

## Effet, in vitro et in vivo, de quelques fongicides sur le développement de la pourriture des pommes en conservation due à *Alternaria tenuis* Nees

Selmaoui K.<sup>1</sup>, Boubaker A.<sup>2</sup> et Douira A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Botanique, Faculté des sciences de Kénitra, Université Ibn Tofail, Maroc

<sup>2</sup> Laboratoire de phytopathologie, Institut National Agronomique de Tunis .43, Avenue Charles Nicolle, 1002 Tunis, Tunisie

### Résumé

*Cinq fongicides : le bénomyl, le chlorothalonil, le métyl-thiophanate, le mancozèbe et l'iprodione, ont été testés contre Alternaria tenuis, agent causal de la pourriture des pommes en conservation.*

*In vitro, le chlorothalonil, le mancozèbe et l'iprodione ont totalement inhibé la germination des conidies du parasite. Alors que l'iprodione et le mancozèbe ont empêché le développement mycélien.*

*In vivo, l'iprodione était le fongicide le plus efficace contre l'évolution de la pourriture des pommes en conservation.*

**Mots clés :** *Alternaria tenuis*, pommes, conservation, pourriture, fongicides

### Abstract : In vivo and in vitro activity of some fungicides on development of post harvest disease of apple caused by *Alternaria tenuis* Nees

*Five fungicides : benomyl, chlorothalonil, methyl-thiophanate, mancozeb and iprodione, were tested in vitro and in vivo against Alternaria tenuis. In vitro, conidia germination of Alternaria tenuis was completely inhibited by chloronthalonil, mancozebe and iprodione. Iprodione and mancozeb inhibited mycelial growth of fungi.*

*In vivo, iprodione was the most effective fungicide for controlling apple rot development during the storage.*

**Key words :** *Alternaria tenuis*, apple, storage, rot, fungicides

## ملخص : دراسة مفعول بعض المبيدات الفطرية على تطور مرض التفاح المخزن الناتج عن الإصابة بفطر *Alternaria tenuis* Nees

سلماتي ك. 1، بوبكر ع. 2، ادوية ع. 1

1 مختبر البيولوجيا النباتية، كلية العلوم، القنيطرة، جامعة ابن طفيل، المغرب

2 مختبر أمراض النباتات، المعهد الوطني الفلاحي، تونس، شارع شارل نيكول، 1002 تونس، تونس

في هذه الدراسة، استعملت خمسة مبيدات فطر لمكافحة *Alternaria tenuis* Nees التي تسبب تعفن التفاح طيلة خزنه. ففي بيئة مصطنعة، أظهر كل من mancozèbe و chlorothalonil و iprodione قدرتهم على كبح نمو أبواغ *Alternaria tenuis* بصفة نهائية. كما أظهر المبيد الأول والثالث فعالية كبيرة على النمو المشيجي للفطر. أما الجسم الحي، فقد استطاع iprodione كبح تطور جروح التفاح المخزن.

الكلمات المفتاحية : *Alternaria tenuis*، مبيدات فطر، تفاح، خزن وتعفن

## Introduction

Les maladies de conservation sont au premier rang des préoccupations des producteurs de poires et de pommes. Elles constituent un problème majeur en arboriculture fruitière. Ces affections entraînent pendant la période de conservation des pertes très importantes, pouvant toucher parfois la moitié de la récolte et les fruits atteints sont rapidement inutilisables.

En France, Bondoux et al. (1969) ont montré l'existence de plus de 40 espèces de champignons qui sont susceptibles de provoquer des pourritures sur pommes et poires, et dont l'importance est inégale.

L'Alternariose causée par *Alternaria tenuis* est l'une des maladies identifiées sur les pommes et les poires aussi bien au verger qu'en conservation. Ce champignon a été observé auparavant en France (Bondoux et al., 1969), au Canada (Lockhart et forsyth, 1974), au Maroc (Amrani et Najim, 1985) et en Inde (Tak et al., 1986).

Une enquête effectuée par Bernard et al. (1993) dans les stations fruitières de France a révélé que plus de 13% des pertes survenues au cours de la conservation sont dues à la présence d'un ensemble de champignons parmi lesquels figure le genre *Alternaria*, les 87% sont dues essentiellement à la tavelure et au Bitter Pit.

