

Pomme Maladies de conservation

En Europe, la lutte contre les maladies parasitaires de conservation repose essentiellement sur des traitements fongicides, présents en suffisance sur les fruits durant la période de conservation afin de prévenir le développement des moisissures. Cependant, l'apparition de souches résistantes et les conditions plus restrictives de leur utilisation en termes législatifs expliquent l'intérêt croissant des professionnels pour des méthodes alternatives de lutte.

La lutte biologique au moyen de deux souches de levures

En France et en Belgique, la plupart des dégâts occasionnés sur pommes en post-récolte sont attribués au groupe des gloeosporioses (incluant *Cryptosporiopsis mali-corticis*, *Cylindrocarpum mali* and *Trichoseptoria fructigena*), à *Penicillium expansum* et à *Botrytis cinerea* (Bondoux, 1992) (photo 1). *P. expansum* et *B. cinerea* pénètrent dans les fruits via des blessures qui peuvent être occasionnées par des oiseaux, des guêpes, la grêle ou par des lésions ou coups réalisés durant la cueillette, le transport et le tri des fruits. Ces deux parasites de blessures peuvent également se propager par simple contact entre fruits sains et contaminés et multiplier par 15 à 20 le nombre de fruits initialement infectés (photo 2). Le groupe des gloeosporioses (parasites latents) pénètre par les lenticelles des fruits. Le développement ultérieur des symptômes (pourriture du fruit) se produit lors de la phase de conservation.

Résistances et conditions restrictives réglementaires

En Europe, la lutte contre les maladies parasitaires de conserva-

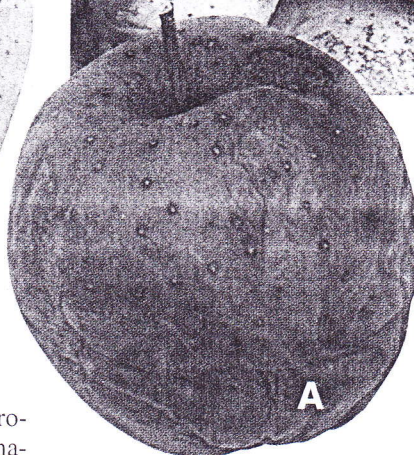
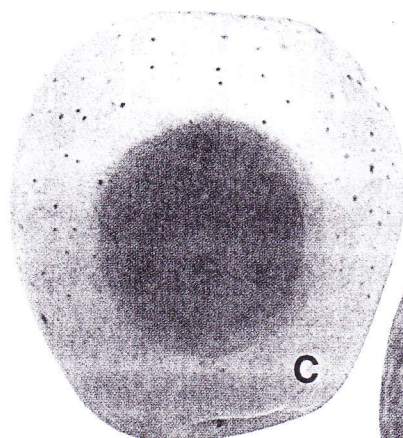
tion repose essentiellement sur des traitements fongicides qui sont appliqués en pré-récolte durant les semaines précédant la cueillette, et en post-récolte immédiatement après la cueillette. Ces traitements visent à ce que le fongicide soit présent en suffisance sur les fruits durant la période de conservation afin de prévenir le développement des moisissures. Cependant, l'apparition de souches résistantes à certaines matières actives agréées (pour les traitements en pré et post-récolte) et les conditions plus restrictives

de leur utilisation en termes législatifs expliquent que les arboriculteurs risquent de rencontrer des problèmes pour lutter efficacement contre les pourritures des fruits en conservation. L'attitude du public vis-à-vis des risques phytosanitaires et celle des chaînes de grande distribution qui accordent une part croissante du marché des fruits pour les produits labellisés garantissant un nombre réduit de traitements, renforcent l'intérêt croissant des professionnels pour des méthodes alternatives de lutte.

