

Influence de la température et de la nature du substrat sur la production en masse et la conservation de *Beauveria bassiana* B., champignon entomopathogène

Gabriel Ahouansè HEVIEFO^{1,2}, Seth Wolali NYAMADOR², Etienne Dodou DAGBOZOUNKOU¹, Manuele TAMÒ¹, Isabelle Adolé GLITHO²

Résumé

Beauveria bassiana (Balsamo) est un champignon pathogène utilisé dans la gestion des populations d'insectes. En vue de déterminer les conditions de la production de masse de ce champignon pour un rendement optimal, sa croissance radiale et sa production de conidies ont été évaluées à différentes températures et sur différents substrats. Les géloses SDA et PDA, le riz et plusieurs substrats de substitutions (résidus alimentaires) tels que la drêche de bière, le son de riz, de maïs et de soja, les coques de riz et de maïs, les tourteaux de palmiste et de coton ont été expérimentés. Les conditions thermiques utilisées sont : 20, 25, 30 et 35 °C. Les conidies de *B. bassiana* obtenues ont été conservées dans différentes conditions afin de déterminer leur viabilité. Les résultats ont montré que, sur les géloses, le champignon peut se développer à 20, 25 et 30 °C. Par contre, il n'y a pas de développement fongique à 35 °C. La croissance radiale (développement mycélien) a été similaire à 25 °C (5,57 ± 0,44 cm) et 30 °C (5,74 ± 0,46 cm) mais significativement plus faible à 20 °C ($P < 0,0001$). Le rendement est significativement plus important à 25 °C (11,0 ± 2,6)10⁹ conidies / colonie) sur la gélose SDA. Le riz et la coque de maïs sont les seuls substrats de substitution qui ont permis le développement du champignon. Le rendement optimal obtenu sur ces substrats à 7 jours d'incubation est de 5,00 ± 0,39 g de conidies par 250 g (DL = 2 ; F = 0,61 ; $P > 0,56$). Les résultats montrent également que les conidies séchées peuvent garder leur viabilité durant deux mois à la température ambiante (28 ± 2 °C), 18 mois au réfrigérateur (10 °C) et 60 mois au moins au congélateur (-18 °C).

Mots clés : *Beauveria bassiana*, Pathogène, production, conservation, rendement, substrats de substitution

Abstract

Beauveria bassiana (Balsamo) is a pathogenic fungus used in insect population management. In order to determine the conditions of this fungus mass production for optimal yield, its radial growth and conidial production were evaluated at different temperatures and on different substrates. SDA and PDA agars, rice and some food residues like drecche of beer, rice, maize and soybean bran, rice and maize husk, palm kernel and cotton cakes were tested as substitution substrates. The thermal conditions used were: 20, 25, 30 and 35 °C. The conidia of *B. bassiana* obtained were stored under different conditions to determine their viability. The results showed that on agars, the fungus can grow at 20, 25 and 30 °C. However, there is no fungal growth at 35 °C. Radial growth (mycelial development) was similar at 25 °C (5.57 ± 0.44 cm) and 30 °C (5.74 ± 0.46 cm) but significantly lower at 20 °C ($P < 0.0001$). The yield was significantly important at 25 °C (11.0 ± 2.6)10⁹ conidia/colony) on SDA agar. The rice and the maize husk are only the substitution substrates that have allowed fungal development. The optimal yield obtained on these substrates at 7 days of incubation is 5.00 ± 0.39 g of conidia per 250 g (DF = 2; F = 0.61; $P > 0.56$). The results show also that dried conidia can keep its viability during two months at warm temperature (28 ± 2 °C), 18 months in the refrigerator (10 °C) and at least 60 months in the freezer (-18 °C).

Key words: *Beauveria bassiana*, Pathogen, production, conservation, yield, substrates

¹ Institut International d'Agriculture Tropicale, 08 BP 932 Tripostal, Cotonou, Bénin

² Laboratoire d'Entomologie Appliquée, Faculté des Sciences, Université de Lomé, 01 BP 1515 Lomé 1, Togo

INTRODUCTION

Pour accroître les rendements, les producteurs agricoles et en particulier les maraîchers des zones péri-urbaines ont souvent recours aux pesticides de synthèse pour la protection de leurs cultures contre les ravageurs. Si les avantages des pesticides sont indéniables pour l'amélioration des rendements dans la plupart des cas, ils entraînent des effets dommageables à l'homme, à son bétail et à son environnement (Bourguet et Guillemaud, 2016). Par ailleurs, la plupart des insectes ravageurs développent des résistances aux pesticides de synthèse. Selon Salinas (1985), *Plutella xylostella* L., l'un des ravageurs les plus importants du chou serait le premier Lépidoptère à avoir développé une résistance au DDT et à des insecticides biologiques comme les formulations de *Bacillus thuringiensis* (Grzywacz, et al., 2010). Comme l'usage abusif des pesticides de synthèse a entraîné une perturbation de l'écosystème et une baisse drastique de l'efficacité des agents de lutte biologique tels que les prédateurs naturels, les parasites et les parasitoïdes, le recours à la lutte intégrée qui combine toutes les méthodes

de lutte (mécanique, culturale, botanique, biologique et même chimique) est devenu une nécessité pour préserver la biodiversité (Sunderland, 2011). La lutte biologique qui promeut les agents pathogènes tels que les bactéries, les virus, les protozoaires, les nématodes et les champignons microscopiques apparaît comme une meilleure solution alternative en ce sens qu'elle protège à la fois les cultures et l'environnement. Ces dernières années, les champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* M. et *Beauveria bassiana* (Balsamo) ont été proposés comme solution alternative aux pesticides de synthèse par différents chercheurs pour protéger une gamme variée de cultures. *B. bassiana*, agent pathogène de lutte contre les insectes ravageurs (Zhao et al., 2010), présente l'avantage d'être un endophyte colonisant les tissus de la plante-hôte pour lui conférer une résistance aux maladies et une protection contre les insectes phytophages. Plusieurs travaux de recherche au laboratoire et au champ ont démontré la pathogénicité de ce champignon en application directe sur plusieurs espèces. Ainsi, *B. bassiana* a été reconnu virulent sur les charançons qui

