

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

Option : Microbiologie appliquée aux substances Antimicrobiennes

Intitulé

**Etude de la variabilité phénotypique des souches de
Botrytis cinerea, agent de la pourriture grise de la tomate**

Présenté par

M^{me} BENFEDALA Sadia

Soutenu le : 20 novembre 2012

Devant la commission du jury:

<i>Mr BENALLAOUA Saïd</i>	Président	Professeur	U.A.M.B
<i>Mr AISSAT Kamel</i>	Rapporteur	Maître de conférences	U.A.M.B
<i>Mr TOUATI A/ Aziz</i>	Examineur	Maître de conférence	U.A.M.B
<i>Mr NABTI El Hafid</i>	Examineur	Maître de conférence	U.A.M.B

2011/2012

Remerciement

Je rends grâce à ALLAH le tout puissant. Je vous prie de me guider sur le droit chemin qui est le vôtre et qui nous mène à votre Paradis. Amen.

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Monsieur **AISSAT K.** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et qui m'a apporté son aide et ses conseils précieux et ses orientations durant toute la période de stage. Je vous remercie Mr **AISSAT K.** pour la confiance que vous m'avez accordée.*

*Je tiens à remercier vivement Mr **BENALLAOUA S.** qui m'a fait un immense honneur de présider le jury. Je souhaite exprimer également mes reconnaissances à Mr **TOUATI A/ A.** et Mr **NABTI E.** pour l'honneur qu'ils m'ont accordé en acceptant d'évaluer ce modeste travail.*

*Je remercie infiniment Mr. **ADJEBLI A.** pour ses précieux conseils, son aide et ses orientations.*

*M^{elle} **TITLI F.**, M^{me} **YOUSFI K.**, et M^{elle} **HAMANI M.** pour leur soutien, leurs conseils et leur aide.*

Je tiens à remercier également :

*L'ingénieur de laboratoire de Mycologie M^{elle} **ATI F.Z.** pour ses qualités humaines très hautes.*

*M^{elle} **BENSIDHOUM L.**, M^{elle} **TABLI N.***

Ainsi que toute l'équipe de laboratoire de Mycologie pour l'ambiance de travail

et je vous souhaite une bonne réussite dans vos projets.

Sans oublier de remercier infiniment toute la promotion de PG de l'année 2010.

Dédicaces



*Ce travail fut une expérience intense,
passionnante et enrichissante, qui sans*

vous,

chers parents, chers frère et sœurs et

chers amis,

n'aurait pas vu le jour.

*Pour votre patience, vos
encouragements et vos judicieux*

conseils, je tiens à vous dire

Merci



Liste des figures

Figure 1. Symptômes de la pourriture grise causée par <i>Botrytis cinerea</i> sur différents hôtes	- 4
Figure 2. Cycle de développement (reproduction asexuée) de <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes culture	----- 5
Figure 3. Technique de prélèvement de <i>B. cinerea</i> sur les chancres de tomate	----- 18
Figure 4. Les étapes de la purification de <i>B. cinerea</i> par la technique monospore	----- 20
Figure 5. Etapes du Test d'agressivité des souches de <i>B. cinerea</i> sur des folioles de tomate	- 24
Figure 6. Préparation de la suspension de spores de <i>B. cinerea</i>	----- 27
Figure 7. Etapes du test de l'effet de la température sur la germination des spores de <i>B. cinerea</i>	----- 27
Figure 8. Différents aspects du mycélium de <i>B. cinerea</i> obtenu sur PDA à 21°C	----- 29
Figure 9. Différents aspects de la sporulation observés des souches de <i>B. cinerea</i> sur milieu PDA à l'obscurité à 21°C.	----- 30
Figure 10. Les lésions causées par les souches de <i>B. cinerea</i> les plus et les moins agressives d'origine d'Algérie et d'Europe sur les folioles de tomates après 96h de l'inoculation	----- 33
Figure 11. Cinétique de l'incidence de la pourriture grise sur les folioles de tomate	----- 34
Figure 12. AUDPC moyens des différentes souches Algériennes testées	----- 34
Figure 13. AUDPC des souches européennes testées	----- 35
Figure 14. Vitesses moyennes de croissance radiale des souches de <i>B. cinerea</i> à différentes température	----- 38
Figure 15. Taux de germination des spores de <i>B. cinerea</i> à différentes températures	----- 40

Liste des tableaux

Tableau I. Les différents groupes de fongicides synthétiques anti- <i>Botrytis</i>	11
Tableau II. Mécanismes d'action des agents de lutte biologique	13
Tableau III. Les souches de <i>Botrytis cinerea</i> étudiées	21
Tableau IV. Classification morphotypique des souches de <i>B. cinerea</i> sur milieu MA	22
Tableau V. Classification des souches de <i>B. cinerea</i> testées selon leurs Morphotypes	31
Tableau VI. Classement des groupes non significativement différents des valeurs d'AUDPC des souches testées obtenus par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95% --	35
Tableau VII. Taux de croissance mycélienne moyenne totale de <i>Botrytis cinerea</i> à différentes températures sur milieu PDA	37
Tableau VIII. Analyse de la variance du taux moyen de croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> sur PDA	37
Tableau IX. Les vitesses moyennes de croissance mycélienne des souches de <i>B. cinerea</i> à différentes températures	39
Tableau X. Les taux moyens totaux de la germination des spores de <i>Botrytis cinerea</i> à différentes températures sur milieu PDA	39
Tableau XI. Analyse de la variance du taux moyen de croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> sur PDA	40
Tableau XII. Pourcentage de germination des spores des souches de <i>B. cinerea</i> à différentes températures	41

Liste des annexes

Annexe 1. Milieux de culture et tampons

Annexe 2. Cellule de Malassez

Annexe 3. Résultats du test d'agressivité.