En Tunisie, lors de la prospection de 3 chambres froides, nous avons identifié quelques espèces de champignons responsables de la pourriture des pommes : *Penicillium sp.*, *Botrytis sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus sp.*, et *Alternaria tenuis* et les pertes dues à ce champignon ont été estimées à plus de 9%.

Vu les dégats causés par *A. tenuis*, on se propose dans ce travail de tester l'efficacité in vitro et in vivo de 5 matières actives sur ce champignon afin de diminuer l'incidence de la maladie sur les pommes en conservation.

## Matériel et Méthodes

### Isolement du parasite responsable de la pourriture des pommes

L'isolement d'*Alternaria tenuis* a été réalisé à partir des pommes en conservation dans des chambres frigorifiques de la région de Monastir (Tunisie) et présentant les symptômes de l'alternariose. Les pommes ont été désinfectées par l'hypochlorite de sodium à 5% et les fragments ont été par la suite découpés et déposés sur milieu de culture PDA (pomme de terre : 200g ; glucose : 20g ; Agar : 20g et 1000 ml d'eau distillée) coulé en boîtes de Petri stériles. Par la suite, les boîtes ont été incubées à l'obscurité à une température de 25 °C. La purification des thalles isolés est obtenue après plusieurs repiquages successifs et clonage monospore. L'identification a été effectuée par examen au microscope optique des prélèvements des structures conidiennes sur le PDA.

### Matériel végétal

La variété de pomme tunisienne " Aziza " a été utilisée dans les tests d'infection des pommes par *A. tenuis* et dans les essais de traitements chimiques.

### Les fongicides utilisés

Le tableau 1 résume les propriétés chimiques des fongicides testés pour leur effet toxique sur la germination conidienne et la croissance mycélienne du parasite.

**Tableau 1.** Propriétés chimiques des fongicides utilisés dans les essais

Matière active	nom commercial	groupe des fongicides	dose homologuée	mode d'action
Chlorothalonil 75%	Daconil 2787w75	dérivés du benzène	150 g/hl	contact
Iprodione 50 %	Rovral	dicarboximide	75 g/hl	contact
Mancozèbe 80%	Dithane M45	dithiocarbamate	160 g/hl	contact

Méthyl thiophanate 70%	- Pelt44	acide carbamique	350 g/hl	systémique
Bénomyl 50%	Benlate	acide carbamique	200 g/hl	systémique

## Essais in-vitro

### Action des fongicides sur la germination conidienne

La technique utilisée dans cette partie s'inspire de celle d'Horsfall (1956). Elle consiste à répartir, d'une façon homogène sur des lames à concavité, la suspension des fongicides à différentes concentrations. La suspension de spores a été par la suite mise en contact avec le fongicide.

Avec chaque fongicide, on crée une mince pellicule sur les parois de la concavité de la lame en évaporant l'eau à l'aide d'une plaque chauffante à 40°C. Ce phénomène est comparable à ce qui se passe dans la nature après pulvérisation d'un produit chimique. Par la suite, chaque lame reçoit 70µl d'une suspension de spores de concentration 10<sup>5</sup> spores/ml provenant d'une culture âgée de 20 jours. Les lames sont ensuite placées dans une chambre humide à une température de 25°C en obscurité totale.

Les fongicides sont testés aux doses suivantes : D.H. (Dose Homologuée), 20%, 10%, 2%, et 1% D.H.

### Action des fongicides sur la croissance mycélienne

Cet essai permet d'évaluer l'effet curatif des fongicides, à différentes concentrations, à l'égard du mycélium. La technique utilisée est celle établie par Faddoul et Albertini (1974) et Bendahmane *et al.* (1992). Chaque fongicide a été incorporé aseptiquement dans le milieu de culture PDA maintenu en surfusion à une température de 40°C. L'inoculation s'effectue en déposant des rondelles de gélose, de 4 mm de diamètre, portant le mycélium au centre des boîtes de Petri. La croissance mycélienne est enregistrée quotidiennement en mesurant le diamètre moyen des colonies. Les doses des fongicides utilisées sont identiques à celles testées dans la germination conidienne.