détruisent les rhizomes de la canne à sucre (Peña *et al.*, 1995), sur le coléoptère foreur de la tige du café (Rosa *et al.*, 1997), sur les charançons du palmier (Gindin *et al.*, 2006), sur la teigne du chou (Godonou *et al.*, 2009), sur *Helicoverpa armigera*, l'un des ravageurs du cotonnier (Douro-Kpindou *et al.*, 2012) et sur *Maruca vitrata*, le plus important ravageur du niébé (Toffa *et al.*, 2014). Au cours des deux dernières décennies, des chercheurs ont démontré le caractère endophyte de *B. bassiana* dans le contrôle des populations de ravageurs et des maladies des plantes (Azevedo *et al.*, 2000 ; Gomez-Vidal *et al.*, 2006 ; Ownley *et al.*, 2008 ; Ownley et Gwinn, 2010). Ainsi, Lewis (1996) et Wagner et Lewis (2000) ont démontré l'efficacité de l'incorporation de *B. bassiana* dans le plant du maïs pour lutter contre le foreur européen *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Ce champignon a été également établi comme endophyte dans les plants de jute, *Corchorus olitorius* (Biswas *et al.*, 2012), de coton, *Gossypium hirsutum* (Lopez *et al.*, 2014) et du chou, *Brassica oleracea* (Heviefó *et al.*, 2017). Un des freins actuels à l'utilisation de cet agent biologique est son indisponibilité sur le marché. C'est pourquoi l'objectif final de cette étude est de déterminer les paramètres biotiques et abiotiques qui permettront une production en masse et une conservation de *B. bassiana*. Plus spécifiquement, il s'agit d'identifier les températures et les substrats de substitution pour le rendement optimal de la production du champignon de même que les conditions de conservation des conidies.

I- MATERIEL ET METHODES

1- Matériel

Le matériel utilisé est essentiellement composé :

- du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana*, souche Bb11 (5653) isolée de *Sesamia calamistis* (Lepidoptera, Noctuidae) et conservée dans la collection des microorganismes de l'Institut International d'Agriculture Tropical (IITA), station du Bénin. Cette souche a été utilisée dans un premier temps pour infester les larves de *Plutella xylostella* L. élevées au laboratoire. Les larves mortes ont été incubées pour l'obtention d'une sous culture pure et virulente du champignon;
- des milieux gélosés Sabouraud Dextrose Agar (SDA) et Potato Dextrose Agar (PDA) obtenus au centre de l'IITA-Ibadan (Nigéria) ;
- du riz consommable à longs grains acheté sur le grand marché de Cotonou (Bénin) ;
- des substrats de substitution tels que la coque et le son du maïs, la coque et le son du riz, la drêche de bière, les tourteaux de coton et de palmiste et le son du soja. Ces substrats ont été acquis auprès des transformateurs et sur les marchés locaux.

Les expérimentations se sont déroulées dans le laboratoire de l'IITA-Bénin.

2- Méthodes

2.1- Effet de la température sur la croissance radiale et le rendement de *B. bassiana* sur gélose

La croissance radiale de *B. bassiana* a été étudiée sur deux milieux gélosés SDA et PDA à différentes températures : 20 °C, 25 °C, 30 °C et 35 °C. Le milieu de culture est constitué de 5 ml d'Agar SDA ou PDA placés dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre. Après deux jours d'incubation, des touffes de mycélium prélevées à l'aide d'un tube de 0,7 mm sont déposées au centre d'autres boîtes de Pétri contenant le même type d'Agar. Vingt (20) boîtes sontensemencées par type d'Agar et par température, soit un total de 160 boîtes. Une fois par semaine, cinq boîtes de chaque condition sont prises au hasard pour mesurer le diamètre (cm) de la colonie formée et le rendement (nombre de spores ou conidies). Pour déterminer le rendement, la surface de la colonie a été raclée à l'aide d'une spatule pour récupérer les spores. Ces spores ont été dissoutes dans 10 à 20 ml d'eau stérilisée mélangée au détergent Tween80 dans une petite bouteille universelle de 25 ml de capacité. Après avoir homogénéisé la solution, une goutte a été déposée sur chacune des deux côtés de la face de l'hématimètre et le comptage des conidies est fait au microscope photonique (X400) pour la détermination de la concentration de la solution provenant de la colonie.

L'hématimètre comporte deux compartiments de 25 carreaux chacun et le comptage se fait dans cinq carreaux en diagonal (Figure 1) de chaque côté. La capacité de l'hématimètre est de 10^{-4} ml de solution répandue sur les 25 carreaux. Le calcul de la concentration a été fait selon la formule suivante : $C = \frac{5 \cdot (X_1 + X_2) \cdot 10^4}{2} \cdot x 10^d$

où x_1 = somme des spores (conidies) comptées dans les cinq carreaux du premier côté,

x_2 = somme des spores du deuxième côté

C = concentration finale de la solution (nombre de spores par ml de la solution),

2 = moyenne de comptage des deux faces sur 5 carreaux

5 = facteur d'extrapolation sur les 25 carreaux, d'où le facteur 10^4

d = facteur de dilution (nombre de fois que la solution a été diluée).

La détermination du nombre de spores (N_f) par colonie fongique est faite par la formule suivante :

$$N_f = C \times V$$

où V = volume initial de la solution mère qui a été diluée.

Le nombre de spores (N_{sp}) ou conidies par gramme de poudre de *B. bassiana* est déterminé par la formule :

$$N_{sp} = \frac{N_f}{m}$$

où m est la masse (g) de poudre de spores introduite dans l'eau du départ.

