



## Synergy of Benzimidazole Fungicides and Anilinopyrimidine with Calcium Chloride against Apple rot in Conservation

(Synergie des benzimidazolés et de l'anilinopyrimidine avec le chlorure de calcium dans la lutte contre la pourriture des pommes en conservation)

Author

**Khaled ATTRASSI**

Laboratoire Science de la Vie et de la Terre, Centre Régional des Métiers de l'Éducation et de la Formation (CRMEF), B.P.245, Kénitra, Maroc

Email: [attrassi2@yahoo.fr](mailto:attrassi2@yahoo.fr)

### ABSTRACT

*Anilinopyrimidine was more efficacious than calcium chloride at 4% in vitro on mycelious growing, conidial germination and sporulation of twelve species responsible of apple rot during conservation. Their association improved the inhibition.*

*Calcium chloride was more active on the rooting of apples 'Golden Delicious' when they are stocked at 4°C instead of 25°C. Benzimidazoles fungicides (benomyl, thiabendazole) and anilinopyrimidine tested alone were slightly to fairly effective on the fungi complex, with best results at 4°C. The association of fungicides with calcium chloride (4%) allowed a better control of the rot.*

**Key-words:** *anilinopyrimidine, apple, apple rot, benzimidazoles, calcium chloride, conservation, fungicides.*

### INTRODUCTION

Les moisissures entraînent pendant la conservation des pommes des pertes importantes pouvant atteindre la moitié de la récolte [Ramdani, 1989 ; Selmaoui *et al.*, 1997]. Il est difficile d'estimer les pertes dues à chaque pathogène car les blessures sont colonisées par un complexe fongique [Attrassi *et al.*, 2005 ; Selmaoui, 1999]. Le contrôle se fait généralement par des fongicides. Cependant, les champignons tolèrent de plus en plus les fongicides utilisés [Bondoux, 1992 ; Mc Phee, 1980 ; Prusky, 1985 ; Ramdani, 1989].

Les fongicides benzimidazolés et des thiophanates sont inefficaces contre *Alternaria alternata* et *Penicillium expansum*, mais actifs contre *Trichothecium roseum*, *Trichoderma harzianum* et *Fusarium avenaceum* [Rosenberg et Meyer,

1979 ; Selmaoui *et al.*, 1997 ; Selmaoui, 1999].

Les thiocarbamates inhibent le développement d'*Alternaria alternata* et *Penicillium expansum*, mais non celui des autres champignons, d'où la nécessité de combiner les deux familles de fongicides contre le complexe fongique.

Ces résistances ont incité à associer aux fongicides le chlorure de calcium, connu pour son efficacité dans les maladies physiologiques des pommes liées à une carence en calcium comme la pourriture amère [DeLong, 1937 ; Garman et Mathis, 1956]. Le calcium confère aux fruits une grande résistance vis-à-vis de certains champignons tels *Alternaria* sp. [Biggs *et al.*, 1993], *Penicillium* sp. [Conway, 1982], *Leucostoma persoonii* [Biggs et Peterson, 1990 ; Biggs *et al.*, 1994] et vis-à-vis d'*Alternaria alternata*, *Trichothecium roseum*, *Trichoderma*

*harzianum*, *Penicillium expansum* et *Fusarium avenaceum* [Selmaoui et Douira, 2003].

Dans ce travail, l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de l'association du chlorure de calcium avec trois fongicides a été testée à l'égard de douze espèces fongiques rencontrées lors de la conservation des pommes.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Isolement des moisissures

Quatre Ascomycètes (*Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* et *Saccharomyces cerevisiae*), sept Basidiomycètes (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Monilia fructigena*, *Cryptosporiopsis malicorticis*, *Spilocaea pomi* et *Trichothecium roseum*) et un Oomycète (*Rhizopus stolonifer*) ont été isolés à partir de pommes en conservation dans des chambres frigorifiques de la région de Kénitra au Maroc. Les pommes ont été désinfectées par l'hypochlorite de sodium à 5 % et des fragments ont été découpés et déposés sur milieu de culture PSA (Potato Sucrose Agar) coulé en boîtes de Petri stériles. Ces dernières ont été incubées à l'obscurité à 25°C. Après plusieurs repiquages successifs et clonage monospore sur PSA, l'identification a été effectuée par examen au microscope optique des structures conidiennes.

### Fongicides et chlorure de calcium testés

L'anilinopyrimidine (Pyrithanil, 800 ppm) et deux fongicides benzimidazolés, le bénomyl 50 % (Benlate, 60 g/hl) et le thiabendazole (Decco20S, 150 g/hl) ont été utilisés aux doses homologuées. Le chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub> 96 %) a été testé à 4 % seul ou associé aux fongicides.

