

## EFFET DE DÉRIVÉS CALCIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT DE MOISSURES LORS DE LA CONSERVATION DES POIRES (\*)

A. MAOUNI <sup>(1)</sup>, A. LAMARTI <sup>(2)</sup>, A. DOUIRA <sup>(3)</sup> et  
A. BADOUC <sup>(4)</sup>

*Cinq composés minéraux du calcium (hydroxyde, chlorure, nitrate, sulfate et fluorure) ont été testés sur la colonisation des poires en conservation par Alternaria alternata, Penicillium expansum, Cladosporium herbarum, Rhizopus stolonifer et Aspergillus niger. In vitro, la plupart des sels de calcium ont peu d'effet, alors que l'hydroxyde s'est montré très efficace sur la germination, la croissance et la sporulation de tous les champignons. In vivo et à froid, la plupart des dérivés calciques testés s'avèrent efficaces sur le développement de la pourriture des poires causée par les deux principales moisissures. Ces résultats justifient l'utilisation de ces agents minéraux comme moyen de lutte non polluant contre les maladies d'origine cryptogamique et physiologique des poires en conservation.*

---

(\*) *Manuscrit reçu le 15 octobre 2001.*

(1) *Département des Sciences Naturelles, École Normale Supérieure, BP 202, 93150 Martil, Maroc. amaouni@hotmail.com*

(2) *Unité de Biotechnologie et d'Amélioration des plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences M'hannech II, BP 2121, 93002 Tétouan, Maroc.*

(3) *Laboratoire de Botanique et Protection des plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP 133, 12000 Kénitra, Maroc.*

(4) *Laboratoire de Mycologie et Biotechnologie végétale, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 3, place de la Victoire, 33076 Bordeaux Cedex.*

## INTRODUCTION

Plusieurs espèces de champignons peuvent occasionner la pourriture des poires pendant la phase de conservation [4]. Les pertes économiques dues au pourrissement [5,11-12], les risques de pollution des fruits par les résidus et l'apparition de souches résistantes suite à l'utilisation répétée de fongicides [14] justifient des applications phytosanitaires avec des produits comme les dérivés calciques, tant au verger en pré-récolte qu'avant l'entreposage.

Depuis longtemps, certains chercheurs [9-10] ont mis l'accent sur l'importance du calcium dans le développement des maladies et accidents physiologiques des pommes et des poires. Une relation très étroite a été observée entre la quantité de calcium contenue dans ces fruits et l'incidence de maladies telles le " Bitter-pit " ou " Taches amères " des pommes [11,13] et le " Cork spot " des poires [15-16].

Des travaux plus récents ont également montré que le calcium confère aux fruits une grande résistance vis-à-vis de certains champignons tels *Leucostoma persoonii* [1,3], *Alternaria* sp. [2] et *Penicillium* sp. [6].

L'objectif de ce travail est de tester l'efficacité de cinq dérivés calciques *in vitro* et *in vivo* à l'égard de cinq espèces fongiques fréquemment rencontrées au Maroc lors de la conservation des poires.

La démarche suivie a été de tester d'abord l'efficacité *in vitro* des cinq composés sur la germination des champignons, puis de déterminer les  $CI_{50}$  et les  $CI_{90}$  sur la germination, la croissance et la sporulation en présence du composé le plus efficace, enfin de tester *in vitro* et *in vivo* l'efficacité des cinq dérivés calciques sur le développement d'*Alternaria alternata* et *Penicillium expansum*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Espèces fongiques retenues

Cinq espèces de moisissure ont été isolées à partir de poires conservées en chambre froide au Maroc : *Cladosporium herbarum* (de

'Passe Crassane'), *Rhizopus stolonifer* (de 'Williams'), *Aspergillus niger* (de 'Williams'), *Alternaria alternata* (de 'Williams', 'Passe Crassane' et 'Beurré Hardy') et *Penicillium expansum* (de 'Williams' et 'Passe Crassane'). Ces deux dernières moisissures sont les agents les plus rencontrés et les plus redoutables sur les poires en conservation au Maroc.

