

AFPP – 3<sup>ème</sup> CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS  
DE PROTECTION DES CULTURES  
LILLE – 13, 14 ET 15 MARS 2006

**LA SELECTION DES ANTAGONISTES DE *PENICILLIUM EXPANSUM* ET DE  
*BOTRYTIS CINEREA*, DEUX PARASITES DE POST-RECOLTE DES POMMES.**

E.H. ACHBANI <sup>(1)</sup>, R. MOUNIR <sup>(1)</sup>, S. JAAFARI <sup>(2)</sup>, A. DOUIRA, A <sup>(3)</sup>. BENBOUAZZA <sup>(1)</sup>,  
H. JIJAKLI <sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup> LABORATOIRE DE PHYTOBACTERIOLOGIE, INRA MEKNES, BP 579 MEKNES  
VN, MAROC, ACHBANI5@YAHOO.FR

<sup>(2)</sup> LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE ET AMELIORATION DES PLANTES (UMI-  
BAP), UNIVERSITE MOULAY ISMAIL, BP 4010, MEKNES, S.JAAFARI@MENA.MA

<sup>(3)</sup> LABORATOIRE DE BIOLOGIE ET DE PROTECTION DES CULTURES,  
UNIVERSIRE IBN TOFAIL, FACULTE DES SCIOENCES ; BP : 133, 14000 KENITRA,  
MAROC

<sup>(4)</sup> UNITE DE PHYTOPATHOLOGIE, FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES  
AGRONOMIQUES, PASSAGE DES DEPORTES, 2, B-5030 GEMBLoux BELGIQUE,  
JIJAKLI @FUSAGX.AC.BE

**RÉSUMÉ :**

Des isollements sur la surface des pommes (var G.Delicious) ont abouti à l'obtention de bactéries, de levures et de champignons (33 au total), dont six de ces microorganismes identifiés en tant que *Aureobasidium pullulans* ont manifesté sur pomme un haut pouvoir antagoniste à 25°C, contre deux parasites de post-récolte : *Penicillium expansum* et/ou *Botrytis cinerea*. Les isolats Ach1-1, Ach2-1, Ach2-2, 1112-3, 1113-10 et 1113-5 ont manifesté un taux de protection dépassant les 80% vis-à-vis de *P. expansum* à 5 jours après confrontation. Le taux de protection le plus élevé est noté chez l'isolat Ach2-1 avec 96%. Sur *Botrytis*, Le taux de protection offert par Ach2-1 et Ach2-2, est respectivement de 100% et 96% à 6 jours d'incubation. A 5°C, ces isolats gardent leur pouvoir antagoniste élevé dépassant les 82%. Les antagonistes Ach1-1 et 1113-5 ont été retenus pour la suite du programme.

Mots-clés : antagonistes, post récolte, pomme, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*.

**SUMMARY :**

**SELECTION OF ANTAGONISTS AGAINST *PENICILLIUM EXPANSUM* AND  
*BOTRYTIS CINEREA*, TWO POSTHARVEST APPLE PARASITES**

Potential antagonistic micro-organisms (33 isolates) belonging to yeast, bacteria and fungi have been isolated from apple surface. Six of them (All strains Ach1-1, Ach2-1, Ach2-2, 1112-3, 1113-10 and 1113-5 belonging to *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud) showed a high level of protection (more than 80%) at 25°C, against *P. expansum* and/or *B. cinerea* for 5 days. The highest level of protection against *P. expansum* (96%) was observed with the application of Ach 2-1. Six days after inoculation of *B. cinerea*, strains Ach 2-2 and Ach 2-1 insured 100% and 96 % of protection, respectively. At lower temperature (5°C), Percentages of protection observed after apple treatment with these antagonistic strains were ranged from 82% to 94% 20 days after *P. expansum* inoculation. Strain Ach1-1 and 1113-5 were retained as the best antagonists for the subsequent studies.

Key-words : antagonists, post harvest, apple, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*.

## INTRODUCTION

Le Maroc contribue à raison de 30% de la production des pommes en Afrique, ce qui le place en seconde position après l'Afrique du Sud. 32% de cette superficie exploitée (soit environ 9000 ha) se situent dans la région de Mekhènes et ses environs, avec une capacité frigorifique de 45 000 tonnes.