Annexe 4. Résultats du test de l'effet de température sur le développement de *B. cinerea*

Liste des abréviations

ANOVA: Analysis of Variance

ALG: Algérie

AUDPC: The Area Under the Disease Progress Curve

BC: *Botrytis cinerea*

GA: gélose Glucose Agar

HR: Humidité Relative

IGS : Inter Gene Spacer

PDA : milieu Pomme de terre Dextrose Agar

T : Température

UV: Ultra Violet

Glossaire

A

Agressivité : Composante quantitative du pouvoir pathogène d'un microorganisme.

Anamorphe : Forme asexuée d'un champignon, appelé aussi « stade imparfait », aboutissant à la formation de conidies.

Apothécies : Structure en forme de disque ou de trompette sur laquelle se forment des ascospores chez les ascomycètes.

Ascomycète : Groupe de champignons produisant leur spore sexuée, les ascospores, par l'intermédiaire d'asque.

Ascospores : Spore issue de la reproduction sexuée chez les Ascomycètes, se formant à l'intérieur d'un asque.

Asques : Cellule en forme de sac dans laquelle généralement 8 ascospores sont formées, et qui caractérisent les Ascomycètes.

AUDPC : la surface sous la courbe de la régression de la maladie est un résumé quantitatif de l'intensité de la maladie au fil du temps, à titre de comparaison sur plusieurs années ou plusieurs endroits.

C

Chancre : Lésion nécrotique plus ou moins localisée.

Conidies : Spore issue de la multiplication asexuée formée à l'extrémité d'un conidiophore.

Conidiophore : Hyphe spécialisé sur lequel se forment une ou plusieurs conidies.

E

Epidémiologie : Etude de l'apparition, du développement et de la dispersion d'une maladie en relation avec l'environnement.

H

Hybride : Un individu descendant de deux parents de génotype différents.

L

Latence : Période qui sépare une contamination de la différenciation des premières fructifications.

M

Microsatellite : Sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétitions fait d'une à six paires de base.

Morphotype : Appelé aussi « type morphologique », est la forme courante et classique d'une espèce.

N

Nécrotrophique : mode de vie d'un organisme en parasite d'une plante vivante causant ainsi sa mort. Par la suite, il devient saprophyte et décompose les tissus morts.

O

Opportuniste : Organisme qui ne cause habituellement pas de maladie mais qui peut devenir pathogène dans certaines conditions, lorsque le système immunitaire et la résistance de l'individu sont affaiblis.

P

Parasite : Se dit d'un organisme vivant au déterminant d'un autre organisme vivant.

Phyllosphère : Microécosystème de la surface des feuilles.

Polyphage : Un pathogène pouvant avoir plusieurs organismes hôtes.

S

Saprophyte : Se dit d'un organisme tirant sa nourriture de la matière organique en décomposition.

Sclérotés : Masse compacte de mycélium aggloméré, souvent de couleur brune à noire, adaptée à la survie en conditions défavorables.

T

Téléomorphe : Forme sexuée d'un champignon, appelée aussi « stade parfait », aboutissant après la fusion nucléaire à la formation d'ascospores.

V

Virulence : Une composante qualitative du pouvoir pathogène, qui présente la capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte donné et à causer une maladie.

SOMMAIRE

Remerciement	
Dédicaces	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Glossaire	
Liste d'abréviation	
Introduction	1

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I. Biologie de *Botrytis cinerea*

I.1. <i>Botrytis cinerea</i>	3
I.2. Symptômes de la pourriture grise	3
I.3. Cycle biologique de <i>B. cinerea</i> et son épidémiologie	5
I.4. Facteurs influençant le développement de <i>Botrytis cinerea</i>	6

II. La lutte de la pourriture grise

II.1. Pratiques culturales	9
II.2. Lutte chimique	9
II.3. Lutte biologique	10
II.4. Protection intégrée	14

III. Diversité de *B. cinerea*

III.1. Diversité phénotypique	15
III.2. Diversité génotypique	16

Chapitre II. Matériel et Méthodes

I. Obtention du matériel fongique

I.1. Prélèvement	18
I.2. Purification des isolats	19
I.3. Choix de souches	19
I.4. Repiquage des souches	21

II. Caractérisation morphologique	22
--	----

III. Test d'agressivité	23
III.1. Matériel végétal	23
III.2. repiquage des souches	23
III.3. Inoculation des folioles	23
III.4. Lecture	23
IV. Effet de la température sur le développement de <i>B. cinerea</i>	
IV. 1. Croissance mycélienne	25
IV. 2. Germination de spores	25
IV. 2.1. Préparation des suspensions de spores	25
IV. 2.2. Inoculation	26
V. Analyse statistique	28

Chapitre III. Résultats et Discussion

I. Détermination du morphotype	29
II. Test d'agressivité	33
III. Effet de la température sur le développement de <i>B. cinerea</i>	36
III. 1. Croissance mycélienne	36
III. 2. Germination	39
Conclusion	43
Références bibliographiques	46
Annexes	

Introduction

La tomate (*Lycopersicon esculuntum*) est l'un des légumes les plus appréciés et les plus cultivés partout dans le Monde. Elle peut être cultivée en plein champ ou sous abris. La chaleur et le taux d'humidité élevé dans les serres favorisent le développement de nombreuses maladies notamment les maladies cryptogamiques. L'une de ces maladies les plus destructives est la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. La pourriture grise est caractérisée par la formation d'une moisissure grise sur la tige et les feuilles de la tomate. Les contaminations par le *Botrytis* sont plus virulentes dans les cultures sous abri soumises à des températures modérées, une humidité élevée et de l'air stagnant.

