

African Crop Science Journal by African Crop Science Society is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Uganda License. Based on a work at [www.ajol.info/](http://www.ajol.info/) and [www.bioline.org.br/cs](http://www.bioline.org.br/cs)  
DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/acsj.v26i4.2>



## IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES CHAMPIGNONS DES SEMENCES CHEZ L'ASSAMELA SUIVI DE LEUR PROTECTION A PARTIR DES POUDRES ET EXTRAITS ISSUS DE PLANTES MEDICINALES

J.F. DJEUGAP<sup>1,2</sup>, C. NZUTA<sup>1,3</sup>, G. KENMOGNE<sup>1</sup>, P. TEKAM<sup>4</sup> et M. KYALO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université de Dschang, Faculté d'Agronomie et des sciences Agricoles, Département de Protection des Végétaux, Unité de recherche de Phytopathologie et Zoologie Agricole, BP. 222 Dschang, Cameroun

<sup>2</sup>Biosciences eastern and central Africa-International Livestock Research Institute (BeCA-ILRI) Hub, Nairobi, Kenya

<sup>3</sup>Université de Dschang, Faculté d'Agronomie et des sciences Agricoles, Département de Foresterie, Unité de recherche de Sylviculture et Technologie du bois, BP. 222 Dschang, Cameroun

<sup>4</sup>Société Forestière PALLISCO, SARL. Avenue des cocotiers, 478 ; BP. 394 Douala, Cameroun

**Auteur correspondant:** [joseph.djeugap@univ-dschang.org](mailto:joseph.djeugap@univ-dschang.org), [jdjeugapfovo@yahoo.fr](mailto:jdjeugapfovo@yahoo.fr)

(Received 29 January, 2018; accepted 7 November, 2018)

### RÉSUMÉ

Les champignons des semences constituent l'une des contraintes majeures de régénération naturelle des peuplements de l'Assamela (*Pericopsis elata*) dans les forêts de production au Cameroun. Cette étude avait pour objectif de contribuer à la protection des semences chez l'assamela par l'utilisation des substances naturelles d'origine végétale (*Vitex doniana*, *Paullinia pinnata*, *Citrus sinensis*, *Ageratum conyzoides* et *Carica papaya*). Le Kit (Zymo Research) a été utilisé pour l'extraction d'ADN des champignons et les portions ITS des gènes de l'ADN ribosomal séquencés. Les poudres végétales ont été testées à 10% (m m<sup>-1</sup>) et les extraits aqueux et éthanoliques, aux concentrations respectives de 100 g ml<sup>-1</sup> et 48 g ml<sup>-1</sup>. Le fongicide Thirame a été utilisé comme témoin positif. Les champignons pathogènes des semences ont été : *Aspergillus niger*, *Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus flavus* et *Fusarium equiseti*. Le taux d'infection des semences a été de 67% chez le lot témoin négatif. Les semences conservées dans les poudres ont donné des taux d'infections inférieurs à 8% significativement comparable (P<0,05) à ceux du fongicide de synthèse Thirame (3,33%). Les poudres n'ont pas eu d'effet sur la germination à la concentration testée 10%. Seuls les extraits aqueux de *Citrus sinensis*, *Ageratum conyzoides* et *Carica papaya* ont offert des taux de germination élevés de 92 ; 92 et 97% respectivement. Les poudres testées et l'extrait aqueux de *A. conyzoides* pourraient constituer des alternatives à la protection chimique des semences de *P. elata*.

**Mots Clés:** *Pericopsis elata*, extraits végétaux, poudres végétales, protection des semences, champignons des semences

### ABSTRACT

Seedborne fungi constitute one of the major constraints of natural regeneration of Assamela (*Pericopsis elata*) stands in Cameroon's forest production. The objective of this study was to evaluate the capacity of a botanical (*Vitex doniana*, *Paullinia pinnata*, *Citrus sinensis*, *Ageratum conyzoides* and *Carica papaya*) to protect Assamela seeds against seedborne fungal pathogens. Fungal DNA extraction was done using the Zymo Research Kit and the internal transcribe spacer (ITS) portions of ribosomal DNA genes were sequenced. Plant powders were tested at 10% (mass/mass) and the efficiency of the aqueous and ethanolic extracts was evaluated at 100 g ml<sup>-1</sup> and 48 g ml<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>, respectivement. Thirame (référence fongicide) a été utilisé comme contrôle positif. Des champignons pathogènes transmis par les semences ont été trouvés : *Aspergillus niger*, *Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus flavus* et *Fusarium equiseti*. L'infection des semences a été de 67% dans le contrôle négatif. Les semences stockées dans les poudres végétales ont eu des taux d'infection inférieurs à 8% ( $P < 0.05$ ) comparativement à celles du fongicide Thirame (3.33%). Les poudres n'ont eu aucun effet sur la germination à 10%. Seuls les extraits aqueux de *Citrus sinensis*, *Ageratum conyzoides* et *Carica papaya* ont donné de hautes germinations de 92, 92 et 97%, respectivement. Les poudres végétales testées et l'extrait aqueux de *A. conyzoides* pourraient être considérés comme des alternatives à la protection chimique des semences de *P. elata*.