Chaque espèce est représentée par une seule souche ; les cinq souches choisies sont considérées comme étant les plus agressives parmi une collection d'isolats. En effet, elles se développent de façon très importante sur les milieux MEA (malt-extract-agar) et PDA (potato-dextrose-agar), produisent des lésions très larges sur les poires et favorisent fortement leur pourriture. Les souches ont été maintenues sur milieu PDA avec périodiquement un passage sur des poires afin d'éviter une perte d'agressivité liée aux subcultures sur le milieu artificiel.

### **Dérivés calciques testés**

Cinq composés ( $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca(NO}_3)_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{CaF}_2$ ) ont été testés *in vitro* et *in vivo* à 4 % (p/v). L'hydroxyde de calcium a été testé *in vitro* à 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 % pour pouvoir déterminer les concentrations inhibitrices  $\text{CI}_{50}$  et  $\text{CI}_{90}$ .

### **Essais *in vitro***

#### **• Effet des dérivés calciques sur la germination conidienne**

Une suspension de spores ( $10^5$  spores /ml d'eau distillée stérile) a été étalée sous hotte à flux laminaire à la surface de boîtes contenant un mélange agar-dérivé calcique. Les agents minéraux ont été ajoutés au milieu gélosé encore en fusion. 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, avec 3 répétitions.

#### **• Effet des dérivés calciques sur la croissance mycélienne**

Les solutions de chaque dérivé calcique ont été incorporées au milieu MEA encore en fusion et le mélange a été coulé sur des boîtes de Petri. Pour chaque test, trois essais ont été effectués. Deux boîtes ont été utilisées par essai et, dans chaque boîte, l'inoculation a été faite sur trois points séparés.

L'inoculation a été effectuée par des disques mycéliens issus de culture âgée de 10 à 15 jours. La croissance mycélienne a été évaluée après dix jours d'incubation à 25°C, par mesure du diamètre des colonies.

#### **• Effets des dérivés calciques sur la sporulation**

Toutes les colonies ayant servi pour évaluer la croissance mycélienne et ayant incubé 10 jours à 25 °C ont été utilisés pour étudier l'effet des dérivés

calciques sur la sporulation. Quatre disques de 5 mm de diamètre ont été prélevés à la bordure d'une même colonie et ont été réunis dans un tube contenant 1 ml d'eau distillée. Après écrasement des disques et agitation au vortex pendant 30 secondes, les spores ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez à raison de trois comptages par suspension.

• *Efficacité des agents minéraux et calculs des  $CI_{50}$  et  $CI_{90}$*

L'efficacité de chaque agent minéral est déterminée selon la formule ci-dessous :

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

$X$  : Estimation de la germination, de la croissance ou de la sporulation dans un milieu sans dérivé calcique (témoin)

$Xi$ : Estimation de la germination, de la croissance ou de la sporulation en présence des dérivés calciques (essai)

Les concentrations inhibitrices  $CI_{50}$  et les  $CI_{90}$  de  $Ca(OH)_2$  ont été déterminées graphiquement à partir de la relation linéaire entre le logarithme de la concentration en agent minéral et l'efficacité de cet agent sur la germination, la croissance ou la sporulation.

**Essais *in vivo***

Des poires de la variété 'Williams' ont été stérilisées en surface par de l'hypochlorite de sodium à 1 % pendant 1 minute, rincées 3 fois à l'eau distillée stérile et séchées avec du papier filtre stérile. Des blessures de 2 mm de profondeur ont été réalisées avec des aiguilles de 1 mm de diamètre en 3 points de la zone équatoriale. Après trempage 3 minutes dans les solutions de dérivés calciques, les poires ont été laissées 12 heures sous hotte à flux laminaire. L'inoculation a eu lieu au niveau des blessures avec des fragments mycéliens de 1 mm de diamètre provenant de cultures âgées de 20 jours. Les fruits ainsi traités ont été répartis séparément dans des sachets en plastique fermés, préalablement imbibés d'eau distillée stérile afin de maintenir une humidité relative élevée. On favorise ainsi la croissance des champignons et on évite les pertes d'eau des fruits. Ces sachets ont été placés dans de grands sachets en plastique noir pour assurer une obscurité totale. Ils ont été conservés deux mois à 2-4°C ou 10 jours à température ambiante (22-26°C). La croissance a été évaluée par mesure du diamètre et l'efficacité de chaque agent minéral a été déterminée comme précédemment.