La maîtrise de *B. cinerea* a été toujours difficile, plus particulièrement sous abris. Cette situation a plusieurs explications : le climat, les plantes particulièrement réceptives (disposant d'organes succulents, blessés par la taille ou l'ébourgeonnage, ...), aptitude particulière de ce champignon à s'adapter rapidement aux traitements chimiques utilisés,....

B. cinerea est caractérisé par une haute capacité d'adaptation, ce qui limite les méthodes de lutte entreprises. Il convient de souligner que plusieurs familles de fongicides sont concernées par des phénomènes de résistance. La variabilité génétique de *B. cinerea* lui a permis de s'adapter à de nombreux fongicides qui lui ont été opposés. Des travaux de biologie moléculaire récents ont révélé également une grande variabilité génétique au sein de cette espèce. Les mutations dues aux traitements chimiques sont confirmées, mais la diversité des souches a d'autres origines telles que la reproduction sexuée, les facteurs environnementaux (température, humidité,...) ainsi qu'à d'autres contraintes. Cette capacité d'adaptation (diversité phénotypique et génotypique) de *B. cinerea* fait l'objet de plusieurs travaux de recherche.

Les travaux de recherche actuels visent à comprendre principalement la dynamique des populations de *Botrytis cinerea*. En effet, ce champignon se retrouve sous différents climats et différentes cultures et son déplacement dans la région méditerranéenne est une question de recherche que nous étudions dans le laboratoire de mycologie de l'université A/MIRA de Bejaia en collaboration avec l'Unité de phytopathologie d'INRA Avignon France.

Le présent travail constitue une partie d'un projet de recherche sur les populations de *B. cinerea* et consiste à vérifier les hypothèses suivantes :

- Le niveau d'agressivité des souches de *B. cinerea* est-il identique quelque soit l'origine d'isolement.
- L'effet des températures élevées sur la croissance mycélienne et la germination des spores des souches de *B. cinerea* est-il indépendant du site d'isolement.

Pour atteindre cet objectif, une étude a été entreprise sur l'agressivité de quelques souches de *B. cinerea* isolées dans trois régions géographiques différentes (Algérie, France et Norvège) sur des folioles de tomate.

Et une autre étude a été entreprise sur l'influence des températures élevées sur la croissance mycélienne et la germination des spores de quelques souches de *B. cinerea* isolées dans trois régions géographiques différentes (Algérie, France et Norvège) *in vitro*.

Synthèse

bibliographique

I. Biologie de *Botrytis cinerea*

La pourriture grise est une pathologie provoquée par un champignon aérien *Botrytis cinerea*, la forme imparfaite du *Botryotinia fuckeliana*.

B. cinerea est un champignon polyphage vivant comme saprophyte sur une multitude de plantes. Il peut survenir sur de nombreuses cultures d'importance économique : les légumes (tomate, le concombre, la laitue), les plantes ornementales (rose, gerbera), des bulbes (oignons) et fruits (vigne, fraise, kiwi). Ce champignon peut attaquer plusieurs organes aériens de la plante à tout stade de leur développement (Lahlali *et al.*, 2007 ; Leroux, 2007).

B. cinerea est ubiquiste sévissant partout là où ses hôtes sont cultivés, allant des zones tempérées fraîches aux zones subtropicales humides.

Sur le plan taxonomique, *Botrytis* et sa forme sexuée *Botryotinia* comprennent 22 espèces et un hybride. *Botrytis* connaît une double classification selon la forme sous laquelle il se présente (Chardonnet *et al.*, 2000 ; Staats *et al.*, 2004) :

- ❖ Forme parfaite (téleomorphe), *Botryotinia fuckeliana*, un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.
- ❖ Forme imparfaite (anamorphe), *Botrytis cinerea*, c'est un Deutéromycète de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae.

I.2. Symptômes de la pourriture grise

B. cinerea montre un mode de vie nécrotrophique, survenant comme un agent pathogène sur une gamme d'hôtes très large (Figure 1). Après l'infection et la mort de tous les tissus de l'hôte, il peut survivre et sporuler comme saprophyte sur les tissus nécrosés ou produire des structures de survies telles que les sclérotés (Holz *et al.*, 2007).

Ce pathogène est fréquent sur les légumes sous abris et en plein champ lorsque les conditions climatiques sont favorables. Il sévit aussi bien en pépinière qu'en cours de culture. Il pose aussi quelques problèmes après la récolte, au cours du transport et du stockage des fruits (Blancard *et al.*, 2009).

Les cotylédons déhiscents en pépinière, pièces florales sénescents, folioles blessées sénescents et diverses blessures placées dans un environnement humide, permettent à ce champignon opportuniste de s'installer et de coloniser rapidement divers tissus (Blancard *et al.*, 2009).

