



Efficacité du perydroxan contre deux champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea* et *Penicillium digitatum* (Efficiency anti-fungal of perydroxan for *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum*)

M. C. Elbouchtaoui¹, B. Chebli¹, M. Errami^{1,2}, R. Salghi^{1,*},
S. Jodeh³, I. Warad³, O. Hamed³, A. El Yamlahi⁴

¹ Team of Environmental and Biotechnology, ENSA, University Ibn Zohr, PO Box 1136, 80000 Agadir, Morocco.

² Laboratory of Environmental Engineering and Process (P2E), Universiapolis, 80000 Agadir, Morocco.

³ Department of Chemistry, An-Najah National University, P. O. Box 7, Nablus, State of Palestine

⁴ Morocco's Cereal Office (ONICL), 3 AV Moulay El Hassan, Rabat, Morocco.

Received 2015, Revised 2015, Accepted xxxxx 2015

*Corresponding author: E-mail: r.salghi@uiz.ac.ma; Tel: (+212 661145512)

Résumé

Botrytis cinerea et *Penicillium digitatum* font partie des principales maladies fongiques s'attaquant à plusieurs cultures d'importance agronomique. Ces champignons sont capables de développer des résistances à une grande variété de composés fongicides de synthèse. Ce travail s'intéresse à l'étude de l'activité antifongique d'une nouvelle spécialité dite Perydroxan contre deux champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea* et *Penicillium digitatum* s'attaquant aux fruits et légumes de la région Souss Massa Daraa. Différentes concentrations de Perydroxan ont été testées pour leurs effets inhibiteurs de la croissance mycélienne et la germination des spores *in vitro* de *B. cinerea*, et *P. digitatum*. 100% d'inhibition de la croissance mycélienne a été obtenue aux doses de 2% et 2,5% pour *P. digitatum* et *B. cinerea* respectivement. De plus la germination des spores de *B. cinerea* a été à 100% à la dose de 2,5% et pour un temps de contact de 15 min. Alors que la germination des spores de *P. digitatum* a été inhibé à 100% à la dose de 1,5% et pour une durée de contact de 25min. Cette étude montre que le Perydroxan présente un important effet inhibiteur de la croissance mycélienne et de la germination des spores des champignons de *B. cinerea* et *P. digitatum*. Ce produit manifeste un très grand potentiel de désinfection, permettant l'éradication des champignons en question dans les stations de conditionnement des agrumes et légumes.

Mots-clés: *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, Perydroxan, Activité antifongique.

Abstract

Botrytis cinerea and *Penicillium digitatum* are among the principal fungal diseases on agronomically important crops. These fungi are able to develop resistance to a wide variety of synthetic compounds. This work focuses on the study of the antifungal activity of a new specialty called Perydroxan against two plant pathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* attacking fruits and vegetables from the Souss Massa Daraa region. Different concentrations of Perydroxan were tested for their inhibitory effects of the mycelial growth and spores germination *in vitro* of *B. cinerea* and *P. digitatum*. 100% inhibition of mycelial growth was achieved at doses of 2% and 2.5% for *P. digitatum* and *B. cinerea* respectively. Moreover, spore germination of *B. cinerea* was 100% at a dose of 2.5% and for a contact time of 15 min. While the germination of spores of *P. digitatum* was completely inhibited at 1.5% dose and for a contact time of 25 min. This study shows that Perydroxan has a significant inhibitory effect of the mycelial growth and germination of fungal spores of both fungi *B. cinerea* and *P. digitatum*. This product exhibits a very high potential for disinfection of packinghouse of citrus and vegetables.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, Perydroxan, Antifungal activity.

