

sélection des antagonistes de deux parasites de post-récolte des pommes (*Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*)

Achbani E.H.¹, Mounir R.¹, Jaafari S.²,
Douira A.³, Benbouazza A.¹, Jijakli H.⁴

(1) **INRA Meknès**. Laboratoire de Phytobactériologie et de Lutte Biologique, BP 579 Meknès VN, Maroc, achbani5@yahoo.fr

(2) **Université Moulay Ismail**. Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (UMI-BAP), BP 4010, Meknès, s.jaafari@menara.ma

(3) **Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences**. Laboratoire de Biologie et de Protection des Cultures, BP : 133, 14000 Kénitra, Maroc

(4) **Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques**. Unité de Phytopathologie, Passage des Déportés, 2, B-5030 Gembloux Belgique, jijakli@fussagx.ac.be

Résumé

Les isollements à partir de la surface des pommes (var G. Delicious) ont abouti à l'isolement de différentes bactéries, levures et champignons (33 au total). Six levures 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%. Par contre, dans le cas de *B. cinerea*, les taux de protection de Ach2-1 et Ach2-2 sont respectivement 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, levures, post récolte, pomme, *Penicillium expansum*,

انتقاء مضادات لفطريات أمراض ما بعد الجني عند التفاح؛
بنيسليوم إكسبانصوم (*Penicillium expansum*) وبوتريتييس سنيريا (*Botrytis cinerea*)

أشباني ح . .

ملخص

تهدف هذه الدراسة الى البحث عن عزلات مضادة لمسببين لأمراض ما بعد الجني عند التفاح وهما *Penicillium expansum* و *Botrytis cinerea* وهكذا تم عزل من سطح فاكهة التفاح (Golden Delicious) صنف 33 جرثومة مختلفة تنتمي إلى البكتيريا و الخمائر و الفطريات، أظهرت ست من الخمائر قدرة تضادية جد عالية تجاه *Penicillium expansum* داخل بيت الإنبات عند درجة حرارية 0.5 + 25. وقد أظهرت عزلات Ach1-1 و Ach2-1 و Ach2-2 و 1113-5 و 1113-10 و 1112-3 عن نشاط مضاد عال يزيد على 80 بالمائة من حماية التفاح ضد فطر *P. expansum* وذلك بعد 5 أيام من المواجهة. وسجلت أكبر نسبة (96%) تضادية عند عذلة Ach2-1، أما تجاه *B. cinerea*، فنسب الحماية المسجلة من طرف كل من Ach2-1 و Ach2-2 تتراوح بالتتالي ما بين 100 و 96% بعد 6 أيام من المواجهة. تبين أيضا أنه عند درجة حرارية 5°C، تحتفظ العزلات بمستوى تضادها العالي والذي يتجاوز 82%. ولمتابعة باقي برامج البحث المتبقية، تم الإحتفاظ بعزلتين هما Ach1-1 و 1113-5.

الكلمات المفتاح: التفاح، أمراض ما بعد الجني، المكافحة الحيوية، الخمائر، *Botrytis cinerea*، *Penicillium expansum*

Selection of antagonists of (Penicillium expansum and Botrytis cinerea), two postharvest apple parasites.

Summary

The potential antagonistic micro-organisms (33 isolates) belonging to yeast, bacteria and fungi have been isolated from apple surface. Six yeasts isolates of them (All strains Ach1-1, Ach2-1, Ach2-2, 1112-3, 1113-10 and 1113-5) showed a high level of protection (more than 80%) at 25°C, against P. expansum 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 those 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 previous subsequent studies.

Key-words: Antagonists, postharvest, 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. Le tiers de la superficie exploitée (soit environ 9000 ha) se situe dans la région de Meknès et ses environs, avec une capacité frigorifique de 45000 tonnes (Oukabli, comm .pers).