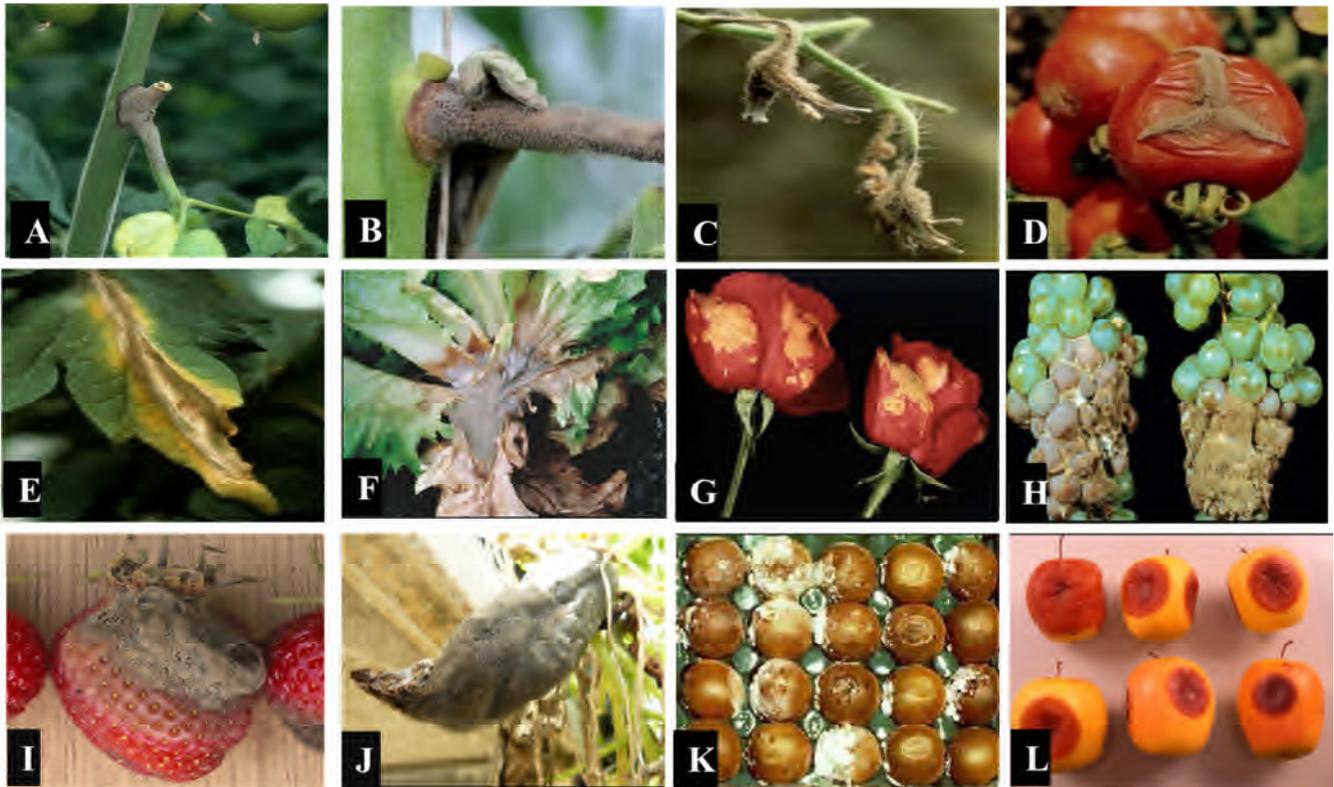


Figure 1. Symptômes de la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea* sur différents hôtes (Agris, 2005).

A: Plaie d'ébourgeonnage sur tomate.

B: Tige de tomate.

C: Inflorescence.

D: Fruit de tomate.

E: feuille de tomate.

F: Laitue.

G: Fleurs du rosier.

H: Grappe du raisin.

I:Fraise.

J: Poivron.

K: kiwi.

L: Pomme.

I.3. Cycle biologique de *B. cinerea* et son épidémiologie

Le cycle de vie de *B. cinerea* comprend plusieurs phases tel qu'il est schématisé dans la figure 2 (Agrios, 2005).

B. cinerea est capable de se maintenir dans le sol et sur des débris végétaux sous différentes formes: les conidies, mycélium ou sclérotés (Blancard *et al.*, 2009), dont chacune peut servir comme structure de survie et de dissémination (Holz *et al.*, 2007). La particularité de ce champignon est qu'il se situe à la frontière du saprophytisme et de parasitisme, de sorte qu'il se développe en premier lieu par saprophytisme sur des débris végétaux avant de devenir parasite (Dubos, 2002). Les potentialités saprophytiques et polyphagiques de ce champignon lui permet de se conserver sans peine plusieurs années dans le sol et sur la matière organique (Blancard *et al.*, 2009).

Sous des conditions défavorables de température et d'humidité, *B. cinerea* se conserve sous forme mycélienne dans les débris végétaux ou sous forme de sclérotés. Cette structure permet au champignon de se protéger des facteurs externes tels que la dessiccation, les UV et les attaques microbiennes sur de longues périodes (Williamson *et al.*, 2007).