**Key Words:** *Pericopsis elata*, extraits végétaux, poudre végétale, champignons pathogènes, protection des semences

## INTRODUCTION

Les forêts d'Afrique centrale en général et celles du Cameroun en particulier, abritent une richesse floristique de bois d'œuvre très prisée dans le commerce national et international (Gonmadje *et al.*, 2012). Au nombre des espèces prisées des forêts camerounaises, l'on cite *Pericopsis elata* (Harms) Van Meeuwen communément appelé assamela ou aformosia, une essence surexploitée et inscrite à l'Annexe II de la CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) sur décision de la VII<sup>ème</sup> Session de la Conférence des Parties en 1992 (CITES, 2005). C'est la raison pour laquelle depuis 2005, l'Organisation Internationale des Bois Tropicaux (OIBT) et la CITES travaillent pour le développement d'un vaste projet de renforcement des capacités des pays tropicaux sur le commerce durable de trois espèces classées en annexe II de la CITES à savoir : *Swietenia macrophylla* (*Bigleaf mahogany*) en Amérique latine, *Gonystylus* sp en Asie du Sud Est et *Pericopsis elata* (Aformosia ou Assamela) en Afrique Centrale (CITES, 2005). La faible régénération naturelle observée chez *P. elata* et l'insuffisance des données nécessaires à une gestion durable de la forêt, ont conduit les chercheurs à s'interroger sur les causes potentielles de cette situation afin de proposer des solutions efficaces et durables. En effet, depuis son inscription à l'annexe II de la CITES, la recherche sur *P. elata* a connu un regain d'intérêt. Cette essence présente un faible niveau de régénération naturelle qui serait probablement due à un faible niveau

d'éclairage dans les sous-bois (Boyemba, 2011). Il remarque par ailleurs, que les graines germent difficilement et la plupart pourrit un à trois mois plus tard. A cela s'ajoute les facteurs biotiques (champignons hébergés par les semences) qui entravent la germination des semences et provoqueraient la mort des plantules. Certains travaux ont montré que les semences sont considérées comme source alimentaire potentielle et de propagation de divers agents pathogènes (Champion, 1997 ; Baskin et Baskin, 2014). Pour lutter contre les maladies fongiques transmises par les semences, plusieurs fongicides de synthèse sont préconisés. Malheureusement, leur utilisation judicieuse en conformité avec les prescriptions d'usage est plutôt rare car les pépiniéristes locaux sont inexpérimentés et non formés en matière de gestion des pesticides. L'utilisation parfois anarchique des pesticides de synthèse présente des risques de pollutions environnementales, de développement de résistance aux agents pathogènes et d'intoxication pour le consommateur (Lulia *et al.*, 2012 ; Kausik et Sayan, 2015). C'est pour ces raisons que les recherches dans le domaine de la protection des végétaux sont de plus en plus orientées vers le développement des alternatives à la lutte chimique en recourant à l'utilisation de substances non toxiques d'origine naturelle (Murray, 2000 ; CABI, 2011). C'est dans ce cadre que la présente étude a été réalisée afin de tester l'efficacité de poudres et extraits de quelques plantes médicinales dans la protection post-récolte des semences de l'Assamela.

## MÉTHODOLOGIE

**Origine des semences.** Les gousses de *Pericopsis elata* ont été récoltées dans les plantations d'Assamela de Belabo (Réserve de Deng-Deng) et de Bidou (Réserve Kienké-Sud) en Avril 2015, et transportées au Laboratoire de Phytopathologie où elles ont été conservées dans un incubateur à 4°C jusqu'à leur utilisation.

**Isolement des champignons, extraction d'ADN, amplification, séquençage et test de pathogénie.** L'isolement des champignons a été réalisé sur le milieu pomme de terre dextrose agar (PDA), supplémenté en ampicilline à raison de 500 mg l<sup>-1</sup> (Djeugap, 2013). L'extraction d'ADN s'est faite en utilisant le protocole décrit dans le Kit d'extraction ZR Plant/Seed DNA MiniPrep™ (Zymo Research), à partir d'environ 150 mg du mycélium frais. Après élution des échantillons d'ADN, leur pureté a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop spectrophotomètre. Les séquences ITS des gènes des ADNr ont été amplifiées par les amorces universelles ITS1 et ITS4 (De Beeck *et al.*, 2014) suivantes : ITS1 52 -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-32 et ITS4 52 -TCCTCCGCTTATTGATATGC-32. Le volume total du mélange réactionnel a été de 30µl constitué du tampon PCR (3µl), dNTP (0,6µl), MgCl<sub>2</sub> (2,4µl), amorces ITS (1,8 µl chacune), Taq DNA polymérase (0,24µl), eau doublement distillée (15,16 µl) et l'ADN (5µl). Les conditions de l'amplification ont été les suivantes : une phase de dénaturation à 94°C pendant 3 min, suivi de 35 cycles de dénaturation (94°C pendant 30 s, 60°C for 1 min et 72°C pendant 1 min), avec une extension finale à 72°C pendant 7 min. Après amplification, le Kit de purification des produits PCR (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) a été utilisée pour purifier les amplicons avant leur expédition en Hollande munis des amorces ITS1 et ITS4 à 10 pmoles.µl<sup>-1</sup> pour le séquençage par la compagnie MACROGEN. Les séquences ITS

obtenues ont été nettoyées, assemblées et blastées à celles de la collection de la banque de Nucleotides (Nr/nt) du NCBI à l'aide de l'algorithme WU-BLAST (Washington University-Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997). En ce qui concerne le test de pathogénie, 5 isolats de chaque espèce fongique ont été sélectionnés au hasard pour les inoculations. Pour y parvenir, les semences saines ont été immergées dans l'eau distillée stérilisée pendant 1 h puis enrobées directement avec les spores sur le mycélium des cultures pures des champignons conservées dans des boîtes de Pétri pendant 10 jours à 22°C. Vingt semences ont été considérées par isolat. Au bout de 10 jours, la présence des infections (+, ++, +++) ou leur absence (-) sur les semences a été relevée.