### Test *in vitro* des fongicides et du CaCl<sub>2</sub>

Pour la croissance mycélienne, les solutions de chaque fongicide et/ou du CaCl<sub>2</sub> ont été incorporées au milieu PDA (Potato Dextrose Agar) encore en fusion et le mélange a été coulé sur des boîtes de Petri. L'inoculation est effectuée par un disque mycélien provenant d'une culture

âgée de dix jours incubée à 25°C. La croissance mycélienne a été évaluée par mesure perpendiculaire du diamètre des colonies après dix jours d'incubation à 25°C et à l'obscurité.

Pour la germination conidienne, une suspension de spores (10<sup>3</sup> spores/ml) a été étalée à la surface des boîtes de Petri contenant un mélange agar-fongicide et/ou CaCl<sub>2</sub>. Le comptage des spores germées a été effectué sur un total de 200 spores après 24 heures d'incubation à 25°C et à l'obscurité.

Pour la sporulation, quatre disques de 5 mm de diamètre ont été prélevés à la bordure de colonies de cultures ayant servi pour la croissance mycélienne et ont été placés dans un tube contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Après agitation au vortex, les spores ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez à raison de trois comptages par suspension.

Pour chaque étape de vie, trois essais ont été réalisés et pour chaque essai, trois boîtes de Petri ont été utilisées.

L'efficacité du fongicide et/ou du CaCl<sub>2</sub> est déterminée selon la formule suivante :

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

$X_t$  : Estimation de la croissance mycélienne, de la germination conidienne ou de la sporulation dans un milieu sans fongicide et sans CaCl<sub>2</sub> (témoin)

$X$  : Estimation de la croissance mycélienne, de la germination conidienne ou de la sporulation dans un milieu en présence de fongicide et / ou de CaCl<sub>2</sub> (essai).

### Test *in vivo*

Des pommes (*Malus pumila* Mill. 'Golden Delicious') préalablement stérilisées à l'alcool à 90° ont été inoculées en trois endroits équidistants de leur région équatoriale par des fragments mycéliens issus de cultures de dix jours à 25°C à l'obscurité ayant servi pour la croissance mycélienne. Les pommes traitées par un fongicide et / ou CaCl<sub>2</sub> ont été réparties séparément dans des

sachets en plastique noir pour favoriser l'obscurité, préalablement pulvérisés à l'eau distillée pour obtenir une humidité relative élevée. Elles ont été conservées deux mois à 4°C ou dix jours à 25°C. L'efficacité ou pourcentage d'incubation de fongicide et de CaCl<sub>2</sub> est déterminée selon la formule suivante.

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

*Dt* : Diamètre moyen de la pourriture sur pomme témoin

*D* : Diamètre moyen de la pourriture sur pomme traitée par le fongicide et / ou CaCl<sub>2</sub>.

Pour chaque test, trois essais ont été effectués avec pour chaque essai trois pommes.

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

## RÉSULTATS

### Efficacité *in vitro*

Le chlorure de calcium à 4 % a peu d'action sur la croissance mycélienne et la germination conidienne et est moyennement efficace sur la sporulation des différentes espèces étudiées (Tableau III).

L'efficacité de l'anilinopyrimidine est importante sur toutes les espèces fongiques testées, et augmente en association avec CaCl<sub>2</sub> (Tableau I).

**Tableau I :**

Efficacité *in vitro* de l'anilinopyrimidine (An, 800 ppm) et / ou du chlorure de calcium (4 %) sur les trois étapes de vie des champignons responsables de la pourriture des pommes en conservation.