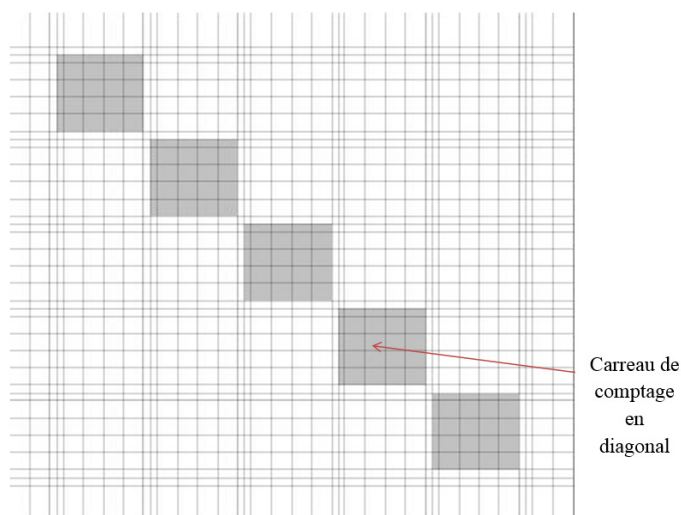


Figure 1 : Dispositif de comptage sur l'hématimètre (LuBiLoSa, 1996).

2.2- Effet de la nature du substrat sur la production de *Beauveria bassiana* en milieu solide

Le développement en milieu liquide permet d'obtenir une biomasse importante pouvant rapidement coloniser les substrats. Le champignon a d'abord été produit en milieu liquide composé de 20 g de sucre et 20 g de levure séchée de brasserie et 1 litre d'eau sur l'agitateur rotatif à 150 tours/mn pendant trois jours selon la méthode de Jenkins *et al.* (1998). Ce milieu est ensuite utilisé pour évaluer l'effet des différents substrats sur le rendement du champignon.

2.2.1- Production de *Beauveria bassiana* sur le riz

Afin d'éliminer la poussière, le riz a été lavé avant utilisation. Quarante-huit (48) sachets de 500 g de riz lavé ont été stérilisés à l'autoclave à 121 °C et 1,05 bar pendant 45 mn (CABI-CMI, 1983). Le milieu liquide de *B. bassiana* précédemment produit a été versé dans chaque sachet à raison de 75 ml de bouillon par 500 g de riz et l'ensemble est mélangé soigneusement pour obtenir une distribution équitable de l'inoculum. Une humidité relative de $30 \pm 2\%$ a été déterminée, selon la méthode de Heviefio *et al.* (2000), dans le riz ainsi traité. Le sachet contenant le riz ainsi traité est déposé dans une bassine plastique (25 cm de petite base, 36,5 cm de grande base et 19,5 cm de hauteur) perforée de quatre trous. La bassine étant bien fermée, les trous sont bouchés avec les éponges en mousse pour filtrer l'air, faciliter l'aération et l'échange gazeux entre la culture et l'extérieur. L'incubation a eu lieu à une température moyenne de 25 ± 2 °C au laboratoire. Les traitements ont consisté en une variation des durées d'incubation de 6, 7, 8 et 10 jours avec 12 répétitions par traitement. A la fin de l'incubation, la bassine est ouverte pour arrêter le développement et la culture est séchée à l'air ambiant du laboratoire pendant deux semaines avant de tamiser la culture avec le tamis manuel à mailles fines de 106 µm et à couvercle hermétique. La poudre de spores issue du tamisage est séchée jusqu'à 5% d'humidité relative au dessiccateur avant les pesées de chaque poudre par répétition. Le nombre de spores ou conidies par gramme de poudre de *B. bassiana* a été déterminé selon la méthode décrite ci-dessus (Paragraphe 2.1).

2.2.2- Production de *Beauveria bassiana* sur les substrats de substitution

Des substrats de substitution non comestibles disponibles ont été utilisés pour la production en masse du champignon. Ces substrats sont : la drêche de bière, le son de riz, de maïs et de soja, les coques de riz et de maïs, les tourteaux de palmiste et de coton. Le riz a été utilisé comme témoin dans ces essais. Compte tenu de l'indisponibilité des substrats de substitution en quantité suffisante, 250 g de chaque substrat ont été utilisés pour le développement du champignon avec dix répétitions par traitement. Dans l'espoir du bon développement du champignon, tous les substrats ont été traités avec le réajustement de leur teneur en eau (32%) et ils ont été stérilisés comme le riz avant leur inoculation avec le milieu liquide suivie de leur incubation.

2.3- Effet des conditions de conservation sur la viabilité des spores de *Beauveria bassiana*

L'objectif de cette étude est le suivi de la viabilité des spores en conservation afin de déterminer la durée de conservation au bout de laquelle les spores peuvent rester viables dans chaque milieu. Ceci permet aux paysans de connaître les possibilités de conservation du champignon selon leur moyen en vue de l'application en cas de besoin. La poudre de conidies de *B. bassiana* produit sur le riz a été emballée par lot de 3 g dans de petits sachets en aluminium à trois couches (polyéthylène-aluminium- polyéthylène). Les sachets contenant les spores ont été conservés dans différentes conditions : le congélateur (-18 °C), le réfrigérateur (10 °C), l'étuve (30 °C), la chambre (28 ± 2 °C) et sous le manguier, *Mangifera indica* L. (29 ± 3 °C). A chaque période de suivi de la viabilité des spores, trois sachets ont été pris au hasard dans chaque endroit de conservation pour le test de germination (viabilité) des spores. A son ouverture, la poudre est dissoute dans l'eau de tween stérilisée (une pincée dans 10 ml) puis, trois à quatre gouttes de solution ont été déposées à la surface de l'Agar SDA contenu dans une boîte de Pétri (5 cm de diamètre). Cette culture est incubée à 28 ± 2 °C pendant 24 h et les spores germées ou non sont comptées au microscope (X400). Une fois par mois, les tests de suivi des viabilités ont été réalisés. Néanmoins, après six mois, le suivi a été trimestriel pour les sachets de spores conservés au congélateur ou au réfrigérateur. Les viabilités (taux de germination, Tg) ont été connues par la formule suivante : $Tg = \frac{a}{a+b} \times 100$

où a = nombre de spores germées

b = nombre de spores non germées.

