

Activité Antifongique In Vitro Du Perydroxan Sur Penicillium Digitatum et P. Italicum Responsables de la Pourriture des Agrumes

[In Vitro Antifungal Activity of Perydroxan on Penicillium Digitatum and P. Italicum Responsible For the Decay of Citrus Fruit]

Khaled ATTRASSI

Laboratoire Science de la Vie et de la Terre, Equipe de la Biodiversité,

CRMEF (Centre Régional des Métiers de l'Éducation et de la Formation), 245, Kénitra, Maroc.

attrassi2@yahoo.fr



Abstract - The antifungal activity of perydoxan against *Penicillium italicum* and *P. digitatum* attacking citrus fruits of the region of Gharb (Morocco) was tested in vitro. 100% inhibition of mycelial growth was achieved with 2 and 2,5 % perydoxan for *P. digitatum* and *P. italicum*, respectively. This product thus exhibits a high potential of disinfection for the control of these phytopathogenes in the conditioning of citrus fruits.

Résumé - L'activité antifongique du perydoxan contre *Penicillium italicum* et *P. digitatum* qui s'attaque aux fruits d'agrumes de la région du Gharb (Maroc) a été testé in vitro. Une inhibition totale de la croissance mycélienne a été obtenue à 2 et 2,5 % pour *P. digitatum* et *P. italicum*. Ce produit manifeste donc un grand potentiel de désinfection pour l'éradication de ces phytopathogènes dans les stations de conditionnement des agrumes.

Keywords - *Penicillium Italicum*; *Penicillium Digitatum*; *Perydoxan*; *Antifungal Activity*.

I. INTRODUCTION

Au Maroc, la culture des agrumes couvrait en 2013-2014 une superficie 92 000 hectares assurant une production annuelle de 2,2 millions de tonnes [19]. Ce tonnage couvre à la fois les besoins du marché national en fruit frais, assure une exportation croissante et alimente les unités de transformation.

En raison de leur teneur élevée en eau et de leur richesse en éléments nutritifs, les fruits d'agrumes sont très susceptibles aux attaques des champignons pathogènes

[10,31]. Cependant, la quasi-totalité des pertes d'origine parasitaire, en post-récolte, sont dues aux champignons suivants : *Geotrichum candidum* (agent de la pourriture amère), *Penicillium digitatum* (agent de la pourriture verte) et *P. italicum* (agent de la pourriture bleue). En effet, plus de 90 % des dégâts sur fruits d'agrumes en post-récolte sont dus aux champignons précités [4].

Les maladies de post-récolte sont à l'origine d'énormes pertes des fruits d'agrumes pendant le stockage et le transport des fruits. Ces maladies sont contrôlées principalement par

l'utilisation excessive de fongicides de synthèse. Cependant, l'efficacité variable de ces fongicides, la prolifération des souches résistantes et la préoccupation croissante de la population envers les dangers liés à l'utilisation de ces produits, tels que leurs effets néfastes sur la santé et l'environnement, a nécessité le développement de stratégies alternatives pour le contrôle des maladies d'agrumes en post-récolte.

Il est bien connu que les fruits, après leur récolte sont attaqués par des moisissures, qui entraînent leur pourriture. Elles apparaissent après un temps plus ou moins long selon la nature des fruits et légumes et des conditions de stockage [15]. Ces champignons sont pour la plupart bien connus, de même que leur mode de développement. Parmi eux, *Penicillium digitatum* cause la pourriture verte des agrumes et *P. italicum* la pourriture bleue. Ces deux espèces sont responsables de plus de 80 % des pourritures des agrumes en post-récolte [2].

Les méthodes de traitement des fruits contre ces champignons sont connues et bien décrites. Parmi celles-ci, on peut citer l'application par trempage et/ou brossage des fruits après récolte dans des solutions de fongicides [2,5,6,13,23]. D'autres procédés recommandent un premier traitement par pulvérisation de composés fongicides sur les arbres fruitiers, puis un trempage des fruits dans d'autres fongicides. Les fongicides les plus couramment utilisés pour le traitement des fruits après récolte et surtout des agrumes, sont l'imazalil, le thiabendazole ou la guazatine, qui se sont avérés jusqu'à présent d'une grande efficacité. Ces composés sont en effet particulièrement actifs contre les souches de *Penicillium* à l'origine de nombreuses maladies fongiques [9,14,21,29,32].