Traitements Espèces	Croissance mycélienne (mm)			Germination conidienne (%)			Sporulation (spores/ml)		
	CaCl <sub>2</sub>	An	An + CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	An	An + CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	An	An + CaCl <sub>2</sub>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	28,5 <sup>d</sup>	79,5 <sup>b</sup>	84,6 <sup>b</sup>	25,4 <sup>j</sup>	70,0 <sup>c</sup>	83,2 <sup>bc</sup>	48,8 <sup>e</sup>	70,0 <sup>b</sup>	90,4 <sup>a</sup>
<i>Penicillium expansum</i>	34,0 <sup>e</sup>	78,0 <sup>b</sup>	80,0 <sup>b</sup>	22,6 <sup>c</sup>	32,0 <sup>bc</sup>	36,9 <sup>b</sup>	49,3 <sup>e</sup>	65,5 <sup>d</sup>	73,9 <sup>b</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	28,4 <sup>c</sup>	90,0 <sup>b</sup>	96,5 <sup>a</sup>	23,4 <sup>d</sup>	30,5 <sup>c</sup>	34,4 <sup>c</sup>	54,6 <sup>e</sup>	68,2 <sup>d</sup>	71,5 <sup>c</sup>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19,5 <sup>d</sup>	91,0 <sup>a</sup>	92,0 <sup>a</sup>	24,5 <sup>c</sup>	78,6 <sup>bc</sup>	86,0 <sup>b</sup>	51,6 <sup>e</sup>	70,0 <sup>d</sup>	84,1 <sup>c</sup>
<i>Alternaria alternata</i>	18,6 <sup>f</sup>	56,0 <sup>c</sup>	64,3 <sup>b</sup>	28,5 <sup>c</sup>	74,5 <sup>b</sup>	90,2 <sup>ab</sup>	50,8 <sup>c</sup>	74,6 <sup>b</sup>	94,0 <sup>a</sup>
<i>Cladosporium herbarum</i>	26,4 <sup>d</sup>	94,5 <sup>ab</sup>	94,6 <sup>ab</sup>	28,6 <sup>f</sup>	70,4 <sup>b</sup>	72,6 <sup>b</sup>	55,4 <sup>c</sup>	84,2 <sup>b</sup>	92,4 <sup>ab</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i>	20,2 <sup>f</sup>	56,4 <sup>c</sup>	64,0 <sup>b</sup>	20,2 <sup>e</sup>	58,6 <sup>c</sup>	64,0 <sup>b</sup>	53,2 <sup>c</sup>	86,7 <sup>b</sup>	95,0 <sup>a</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17,4 <sup>e</sup>	82,6 <sup>b</sup>	91,9 <sup>a</sup>	19,4 <sup>d</sup>	48,4 <sup>c</sup>	56,9 <sup>b</sup>	51,6 <sup>d</sup>	73,0 <sup>b</sup>	86,6 <sup>a</sup>
<i>Monilia fructigena</i>	18,8 <sup>e</sup>	83,2 <sup>b</sup>	95,5 <sup>a</sup>	28,6 <sup>c</sup>	36,5 <sup>d</sup>	66,2 <sup>b</sup>	54,0 <sup>c</sup>	80,0 <sup>b</sup>	90,9 <sup>a</sup>
<i>Cryptosporiopsis malicorticis</i>	27,6 <sup>e</sup>	86,0 <sup>b</sup>	94,8 <sup>a</sup>	28,5 <sup>d</sup>	44,3 <sup>c</sup>	54,0 <sup>b</sup>	49,3 <sup>d</sup>	86,1 <sup>b</sup>	96,7 <sup>a</sup>
<i>Spilocaea pomi</i>	19,5 <sup>f</sup>	94,0 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	31,8 <sup>d</sup>	43,0 <sup>c</sup>	63,2 <sup>b</sup>	48,2 <sup>e</sup>	70,0 <sup>c</sup>	86,0 <sup>b</sup>
<i>Trichothecium roseum</i>	19,4 <sup>e</sup>	93,2 <sup>ab</sup>	99,5 <sup>a</sup>	34,0 <sup>d</sup>	54,5 <sup>b</sup>	58,0 <sup>b</sup>	54,5 <sup>d</sup>	73,2 <sup>b</sup>	93,2 <sup>ab</sup>

**Efficacité *in vivo* de l'association CaCl<sub>2</sub> - anilinopyrimidine**

Le chlorure de calcium est moyennement efficace à 4°C et peu à 25°C (Tableau II).

L'association de l'anilinopyrimidine avec le CaCl<sub>2</sub> augmente l'efficacité des douze espèces fongiques aussi bien à 4 qu'à 25°C.

**Tableau II :**

Efficacité du chlorure de calcium (4 %), de l'anilinopyrimidine et de leur association sur le développement de douze espèces fongiques responsables de la pourriture des pommes en conservation à 4 et 25°C.