RÉSUMÉ

Deux souches de levures, *Pichia anomala* (souche K) et *Candida oleophila* (souche O) ont été sélectionnées pour leur activité protectrice élevée et stable contre *B. cinerea* et *Penicillium spp.* sur pommes. Ces deux souches antagonistes ont gardé leurs propriétés protectrices après leur production en fermenteur. Ces deux premiers critères (biologique et technologique) sont nécessaires mais pas suffisants pour le développement pratique de la lutte biologique. Les principales étapes permettant de donner les atouts nécessaires à ces deux biopesticides pour leur assurer un succès d'utilisation sont exposées dans le souci de satisfaire les différents acteurs de la filière fruit (l'arboriculteur, l'industriel, les chaînes de distribution et le consommateur).

Symptômes de pourriture sur Golden Delicious dus à *B. cinerea* (A), *P. expansum* (B) et à *Gloeosporium* sp. (C)



► **Potentiels de la lutte biologique sur fruits en conservation**

La lutte biologique pour la protection des plantes contre les maladies fongiques s'est le plus souvent avérée moins satisfaisante que la lutte chimique (Cooley *et al.*, 1996). Cette observation peut s'expliquer par des difficultés majeures auxquelles se heurtent les produits biologiques : reproductibilité de l'effet protecteur et de la qualité du produit fini, stabilité dans le temps de ce produit et enfin, son prix de revient. Le marché des biopesticides ne dépasse pas à l'heure actuelle 1 % du total des pesticides vendus dans le monde malgré une recherche menée dans de nombreux laboratoires sur le thème de la lutte biologique. Cependant, la conservation des fruits constitue un domaine où les limites de cette lutte peuvent être surmontées plus facilement car, contrairement à une application au champ, les sites d'application sont limités aux fruits et ceux-ci présentent une haute valeur ajoutée qui permet de supporter les coûts parfois élevés d'un traitement biologique (Fokkema, 1991). De plus, les paramètres environnementaux des chambres de stockage sont bien définis et stables au cours du temps. Ainsi, de nombreux travaux ont été effectués dans ce domaine et ont fait l'objet d'une publication de synthèse (Wilson et Wisniewski, 1994). Enfin, deux biopesticides ont été agréés en

postrécolte sur pommes et poires : *Aspire'* (à base d'une souche de levure et commercialisé par Ecogen) agréé aux USA et en Israël et *Bio-Save 110'* (à base d'une souche de bactérie et vendu par Ecoscience) homologué aux USA.

Dans ce contexte, l'unité de phytopathologie en collaboration avec d'autres partenaires universitaires travaille depuis 1991 à la mise au point d'un traitement biologique aboutissant à la mise en œuvre d'une première génération de souches de levures efficaces contre les parasites de blessures (*B. cinerea* et *P. expansum*) sur pommes en conservation ; celles-ci peuvent être intégrées à d'autres techniques de lutte dirigées contre les pourritures dues à *Gloeosporium spp.* La mise en application pratique d'une telle lutte biologique nécessite la réalisation d'un certain nombre d'étapes.

Les étapes du développement d'un biopesticide

→ **Sélection de souches antagonistes.** Parmi 329 souches microbiennes isolées à la surface de fruits, nous avons sélectionné deux souches de levures, *Pichia anomala* souche K et *Candida oleophila* souche O (anciennement

nommée *Debaryomyces hansenii*) pour leur activité de protection élevée et stable vis-à-vis de *B. cinerea* et *P. expansum*. L'application sur sites blessés de pommes Golden Delicious de 50 µl d'une suspension de l'un des deux antagonistes retenus (10⁷ unités formatrices de colonies ou ufc/ml) a permis l'inhibition du développement des symptômes dus à l'un de ces pathogènes (inoculé par 50 µl d'une suspension de 10⁶ spores/ml). Cet effet protecteur s'observait tant à 25 °C qu'à 5 °C (Jijakli *et al.*, 1993).

→ **Production en masse, séchage et formulation technique des souches antagonistes.** Lorsque le nombre de candidats potentiels est suffisamment réduit, l'aptitude à la production en masse et à la préparation d'une formulation sèche des micro-organismes doit être évaluée pour s'assurer de la faisabilité économique de la technique. Certains adjuvants spécifiques peuvent être additionnés (protectants, 'carriers...') à cette étape afin d'améliorer la viabilité des souches à ces différentes opérations.