## Essais in vivo

Dans cet essai, des pommes de la variété tunisienne " Aziza " présentant le même stade de maturation ont été blessées par une aiguille fine de 1 mm de diamètre, et inoculées par des fragments mycéliens d'*Alternaria tenuis* provenant d'une culture âgée de 20 jours. Ces pommes ont été placées dans deux chambres humides (humidité relative de 100%), l'une est réglée à une température de 5°C reproduisant ainsi les conditions de conservation des pommes dans

les chambres frigorifiques, et l'autre réglée à une température de 25°C (température optimale de développement d'*A. tenuis* (Selmaoui, 1995)).

Les traitements chimiques ont été effectués une semaine après l'infection par trempage des pommes dans les différentes solutions de fongicides préparées selon les doses d'homologation.

Le dispositif expérimental complètement aléatoire comporte cinq traitements avec dix répétitions et chaque répétition comporte 10 pommes. Le témoin est constitué par des pommes infectées et non traitées. La mesure du diamètre moyen des lésions est effectuée sur une durée de 15 jours à raison d'une mesure tous les trois jours.

## Résultats

Sur les pommes infectées par *A. tenuis*, on a observé des lésions peu profondes souvent localisées sur la peau fragile, caractérisée par des cercles de couleur brun noir, irréguliers et de consistance molle (Fig. 1).

L'observation microscopique a révélé que les conidies d'*A. tenuis* sont de couleur olive à noir et fréquemment ovoïdes. Elles sont pourvues d'un bec court et s'assemblent en culture pure en chaîne très longue, la majorité des conidies présentent 1 à 7 septa transversaux et 1 à 3 septa longitudinaux (Fig. 2).

Figure 1. Pommes présentant les symptômes de l'alternariose : a- début d'attaque d'*A. tenuis*, b- pourriture à contour irrégulier, de consistance molle et de couleur brune

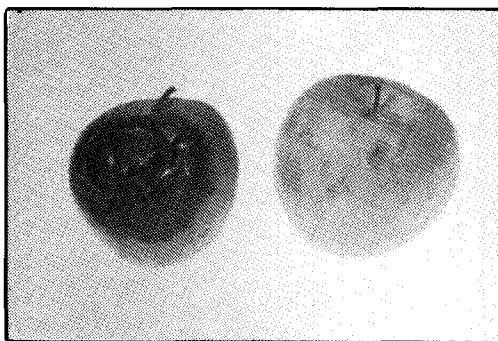
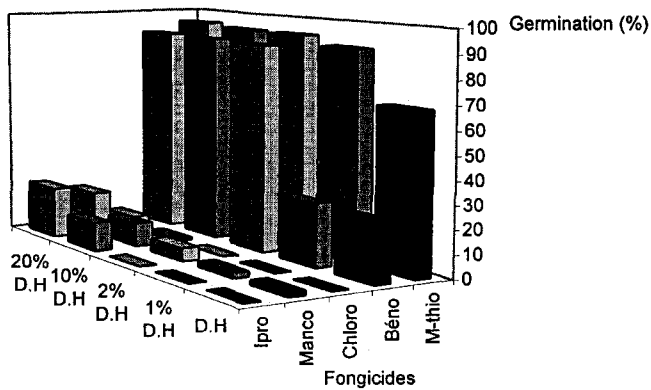


Figure 2. Mycélium (a) et spores caractéristiques d'*A. tenuis* grossissement (x 400)