Traitements	CaCl <sub>2</sub>		Anilino pyrimidine		Anilino pyrimidine + CaCl <sub>2</sub>	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
<i>Rhizopus stolonifer</i>	69,4 <sup>a</sup>	46,0 <sup>a</sup>	96,0 <sup>a</sup>	74,0 <sup>a</sup>	100,0 <sup>a</sup>	86,5 <sup>a</sup>
<i>Penicillium expansum</i>	61,0 <sup>b</sup>	21,6 <sup>c</sup>	94,0 <sup>a</sup>	72,0 <sup>a</sup>	98,5 <sup>a</sup>	84,4 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	68,0 <sup>a</sup>	26,4 <sup>c</sup>	86,0 <sup>b</sup>	73,0 <sup>a</sup>	94,0 <sup>b</sup>	83,0 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	56,0 <sup>c</sup>	36,3 <sup>b</sup>	88,0 <sup>b</sup>	74,4 <sup>a</sup>	96,4 <sup>a</sup>	85,0 <sup>a</sup>
<i>Alternaria alternata</i>	69,0 <sup>a</sup>	34,6 <sup>b</sup>	92,0 <sup>a</sup>	70,2 <sup>a</sup>	96,2 <sup>a</sup>	80,4 <sup>b</sup>
<i>Cladosporium herbarum</i>	58,5 <sup>c</sup>	43,2 <sup>a</sup>	87,5 <sup>a</sup>	69,5 <sup>b</sup>	96,6 <sup>a</sup>	78,8 <sup>b</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i>	64,2 <sup>ab</sup>	34,0 <sup>b</sup>	84,4 <sup>b</sup>	65,8 <sup>bc</sup>	92,0 <sup>b</sup>	76,6 <sup>b</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65,0 <sup>ab</sup>	22,0 <sup>c</sup>	73,0 <sup>c</sup>	36,0 <sup>e</sup>	90,0 <sup>b</sup>	83,0 <sup>a</sup>
<i>Monilia fructigena</i>	66,0 <sup>ab</sup>	36,0 <sup>b</sup>	79,0 <sup>bc</sup>	38,0 <sup>e</sup>	92,2 <sup>b</sup>	84,5 <sup>a</sup>
<i>Cryptosporiopsis malicorticis</i>	58,0 <sup>c</sup>	24,5 <sup>c</sup>	75,5 <sup>c</sup>	45,0 <sup>d</sup>	93,0 <sup>b</sup>	81,6 <sup>a</sup>
<i>Spilocaea pomi</i>	59,4 <sup>c</sup>	32,3 <sup>b</sup>	77,0 <sup>c</sup>	56,0 <sup>c</sup>	95,5 <sup>a</sup>	83,3 <sup>a</sup>
<i>Trichothecium roseum</i>	70,3 <sup>a</sup>	43,7 <sup>a</sup>	88,6 <sup>a</sup>	69,6 <sup>a</sup>	96,6 <sup>a</sup>	84,0 <sup>a</sup>

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

**Efficacité *in vivo* de l'association CaCl<sub>2</sub> - benzimidazolés**

*In vivo* (Tableau III), les deux fongicides benzimidazolés testés n'ont présenté globalement aucune efficacité vis-à-vis des douze agents fongiques quelle que soit la température de conservation.

En présence du CaCl<sub>2</sub>, l'efficacité des fongicides a augmenté pour tous les champignons étudiés, quelle que soit la température de conservation. L'efficacité à basse température est plus élevée que celle observée à 25°C.

**Tableau III :**

Efficacité du chlorure de calcium (4 %), de deux fongicides benzimidazolés et de leur association au chlorure de calcium sur le développement de douze espèces fongiques responsables de la pourriture des pommes en conservation à 4 et 25°C.

Traitements	CaCl <sub>2</sub>		Bénomyl		Bénomyl + CaCl <sub>2</sub>		Thiabendazole		Thiabendazole + CaCl <sub>2</sub>	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
<i>Rhizopus stolonifer</i>	74,6 <sup>a</sup>	40,3 <sup>a</sup>	26,4 <sup>c</sup>	15,6 <sup>c</sup>	84,6 <sup>a</sup>	78,0 <sup>a</sup>	42,0 <sup>b</sup>	28,0 <sup>a</sup>	86,7 <sup>b</sup>	80,5 <sup>a</sup>
<i>Penicillium expansum</i>	68,0 <sup>b</sup>	22,5 <sup>c</sup>	5,9 <sup>e</sup>	8,6 <sup>d</sup>	65,0 <sup>bc</sup>	60,0 <sup>c</sup>	14,0 <sup>e</sup>	7,0 <sup>c</sup>	64,0 <sup>d</sup>	20,7 <sup>f</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	70,3 <sup>a</sup>	28,2 <sup>b</sup>	87,0 <sup>b</sup>	28,4 <sup>a</sup>	85,0 <sup>a</sup>	76,5 <sup>a</sup>	92,0 <sup>a</sup>	32,0 <sup>a</sup>	94,0 <sup>a</sup>	81,5 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	69,5 <sup>a</sup>	26,4 <sup>b</sup>	94,0 <sup>a</sup>	26,3 <sup>a</sup>	64,2 <sup>bc</sup>	77,0 <sup>a</sup>	89,0 <sup>a</sup>	30,5 <sup>a</sup>	92,6 <sup>a</sup>	85,4 <sup>a</sup>

