

Madagascar est un terrain favorable à la production de fruits tropicaux. Etant donné les pertes post-récoltes, il s'agit surtout d'une production destinée à assurer la consommation locale. L'exportation fruitière de l'île était de 6000t (soit 10.231.000 U\$D) en 2011 (FAO, 2011) alors que l'Afrique couvre 13% des exportations fruitières mondiales (estimées à 8 milliards U\$D en 2017) (Loillet, 2017). Toutefois, une petite partie est collectée pour être transformée en des dérivées plus conservables comme les pâtes de fruits, confitures, fruits confits.

Les pathologies, les conditions hygrométriques au champ et au niveau post-récolte ainsi que les traitements (manutention, stockage, fongicide) post-récoltes déterminent la qualité et la conservation post-récolte d'un fruit (Eckert and Sommer, 1967) et donc sa disponibilité pour la commerce. Dans le cas de Madagascar, de nombreuses études ont été faites sur l'occurrence de maladies au champ des bananiers, papayers et manguiers à Madagascar mais très peu ont porté sur la part réelle des pathologies post-récoltes, qui jouent un rôle stratégique dans le commerce de ces fruits, sachant qu'elles peuvent engendrer des pertes considérables que ce soit au niveau de la production ou du transport des produits et influencer de manière non négligeable la balance commerciale d'un pays.

En fin de cycle, la plupart des champignons phytopathogènes produit des spores qu'il libère au sein de l'environnement et qui contaminent les fruits. Les spores des pathogènes sont par conséquent présents sur les fruits lors de la récolte (Johnson et *al.*, 1991). La germination de ces spores est tributaire de certaines conditions d'hygrométrie, de température et de lumière. Ainsi, le climat et par conséquent, l'origine géographique peuvent avoir une influence sur la biodiversité de champignons phytopathogènes sévissant dans une région (Prusky, 1996). Toutefois, au stade post-récolte, d'autres champignons, pas forcément pathogènes peuvent coloniser les fruits après que ces derniers aient été fragilisés par un pathogène. Il est alors nécessaire de caractériser les pathologies post-récolte des fruits d'une région, de connaître la flore fongique qui y est associée, d'en identifier les pathogènes et les flores secondaires pour enfin définir l'état des lieux des pathologies existantes.

Plusieurs types de pathogènes peuvent infecter les arbres fruitiers, certaines de façon sporadique, les plus connus sont toutefois récurrents et appartiennent à la famille des Ascomycètes. Les ascomycètes ont deux phases de croissance : le stade asexué appelé anamorphe et le stade sexué appelé téléomorphe. Le stade anamorphe est plus souvent associé aux pathologies post-récoltes sur les fruits les plus connus comme les genres *Penicilium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Dothiorella*, *Lastodiopodia* (Coates and Johnson, 2013).

Ainsi, une étude des champignons post-récoltes des fruits est nécessaire pour Madagascar afin d'identifier les principales maladies pouvant engendrer des dommages post-récoltes sur les fruits notamment lors du transport et du stockage de ces derniers.

- Comment ces fruits sont acheminés jusqu'aux consommateurs ?
- Quelles sont les principaux groupes de champignons trouvés sur les nécroses et les pourritures de ces trois fruits ?
- Lesquels sont des pathogènes connus dans les pertes post-récoltes des fruits ?
- Y-a-t-il une différence au niveau de l'occurrence des pathogènes entre les différents contextes écologiques de l'île ?
- Lesquels sont spécifiques de chaque fruit ?

Voilà les questions auxquelles cette première partie tente de répondre en partant de l'hypothèse qu'évoluant dans un climat tropical, les mangues, bananes et papayes malgaches ont les mêmes flores post-récoltes secondaires que celles d'autres pays tropicaux, que les pathogènes spécifiques de chaque fruit sont similaires à d'autres pays tropicaux et que l'occurrence de ces pathogènes est dépendant de la température et de l'humidité et donc de l'origine géographique mais aussi des traitements et du circuit de commercialisation de ces fruits.

Des fruits murs ont été collectés dans diverses régions de l'île pour en isoler les champignons post-récoltes se trouvant sur leurs peaux, notamment celles sur les pourritures et les taches noires. Au préalable, une enquête sur leur circuit de commercialisation a été effectuée. Chaque souche est purifiée avant d'être identifiée par la technique de la biologie moléculaire. La morphologie des souches identifiées est alors vérifiée.

