

**ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE
D'ALTERNARIA ALTERNATA ET DE
PENICILLIUM EXPANSUM AUX FONGICIDES
LORS DE LA CONSERVATION DES POIRES (*)**

**A. MAOUNI ⁽¹⁾, A. LAMARTI ⁽²⁾, A. DOUIRA ⁽³⁾,
A. BADOUC ⁽⁴⁾**

Cinq fongicides (bénomyl, méthyl-thiophanate, thiabendazole, mancozèbe–métalaxyl et mancozèbe) ont été testés contre Alternaria alternata et Penicillium expansum, agents responsables de la pourriture des poires en conservation. In vitro comme in vivo, les benzimidazoles sont faiblement efficaces sur le développement des différents isolats fongiques étudiés ; par contre, les dithiocarbamates sont moyennement à fortement efficaces. Le problème de la résistance, particulièrement aux benzimidazoles, fongicides permis actuellement en traitement post-cueillette, et le risque de résidus toxiques de dithiocarbamates imposent l'adoption d'autres stratégies de lutte plus efficaces et non polluantes.

(*) *Manuscrit reçu le 15 octobre 2001.*

(1) *Département des Sciences Naturelles, École Normale Supérieure, BP 202, 93150 Martil, Maroc. amaouni@hotmail.com*

(2) *Unité de Biotechnologie et d'Amélioration des plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences M'hannech II, BP 2121, 93002 Tétouan, Maroc. alamarti@fst.ac.ma*

(3) *Laboratoire de Botanique et Protection des plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP 133, 12000 Kénitra, Maroc. douiraallal@hotmail.com*

(4) *Laboratoire de Mycologie et Biotechnologie végétale, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex. jbtalenc@club-internet.fr*

INTRODUCTION

Les pourritures des fruits au cours du stockage entraînent des pertes financières importantes dans de nombreux pays [14]. L'alternariose causée par *Alternaria alternata* [1,3,11-12,17,20] a été observée comme agent responsable de la pourriture des poires aussi bien au verger qu'en conservation (Photo 1). *Penicillium expansum* est également responsable de la pourriture des poires en conservation [4,6,12,15] et cause une pourriture beige ou bleue verte (Photo 2). Le contrôle de ces deux agents est basé essentiellement sur l'usage répété des fongicides. Toutefois, malgré une intense protection phytosanitaire, ces deux moisissures continuent à infliger des pertes parfois importantes des poires comme des pommes en conservation. L'inefficacité de la chimiothérapie peut-être attribuée à l'apparition de souches résistantes au sein des populations de ces deux pathogènes.

L'objectif de ce travail est d'évaluer le niveau de résistance de ces deux champignons vis-à-vis de divers fongicides utilisés au Maroc.