<i>Alternaria alternata</i>	71,5 <sup>a</sup>	35,2 <sup>a</sup>	15,6 <sup>d</sup>	10,6 <sup>d</sup>	84,0 <sup>a</sup>	74,0 <sup>a</sup>	40,0 <sup>b</sup>	29,7 <sup>a</sup>	84,0 <sup>b</sup>	58,0 <sup>c</sup>
<i>Cladosporium herbarum</i>	65,6 <sup>b</sup>	30,4 <sup>b</sup>	26,3 <sup>c</sup>	22,4 <sup>b</sup>	74,5 <sup>b</sup>	64,0 <sup>c</sup>	22,5 <sup>d</sup>	28,4 <sup>a</sup>	79,5 <sup>bc</sup>	42,0 <sup>d</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i>	69,4 <sup>a</sup>	24,7 <sup>c</sup>	15,5 <sup>d</sup>	13,7 <sup>c</sup>	85,0 <sup>a</sup>	65,0 <sup>c</sup>	36,0 <sup>b</sup>	26,0 <sup>ab</sup>	82,0 <sup>b</sup>	44,6 <sup>d</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67,2 <sup>ab</sup>	22,0 <sup>c</sup>	9,4 <sup>e</sup>	8,4 <sup>d</sup>	75,0 <sup>b</sup>	60,3 <sup>c</sup>	15,8 <sup>e</sup>	6,0 <sup>c</sup>	74,0 <sup>c</sup>	22,0 <sup>f</sup>
<i>Monilia fructigena</i>	68,5 <sup>b</sup>	23,3 <sup>c</sup>	4,5 <sup>e</sup>	15,5 <sup>c</sup>	73,0 <sup>b</sup>	62,0 <sup>c</sup>	21,4 <sup>d</sup>	11,4 <sup>bc</sup>	76,2 <sup>c</sup>	26,0 <sup>f</sup>
<i>Cryptosporiopsis malicorticis</i>	65,4 <sup>b</sup>	25,7 <sup>bc</sup>	16,8 <sup>d</sup>	22,0 <sup>b</sup>	68,3 <sup>bc</sup>	59,4 <sup>c</sup>	22,0 <sup>d</sup>	26,0 <sup>a</sup>	78,0 <sup>c</sup>	45,0 <sup>d</sup>
<i>Spilocaea pomi</i>	66,3 <sup>bc</sup>	24,6 <sup>c</sup>	20,0 <sup>d</sup>	26,0 <sup>b</sup>	69,4 <sup>bc</sup>	61,7 <sup>c</sup>	28,0 <sup>c</sup>	18,0 <sup>b</sup>	81,5 <sup>b</sup>	34,0 <sup>e</sup>
<i>Trichothecium roseum</i>	71,2 <sup>b</sup>	36,5 <sup>a</sup>	28,5 <sup>c</sup>	24,0 <sup>b</sup>	86,2 <sup>a</sup>	76,0 <sup>a</sup>	36,6 <sup>b</sup>	24,8 <sup>a</sup>	84,0 <sup>b</sup>	64,0 <sup>b</sup>

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

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Les douze champignons étudiés tolèrent *in vitro* comme *in vivo* le bénomyl et le thiabendazole aux doses homologuées. La résistance aux fongicides benzimidazolés a été signalée pour *Penicillium expansum* sur des pommes et des poires [Amiri *et al.*, 2005 ; Errampalli *et al.*, 2006 ; Francès *et al.*, 2006 ; Ramdani, 1989]. Par contre, l'anilinopyrimidine est efficace sur tous les champignons étudiés.

*In vitro*, le chlorure de calcium à 4 % est peu efficace vis-à-vis des espèces rencontrées dans le complexe fongique des lésions de pommes alors qu'il est efficace *in vivo* à 4°C. Des résultats similaires ont été observés lors du traitement avec le chlorure de calcium de *Penicillium expansum* et *Alternaria* sp. isolés de pommes et de poires [Biggs *et al.*, 1993 ; Conway, 1982 ; Maouni *et al.*, 2001], d'*Alternaria alternata*, *Trichothecium roseum*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium expansum* et *Fusarium avenaceum* isolés de pommes [Selmaoui et Douira, 2003] ou de *Leucostoma persoonii* isolé de pêches [Biggs *et al.*, 1994].

Le traitement des pommes par le calcium peut prévenir contre la destruction de la pectine par l'enzyme pectique. Le calcium confère aux cellules une résistance à l'activité enzymatique de *Penicillium expansum*. L'ion Ca<sup>2+</sup> peut, en se fixant aux molécules de la paroi, dénaturer celle-ci et ainsi inhiber la croissance microbienne. Dans le tissu végétal, Ca<sup>2+</sup> peut contribuer à limiter le

développement microbien en renforçant la paroi cellulaire [Yaganza, 2005].

