

WWJMRD 2016; 2(7): 43-47  
www.wwjmr.com  
Impact Factor MJIF: 4.25  
e-ISSN: 2454-6615

**Khaled ATTRASSI**  
Laboratoire Science de la vie et  
de la terre, CRMEF (Centre  
Régional des Métiers de  
l'Éducation et de la  
Formation), 245, Kénitra,  
Maroc

## ***In vivo* Effect of some calcium salts on the development of post-harvest fungi *Penicillium italicum* and *Rhizopus stolonifer* in citrus fruit**

**Khaled ATTRASSI**

### **Abstract**

The *in vivo* efficacy of silicate, hydroxide, oxide, sulfate and calcium hypochlorite were tested on the development of fungi responsible for storage rot in citrus fruit.

*In vivo*, 600 ppm of calcium silicate, calcium hydroxide and calcium oxide inhibited superficial rot due to *Penicillium italicum* and *Rhizopus stolonifer* with 51 and 86% on fruit Orange and 52 and 85% on Clémentine. The depth of rot inside the fruit decreased with 53 and 85% in Orange and 50 and 91% in Clémentine.

**Keywords:** Citrus fruit, rot, storage, calcium salts

### **Introduction**

Les agrumes comptent parmi les principales cultures fruitières, dont le fruit est largement consommé aussi bien frais que sous forme de jus ou autre formes (conserves, confiture...). L'importance des fruits d'agrumes est attribuée à leur richesse en vitamine C (acide ascorbique), en fibres alimentaires, en composés phénoliques, en oligo-éléments, et pour leur potentiel antioxydant (Gorinstein *et al.*, 2001). Les agrumes sont cultivés dans plus de 137 pays à travers le monde (Ismail and Zhang, 2004). À l'échelle mondiale, la production annuelle en fruit frais est d'environ 120 millions de tonnes. Au Maroc, la culture des agrumes couvre une superficie de 76500 hectares assurant une production annuelle d'environ 1,5 millions de tonnes. Ce tonnage couvre à la fois les besoins du marché national en fruit frais, assure l'exportation d'environ 570.000 t/an et alimente les unités de transformation. Ce secteur génère des effets importants sur l'emploi à travers la création de près de 21 millions de journées de travail par an. De ce fait, le secteur des agrumes est classé parmi les plus importants de l'économie nationale. La région du Souss-Massa-Draa vient au premier rang à l'échelle nationale, en assurant environ 50 % de la production et de l'exportation nationale (Anonyme, 2011). En raison de leur teneur élevée en eau et de leur richesse en élément nutritifs, les fruits d'agrumes sont très susceptibles aux attaques des champignons pathogènes (Eckert and Ogawa, 1985; Tripathi and Dubey, 2004). Au Maroc, comme dans les pays en développement, les pertes pendant la récolte, le transport et le stockage des fruits sont élevées. Elles peuvent aller jusqu'à 50%, ou plus, de la récolte (Eckert and Ogawa, 1985; Wisniewski and Wilson, 1992). Les agrumes, comme toutes les autres cultures, sont affectés par plusieurs maladies cryptogamiques. Ces maladies sont dues à des infections initiées soit avant la récolte (e.g. *Alternaria citri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodyplodia theobromae*, *Trichoderma viride*) ou après la récolte des fruits (e.g. *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viride*) (Sommer, 1982; Eckert and Brown, 1986; Holmes *et al.*, 1994). 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 (Boubaker, 1993; Holmes *et al.*, 1994).

Les fruits d'agrumes subissent des dégâts considérables pendant le stockage, essentiellement suite à une contamination par des moisissures et dans une moindre mesure par les rongeurs et les insectes. Il s'ensuit une réduction quantitative et qualitative de leur valeur alimentaire et

### **Correspondence:**

**Khaled ATTRASSI**  
Laboratoire Science de la vie et  
de la terre, CRMEF (Centre  
Régional des Métiers de  
l'Éducation et de la  
Formation), 245, Kénitra,  
Maroc

des problèmes sanitaires (Mislivec et Tuite, 1970 ; Eckert, 1978 ; Barnett *et al.*, 1990 ; Bulter et Day, 1998 ). Les infections sont initiées au champ, quelques jours à plusieurs semaines avant la récolte. Elles sont favorisées, entre autres, par un taux d'inoculation élevé dans l'air et par une forte humidité. La détérioration peut être limitée par certaines conditions environnementales et par la résistance de l'écorce du fruit.

La réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée, baisse du rendement des récoltes et de graves problèmes sanitaires (Mislivec et Tuite, 1970 ; Eckert, 1978 ; Barnett *et al.*, 1990 ; Bulter et Day, 1998).

Les portes d'entrée des agents pathogènes pendant la récolte et le stockage des agrumes sont des blessures et des microlésions accidentelles. Les champignons parasites pénètrent aussi par voie naturelle par les stomates. Les blessures ont des origines variées : accidents divers (grêle, chocs, coups d'angle à la cueillette, prédateurs, chaleur, froid ou raréfaction de l'oxygène). Après pénétration, les microorganismes (*Penicillium* spp., *Rhizopus nigricans*, etc.) restent inactifs pendant un certain temps et constituent une niche de multiplication. Ils reprennent leur activité lors de la maturité des fruits. Les champignons détruisent les cellules de l'hôte en sécrétant des enzymes. Ils peuvent attaquer les polysaccharides des parois cellulaires et les protéines membranaires (Bailly, 1990 ; Snowdon, 1990 ; Bondoux, 1992; Selmaoui, 1999; Attrassi *et al.*, 2005; Attrassi *et al.*, 200 ; Attrassi *et al.*, 2016 ).

Dans ce travail nous avons déterminé le taux d'humidité des fruits de deux agrumes et isolé et identifié leurs moisissures après stockage à température ambiante.

### Matériel ET Méthodes

Acton *in vivo* des sels de calcium Matériel végétal : Deux variétés des fruits d'agrumes de type Orange (*Citrus sinensis* Osb.) et Clémentine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) de même calibre et d'apparence saine ont été trempés 1 min dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5% puis rincés à l'eau distillée stérile et séchés avec du papier filtre. Traitement des fruits : Les fruits des deux variétés ont été blessés artificiellement à l'aide d'une aiguille stérile de 3 mm de diamètre et 2 mm de profondeur en quatre points équatoriaux équidistants et au niveau du pédoncule. Ils ont été trempés 10 min dans 2000 ml d'une solution d'hydroxyde, silicate et l'oxyde de calcium à 600 ppm de Ca<sup>2+</sup>. Les témoins ont été trempés dans de l'eau distillée stérile. Les fruits ont été mis à sécher à l'air libre sur du papier filtre pendant 30 min.

Inoculation des fruits: L'inoculation par des disques mycéliens de 5 mm de diamètre de *Penicillium italicum* et *Rhizopus stolonifer* a eu lieu au niveau des blessures juste après le séchage. Les fruits ont été répartis individuellement dans des sachets en plastique blanc et

déposés sur la paillasse dans les conditions ambiantes du laboratoire. Pour chaque condition, trois melons ont été utilisés. Sept jours après inoculation, les diamètres des pourritures superficielles et en profondeur ont été mesurés au niveau des blessures à l'aide d'un double-décimètre en effectuant des coupes horizontales et verticales. Le pourcentage d'inhibition du développement des pourritures a été calculé par rapport au témoin.

Pourcentage d'inhibition en surface :

$$PIS = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

X

PIS : Pourcentage d'inhibition en surface.

X : Diamètre de la pourriture du témoin inoculé.

Y : Diamètre de la pourriture du fruit traité par le sel de calcium.

Pourcentage d'inhibition en profondeur :

$$PEP = \frac{Pt - P}{Pt} \times 100$$

Pt

PEP : Pourcentage d'inhibition en profondeur.

Pt: Profondeur de la pourriture du témoin inoculé.

P : Profondeur de la pourriture du fruit traité par le sel de calcium.

Analyse statistique : Les CI<sub>50</sub> et les CI<sub>90</sub> ont été déterminées graphiquement à partir de la relation linéaire entre les valeurs probits issues des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne, la production des conidies et la germination des conidies et le logarithme décimal des concentrations en Ca<sup>2+</sup>. Le traitement statistique des pourcentages moyens d'inhibition transformé en Arcsin UP a porté sur l'analyse de la variance et le test PPDS (plus petite différence significative) au seuil de 5 %.

### Résultats

Les résultats relatifs à l'action des sels de calcium sur l'évolution *in vivo* des pourritures causées par *Penicillium italicum*, et *Rhizopus stolonifer* sont représentés dans les Tableaux 1, 2 et 3.