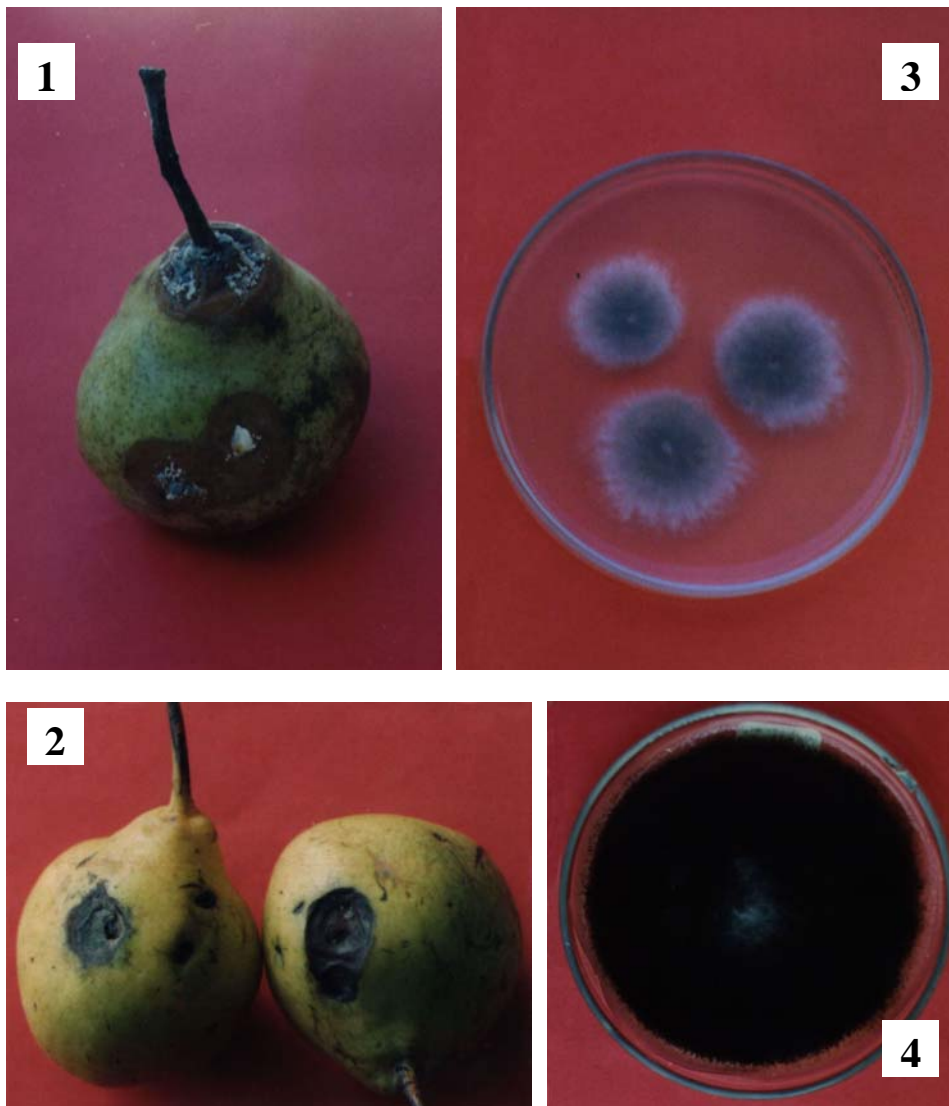
La démarche suivie a été de collecter des isolats fongiques de poires pourries provenant de différentes chambres froides, puis de tester *in vitro* l'efficacité des fongicides sur trois stades du développement fongique et enfin d'évaluer *in vivo* l'efficacité des fongicides sur les isolats les plus agressifs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches fongiques

Alternaria alternata et *Penicillium expansum* sont les espèces les plus rencontrées et les plus redoutables sur les poires en conservation au Maroc. Les isolats (cinq de chaque espèce) utilisés dans cette étude proviennent de variétés et de chambres froides différentes.

Un isolat de chaque espèce a été retenu pour son agressivité. Ces isolats se développent bien sur le milieu MEA (Malt Extract Agar, Photos 3 et 4), atteignant un diamètre de 4 et 7 cm en 7 jours, respectivement pour *A. alternata* et *P. expansum*. Ils se développent aussi correctement sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et produisent des lésions très larges sur les poires en conservation.



Pourritures des poires en conservation.

- 1 : *Pourriture bleue verte due à Penicillium expansum sur une poire 'Williams'.*
- 2 : *Pourriture lenticellaire due à Alternaria alternata sur une poire 'Louise Bonne d'Avranche'.*
- 3 : *Colonies de P. expansum après 7 jours sur milieu MEA (Malt Extract Agar).*
- 4 : *Colonies d'A. alternata après 20 jours sur milieu MEA.*

Ils ont été maintenus sur le milieu PDA. Afin de maintenir le degré d'agressivité, des repiquages ont aussi eu lieu périodiquement sur des poires.

Fongicides testés

Les fongicides les plus commercialisés au Maroc pour lutter contre les maladies cryptogamiques des fruits ont été retenus et utilisés aux doses homologuées. Ils appartiennent à deux familles :

- les benzimidazoles : bénomyl 50 % (Benlate, 60 g/hl) ; méthylthiophanate 70 % (Pelt 44, 350 g/hl), thiabendazole (Decco 20S, 150 g/hl)
- les dithiocarbamates : mancozèbe - métalaxyl (Ridomil MZ 58, 300 g/hl) et mancozèbe 80 % (Dithane M 45, 160 g/hl).

Essais *in vitro*

• Effet des fongicides sur la germination conidienne

Une suspension de spores (10^5 spores /ml) a été étalée à la surface de trois boîtes de Petri contenant un mélange agar-fongicide. Les fongicides ont été ajoutés au milieu gélosé encore en fusion. Le comptage des spores germées a été effectué après 24 heures d'incubation à 25 °C et à l'obscurité en trois points séparés sur un total à chaque fois de 100 spores. Cet essai a été répété trois fois.