Malheureusement, on observe l'apparition de souches résistantes au thiabendazole et plus récemment à l'imazalil. Ce dernier ? peut être employé aussi bien en traitement préventif que curatif et il a été démontré que cet effet curatif reste limité dans le temps. Par ailleurs, l'utilisation des pesticides est de plus en plus critiquée en raison de leur toxicité [7-8,11,18,25-27]. Pour cette raison, le développement de nouveaux produits de protection des fruits et légumes ayant pour principes actifs des molécules à faible toxicité peut s'inscrire comme une solution écologique contre la croissance mycélienne des champignons *P. italicum* et *P. digitatum*.

Récemment, plusieurs produits commerciaux à base de peroxyde d'hydrogène ont été testés pour leur effet antifongique, comme le Storox, désinfectant à large spectre

contenant un mélange de peroxyde d'hydrogène et d'acide peroxyacétique, qui réduit de 98 % la contamination de caisses d'emballage en bois par *Penicillium expansum*, lorsqu'il est appliqué à 2700 ppm [28]. Tian *et al.* [30] ont démontré que le chlorure de calcium à 2 % inhibe la croissance mycélienne et la germination des spores de *Rhizopus stolonifer*, et Patykowski [20] a prouvé que 40 mM de H₂O₂ inhibe in vitro la germination des spores de *Botrytis cinerea*. Une étude récente a montré que H₂O₂ possède une activité antibactérienne in vitro et sur les feuilles de tomate contre *Ralstonia solanacearum* [17]. L'acide peracétique est actuellement utilisé avec succès pour désinfecter les effluents d'eaux usées et stériliser les récipients de traitement et des réservoirs dans l'industrie alimentaire [24].

Le peroxydran est un mélange aqueux d'acide peracétique (5 %) et de peroxyde d'hydrogène (25 %) qui a été récemment testé contre la pourriture des fruits [14].

L'objectif de ce travail est d'isoler et évaluer l'efficacité in vitro du perydroxan sur la croissance mycélienne et la germination des spores de *Penicillium digitatum* et *P. italicum*.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ESPECES FONGIQUES ETUDIEES

Penicillium italicum et *P. digitatum* ont été isolés à partir de clémentines pourries (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) orange foncé, petites et de texture onctueuse provenant d'une chambre froide de Kénitra à 6°C après six mois de stockage en 2015.

Des fruits d'agrumes pourris en conservation provenant de chambre froide de Kénitra, ont été ramenés au laboratoire pour analyse mycologique. Ils ont été désinfectés par l'alcool à 90° et les fragments présentant des lésions ont été par la suite découpés et déposés sur le milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar). Les constituants de ce milieu (200 g pomme de terre, 15 g agar-agar, 20 g saccharose, 100 ml eau distillée) ont été mélangés au préalable dans une fiole Erlenmeyer d'un litre. Le milieu a été stérilisé en autoclave à 120°C pendant 30 min. Le milieu est coulé à environ 50°C dans des boîtes de Petri de 20 cm de diamètre à raison de 30 à 40 ml par boîte additionné de 100 mg/l de chloramphénicol pour empêcher le développement de bactéries. Les boîtes ont été incubées dix jours à l'obscurité et à 25°C.

Une fois les colonies fongiques développées, plusieurs repiquages ont été réalisés dans de nouvelles boîtes de PDA

afin d'obtenir des cultures pures. Des isollements monospores ont été également réalisés à partir de cultures pures en utilisant la technique des stries perpendiculaires. Cette dernière consiste à préparer une suspension sporale à partir de chaque culture et d'étaler à la surface du milieu de culture une goutte de la suspension en stries perpendiculaires. Les colonies développées après 24 heures sont prélevées une à une sous microscope à faible ou moyen grossissement, et repiquées séparément dans des boîtes contenant le milieu PDA.

La détermination des espèces fongiques isolées a été réalisée à l'aide de plusieurs clés de détermination [3,22,26].

B. EFFICACITE DU PERHYDROXAN SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE

Le produit testé est le perydroxan qui est un mélange d'acide peracétique et de peroxyde d'hydrogène. Il est conçu pour assainir les surfaces qui entrent en contact avec les produits alimentaires.