Pour chaque test, trois essais séparés dans le temps ont été effectués et pour chaque essai, deux poires ont été utilisées.

## RÉSULTATS

### Efficacité des dérivés calciques sur la germination des spores

Le Tableau I montre que l'hydroxyde de calcium est efficace à 100 % sur la germination des cinq espèces étudiées. Par contre, les sels sont moins actifs. *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* et *Aspergillus niger* sont faiblement sensibles et *Alternaria alternata* est faiblement à très faiblement sensible à ces sels.

*Penicillium expansum* est sensible à  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et  $\text{CaSO}_4$  et moyennement sensible à  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{CaF}_2$ .

**Tableau I :**  
**Efficacité (pourcentage d'inhibition) de 5 dérivés calciques sur la germination des spores de 5 agents pathogènes fongiques des poires**

(comptages sur 200 spores, 3 répétitions ; sur une même colonne, 2 résultats suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %)

Dérivé à 4 %	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Aspergillus niger</i>
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>
$\text{CaCl}_2$	26,53 <sup>b</sup>	23,69 <sup>c</sup>	2,16 <sup>c</sup>	2,55 <sup>b</sup>	2,95 <sup>b</sup>
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2,16 <sup>d</sup>	55,05 <sup>b</sup>	1,91 <sup>c</sup>	2,29 <sup>bc</sup>	1,19 <sup>c</sup>
$\text{CaSO}_4$	1,58 <sup>d</sup>	55,42 <sup>b</sup>	1,64 <sup>c</sup>	1,41 <sup>cd</sup>	0,91 <sup>c</sup>
$\text{CaF}_2$	19,82 <sup>c</sup>	31,40 <sup>c</sup>	9,59 <sup>b</sup>	1,08 <sup>d</sup>	1,83 <sup>c</sup>

### $\text{CI}_{50}$ et $\text{CI}_{90}$ de $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Les valeurs des  $\text{CI}_{50}$  et  $\text{CI}_{90}$  révèlent que  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  est très efficace sur la germination, la croissance et la sporulation, avec des concentrations allant de 0,19 à 2 % (Tableau II).

**Tableau II :**  
**CI<sub>50</sub> et CI<sub>90</sub> de Ca(OH)<sub>2</sub> sur les stades de développement de 5**  
**agents pathogènes fongiques des poires**

Agent pathogène	CI <sub>50</sub> (%)			CI <sub>90</sub> (%)		
	Germination	Croissance	Sporulation	Germination	Croissance	Sporulation
<i>Alternaria alternata</i>	0,22	1,32	1,41	0,25	1,41	1,58
<i>Penicillium expansum</i>	0,19	1,66	0,32	0,20	2,00	1,26
<i>Cladosporium herbarum</i>	0,22	1,26	0,79	0,25	1,58	1,26
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,19	0,96	0,35	0,20	1,26	0,89
<i>Aspergillus niger</i>	0,19	1,66	0,56	0,20	2,00	1,26

### Effet *in vitro* sur la croissance et la sporulation

L'analyse des Tableaux I et III montre que l'hydroxyde de calcium est efficace à 100 % sur le développement de *Penicillium expansum* et *Alternaria alternata*. Par contre, l'efficacité des sels est globalement faible à moyenne. CaF<sub>2</sub> et Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> sont plus efficaces sur la sporulation et la germination de *Penicillium expansum*.