1. Introduction

Il est bien connu que les fruits, après leur récolte sont attaqués par des moisissures, qui entraînent leurs pourritures. Ces moisissures apparaissent après un temps plus ou moins long, selon la nature des fruits ou des légumes et les conditions de stockage [1]. Elles sont causées par un ou plusieurs champignons phytopathogènes. En plus, les mycotoxines qui sont les produits de métabolites secondaires des champignons causent des effets néfastes sur les êtres humains et les animaux [2]. Ces champignons sont pour la plupart bien connus, de même que leur mode de développement. Parmi ces champignons on a le *Penicillium digitatum* qui cause la pourriture verte des agrumes. Alors que *Botrytis cinerea* Pers: Fr. (pourriture grise) qui est un agent pathogène omniprésent, cause de graves dommages à de nombreux fruits, légumes et cultures ornementales en pré et post-récolte [3-6]. Les méthodes de traitement des fruits contre ces champignons sont connues et bien décrites. Parmi celles-ci, on cite l'application par trempage et/ou brossage des fruits après récolte dans des solutions de fongicides [7,8]. 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 les 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*, qui sont à l'origine de nombreuses maladies fongiques [9, 10]. Malheureusement, actuellement on note l'apparition des souches de *Penicillium* résistantes au thiabendazole et plus récemment résistantes à l'imazalil. Cette spécialité peut être employée aussi bien en traitement préventif que curatif, il a été démontré que cet effet curatif reste limité dans le temps. En plus l'utilisation des pesticides est de plus en plus dénoncé en raison de leurs grandes toxicités [11,12]. D'après l'Institut Français de l'environnement (IFEN) on trouve des résidus de pesticides dans 96% des eaux superficielles et dans 61% des eaux souterraines. Entre 1995 et 1996, l'INRA de Rennes a installé des stations de mesure de pesticides dans les eaux de pluie. Les résultats ont montré que presque tous les échantillons contenaient des pesticides et 60% d'entre eux dépassaient les 0,1µg/l, concentration Maximale Admissible (CMA) pour l'eau de distribution. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé qu'il y a chaque année dans le monde 1 million de graves empoisonnements par les pesticides, avec quelque 220 000 décès. Les pesticides organophosphorés et les carbamates sont à l'origine des cas d'empoisonnements les plus fréquents [13]. Pour cela, 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 *B. cinerea* et *P. Digitatum*. De plus le contrôle de la pourriture fongique est essentiel pour optimiser le potentiel de stockage des citrus. Donc la recherche d'alternatives à la lutte chimique contre les maladies est nécessaire. Une alternative potentielle aux fongicides pour le contrôle des maladies de post-récolte est l'utilisation de produit désinfectant comme les peracides. Plus précisément, les peracides forment des radicaux libres hydroxyyles (OH), qui s'oxydent et perturbent les groupes thiols des protéines et des enzymes. Certaines stratégies, comme l'application de pré- ou post-récolte des sels de calcium, du peroxyde d'hydrogène et du chitosane contre la détérioration des fruits sont proposés [14-16]. Dans cette perspective nous étudions l'efficacité du produit Perydroxan contre la croissance mycélienne et la germination des spores de deux champignons phytopathogènes en vue de la recherche de nouvelles substances écologiques à activité antifongique.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Microorganismes étudiés et le produit testé.

Botrytis cinerea, a été isolé à partir des tiges de plants de tomate infectés et *Penicillium digitatum*, a été isolé à partir des fruits d'agrumes des oranges de la variété Maroc Late. Les deux souches isolées ont été identifiées au Laboratoire de Biologie et de Microbiologie de l'Ecole Nationale des Sciences Appliquées (ENSA), Agadir. Le produit testé est le perydroxan qui est un mélange d'acide péracétique et de peroxyde d'hydrogène. Il est conçu pour assainir les surfaces qui entrent en contact avec les produits alimentaires.

2.2. Etude de l'efficacité du produit Perydroxan sur la croissance mycélienne in vitro de *B. cinerea* et de *P. digitatum*

Le produit Perydroxan à des concentrations de 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5 et 3% (v: v) a été testé pour son effet inhibiteur de la croissance mycélienne de *B. cinerea* 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 pétri stériles (9 cm de diamètre). Les boîtes contenant le PDA exempt de produit chimique ont été utilisées comme témoin. Toutes les boîtes ont été inoculées au centre avec des disques de diamètre 5 mm d'une culture âgée de 10 jours par des champignons testés. Les boîtes de pétri inoculées ont été scellées avec du parafilm et ont été incubées à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ [17] (Figure 2). La croissance linéaire moyenne des champignons testés a été calculée après 7 jours quand le témoin atteint la pleine croissance. Tous les traitements ont consisté en trois répétitions. L'efficacité de chaque traitement sur la croissance des champignons a été calculée en déterminant le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.