L'activité enzymatique pectolytique pourrait être empêchée suite à l'association de Ca<sup>2+</sup> avec les substances pectiques intercellulaires des fruits [Bateman et Lumsden, 1965 ; Conway et Sam, 1984]. Ce mécanisme peut être opérationnel à la variété de pomme 'Nittany' attaquée par *Alternaria* sp.. Les ions Ca<sup>2+</sup> peuvent réduire l'efficacité de la polygalacturonase, fréquemment produite par les champignons dans les tissus malades de l'hôte [Barash et Angel, 1970 ; Barown *et al.*, 1976] et qui participe avec la pectine méthyl estérase à l'altération des tissus des pommes. Cette réduction est réalisée par la formation de cations avec les acides pectiques constituant ainsi une muraille de cellules résistantes à la dégradation par la polygalacturonase [Conway *et al.*, 1987].

Par ailleurs, Kohle *et al.* (1985) suggèrent que les ions Ca<sup>2+</sup> stimulent la synthèse de phytoalexines et/ou de phénols qui jouent un rôle très important dans la résistance des plantes aux agressions parasitaires [Nicholson et Hammerschmidt, 1992 ; Ouchi, 1983]. Ces composés entraînent notamment une action inhibitrice de l'activité des enzymes hydrolytiques [Bostock *et al.*, 1999] parasitaires telles les pectinases [Davet et Ravisé, 1976] et les cellulases [Reddy et Mahadevan, 1976]. Les composés phénoliques peuvent également inhiber la biosynthèse de toxines

parasitaires [Desjardins *et al.*, 1988 ; Valentines *et al.*, 2005].

À basse température, le chlorure de calcium est efficace à 4 %. Des résultats similaires sont notés vis-à-vis de *Penicillium expansum* et *Alternaria* sp. [Biggs *et al.*, 1993 ; Conway, 1982; Maouni *et al.*, 2002]. Il semblerait que les ions  $Ca^{++}$  puissent s'associer aux acides pectiques, empêchant ainsi l'activité de la polygalacturonase fongique [Conway et Sams, 1984]. À 25°C, le calcium serait insuffisant pour pouvoir empêcher une telle activité enzymatique.

*In vivo* et à 4°C, le chlorure de calcium à 4 % empêche l'activité enzymatique de manière plus efficace qu'à 25°C sur les principaux agents fongiques testés. Des résultats similaires ont été obtenus avec *Penicillium expansum* et *Alternaria* sp. [Biggs *et al.*, 1993 ; Conway, 1982 ; Selmaoui, 1999].

Les douze champignons étudiés tolèrent *in vivo* l'anilinopyrimidine. Ce fongicide interfère au niveau des acides aminés et principalement sur la biosynthèse de la méthionine ; il bloque la transformation de la cystathionine en homocystéine puis en méthionine par l'enzyme cystathionine  $\beta$ -lyase [Leroux, 1993].

*In vivo*, les douze champignons testés tolèrent le bénomyl et le thiabendazole aux doses homologuées. Des résultats similaires sont notés pour *Penicillium expansum* [Amiri *et al.*, 2005, Errampalli *et al.*, 2006 ; Francès *et al.*, 2006 ; Ramdani, 1989; Wicks, 1977]. Les fongicides benzimidazolés (bénomyl et thiabendazole) systémiques sont unisites, c'est-à-dire qu'ils possèdent un seul site d'action. Ce sont agents antimitotiques interférant spécifiquement avec la division nucléaire et avec d'autres processus liés à l'activité des microtubules et principalement la tubuline, protéine dont l'assemblage forme les microtubules [Davidse et Flach, 1978 ; Leroux, 1993], constituants majeurs du cytosquelette et du fuseau achromatique : toute substance susceptible

d'interférer avec la formation et/ou le fonctionnement de ces microtubules bloque les divisions cellulaires et l'élongation des hyphes mycéliens [Paternelle et Lhoutellier, 2002 ; Leroux, 2003]. Les fongicides benzimidazolés se fixent sur la  $\beta$ -tubuline de nombreux Ascomycètes et Basidiomycètes, mais leur interaction est faible pour celles des Oomycètes [Leroux, 2003]. L'usage agricole des benzimidazolés s'est trouvé fortement affecté par l'apparition de souches phytopathogènes résistantes [Brooks et Roberts, 1999 ; Leroux, 2003]. Cette résistance acquise est liée à une moindre affinité de ces fongicides pour la  $\beta$ -tubuline et résulte de mutations dans les codons 198 ou 200 [Paternelle et Lhoutellier, 2002 ; Leroux, 2003]. Ainsi, en position 198, chez les souches sensibles, le triplet GAG code pour un glutamate, alors que, chez les résistantes, il y a notamment pour l'alanine et la glycine. En position 200, les  $\beta$ -tubulines des souches sensibles et résistantes comportent respectivement une phénylalanine (codon TTC) et un tyrosine (codon TAC) [Leroux, 2003], ce qui peut en partie expliquer la sélectivité des benzimidazolés à usage agricole [Brooks et Roberts, 1999 ; Lyr, 1995; Paternelle et Lhoutellier, 2002].