La part de la production de pommes entreposées dans les frigos subit malheureusement des détériorations suite aux problèmes phytosanitaires. Les pertes peuvent atteindre 60% et sont occasionnées essentiellement par des maladies d'origine fongiques tels que *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Fusarium avenaceum*. L'incidence de chacun de ces parasites reste à déterminer, même s'il semble que *B. cinerea* et *P. expansum*, deux parasites de blessures, soient à l'origine de beaucoup de contaminations observées sur fruits (Bondoux P., 1992). Ces pertes, économiquement importantes, agissent sur le prix de vente de la pomme, devenant souvent supérieures au pouvoir d'achat d'une grande majorité des couches sociales. Les méthodes de lutttes utilisées contres ces parasites sont principalement de nature chimique, les fongicides les plus utilisés appartenant à la famille des benzimidazoles. L'usage de ces fongicides a engendré l'apparition de souches pathogènes résistantes. Par ailleurs, la plupart des pays importateurs de fruits, et plus particulièrement les pays européens ont adopté des législations très strictes vis-à-vis de l'emploi des pesticides. Ainsi, l'utilisation de certains produits est déjà limitée. La vinchlozoline ne peut plus être utilisée sur pommier et poirier que pendant la période de floraison pour combattre la pourriture de la mouche (*B. cinerea*). Le captane est interdit en Allemagne et en Hollande pour des problèmes d'éco-toxicologie. Dans d'autres pays européens, la période entre la dernière application de cette matière active et la récolte a été allongée. Dans un avenir proche, certains produits efficaces (benzimidazoles) ne seront plus autorisés. Ces mesures s'accompagnent d'une réduction des limites maximales de résidus tolérées sur les fruits.

Aussi, la recherche d'une alternative de lutte permettant, d'une part, de réduire les dégâts dus aux maladies de post-récolte et, d'autre part, de répondre aux contraintes imposées par le marché international, est-elle devenue une des priorités de ce secteur. Parmi les méthodes de lutttes alternatives, une attention considérable a été portée sur la lutte biologique (Roberts, 1990 ; Wilson et Wisniewski, 1992 ; Bull *et al.*, 1997 ; Chand-Goyal et Spotts, 1997 ; El Ghaouth *et al.*, 1998). Les résultats obtenus durant les dix dernières années dans ce domaine ont montré qu'elle peut constituer une alternative intéressante à la lutte chimique. Ainsi, plusieurs antagonistes ont été identifiés contre les principales maladies de post-récolte des fruits et légumes telles que les souches appartenant aux espèces de *Bacillus subtilis* et de *Pseudomonas syringae* (bactéries), aux espèces de *Pichia anomala*, *P. guilliermondii*, *Candida oleophila*, *Cryptococcus laurentii* (levures). Enfin, deux biopesticides ont été autorisés en post-récolte sur pommes et poires : Aspire™ (à base d'une souche de levure et commercialisé par Ecogen) et Bio-Save 110™ (à base d'une souche de bactérie et vendu par Ecoscience) homologués aux EU.

Le développement de lutte biologique vis-à-vis des maladies de conservation des pommes passe par la réalisation tout d'abord de la sélection des antagonistes des deux principaux parasites des pommes au Maroc, *B. cinerea* et *P. expansum*. Ainsi, les objectifs assignés à ce travail sont la sélection *in vivo* des antagonistes des deux pathogènes des pommes à la température de 25°C et à 10°C et enfin l'identification des microorganismes antagonistes retenus.

## MATERIEL ET METHODE

### SELECTION *IN VIVO* DES ANTAGONISTES DES MALADIES DE POST-RECOLTE DES POMMES

La technique de sélection des antagonistes de Jijakli M.H. (1996) est utilisée vis-à-vis des deux principaux pathogènes sur pommes, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. Le même protocole est pratiqué dans tous les essais de sélection réalisés, avec toutefois de légères modifications qui ont touché, en effet, le diamètre de la blessure et la quantité de la suspension par blessure qui sont respectivement soit 6 ou 8mm et 50 ou 70  $\mu$ l.