2.3. Etude de l'efficacité du produit Perydroxan sur la germination des spores *in vitro* de *B. cinerea* et de *P. digitatum*

L'effet du produit perydroxan aux concentrations antérieures sur la germination des spores de *B. cinerea*, et *P. digitatum* a été évalué. Des suspensions de spores ont été préparées à partir des cultures vieilles de deux semaines cultivées sur PDA à 25°C . Les spores ont été récupérées en les enlevant à la surface des cultures avec une anse bactériologique stérile dans 5 ml d'eau distillée stérile et transférées dans 100 ml d'eau distillée stérile dans une fiole conique de 250 ml. Les suspensions ont été agitées pendant 10 min à 25°C et filtrées à travers deux couches de tissu mousseline stérile pour éliminer le mycélium fongique. La concentration des spores a été déterminée avec un hemacytometre et a été ajusté à 10^5 spores/ml. 1 ml de la suspension de spores de *B. cinerea* ou du *P. digitatum* a été ajouté dans un tube contenant 9 ml des différentes concentrations du produit perydroxan (0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5 et 3% (v: v). Puis chaque solution a été incubée à 25°C pendant 1 ; 5 ; 10 ; 15 ; 25 et 30 min. Ensuite, 0,1 ml de la suspension de chaque période d'incubation et la concentration du produit ont été étalés sur les milieux PDA et incubées pendant 6 jours à 25°C selon la méthode de Piano *et al.* [18]. La survie du champignon a été exprimée par le nombre moyen d'unités formant des colonies UFC/ml. Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne et de la germination des spores pour les deux champignons étudiés ont été calculés selon la formule 1 :

$$P (\%) = \frac{X - X_a}{X} \times 100 \quad (1)$$

Avec:

P: Pourcentage d'inhibition (%) de la croissance mycélienne ou de la germination des spores

X: Estimation de la germination ou de la croissance mycélienne dans milieu témoin.

Xa: Estimation de la germination ou de la croissance mycélienne dans le milieu avec le produit.

2.4. Méthode d'analyse statistique

Les résultats ont été analysés statistiquement par l'analyse de la variance à un critère, chaque donnée représente la moyenne de trois répétitions. L'application du test de Newman et Keuls permet de déterminer les groupes homogènes. Ainsi les données appartenant au même groupe sont considérées non différentes avec le risque α égal à 5%. Le traitement statistique des résultats est réalisé à l'aide d'un programme informatique statistique.

3. Résultats et Discussions

3.1. Croissance mycélienne *In vitro* de *B. cinerea* et de *P. digitatum*

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 1** et la **Figure 1**. Le produit peridroxan est très efficace pour inhiber la croissance mycélienne des deux champignons *Botrytis cinerea* et *Penicillium 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.

3.2. Germination des spores de *B. cinerea* et de *P. digitatum*

Toutes les concentrations du produit testé ont réduit la germination des spores des deux champignons étudiés (**Tableaux 2 et 3** et **Figures 2 et 3**). L'inhibition totale a été observée à la dose de 2,5% pour la durée de contact de 15 min du produit avec les spores des champignons testés. Les résultats montrent aussi que les spores du champignon *P. digitatum* sont plus sensibles au produit que les spores de *B. cinerea*. Les résultats obtenus lors de l'application de ce produit sont similaires à ceux obtenus par plusieurs chercheurs [19- 22] qui ont étudié l'activité antifongique du peroxyde d'hydrogène.

Tableau 1: Pourcentage d'inhibition (%) de la croissance mycélienne des deux champignons *B. cinerea* et *P. digitatum* en réponse aux différentes concentrations du produit perydroxan.

Concentration (%)	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne	
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>P. digitatum</i>
0	0d	0d
0,5	38,3c*	55,6d
1	77,8b	79,4c
1,5	80b	81,33b
2	98a	100a
2,5	100a	100a
3	100a	100a

* Les chiffres suivis de la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différents selon le test de Newman et Keuls ($P \leq 5\%$).