### Action des fongicides sur la germination conidienne

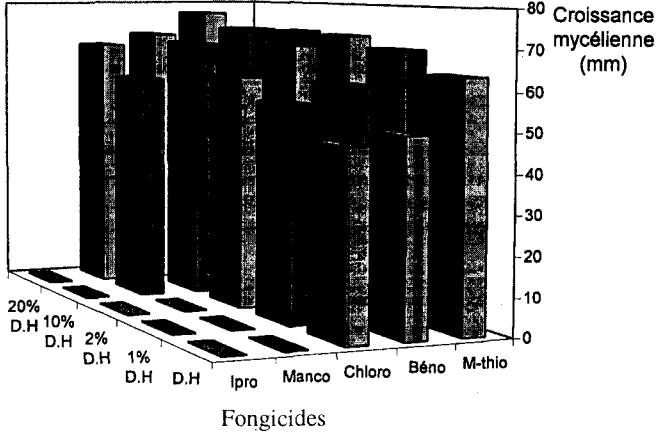
La germination conidienne est totalement inhibée par l'iprodione et le chlorothalonil à des doses élevées (la dose homologuée, 20% et 10% de la dose homologuée) (Fig. 3). Le mancozèbe, à différentes doses, n'est pas aussi efficace que les fongicides précédents. En effet, un certain pourcentage de germination des spores a été observé. Les autres fongicides testés (bénomyl et méthyl-thiophanate) n'empêchent pas la germination conidienne, même à des doses élevées. L'analyse statistique des résultats par le test de Newman et Keuls au seuil de 5% n'a révélé aucune différence significative entre l'iprodione et le chlorotalonil aux doses inhibitrices de la germination conidienne. Le chlorotalonil, à des doses faibles, a donné des résultats similaires à ceux obtenus avec le mancozèbe à des doses élevées.



**Figure 3.** Action des différentes doses des fongicides sur la germination conidienne d'*A. tenuis* (après 24 h)

### Action des fongicides sur la croissance mycélienne

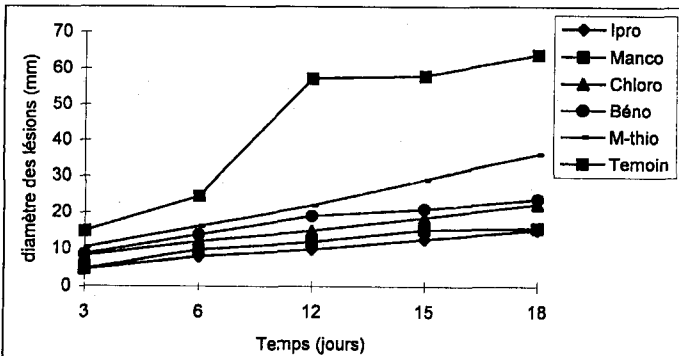
L'étude de l'efficacité des fongicides sur la croissance mycélienne, montre que seuls l'iprodione et le mancozèbe inhibent totalement la croissance mycélienne et ceci aux différentes doses de l'iprodione et à des doses élevées du mancozèbe (20%, 10% de D.H et la dose homologuée) (Fig. 4). Les autres produits testés, même aux doses homologuées, ont permis la croissance mycélienne du parasite. La comparaison des moyennes de la croissance mycélienne par le test de Newman et Keuls au seuil de 5% permet de classer les fongicides en deux groupes selon leur efficacité sur la croissance mycélienne. Le premier groupe constitué par l'iprodione aux différentes doses et le mancozèbe aux doses élevées : 20%, 10% de la D.H et la dose homologuée. Le deuxième groupe comprend le benomyl, le chlorothalonil et le méthyl-thiophanate aux différentes doses et le mancozèbe aux doses les plus faibles.



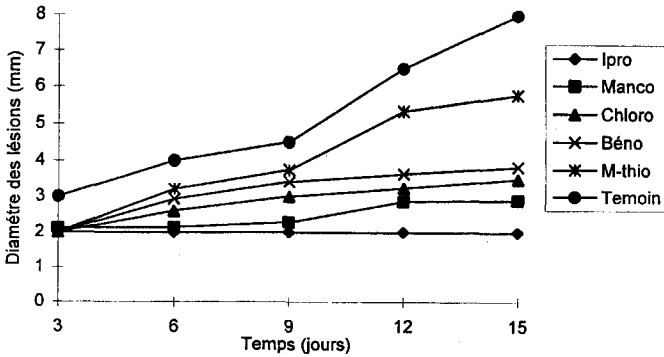
**Figure 4.** Action des différentes doses des fongicides sur la croissance mycélienne d'*A. tenuis* (après 15j)

### Essai in vivo

Les résultats relatifs à l'action des fongicides sur l'évolution de la pourriture provoquée par *A. tenuis* sur les pommes sont représentés sur les figures 5 et 6. L'iprodione, le mancozèbe et le chlorothalonil diminuent la progression du champignon sur les pommes aussi bien à 5°C qu'à 25°C. Ces produits ont permis une diminution du diamètre des lésions à plus de 50% par rapport au témoin infecté et non traité à une température de 25°C, alors qu'à 5°C l'iprodione a totalement inhibé l'évolution du champignon puisque le diamètre des lésions n'a pas dépassé 2 mm. Le méthyl-thiophanate et le benomyl ont une action significativement moins importante que les matières actives citées auparavant.