I. Approche méthodologique

1. Ecologie des fruits modèles

- Les bananes

Elles poussent dans toutes les régions de l'île, mais leur zone de prédilection est la côte Est et Ouest de l'île (Mahajanga, Toamasina, Mananjary, Manakara). Du point de vue systématique, le bananier appartient au :

Règne : PLANTAE

Sous-règne : TRACHEOBIONTA

Superdivision : SPERMATOPHYTA

Division : MAGNOLIOPHYTA

Classe : LILIOPSIDA

Sous-classe : ZINGIBERIDAE

Ordre : ZINGIBERALES

Famille : MUSACEAE

Genre : *Musa*

Espèce : *acuminata* L.

-Les papayes

Les papayes sont des fruits qui poussent dans toutes les cours malgaches mais les zones de productions massives sont l'Itasy (Analavory, Ampefy) pour la variété « Maradol » et Atsinanana (Toamasina) pour la variété « Solo ». Le papayer appartient au :

Règne : PLANTAE	Sous-classe : DILLENIIIDAE
Sous-règne : TRACHEOBIONTA	Ordre : VIOLALES
Superdivision : SPERMATOPHYTA	Famille : CARICACEAE
Division : MAGNOLIOPHYTA	Genre : <i>Carica</i>
Classe : MAGNOLIOPSIDA	Espèce : <i>papaya</i> L.

-Les mangues

Les mangues sont cultivées partout dans l'île mais leurs zones de production massive sont le Nord-Ouest et l'Ouest de l'Île (Diego et Majunga). Le manguier appartient au :

Règne : PLANTAE	Sous-classe : ROSIDAE
Sous-règne : TRACHEOBIONTA	Ordre SAPINDALES
Superdivision : SPERMATOPHYTA	Famille : ANACARDIACEAE
Division : MAGNOLIOPHYTA	Genre : <i>Mangifera</i>
Classe : MAGNOLIOPSIDA	Espèce : <i>indica</i> L.

2. Collecte des échantillons de fruits malades

Des bananes, papayes et mangues présentant des pourritures ou des taches noires, indicateurs de maladies post-récoltes ont été récoltées dans diverses régions de Madagascar, en prenant soin de créer un contraste « zones côtières » et « hauts-plateaux » pour chaque fruit. Les zones de collecte sont résumées dans le tableau 1.

Chaque collecte de fruit a aussi été mise à profit à travers une enquête qualitative sur le circuit des fruits du producteur aux consommateurs. Plus précisément, les collectes ont été effectuées à plusieurs niveaux de la chaîne de commercialisation, en remontant la filière du vendeur à l'étalage sise à Antananarivo aux producteurs. L'enquête a été portée sur les traitements effectués sur les fruits, le lieu d'approvisionnement et d'écoulement des produits (Fiche d'enquête présentée en annexe 1). L'enquête ayant une finalité purement informative, deux acteurs par étape et par zone de collecte uniquement ont été questionnés.

Tableau 1 : Zone de collecte des fruits

<i>Fruits</i>	<i>Haut-plateaux</i>	<i>Zones cotières</i>
<i>Bananes</i>	Analamanga Itasy	Toamasina Vatovavy-Fitovinany Mahajanga
<i>Mangues</i>	Analamanga Itasy Bongolava	Mahajanga Atsimo-Andrefana SAVA
<i>Papayes</i>	Analamanga Itasy Bongolava	Mahajanga Atsimo-Andrefana Toamasina

3. Caractérisation des pathologies observées sur les fruits au niveau post-récolte

Cette partie de l'étude a été réalisée dans le laboratoire de Physiologie végétale de l'Université d'Antananarivo. Les maladies observées sur les fruits collectés sont décrites par rapport à leur :

- nature (taches, dépression)
- couleur
- forme (arrondie, éparpillée, étendue)
- texture (filamenteuse, duveteuse, glabre, suintante)
- position (à la base du pédoncule, le long du fruit)

4. Isolement et purification des souches

Cette partie de l'étude a été réalisée dans le laboratoire de Physiologie végétale de l'Université d'Antananarivo. La peau malade est découpée avec un bistouri, puis déposée sur un milieu vierge stérilisé de gelose Sabouraud chloramphenicol qui contient de l'antibiotique. L'ensemble est incubé à 27°C dans une étuve. Au bout d'une semaine, chaque souche présente sur le milieu est repiquée sur un milieu vierge stérilisé de potato dextrose agar (Annexe 6). Au bout de deux semaines, la souche ainsi isolée est inondée d'eau distillée stérile (EDS, environ 10 mL). L'ensemble est agité légèrement puis prélevé dans un tube Eppendorf de 2mL. La quantité de conidies présentes par mL de solution est par la suite déterminée à l'aide d'une cellule de comptage de Mallassez, en comptant le nombre de spores dans 10 rectangles (intercalés de 2 rectangles chacune) de la cellule. La concentration en spores est donnée par la formule :

$$N = (\text{SOMME DES NOMBRES} / 10) * 10^5 \text{ SPORES} \\ \text{par mL de solution}$$

Une dilution au dixième en cascade jusqu'à 10 spores/mL est effectuée dans le but de cultiver une seule spore, sur un milieu PDA vierge à raison de 100µL de cette solution. La spore ainsi cultivée est appelée une monospore, sa culture permet d'obtenir une souche pure qui se conserve dans une solution de glycérol 20% à -24°C.