#### Isolement des microorganismes :

La sélection se fait en plusieurs étapes :

- i) Extraction des microorganismes (levures, bactéries, champignons) à partir de la surface des pommes : à partir des différents lots de pomme (G. Delicious) achetés sur le marché, 4 pommes de chacun sont introduites dans un sac de toppits de 3000ml contenant 1000ml d'eau de lavage (KPNT), il faut par précaution mettre les sacs dans deux autres sacs pour éviter l'endommagement du sac contenant de l'eau de lavage. L'ensemble est mis à agiter sur un agitateur électrique réglé à 120 tours/min. Après agitation, on prélève 5 ml de chacun (SM = Solution mère) et on procède à une série de dilutions dans des flacons de 15 ml : X5 (2ml de SM ajoutés à 8 ml de tampon KPBT), X10, X50 et X100.
- ii) Ensemencement sur boîtes de pétri avec PDA : cent  $\mu$ l de chaque dilution prélevés à l'aide d'une pipette à embout jetable stérile sont bien étalées sur une boîte avec PDA à l'aide d'un étaloir. Trois répétitions pour chaque dilution sont réalisées. Les boîtes sont ensuite emballées avec du Reynolon puis mises en incubation à 25°C avec le couvercle en bas.
- iii) Lecture des boîtes ensemencées et purification : après 48h d'incubation, les différentes colonies observées sur le milieu sont décrites (taille, couleur, opacité, etc.), codifiées puis repiquées sur PDA en boîtes. Le tout est mis pour incubation à 25°C. Trois repiquages sont effectués pour chaque souche à 24h d'intervalle en vue de ne conserver que des souches pures et actives. La nature de la souche (levure ou bactérie) est déterminée par observation au microscope (GX25 pour levures ou X40 pour bactéries)

#### Sélection des antagonistes issus des eaux de lavage

- i- Préparation des fruits : les pommes de la variété Golden Delicious sont désinfectées par trempage pendant deux minutes dans l'hypochlorite de sodium (10%), puis rinçage deux fois successives dans de l'eau distillée stérile et séchage dans le flux laminaire sur papier. Ensuite, deux blessures par fruit espacées de 4 à 5 cm l'une de l'autre, ayant chacune 6 (ou 8) mm de diamètre et 2 à 3 mm de profondeur, sont réalisées à l'aide d'un emporte-pièce au niveau de la zone équatoriale du fruit. Chaque fruit est mis dans un flacon en plastique (15x10 cm) contenant du papier filtre. Les flacons avec fruit sont déposés dans la chambre de culture à 25°C pendant 24 heures.
- ii- Application des souches isolées : les suspensions des différentes souches isolées sont préparées dans de l'eau isotonique stérile, à partir desquelles deux concentrations par isolat sont déterminées en utilisant la densité optique à 595 nm : Do 0,5 et Do 0,75.

Comme témoin positive, la souche de *Candida oleophila* est utilisée à la concentration de  $10^6$  levures/ml en adoptant pour le calcul, l'équation reliant la densité optique aux nombres de cellules par ml qui est la suivante :

$$[DO-0,015)/0,014 = \text{Nombre de cellule par ml} \times 10^6 = \text{Concentration initiale (Ci)}].$$

L'inoculation des pommes consiste en un dépôt de 50 µl de la suspension des différentes doses des cultures dans la blessure (5 fruits par dose, ce qui fait 10 blessures au total par fruit). Pour garder l'humidité suffisante autour de la pomme, trois ml d'eau distillée stérile sont versés dans chaque flacon. Ces flacons, une fois fermés par leur couvercle sont incubés à 25°C dans une chambre de culture.

iii- Application du champignon *Penicillium expansum* «P1» issu de la collection de l'Unité de Phytopathologie de Gembloux (Fusagx) : la suspension de *P. expansum* est préparée en grattant à l'aide d'une anse de platine une culture du champignon poussée sur PDA pendant 7 jours (25°C sous une photopériode de 16 h) et inondée par 10 ml d'eau distillée stérile avec tween 20 (0,5 ml/l). Le contenu est filtré sur un entonnoir avec une étamine. Ensuite, on ajuste la suspension à 10<sup>6</sup> spores/ml en s'aidant de la cellule de Bürker. La co-inoculation des fruits se fait une heure après leur sortie de la chambre, en déposant 50µl de la suspension fongique dans toutes les blessures. Puis, on recouvre de nouveau les flacons et on remet à l'incubation sous les mêmes conditions pendant 5 jours. Le témoin est représenté par 5 fruits ayant reçu uniquement le pathogène.