• Effet des fongicides sur la croissance mycélienne

Les solutions de chaque fongicide ont été incorporées au milieu MEA encore en fusion et le mélange a été coulé sur des boîtes de Petri. Pour chaque test, trois essais ont été effectués, trois boîtes ont été utilisées par essai et, dans chaque boîte, l'inoculation a été effectuée par trois disques mycéliens de 5 mm issus de culture âgée de 10 à 15 jours. La croissance mycélienne a été évaluée après dix jours d'incubation à 25 °C par mesure du diamètre des colonies.

• Effets des fongicides sur la sporulation

Pour neuf colonies des cultures ayant servi pour la croissance mycélienne, pour chaque colonie, quatre disques de 5 mm de diamètre ont été prélevés à leur bordure et placés dans un tube contenant 1 ml d'eau distillée. Après écrasement des quatre disques et agitation au vortex, on effectue la moyenne de trois comptages à l'aide d'une cellule de Malassez.

• *Efficacité des fongicides*

L'efficacité (pourcentage d'inhibition) de chaque fongicide est déterminée selon la formule ci-dessous :

$$E(\%) = \frac{X - Xi}{X} \times 100$$

X : Estimation de la germination, de la croissance ou de la sporulation dans un milieu sans fongicide (témoin)

Xi : Estimation de la germination, de la croissance ou de la sporulation en présence du fongicide (essai).

Essais *in vivo*

Dans cet essai, des poires de la variété 'Passe Crassane', préalablement stérilisées à l'hypochlorite de sodium, ont été inoculées par des fragments mycéliens 24 heures après blessure et traitement fongique [12]. Les fruits ainsi traités ont été répartis séparément dans des sachets en plastique à 100 % d'humidité relative et ont été conservés à l'obscurité pendant deux mois à 4 °C ou pendant 10 jours à 25 °C [12]. L'efficacité de chaque fongicide est déterminée selon la formule ci-dessous :

$$E(\%) = \frac{D - Di}{D} \times 100$$

D : Diamètre de la pourriture du fruit témoin

Di : Diamètre de la pourriture du fruit traité par le fongicide

Pour chaque test, trois essais ont été effectués et pour chaque essai, trois poires inoculées en trois points de leur région équatoriale ont été utilisées.

L'analyse statistique des résultats *in vitro* et *in vivo* a été réalisée par le test "Duncan's multiple range" au seuil de 5 % [19].

RÉSULTATS

Action des fongicides benzamidazolés *in vitro*

Le Tableau I met en évidence une variabilité de résistance des souches pour les deux champignons. Ainsi, la souche 4 de *Penicillium expansum* semble relativement résistante.

Tableau I :
Efficacité (pourcentage d'inhibition) de 3 fongicides benzimidazolés sur
3 stades de vie
d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium expansum*

Moyenne de 27 résultats pour la germination (Germin.) et la croissance et
de 9 pour la sporulation (Sporul.). Pour une même
colonne et une même espèce, 2 résultats suivis de la même lettre ne diffèrent
pas significativement au seuil de 5 %