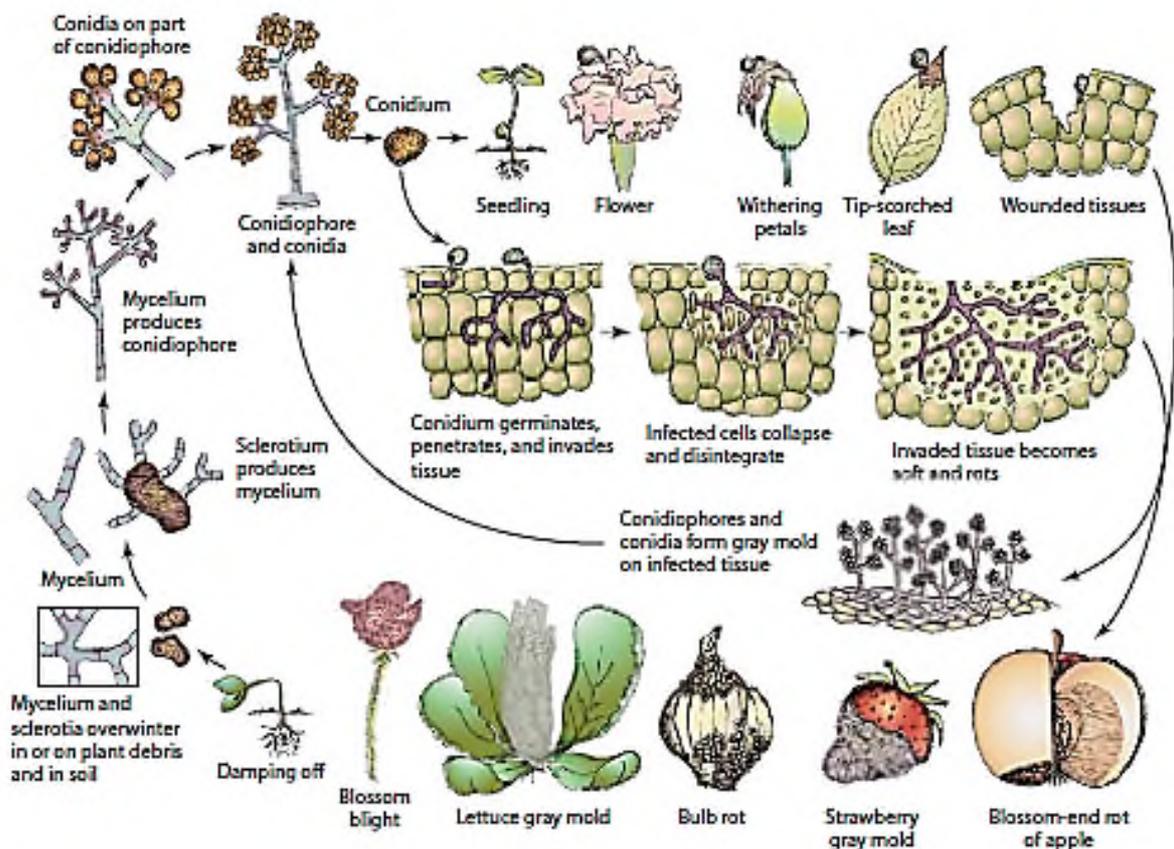


Figure 2. Cycle de développement (reproduction asexuée) de *Botrytis cinerea* sur différentes cultures (Agrios, 2005).

Au printemps, lorsque les conditions climatiques redeviennent favorables, les sclérotés germent pour produire des cultures successives de conidies selon un processus de reproduction asexuée ou subir une fructification sexuée donnant des apothécies brunâtres portant un grand nombre d'asques contenant des ascospores dont la germination donne un mycélium sur lequel se différencient des conidiophores. Ces derniers libèrent des conidies, présentant la source d'inoculum primaire. La dissémination des conidies s'effectue par le biais du vent, de la pluie et des insectes (Holz *et al.*, 2007 ; Dubos, 2002). Selon Blancard *et al.* (2009), les conidies germent en quelques heures (5h à 20°C) sur les organes mouillés ou en présence d'une humidité relative d'au moins 90%. La germination des conidies est fortement conditionnée par la température et l'humidité. Une fois que le tube germinatif est formé, il pénètre dans le tissu soit directement à travers la cuticule ou il profite de la présence d'une blessure d'ébourgeonnement ou d'effeuillage. Il peut également envahir les tissus sénescents, nécrosés et/ou morts tels que des pétales et des sépales nécrosés et les veilles folioles (Blancard *et al.*, 2009).

L'agent pathogène peut se maintenir sur les fruits immatures et les organes floraux sans évolution: c'est la phase de latence ou de quiescence. Cette phase s'explique par l'expression des mécanismes de défense de la plante (Elmer et Reglinski, 2006). Après un temps, dans certaines lésions primaires, l'agent pathogène peut surmonter les barrières défensives de la plante et commence à se répandre dans le tissu végétal aboutissant à une macération de ce dernier (Benito *et al.*, 2000). La maladie s'exprime par une fructification sous forme d'une moisissure grise plus ou moins dense constituée de nombreux conidiophores. A leurs extrémités naissent des conidies ovoïdes à sphériques assurant la dissémination de *B. cinerea* et initient à nouveau un autre cycle d'infection (Blancard *et al.*, 2009 ; Agrios, 2005).

I.4. Facteurs influençant le développement de *Botrytis cinerea*

I.4.1. Facteurs climatiques

Les conditions environnementales, particulièrement la température et l'humidité relative (HR), jouent un rôle primordial dans l'établissement de l'infection de la plante par *B. cinerea*.