Une part de la production de pommes entreposées dans les frigos subit malheureusement des détériorations dues aux problèmes phytosanitaires. Les pertes peuvent atteindre 60% et sont occasionnées essentiellement par des maladies d'origine fongique telles que *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Fusarium avenaceum* (Bondoux, 1992). 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, 1992). Ces pertes, économiquement importantes, agissent sur le prix de vente de la pomme, devenant souvent supérieur au pouvoir d'achat d'une grande majorité des couches sociales. Les méthodes de lutte utilisées contre ces parasites sont principalement de nature chimique. Les fongicides les plus utilisés appartiennent à la famille des benzimidazoles. L'usage de ces fongicides a engendré l'apparition de souches de 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 grise (*B.cinerea*). Le captane est interdit en Allemagne et en Hollande pour des problèmes d'éco-toxicologie (Janisiewicz et Korsten, 2002). Dans d'autres pays européens, la période entre la dernière application de cette matière active et la récolte a été allongée (Janisiewicz et Korsten, 2002). Dans un avenir proche, certains produits efficaces, comme les benzimidazoles, ne seront plus autorisés. Ces mesures s'accompagnent d'une réduction des limites maximales de résidus tolérées sur les fruits.

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 lutte alternatives, une attention particulière 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 (Ippolito et Nigro, 2000). 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 guillermondii*, *Candida oleophila*, *Cryptococcus laurentii*

(Levures). Enfin, deux biopesticides ont été agréés en post-récolte sur pommes et poires, l'un à base d'une souche de levure et l'autre à base d'une souche de bactérie, homologués aux Etats-Unis d'Amérique.

Le développement de lutte biologique au Maroc vis-à-vis des maladies de conservation des pommes passe tout d'abord par la réalisation tout d'abord de la sélection des antagonistes des deux principaux parasites de ces fruits, *B. cinerea* et *P. expansum*. Ainsi, les objectifs assignés à ce travail sont : 1) Sélection *in vivo* des antagonistes des deux pathogènes des pommes à la température de 25°C et à 5°C et 2) Identification des microorganismes antagonistes retenus.

Matériel et méthodes

Sélection in vivo des antagonistes des maladies de post-récolte des pommes

La technique de sélection des antagonistes de Jijakli (1996) est utilisée vis-à-vis des deux principaux pathogènes sur pommes, *P. expansum* et *B. cinerea*. Le même protocole est pratiqué dans tous les essais de sélection réalisés, avec toutefois de légères modifications qui ont touché le diamètre de la blessure et la quantité de la suspension par blessure qui sont respectivement 6 ou 8 mm et 50 ou 70 μ 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: A partir des différents lots de pomme (Golden delicious) achetés au marché, 4 pommes de chaque lot sont introduites dans un sac de toppits de 3000 ml contenant 1000 ml du tampon de lavage KPBT (Tampon phosphate de potassium 0.5M à pH6.5 contenant 0.005% de tween 80). Il faut par précaution mettre les sacs dans deux autres sacs pour éviter l'endommagement du sac contenant l'eau de lavage. L'ensemble est mis en agitation sur un agitateur électrique réglé à 120 tours/min. Après agitation, on prélève 5 ml de chaque solution mère (SM) et on procède à une série de dilutions dans le KPBT et dans des flacons de 15 ml : X5, X10, X50 et X100.

ii) Ensemencement sur boîtes de Pétri contenant PDA (Potato Dextrose Agar) : De chaque dilution, cent μ l ont été prélevés à l'aide d'une pipette à embout jetable stérile et étalés 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 incubées 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 à 24h d'intervalle, pour chaque souche en vue de ne conserver que des souches pures et actives. La nature de la souche (levure ou bactérie) est déter-

minée par observation au microscope (GX25 pour les levures ou X40 pour les bactéries).

Sélection des antagonistes issus des eaux de lavage

i- Préparation des fruits: Les pommes de la variété Goldon *delicious* sont désinfectées par trempage pendant deux minutes dans l'hypochlorite de sodium à 10%, puis rincées deux fois successives dans de l'eau distillée stérile et séchées sous le flux laminaire. 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 (15 x 10 cm) contenant du papier filtre. Les flacons 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 (0.85% de NaCl) stérile, à partir desquelles deux concentrations par isolat sont déterminées en utilisant la densité optique (Do) à 595 nm, Do 0,5 et Do 0,75.

