Developing strategies for biological control of black pod, monilia pod rot, and witches' broom on cacao. In : *Proceedings of the 1<sup>st</sup> West and Central Africa training workshop on biocontrol of plant diseases, with special reference to cacao black pod diseases*. 25-29 June, 2001. Douala (Cameroon). pp. 10-16.
- Chet I., Inbar J., & Hadar Y., 1997. Fungal antagonists and Mycoparasites. In: Wicklow D.T & Soderstrom B.E., Eds. *Environment and microbial relationships: The Mycota* (Volume IV). Berlin Heidelberg. pp 166-184.
- Deacon J.W., & Berry L. A., 1992. Modes of action mycoparasites in relation to biocontrol of soil borne plant pathogens. In: Tjamos E.S *et al.*, Plenum press. Eds. *Biological control of plant diseases*. New York, USA. pp. 295-303.
- Druzhinina I., & Kubicek C.P., 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea* : form aggregate species to species clusters. *J zhejiang Univ. Sci. B* **6** : 100-112.
- Dubos B., 1986. L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens : *Chondrostereum purpureum* (Pers.ex Fr) Pouzar (Plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* Pers.(pourriture grise de la vigne). In : INRA Publ.,Eds. *L'emploi d'ennemis naturels dans la protection des cultures. Les colloques de l'INRA, N°34*. 10 janvier 1985. Versailles (France), pp 37-49.
- Everitt B., 1980. *Cluster analysis* (2<sup>nd</sup> edition). New York, USA: John Wiley & Sons.153pp.
- Harman E.G., 2000. Myths and Dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease* **84** : 377-393.
- Harman E.G., Howell R. C., Viterbo A., Chet I., & Lorito M., 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent, plant symbionts. *Nature reviews, Microbiology*. **2** : 43-56.
- Fulton R.H., 1989. The cacao disease trilogy : black pod, monilia pod rot, and witches' broom. *Plant Disease* **73** : 601 – 603
- Hebbar K. P., Lumsden D. R., Krauss U., Soberanis W., Lambert S., Machado R., Dessimoni C., & Aitken M. (1999). Biocontrol of cacao diseases in latin America- Status of field trials. In: Krauss U. & Hebbar K.P., Eds. *Research methodology in biocontrol of plant diseases with special reference to fungal diseases of cocoa*. 28 June – 4 July 1999. CATIE, Turrialba (Costa Rica): CABI international & USDA, pp 19-28.
- Howell C. R., Hanson L. E., Stipanovic R.D., & Puckhaber L.S., 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* **90**: 248-252.
- Huguenin G., & 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.

- ICC0 (International Cocoa Organisation), 2000. Bilan de la conjoncture Cacaoyère. 106<sup>e</sup> Réunion. 5-14 juin 2000.Londres. 9 pp.
- ICC0 (International Cocoa Organisation), 2003. Rapport annuel 2002-2003. 22 Berners Street,Londres WIP 3DB. 31p.
- Iwaro A.D., Sreenivasan T.N., Butler D. R., & Umaharan P., 1997 b. *Phytophthora* resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.) : influence of pod morphological characteristics. *Plant Disease* **81** (6): 615-624.
- Iwaro A.D., Sreenivasan T.N, Butler D. R, Thevénin J.M., Moolleedhar V., Bekele F., Sounigo O., & 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.
- Kébé B. I., 1994. Lutte contre les maladies à *Phytophthora* sp par injection directe du fongicide dans le tronc du cacaoyer. In : *Proceedings of the 11th International Cocoa Research Conference*.18-24 juillet 1993.Yamoussoukro (Côte d'Ivoire). pp. 991-996.
- Kébé B.I., 1999. Rapport d'activité 1998, Programme Café Cacao Cola, CNRA, Côte d'Ivoire.39 p.
- Krauss U., & Soberanis W., 2001a. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological control* **24** : 149-158.
- Krauss U., & Soberains W., 2002. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pods diseases. *Biological control* **24** : 82-89.
- Krauss U., Martijn ten Hoopen G., Hidalgo E., Martinez A., Arroyo C., Garcia J., Portuguez A., & Palacios M., 2003. Biocontrol of moniliais (*Moniliophthora roreri*) and Black pod (*Phytophthora spp*) in Panama with mycoparasites in two formulations. In: Akrofi A.Y., Achonor J.B., & Ollennu L.A.A. (eds). *Proceedings of INCOPEd 4<sup>th</sup> International Seminar on Cocoa pests and diseases*. 19-21 October 2003. Accra (Ghana). pp 53-58.
- Kulling C. M., Mach R. L., Lorito M., & Kubicek C. P., 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *Trichoderma harzianum*) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering *Trichoderma* ech 42 gene expression before mycoparasitic contact. *Appl. Environ Microbiol.* **66**: 2232 –2234.
- Mpika J., 2002. *Lutte contre la pourriture des cabosses du cacaoyer en Côte d'Ivoire : isolement et identification des antagonistes naturels de Phytophthora sp*. Mémoire de DEA. UFR de Biosciences Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire. 74 pp.
- Nyassé S., Cilas C., Herail C., & Blaha G., 1995. Leaf inoculation as early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. *Crop protection* **14** : 657-663.
- Pereira J.L., 1985. Chemical control of *Phytophthora* pod rot of cacao in Brazil. *Cocoa Growers Bull.* **36** : 23-28
- Tondje P.R., Begoude B.A.D., Samuels G. J., Hebbar P.K & Foko, J., 2005. Biological control of the cacao black pod disease causative agent *Phytophthora megakarya* with *Trichoderma asperellum*. In : *Proceedings of the 14th International Cocoa Research Conference*. 13-18October 2003 Accra (Ghana). pp. 677-682.
- Tondjé P.R., Roberts D.P., Bon M.C., Widmer T., Samuels G.J., Ismaïel A.D., Begoude A.D., Tchana T., Nyemb-Tshomb E., Ndoumbe-Nkeng, Bateman R., Fontem D., & Hebbar K.P., 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in cameroon. *Biol. Control* **43**: 202-212.
- Sid Ahmed A., Sanchez P.C., & Candela E.M., 2000. Evaluation of induction systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European journal of plant pathology* **106** : 824-824.
- Whipps J.M.,1997. Effect of media on growth and interaction between a range of soil-borne glasshousess pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*.**107**: 127-142.