

Sélection de levures antagonistes à *penicillium digitatum* agent de la pourriture verte des fruits d'agrumes en post-récolte

N. Taqarort, L. Bouzerda, E.H. Boudyach, H. Boubaker, O. Akhayat et A. Ait Benaoumar.

UFR biologie appliquée Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Agadir, BP 8106 cité Dakhla Agadir 80000-Maroc E-mail : aitbenaoumar@yahoo.fr

Mots Clés : Lutte biologique, *Penicillium digitatum*, Post-Récolte, Agrumes, Levures.

Introduction

L'agrumiculture demeure le secteur agricole exportateur le plus important au Maroc. Elle joue un rôle primordial dans le développement économique national. Toutefois, les agrumes sont exposés à de nombreux problèmes phytosanitaires, causant des pertes non négligeables (1). Les champignons parasites des agrumes en post-récolte sont nombreux, mais dans la pratique, c'est à quelques uns seulement qu'on peut attribuer la presque totalité des dégâts observés. Il s'agit de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*. La lutte contre ces pathogènes est basée jusqu'à présent sur l'utilisation de fongicides. Toutefois, la lutte chimique présente de nombreux inconvénients (persistance des résidus sur les fruits traités; apparition de souches résistantes aux produits fongicides utilisés et l'impact des traitements chimiques sur la santé et l'environnement). La lutte biologique, utilisant des micro-organismes non pathogènes pour contrôler les maladies des plantes est une alternative prometteuse et peut être appliquée en post-récolte. En effet, des résultats très encourageants ont été rapportés pour plusieurs fruits tels que : les pommes(2), les pêches(3), les poires(4), les fraises(5), les nectarines(6) et les agrumes(7,8). Ces microorganismes antagonistes sont soit des bactéries qui agissent par la sécrétion de molécules inhibitrices, révélées par des tests d'antibiose sur milieux de culture(4,9), soit des levures agissant par compétition pour l'espace et les nutriments. Les levures sont recherchées par des tests de compétition *in vivo*(2,10,11). Certains de ces antagonistes sont déjà utilisés dans la production de biofongicides tels que l'Aspire(12) et le Biosave(13) qui sont respectivement à base de *Candida oleophila* et *Pseudomonas syringae*.

Ce travail consiste à isoler des levures antagonistes à *Penicillium digitatum*, évaluer la protection des fruits par les isolats sélectionnés et étudier la dynamique de population des antagonistes à la température de conditionnement des fruits.

Matériels & méthodes

1-Recherche des levures antagonistes

La méthode consiste à isoler les levures antagonistes à partir des blessures non pourries, préalablement traitées par l'eau de lavage des fruits et inoculées par *Penicillium digitatum* (14,15). Les fruits témoin sont inoculés par l'eau distillée. Seuls les isolats de levures qui réduisent le pourcentage de la pourriture verte de 50% ou plus, après sept jours d'incubation des fruits (25°C, humidité relative : 95%), ont été retenus (14,15). Les meilleures levures antagonistes sont testées pour la protection des fruits.

2. Évaluation du contrôle biologique de *P. digitatum* par la levure L22

L'isolat L22 qui a montré une efficacité importante dans le contrôle de la pourriture verte a été utilisé dans cette expérience. Les essais ont été effectués à 25°C et à 4°C sous une H.R. de 90%. Des fruits de la variété 'salustiana' préalablement désinfectés et blessés ont été traités avec 30 µl de la suspension de levure L22 à des concentrations de 10⁷, 10⁸ et 10⁹ cfu /ml. Après 24 h., chaque blessure a été inoculée avec 15 µl d'une suspension de *P. digitatum* à des concentrations de 10⁵ et 10⁶ spores /ml. Les fruits, ainsi traités, ont été entreposés à 4°C pendant 30 jours suivis de 7 jours à 25°C. Après cette période d'incubation, le pourcentage de pourriture a été déterminé comme suit:

$$\% \text{ pourriture} = \frac{\text{nombre de blessures pourries}}{\text{nombre total des blessures}} \times 100$$

3. Dynamique de population de la levure L22

Des fruits de la variété 'Maroc-late', préalablement lavés, désinfectés et blessés, sont trempés pendant 30 secondes dans une suspension de levure (10⁸ CFU/ml). Après une période de 0, 1, 2, 3, 4 et 7 jours d'incubation à 25°C, trois fruits sont prélevés pour étudier la dynamique de population des levures dans les blessures et à la surface des fruits. A partir de chaque fruit, on prélève quatre disques d'écorce de 1cm de diamètre contenant les blessures, et quatre disques de 1cm de diamètre de la surface non blessée. Les 12 disques de chaque type sont broyés séparément dans 10ml du tampon phosphate stérile (0.05M pH 6.5). Le broyat est ensemencé sur milieu solide NYDA additionné de la streptomycine sulfate à 0.1%. Après deux jours d'incubation à 25°C, le

nombre de CFU est déterminé par blessure ou par unité de surface (cm²).