5. Identification moléculaire et caractérisation morphologique des souches

Etant donné les résolutions prônant l'abandon de la double nomenclature des champignons phytopathogènes en 2011 (Crous et *al.*, 2015), ainsi que l'instabilité des caractères morphologiques, notamment la couleur des souches en culture, l'approche moléculaire a été privilégiée lors de cette étude même si l'interprétation des séquences obtenues par cette approche est sujet à controverse (Kang et *al.*, 2010). Cette partie de l'étude a été réalisée au laboratoire de Biologie moléculaire du DP Forêts et Biodiversité sise dans les locaux du DRFGRN/FOFIFA Ambatobe – Antananarivo. Elle fut par la suite additionnée d'un petit descriptif morphologique de chaque genre identifié.

a. Extraction de l'Acide désoxyribonucléique (ADN)

Le protocole utilisé pour extraire l'ADN nucléaire des souches a été mis au point à partir d'un protocole d'identification des souches de *Fusarium* trouvées sur le poivrier (Shahnazi et *al.*, 2012) :

- Le mycélium de la souche est d'abord collecté à partir d'une culture âgée de 10 jours, imbibée au préalable d'EDS.
- 2mL de la suspension ainsi obtenue est centrifugée 8min à 10 000 tr/min. Le culot est alors récupéré.
- 750µL de tampon de lyse (composition en annexe 4) membranaire est ajouté à ce culot, l'ensemble est ensuite incubé 1h à 60°C en prenant soin de bien mélanger par retournement de tubes toutes les 15min pour homogénéiser la répartition de la chaleur.
- L'ADN est par la suite extrait avec un solvant (chloroforme - alcool iso-amylque 24 :1 v/v) qui est ajouté dans le mélange (suspension de spores + tampon de lyse) jusqu'à atteindre un volume final de 2mL. Afin de séparer

l'ADN récupéré dans la phase aqueuse, l'ensemble est centrifugé 5min à 13 000 tr/min (les débris cellulaires seront emprisonnés dans le chloroforme).

- L'ADN est précipité avec de l'isopropanol à -20°C pendant 45min, et ensuite récupéré dans le culot après centrifugation 5min à 13 000 tr/min,
- lavé à l'éthanol 70° avant d'être séché 1h à l'air libre,
- resuspendu dans un tampon TE fournit dans le kit QUIAGEN (50µL, composition en annexe 4),
- stocké une nuit à 4°C avant d'être révélé par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% (Annexe 5).

b. Séquençage de l'Acide désoxyribonucléique (ADN)

i. Amplification

Cette étape de la caractérisation des souches consiste à cibler et à amplifier une zone spécifique de l'ADN extrait. Dans le cas des champignons phytopathogènes, deux régions de l'ADN nucléaire sont transmises de génération en génération et permettent d'identifier une espèce. Il s'agit des régions ITS (internal transcribed spacer) 1 et 2 de la sous-unité d'ADN codant pour l'ARN 5.8S, transcrites à l'aide des amorces ITS1 et ITS4 (Tableau 2) (Shahnazi et *al.*, 2012).

Tableau 2: Les séquences des amorces utilisées pour amplifier les régions ITS

Amorces	Séquences (5' vers 3')	Tm °C	Bases
ITS1	TTC GTA GGT GAA CCT GCG G	62.5	19
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	58.0	20

T : thymine, G : guanine, C : cytosine, A : Adénine, Tm : température maximale tolérée, ITS : internal transcribed spacer

Les extraits d'ADN ont été amplifiés avec des amorces ITS1 et ITS4, afin d'obtenir en quantité les régions ITS1 et ITS2 de chaque souche. 5µL d'ADN sont utilisés pour l'amplification par PCR dans un thermocycleur, dans 35µL d'un mix de solution réactionnelle contenant essentiellement, des amorces, des bases, des sels et la Taq polymérase (Composition en annexe 6). Le programme adopté est le suivant :

- 3min de pré-dénaturation à 94°C

- 35 cycles de :
 - ✓ Etape de dénaturation à 94°C pendant 60s
 - ✓ Etape d'hybridation spécifique à 58°C pendant 60s
 - ✓ Etape d'élongation de la chaîne à 72° C pendant 120s
- 10min de post-élongation

ii. Quantification

Les extraits d'ADN ainsi amplifiés seront révélés et quantifiés par électrophorèse, avec un marqueur de taille, sur un gel de migration, l'agarose.