Le Centre wallon de biologie industriel (Liège, Belgique) a étudié la capacité des deux souches antagonistes (K et O) à être produites en masse. L'application de ces souches une fois produites en fermenteur à une concentration de 10⁷ ufc/ml a apporté vis-à-vis de *B. cinerea* et *P. expansum* un niveau de protection similaire à celui observé après leur production en boîte de Pétri (Jijakli *et al.*, 1993b).

Mécanismes d'action. Les relations d'antagonisme peuvent s'appuyer sur des mécanismes très

divers de compétition (pour les éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), d'antibiose, de parasitisme de l'agent pathogène ou encore de protection indirecte en induisant chez la plante des réactions de défense. Nos connaissances sur le mode d'action des agents de lutte biologique en postrécolte restent très limitées. Pourtant leur compréhension permettrait la mise en œuvre rationnelle d'un protocole de sélection de souches plus efficaces, une formulation spécifique renforçant ces mécanismes et apporterait des éléments importants pour la constitution du dossier d'homologation de l'agent de lutte biologique.

Concernant les deux souches de levures antagonistes, nous avons pu montrer que l'effet de protection dû aux deux souches antagonistes les plus performantes est étroitement lié à la colonisation des blessures. Ces résultats suggèrent que la compétition pour les éléments nutritifs pourrait être l'un des mécanismes impliqués dans la protection des fruits. Dans nos conditions expérimentales, il ne semble pas que la protection observée puisse s'expliquer par la production de métabolites toxiques ou par l'induction de mécanismes de résistance chez le fruit hôte. Enfin, le rôle d'exo-

1,3-glucanases produites par *P. anomala* souche K a également été étudié. Ces enzymes hydrolytiques sont connus pour leurs propriétés de dégradation des parois de champignons. Cependant, les derniers résultats suggèrent que deux de ces enzymes produites par la souche K ne jouent pas séparément un rôle majeur dans l'activité protectrice vis-à-vis de *B. cinerea* (Jijakli *et al.*, 1999).

→ **Formulation biologique des souches antagonistes.** La formulation biologique doit permettre de stabiliser la protection apportée par les souches antagonistes dans un environnement qui n'est pas toujours adéquat (critère de robustesse de la protection). En effet, la formulation biologique est destinée à augmenter l'expression des potentialités de protection de l'agent de lutte biologique. Plus précisément, cette formulation doit accroître la survie et/ou l'efficacité du micro-organisme et/ou la persistance de cette efficacité sur la plante hôte. Dans ce contexte, le chlorure de calcium, le 2-déoxy-D-glucose et le Nu-film-P (NFP), un anti-transpirant agréé en agriculture biologique, ont été sélectionnés pour leur capacité à augmenter et/ou stabiliser la protection apportée par les deux souches antagonistes vis-à-vis de *B. cinerea* et

P. expansum (Jijakli *et al.*, 1993).

→ **Mise en pratique et intégration de la lutte biologique à d'autres techniques de contrôle des pathogènes.** Cette étape consiste à apprécier d'une part, la compatibilité du contrôle biologique avec la lutte contre d'autres parasites et, d'autre part, à évaluer la possibilité d'intégrer le traitement par les antagonistes dans la chaîne des opérations de conditionnement des fruits avant leur mise en conservation. Dans le cas particulier des pommes en conditions de postrécolte, il faut non seulement assurer la protection des fruits contre les parasites de blessures mais également contre les infections latentes de *Gloeosporium spp.* visées par les traitements chimiques traditionnels mais non contrôlés par nos deux souches de levure. Des traitements thermiques dirigés contre les Gloeosporioses ont alors été combinés avec des applications des deux souches de levures. Les différents traitements sont repris dans l'encadré ci-dessous.