Le perydroxan a été testé sur la croissance mycélienne in vitro de *P. italicum* et de *P. digitatum* à 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5 et 3 % (v:v) pour son effet inhibiteur de la croissance mycélienne de *P. italicum* et *P. digitatum*. Les différentes concentrations ont été versées dans des erlenmeyers contenant le milieu PDA stérilisé. Après agitation, le mélange est distribué dans des boîtes de Petri stériles (9 cm de diamètre). Les boîtes contenant le PDA exempt de perydroxan ont été utilisées comme témoin. Toutes les boîtes ont été inoculées au centre avec des disques de 5 mm de diamètre d'une culture âgée de dix jours des champignons testés. Les boîtes inoculées ont été scellées avec du parafilm et incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ [1]. La croissance linéaire moyenne des champignons testés a été calculée après sept jours quand le témoin atteint une pleine croissance. Tous les traitements ont été répétés trois fois.. Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne pour les deux champignons étudiés ont été calculés selon la formule suivante :

$$P\% = \frac{D - Da}{D} \times 100$$

Avec:

P : pourcentage d'inhibition (%) de la croissance mycélienne,
D : estimation de la croissance mycélienne dans milieu témoin,

Da : estimation de la croissance mycélienne dans le milieu avec le produit.

C. ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique des données a été effectuée par le test de comparaisons multiple de Duncan au seuil de 5 %.

III. RÉSULTATS

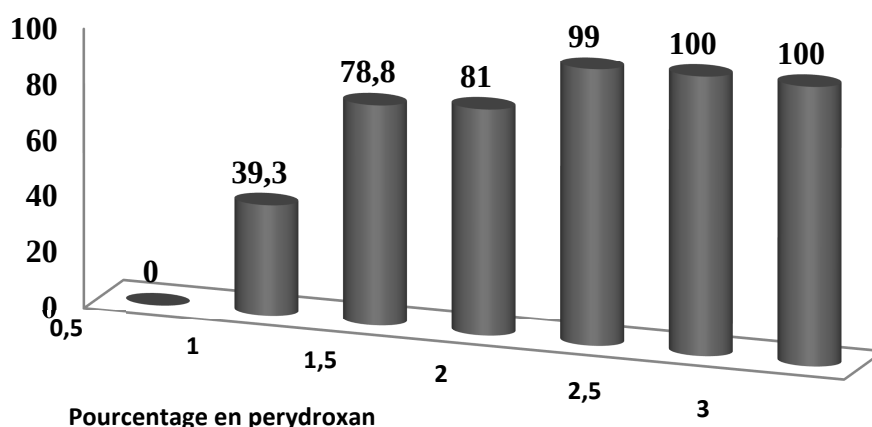
Le perydroxan inhibe la croissance mycélienne de *Penicillium italicum* et *P. digitatum* (Figure 1). L'efficacité augmente avec les concentrations testées. Le pourcentage d'inhibition est total à 2,5 % pour *P. italicum* et 2 % pour *P. digitatum*.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 1. Le produit peridroxan est très efficace pour inhiber la croissance mycélienne des deux champignons *Penicillium italicum* et *P. digitatum*. Cette efficacité varie en fonction des doses testées. La dose de 2,5% a induit une réduction de la croissance mycélienne avec un pourcentage d'inhibition de 100% de la croissance mycélienne des deux champignons.

Le perydroxan présente un important effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de *Penicillium italicum* et *P. digitatum*. De par son important potentiel de désinfection, il permet leur éradication dans les stations de conditionnement, les structures des serres à partir de 2,5 %. À cette dose, le perydroxan est à recommander pour la désinfection des outils de travail comme les sécateurs, pinces et couteaux lors des opérations d'ébourgeonnage, taille, greffage et effeuillage.