Le développement de la pourriture provoquée par tous les champignons testés, aussi bien superficielle qu'à l'intérieur du fruit, a été efficacement inhibé *in vivo* par le silicate de calcium, l'hydroxyde de calcium et l'oxyde de calcium. L'hydroxyde de calcium permet de réduire jusqu'au 86% et 85% de diamètre des pourritures superficielles au niveau des points équatoriaux provoquées respectivement par *Rhizopus stolonifer* sur les fruits Mandarines et d'Oranges. De même, ce sel a pu inhiber de 65 % à 80% le développement des pourritures superficielles sur le pédoncule Clémentine et de 68 % à 78 % sur Orange.

**Tableau 1:** Effet *in vivo* de silicate de calcium sur le développement des pourritures des fruits d'agrumes causées par les différents champignons testés

	Pourriture superficielle				Profondeur des pourritures			
	Points équatoriaux		Pédoncule		Points équatoriaux		Pédoncule	
Orange	Φ (mm)	Pi (%)	Φ (mm)	Pi (%)	Prf (mm)	Pi(%)	Prf (mm)	Pi(%)
<i>P.italicum</i>	19,6		21,3		23,5		18,0	
<i>R.stolonifer</i>	25,0		22,4		20,8		23,6	
<i>P.italicum</i> +Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>	6,3	68b	7,6	64c	6,4	73a	7,0	61b
<i>R.stolonifer</i>	4,8	81a	6,0	73a	6,8	67b	7,7	67a

+ Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>								
<b>Clémentine</b>								
<i>P.italicum</i>	17,7		17,0		12,0		11,4	
<i>R.stolonifer</i>	26,8		24,5		18,5		20,0	
<i>P.italicum</i> +Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>	6,0	66c	8,2	52b	5,0	58b	4,0	65c
<i>R.stolonifer</i> + Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub>	6,0	78a	6,6	73c	8,0	57b	5,6	72b

Pour chaque variété, Deux résultats lus sur une même colonne diffèrent significativement au seuil de 5 % s'ils ne sont affectés d'aucune lettre en commun.

**Tableau 2:** Effet *in vivo* d'hydroxyde de calcium sur le développement des pourritures des fruits d'agrumes causées par les différents champignons testés

	Pourriture superficielle				Profondeur des pourritures			
	Points équatoriaux		Pédoncule		Points équatoriaux		Pédoncule	
<b>Orange</b>	Φ (mm)	Pi (%)	Φ (mm)	Pi (%)	Prf (mm)	Pi(%)	Prf (mm)	Pi(%)
<i>P.italicum</i>	19,6		21,3		23,5		18,0	
<i>R.stolonifer</i>	25,0		22,4		20,8		23,6	
<i>P.italicum</i> +Ca <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	4,0	79b	6,8	68c	3,6	85a	3,0	83a
<i>R.stolonifer</i> + Ca <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	3,5	86a	5,0	78a	5,0	76b	5,5	77b
<b>Clémentine</b>								
<i>P.italicum</i>	17,7		17,0		12,0		11,4	
<i>R.stolonifer</i>	26,8		24,5		18,5		20,0	
<i>P.italicum</i> + Ca <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	4,0	77b	6,0	65c	3,8	68c	3,5	69c
<i>R.stolonifer</i> + Ca <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	4,0	85a	4,8	80a	5,3	71b	4,2	79b

Pour chaque variété, Deux résultats lus sur une même colonne diffèrent significativement au seuil de 5 % s'ils ne sont affectés d'aucune lettre en commun.

**Tableau 3:** Effet *in vivo* d'oxyde de calcium sur le développement des pourritures des fruits d'agrumes causées par les différents champignons testés

	Pourriture superficielle				Profondeur des pourritures			
	Points équatoriaux		Pédoncule		Points équatoriaux		Pédoncule	
<b>Orange</b>	Φ (mm)	Pi (%)	Φ (mm)	Pi (%)	Prf (mm)	Pi(%)	Prf (mm)	Pi(%)
<i>P.italicum</i>	19,6		21,3		23,5		18,0	
<i>R.stolonifer</i>	25,0		22,4		20,8		23,6	
<i>P.italicum</i> +CaO	7,0	64b	10,4	51c	8,3	65a	7,0	61a
<i>R.stolonifer</i> + CaO	6,5	74a	8,5	62a	9,7	53c	8,8	63a
<b>Clémentine</b>								
<i>P.italicum</i>	17,7		17,0		12,0		11,4	
<i>R.stolonifer</i>	26,8		24,5		18,5		20,0	
<i>P.italicum</i> + CaO	7,3	59c	8,0	53b	6,0	50c	5,2	54c
<i>R.stolonifer</i> + CaO	6,8	75a	10,2	58a	8,4	55b	8,6	57b

Pour chaque variété, Deux résultats lus sur une même colonne diffèrent significativement au seuil de 5 % s'ils ne sont affectés d'aucune lettre en commun.