La thermothérapie réduit l'infection

Lors d'un premier essai, 72,4 % des fruits du lot non-traité étaient infectés après deux mois de stoc-

TRAITEMENTS RÉALISÉS

Lors du premier essai, 8 lots de 160 pommes n'ayant reçu aucun traitement chimique en postrécolte ont été utilisés en conditions d'infection naturelles. Trois traitements ont consisté au trempage, soit dans un bain thermostatique à 45 °C pendant 10 minutes, soit dans une suspension aqueuse contenant les deux antagonistes *P. anomala* (souche K) et *C. oloephila* (souche O) à une concentration de 10⁷ UFC/ml chacun durant deux minutes, ou encore dans une émulsion d'un film antitranspirant à 2 % [Nu-film-P contenant 96 % de poly-1-p-menthène (laboratoire Miller)]. Ces trois traitements ont été appliqués séparément ou en combinaison et comparés à un lot ne recevant aucun traitement. Dans le cas de traitements combinés, la thermothérapie a toujours précédé les autres applications. L'application des deux souches de levures et du NFP s'est effectuée simultanément

par mise en suspension des agents antagonistes dans l'émulsion du film antitranspirant.

Au cours du deuxième essai, deux lots de 160 pommes ont été utilisés. Le premier lot n'a subi aucun traitement (lot témoin), le deuxième a été successivement trempé dans l'eau à 45 °C pendant 10 minutes, puis dans une préparation contenant les deux levures mises en suspension dans l'émulsion de NFP.

Après traitement, les fruits ont été séchés à l'air libre puis rangés dans des caissettes en bois. Ils ont été conservés un mois en chambre froide à 3 °C avant d'être transférés dans une chambre à 20 °C où ils ont été maintenus un mois. Le pourcentage de fruits infectés a été calculé pour chacun des pathogènes ou groupe de pathogènes par rapport au nombre total de fruits de chaque lot après ces deux mois de conservation.

► kage (tableau 1). Le pourcentage total de fruits infectés a diminué quel que soit le traitement appliqué sur les pommes ; le meilleur niveau de protection a été obtenu par le traitement à la chaleur suivi d'un trempage dans une émulsion de Nu-Film-P contenant les deux levures *P. anomala* et *C. oleophila* en suspension (40,2 % de fruits infectés). Le lot non-traité présentait 54,4 % de fruits infectés par *Gloeosporium* spp. Tous les traitements incluant une thermothérapie ont réduit l'infection par ces pathogènes à moins de 5 % alors que le pourcentage de fruits infectés se situait entre 33,8 et 41,5 % pour les lots traités uniquement par les levures (seules ou mises en suspension dans le NFP). Néanmoins, la réduction du pourcentage de fruits montrant des symptômes de gloeosporiose après le traitement à la chaleur, s'est accompagnée d'une augmentation de la proportion de fruits atteints par *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. et particulièrement par *Penicillium* spp. Après l'application de la thermothérapie, le contrôle de *Penicillium* spp. a été rétabli grâce à un bain dans l'émulsion de Nu-Film-P contenant les deux levures.

Au cours d'un deuxième essai, le pourcentage total de fruits infectés était de 24,2 % chez le lot non traité (tableau 2). Le trempage à 45 °C suivi d'un bain dans les levures et le NFP a permis une diminution du pourcentage de pommes infectées (4,6 %). La combinaison de ces traitements a également entraîné la disparition



Développement d'un nid de pourriture causé par *B. cinerea*

des infections dues à *B. cinerea* et à *Gloeosporium* spp., ainsi qu'une diminution de 15 % des infections dues à *Penicillium* spp. par rapport au lot non traité (photo 3). Lors de ces deux essais, la qualité technologique des pommes (diamètre, poids, couleur, acidité, degré brix, texture), n'a pas été altérée par le traitement combiné à la chaleur, au Nu-film-P et aux levures (Jijakli et al., 1993).