% d'inhibition de *Penicillium italicum*



% d'inhibition de *Penicillium digitatum*

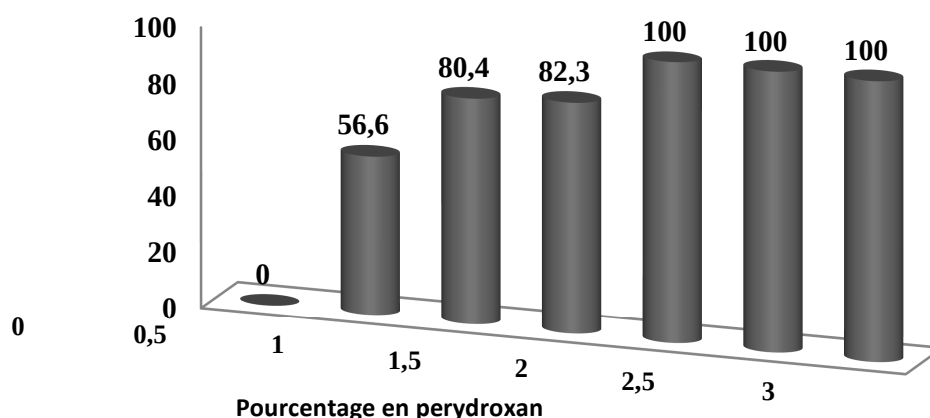


Figure. 1 : Croissance Mycélienne de *Penicillium Italicum* et *P. Digitatum* Après Sept Jours D'incubation à 25°C en Présence de Sept Concentrations de Perydroxan.

RÉFÉRENCES

- [1] Al-Reza (S.M.), Rahman (A.), Ahmed (Y.), Kang (S.C.) - Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. - *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2010, **96**(2), 86-92.
- [2] Attrassi (K.), Badoc (A.) - Moisissures des fruits de deux agrumes. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2014, **153**(1-4), 25-34.
- [3] Botton (B.), Burton (A.), Fèvre (M.), Gauthier (S.), Guy (P.R.), Larpent (J.P.), Reymond (P.), Sanglier (J.J.), Vayssier (Y.), Veau (P.) - *Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle*. Paris, Milan, Barcelone : Masson, 1990, 512 p.
- [4] Boubaker (H.) - Étude des problèmes phytosanitaires des fruits d'agrumes en post-récolte. Thèse Phytopathologie, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech, Univ. Cadi Ayyad, Marrakech, 1993, 117 p.

- [5] Chitzanidis (A.), Argyri (I.) - Spread of phytophthora rot on stored citrus and its prevention by fungicide dips. *Bull. OEPP*, 1990, **20**, 163.
- [6] Cohen (E.), Shalom (Y.) - Fenpropimorph: a promising fungicide for postharvest diseases in citrus fruits. - *Phytoparasitica*, 1990, **18**(1), 17-26.
- [7] Conway (S.W.), Sams (C.E.), Wang (C.Y.), Abbott (J.A.) – Additive effects of postharvest calcium and heat treatments on reducing decay and maintaining quality in apples. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1994, **119**, 49-53.
- [8] Daferera (D.J.), Ziogas (B.N.), Polissiou (M.G.) - GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. - *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**(6), 2576-2581.
- [9] Eckert (J.W.) – Role of chemical fungicides and biological agents in post harvest diseases of fruits and vegetables. - *Workshop Proc. USDA ARS*, **92**, 1991, 14-30.
- [10] Eckert (J.W.), Ogawa (J.M.) - The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. - *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1985, **23**(1), 421-454.
- [11] El-Gaouth (A.), Arul (J.), Grenier (J.), Asselin (A.) - Antifungal activity of Chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. - *Phytopathology*, 1992, **82**, 398-402.
- [12] El-Mougy (N.S.), El-Gamal (N.G.), Abdalla (M.A.) - The use of fungicide alternatives for controlling postharvest decay of strawberry and orange fruits. - *J. Plant Prot. Res.*, 2008, **48**(3), 385-395. [https://www.degruyter.com/dg/viewarticle/j\\$002fjppr.2008.48.issue-3\\$002fv10045-008-0048-z\\$002fv10045-008-0048-z.xml](https://www.degruyter.com/dg/viewarticle/j$002fjppr.2008.48.issue-3$002fv10045-008-0048-z$002fv10045-008-0048-z.xml)
- [13] Elad (Y.) - Integrated control of foliar disease of green house vegetable crops. In Hafini (A.), Adhouri (M.), Boufouin (W.O.), Proc. Symp. Int. Prod. Prot. Intégrées Cult. Hortic., 6-9 May 1997, IAV Agadir, Morocco.
- [14] Elbouchtaoui (M.C.), Chebli (B.), Errami (B.), Salghi (R.), Jodeh (S.), Warad (I.), Hamed (O.), El Yamlahi (A.) - Efficacité du perydroxan contre deux champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea* et *Penicillium digitatum*. - *J. Mater. Environ. Sci.*, 2015, **6**(7), 1938-1943. http://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol6/vol6_N7/233-233-JMES-1494-2015-Elbouchtaoui.pdf
- [15] Gatto (M.A.), Ippolito (A.), Linsalata (V.), Cascarano (N.A.), Nigro (F.), Vanadia (S.), Di Venere (D.) - Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. - *Postharv. Biol. Technol.*, 2011, **61**(1), 72-82.
- [16] Juven (B.J.), Pierson (M.D.) - Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. - *J. Food Prot.*, 1996, **59**(11), 1233-1241. <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-59.11.1233?code=fopr-site>
- [17] Klein (J.D.), Conway (W.S.), Whitaker (B.D.), Sams (C.E.) - *Botrytis cinerea* decay in apples is inhibited by postharvest heat and calcium treatments. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1997, **122**(1), 91-94. <http://journal.ashspublications.org/content/122/1/91.full.pdf+html>
- [18] Martínez-Romero (D.), Serrano (M.), Bailén (G.), Guillén (F.), Zapata (P.J.), Valverde (J.M.), Castillo (S.), Fuetes (M.), Valero (D.) - The use of a natural fungicide as an alternative to pre harvest synthetic fungicide treatments to control lettuce deterioration during postharvest storage. - *Postharv. Biol. Technol.*, 2008, **47**(1), 54-60.
- [19] Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts. Production prévisionnelle des agrumes : Une année record qui permet de dépasser le cap des 2 millions de tonnes 2014. <http://www.agriculture.gov.ma/pages/communiqués/production-previsionnelle-des-agrumes%C2%A0-une-annee-record-qui-permet-de-depasser-le-cap-2millions-tonnes>
- [20] Patykowski (J.) - Role of hydrogen peroxide and apoplastic peroxidase in tomato — *Botrytis cinerea* interaction. - *Acta Physiol. Plant.*, 2006, **28**(6), 589-598.