Les pourritures en profondeur et en superficielle du fruit causées par *P.italicum* et *R.stolonifer* sont réduites de façon significative par l'hydroxyde, silicate et l'oxyde de calcium au niveau des zones équatoriales et le pédoncule. Les pourcentages d'inhibition de l'hydroxyde de calcium au niveau des points équatoriaux et pédoncule sont supérieurs à 65% sur les deux variétés et atteignent 86% sur la variété Orange et 85% sur variété Clémentine.

#### Discussion ET Conclusion

*In vivo*, le silicate, l'hydroxyde et l'oxyde de calcium se sont avérés très efficaces dans l'inhibition des agents

pathogènes fongiques testés. Des résultats similaires ont été obtenus par Conway (1982) et Conway et Sams (1983). Ces auteurs ont rapporté que la pourriture des pommes causée par *Penicillium expansum* peut être réduite par le trempage des fruits dans une solution contenant l'hydroxyde, l'oxyde ou le silicate de calcium après la récolte. Selmaoui (1999) a signalé que ces produits ont pu diminuer ou inhiber totalement l'évolution des pourritures des pommes causées par *Alternaria alternata*, *Trichothecium roseum*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium spp.* et *Fusarium avenaceum*. Les ions Ca<sup>2+</sup> peuvent diminuer l'activité enzymatique des champignons en formant des

cations avec les acides pectiques constituant ainsi une muraille de cellules résistantes à la dégradation par les enzymes fongiques (Conway *et al.*, 1987). Pour Köhle *et al.* (1985), les ions  $\text{Ca}^{2+}$  stimuleraient probablement la synthèse de phytoalexines et/ou de phénols. La fermeté et la résistance au ramollissement peut être augmenté par trempage dans des solutions contenant le calcium, en raison de la stabilisation des systèmes membranaires et la formation de pectate de calcium qui augmente par la suite la rigidité de la paroi cellulaire et retarde l'activité du polygalacturonase (Poovaiah, 1986). Le calcium est considéré comme un élément minéral important qui maintient la qualité et la fermeté des fruits et permet une diminution de la pourriture de post-récolte et l'incidence des troubles physiologiques (Lurie, 2009). D'un autre côté, Martin-Diana *et al.* (2007) ont rapporté que le traitement par le calcium, en trempant les fruits dans des solutions de calcium, peut améliorer leur qualité nutritionnelle durant la conservation et accroître la durée de leur vie en maintenant leur fermeté. Il permet aussi de réduire le taux de la respiration et de la production d'éthylène, de retarder la maturation des fruits, de réduire la carie et le brunissement et d'atténuer les dégâts dus au froid. De même, Rao *et al.* (2011) ont signalé que le traitement du poivron par le  $\text{CaCl}_2$  permet de retarder la maturation, de prolonger la durée de vie et d'améliorer la qualité de leur conservation, tout en conservant la qualité nutritionnelle. Les résultats satisfaisants de cette étude permettront de suggérer l'utilisation des sels de calcium qui présentent un effet inhibitrice contre les pathogènes responsables des pourritures des fruits d'agrumes en post-récolte, avant l'entreposage, en raison de son efficacité contre les maladies d'origine fongiques.