iv- Lecture : le pourcentage de protection des pommes vis-à-vis *P. expansum* se détermine selon la formule suivante :

$$\% \text{ de protection} = \frac{(\text{Dm du témoin}-6(\text{ou } 8)) - (\text{Dm de } x -6 (\text{ou } 8))}{(\text{Dm du témoin}-6 (\text{ou } 8))} \times 100$$

(/témoin)

où :

Dm = diamètre moyen (des 10 blessures) des lésions;

Le chiffre 6 (ou 8) correspond au diamètre de la blessure (de l'emporte pièce);

Témoin = Blessure inoculée seul par le pathogène;

X = isolat donné

#### IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES ANTAGONISTES RETENUS

Les isolats retenus comme des antagonistes vis-à-vis de *P. expansum* et *B. cinerea* ont été envoyés pour identification à la société à Braunschweig en Allemagne DSMZ 0 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (pour Ach1.\*)) et à BCCM/MUCL, Louvain-la-Neuve, Belgique pour le reste des antagonistes.

## RESULTATS

#### SELECTION *IN VIVO* DES ANTAGONISTES DES MALADIES DE POST-RECOLTE DES POMMES

Une première série de sélection a été réalisée à Gembloux–Belgique (Fusagx) vis-à-vis des deux principaux pathogènes sur pommes, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. Une technique de sélection des antagonistes des maladies de post-récolte au niveau de la surface des fruits de pommes est utilisée vis-à-vis des deux principaux pathogènes sur pommes, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. Il s'agit de confronter sur blessures pratiquées sur pommes d'une part les souches isolées sur PDA à partir des eaux de lavage recueillies sur la surface des pommes et les deux pathogènes susdits d'autre part. Une souche de *Candida oleophila* est utilisée comme antagoniste de référence. Les deux essais menés ont abouti à l'isolement de 3 antagonistes sur un ensemble de 9 isolats purifiés (3 levures et 5 bactéries) avec un pouvoir antagoniste intéressant sur les deux champignons pathogènes. Les isolats Ach1-1, Ach2-1 et Ach2-2 ont manifesté un taux de protection dépassant les 90% vis-à-vis de *P. expansum* à 5 jours après confrontation (Tab.I). Le taux de protection le plus élevé est enregistré avec l'isolat Ach2-1 avec 96%. Après 7 jours d'incubation, le niveau de protection a diminué mais il reste supérieur à 72%, le taux maximum étant

manifesté par la souche Ach1-1 avec 85% de protection (Tab.I). La protection après 11 jours reste constante et fluctue entre 71 (Ach2-1) et 85% (Ach1-1). A la DO 0.5, le niveau de protection est légèrement réduit à 5 et à 7 jours d'incubation, et reste le même à 11 jours d'incubation.

Sur *Botrytis* (Tab.II), le taux de protection offert par deux des trois souches (Ach2-1 et Ach2-2, la souche Ach1-1 n'ayant pas été testée) et la souche de *C. oleophila* est de 100% jusqu'à 11 jours d'incubation sauf pour Ach2-1 qui redescend successivement à 95% et à 91% à 7 et à 11 jours d'incubation.

Trois essais de validation réalisés à Méknès au laboratoire de Phytobactériologie, en suivant les mêmes protocoles utilisés à Gembloux (sauf la taille de la blessure et la quantité d'inoculum par blessure qui sont respectivement de 8mm et 70 µl au lieu de 6mm et de 50 µl) montrent qu'effectivement les trois souches (Ach2-1, Ach2-2 et Ach1-1) isolées manifestent sur un matériel biologique marocain un haut pouvoir antagoniste similaire pour *B. cinerea* à celui manifesté par la souche de référence.