Analyse statistique

Une analyse de variance (ANOVA) suivie d'une comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls ont été abordées sur les données obtenues. L'ensemble des calculs ont été effectués par le logiciel STATISTICA.

Résultats

Isolement des levures antagonistes

Le screening des levures antagonistes a permis de constituer une collection de levures antagonistes (tableau 1). Après 7 jours d'incubation des fruits, 46 levures potentiellement antagonistes sont isolées à partir des blessures non-pourries. Vingt et un d'entre elles réduisent l'incidence de la pourriture de plus que 50% (Tableau 1). Sept isolats (L13, L15, L22, L24, L33, L40 et L73) réduisent l'incidence à moins de 20%. Une meilleure protection des fruits est obtenue avec les isolats L13 et L22. En effet, l'incidence de la pourriture est de 2% comparé au témoin.

Tableau 1 : Pourcentage d'infection des fruits de Clémentine sept jours après traitement par les levures et inoculation par *Penicillium digitatum*.

Isolat n°:	L13 L22	L24 L73	L15	L33	L40	L20 L23 L27 L41	L02 L14, L26 L30, L38	L11 L35 L36 L45	L8	Autres isolats	témoin
Incidence en %	2	4	11	12.5	16	20	25	29	33	>50%	70%

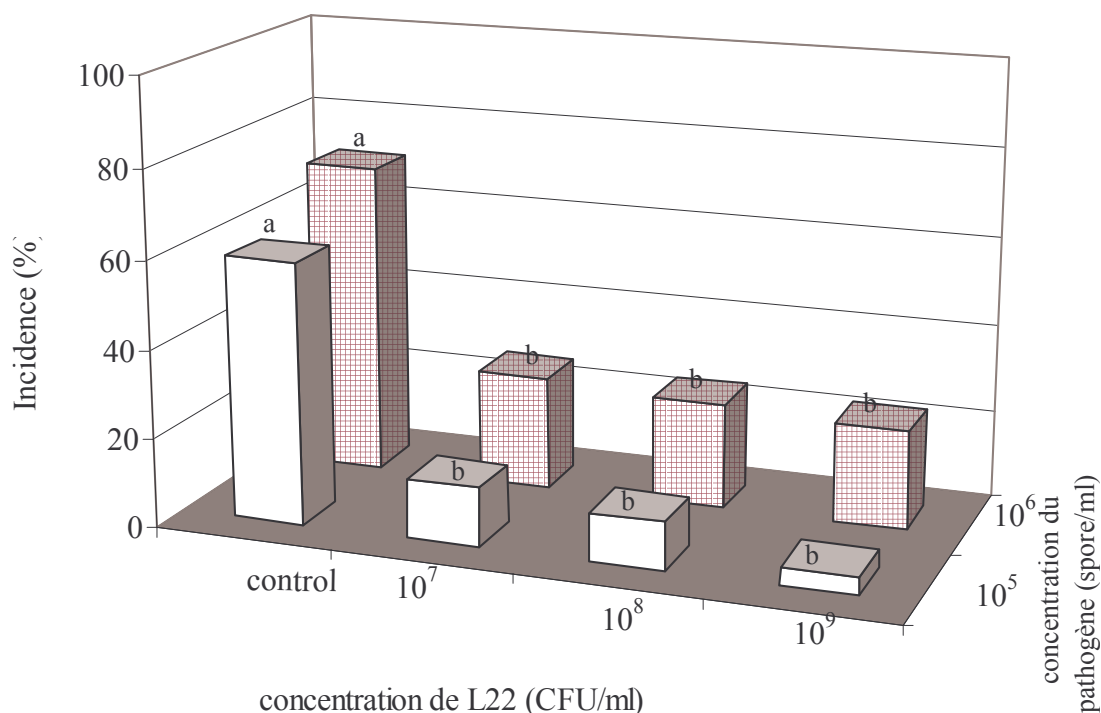


Figure 1 : Evaluation de la protection des fruits d'agrumes par la levure L22