La spore germée est celle qui a émis le bourgeon ou le tube germinatif (Oliveira *et al.*, 2015). L'évolution de la viabilité des spores a été suivie en fonction du temps variable suivant les conditions dans lesquelles elles ont été gardées. Les spores ayant presque perdu leur viabilité à l'étuve, en chambre et sous l'arbre, le suivi des viabilités a continué seulement avec les spores conservées au réfrigérateur et au congélateur.

2.3- Analyses statistiques des résultats

Les différentes données obtenues ont été soumises à l'analyse de variance SAS software, version 9.2 (2013). Les croissances radiales de *B. bassiana* ont été comparées par ANOVA et T-test. Dans les cas de valeurs significatives *F*, les moyennes ont été séparées en utilisant Student Newman Keuls (SNK) au seuil de 5% de probabilité. Pour stabiliser la variance, les données (en puissance) des rendements de la croissance radiale de *B. bassiana* ont été transformées en logarithme décimal à base 10 avant de procéder aux analyses. Toutefois, le chiffre 1 a été ajouté à chaque valeur *x* pour éviter d'avoir le logarithme de zéro, soit $\text{Log}_{10}(x+1)$. Les données sur la viabilité du champignon ont été transformées en Arc sinus de racine carrée des pourcentages pour la stabilisation des variances.

II- RESULTATS

1- Effet de la température sur la croissance radiale et le rendement de *B. bassiana* sur gélose

B. bassiana ne s'est développé à 35 °C ni sur SDA, ni sur PDA ; il n'y pas eu de croissance et le mycélium déposé au centre de l'Agar est resté intact, sans changement. Aux autres températures, ce champignon a poussé progressivement en cercles aux diamètres variant, selon la température et le temps d'incubation, aussi bien sur le milieu gélosé SDA que sur PDA (Tableau 1).

Tableau 1 : Croissance radiale (diamètre de colonie en cm) de *B. bassiana* à différentes températures

Température (°C)	Gélose	Temps d'incubation (jour)		
		Jour 7	Jour 14	Jour 21
20	PDA	1,46 ± 0,06b	2,51 ± 0,09b	3,55 ± 0,07b
	SDA	1,73 ± 0,06b	2,73 ± 0,13b	3,61 ± 0,21b
25	PDA	1,51 ± 0,11b	3,42 ± 0,20a	3,59 ± 0,33b
	SDA	2,45 ± 0,14a	4,01 ± 0,32a	5,57 ± 0,44a
30	PDA	2,32 ± 0,05a	3,56 ± 0,23a	5,63 ± 0,18a
	SDA	2,32 ± 0,11a	4,13 ± 0,31a	5,74 ± 0,46a

Les moyennes suivies de mêmes lettre(s) dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (Analyse de Variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

Les hyphes de *B. bassiana* croissent régulièrement en progressant sur la gélose durant l'incubation. Ainsi, leur diamètre de croissance augmente en fonction de la durée d'incubation. Le mycélium de ce champignon se développe significativement plus sur les géloses SDA et PDA à 25 °C et 30 °C qu'à 20 °C ($P < 0,05$). Le mycélium incubé se développe sans différences significatives à 25 °C et à 30 °C sur PDA et SDA ($P > 0,05$).

A chaque contrôle des cultures durant l'incubation (7 jours, 14 jours ou 21 jours), le rendement en conidies est toujours plus faible à 30 °C qu'à 20 et 25 °C tant sur PDA que sur SDA (Figures 2A et 2B) ; alors qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les diamètres mycéliens des colonies à 30 °C et 25 °C au seuil de $P > 0,05$. Le mycélium croît bien à 30 °C, mais produit peu de spores. Sur SDA à 25 °C, les rendements significatifs ($P < 0,0001$) sont $1,1 \times 10^9$ conidies à 7 jours, $2,1 \times 10^9$ conidies à 14 jours et $1,1 \times 10^{10}$ conidies à 21 jours par rapport ceux du PDA ($5,1 \times 10^8$ conidies à 7 jours, $1,7 \times 10^9$ conidies à 14 jours et 3×10^9 conidies à 21 jours). Ces rendements sont également très significatifs ($P < 0,0001$) par rapport à ceux obtenus à 20 °C et 30 °C tant sur SDA que sur PDA durant toutes les périodes d'incubation. Alors, la température de 25 °C serait plus favorable au développement de *B. bassiana*.

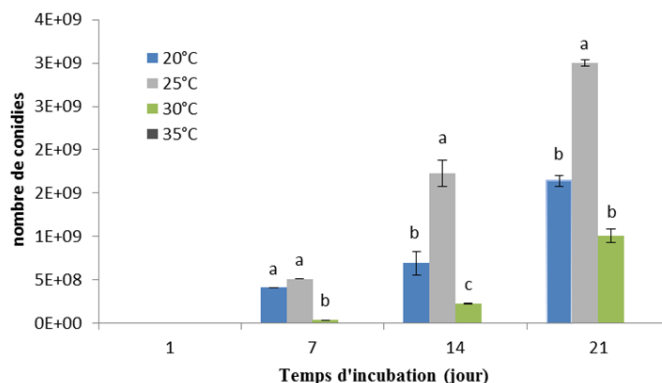


Figure 2A : Rendement de la croissance de *B. bassiana* à différentes températures sur PDA

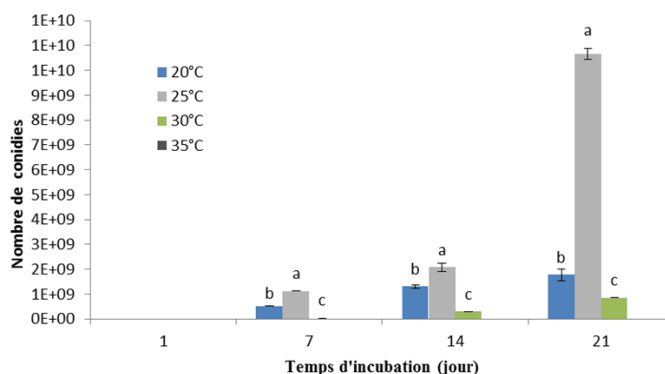


Figure 2B : Rendement de la croissance de *B. bassiana* à différentes températures sur SDA

2- Effet de la nature du substrat sur la production de *Beauveria bassiana* en milieu solide

2.1- Production de *B. bassiana* sur le riz

Cultivé sur le riz lavé, *B. bassiana* a colonisé les grains de riz donnant une sporulation à l'intérieur et à la surface de la

culture (Figure 3).