**Tableau III :**  
**Efficacité (pourcentage d'inhibition) de 5 dérivés calciques sur**  
**la croissance et la sporulation de 2 agents pathogènes fongiques**  
**des poires après 10 jours d'incubation à 25°C**

(moyenne de 18 résultats ; sur une même colonne, 2 résultats suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %)

Dérivé à 4 %	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Penicillium expansum</i>	
	Croissance	Sporulation	Croissance	Sporulation
Ca(OH) <sub>2</sub>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub>	16,00 <sup>e</sup>	23,61 <sup>d</sup>	39,09 <sup>b</sup>	42,75 <sup>d</sup>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	42,42 <sup>b</sup>	0,83 <sup>e</sup>	24,05 <sup>c</sup>	64,12 <sup>c</sup>
CaSO <sub>4</sub>	31,30 <sup>c</sup>	58,90 <sup>b</sup>	13,28 <sup>c</sup>	11,93 <sup>e</sup>
CaF <sub>2</sub>	22,58 <sup>d</sup>	55,96 <sup>c</sup>	16,88 <sup>c</sup>	89,93 <sup>b</sup>

### Effet *in vivo* des dérivés calciques

Les résultats obtenus à basse température (Tableau IV) montrent qu'*Alternaria alternata* est plus sensible à  $\text{Ca(OH)}_2$ , suivi de  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{CaF}_2$  et que *Penicillium expansum* est plus sensible à  $\text{Ca(NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$  et  $\text{CaCl}_2$ .

À température ambiante, les deux agents sont globalement moins sensibles à tous les dérivés calciques sauf *A. alternata* à  $\text{Ca(OH)}_2$ .

**Tableau IV :**  
**Efficacité (pourcentage d'inhibition) *in vivo* de 5 dérivés calciques sur le développement de 2 agents responsables de la pourriture des poires**  
 (moyenne de 18 résultats ; sur une même colonne, 2 résultats suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %)

Dérivé à 4 %	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Penicillium expansum</i>	
	2-4 °C	22-26 °C	2-4 °C	22-26 °C
$\text{Ca(OH)}_2$	86,76 <sup>a</sup>	76,78 <sup>a</sup>	71,56 <sup>b</sup>	42,82 <sup>a</sup>
$\text{CaCl}_2$	65,71 <sup>b</sup>	25,17 <sup>b</sup>	58,29 <sup>c</sup>	26,96 <sup>b</sup>
$\text{Ca(NO}_3)_2$	40,46 <sup>d</sup>	9,08 <sup>c</sup>	83,65 <sup>a</sup>	1,97 <sup>c</sup>
$\text{CaSO}_4$	16,89 <sup>e</sup>	2,56 <sup>e</sup>	46,70 <sup>d</sup>	2,66 <sup>c</sup>
$\text{CaF}_2$	53,82 <sup>c</sup>	5,71 <sup>d</sup>	47,74 <sup>d</sup>	1,25 <sup>c</sup>

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Parmi les cinq dérivés calciques testés *in vitro*, seul l'hydroxyde de calcium a présenté une toxicité très importante vis-à-vis de la germination de tous les champignons étudiés. Ces résultats rejoignent en partie ceux obtenus avec *Leucostoma personii*, champignon parasite de la pêche [1,3]. L'inefficacité de la plupart des sels de calcium testés *in vitro* justifie bien que les champignons tolèrent parfaitement le calcium et la sensibilité exagérée au  $\text{Ca(OH)}_2$  pourrait être liée aux hydroxydes, autrement dit à un pH basique élevé. Néanmoins, on doit préciser que les cations  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent modifier la perméabilité membranaire.

*In vivo* et à des températures très basses, la plupart des dérivés calciques se sont avérés plus efficaces sur les principaux agents testés. Des résultats similaires ont été obtenus avec *Penicillium expansum* et *Alternaria* sp. [2,6] tiré de pommes, *Monilia fructicola* de pêches [7].

Il semble que l'apport du calcium aux poires leur confère à des températures basses une résistance vis-à-vis des champignons. Des travaux effectués dans ce sens [8] ont suggéré que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent s'associer aux acides pectiques, empêchant ainsi l'activité de l'enzyme polygalactourinase. À des températures plus élevées, le calcium semble être insuffisant pour empêcher une telle activité enzymatique.