Comme témoin positif, une souche de *Candida oleophila*, antagoniste de *P. expansum* et de *B. cinerea* (source : Unité de Phytopathologie, FUSAGX, Belgique) est utilisée à la concentration de 10^6 levures/ml en adoptant pour le calcul, l'équation reliant la densité optique DO (595 nm) aux nombres de cellules par ml qui est la suivante :

$[DO-0,015)/0,014 = \text{Nombre de cellule par ml} \times 10^6 = \text{Concentration initiale (Ci)}$ (Jijakli, 1996).

L'inoculation des pommes consiste en un dépôt de 50 μ l de la suspension des différentes doses des cultures (DO 0.75 et DO 0.50) dans la blessure (5 fruits par dose, ce qui fait 10 blessures au total par dose). Pour garder l'humidité suffisante autour de la pomme, 3 ml d'eau distillée stérile sont versés dans chaque flacon. Une fois fermés par leur couvercle, les flacons sont incubés à 25°C dans une chambre de culture.

iii- Application des champignons *P. expansum* «P1 et ou 882» ou de *B. cinerea* (1ère série de sélection) issus de la collection de l'Unité de Phytopathologie de Gembloux (Fusagx-Belgique) après 24 h d'incubation : La suspension de *P. expansum* et/ou de *B. cinerea* est préparée en grattant à l'aide d'une anse de platine une culture du champignon poussée sur PDA incubé à 25 °C et sous une photopériode de 16 h pendant 7 jours puis 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, la suspension est ajustée à 10^6 spores/ml à l'aide de la cellule de Bürker. La co-inoculation des fruits se fait une heure après leur sortie de la chambre, en déposant 50 μ l de la suspension fongique dans toutes les blessures. Les flacons sont recouverts de nouveau et remis en 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 de *P. expansum* et ou *B. cinerea* réalisé à 5, 7 et 11 jours à 25°C et à 20 et 26 jours à 5°C se détermine selon la formule suivante :

$$\% \text{ Promotion/ témoin} = \frac{\text{Dm de x-6(ou8)}}{\text{Dm de témoin 6(ou8)}} \times 100$$

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 seule 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 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (pour Ach1.*) et à BCCM/MUCL (The Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms/Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain) Louvain-la-neuve, Belgique pour le reste des antagonistes.

Résultats

Sélection in vivo des antagonistes des maladies de post-récolte des pommes

Une première série de sélection a été réalisée à Gembloux –Belgique (Fusagx) vis-à-vis des deux principaux pathogènes sur pommes, *P. expansum* et *B. cinerea*. Une technique de sélection des antagonistes des maladies de post-récolte à partir de la surface des fruits des pommes est utilisée vis-à-vis de ces deux principaux pathogènes sur pommes. 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 sus dits. Une souche de *Candida oleophila* est utilisée comme antagoniste de référence. Les deux essais (Tableaux 1 et 2) ont abouti à la sélection 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*, 5 jours après confrontation (Tableau 1). 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 (Tableau 1). La protection après 11 jours reste constante et fluctue entre 71 (Ach2-1) et 85% (Ach1-1). A la DO 0.5 (Dose ou densité

optique), le niveau de protection de l'ensemble des souches est légèrement réduit à 5 et à 7 jours d'incubation et reste le même à 11 jours d'incubation.

Vis-à-vis de *B. cinerea* (Tableau 2), 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.

D'autres essais d'isollements 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

(Tableau 3) et ont abouti à une collection de 25 souches (bactéries, levures et champignons) (Tableau 3). Parmi lesquelles, sept isolats ont exprimé à 25°C un niveau de protection jugé intéressant et variant entre 67 et 86% (Tableau 3). 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%) (Tableau 3). A 5°C, l'expression des premiers symptômes de *P. expansum* sur les témoins 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. Ces niveaux ont varié de 78 (1113-9) à 94% (Ach2-2). (Tableau 4). 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% (Tableau 4)

Identification des microorganismes antagonistes retenus

Certains isolats dont le pouvoir antagoniste est jugé intéressant sont retenus pour la suite du travail (Écologie, mode d'action et formulation). Le résultat d'identification de ces isolats a montré qu'ils appartiennent tous à une espèce de levure, que nous ne pouvons pas divulguer pour le moment, vu le caractère confidentiel de notre travail.