Figure 3 : Développement de *B. bassiana* sur le riz.

A : riz non recouvert de *B. bassiana*, B : riz recouvert de *B. bassiana*

Les quantités de poudre de spores obtenues ont varié en fonction du temps d'incubation de la culture (Figure 4). Ainsi, ces rendements ont varié de $6,27 \pm 0,17$ g à $10,01 \pm 0,37$ g par 500 g de riz. La plus faible quantité de poudre a été obtenue au dixième jour d'incubation tandis que la plus forte quantité a été obtenue au septième jour et ces différences ont été significatives ($DL = 3$; $F = 24,73$; $P < 0,0001$). Plus le temps d'incubation de la culture est prolongé au-delà de sept jours, plus la quantité de poudre de spores diminue (Figure 4).

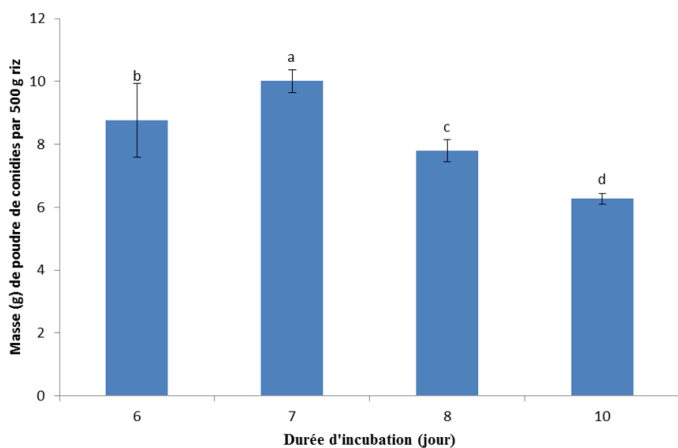


Figure 4 : Quantités de *B. bassiana* obtenues en fonction du temps d'incubation à 25 °C sur le riz

Après le séchage des spores de *B. bassiana*, les tests d'évaluation conduits pour déterminer le nombre de conidies par gramme de poudre pure ont donné une valeur moyenne de $(1,05 \pm 0,03) \times 10^{11}$ conidies ou spores.

2.2- Production sur les substrats de substitution

Le champignon *B. bassiana* n'a pas eu de développement sur les substrats tels que la drêche de bière, le son du maïs et du riz, les tourteaux de palmiste et de coton ou la coque du riz. Toutefois, son développement sur le son de soja a été superficiel sans aucune possibilité de recueillir sa poudre. Par contre, ce champignon s'est bien développé sur la coque de maïs avec un rendement moyen de $5,65 \pm 0,33$ g par 250 g comme le riz où le rendement a été $5,00 \pm 0,39$ g par 250 g (Tableau 2). Aucune différence significative ($DL = 2$; $F = 0,61$; $P < 0,56$) n'a été notée entre les rendements de la production sur ces deux substrats.

Tableau 2 : Masse (g) de poudre de spores séchées obtenue par 250 g de substrat à 25 °C

	Substrat								
	Riz	Coque maïs	Coque riz	Son maïs	Son riz	Son soja	Drêche	Tourteau coton	Tourteau palmiste
Masse (g)	$5,00 \pm 0,39a$	$5,65 \pm 0,33a$	0	0	0	0	0	0	0

Les moyennes suivies de mêmes lettre(s) sur la même ligne ne sont pas significativement différentes (Analyse de Variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

3- Effet des conditions de conservation sur la viabilité des spores de *Beauveria bassiana*

Conservé dans la chambre et à l'étuve, *B. bassiana* commence par perdre significativement sa viabilité après un mois ($P < 0,0003$) contrairement aux autres milieux (sous arbre, réfrigérateur et congélateur) (Tableau 3). Les taux de viabilité de $83,99 \pm 1,93\%$, $85,07 \pm 1,30\%$ et $82,23 \pm 0,53\%$ obtenus respectivement sous arbre, en chambre et à l'étuve en deux mois de conservation sont encore bien appréciables bien qu'ils aient connu une baisse significative ($P < 0,0001$) par rapport aux taux enregistrés au réfrigérateur ($92,31 \pm 0,39\%$) et au congélateur ($92,27 \pm 0,03\%$). Mais, après deux mois de conservation la perte de viabilité des spores s'est accentuée dans la chambre et à l'étuve et les taux de germination ne sont plus que de $26,31 \pm 0,26\%$ et $18,59 \pm 0,37\%$ respectivement après cinq mois de conservation. Après cette durée de cinq mois de conservation sous l'arbre, $55,02 \pm 2,09\%$ des spores sont encore viables alors qu'au réfrigérateur et au congélateur ces spores ont conservé leur viabilité ($89,56 \pm 0,07\%$ et $90,69 \pm 0,24\%$ respectivement).