Variété hôte Isolats	Bénomyl			Méthyl-thiophanate			Thiabendazole		
	Germin.	Croissance	Sporul.	Germin.	Croissance	Sporul.	Germin.	Croissance	Sporul.
Alternaria									
1 <i>Williams</i>	36,3	24,5 ^a	32,6 ^a	23,6 ^a	32,3 ^a	10,0 ^{ab}	4,0 ^c	31,6 ^a	11,6 ^a
2 <i>Passe Crassane</i>	20,1 ^j	10,1 ^{bc}	29,0 ^{at}	24,0 ^a	20,6 ^b	11,3 ^{ab}	8,0 ^b	21,0 ^b	5,3 ^d
3 <i>Beurré Hardy</i>	17,1 ⁱ	10,8 ^b	21,3 ^c	28,0 ^a	20,0 ^b	7,0 ^c	11,3 ^a	20,0 ^b	8,6 ^{bc}
4 <i>Williams</i>	11,9 ^g	7,8 ^c	8,6 ^d	17,3 ^c	20,0 ^b	8,0 ^{bc}	4,3 ^c	16,0 ^c	10,6 ^{ab}
5 <i>Louise Bonne d'Avranches</i>	18,1 ^h	26,1 ^a	25,0 ^{bc}	19,3 ^b	14,0 ^c	10,0 ^{ab}	10,0 ^a	18,0 ^c	7,0 ^{cd}
Penicillium expansum									
1 Williams	35,6	34,0 ^{ab}	48,6 ^a	36,3 ^a	12,3 ^b	39,0 ^a	31,6 ^c	65,0 ^{ab}	27,6 ^a
2 <i>Docteur Jules Guyot</i>	35,3	31,3 ^b	34,3 ^b	29,3 ^b	14,0 ^b	11,3 ^{cd}	26,6 ^c	40,6 ^c	11,6 ^c
3 <i>Passe Crassane</i>	28,0 ^j	22,0 ^c	25,3 ^c	35,0 ^a	18,6 ^a	23,3 ^b	51,3 ^a	70,0 ^a	18,6 ^{bc}
4 <i>Williams</i>	24,6 ^g	19,3 ^c	18,0 ^d	17,3 ^c	10,0 ^b	7,0 ^d	42,6 ^b	31,6 ^d	12,6 ^c
5 <i>Passe Crassane</i>	31,3	38,3 ^a	28,0 ^c	20,6 ^c	18,0 ^a	14,0 ^c	50,0 ^a	61,6 ^b	21,3 ^{ab}

Les isolats d'*A. alternata* ont montré globalement un fort niveau de résistance. Les isolats de *P. expansum* ont montré également une résistance importante vis-à-vis du bénomyl et du méthyl-thiophanate : l'inhibition est toujours inférieure à 50 % sur les trois stades de vie. Cependant, ils sont moins résistants au thiabendazole au cours de la germination et de la croissance. Le bénomyl donne les moins mauvais résultats pour l'inhibition de la sporulation des deux genres.

Action des fongicides dithiocarbamates *in vitro*

L'analyse du Tableau II montre à nouveau une certaine résistance de la souche 4 de *Penicillium expansum*. Le mancozèbe-métalaxyl est très efficace sur la germination, moyennement sur la croissance et très faiblement sur la sporulation des isolats des deux espèces.

Tableau II :

Efficacité de 2 fongicides dithiocarbamates sur 3 stades de vie d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium expansum*

Moyenne de 27 résultats pour la germination (Germin.) et la croissance et de 9 pour la sporulation. Sur une même colonne et pour une espèce, 2 résultats suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %

Isolats	Mancozèbe – Métalaxyl			Mancozèbe			
	Germin.	Croissance	Sporulation	Germin.	Croissance	Sporulation	
<i>Alternaria alternata</i>	1	90,3 ^a	55,6 ^{cd}	20,6 ^a	99,6 ^a	100 ^a	100 ^a
	2	91,3 ^a	61,6 ^b	20,0 ^{ab}	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	3	82,6 ^b	56,6 ^{bc}	11,6 ^{cd}	100 ^a	89,3 ^c	18,3 ^b
	4	94,0 ^a	71,6 ^a	15,0 ^{bc}	99,6 ^a	88,0 ^c	8,0 ^b
	5	72,0 ^c	50,6 ^d	8,6 ^d	100 ^a	95,0 ^b	46,6 ^b
<i>Penicillium expansum</i>	1	97,3 ^a	52,0 ^b	23,3 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	2	92,3 ^a	54,0 ^{ab}	20,0 ^a	100 ^a	81,6 ^c	9,3 ^b
	3	96,3 ^a	61,6 ^a	18,6 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
	4	81,6 ^b	49,3 ^b	13,3 ^a	100 ^a	87,0 ^b	8,0 ^b
	5	71,6 ^c	50,0 ^b	20,0 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Le mancozèbe est très efficace sur la germination et la croissance de tous les isolats. Il est également très efficace sur la sporulation de certains isolats des deux espèces et peu pour les autres.

L'ensemble des isolats fongiques sont donc très sensibles aux fongicides dithiocarbamates au cours de la germination et de la croissance. Toutefois, la sporulation n'est pas fortement affectée chez les isolats qui arrivent à croître.