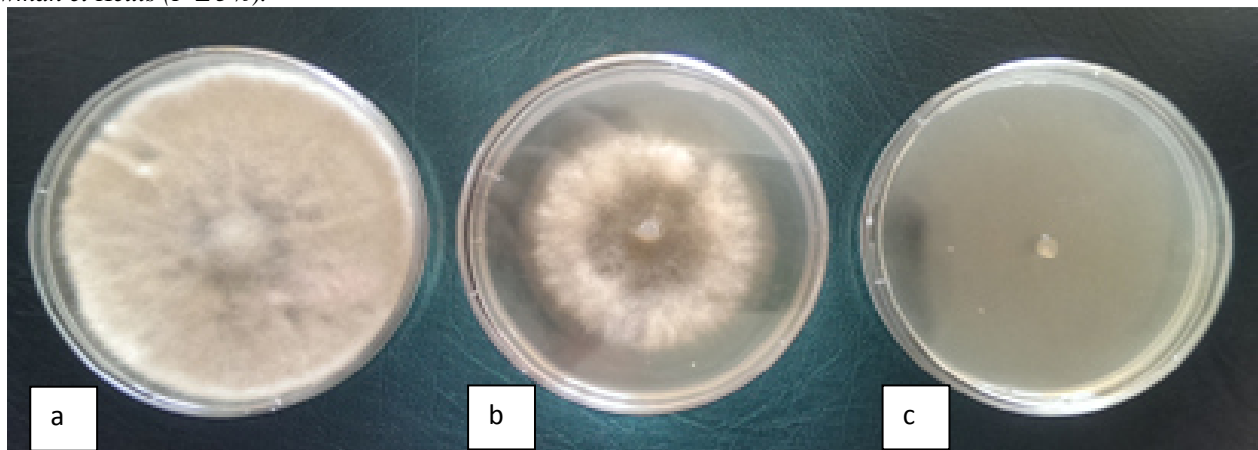


Figure 1: Croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* après 7 jours d'incubation à 25 °C des boîtes de pétri : témoin (a) traitée avec 1,5% perydroxan (b) et 2,5% de perydroxan (c).

Récemment, plusieurs produits commerciaux à base de peroxyde d'hydrogène ont été testé pour leur effet antifongique, comme le produit Storox un nouveau désinfectant à large spectre contenant un mélange de peroxyde d'hydrogène et d'acide peroxyacétique, ce produit a réduit à 98% la contamination des caisses d'emballage en bois par *Pecicillium expansum*, lorsqu'il est appliqué à 2700 ppm [23]. Tian et al. (2002) [24] ont démontré que le chlorure de calcium à 2% a inhibé la croissance mycélienne et la germination des spores de *R. stolonifer*, alors que Patykowski, 2006 [25] a prouvé que 40 mM de H₂O₂ inhibe la germination de spores *in vitro* de *B. cinerea*. Une étude récente a montré que H₂O₂ possède une activité antibactérienne *in vitro* et sur les feuilles de tomate contre *R. solanacearum* [26]. 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 [27].

Tableau 2: Pourcentage d'inhibition (%) de la germination des spores *B. cinerea* en réponse aux différentes concentrations du produit Perydroxan et après 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 25 min de contact des spores avec le produit.

Temps de contact (min) Spores de <i>B. cinerea</i>	Concentration du produit Perydroxan (%)					
	0%	0,50%	1%	1,50%	2%	2,50%
1	0,0a*	0,0e	0,0e	4,4d	24,4d	35,6d
5	0,0a	7,8d	28,9d	40,0c	51,1c	73,3c
10	0,0a	25,6c	63,3c	71,1b	71,1bc	95,6b
15	0,0a	51,1b	77,8b	80,0b	88,9b	100,0a
25	0,0a	73,3a	83,3a	97,8a	100,0a	100,0a

* Les chiffres suivis de la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différents selon le test de Newman et Keuls ($P \leq 5\%$).