Tableau 3 : Viabilités des spores en conservation à court terme dans différents endroits

Lieu	Début	Durée de conservation				
		1 ^{er} mois	2 ^{ème} mois	3 ^{ème} mois	4 ^{ème} mois	5 ^{ème} mois
Congélateur	$96,44 \pm 0,18$	$94,03 \pm 0,20a$	$92,27 \pm 0,03a$	$91,16 \pm 0,45a$	$90,34 \pm 0,10a$	$90,69 \pm 0,24a$
Réfrigérateur	$96,44 \pm 0,18$	$93,20 \pm 0,17a$	$92,31 \pm 0,39a$	$89,63 \pm 0,47a$	$89,78 \pm 0,43a$	$89,56 \pm 0,07a$
Sous arbre	$96,44 \pm 0,18$	$92,73 \pm 0,87a$	$83,99 \pm 1,93b$	$74,34 \pm 0,91b$	$70,73 \pm 0,64b$	$55,02 \pm 2,09b$
Chambre	$96,44 \pm 0,18$	$86,04 \pm 1,19b$	$85,07 \pm 1,30b$	$55,76 \pm 1,30c$	$46,91 \pm 0,36c$	$26,31 \pm 0,26c$
Etuve	$96,44 \pm 0,18$	$86,55 \pm 0,23b$	$82,23 \pm 0,53b$	$33,45 \pm 0,50d$	$36,45 \pm 1,08d$	$18,59 \pm 0,37d$

Les moyennes suivies de mêmes lettre(s) dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (Analyse de Variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

Au réfrigérateur, les viabilités des spores ont varié entre

96,44 ± 0,18% et 82,30 ± 0,13% en 18 mois avant que les spores ne perdent significativement leur pouvoir germinatif (Figure 5). Par contre, les viabilités des spores conservées au congélateur n'ont pas présenté de variations significatives 96,44 ± 0,18% à 90,69 ± 0,24% durant 60 mois (Figure 5). A chaque test de vérification de la viabilité des spores conservées au congélateur, elles germent et les tubes germinatifs croissent rapidement en donnant les hyphes semblables à ceux des spores nouvellement produites.

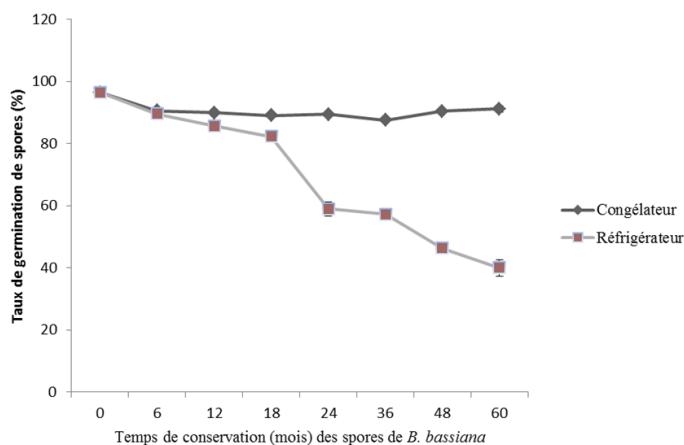


Figure 5 : Conservation à long terme des spores de *B. bassiana* au réfrigérateur et au congélateur

III- DISCUSSION

Les résultats obtenus dans les présents travaux montrent que le champignon *B. bassiana* peut être localement produit et rendu disponible pour les applications en milieu réel. Ces résultats constituent une base qui peut être utilisée pour la production industrielle de *B. bassiana*. En croissance radiale, le mycélium de *B. bassiana* se développe aussi bien à 30 °C qu'à 25 °C mais avec une faible production de spores (rendement) à 30 °C tant sur la gélose SDA que sur celle de PDA. Certes, ce champignon ne s'est pas développé à 35 °C, mais les bons rendements sont obtenus à 25 °C ; donc la température indiquée pour un rendement optimal de *B. bassiana* est de 25 °C. Ces résultats concordent avec ceux des travaux de Jenkins (1995). En cultivant le champignon sur les milieux gélosés, les meilleurs rendements sont obtenus sur SDA. Ceci est probablement dû au fait que SDA est plus riche en sucre que PDA ; car il contient 40 g de dextrose alors que PDA n'en contient que 20 g par litre (CAB-CMI, 1983). Ces résultats sont aussi similaires à ceux obtenus sur le développement du *Metarhizium anisopliae* sur les milieux gélosés tels que Malt Extract Agar, Molish Agar, Potato Carrot Agar, Czapek Dox Agar, Nutrient Agar, etc. (données IITA non publiées). Dès lors, SDA serait une gélose adéquate et plus indiquée pour la production des champignons (Deutéromycètes) tandis que PDA serait utile pour l'isolement de ces champignons de leurs hôtes à cause de leur rendement. Sur la gélose Agar (SDA ou PDA), la croissance excentrique progressive est due à la disponibilité des nutriments dans les portions d'Agar non encore colonisées. Cette disponibilité nutritive est la raison qui explique l'augmentation du rendement de ce champignon en fonction de temps.

Sur le riz, plus la durée d'incubation de ce champignon s'allonge au-delà de 7 jours, plus le rendement baisse. Ceci

serait dû au fait que le mycélium épuise les substances nutritives (carbone et azote) contenues dans le riz lors du développement des spores qui arrivent à maturité au bout de 7 jours (premier cycle) mais surtout que certaines commencent par germer pour donner du mycélium (deuxième cycle), faisant ainsi baisser le nombre de spores produites. L'objectif primordial étant d'avoir une quantité importante de poudre de conidie de *B. bassiana* par Kg de substrat, il est préférable d'arrêter le développement au bout de sept jours. Le rendement maximal de 20 g de spores par Kg du riz est significativement différent de celui de *Metarhizium anisopliae* qui varie de 25 à 35 g/Kg de riz (Jenkins *et al.*, 1998 ; Cherry *et al.*, 1999). Ce rendement de *B. bassiana* serait dû à sa durée d'incubation très courte (7 jours) contrairement à celle de *M. anisopliae* qui peut aller à 13 jours sans amorcer le second cycle de développement. Mais aussi, comme nous avons pu l'observer, *B. bassiana* colonise les grains de riz, les solidifie et les rend compacts, ne permettant plus l'aération à l'intérieur. De ce fait, la sporulation est bonne à la surface de la culture mais faible à l'intérieur du substrat. La poudre de *B. bassiana* obtenue dans nos travaux avec le tamis manuel à mailles fines de 106 µm a donné 10¹¹ conidies par gramme. Ce qui est conforme aux résultats issus du dispositif d'extraction à double cyclones utilisé par Bateman (1994).