**Matériel végétal utilisé pour la préparation des poudres et extraits de plante et détermination du taux d'infection.** Les végétaux utilisés pour la préparation des poudres et extraits sont des plantes médicinales couramment utilisées pour lutter contre le paludisme, le diabète, l'hypertension artérielle, les dermatoses et les vers intestinaux (Tableau 1). Les différents organes des plantes ont été collectés dans les Hauts Plateaux de l'Ouest Cameroun puis séchés à l'abri du soleil pendant deux semaines. Un témoin négatif (eau distillée) et un témoin positif (fongicide Thirame) recommandé pour la protection des semences, ont été introduits dans l'étude. Les gousses ont été collectées sous les semenciers de chaque localité (Bidou et Belabo) en février 2015 (saison sèche) et conservées à 4°C pour attendre le retour des pluies. En mai 2015, les semences ont été extraites des gousses et le taux d'infection des semences a été déterminé avant traitement aux poudres et extraits de plantes.

**Préparation des poudres et extraits végétaux.** Les différents organes (graines, feuilles, écorce) de plante récoltés ont été séchés séparément à l'ombre pendant deux

TABLEAU 1. Espèces végétales médicinales utilisées pour la préparation des poudres et extraits végétaux

Nom commun	Nom scientifique	Famille botanique	Organe utilisé	Propriétés médicinales (pathologies traitées)
Roi des herbes	<i>Ageratum conyzoides</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Partie aérienne	Constipation, Hypertension artérielle, Diabète, Otite, Paludisme (Trabi <i>et al.</i> , 2008)
Prunier noir	<i>Vitex doniana</i> Sweet	<i>Verbenaceae</i>	Ecorces	Maux de tête, l'Asthénie, les courbatures et les céphalées, la varicelle, la rougeole, les dermatoses, le panaris, les plaies, les blessures (Wickens, 1980 ; Zerbo <i>et al.</i> , 2007)
Toa-ntini	<i>Paullinia pinnata</i> L.	<i>Sapindaceae</i>	Feuilles	Rhumatisme, paludisme, relaxation vasculaire, diminution de l'érection, antioxydant, troubles métaboliques (Robert <i>et al.</i> , 2004 ; Zamble <i>et al.</i> , 2006)
Papaye	<i>Carica papaya</i> L.	<i>Caricaceae</i>	Pépins	Fièvre typhoïde, Parasitoses intestinales, anthelminthique (ascaris, oxyures, trichocéphales, uncinaria), antibactérienne, anti-inflammatoire (Nicolas, 2003 ; Trabi <i>et al.</i> , 2008)
Orange	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>Rutaceae</i>	Péricarpe	Douleurs articulaires, crampes, rhumatismes, infections bactériennes, infections virales, Calculs biliaires, constipation chronique, hypertension (Trabi <i>et al.</i> , 2008)

semaines puis broyées séparément dans un moulin : les poudres ont été pesées et conservées dans des bocaux à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation (Keuete *et al.*, 2015). Le rendement en poudre est le pourcentage de matière sèche obtenu. L'eau distillée stérilisée et l'éthanol ont été utilisés pour extraire les principes actifs des poudres. Pour y parvenir, 100 g de poudre de chaque plante ont été macérés dans 500 ml de chaque solvant pendant 48 heures puis filtrés sur du papier Whatman N°1. Les filtrats issus de la macération éthanolique ont été introduits dans le ballon d'un Rota vapeur (marque Buchner) à 67°C pour évaporer et récupérer le solvant d'extraction puis l'évaporation complète s'est poursuivie dans une étuve (marque Koelthenhiek-Electriciteit Cornelis) à 40°C (Keuete *et al.*, 2015). Les filtrats issus de la macération aqueuse ont été versés dans des plateaux en inox et mis à évaporer dans la même étuve à 40°C. Les extraits bruts obtenus ont été pesés afin de déterminer le rendement (Rdt) d'extraction et conservés à température ambiante dans des flacons sombres hermétiquement fermés pour leur utilisation ultérieure.  $Rdt (\%) = 100 (M_1/M_0)$  ;

$M_0$  est la masse de la poudre et  $M_1$ , la masse de l'extrait.

**Evaluation de l'efficacité des poudres végétales dans la protection des semences de *Pericopsis elata*.** Les poudres ont été appliquées à des doses correspondant au dixième du poids des semences traitées (Kaloma *et al.*, 2008). Ainsi, dans une boîte de Pétri scellée avec du papier parafilm, 10,5 g de semences de *P. elata* correspondant à 40 semences ont été enrobées avec 1,05 g de poudre fine (soit 10%). Les semences du lot témoin positif ont été enrobées avec un fongicide de synthèse recommandé imidaclopride à la dose d'utilisation recommandée (10 g kg<sup>-1</sup> de semences) et les semences du lot témoin négatif n'ont reçu ni poudre, ni fongicide. Chaque traitement a été

répété trois fois et conservé à 22°C. Les observations hebdomadaires réalisées ont porté sur le nombre de semences saines et le nombre de semences infectées (Kaloma *et al.*, 2008). L'examen des semences a été réalisé à la loupe (agrandissement : 10X) et les semences présentant des taches ou un développement mycélien ont été considérées comme infectées ; puis, le taux d'infection déterminé au bout de 45 jours après traitement (JAT).