Il convient donc de suggérer une utilisation des dérivés calciques tels que  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  tant au verger en pré-récolte (pulvérisation) qu'en station avant l'entreposage (trempage), en raison de leur efficacité contre les maladies d'origine physiologiques et fongiques et aussi, de leur nature non polluante.

## RÉFÉRENCES

- 1 - 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 personii*. - *Plant Dis.*, 1994, **78**(9), 886-896.
- 2 - 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.
- 3 - Biggs (A.R.), Peterson (C.A.) - Effect of chemical applications to peach bark wounds on accumulation of lignin and suberin and susceptibility to *Leucostoma personii*. - *Phytopathology*, 1990, **80**(9), 861-865.
- 4 - Bondoux (P.) - Les maladies cryptogamiques des poires et des pommes au cours de l'entreposage. II. Identification et description. *Ann. Phytopathol.*, 1969, **1**, 327-352.
- 5 - Bondoux (P.) - Les maladies de conservation des fruits à pépins : pommes et poires. - *INRA. PHM. Rev. Hortic.*, 1992, 173 p.

- 6 - Conway (W.S.) - Effect of post-harvest calcium treatment on decay of Golden Delicious apples. - *Plant Dis.*, 1982, **66**(5), 402-403.
- 7 - Conway (W.S.), Greene (G.M.), Hickey (K.D.) - Effects of preharvest and postharvest calcium treatments of peaches on decay caused by *Monilia fructicola*. - *Plant Dis.*, 1987, **71**, 1084-1086.
- 8 - Conway (W.S.), Sams (C.E.) - Possible mechanisms by which postharvest calcium treatment reduces decay in apples. - *Phytopathology*, 1984, **74**(2), 208-210.
- 9 - DeLong (W.A.) - Calcium and boron contents of the apple fruit as related to the incidence of blotchy cork. - *Plant Physiol.*, 1937, **12**, 553-556.
- 10 - Garman (P.), Mathis (W.T.) - Studies of mineral balance as related to occurrence of Baldwin spot in Connecticut. - *Bull. Conn. Agric. Exp. Stn.*, 1956, (601), 1-19.
- 11 - Gautier (M.) - La conservation des fruits (3<sup>ème</sup> partie). - *Arboriculture fruitière*, 1979, (309), 27-42.
- 12 - Palazón (I.), Palazón (C.), Robert (P.), Escudero (I.), Munôz (M.), Palazón (M.) - Estudio de los problemas de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza. - 1984, *Diputación Provincial Zaragoza Publicación no. 990, Institución Fernando El Católico*, 68 p.
- 13 - Perring (M.A.) - Incidence of Bitter pit in relation to the calcium content of apples: problems and paradoxes, a review. - *J. Sci. Food. Agric.*, 1986, **37**(7), 591-606.
- 14 - Prusky (D.), Bazak (M.), Ben-Arie (R.) - Development, persistence survival, and strategies for control of thiabendazol resistant strains of *Penicillium expansum* on pome fruits. - *Phytopathology*, 1985, **75**(8), 877-882.
- 15 - Raese (J.T.) - Effects on apple and pear disorders and fruit quality. - *Proc. Wash. State Hortic. Assoc.*, 1988, **84**, 247-256.
- 16 - Raese (J.T.), Stahly (E.A.) - Timing of calcium sprays to increase fruit calcium, improve fruit quality and control disorders of 'Anjou' pears. - *HortScience*, 1988, **23**(5), 836 (Abstract).

## ABSTRACT

### **Effect of calcium derivates on the colonization of stored pear by fungic species**

The present study assayed efficacy of five calcium derivates (hydroxyde, chloride, nitrate, sulfate and fluoride) on the development and colonization of storage pear by *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer*, and *Aspergillus niger*. *In vitro*, the majority of calcium salts had a weak effect, while hydroxyde was shown very efficient on germination, growth and sporulation of all fungi. *In vivo* and at low temperature, the majority of calcium derivates were shown efficient against the rot development of pear caused by the two principal pathogens. These results justify the use of non-pollutant calcium derivates on pears as fungicide treatment and in physiological disorders.

**Key-words:** calcium hydroxide, calcium salts, conservation, fungicide, pear.

---