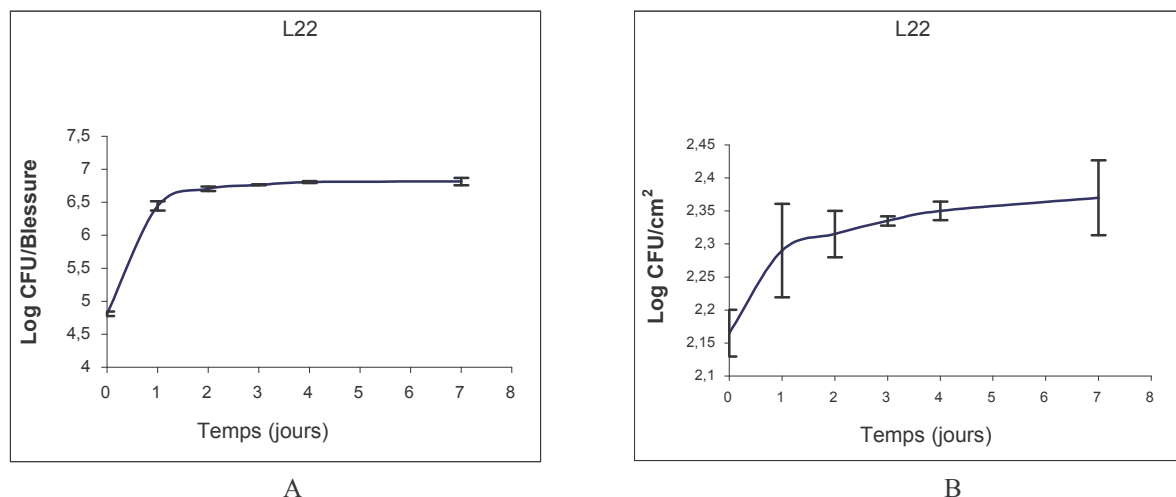


Figure 2 : Dynamique de population de la levure (L22) sur des fruits de Maroc-late à 25°C. **A** (au niveau des blessures), **B** (à la surface des fruits).

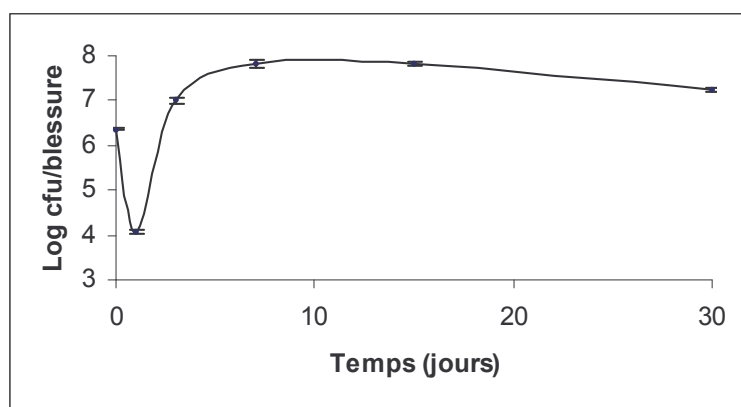


Figure 3 : Dynamique de population de la levure (L22) au niveau des blessures des fruits de Maroc-late à 4°C.

Evaluation de l'efficacité de levure L22

Après 30 jours de stockage à 4°C aucune infection n'a été observée sur les fruits traités. Cependant après 7 jours de transfert à 25°C après les 30 jours de stockage à 4°C, les trois concentrations de la levure L22 testées (10^7 , 10^8 , 10^9 cfu/ml) ont permis de réduire considérablement et de manière significative l'incidence de la pourriture verte comparée au contrôle et ce ci pour les deux concentrations utilisées du pathogène (10^5 et 10^6 conidie/ml) (Fig.1). On a pas noté de différence significative d'une part entre l'incidence de la pourriture verte et les concentrations croissantes de l'antagoniste et d'autre part, entre cette incidence et les concentrations croissantes de l'agent pathogène à $P=0.05$. Ceci pourrait s'expliquer probablement par la grande capacité de la levure L22 dans le contrôle de la pourriture verte des fruits d'agrumes.