Plusieurs recherches montrent une gamme de températures assez large pour le développement du *Botrytis*. Ainsi, la germination des conidies et la formation des lésions nécrotiques sur des fleurs de Gerbera sont observées à des températures comprises entre 4 °C

et 25°C (Salinas *et al.*, 1989). Selon Salinas *et al.* (1989) la gamme de température optimale pour la germination est comprise entre 18°C à 25°C. Au dessus de 25°C, le développement du champignon est ralenti et à des températures supérieures à 35°C, la germination est totalement inhibée (Boneche et Pucheu, 1986 ; Hensen *et al.*, 2010). O'Neill *et al.* (1997) rapportent que la température optimale pour la sporulation est de 15°C, mais celle-ci n'a pas eu lieu ni à 5°C ni à 26°C. Les températures optimales pour l'installation de l'infection par les apothécies sont comprises entre 20°C et 25°C en présence d'humidité. Aucune lésion n'est observée à 5°C et seulement quelques unes sont produites à 30°C (Polach et Abawi, 1975).

Dans les conditions sèches, les conidies restent non germées tandis qu'à une humidité relative élevée, elles germent et donnent lieu à des lésions nécrotiques (Salinas *et al.*, 1989). En effet, la germination des conidies se produit à une humidité relative supérieure à 92% (Elad et Younis, 1993). La croissance mycélienne est maximale à 21°C et à une humidité relative de 94% en présence de vent limité (Thomas *et al.*, 1988). Le taux de croissance est diminué lorsque la température et l'humidité sont réduites. Ainsi, à 69% d'humidité relative, le développement de la maladie n'a pas été constaté (Thomas *et al.*, 1988).

I.4.2. Fertilisation

Les quantités d'engrais et la composition de la solution nutritive utilisée influencent la sensibilité de la plante hôte à la pourriture grise. Mais, les résultats sont parfois contradictoires (Dik et Wubben, 2007). En effet, le taux élevé d'azote favorise la croissance des plantes et la densité du feuillage, mais cela est censé conduire à une sensibilité accrue à *B. cinerea*. A titre d'exemple et selon Pitchay *et al.* (2007), la sensibilité des plantes à *B. cinerea* passe de 3% à 14% sur les feuilles et de 10% à 80% sur la tige à des niveaux élevés d'azote (Pitchay *et al.*, 2007). En revanche, Verhoeff (1968), a constaté que la sensibilité des tomates augmente vis-à-vis *B. cinerea* avec la baisse du niveau d'azote dans le sol. En effet, des corrélations négatives sont observées entre la quantité d'azote dans le sol et le nombre de lésions sur les tiges et la proportion de fruits tombés prématurément. Hoffland *et al.* (1999) trouvent une corrélation linéaire positive entre le rapport de croissance, le taux du nitrogène dans les feuilles et la sensibilité des plantes de tomate à *B. cinerea*. D'autre part, le calcium et le potassium réduisent la sensibilité des plantes vis-à-vis *B. cinerea* en augmentant la résistance à la dégradation enzymatique par *B. cinerea* (Volpin et Elad, 1991). Ainsi, l'addition de potassium réduit significativement (27 à 33%) l'incidence de la pourriture grise des fruits et l'addition de calcium la réduit de 35 à 50% (Elad et Younis, 1993).

I.4.3. Lumière

La lumière (l'intensité et la longueur d'onde) est un facteur important dans la protection des cultures sous serre. La lumière, surtout UV, qui selon Dik et Wubben (2007), augmente la sporulation de *B. cinerea*. La production de spores sous un film de polyéthylène filtrant les UV en boîte de Pétri représente 0,05% de la production de spores sous un film témoin non filtrant et ceci pendant plusieurs semaines après l'inoculation. Cela démontre que l'absence des UV inhibe la sporulation plutôt que de la retarder (Nicot *et al.*, 1996). Cependant, l'effet direct de la lumière sur ce champignon peut être contrecarré par des effets sur l'hôte ou sur le climat dans la serre. Il a été constaté que *B. cinerea* est stimulé dans les cultures illuminées. Ceci pourrait être dû à plusieurs facteurs: l'effet direct de la lumière sur le champignon, sur la température, sur l'humidité ou sur la vigueur de l'hôte (Dik et Wubben, 2007).

I.4.4. Irrigation

Le type d'irrigation peut également influencer sur le développement de la pourriture grise. Le développement de pourriture sur les tiges de tomate est survenu plus tôt dans l'irrigation par rigoles que dans l'irrigation goutte à goutte. Même constatation a été enregistrée concernant la cinétique de l'évolution de l'infection et sa gravité (Aissat *et al.*, 2008).

Le régime d'irrigation a aussi son influence. L'incidence de la maladie est beaucoup plus élevée si l'irrigation est effectuée du levé au couché du soleil, que dans un régime avec la même quantité d'irrigation, effectué de 1 à 2 h après le levé de soleil jusqu'à 1 à 2 h avant le couché du soleil (Dik et Wubben, 2007).

II. La lutte de la pourriture grise

La lutte contre la pourriture grise repose principalement sur l'utilisation des traitements chimiques mais également sur des stratégies de lutte culturale dont les principales sous abris sont : la lutte climatique (contrôle de l'humidité et de la température pour éviter la formation du film d'eau à la surface des plantes et défavoriser l'installation de *B. cinerea* en gardant une température constante relativement élevée (< 20°C)) et les mesures prophylactiques (les pratiques permettant de réduire la source d'inoculum ; retirer les plantes malades, réduire la densité des cultures, ...). Aucune de ces méthodes ne permet de garantir une protection totale des cultures contre cet agent pathogène (Deguine et Ferron, 2004).