D'autres essais d'isolements à partir des eaux de lavage issues de la surface des pommes et de confrontations *in vivo* sur pommes vis-à-vis de *P. expansum* ont été réalisés et ont abouti à une collection de 25 souches (bactéries, levures et champignons). De celle-ci, sept isolats ont exprimé à 25°C un niveau de protection jugé intéressant et variant entre 67 et 86% (Tab.III). Ces isolats sont 1113-6 (67%), 1112-2 (68%), 1112-1 (68%), 1112-9 (69%), 1113-4 (78%), 1112-3 (84%), 1113-10 (85%) et 1113-5 (86%) (Tab.III). A 5°C, l'expression des premiers symptômes sur les témoins (ayant reçu 882 seul) se manifeste après 13 jours d'incubation. La première lecture réalisée à 20 jours d'incubation fait apparaître des niveaux de protection très importants dans l'ensemble des isolats testés ; ceux-ci varient de 78 % (1113-9) à 94% (Ach2-2) (Tab.IV). Les isolats Ach gardent leur pouvoir antagoniste élevé dépassant les 91% de protection, suivis par 1113-10 (90%), 1113-5 (89%) et 1112-3 (82%). A 26 jours d'incubation, les niveaux de protection ont baissé, mais restent supérieurs à 60%. Ach2-2 et 1113-5 ont manifesté un antagonisme toujours élevé avec 89 et 87% respectivement. Ach2-1 et 1113-10 assurent une protection de l'ordre de 75%, Ach1-1 avec 72% et pour le reste, cette protection est de 61% (Tab.IV).

#### IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES ANTAGONISTES RETENUS

Certains isolats dont le pouvoir antagoniste est jugé intéressant sont retenus pour la suite du travail (Ecologie, mode d'action et formulation) comme des antagonistes vis-à-vis de *P. expansum* et *B. cinerea*. Le résultat des analyses a montré que les trois isolats Ach1-1, Ach2-1 et Ach2-2 appartiennent à l'espèce d' *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud et les souches 1113-5, 1113-9 et 1113-10 appartiennent également à cette même espèce mais de variété *pullulans* : *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn.v. *pullulans*.

Tableau I : Résultats de l'essai de sélection des antagonistes sur pomme *Golden delicious* vis-à-vis de *Penicillium expansum* après 5, 7 et 11 j d'incubation à 25°C (DO : densité optique à 595, NC : Non compté)

Biocontrol activity of some strains against *P. expansum* on wounded *Golden delicious* apples after 5, 7 and 11 days of incubation at 25°C (NC : no counted).

| Isolat             | DO 0,5              |                      |                       | DO 0,75            |                      |                       |
|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|
|                    | 5 jours incubation  | 7 jours d'incubation | 11 jours d'incubation | 5 jours incubation | 7 jours d'incubation | 11 jours d'incubation |
|                    | % Protection/Témoin |                      |                       |                    |                      |                       |
| <i>C.oleophila</i> | 42,45               | 42,93                | 40,11                 | 67,63              | 45,55                | 39,55                 |
| Eau lavage         | 49,64               | 40,31                | 33,15                 | 49,64              | 40,31                | 33,15                 |
| Ach 1.1            | 84,89               | 71,20                | 62,12                 | 91,37              | 85,34                | 85,52                 |
| Ach 1.2            | 46,04               | 35,08                | NC                    | 28,06              | 29,84                | NC                    |
| Ach 1.3            | 74,82               | 60,21                | 65,46                 | 69,07              | 53,93                | 43,18                 |
| Ach 1.4            | 40,29               | 33,51                | NC                    | 33,09              | 25,65                | NC                    |
| Ach 1.5            | 33,81               | 25,65                | NC                    | 28,78              | 26,70                | NC                    |
| Ach 1.6            | 42,45               | 36,65                | NC                    | 33,09              | 35,08                | NC                    |
| Ach 1.7            | 33,09               | 29,32                | NC                    | 29,50              | 20,42                | NC                    |
| Ach 2.1            | 88,49               | 80,11                | 72,42                 | 95,68              | 75,39                | 71,03                 |
| Ach 2.2            | 87,05               | 80,11                | 74,65                 | 92,09              | 72,25                | 75,49                 |

Tableau II: Résultats de l'essai de sélection des antagonistes sur pomme *Golden delicious* vis-à-vis de *Botrytis cinerea* après 5, 6 et 8 j d'incubation à 25°C. (C.o : *Candida oleophila*)

Biocontrol activity of some strains (at a concentration of DO 0.75 at 595nm) against *B. cinerea* on wounded *Golden delicious* apples after 5, 6 and 8 days of incubation at 25°C.