Discussion et conclusions

La recherche de moyens de lutte alternatifs à l'usage des pesticides s'est avérée primordiale dans les systèmes de production intégrée adoptés 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 des antagonistes contre les maladies de post-récolte. 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 produits 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 rapportées dans la littérature comme des antagonistes des espèces fongiques sus mentionnées, responsables des principales maladies de conservation des pommes (Jijakli *et al.*, 1999). La même méthode utilisée par Jijakli (1996) est adoptée dans notre cas, nous a permis de sélectionner sur très peu d'isollements des microorganismes présentant un haut pouvoir antagoniste sur ces deux parasites (*P. expansum* et *B. cinerea*) 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 106 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 perturbé.

Concernant l'innocuité de l'espèce antagoniste retenue dans ce travail, celle-ci n'est ni un pathogène primaire pour l'homme, ni reconnue comme productrice de mycotoxines (www.mold-survivor). L'avis du groupe scientifique «AFC» en France, adopté en juillet 2004 (http://www.efsa.eu.int/science/afc/afc_opinions/catindex_fr.html), considère que cette espèce exploitée pour la production d'un polysaccharide utilisé comme additif alimentaire, ne produit pas de toxines. Il ajoute que la base de données toxicologiques pour ce polysaccharide est limitée, mais indique qu'il a une faible toxicité.

En perspective, trois objectifs seront réalisés successivement : (a), l'influence *in vitro* des facteurs physiques (température, l'activité de l'eau, le pH et les 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 de Post-récolte des pommes entre la Belgique et le Maroc.

Références bibliographiques

- Bondoux P., 1992. Maladies de conservation des fruits à pépins, pommes et poires. Institut National de la Recherche Agronomique Paris, 173 p.
- 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 R.A., 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. Thèse de Doctorat, Faculté Universitaires des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 173 p.
- Jijakli M.H., Lepoivre P., Grevesse C., 1999. Yeast species for biocontrol of apple post-harvest 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.

Tableau 1. Pourcentage de protection par rapport au témoin des microorganismes isolés sur pomme vis-à-vis *Penicillium expansum* après 5, 7 et 11 j d'incubation à 25°C (DO : densité optique à 595, NC : Non compté).

Isolat	DO 0,5			DO 0,75		
	jours incubation					
	5	7	11	5	7	11
C.oleophila	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 2 . Pourcentage de protection par rapport au témoin des antagonistes (Ach1.3, Ach2.1 et Ach2.2) sur pomme vis-à-vis de *Botrytis cinerea* après 5, 6 et 8 j d'incubation à 25°C. (C.o : *Candida oleophila*)

Isolat	Durée d'incubation en jours		
	5	6	8
C.o* (105 cfu/ml)	87,94	82,81	83,39
C.o (107 cfu/ml)	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

Tableau 3 . Pourcentage de protection par rapport au témoin (10^6 cfu/ml) des antagonistes (Ach2.2, 1113.* et 1112.* à 10^7 cfu/ml) sur pomme vis-à-vis de *P. expansum* après 5 jours d'incubation à 25°C (Pe : *P. expansum*).

Isolat	% protection /Témoin
Control Pe*	0
Ach2-2	68,34
1113-4	77,89
1113-9	68,84
1113-10	85,43
1112-3	84,42
1112-2	67,84
1113-5	85,93
1113-6	67,34
1112-1	68,34

Tableau 4. Pourcentage de protection par rapport au témoin (10^6 cfu/ml) des antagonistes (Ach*, 1113.* et 1112.3 à 10^7 cfu/ml) sur pomme vis-à-vis de *P. expansum* après 20 et 26 jours d'incubation à 5°C (Pe : *P. expansum*)

Isolat	Durée d'incubation en jours	
	20	26
Control Pe*	0	0
Ach1-1	90,91	71,75
ACH2-1	91,56	75,34
ACH2-2	93,51	88,79
1113-10	90,26	75,34
1113-5	88,96	86,55
1112-3	82,47	60,54