**Evaluation de l'efficacité des extraits de plantes dans la protection des semences de *Pericopsis elata*.** Des lots de 40 semences par boîte de Pétri (4 boîtes de 40 semences chacune ont été considérées par traitement) ont été pulvérisés avec 5 ml d'extraits éthanoliques et aqueux aux concentrations respectives de 48 et 100 mg.ml<sup>-1</sup> à l'aide d'un mini pulvérisateur manuel. Un volume de 5 ml d'eau distillée stérilisée et de la bouillie fongicide à la concentration de 10 g.litre<sup>-1</sup> a servi de témoins négatif (T<sup>-</sup>) et positif (T<sup>+</sup>) respectivement. Après pulvérisation, les semences ont été placées à l'étuve à 40°C pendant 15 min suivant le protocole modifié de Serferbe *et al.* (2015). Les boîtes de Pétri contenant les semences ont été ensuite scellées au papier parafilm et conservées à la température de 22°C. Chaque traitement a été répété 3 fois. Les observations hebdomadaires réalisées ont porté sur le décompte du nombre de semences saines et du nombre de semences infectées. L'examen des semences et le calcul du taux d'infection ont été réalisés comme expliciter plus haut.

**Test de germination sur papier buvard.** A l'issue de l'évaluation de la bio activité des poudres et extraits de plante sur la protection des semences de *P. elata* contre les champignons, un test de germination sur papier buvard a été effectué. A cet effet, les semences traitées (160 par traitement) ont été déposées dans des boîtes de Pétri contenant 3 couches de papier buvard imbibé d'eau distillée stérilisée. Ces boîtes ont été ensuite placées à

la température de 22°C (température ambiante) avec un cycle alternatif de 12 h d'obscurité et 12 h de lumière pendant 6 jours (Serferbe *et al.*, 2015). La lumière était fournie par de tubes fluorescents placés à 40 cm au-dessus des boîtes de Pétri. La germination (G) a été calculée à travers la formule :

$G = (\text{nombre de semences ayant germées} / \text{nombre total de semences incubées}) \times 100.$

**Analyses statistiques.** Les données exprimées en pourcentage ont été préalablement transformées en arc sinus pour une meilleure normalisation des données avant analyse (Vilain, 2012). Le logiciel SAS (Version 9.1.) a été utilisé et lorsque les analyses de variance étaient significatives, les différences significatives entre les moyennes étaient déterminées par le test de Student au seuil de probabilité de 5%.

## RÉSULTATS

**Champignons hébergés par les semences de *Pericopsis elata* et pouvoir pathogène.** Le séquençage de la portion ITS de l'ADNr des champignons isolés montre que le profil fongique des champignons associés aux semences de *P. elata* est diversifié. On y retrouve : *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *Colletotrichum acutatum*, *Diaporthe* sp., *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus nigricans*, *Trichoderma harzianum* et *Macrophomina phaseolina*. Le Tableau 2 présente le pourcentage de similitude des séquences obtenues avec celles de la banque des gènes ainsi que le niveau de pathogénie de quelques isolats d'intérêt. Les espèces pathogènes des semences sont : *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium equiseti* et *Macrophomina phaseolina* (Tableau 2).

**Effet des poudres et extraits végétaux sur l'état sanitaire et le taux d'infection des semences de *Pericopsis elata*.** Quarante-cinq jours après traitement, les semences

TABLEAU 2. Caractéristiques de quelques espèces fongiques identifiées à partir des régions ITS comparé aux données de la banque des gènes

Espèce fongique	% de similitude* et N° Accession	Nombre d'isolats		Pourcentage d'isolement		Test de pathogénicité
		Bidou	Belabo	Bidou	Belabo	
<i>Diaporthe</i> sp.	98%, KJ197289	12	3	16,44	5,77	-
<i>Aspergillus flavus</i>	100%, HQ340106	15	9	20,55	17,31	+++
<i>Aspergillus oryzae</i>	100%, EU301638	4	2	5,48	3,84	-
<i>Fusarium equiseti</i>	100%, JQ936152	13	7	17,81	13,46	++
<i>Aspergillus niger</i>	100%, KU681408	19	15	26,03	28,85	+++
<i>Macrophomina phaseolina</i>	100%, KJ629093	8	11	10,96	21,15	+++
<i>Trichoderma harzianum</i>	99%, KJ755187	2	5	2,74	9,62	-

\*Pourcentage de similitude avec les séquences de la banque des données nucléotidiques du NCBI (National Center for Biotechnology Information)

conservées dans les poudres végétales et dans le fongicide ont conservé leur aspect physique. Leur examen visuel à la loupe n'a pas montré de filaments mycélien contrairement aux lots de semences témoin négatif. Pour ce qui est des semences conservées dans les extraits, seules les semences traitées avec l'extrait aqueux d'*A. conyzoides* à la concentration de 100 mg.ml<sup>-1</sup> ou avec la bouillie du fongicide Thirame ont conservé leur aspect physique et n'étaient pas colonisées de filaments mycéliens. Presque toutes les semences traitées aux autres extraits aqueux ont été envahies par les champignons au bout de 45 jours. La quasi-totalité des semences conservées dans les extraits éthanoliques ont pourries durant l'essai. Les semences traitées aux poudres ont donné des taux d'infection compris entre 4 et 7%, valeurs significativement comparables (Pd\*0,05) à celle de la poudre du fongicide (3,33%), 45 JAT. Les semences du lot témoin qui ont été conservées sans poudre ont les taux d'infection les plus élevés (72,33%) au bout de 45 jours (Tableau 3). Les lots de semences traitées aux extraits aqueux ont donné des taux d'infection compris entre 8 et 100%. Le taux d'infection des semences traitées à l'extrait aqueux de *A. conyzoides* (8,62%) a été significativement semblable à celui des semences traitées avec au fongicide (10,5%), tandis qu'il a été de 100% pour les semences traitées à l'extrait aqueux de *P. pinnata*

(Tableau 4). Les semences traitées aux extraits éthanoliques ont présenté les taux d'infection les plus élevés comparés à ceux relatifs aux poudres et extraits aqueux. Ces taux ont varié de 54% pour l'extrait éthanolique de *A. conyzoides* à 100% pour les extraits éthanoliques de *P. pinnata* et *V. doniana*. Quelle que soit la poudre végétale et le type d'extrait considéré, les semences traitées avec *A. conyzoides* ont présenté les taux d'infection les plus faibles.