| Isolat                     | 5 jours d'incubation | 6 jours d'incubation | 8 jours d'incubation |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                            | % Protection/Témoin  |                      |                      |
| <i>C.o</i> 10 <sup>5</sup> | 87,94                | 82,81                | 83,39                |
| <i>C.o</i> 10 <sup>7</sup> | 100                  | 100                  | 100                  |
| Ach 1.3 DO 0,75            | 87,94                | 79,37                | 70                   |
| Ach 2.1 DO 0,75            | 100                  | 95,70                | 91,86                |
| Ach 2.2 DO 0,75            | 100                  | 100                  | 97,29                |

## DISCUSSION ET CONCLUSION

La recherche de moyens de lutte alternatifs à l'usage des pesticides s'est avérée primordiale dans les systèmes de production intégrée adoptée par divers pays en vue de réduire les pertes dues aux maladies de conservation. Dans ces systèmes, la lutte biologique occupe une place privilégiée. De nombreux microorganismes se sont avérés efficaces dans la protection des pommes, des pêches, des agrumes vis-à-vis des pourritures de post-récolte.

La surface du fruit (pomme dans notre cas) semble être un site favorable à la sélection de bons antagonistes contre les maladies de post-récolte des pommes. Janisiewicz et Korsten (2002) rapportent que la sélection des antagonistes doit être effectuée sur des fruits sains dans le verger en stockage, de préférence à partir des fruits issus de vergers biologiques où les populations naturelles ne sont pas perturbées par l'utilisation des intrants chimiques. Sur 329 microorganismes épiphytes existants à la surface des pommes, Jijakli (1996) a pu isoler deux souches de levures, *Pichia anomala* (souche K) et *Candida sake* (souche O), comme étant deux agents de biocontrôle vis-à-vis de *P. expansum* et *B. cinerea* sur pommes. D'autres levures telles que *Acremonium breve*, *Candida tenuis*, *C. sake* et *Candida* spp ont été rapporté dans la littérature comme des antagonistes des dites espèces fongiques, responsables des principales maladies de conservation des pommes (Jijakli *et al.*, 1999). La même méthode utilisée par Jijakli (1996) est adoptée dans notre cas, et nous a permis de sélectionner sur très peu d'isollements des microorganismes présentant un haut pouvoir antagoniste sur ces deux parasites de post récolte des pommes, et confirme ainsi que la surface des pommes constitue, en effet, un lieu privilégié pour l'obtention des microorganismes de biocontrôle. Les travaux sur certains antagonistes montrent que les concentrations permettant d'avoir des niveaux de protection élevés vis-à-vis des pathogènes de post-récolte oscillent autour de  $10^9$  pour les bactéries et  $5.10^7$  CFU/ml pour les levures (Janisiewicz, 1998). Dans le cas de la levure, *Pichia anomala* (souche K), une efficacité jugée acceptable est obtenue lorsque celle-ci est appliquée à une concentration de  $10^7$  cfu/ml sur blessure ayant reçu par la suite une suspension fongique de  $10^6$  spores/ml de *P. expansum* ou de *B. cinerea* (Jijakli *et al.*, 1999). De même que le niveau de protection est fonction du temps qui s'écoule entre l'application de l'antagoniste et du pathogène, la durée de 24h a été rapportée comme étant la durée favorable pour l'obtention d'un bon contrôle (Jijakli, 1996). Nos résultats sont conformes à ceux rapportés par ces auteurs, les concentrations utilisées pour nos isolats antagonistes et pathogènes sont respectivement de  $10^7$  et de  $10^6$  cfu/ml, et le temps séparant les deux applications est de 24h.

Notre travail ne constitue, en effet, qu'une première étape de développement d'un agent efficace de biocontrôle qui devra être suivie par d'autres, relatives à la capacité de l'agent sélectionné à être produit en masse, à résister aux divers stress de l'environnement surtout si le contrôle cible la pré-récolte, et à être formulé sans que leur pouvoir antagoniste soit impacté.

L'identification de six antagonistes a montré qu'ils correspondent à la même espèce qui est *Aureobasidium pullulans*. Celle-ci a été mentionnée dans la bibliographie comme agent potentiel de biocontrôle contre les maladies de post-récolte. Des expériences à petite échelle conduites en Italie ont montré que l'espèce *Aureobasidium pullulans* (LS-30) présente une activité antagoniste significative contre *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer* et *Aspergillus niger* sur raisin de table et *B. cinerea* et *P. expansum* sur pomme (Castoria *et al.*, 2001). *A. pullulans* se multiplie rapidement et contrôle les pourritures causées par *B. cinerea* et *P. expansum* avec des niveaux de protection respectifs de 89 et 67%, par rapport au témoin (Eau distillée stérile) (Ippolito et Nigro, 2000).