- [21] Piano (S.), Neyrotti (V.), Migheli (Q.), Gullino (M.L.) - Biocontrol capability of *Meschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. - *Postharv. Biol. Technol.*, 1997, **11**(3), 131-140.
- [22] Pitt (J.I.) - Laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. Division of Food Processing. 1988, 187 p.
- [23] Poovaiah (B.W.) - Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. - *Food Technol.*, 1986, **40**, 86-89. <http://postharvest.tfrec.wsu.edu/PC2004F.pdf>
- [24] Profaizer (M.), Massone (A.), Nurizzo (C.), Bandera (F.) - *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 1997, 62(4b), 1785-1792.
- [25] Ralph (S.) - *Controlled Environm. Magazine*, 2003, **42**, 328.
- [26] Samson (R.A.), Hoekstra (E.S.), Van Dorschot (C.A.N.) - Introduction to food-Borne fungi. Second edition Central bureau Voor Schimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands, Academy of Arts and Sciences, 1984, 248 p.
- [27] Sapers (G.M.), Simmons (G.F.) - Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. - *Food Technol.*, 1998, **52**(2), 48-52.
- [28] Sholberg (P.L.) - Bin and storage room sanitation. *Washington Tree Fruit Postharvest Conference*. December 8th, 2004, Yakima.
- [29] Solaimani (B.), Ramezani (M.), Rahemi (M.), Saharkhiz (M.J.) - Biological control of postharvest disease caused by *Penicillium digitatum* and *P. italicum* on stored citrus fruits by Shiraz Thyme essential oil. - *Adv. Environ. Biol.*, 2009, **3**(3), 249-254. www.aensiweb.com/old/aeb/2009/249-254.pdf
- [30] Tian (S.P.), Fan (Q.), Xu (Y.), Jiang (A.L.) - Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. - *Plant Pathol.*, **51** (2002) 352-358. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3059.2002.00711.x/pdf>
- [31] Tripathi (P.), Dubey (N.K.) - Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. - *Postharv. Biol. Technol.*, 2004, **32**(3), 235-245.
- [32] Wedge (D.E.), Galindo (J.C.G.), Macias (F.A.) - Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. - *Phytochemistry*, 2000, **53**(7), 747-757.