Effet *in vivo* des fongicides sur la pourriture des poires

In vivo (Tableau III), le bénomyl, le méthyl-thiophanate et le thiabendazole sont peu efficaces vis-à-vis des deux champignons. Le mancozèbe-métalaxyl et surtout le mancozèbe sont plus efficaces. Les fongicides donnent de meilleurs résultats pour une conservation à 4 °C plutôt qu'à 25 °C.

Tableau III :

Efficacité *in vivo* de 5 fongicides sur le développement de 2 agents responsables de la pourriture des poires après stockage 2 mois à 4 °C ou 10 jours à 25 °C

Moyenne de 27 résultats. Sur une même colonne, 2 résultats suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %

Fongicides aux doses homologuées	<i>Alternaria alternata</i> Isolat 3		<i>Penicillium expansum</i> Isolat 2	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
Bénomyl	22,3 ^c	8,6 ^c	8,6 ^e	6,0 ^d
Méthyl-thiophanate	48,3 ^b	33,3 ^b	21,6 ^d	7,3 ^c
Thiabendazole	49,0 ^b	37,3 ^b	31,6 ^c	10,6 ^c
Mancozèbe-métalaxyl	66,6 ^a	48,3 ^b	47,6 ^b	20,6 ^b
Mancozèbe	70,0 ^a	55,0 ^a	75,0 ^a	26,6 ^a

Globalement, les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* sont comparables.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* montrent qu'*Alternaria alternata* et *Penicillium expansum* présentent une résistance vis-à-vis des fongicides benzimidazolés. Des résultats similaires sont notés chez *P. expansum* pour des pommes et des poires [21]. La résistance aux benzimidazoles est signalée également chez *Botrytis cinerea* pour des tomates [2,7].

L'utilisation répétée de ces fongicides systémiques et leur persistance pendant de longues période de conservation [16] a probablement entraîné une pression de sélection continue et conduit à l'émergence de souches résistantes. Par ailleurs, ces fongicides systémiques se lient avec une protéine des microtubules, arrêtant ainsi les divisions cellulaires [5]. Cette action uni-site pourrait faciliter l'apparition de souches résistantes.

Les fongicides dithiocarbomates, représentés par le mancozèbe-métalaxyl et le mancozèbe, ont donné des résultats très satisfaisants sur la germination des deux espèces étudiées. Cependant, ces fongicides ont un effet moindre sur la sporulation des deux espèces *in vitro*.

La fongitoxicité des ces produits, justifiée principalement au cours de la germination, résulte de leur interaction avec des groupements amines et hydroxyles d'enzymes intervenant dans le processus de respiration [9-10,13,18]. Du fait de cette action multi-site, ces fongicides sont potentiellement peu exposés à la résistance [8].

L'utilisation des fongicides benzimidazolés contre les maladies de conservation risque donc d'augmenter la fréquence de souches résistantes. Malgré la sensibilité des deux espèces aux dithiocarbomates, ces produits très toxiques ne sont autorisés qu'en traitement pré-récolte avec un grand délai d'emploi, afin d'éviter les résidus qu'ils peuvent laisser sur les fruits s'ils sont utilisés trop tardivement. La maîtrise des maladies de conservation nécessite donc l'adoption d'autres stratégies de lutte plus efficaces et non polluantes : chimique (sels de calcium), biologique (antagonistes), génétique (sélection de variétés résistantes), biotechnologique ou encore raisonnée et intégrée.