L'association au chlorure de calcium des trois fongicides testés donne de bons résultats aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Des résultats satisfaisants ont été observés avec d'autres fongicides associés à  $CaCl_2$  comme citez ces fongicides [Biggs *et al.*, 1993]. Il semble que le chlorure de calcium intervienne en renforçant les liens avec les principaux sites d'action des fongicides de l'agent pathogène étudié. Pour lutter contre les maladies physiologiques et parasitaires des pommes en conservation, la stratégie d'association des fongicides avec  $CaCl_2$  donne des résultats très satisfaisants contre la pourriture des pommes en conservation.

## RÉFÉRENCES

- 1 - Amiri (A.), Cholodowski (D.), Bompeix (G.) - Adhesion and germination of waterborne and airborne conidia of *Penicillium expansum* to apple and inert surfaces. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2005, **67**(1), 40-48.
- 2 - Attrassi (K.), Selmaoui (K.), Ouazzani Touhami (A.), Badoc (A.), Douira (A.) - Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2005, **144**(1-2), 47-62.
- 3 - Barash (I.), Angel (E.) - Isolation and properties of an exopolygalacturonase produced by *Penicillium digitatum* during infection lemon fruits. - *Israel J. Bot.*, 1970, **19**, 599-608.
- 4 - Barown (A.), Goas (M.), Drilleau (J.F.) - Contribution à l'étude du métabolisme azoté des pommes au cours de la maturation. - *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1976, **283**, 1301-1304.
- 5 - Bateman (D.F.), Lumsden (R.D.) - Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. - *Phytopathology*, 1965, **55**, 734-738.
- 6 - Bateman (D.F.), Müllar (R.Y.) - Pectic enzymes in tissue degradation. - *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1966, **4**, 119-146..
- 7 - Biggs (A.R.), El Kholi (M.M.), El-Neshawy (S.M.) - Effect of calcium salts on growth, pectic enzyme activity, and colonization of peach twigs by *Leucostoma persoonii*. - *Plant Dis.*, 1994, **78**(9), 886-890.
- 8 - Biggs (A.R.), Ingle (M.), Solihati (W.D.) - Control of *Alternaria* infection of fruit of apple cultivar Nittany with calcium chloride and fungicides. - *Plant Dis.*, 1993, **77**(10), 976-980.
- 9 - Biggs (A.R.), Peterson (C.A.) - Effect of chemical applications to peach bark wounds on accumulation of lignin and suberin and susceptibility to *Leucostoma persoonii*. *Phytopathology*, 1990, **80**(9), 861-865.
- 10 - Bondoux (P.) - Maladies de conservation des fruits à pépins: pommes et poires. - *PHM. Rev. Hortic.*, 1992, 173 p.
- 11 - Bostock (R.), Wilcox (S.M.), Wang (G.), Adaskaveg (J.E.) - Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. - *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1999, **54**(1-2), 37-50.
- 12 - Brooks (G.T.), Roberts (T.R.) - Pesticides chemistry and bioscience, the food environment challenge, R. Soc. Chem., Cambridge, UK, 1999, 438 p.
- 13 - Conway (W.S.) - Effect of post-harvest calcium treatment on decay of Golden Delicious apples. - *Plant Dis.*, 1982, **66**(5), 402-403.
- 14 - Conway (W.S.), Sams (C.E.) - Possible mechanisms by which post-harvest calcium treatment reduce decay in apples. - *Phytopathology*, 1984, **74**(2), 208-210.
- 15 - Davet (P.), Ravisé (A.) - Inhibition du *Colletotrichum coccodes* du *Pyrenochaeta lycopersici* et de leurs enzymes pectonolytiques par des substances élaborées chez quelques *Lycopersicon* Mill. en réaction à l'infection par le complexe parasitaire des racines. - *C. R. Acad. Sci. : Paris, Sér. D*, 1976, **282**, 1351-1354.
- 16 - Davidse (L.C.), Flach (W.) - Interaction of thiabendazole with fungal rungal tubulin. - *Biochim., Biophys. Acta*, 1978, **543**(1), 82-90.
- 17 - DeLong (W.A.), 1937. Calcium and boron contents of the apple fruit as related to the incidence of blotchy cork. - *Plant Physiol.*, **12**(2), 552-556. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=439311&blobtype=pdf>