À l'heure actuelle, ces recherches continuent afin, d'une part, de valider les résultats obtenus lors de ces deux essais et, d'autre part, d'analyser la compatibilité et l'intégration de la lutte biologique à une lutte chimique

moins intensive en conditions proches de la pratique.

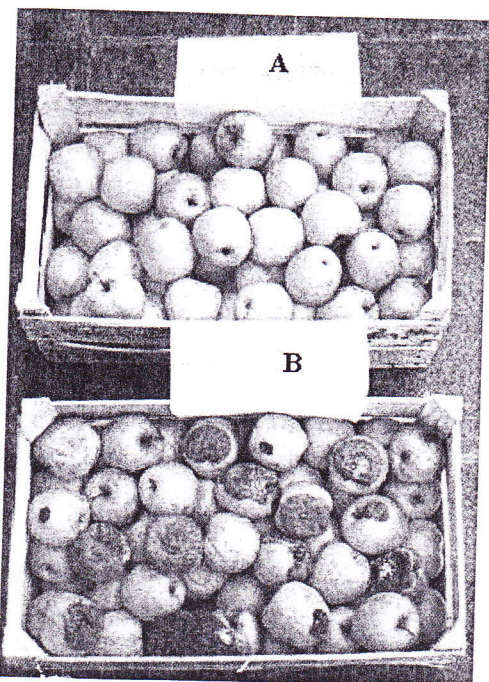
Les biopesticides, un moyen complémentaire

La recherche de moyens de lutte biologique représente une approche attractive pour mener à bien une stratégie de contrôle des maladies de pommes en conservation. Le remplacement de tous les pesticides chimiques par la lutte biologique ne constitue pas un objectif réaliste. Ces biopesticides devront être considérés comme un des moyens disponibles dans une stratégie de lutte intégrée.

TABLEAU 1 : EFFETS SÉPARÉS ET COMBINÉS DE LA THERMOTHÉRAPIE. DES TRAITEMENTS AVEC LES LEVURES ET DE L'APPLICATION D'UN ANTITRANSPIRANT SUR LES MALADIES DES POMMES EN CONSERVATION (1^{ER} ESSAI)

	témoin	45 °C ^a	45 °C +NFP ^b	45 °C + K+O ^c	45 °C+ K+O + NFP	K+O	NFP	NFP + K+O
Infection totale	72,4 ^a	55,2	61,3	50,0	40,2	56,2	57,5	62,5
Gloeosporioses	54,4	4,6	4,6	2,3	1,5	37,7	33,8	41,5
<i>Penicillium</i> spp.	8,2	20,0	32,3	19,2	11,5	3,1	10,0	6,1
<i>Alternaria</i> spp.	4,8	13,1	10,0	10,8	11,5	4,6	5,4	7,7
<i>Fusarium</i> spp.	3,4	7,7	5,4	3,1	6,9	0,8	0,8	2,3
<i>Cylindrocarpon</i> spp.	3,4	3,8	3,8	5,4	6,9	3,8	1,5	3,8
<i>Rhizopus</i> spp.	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Non déterminée	4,1	8,5	11,5	9,2	9,2	10,0	10,0	6,9

a = pourcentage des infections calculé sur 130 pommes ; b = les pommes ont été trempées dans un bain d'eau à 45 °C pendant 10 minutes ; c = les pommes ont été trempées dans une émulsion de NFP (2 %) ; d = les pommes ont été trempées dans une suspension de *P. anomala* souche K et de *C. oleophila* souche O (10⁷ UFC de chaque souche/ml).



Lot A = lot de pommes ayant subi une thermothérapie suivie d'une application des deux levures en suspension dans le Nu film P. Lot B = lot non traité.