Le résultat obtenu sur la coque de maïs est très significatif et intéressant car ce substrat est un résidu alimentaire qui peut être exploité dans la production de *B. bassiana*. La quantité de spores de *B. bassiana* obtenue sur le maïs dépasse celle rapportée par Karanja *et al.* (2008) qui ont recueilli 1,77 g de spores pour 250 g de ce substrat, mais 7,38 g pour 250 g de riz avec 7,75% de contenu en eau des spores. Mais cette coque de maïs est plus légère et 250 g occupent un volume de 1000 ml tandis que 250 g de riz occupent 250 ml ; donc le volume de la coque de maïs fait quatre fois celui du riz. Néanmoins, cette coque de maïs, bien qu'elle ne soit pas toujours disponible, règle le problème d'éthique où le riz, un aliment de base est utilisé pour la production des champignons au lieu des résidus alimentaires. A l'exception de la coque de maïs, les autres substrats de substitution utilisés n'ont pratiquement rien donné. Ce résultat serait dû au fait que ces substrats sont pauvres en nutriments (carbone et azote) comme la drêche de bière qui est exploitée à plusieurs reprises avant d'être rejetée par l'usine.

Les spores de *B. bassiana* ont conservé leurs viabilités pendant deux mois à la température ordinaire (sous l'arbre et dans la chambre). Cependant, conservées à 10 °C au réfrigérateur, les spores sont en vie ralentie durant 18 mois. Mais, les spores conservées à (-18 °C) au congélateur ont leur vie presque totalement bloquée et peuvent rester viables en état dormant pendant 60 mois au moins. La viabilité des spores diminue en fonction du temps suivant les conditions dans lesquelles elles sont gardées ; ceci est confirmé par Sandhu *et al.* (2008). Donc la longévité des spores en conservation dépend de la température. Ce résultat est soutenu par ceux de Hedgecock *et al.* (1995) pour qui les spores perdent également leur viabilité si elles ne sont pas conservées à basses températures. Les basses températures sont alors favorables à la conservation de *B. bassiana* ; ces résultats sont soutenus par Moore et Higgins (1997) et Hong *et al.* (1999). Lors de leur conservation, ces spores subissent sous l'influence de la température, des modifications qui affectent

leur germination. La température et l'humidité relative sont les principales causes de perte de viabilité des spores conservées de différentes manières (stockage en formulations huileuses ou aqueuses, lyophilisation ou dessiccation) comme rapporté par Marques *et al.* (1999), Oliveira *et al.* (2011), et Immediato *et al.* (2018). C'est ce qui expliquerait le fait que les spores de *B. bassiana* conservées sous l'arbre, dans la chambre et à l'étuve ont significativement perdu de viabilité. Ce résultat est confirmé par ceux de Moore *et al.* (1995). La couche et le type du sachet de conservation jouent également un rôle très important en ce sens qu'ils limitent l'échange entre les spores et l'extérieur. Ces résultats démontrent aux agriculteurs qu'ils peuvent se procurer des spores de *B. bassiana* et les garder pour les appliquer lorsque cela devient nécessaire. Cependant, il convient d'évaluer le taux de germination des spores en conservation avant leur utilisation pour éviter d'utiliser les spores de faible viabilité car l'efficacité du champignon entomopathogène est subordonnée à son taux de germination (viabilité). C'est ce que signalent Lopes *et al.* (2013) qui rapportent que la virulence des spores de faible viabilité sur le lépidoptère *Diatraea saccharalis* et l'hyménoptère *Solenopsis saevissima* décroît par rapport à celle des spores qui ont bien germé. Toutefois, si le taux de germination a significativement baissé, la dose de spores (concentration) peut être réajustée en conséquence avant l'application. Toutefois, si le pourcentage de germination est inférieur à 70%, les spores ne peuvent pas être utilisées (LuBiLoSa, 1996).

CONCLUSION

Ces différents résultats obtenus montrent que *B. bassiana* se développe aussi bien sur les milieux gélosés que sur certains substrats de substitution. La température la plus favorable au développement de ce champignon est 25 ± 1 °C. L'Agar SDA est plus adéquat pour le développement mycélien et la production des spores de *B. bassiana* tandis que le PDA est bon pour l'isolement de *B. bassiana* de son hôte. Seuls le riz et la coque de maïs ont permis d'obtenir de bons rendements lors de la production des spores de ce champignon. La durée d'incubation de *B. bassiana* pour un rendement optimal est de sept jours. Un gramme de poudre pure de *B. bassiana* contient environ 10^{11} conidies ou spores et cette information constitue une base permettant le réajustement des doses d'application de ce champignon dans les cultures. La poudre de *B. bassiana* peut être conservée viable durant deux mois à la température ordinaire, 18 mois à 10 °C au réfrigérateur et 60 mois au moins au congélateur. Plus la température de conservation est basse, plus la longévité des conidies est élevée.

REFERENCES

- Azevedo J.L., Maccheroni W.J., Pereira J.O., de Araújo W.L. 2000. Endophytic microorganisms : a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Biotechnology* 3 : 40-65
- Bateman, R.P. 1994. An analysis of particle size spectra of myco-insecticide conidial products for ULV application. *27th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Montpellier, France*
- Bourguet D., Guillemaud T. 2016. The hidden and external cost of pesticide use. In Lichtfouse E. Sustainable Agriculture Reviews. *International publishing Switzerland* Vol. 19: 35-120.
- Biswas C., Dey P., Satpathy S., Satya P. 2012. Establishment of fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute (*Corchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker. *BioControl* 57: 565-571
- CAB-CMI, Commonwealth Agricultural Bureaux - Commonwealth Mycological Institute 1983. Plant Pathologist's Pocketbook, 2nd Edition, 439p.
- Cherry A., Jenkins N., Hevief G., Bateman R.P., Lomer C. 1999. A West African pilot scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* sp for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology* 9 : 35 - 51.
- Douro-Kpindou O.K., Djegui A.D., Glitho- Adolé I., Tamò M. 2012. Sensibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in laboratory. *Agricultural and Biological Science* 7, 12: 1007-1015
- Gindin G., Levski S., Soroker V. 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Entomology, Phytoparasitica* 34 (4): 370-379
- Godonou I., James B., Atcha-Ahowe C., Vodouhè S., Kooyman C., Ahanchédé A., Korie S. 2009. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop protection* 28: 220-224
- Gomez-Vidal S., Lopez-Llorca L.V., Jansson H.B., Salinas J. 2006. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron* 37: 624-632
- Grzywacz D., Rossbach A., Raul A., Russell D.A., Srinivasan R., Shelton A.M. 2010. Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassicas in Asia and Africa. *Crop Protection* 29: 68-79
- Hedgecock S., Moore D., Higgins P.M., Prior C. 1995. Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulation. *Biocontrol Science and Technology* 5, 371 - 377.
- Hong T.D., Jenkins N.E., Ellis R.H. 1999. Fluctuating temperature and the longevity of conidia of