**Figure 5.** Evolution de la pourriture des pommes en des matières actives et du temps à 25°C



**Figure 6.** Evolution de la pourriture des pommes en fonction des matières actives et du temps à 5°C

Les analyses statistiques de la variance montrent qu'aucune différence significative n'a été enregistrée d'une part, entre l'iprodione, le mancozèbe et le chlorothalonil, et d'autre part, entre le bénomyl et le méthyl-thiophanate.

## Discussion

Les fongicides utilisés dans ces essais sont soit des produits préventifs ou des produits curatifs. En tenant compte des résultats obtenus *in vitro*, il est à noter que l'iprodione, le chlorothalonil et le mancozèbe (fongicides de contact) sont plus efficaces dans l'inhibition de la germination que les produits systémiques tels que le méthyl-thiophanate et le bénomyl. Ceci peut être dû à la différence du mode d'action de ces deux groupes de fongicides.

Les conidies absorbent rapidement les fongicides de contact et les accumulent dans les structures intracellulaires où ils réagissent avec des groupements amines et hydroxyles des enzymes respiratoires (Owens, 1963 ; Sijpesteijn, 1970 ; Bendahmane *et al.*, 1992). Ils empêchent ainsi, la production d'énergie nécessaire à l'émission et à l'élongation du tube germinatif.

Par ailleurs, les fongicides systémiques agissent sur les divisions mitotiques. Ce sont des produits unicites dont le nombre de cibles est très limité. Ils peuvent, par conséquent, donner naissance à des souches résistantes de champignons. Contrairement aux produits de contact, ils ont une action négligeable sur la respiration. De ce fait, ils n'affectent pas la production d'énergie cellulaire nécessaire à l'élongation des tubes germinatifs (Leroux, 1989).

L'effet préventif du chlorothalonil et du mancozèbe a été reconnu par plusieurs auteurs (Pscheidt et Stevenson, 1986 ; Pscheidt et Stevenson, 1988 ; Stevenson *et al.*, 1990). Suheri et Latin (1991) ont montré que ces fongicides protecteurs constituent une barrière chimique contre l'infection des melons par *Alternaria cucumerina*. L'effet curatif du chlorothalonil a été



démontré également chez *Fulvia fulva* responsable de la cladosporiose de la tomate (Chebil, 1994) et chez *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise des vignes (R'houma, 1995).

Les produits curatifs méthyl-thiophanate et bénomyl n'ont montré aucune efficacité sur le développement mycélien du parasite testé. Ceci rejoint étroitement les résultats obtenus par Douglas et Groskopp (1974) et diffèrent complètement de ceux obtenus par Ellis et Barrat (1983) et Bondoux (1992) qui ont fait ressortir la très bonne efficacité de ces produits contre *A. tenuis*. L'inefficacité observée peut s'expliquer par l'existence de phénomène de résistance. En effet, l'espèce étudiée a été isolée à partir des pommes pré-traitées par le méthyl-thiophanate avant leur conservation et par conséquent le parasite a probablement développé une résistance vis-à-vis de ce produit.

Outre son action préventive, l'iprodione a montré une action curative contre l'alternariose, il a empêché d'une façon significative l'évolution de la pourriture des pommes placées dans les conditions normales et dans les conditions de stockage. Cependant, les travaux réalisés *in vitro* par Biggs (1994) révèlent que certains isolats d'*A. tenuis* présentent une résistance à l'iprodione par rapport à d'autres qui se montrent très sensibles.

## Conclusion

L'étude de l'action de certains fongicides sur le développement d'*A. tenuis* a révélé que le chlorothalonil, le mancozèbe et l'iprodione ont totalement inhibé la germination des conidies. Alors que sur le développement mycélien, seuls l'iprodione et le mancozèbe ont donné des résultats satisfaisants.