RÉFÉRENCES

- 1 - Amrani (N.), Najim (L.) - Contribution to a study microscopical fungal flora of Morocco. 2. *Alternaria alternata* : microsclerotia and chlamydospores. - *Cryptogam., Mycol.*, 1985, **6**(4), 265-270.
- 2 - Besri (M.), Diatta (F.) - Résistance de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise de la tomate aux benzimidazoles, dicarboximides et sulfamides. - *Bull. OEPP*, 1985, **15**, 379-386.
- 3 - Bondoux (P.), Bompeix (G.), Morgat (F.), Viard (P.) - *Les principales pourritures des pommes et des poires en conservation*. Paris : INVUFLEC, 1969, 76 p.
- 4 - Bondoux (P.) - *Maladies de conservation des fruits à pépins : pommes et poires*. - Paris : INRA, PHM, Rev. Hortic., 1992, 173 p.
- 5 - Davidse (L.C.), Flach (W.) - Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. - *Biochim., Biophys. Acta*, 1978, **543**(1), 82-90.
- 6 - El Hassani (N.) - Influence des traitements chimiques au Drencher sur l'incidence des pourritures à *Penicillium expansum* sur poires en conservation. - Mémoire 3^e cycle agronomie (option phytopathologie), I A V H – Rabat, 1991, 176 p.
- 7 - Hmouni (A.), Hajlaoui (M.R.), Mlaiki (A.) - Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomates en Tunisie. - *Bull. OEPP*, 1996, **26**, 697-705.
- 8 - Leroux (P.) - Prévoir, une résistance peut en cacher une autre. - *Perspect. Agric.*, 1993, **185**, 95-98.
- 9 - Leroux (P.), Moncomble (D.) - Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne. Passé, présent, futur (1^{re} partie). - *Phytoma*, 1993a, (450), 27-30.
- 10 - Leroux (P.), Moncomble (D.) - Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne. Passé, présent, futur (2^e partie). - *Phytoma*, 1993b, (451), 23-27.
- 11 - Lockart (C.L.), Forsyth (F.R.) - *Alternaria alternata* storage decay of pears. - *Can. Plant Dis. Survey*, 1974, **54**, 101-102.

- 12 - Maouni (A.), Lamarti (A.), Douira (A.), Badoc (A.) - Effet des dérivés calciques sur le développement de moisissures lors de la conservation des poires. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2001, **140**(1-4), 79-88.
- 13 - Owens (R.G.) - Chemistry and physiology of fungicidal action. - *Ann. Rev. Phytopath.*, 1963, **1**, 77-100.
- 14 - Palazón (I.), Palazón (C.), Robert (P.), Escudero (I.), Munôz (M.), Palazón (M.) - Estudio de los problemas de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza. - 1984, *Diputación Provincial Zaragoza Publicitaión no. 990, Institución Fernando El Católico*, 68 p.
- 15 - Pierson (C.F.), Leponis (M.J.), McColloch (L.P.) - Market diseases of apples, pears and quinces. - U.S. Agric., 1971, Agric. Hanbook 376. U.S. Govt. Printing office, Washington, DC.
- 16 - Prusky (D.), Basak (M.), Ben Arie (R.) - Development, persistence, survival, and strategies for control of thiabendazole-resistant strains of *Penicillium expansum* on pome fruits. - *Phytopathology*, 1985, **75**(8), 877-882.
- 17 - Selmaoui (K), Douira (A.) - Microsclerotia in *Alternaria alternata*. - *Phytopathol. Médit.*, 1999, **38**(1), 43-46.
- 18 - Sijpesteijn (A.K.) - Biochemical modes of action of agricultural fungicides. - *Wld. Rev. Pest. Control*, 1970, U.K., **9**, 85-93.
- 19 - StatSoft France - *Statistica pour Windows 1997*. StatSoft France, 72, quai des Carrières, 94220 Charenton-le-Pont. Tél. : 01 45 18 59 99, Fax : 01 45 18 52 85, www.statsoft.com.
- 20 - Tak (S.K.), Verma (O.P.), Pathak (V.N.) - Factors affecting conidial germination of *Alternaria alternata* (Fries) Keissler causing fruit rot of apple. - *Korean J. Plant Protection*, 1986, **24**, 129-133.
- 21 - Wicks (T.) - Tolerance to benzimidazole fungicides in blue mold (*Penicillium expansum*) on pears. - *Plant Dis. Rep.*, 1977, **61**(6), 447-449.

ABSTRACT

Study of *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* resistance to fungicides during the conservation of pears

Five fungicides (benomyl, methyl-thiophanate, thiabendazol, mancozebe-metalaxyl and mancozebe) were tested against *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum*, the more often isolated species from decayed pears after several months storage. *In vitro* as *in vivo*, the efficacy of benzimidazoles was shown to be weak and without any practical interest against the different strains of both fungi; however, the efficacy of dithiocarbamates was shown to be average to good.

The probleme of resistance of benzimidazoles and the risk of toxic residues of dithiocarbamates impose the adoption of other fighting strategies, more efficient and non pollutant.

Key-words: *Alternaria alternata*, conservation, fungicides, pear, *Penicillium expansum*.