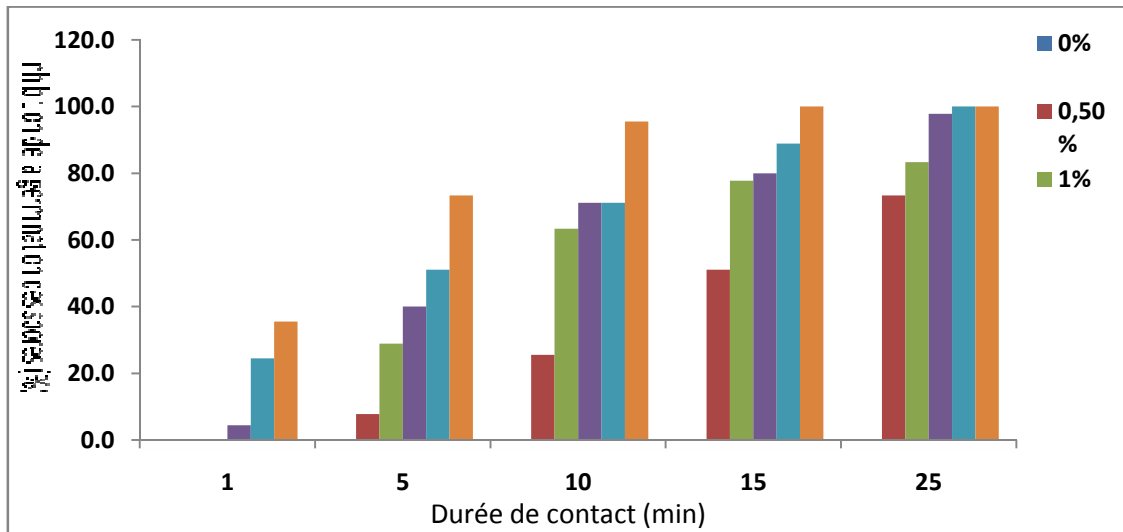


Figure 2 : Pourcentage d’inhibition de la germination des spores du champignon *Botrytis cinerea* après 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 25 min de contact avec le produit Perydroxan aux concentrations : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 2,5%.

Tableau 3: Pourcentage d’inhibition (%) de la germination des spores *P. digitatum* en réponse aux différentes concentrations du produit Perydroxan et après 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 25 min de contact des spores avec le produit.

Temps de contact (min) (Spores de <i>P. digitatum</i>)	Concentration du produit Perydroxan (%)					
	0%	0,50%	1%	1,50%	2%	2,50%
1	0,00a	2,22e*	20,00d	55,56c	80,00c	88,89c
5	0,00a	13,33d	30,00c	77,78bc	86,67bc	91,11b
10	0,00a	26,67c	50,00b	83,33b	88,89b	97,78a
15	0,00a	40,00b	71,11a	86,67b	97,78a	100,00a
25	0,00a	75,56a	88,89a	100,00a	100,00a	100,00a

* Les chiffres suivis de la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différents selon le test de Newman et Keuls ($P \leq 5\%$).

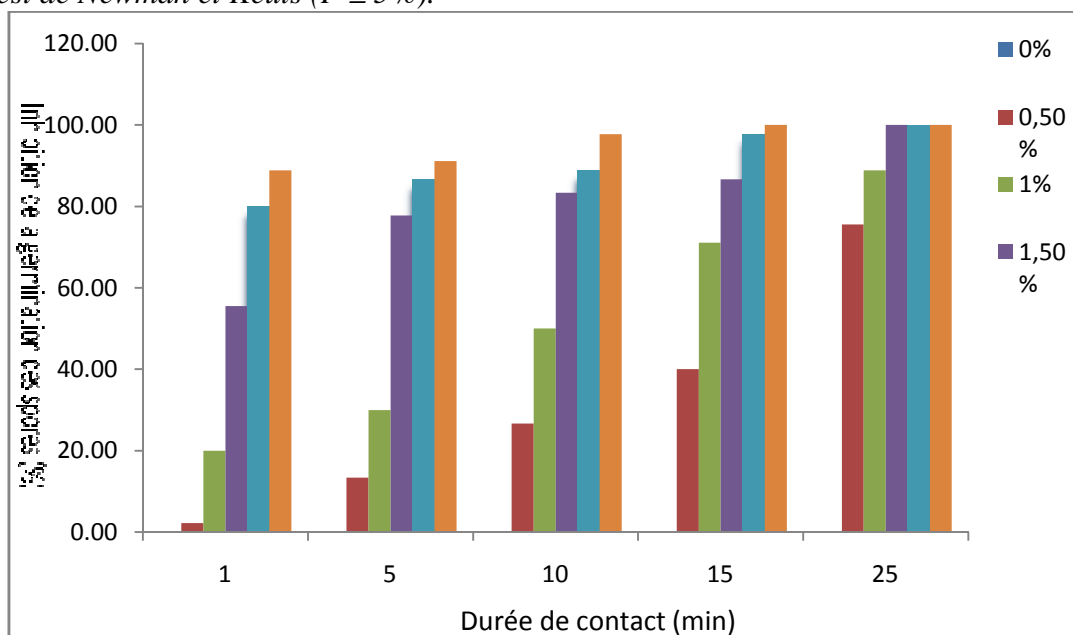


Figure 3 : Pourcentage d’inhibition de la germination des spores du champignon *Penicillium digitatum* après 1 ; 5 ; 10 ; 15 et 25 min de contact avec le produit Perydroxan aux concentrations : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 2,5%.