28 August - 2 September, 1994.

- Metarhizium flavoviride* in storage. *Biocontrol Science & Technology* **9**, 165-176
- Heviefio A.G., Jenkins N.E., Langewald J., Lomer C.J. et Cherry A.J.** 2000. Méthode pour la production de conidies aériennes de champignons entomopathogènes. *Pesticides au Sahel*, 95-105.
- Heviefio A.G., Nyamador S.W., Glitho I.A., Tamo M.** 2017. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as endophyte in cabbage plant for disease and lepidopteran larvae pest control. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin (BRAB). Numéro Spécial Développement Agricole Durable (DAD)- Décembre 2017*, 1 – 12.
- Immediato D., Latta L., Camarda A., Glangaspero A., Capelli G., Figueredo L.A. Otranto D., Cafarchia C.** 2018. Storage of *Beauveria bassiana* conidia suspension: A study exploring the potential effects on conidia viability and virulence against *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 Acari: Dermanyssidae. *Annals of Biological Sciences* (<http://www.imedpub.com/annals-of-biological-sciences/>)
- Jenkins N.** 1995. Studies on the mass production and field efficacy of *Metarhizium flavoviride* for the biological control of locusts and grasshoppers. *Ph.D. thesis*, Cranfield University. 202p
- Jenkins N.E., Heviefio G., Langewald J., Cherry A.J., Lomer C.J.** 1998. Development of a mass production technology for aerial conidia of mitosporic fungi for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information* **19**: 21-31.
- Karanja LW., Phiri NA., Oduor GI.** 2008. Effects of different solid substrates on mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* entomopathogens. *CABI Africa, ICRAF Complex*, PO Box 633-00621, Nairobi, Kenya, Pg 789-797.
- Lewis C.** 1996. Use of *Beauveria bassiana* as an endophyte of corn for control of the European corn borer. *IOBC wprs Bulletin* Vol. 19(8), 121.
- Lopes R.B., Martins I., Souza D.A., Faria M.** 2013. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Invertebrate pathology* **112**, 236-242
- Lopez D.C., Zhu-Salzman K., EK-Ramos M.J., Sword G.A.** 2014. The entomopathogenic Fungal Endophytes *Purpureocillium lilacinum* (Formerly *Paecilomyces Lilacinus*) and *Beauveria bassiana* Negatively Affect Cotton Aphid Reproduction under Both Greenhouse and Field conditions. *PLOS one* **9**: 1-8
- LUBILOSA** 1996. Laboratory techniques in insect pathology; Technical bulletin No3. *International Institute of Tropical Agriculture*, station of Benin, Cotonou, 40 p
- Marques E.J., Alves S.B., Marques I.M.R.** 1999. Effects of the temperature and storage on formulations with mycelia of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. *Brazilian Archives of biology and Technology* **42**:1-6
- Moore D., Bateman, R.P., Carey, M. and Prior, C.** 1995. Long term storage of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology* **5**, 193 - 199.
- Moore D. and Higgins P.M.** 1997. Viability of stored conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal, produced under differing culture regimes and stored with clays. *Biocontrol Science and Technology* **7** (3) 335 - 344.
- Oliveira I., Pereira J.A., Bento A., Baptista P.** 2011. Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. *Annals of Microbiology* **61**:339-344
- Oliveira P.G.D., Pauli G., Mascarin M.G., Delalibera I.** 2015. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Microbiological Methods* **119**:44-52
- Ownley B.H., Griffin M.R., Klingeman W.E., Gwinn K.D., Moulton J.K., Pereira R.M.** 2008. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* **98**: 267-270
- Ownley B.H., Gwinn K.D.** 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* **55**: 113 – 128
- Peña J.E., Gilbin-Davis R.M., Ducan R.** 1995. Impact of indigenous *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on banana weevil and rotten sugarcane weevil (Coleoptera: Curculionidae) populations in banana in Florida. *J. Agric. Entomol.* **12**(23): 163-167.
- Rosa W., Alatorre R., Trujillo J., Barrera J.F.** 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae). *Economic entomology* **90**: 1534 - 1538
- Salinas P.J.** 1985. Studies on Diamondback Moth in Venezuela with reference to other Latin-American countries. *Proceedings of the first international workshop* 11-15 March 1985, Tainan, Taiwan : 17-24
- Sandhu S.S., Rajak R.C., Agarwal G.P.** 2008. Studies on prolonged storage of *Beauveria bassiana* conidia: Effects of temperature and relative humidity on conidia viability and virulence against Chickpea Borer, *Helicoverpa armigera*. *Biocontrol Science*

and Technology, 17 sept. 2008 pg47-53.

Sunderland T.C.H. 2011. Food Security: why is biodiversity Important? *International Forestry Review* 13: 265-274

Toffa M.J., Atachi P., Douro K.O. K., Tamo M. 2014. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on larvae of the legume pod borer *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Agricultural and Biological Science* 9 (2): 55-64.

Wagner B.L., Lewis L.C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 1-7

Zhao L., Zhongren L., Baozhen H., Haihong W. and Tong-Xian L. 2010. Germination behaviour of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) nymphs. *Entomological Science* 45:322-334