- 18 - Errampalli (D.), Brubacher (N.R.), Deell (J.R.) - Sensitivity of *Penicillium expansum* to diphenylamine and thiabendazole and post-harvest control of blue mold with fludioxonil in 'McIntosh' apples. - *Postharvest Biol. Technol.*, 2006, **39**(1), 101-107.
- 19 - Francès (J.), Bonaterra (A.), Moreno (M.C.), Cabrefiga (J.), Badosa (E.), Montesinos (E.) - Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. - *Postharvest Biol. Technol.*, 2006, **39**(3), 299-307.
- 20 - Garman (P.), Mathis (W.T.) - Studies of mineral balance as related to occurrence of Baldwin spot in Connecticut. - *Bull. Conn. Agric. Exp. Stn. New-Haven*, 1956, (601), 1-19.
- 21 - Köhle (H.), Jeblick (W.), Poten (F.), Blaschek (W.), Kauss (H.) - Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a  $Ca^{2+}$ -dependent process. - *Plant Physiol.*, 1985, **77**(3), 544-551. <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/77/3/544.pdf>
- 22 - Leroux (P.) - Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes : Équilibres et déséquilibres phytosanitaires dans le monde végétal. - *C. R. Biologies*, 2003, **326**(1), 9-21.
- 23 - Leroux (P.) - Prévoir, une résistance peut en cacher une autre. - *Perspect. Agric.*, 1993, (185), 95-98.
- 24 - Lyr (H.) - Modern selective fungicides: properties, applications, mode of action, 2<sup>nd</sup> edition. Jena, Germany: Gustav Fischer Verlag, 1995, 595 p.
- 25 - Maouni (A.), Lamarti (A.), Douira (A.), Badoc (A.) - Effet de dérivés calciques sur le développement de moisissures lors de la conservation des poires. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2001, **140**(1-4), 79-88.
- 26 - Maouni (A.), Lamarti (A.), Douira (A.), Badoc (A.) - Étude de la résistance d'*Alternaria alternata* et *Penicillium expansum* aux fongicides lors de la conservation des poires. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2002, **116**(1-4), 61-72.
- 27 - Mc Phee (W.J.) - Some characteristics of *Alternaria alternata* strains resistant to iprodione. - *Plant Dis.*, 1980, **64**, 847-849.
- 28 - Nicholson (R.L.), Hammerschmidt (R.) - Phenolic compounds and their role in disease resistance. - *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1992, **30**, 369-389.
- 29 - Ouchi (S.) - Induction of resistance or susceptibility. - *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1983, **21**, 289-315.
- 30 - Paternelle (M.C.), Lhoutellier (C.) - Index Phytosanitaire. Paris : ACTA (Association de Coordination Technique Agricole), 2002, 788 p.
- 31 - Prusky (D.) - Development, persistence, survival and strategies for control of thiabendazole-resistant strains of *Penicillium expansum* on pome fruits. - *Phytopathology*, 1985, **75**(8), 877-882.
- 32 - Ramdani (A.) - Les pourritures à *Penicillium expansum* Link ex. Thom des pommes et des poires dans une station frigorifique de la région de Meknès : Problèmes et remèdes. Mémoire 3<sup>e</sup> Cycle Agronomie, Option Phytopathol. I.A.V. Hassan II. 1989, 112 p.
- 33 - Reddy (M.K.), Mahadevan (A.) - Effect of phenolic compounds on cellulase. - *Ind. Phytopathol.*, 1972, **20**, 265-267.
- 34 - Rosenberger (D.A.), Meyer (F.W.) - Benomyl-tolerant *Penicillium expansum* in apple packinghouses in eastern New York. - *Plant Dis. Rep.*, 1979, **63**, 37-40.



- 35 - Selmaoui (K.) - Étude d'un complexe fongique responsable de la pourriture des pommes en conservation. Application de quelques moyens de lutte chimique. Thèse Doct. Phytopathol. Fac. Sci. Kénitra, Maroc, 1999, 175 p.
- 36 - Selmaoui (K.), Douira (A.) - Effet in vitro des sels de calcium sur le développement et la colonisation des pommes en conservation par un complexe fongique. - Al Awamia, 2003, (109-110), 159-174.
- 37 - Yaganza (E.S.) - Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre : base physico-chimique. PhD. Fac. Étud. Sup. Univ. Laval Sci. Technol. Aliments Département Sci. Aliments Nutr. Fac. Sci. Agric. Aliment., Québec, 2005, 188 p.