Les chances d'aboutir à un produit commercialisé peuvent être limitées par des exigences techniques, économiques et réglementaires, chacune de ces exigences étant essentielle et complémentaire des autres. Nos recherches tentent de rencontrer ces exigences par la réalisation des différentes étapes déjà énumérées. Néanmoins, l'introduction à grande échelle des agents de lutte biologique requiert aussi l'évaluation de leur impact dans l'environnement en vue d'amé-

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bondoux, P. 1992. Maladies de conservation des fruits à pépins, pommes et poires. Ed. INRA et PHM, Paris France, 173 p.
- Cooley, D. R., Wilcox, W. F., Kovach, J. and Schloemann, S. G. 1996. Integrated pest management programs for strawberries in the northeastern United States. *Plant Dis.* 80 : 228-237.
- Fokkema, N. J. 1991. The Phyllosphere as an ecologically neglected milieu : a plant pathologist's point of view. In : *Microbial Ecology of Leaves*, (Andrews J. H. et Hirano S. S., eds). Ed Springer-Verlag, Madison : 3-18.
- Jijakli, M. H., Choutka, C. and Lepoivre, P. 1993. Formulation and integrated use of two antagonistic yeasts to post-harvest treatments against diseases on apples. *Proceedings of an EC Workshop : Biological Control of Fruit and Foliar disease* : 107-117.
- Jijakli, M. H., Lepoivre, P. Tossut, P. and Thonart, P. 1993b. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* on postharvest apples by two antagonistic yeasts. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent* 58 : 1349-1358.
- Jijakli, M. H., Lepoivre, P. and Grevesse G. 1999. Yeast Species for Biocontrol of Apple Postharvest Diseases : an Encouraging Case of Study for Practical Use. In : *Biotechnological Approaches in Biocontrol of Plant Pathogens* (R. K. Upadhyay and K. G. Mukerji, eds.), 31-49.
- Wilson, L. et Wisniewski, M. E. 1994. *Biological control of postharvest diseases : Theory and practice*. Ed. CRC Press, London, UK, 182 p.

liorer la persistance de l'antagoniste et d'évaluer l'impact des méthodes d'application de celui-ci. Cette introduction à grande échelle exige également d'optimiser les processus de production en masse, de séchage et de for-

mulation technique des biopesticides afin que ceux-ci soient économiquement rentables, qu'ils présentent une durée de vie du produit suffisamment longue et permettent une application aisée par l'arboriculteur. L'application pratique d'un biopesticide nécessite encore la réalisation d'essais d'efficacité multi-locaux et la constitution du dossier d'homologation. Ces dernières étapes sont en cours de réalisation dans le souci d'obtenir un produit commercialisable qui tiendra compte des exigences de l'industriel (seuil de rentabilité économique), de l'arboriculteur (efficacité du produit et facilité de son application) et du consommateur soucieux d'un meilleur respect de l'environnement.

M. H. Jijakli*

TABLEAU 2 : EFFETS SÉPARÉS ET COMBINÉS DE LA THERMOTHÉRAPIE, DE LA LUTTE BIOLOGIQUE ET DE L'APPLICATION D'UN ANTITRANSPIRANT SUR LES MALADIES DES POMMES EN CONSERVATION (2^E ESSAI)