De leur côté, Leibinger *et al.* (1997) ont montré que la combinaison de trois isolats de *A. pullulans* et un de *Rhodotorula glutinis* empêchent l'installation des pourritures de

post-récolte des pommes au même degré qu'EUPAREN, le fongicide communément utilisé à cette fin en Allemagne, et ont conclu que l'usage des microorganismes antagonistes sur pomme au champ constitue une alternative prometteuse aux traitements chimiques contre les maladies de post-récolte des pommes.

Concernant l'innocuité de l'espèce *A. pullulans*, celle-ci n'est ni un pathogène primaire pour l'homme, ni reconnue comme producteur de mycotoxines ([www.mold-survivor.com](http://www.mold-survivor.com)). L'avis du groupe scientifique «AFC» en France, adopté en juillet 2004 ([http://www.efsa.eu.int/science/afc/afc\\_opinions/catindex\\_fr.html](http://www.efsa.eu.int/science/afc/afc_opinions/catindex_fr.html)), considère que la souche d'*A. pullulans* utilisée pour la production d'un polysaccharide utilisé comme additifs alimentaires, le «pullulan», ne produit pas de toxines. Il ajoute que la base de données toxicologiques pour le pullulan est limitée, mais indique que ce polysaccharide a une faible toxicité.

En perspective, trois objectifs seront réalisés successivement : (a) l'influence *in vitro* des facteurs physiques (température, activité de l'eau, pH et UV) sur la croissance des souches sélectionnées, ensuite (b), l'influence de ces facteurs *in vivo* directement sur fruits, et enfin (c), l'identification d'adjuvants permettant d'améliorer la survie et l'efficacité des agents antagonistes malgré les paramètres défavorables.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la CUD (Coopération Universitaire de Développement) de la Belgique qui a financé cette étude qui fait partie du Projet «PIC» sur la lutte biologique contre les maladies post-récolte des pommes entre la Belgique et le Maroc.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bondoux P., 1992 - Maladies de conservation des fruits à pépins, pommes et poires. Institut National de la Recherche Agronomique Paris, 173p.
- Bull. C. T., Strack J.P., Smilanick J. L., 1997 - *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue moulds of citrus. *Biol. Control.*, 8, 81-88.
- Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifica S., De Cicco V., 2001 - *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits : Study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 7-17.
- Chand-Goyal T., Spotts RA., 1997 - Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biol. Control*, 10, 199-206.
- El Ghaouth A., Wilson C.L., Wisniewski M., 1998 - Ultrastructural and cytochemical aspect of the biocotrol activity of *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*, 88, 282-291.
- Ippolito A., Nigro F., 2000 - Impact of pre-harvest application of biological control agents on post harvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* , 19, 715-723.
- Janisiewicz W.J.. 1998 - Biocontrol of postharvest disease of temperature fruits. *Challenges and opportunities*. Marcel Dekker, Inc. New York, United States of America, 171-197.
- Janisiewicz W.J., Korsten L., 2002 - Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40, 411-441.
- Jijakli M.H., 1996 - Etude des propriétés antagonistes de deux souches de levures vis-à-vis de *Botrytis cinerea* Pers. sur pomme en conservation. Faculté Universitaires des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 173.
- Jijakli M.H., Lepoivre P., Grevesse C., 1999 - Yeast species for biocontrol of apple postharvest diseases: an encouraging case of study for practical use. *Biotechnological*

Approche in *Biocontrol of plant pathogens*. Edit. by Mukerji et al., Kluwer Academic/Plenum Publishes, New York, 31-49.

Leibinger W., Breuker B., Hahn M, Mendgen K., 1997 - Control of Postharvest Pathogens and Colonization of the Apple Surface by Antagonistic Microorganisms in the Field. *Phytopathology*, 87, 1103-1110.

Roberts R.G., 1990. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80 : 526-530.

Wilson C. L., Wisniewski M.E., 1992. Future alternative to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. in Tjamos E.S. et al. (Eds.), *Biological Control of Plant Disease*. Plenum Press, New York : 133-148.