**Influence des poudres et extraits végétaux sur la germination des semences de *Pericopsis elata*.** Le test de germination sur papier buvard des semences ayant été conservées dans les poudres et extraits végétaux a montré que celles-ci commencent à germer (émergence de la radicule) à partir du 2<sup>ème</sup> jour après ensemencement (JAE), avec un taux de 0,8% pour les lots de semence conservées dans la poudre d'*A. conyzoides*, contre 0% pour les deux témoins et la poudre des autres plantes (Tableau 4). Au 8<sup>ème</sup> JAE, les taux de germination des semences conservées dans la poudre et dans l'extrait aqueux de *A. conyzoides* (89,4 et 91,8% respectivement) ont été statistiquement comparables à ceux des semences conservées dans la poudre et la bouillie du fongicide (92,5 et 89,3% respectivement). Aucune semence conservée dans les extraits éthanoliques de *P.*

TABLEAU 3. Effet des poudres (10%), extraits aqueux (100 mg ml<sup>-1</sup>) et éthanoliques (48 mg ml<sup>-1</sup>) sur la protection des semences de *P. elata*, 45 jours après traitement à 21°C

Traitement	Infection des semences (%)		
	Poudres	Extraits aqueux	Extraits éthanoliques
Témoin négatif (T <sup>-</sup> )	72,33±7,65 <sup>a</sup>	67,66 ± 9,29 <sup>bc</sup>	67,66 ± 9,29 <sup>c</sup>
Thirame (T <sup>+</sup> )	3,33±2,88 <sup>b</sup>	10,5 ± 3,24 <sup>c</sup>	10,5 ± 3,24 <sup>d</sup>
<i>Ageratum conyzoides</i>	4,04±1,70 <sup>b</sup>	8,62 ± 2,89 <sup>c</sup>	54,12 ± 6,92 <sup>c</sup>
<i>Paullinia pinnata</i>	5,23±1,15 <sup>b</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>
<i>Vitex doniana</i>	6,61±2,51 <sup>b</sup>	77,6 ± 5,29 <sup>b</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>
<i>Citrus sinensis</i>	4,33±3,21 <sup>b</sup>	57,66 ± 9,29 <sup>c</sup>	85,66 ± 2,04 <sup>b</sup>
<i>Carica papaya</i>	4,08±1,73 <sup>b</sup>	36,3 ± 7,93 <sup>d</sup>	73,42 ± 3,30 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>Les moyennes suivies d'une même lettre dans la colonne ne sont pas significativement différentes entre elles selon le test de Student 5%

TABLEAU 4. Effet des poudres (10%), des extraits aqueux (100 mg ml<sup>-1</sup>) et éthanoliques (48 mg ml<sup>-1</sup>) sur la germination\* des semences de *P. elata*, 2 et 8 jours après ensemencement

Traitements	Taux de germination (%)			
	Poudres		Extraits aqueux	Extraits éthanoliques
	2JAE	8JAE	8JAE	8JAE
Témoin négatif (T)	0 <sup>a</sup>	27,7±5,3 <sup>c</sup>	34,7 ± 2,47 <sup>d</sup>	34,6 ± 2,47 <sup>c</sup>
Thirame (T <sup>+</sup> )	0 <sup>a</sup>	92,5±3,3 <sup>a</sup>	89,3 ± 3,47 <sup>a</sup>	89,3 ± 3,47 <sup>a</sup>
<i>Ageratum conyzoides</i>	0,8±0,3 <sup>a</sup>	89,4±3,7 <sup>a</sup>	91,8 ± 4,47 <sup>a</sup>	46,1 ± 7,2 <sup>b</sup>
<i>Paullinia pinnata</i>	0 <sup>a</sup>	57,5±2,3 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
<i>Vitex doniana</i>	0 <sup>a</sup>	62,9±4,1 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
<i>Citrus sinensis</i>	0 <sup>a</sup>	58,1±6,7 <sup>b</sup>	43,3 ± 4,47 <sup>c</sup>	17,1 ± 3,3 <sup>d</sup>
<i>Carica papaya</i>	0 <sup>a</sup>	60,4±5,7 <sup>b</sup>	66,6 ± 6,47 <sup>b</sup>	30,7 ± 4,2 <sup>c</sup>

\*Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles selon le test de Student à 5%. JAE = jours après ensemencement



Figure 1. Poudre (A) et semences (B) conservées dans la poudre de *A. conyzoides* ; semences infectées du lot témoin (C).

*pinnata* et *V. doniana* n'a germé durant la période de l'essai.

## DISCUSSION

**Champignons hébergés par les semences chez l'Assamela.** Très peu de semences de *P. elata* germent en forêt sous les semenciers à cause du manque de lumière et de leur contamination par diverses moisissures (Dondjang, 2010 ; Loumeto *et al.*, 2011). Divers champignons phytopathogènes ont été signalés comme capable d'infecter les semences d'espèces forestières. La diversité des espèces fongiques hébergées par les semences varie d'une espèce végétale à l'autre et chez la même espèce, d'une écologie à

l'autre avec cependant certains champignons polyphages qui se retrouveront dans les semences de plusieurs espèces végétales (Champion, 1997). Certains champignons tels que : *A. niger*, *A. flavus* et *Macrophomina phaseolina* isolés des semences de *P. elata* dans le cadre de cette étude ont été signalés comme agents pathogènes des semences chez d'autres espèces végétales à savoir : *Vigna radiata* (Kandhare, 2014) et *Oryza sativa* (Dedi et Allou, 2015). Etant donné que les espèces *Aspergillus flavus* produisent de l'aflatoxine (Yin *et al.*, 2009), il serait judicieux de vérifier si les isolats de cette espèce retrouvés dans les semences de *P. elata* produisent ou non cette toxine cancérigène.