Les résultats des essais réalisés *in vivo* ont montré l'efficacité de l'iprodione sur le développement de la pourriture des pommes.

## Références bibliographiques

- Amrani N. et Najim L. (1985). Contribution to a study of microscopical fungal flora of Morocco. 2. *Alternaria alternata* : microsclerotia and chlamydospores. Cryptogamie, Mycologie. 6 : 265-270.
- Bendahmane B., Barrault G., Albertini L. et Toubia-Rahmane H. (1992). Etude de l'action *in vitro* de divers fongicides sur le développement de *Dreschlera teres f. teres et f. maculata*. Phytopatho. Méditer. 31 : 77-84.
- Bernard J.L., Franclet J., Gaulliard J., Giraud M. et Morgat F. (1993). Maladies des pommes en fin de cycle au verger et durant la conservation. Phytoma. 455 : 50-52.
- Biggs A.R. (1994). Mycelial growth, sporulation and virulence to apple fruit of *Alternaria alternata* isolates resistant to iprodione. Plant Dis. 78 : 732-735.
- Bondoux P., Bompeix G., Morgat F. et Viard P. (1969). Les principales pourritures des pommes et des poires en conservation. INVUFLC, pp 76.
- Bondoux P. (1992). Maladies de conservation des fruits à pépins : pommes et poires. INRA, Paris. pp 173.

- Chebil S. (1994). Quelques aspects de la biologie de *Fulvia fulva*, champignon parasite de la tomate (*Lycopersicon esculentum*). DEA de parasitologie fondamentale et appliquée, Faculté des Sciences de Tunis II. pp 95.
- Douglas D.R. et Groskopp M.D. (1974). Control of early blight in Eastern and South Central Idaho. Am. Potato. J. 51 : 361-368.
- Ellis M.A. et Barrat J.G. (1983). Colonization of delicious apple fruits by *Alternaria spp.* and effect of fungicide sprays on moldy core. Plant Dis. 67 : 150-152.,0
- Faddoul J. et Albertini L. (1974). La lutte chimique contre *Coryneum cardinal* wag. agent du dépérissement des Cyprés. Expérience in vitro. Phytopathologia Méditer. 8 : 29-54.
- Horsfall J.G. (1956). Principales of fungicides action. Chronica Botanica Co. Pub., Walthman, USA. 2 : 15-29.
- Leroux P. (1989). Traité de pathologie végétale. Aspects phytopathologiques de la chimiothérapie. Ed. les presses agronomiques de Gembloux. Belgique. pp 492.
- Lockhart C.L. et Forsyth F.R. (1974). *Alternaria alternata* storage decay of pears. Canadian Plant Disease Survey 54 : 101-102.
- Owens R.G. (1963). Chemistry and physiology of fungicidal action. Ann. Rev. Phytopatho. 1 : 77-100.
- Pscheidt J.W. et Stevenson W.R. (1986). Comparison of forecasting methods for control of potato early blight in Wisconsin. Plant Dis. 70 : 915-920.
- Pscheidt J.W. et Stevenson W.R. (1988). The critical period for control of early blight of potato. Am. Potato. J. 65 : 425-438.
- R'houma A. (1995). Recherches sur *Botrytis cinerea* de la vigne (*Vitis vinifera*) : biologie, pathogénèse et mesures de lutte. Mémoire de 3ème cycle de l'INAT. pp 118.
- Selmaoui K. (1995). Contribution à l'étude d'*Alternaria tenuis* Nees : aspects biologiques et mesure de lutte chimique. DEA de parasitologie fondamentale et appliquée, Faculté des Sciences de Tunis II. pp 71.
- Sijpesteijn A.K. (1970). Biochemical modes of action of agricultural fungicides. Wld. Rev. Pest. Control, U. K. 9 : 85-93.
- Suheri H. et Latin R.X. (1991). Retention of fungicides for control of *Alternaria* leaf blight of muskmelon under greenhouse conditions. Plant Dis. 75 : 1013-1015.
- Tak S.K., Verma O.P et Pathak V.N. (1986). Factors affecting conidial germination of *Alternaria alternata* (Fries) Keissler causing fruit rot of apple. Korean Journal of Plant Protection 24 : 129-133.