## Références

1. Anonyme, 2011. Bilan Campagne agrumicole 2010/2011. Office Régional de Mise en Valeur Agricole du Souss-Massa, Service de production agricole.
2. Attrassi Khaled, Belamghari Ouafaa, Rahouti Mohamed, 2016. *In vitro* Efficacy of three fungicides on the development of rotting oranges from the cold of Kenitra (Morocco)- *World wide journal of multidisciplinary research and development*, 2(3): 43-47
3. Attrassi (K.), Benkirane (R.), Attrassi (B.), Douira (A.), 2007- Effet de l'association de certains fungicides avec le chlorure de calcium sur le développement d'un complexe fongique responsable de la pourriture des pommes en conservation. - *Phytoprotection*, 88 : 17-26.
4. Attrassi (K.), Selmaoui (K.), Ouazzani Touhami (A.), Badoc (A.), Douira (A.), 2005 - Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144(1-2), 47-62.
5. Conway W.S. 1982. Effect of postharvest calcium treatment on decay of Delicious apples. *Plant Dis.*, 66(5), 402-403.
6. Conway W.S. et Sams C.E. 1983. Calcium infiltration of Golden Delicious apples and its effect on decay. *Phytopathology*, 73(7), 1068-1071.
7. Conway W.S., Gross K.C. et Sam C.E. 1987. Relationship of bound calcium and inoculum concentration to the effect of post-harvest calcium treatment on decay of apples by *Penicillium expansum*. *Plant Dis.*, 71(1), 78-80.
8. Bailly (R.), 1990- Guide pratique de défense des cultures : Reconnaissance des ennemis Notion de protection des cultures. 4<sup>e</sup> ed..Paris : Acta, 557 p.
9. Barnett (J.A.), Payen (R.W.), Yarrow (D.), 1990- Yeasts: characteristics and identification. NY: *Cambridge University Press*, 1002 p.
10. Bondoux (P.) - Maladies de conservation des fruits à pépins, pommes et poires. Paris : INRA, PHM, 1992, 173 p.
11. Boubaker, H., 1993. Etude des problèmes phytosanitaires des fruits d'agrumes en post-récolte, *Phytopathologie*. Univ. Cadi Ayyad, Marrakech, p. 117.
12. Bulter (M.J.), Day (A.W.) - Fungal melanins: a review. - *Can. J. Microbiol.*, 1998, 44(12), 1115-1136.
13. Eckert (J.W.) - Post-harvest disease of citrus fruits. - *Outlook*, 1978, 9, 225-232
14. Eckert, J.W., Ogawa, J.M., 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 421-454.
15. Eckert, J.W., Brown, G.E., 1986. Postharvest citrus diseases and their control. *Fresh citrus fruits*, 315-360
16. Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Park, Y.S., Haruenkit, R., Lojek, A., Cíz, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S., 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food chemistry*, 74, 309-315.
17. Holmes, G., Eckert, J., Pitt, J., 1994. Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of citrus fruits. *Phytopathology*, 84, 719-727.
18. Ismail, M., Zhang, J., 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks on Pest Management*, 15, 29-35.
19. Köhle H., Jeblick W., Poten F., Blaschek W. et Kauss H. 1985. Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent process. *Plant Physiol.*, 77, 544-551.
20. Lurie S. 2009. Stress physiology and latent damage. In: Florkowski, W.J., Shewfelt, R.L., Brueckner, B., Prussia, S.E. (Eds.), *Postharvest Handling: A Systems Approach*. *Academic Press*, 443-459.
21. Martin-Diana A.B., Rico D., Frias J.M., Barat J.M., Henehan G.T.M. et Barry-Ryan C. 2007. Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Trend Food Sci. Technol.*, 18, 210-218.
22. Mislivec (P.B.), Tuite (J.), 1970- Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn kernels. - *Mycologia*, 62(1), 75-88.
23. Poovaiah B.W. 1986. Role of Ca in prolonging the storage life of fruits and vegetables. *Food Technol.*, 40, 86-89.
24. Rao T.V.R., Gol N.B. et Shah K.K. 2011. Effect of postharvest treatments and storage temperatures on the quality and shelf life of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Sci.Hortic.*, 132, 18-26.
25. Selmaoui K. 1999. Étude d'un complexe fongique responsable de la pourriture des pommes en conservation. Application de quelques moyens de lutte

- chimique. Thèse Doctorat, Univ. Ibn Tofaïl, Fac. Sci. Kénitra, Maroc, 175 p.
26. Snowdon (A.L.), 1990- A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables: General introduction and fruits. London: *Wolfe Scientific*, 302 p.
  27. Sommer, N.F., 1982. Postharvest handling practices and postharvest diseases of fruit. *Plant disease*, 66, 357-364.
  28. Tripathi, P., Dubey, N., 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 235-245.
  29. Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables : recent advances. *HortScience*, 27, 94-98.