**Bioactivité des poudres et extraits végétaux dans la conservation des semences chez l'assamela.**

Toutes les poudres des plantes testées ont assuré la conservation des semences de *P. elata* au bout de 45 jours en offrant des taux d'infection très faibles comparables à ceux obtenus avec le fongicide de synthèse utilisé, ainsi que des taux de germination post-traitement relativement élevés 8 jours après ensemencement. Ces résultats qui mettent en exergue l'efficacité des plantes testées corroborent ceux obtenus par (Nweke et Ibiam, 2012) avec l'extrait aqueux des racines de neem (*Azadirachta indica*) dont l'efficacité contre *Colletotrichum gloeosporioides* est obtenue à la dose de 300 mg.ml<sup>-1</sup>. L'efficacité des poudres et extraits végétaux dans la conservation des semences et la lutte contre les champignons hébergés par les semences avait antérieurement été mis en évidence par plusieurs auteurs. C'est le cas par exemple des poudres de *Tephrosia vogelii* qui permettent de conserver les graines de niébé (Kayombo *et al.*, 2015) et des extraits de *Decalepis hamiltonii*, *Lawsonia inermis* et de *Mimosops elengi* qui ont une activité antifongique contre les champignons des semences du riz à la concentration de 3500 µg/ml (Devihalli *et al.*, 2011). Cette étude a par ailleurs montré que les semences conservées pendant 45 jours dans les poudres végétales ont des taux de germination supérieur à 50%. Serferbe *et al.* (2015) avaient obtenu des résultats similaires après conservation des semences de coton dans l'extrait aqueux des feuilles de *Azadirachta indica* et de l'écorce de *Boswellia dalzielii* à la concentration de 100 mg ml<sup>-1</sup>. Ces auteurs rapportent par ailleurs que les extraits de ces plantes réduisent significativement l'infection due aux champignons des semences et améliorent la vigueur des plantules. Ainsi, les poudres et extraits de plantes testées possèdent de toute évidence, des molécules efficaces contre les champignons hébergés par les semences de *P. elata*. Etant donné que la maturation des gousses de *P. elata* intervient en saison sèche, les pépiniéristes désireux

d'installer leurs pépinières à l'approche de la saison des pluies peuvent conserver les semences dans les poudres des plantes testées ou dans l'extrait aqueux de *A. conyzoides*. Les avantages associés à l'utilisation de ces produits sont entre autres, leur disponibilité à proximité des paysans, leurs techniques de préparation et d'utilisation simple, ce sont des substances naturelles moins onéreuses ayant très peu ou pas d'effet néfaste sur l'utilisateur et l'environnement. Toutefois, l'isolement des molécules actives des poudres des plantes testées et de l'extrait aqueux de *A. conyzoides* doit être envisagé en vue de leur formulation et homologation pour la conservation des semences. L'efficacité élevée des poudres dans la protection des semences par rapport aux extraits pourrait s'expliquer par leur faible teneur en eau. En fait, les poudres absorberaient l'humidité contenu dans les semences, réduisant ainsi la respiration des semences et par conséquent, leur activité métabolique ; ce qui crée des conditions défavorables au développement des champignons (Turner, 2013).

**Effet des poudres et extraits végétaux sur la germination des semences.**

Le taux d'infection des semences a été élevé dans les lots témoin (traitement à l'eau distillée) que dans les lots ayant été traités aux poudres et aux extraits végétaux. Ceci serait dû à la peroxydation des lipides au niveau des semences. Cette réaction est plus accentuée chez les graines des oléagineuses où le taux élevé de lipides serait à l'origine d'une détérioration plus rapide des semences pendant le stockage. En effet, la peroxydation cause des changements biochimiques qui peuvent être observés au cours du stockage des semences. Elle peut endommager les membranes des cellules des graines les rendant vulnérables aux maladies (Sung et Chiu, 1995 ; Al-Maskri *et al.*, 2003). La germination des semences de l'Assamela traitées avec les poudres et extraits végétaux a été très élevée comparé à celle des semences des lots témoin. Ce qui démontre que les poudres et extraits de plantes testés

n'ont pas affecté la germination des semences comme rapporté dans les travaux de Mamun et Shahjahan (2011) et de Mahal (2014) pour ce qui est des semences de blé et de lentille respectivement. Ces résultats sont en accord aux études antérieures qui ont relevé que les extraits de plantes, ont des effets positifs sur la protection et la germination des semences, l'émergence et santé de plantules de diverses espèces cultivées telles que le haricot, le blé, le maïs, la tomate et le piment (Alabi *et al.*, 2005; Shafique *et al.*, 2007; Rani et Devanand 2011; Arzoo et Biswas 2013; Alam *et al.*, 2014). Cependant, pour être considéré comme un potentiel agent de biocontrôle, il est important d'envisager des tests d'efficacité de ces substances contre les agents pathogènes responsables des maladies des semences chez l'Assamela.