II.1. Pratiques culturales

La pourriture grise est exacerbée par une forte humidité, l'intensité de lumière et une température modérée. Une humidité relative élevée favorise la sporulation de *B. cinerea* et permet la germination de conidies et la pénétration de l'hôte. Les pratiques culturales limitant les effets de la pourriture grise sont diverses et souvent spécifiques à des espèces particulières et à des systèmes culturaux (Williamson *et al.*, 2007). L'utilisation excessive d'engrais azotés croit le risque de la moisissure grise bien qu'il favorise la croissance végétative (Pitchay *et al.*, 2007).

Xiao *et al.* (2001) ont constaté que l'incidence de la pourriture grise était de 88 à 94% inférieure sous serre qu'en plein champ. Cependant, il est toujours important de favoriser la ventilation pour réduire l'humidité à l'intérieur de ces structures et de minimiser le mouillage des feuilles (Williamson *et al.*, 2007). La réduction de l'intensité de lumière dans les tunnels plastique absorbant les UV pourrait également réduire l'infection et la sporulation de *B. cinerea* (Nicot *et al.*, 1996).

L'espacement des plantes est une autre pratique qui influence le microclimat dans la culture et l'étendue des contacts directs entre les plantes (Dik et Wubben, 2007). L'assainissement peut également réduire l'intensité de la maladie. Ainsi, Mertely *et al.* (2000), ont rapporté que l'élimination des feuilles sénescentes et nécrotiques réduit l'incidence de la pourriture des fruits par rapport aux témoins non traités par les fongicides. L'élimination des plantes infectées et les débris végétaux de la serre ainsi que le nettoyage des matériaux utilisés sont aussi important à pratiquer afin de limiter la progression de ce champignon (Dik et Wubben, 2007).

Dans les serres chauffées, et pour contrôler la pourriture grise de manière écologique et économique, une amélioration des techniques d'effeuillage en éliminant soigneusement les feuilles au ras de la tige sans laisser de fragments de pétioles, diminue fortement l'incidence des chancres de la tige, même sous pression de la maladie (Decognet *et al.*, 2009).

II.2. Lutte chimique

La pourriture grise conduit régulièrement à des pertes économiques importantes. La lutte chimique reste donc le principal moyen pour réduire l'incidence de cette maladie sur les cultures majeures. La lutte chimique se définit par l'utilisation de fongicides pour détruire, affaiblir ou réprimer le champignon pathogène (Leroux, 2002).

Cette méthode de lutte vient en complément des mesures prophylactiques qui contribuent à réduire l'incidence de la maladie en établissant des conditions environnementales moins favorables à l'infection (Rosslénbroich et Stuebler, 2000 ; Leroux, 2007). Cinq groupes de fongicides synthétiques sont définis et classés selon leurs modes d'action biochimique sur le pathogène (tableau I), les fongicides affectant : la respiration, le fonctionnement des microtubules, l'osmorégulation, la biosynthèse de méthionine et la biosynthèse des stérols (Rosslénbroich et Stuebler, 2000 ; Leroux, 2007).

La lutte chimique est très difficile à mettre en œuvre du fait des particularités biologiques de *B. cinerea*, son adaptabilité aux conditions extérieures, son potentiel destructeur et sa capacité de développer de résistances aux fongicides (Blancard *et al.*, 2009).

Bien que les fongicides restent des outils indispensables pour la lutte contre *B. cinerea* en pré- et post-récolte, mais plusieurs familles sont touchées par les phénomènes de résistance et des souches multi-résistantes ont été détectées. La variabilité génétique de *B. cinerea* lui a permis de s'adapter à de nombreuses familles de fongicides qui lui ont été exposés (Yourman *et al.*, 2001 ; Leroux, 2007). Le phénomène de résistance aux fongicides pourrait être un des raisons de la diversité de ce champignon (Voir : Diversité phénotypique).

L'ensemble de phénomènes de résistance constituent un problème dans la lutte contre *B. cinerea*, justifiant ainsi l'intérêt actuel pour l'étude de méthodes alternatives à la lutte chimique contre ce champignon.

II.3. Lutte biologique

L'utilisation des fongicides se réduit drastiquement l'incidence de la pourriture grise. Néanmoins, cette méthode de lutte a plusieurs inconvénients : un impact néfaste sur l'environnement, une accumulation de résidus dans les produits alimentaires et surtout une apparition fréquente de souches résistantes. Ces raisons incitent les chercheurs à développer des méthodes alternatives de contrôle des maladies causées par *B. cinerea* (Masih *et al.*, 2000). Pour cela, la lutte biologique offre une alternative prometteuse ou un complément intéressant à l'utilisation des méthodes conventionnelles du contrôle de la maladie, puisque les agents de bio-contrôle sont perçus comme étant moins exigeant à l'environnement et leur mode d'action généralement complexes réduisant les risques de développement de résistance.

Tableau I. Les différents groupes de fongicides synthétiques anti-*Botrytis* (Leroux *et al.*, 1999 ; Rosslenbroich et Stuebler, 2000 ; Elad et Stewart, 2007).