Evaluation de la survie de levure L-22 dans les blessures

La capacité de la levure sélectionnée à se multiplier et à survivre dans les blessures est étudié pour s'assurer de son pouvoir colonisateur et par conséquence de sa capacité de contrôler la pourriture verte des agrumes à long terme. A 25°C, La population de la levure sélectionné L22 dans les blessures reste stable pendant les premières 24 heures puis augmente pour atteindre un maximum après 4 jours d'incubation (Fig.2A). Il en est de même à la surface des fruits mais la taille de la population est beaucoup plus faible (Fig.2B). Cela est certainement lié à la disponibilité des nutriments à l'intérieure des blessures.

A 4°C, après une diminution de la population de l'antagoniste pendant les trois premiers jours, on assiste une augmentation considérable pour atteindre un maximum après 7 jours. Ceci est probablement lié à l'adaptation de l'antagoniste à des températures basses. Cette population reste stable par la suite durant la durée du stockage (Fig.3).

CONCLUSION :

Les levures antagonistes isolées à partir de la microflore épiphyte des fruits d'agrumes ont montré une protection efficace des fruits d'agrumes contre la pourriture verte.

La croissance de l'antagoniste est meilleure au niveau des blessures qu'à la surface des fruits. Cela pourrait s'expliquer par la disponibilité et l'accessibilité aux nutriments. Ceci est avantageux puisque la blessure constitue la porte d'entrée des agents pathogènes, l'antagoniste pourrait donc y entrer facilement en compétition pour les nutriments et pour l'espace avec le champignon pathogène. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant *Candida sake* comme antagoniste (16). L'étude de la dynamique de la population de la L22 montre une augmentation et un maintien de la croissance au cours du temps d'où la capacité d'adaptation et la possibilité de protection à long terme des fruits d'agrumes en post-récolte lors du conditionnement.

REFERENCES

- Anonyme, 2003.** Office national de mise en valeur agricole du Souss-Massa, Service de production agricole.
- Janisiewicz, W.J., Tworowski, T. J., and Kurtzman, C. P. 2001.** Biocontrol Potential of *Metchnikowia pulcherrima* Strain against Blue Mold of Apple. *Phytopathology* 91 : 1098-1108.
- De Curtis, Torriani, S., Rossi, F., and De Cicco, V. 1996.** Selection and use of as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Ann.Microbiol.Enzymol.* 46 : 45-55.
- Nunes, C., Usall J., Teixido, N., Vinas, I. 2001.** Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Int. J. Food Microbiol.* 70 (2001): 53-61.
- Guinebretiere, M. H., Nguyen-the, C., Morrison N., Reich M., and Nicot, P. 1999.** Isolation and characterization of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruits. *J. Food Protection*, vol.63, No. 3, 2000, pages 386-394.
- Qing, F., and Shiping, T. 2000.** Postharvest biological control of Rhizopus rot of fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant Dis.*84: 1212-1216.
- Chalutz, E., et Wilson, C.L.,1990.** Postharvest biocontrol of Green and blue and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Dis.*74: 134-137.
- El-Ghaouth, A., Smilanick,J.L., Wisniewski, M., and Wilson, C.L. 2000.** Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida sake* and 2-Deoxy – D-Glucose.*Plant Dis.*84: 249-253.
- Ting Zhou, Chun-Lung Chu, Wei T. Liu, and Karin E.Schaneider.2001.** Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *Pseudomonas syringae*. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 246-252.
- Josep Usall, Neus Teixido, Rosario Torres, Xavier Ochoa de Eribe and Immaculaba Vinas.2000.** Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest biology and technology* 21: 147-156.
- Baker, R., 1983.** Mecanisms of biological control of soil pathogens. *Ann.Rev. Phytopathology* 6 : 263-294.
- Chand-Goyal, T., Eckert J.W., Droby, S. and Atkinson, K. 1998.** A method for studying the population dynamics of *Candida oleophila* on orange in the grove, using a selective isolation medium and PCR technique. *Microbiological Research* 153 : 265-270.
- Bull, C.T., Stack J.P. and Smilanick J.L. 1997.** *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus.*Biological Control* 8 : 81-88
- Janisiewicz, W.J., 1987.** Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology* 77:481-485.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M., Droby, S., and Chalutz, E., 1993.** A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae* 53:183-189.
- Usall, J., Teixido, N., Torres, R., Eribe, X.O., and Viñas, I. 2001.** Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 21:147-156.