### CONCLUSION

Au terme de cette étude, dont l'objectif était de contribuer à la protection des semences de *P. elata* par l'entremise des poudres et extraits végétaux issus de plantes médicinales, il ressort que les champignons responsables des maladies des semences chez *P. elata* sont : *Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Fusarium equiseti*. Les espèces *Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* ont été les plus agressives sur les semences après inoculation. Les poudres des plantes testées à 10% ainsi que l'extrait aqueux d'*Ageratum conyzoides* à la concentration de 100 mg/ml assurent la protection des semences de l'Assamela pendant 45 jours sans altérer leur faculté germinative et peuvent être proposés pour la conservation des semences d'espèces forestières. Cette étude met en évidence pour la première fois des champignons hébergés par les semences chez l'Assamela, une espèce forestière menacée d'extinction à cause des maladies des semences, de sa très faible régénération naturelle et de sa surexploitation.

### REMERCIEMENTS

L'identification moléculaire des champignons a été effectuée au Biosciences eastern and central Africa-International Livestock Research Institute (BecA-ILRI) à Nairobi (Kenya). Les auteurs expriment leur entière gratitude au directeur de cette structure de recherche pour les équipements mis à leur disposition et les moyens financiers mobilisés pour la réalisation de ce travail.

### RÉFÉRENCES

- Abuga, I. 2014. Isolation and identification of fungi associated with groundnut seeds at Aliero Central market. *International Journal of Biological Sciences* 1(5):56-62.
- Alabi, D.A., Oyero, I.A., Jimoh et Amusa, N.A. 2005. Fungitoxic and phytotoxic effect of *Vernonia amygdalina* (L.), *Bryophyllum pinnatum* Kurz, *Ocimum gratissimum* Closium L. and *Eucalyptus globulus* (Caliptos) Labill water extracts on cowpea and cowpea seedling pathogens in Ago-Iwoye, South Western Nigeria. *World Journal of Agricultural Sciences* 1:70-75.
- Alam, M.Z., Hamim, I., Ali, M.A. et Ashrafuzzaman, M. 2014. Effect of seed treatment on seedling health of chili. *Journal of Environmental Science and Natural Resources* 7:177-181.
- Al-Maskri, A.Y., Khan, M.M., Khan, I.A. and Al-Habsi, K. 2003. Effect of accelerated ageing on viability, vigor (RGR), lipid peroxidation and leakage in carrot (*Daucus carota* L.) seeds. *Int. J. Agri. Biol.* 5(4): 580 - 585.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Resources* 25:3389-3402.
- Arzoo, K. et Biswas, S.K. 2013. Effect of plant extracts as seed treatments on growth

- parameters, seedlings mortality and biochemical changes in tomato. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 4:47–53.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. 2014. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. *Elsevier* 1600p.
- Boyemba, B.F. 2011. Ecologie de *Pericopsis elata* (Harms) Van Meeuwen (*Fabaceae*), arbre de forêt tropicale africaine à répartition agrégée. Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique. 181pp.
- CAB International. 2011. Natural products in plant pest management. Nawal K. Dubey (Ed.). Centre for Advanced Studies in Botany Banaras Hindu University, Varanasi, India. 306pp.
- Champion, R. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques et pratiques. INRA, Editions Quae, Paris France. 398pp.
- CITES (Convention Internationale sur le commerce des Espèces de Flore et de Faunes menacées d'extinction), 2005. Atelier OIBT/CITES sur le commerce durable de *Pericopsis elata*. In : 57<sup>ème</sup> Session du Comité Permanent, Genève-Suisse. 4 p.
- De Beeck, M.O., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J. and Colpaert, J.V. 2014. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS One* 9(6):e97629.
- Dedi, J. and Allou, K. 2015. Etude du pouvoir germinatif de quatre variétés de riz que sont GIZA 178, WAB 56-50, Lohinini, Danane et identification des champignons présents sur les graines en germination. *Afrique Science* 11(3):161-171.
- Devihalli, C.M., Praveen, P., Veena, V. and Koteswara, A.R. 2011. Plant extracts effect on seed-borne pathogenic fungi from seeds of paddy grown in southern India. *Journal of Plant Protection Research* 51(2):102-106.
- Djeugap, F.J. 2013. Contraintes de germination et diagnostic moléculaire des champignons associés aux maladies chez *Ricinodendron heudelotii* au Cameroun. Thèse de Doctorat PhD, Université Laval, Québec, Canada, 188pp.
- Djeugap, F.J., Azia, A.T., Tita, N.C., Eko, D. and Fontem, D.A. 2016. Influence of compost types and fungicide application on plant growth and suppressiveness of cocoyam [*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott] root rot disease. *International Journal of Agriculture and Biosciences* 5(1):32-37.
- Dondjang, J.P. 2010. Projet OIBT/CITES sur la gestion durable de *Pericopsis elata* (Assamela) dans le bassin du Congo. Rapport de l'atelier de formation sur la pépinière et la sylviculture de *Pericopsis elata* tenu a Yokadouma, Est Cameroun, 31p.
- Ejale, A.U. and Abdullah, H.O. 2004. Preservation of ripe tomato fruits with dried leaf powder of neem. *Nigerian Journal of Applied Science* 22:344-370.
- Gonmadje, C.F., Doumenge, C., Sunderland, T.C.H., Balinga, M.P.B. and Sonké, B. 2012. Analyse phytogéographique des forêts d'Afrique Centrale: Le cas du massif de Ngovayang (Cameroun). *Plant Ecology and Evolution* 145(2):152–164.
- Irokanulo, E.O., Egbezien, I.L. and Owa, S.O. 2015. Use of *Moringa oleifera* in the preservation of fresh tomatoes. *Journal of Agriculture and Veterinary Science* 8(2): 127-132.
- Iulia, G.D., Matache, M.L., Tudorache, A., Chisamer, G., Rozylowicz, L. and Radu, G.L. 2012. Food chain bio magnification of heavy metals in samples from the lower prut floodplain natural Park. *Environmental Engineering and Management Journal* 11(1):69-73.
- Kaloma, A., Kitambala, K., Ndjango, N.L., Sinzahera, U. and Paluku, P. 2008. Effet des poudres d'*Eucalyptus citriodora*, de *Cupressus lucitanica* et de *Tagetas*