Conclusion

Le produit perydroxan présente un important effet inhibiteur de la croissance mycélienne et de la germination des spores des champignons: *B. cinerea* et *P. digitatum*. De part son important potentiel de désinfection, il permet l'éradication des champignons en question dans les stations de conditionnement, les structures des serres et ceci à partir de la dose de 2,5%. A cette dose le Perydroxan est à recommander pour la désinfection des outils de travail comme les secteurs, les pinces et couteaux lors des opérations d'ébourgeonnage, des tailles, de greffage et d'effeuillage.

References

1. Gatto M. A., Ippolito A., Linsalata V., Cascarano N. A., Nigro F., Vanadia S., Venere D. D., *Postharvest. Biol. Technol.*, 61 (2011) 72.
2. Zain M. E., *J. Saudi. Chem. Soc.*, 15 (2011) 129.
3. Elad Y., Yunis H., Katan T., *Plant Pathology.*, 41(1992) 41.
4. Elad Y., Horticole, 6-9 May, (1997), *IAV Agadir, Morocco*.
5. Solaimani B., Ramezani M., Saharkiz M. J., *Adv. Environ. Biol.*, 3 (2009) 249.
6. Tripathi P., Dubey N. K., Shukla A. K., *World J Microbiol Biotechnol.*, 24 (2008) 39.
7. Chitzanidis A., Argyri I., *Bulletin OEPP.*, 20 (1990) 163.
8. Cohen E., Shalom Y., *Phytoparasitica.*, 18 (1990) 17.
9. Eckert J.W., *Workshop proceedings USDA ARS-92*, 1 (1991) 14.
10. Wedge D. E., Galindo J. C. G., Macias F. A., *Phytochemistry.*, 53 (2000) 747.
11. Deferera D. J., Ziogas B. N., Polissiou M. G., *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 2576.
12. Martinez-Romero D., Serrano M., Bailen G., Guillen F., Zapata P. J., Valverde J. M., Castillo S., M. Fuetes Valero D., *Postharvest Biol. Technol.*, 47 (2008) 54.
13. WHO, OMS et PNUE, Genève, Suisse (1989)
14. Conway S.W., Sams C.E., Wang C.Y., Abbott J. A., *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 119 (1994) 49.
15. Sapers G. M., Simmons G. F., *Food Technol.*, 52 (2) (1998) 48.
16. El-Gaouth A., Arul J., Grenier J., Asselin A., *Phytopathology*, 82 (1992) 398.
17. Al-Reza S. M., Rahman A., Ahmed Y., Kang S.C., *Pestic. Biochem. Physiol.*, 96 (2010) 86.
18. Piano S., Neyrotti V., Migheli Q., Gullino M. L., *Postharv. Biol. Technol.*, 11 (1997) 131.
19. El-Mougy N. S., El-Gamal N. G., Abdalla M. A., *Journal of plant protection research.*, 3 (2008) 385.
20. Poovaiah B. W., *Food Technol.*, 40 (1986) 86.
21. Ralph S., *Controlled Environments Magazine*, 42 (2003) 328.
22. Juven B. J., Pierson M. D., *J. Food Prot.*, 59(11) (1996) 1233.
23. Sholberg P.L., *Washington tree fruit postharvest conference*. December 8th, (2004)
24. Tian S.P., Fan Q, Xu Y., Jiang A.L., *Plant Pathology.*, 51 (2002) 352.
25. Patykowski J., *Acta Physiologiae Plantarum.*, 28 (6) (2006) 589.
26. Lien J. D., Conway W. S., Whitaker B. D., Sams C. E., *J. Am. Soci. Hortic. Sci.*, 122 (1997) 91.
27. Profaizer M., Massone A., Nurizzo C., Bandera F., *Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*, 62 (1997) 1785.

(2015) ; <http://www.jmaterenvirosci.com>