Ce dernier donnera une indication de la quantité de paire de base en fonction de la distance parcourue sur le gel.

iii. Séquençage

Les produits de la PCR ont été envoyés à séquencer auprès de la société Genoscreen®, un prestataire allemand qui se spécialise dans la génomique.

Cette dernière séquence les extraits selon la méthode de SANGER dans les deux (02) sens, « forward (sens) » et « reverse (anti-sens) ». Pour l'envoi, 40µl de produit de la PCR par puits, de chaque individu, ont été distribués dans des plaques de séquençage de 96 puits.

Une plaque « Mirror » contenant les amorces a été envoyée avec la plaque de séquençage.

iv. Analyse des séquences

Les données des séquences ont été reçues par courriel sous forme de chromatogramme. Chaque chromatogramme est composé d'un ensemble de pics de différentes couleurs. Chaque base a une couleur spécifique et universelle : « A » est colorée en vert, « T » en rouge, « G » en noir et « C » en bleu. Les pics non identifiés par le séquenceur sont notés « N » ou « not identified » et sont colorés en violet.

Pour chaque séquence, une lecture et une correction manuelle ont été effectuées avec le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor (v7.2.5) (Annexe 7). Afin d'obtenir la totalité du gène, l'alignement et la jonction des séquences « forward » et « reverse » d'environ 500 pb pour chaque individu ont été réalisés.

Pour l'identification de l'espèce, correspondant à chaque séquence, ces dernières sont comparées en ligne avec la base de données des champignons mis en ligne sur NCBI-BLAST.

Toutes les séquences ont été alignées avec le logiciel DARWIN pour établir la distance génétique entre elles. Cette distance génétique permettra, avec les séquences de référence, de confirmer l'identité de la souche à partir de laquelle l'ADN a été extrait. Le taux de similarité et de parenté avec les souches de la base de données est exprimé en termes de probabilité de regroupement et de distance génétique. A partir de la matrice des distances génétiques, un arbre phylogénique a été établi.

c. Caractérisation morphologique

Les souches sont remises en culture sur un milieu PDA fraîchement stérilisé et solidifié. Au bout d'une semaine, sa morphologie est caractérisée d'après les critères suivants :

- Couleur
- Contour (lisse, dentelé, lobé)
- Surface (plane, bombée, surélevée, annelée)
- Spores (type)
- Conidiophores (présence ou absence)

II. Résultats

1. Circuit de commercialisation des fruits dans l'île

Quelle que soit la zone de collecte, tous les fruits partagent un circuit similaire entre le producteur et le consommateur. Ce circuit est représenté sur la figure 3. En général, peu de dispositions sont prises pour protéger les fruits des dégâts post-récoltes, qu'ils soient dûs à la manutention ou dû aux contaminations par des agents pathogènes. Les fruits sont entassés tels quels dans le moyen de transport, ou mis dans des sacs en fibres naturelles à grosses mailles (vanniers) ou dans des cageots en pin.

Le producteur ne collecte pas lui-même ses productions. Des collecteurs employés par des grossistes ou par les transformeurs (locaux ou de la capitale) se chargent de la collecte et du transport des fruits jusqu'à l'usine de transformation ou jusqu'aux marchés paysans locaux ou à distance (la capitale ou d'autres villes de Madagascar). Le transport du champ de production aux marchés locaux se fait souvent par charrettes, par camionnettes ou exceptionnellement par barques pour les bananes. Les produits à écouler sur place sont collectés au niveau des marchés paysans locaux par les détaillants locaux eux-mêmes. Les produits à écouler dans les autres régions de l'île sont acheminés vers la capitale par camions ou exceptionnellement par trains pour les bananes. Ils arrivent tôt au niveau des marchés paysans de la capitale où les détaillants viennent se fournir.