- minitiflora* dans la conservation du maïs (*Zea mays*) et du haricot (*Phaseolus vulgaris*) dans les conditions de Rethy (République Démocratique du Congo). *Tropicultura* 26(1):24-27.
- Kandhare, A.S. 2014. Seed-borne fungi and their effect on seed health of green gram. *Biosciences Discovery* 5(2):251-255.
- Kausik, M. and Sayan, J. 2015. A review on the effects of heavy metals on the aquatic animal of three different districts of West Bengal. *Journal of Global Biosciences* 4(6):2504-2512.
- Kayombo, M.A., Mutombo, T.J.M., Muka, M.P., Somue, M.A. and Kalambaie, B.M.M. 2015. Effet de la poudre de *Tephrosia vogelii* dans la conservation des graines de Niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp.) en stock contre *Callosobruchus maculatus* à Mbujimayi (RD Congo). *Journal of Animal & Plant Sciences* 25(1): 3827-3835.
- Keuete, K.E., Tsompbeng, N.G., Yaouba, A., Djeugap, F.J. and Serferbe, S.D. 2015. Antifungal potential of some plant extracts against three post-harvest fungal pathogens of avocado (*Persea americana* Mill.) fruits. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development* 2(4): 145-152.
- Loumeto, J., Kami, E., Yoka, J., Mombeki, S., Imbounou, A., Samba, J.L., Ossebi-Mbila, S. and Banzouzi, J.C. 2011. Rapport du Projet OIBT/ CITES/UE «Inventaire de *Pericopsis elata* (Aformosia) dans une forêt de production au Congo en vue de sa gestion durable» République du Congo/ Ministère du Développement Durable de l'Economie Forestière et de l'Environnement. 101pp.
- Murray, B.I. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608.
- Nakamura, Y., Yoshimoto, M., Murata, Y., Shimoishi, Y. and Asai, Y. 2007. Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate. *J. Agric Food Chem* 55:4407-4413.
- Nicolas, J.P. 2003. Plantes médicinales du Nord de Madagascar. Ethnobotanique Antakarana et informations scientifiques. Jardins du Monde. 150pp.
- Nweke, C.N. and Ibiam, O.F.A. 2012. Effect of extracts from leaves, bark and root of *Azadirachta indica* L. on the vegetative growth of *Colletotrichum gloeosporoides*: field soft rot pathogen of soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *Agriculture and Biology Journal of North America* 3(12):481-485.
- Osarumwense, P.O., Okunrobo, L.O. and Uwumarongie-Ilori, E.G. 2013. Phytochemical screening, proximate and elemental analysis of *Citrus sinensis* peels (L.) Osbeck. *J. Appl. Sci. Environ. Manage* 17 (1) : 47-50.
- Rani, P.U. et Devanand, P. 2011. Efficiency of different foliar extracts on grain protection and seed germination in maize. *Research Journal of Seed Science* 4:1-14.
- Robert, A., DeFilipps, Maina, S.L. and Crepin, J. 2004. Medicinal plants of the Guianas. Guyana, Surinam, French Guiana. 449pp.
- Serferbe, S., Tsompbeng, N.G., Yaouba, A., Djeugap, F.J. and Keuete, K.E. 2015. Efficacy of three local plant extracts as seed treatment on the germination, infection and vigour index of two cotton seed varieties from Chad. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 6(2):39-44.
- Shafique, S., Arshad, J., Rukhsana, B. et Shafique, S. 2007. Effect of aqueous leaf extracts of allelopathic trees on germination and seed-borne mycoflora of wheat. *Pakistan Journal of Botany* 39:2619-2624.
- Sung, J.M. and Chiu, C.C. 1995. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Science* 110:45-52.
- Trabi, F.H., Irié, G.M., N'Gaman, K.C.C. and Mohou, C.H.B. 2008. Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sciences & Nature* 5(1):39 - 48.

- Turner, M. 2013. *Les semences*. Editions Quae, Presses Agronomiques de Gembloux. 222pp.
- Vilain, M. 2012. *Méthodes Expérimentales en Agronomie: pratique et analyse (2e Ed.)*. Rue Lavoisier, Paris, France. 419pp.
- Wickens, G.E. 1980. Autres utilisations des espèces ligneuses. In: Les fourrages ligneux en Afrique : Etat actuel des connaissances. H.N. Le Houérou (Éd.), *Colloque sur les fourrages ligneux*, 8-12 Avril 1980, Addis Abeba, Ethiopie. *Centre international pour l'élevage en Afrique*. 174pp.
- Yin, Y., Lou, T., Yan, L., Michailides, T.J. and Ma, Z. 2009. Molecular characterization of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates, collected from peanut fields in China. *Journal of Applied Microbiology* 107(6) :1857–1865.
- Zamble, A., Carpentier, M., Kandoussi, A., Sahpaz, S., Petrault, O., Ouk, T., Hennuyer, N., Fruchart, J.C., Staels, B., Bordet, R., Duriez, P., Bailleul, F. and Nizard, M.F. 2006. *Paullinia pinnata* extracts rich in polyphenols promote vascular relaxation via endothelium-dependent mechanisms. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 47(4): 599-608.
- Zerbo, P., Millogo-Rasolodimby, J., Nacoulma-Ouedraogo, O.G. and Vandamme, P. 2007. Contribution à la connaissance des plantes médicinales utilisées dans les soins infantiles en pays San, au Burkina Faso. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 1(3):262-274.