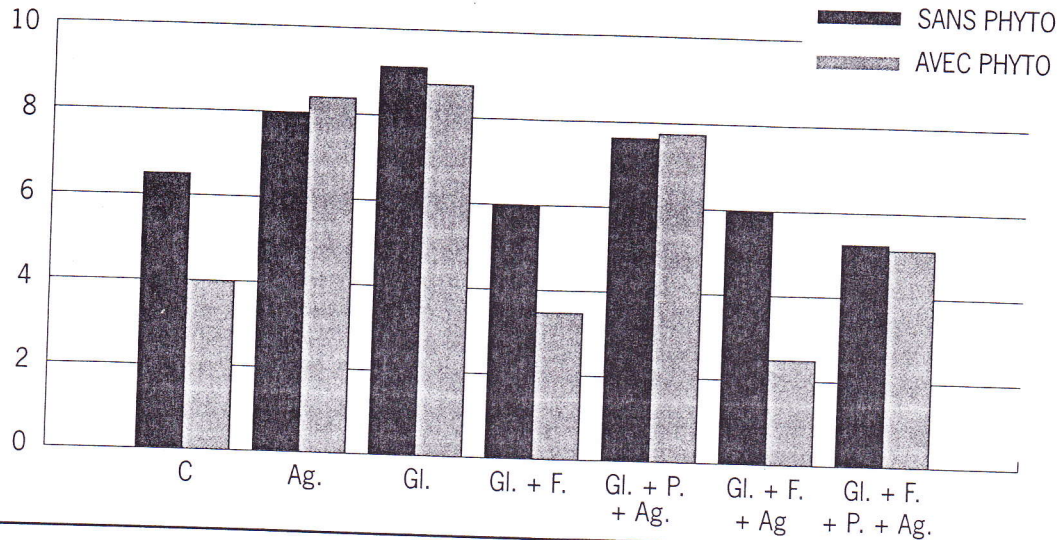
	témoin	45 °C+K+O+NFP ^a
Infection totale	24,2 ^a	4,6
Gloeosporioses	1,5	0,0
Penicillium spp.	18,2	3,8
Botrytis cinerea	6,1	0,0
Fusarium spp.	0,0	0,0
Alternaria spp.	0,0	0,0
Non déterminées	0,8	0,8

a = pourcentage des infections calculé sur 130 pommes ; b = les pommes ont été successivement trempées dans un bain d'eau à 45 °C pendant 10 minutes puis dans une émulsion de NFP (2 %) contenant les deux levures (10⁷ UFC de chaque souche/ml).

* Unité de phytopathologie, passage des Déportés, 2, 5030 Gembloux, Belgique.

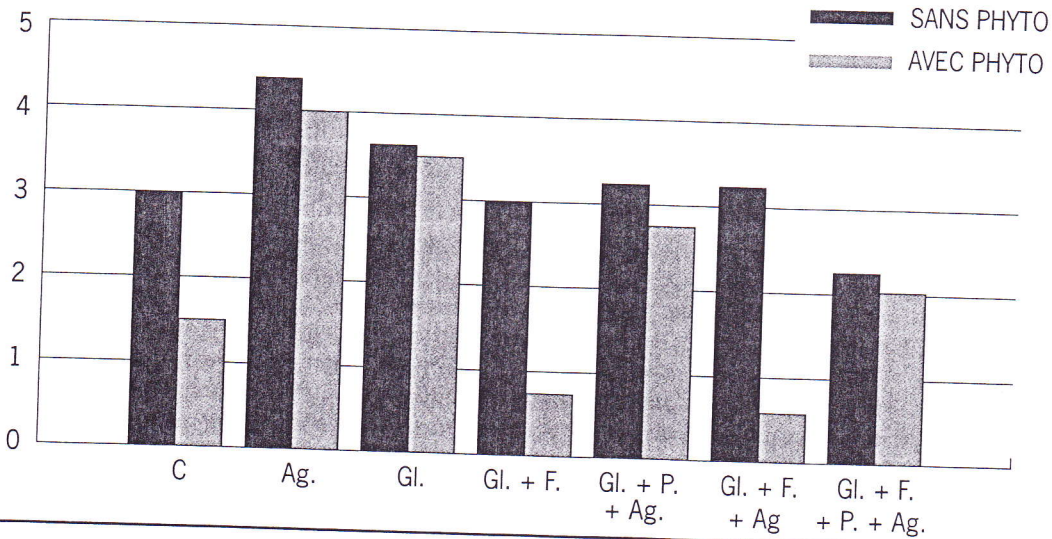


POIDS FRAIS AÉRIEN (g)



← Poids frais aérien (A) et racinaire (B) framboisiers bioçes ou non, onze semaines après inoculation ou non par *Phytophthora fragariae* var. *Rubi*

POIDS FRAIS RACINAIRE (g)



Dans notre numéro de mai, une erreur s'est glissée en page 21. Les couleurs de deux des graphiques de notre article Recherche sur la lutte biologique du framboisier ont été inversées. Voici donc les nouveaux graphiques, revus et corrigés.