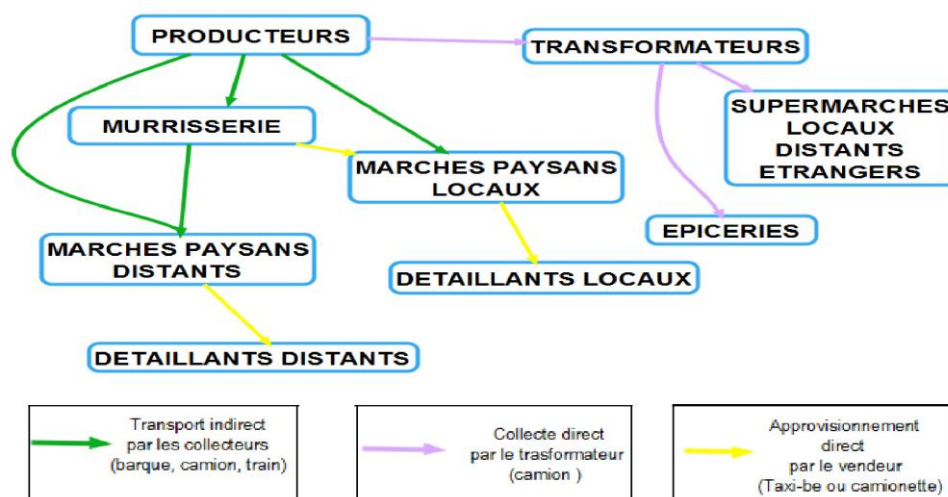


Figure 3: Circuit de commercialisation des bananes, papayes et mangues à Madagascar

Les mangues sont écoulées directement tandis que les bananes et les papayes passent par des murisseries localisées à proximité des champs pour les papayes et à proximité des

marchés pour les bananes. Il s'agit de murisseries traditionnelles chauffées par des bois ou des sciures de bois ou du son. Aucun traitement antibactérien ou antifongique n'est effectué sur les fruits dans ces murisseries.

2. Pathologies observées

Les pathologies observées sont :

- L'anthraxose : il s'agit de nécroses soit des dépressions noires, de formes arrondies, localisées le long du fruit. Dans le cas de la banane, des spores de couleur rouille peuvent apparaître sur les lésions avec le temps (Planche 2).

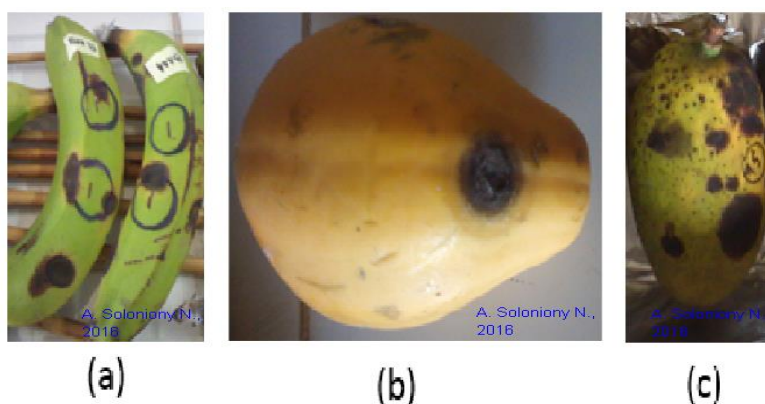


Planche 2: Anthracnose post-récolte sur des fruits malgaches : (a) bananes ; (b) papayes ; (c) mangues.

- Les pourritures : il s'agit de la pourriture localisée d'une partie du fruit. Il peut s'agir de la couronne ou le long ou au bout des doigts pour les bananes, sur le pédoncule et sur le flan pour les papayes, à la base ou le long du fruit pour les mangues. Elles sont généralement planes, suintantes avec développement d'un enchevêtrement mycélien avec le temps (Planche 3).

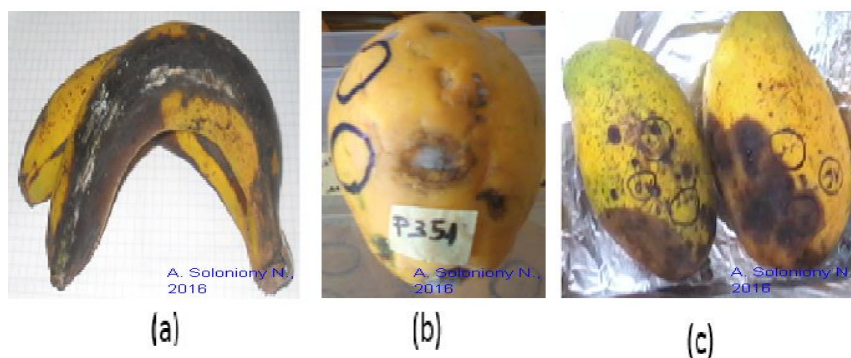


Planche 3: Les pourritures post-récolte des fruits malgaches (a) bananes ; (b) papayes ; (c) mangues