Groupe	Famille chimique	Substance active	Mode d'action
Inhibiteurs de la respiration	Dithiocarbamates Sulfamides	Thirame Dichlofluanide	Les fongicides multi-sites affectant la respiration. Leur action est due à une inhibition de la germination des conidies
		Fluazinam Strobilurines	Blocage du fonctionnement des mitochondries.
Anti-microtubules	Benzimidazoles	Bénomyl et Carbendazime	Inhibition de l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne à faibles concentrations
	Phénylcarbamates	Diéthofencarbe	Inhibition de l'assemblage microtubulaire due à la fixation des fongicides sur la tubuline
Fongicides agissant sur l'osmorégulation	Dicarboximides		Inhibition de la germination des conidies et la croissance mycélienne.
	Phénylpyrroles	Fludioxonil	
	Hydrocarbures aromatiques	Dicloran	Ils causent des altérations morphologiques au niveau des tubes germinatifs tels que des gonflements, des ramifications anormales et des éclatements cellulaires.
Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine	Anilinopyrimidines	Pyriméthanyl, Cyprodinil et Mépanipyrim	Inhibent l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne. Inhibition de la biosynthèse de méthionine dans les cellules et/ou d'un blocage dans l'excrétion d'enzymes hydrolytiques impliquées dans le processus de pathogénicité.
Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols	Hydroxyanilides	Fenhexamid	Inhibition de l'élongation des tubes germinatifs et la croissance mycélienne à de faibles concentrations.

Les premières études sur l'écologie microbienne de la phyllosphère ont montré qu'il y avait un potentiel considérable pour l'utilisation des antagonistes microbiens pour le contrôle de *Botrytis* sur les cultures (Williamson *et al.*, 2007). De nombreux différents champignons filamenteux, bactéries et levures ont été sélectionnés comme agents de lutte biologique potentielle pour le contrôle de la pourriture grise basée sur leur antagonisme envers *B. cinerea*. La suppression biologique de l'agent pathogène se pose à divers niveaux : la compétition pour les nutriments et l'espace, la production de métabolites inhibiteurs et/ou de parasitisme (Verma *et al.*, 2007). Les différents mécanismes d'action des agents de lutte biologiques sont cités dans le tableau II.

L'isolement des microorganismes antagonistes en vue d'exploiter leur potentiel pour la suppression de la maladie biologique était l'objet de plusieurs études. Cependant, malgré de nombreux rapports de la lutte biologique réussie contre *B. cinerea* dans des conditions de laboratoire, seule une petite proportion d'entre eux a démontré une efficacité sur le champ et un nombre encore plus réduit ont été développées dans des produits commerciaux (Elmer et Reglinski, 2006).

Le contrôle des bio-agresseurs par des extraits végétaux constitue aussi une alternative importante à la lutte chimique. L'utilisation des substances bioactives d'origine végétale offre des perspectives nouvelles pour la protection des cultures, en raison de leurs nombreux avantages écologiques. La mise en évidence de molécules de défense des plantes pourrait trouver un intérêt dans le développement de biopesticides d'origine végétale.

A titre d'exemple, un extrait des feuilles de la Renouée de Sakhaline (*Reynoutria sachalinensis*, nom commercial Milsana) a été décrit comme un éliciteur de défense de la vigne contre *B. cinerea* (Carlen *et al.*, 2003).

Le mélange d'extraits d'algues et de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), contenus dans le produit Synermix, induit l'accumulation de resvératrol, composé phénolique antimicrobien, dans les feuilles de vigne. Ce composé induit une résistance systématique chez la plante (Jeandet *et al.*, 2000).

La propolis est une résine végétale utilisée par les abeilles comme anti-infectieux pour assainir la ruche. Celle-ci a une activité antibiotique, antibactérienne et antifongique (Tosi *et al.*, 1996). Cette résine est utilisée pour inhiber *B. cinerea* en traitement après récolte.

Tableau II. Mécanismes d'action des agents de lutte biologique.

Mécanisme	Illustration
Modification des propriétés de surface des plantes	<i>Bacillus brevis</i> diminue la mouillabilité de la surface du chou chinois limitant ainsi la germination de <i>B. cinerea</i> et l'installation de la maladie (Edwards et Seddon, 1992).
Compétition	<i>Trichoderma ssp</i> a la capacité d'inhiber des pathogènes fongiques en compétition pour les nutriments et les sites de développement. L'aptitude à coloniser rapidement les plaies est un élément important qui peuvent être utilisés pour la protection de la tige des infections causées par <i>Botrytis</i> (Eden <i>et al.</i> , 1996)
Des enzymes dégradant la paroi cellulaire et le parasitisme	Le parasitisme s'appuie sur la production d'enzymes fongiques dégradant des parois cellulaires. <i>Pythium periplocum</i> a été trouvé à une mycoparasite agressive de <i>B. cinerea</i> dans la culture de la vigne (Paul, 1999).
Composés inhibiteurs	L'antibiose résulte de la production de substances qui agissent comme des « antibiotiques » et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène. Par exemple, <i>Bacillus brevis</i> sécrète le S-gramicidine, un antibiotique qui est connu pour être très efficace contre <i>B. cinerea</i> (Edwards et Seddon, 1992)
Répression de la production d'inoculum par l'agent pathogène	En présence d'antagonistes, la sporulation de <i>B. cinerea</i> a été fortement réduite (Walter <i>et al.</i> , 2006).
Résistance induite	Cette résistance peut s'établir de différentes manière ; épaissement des structures pariétales, stimulation des voies métaboliques secondaires permettant la synthèse de substances antimicrobiennes (comme les phytoalexines) ou des composés impliqués dans la signalisation de l'agression vers d'autres cellules, voire à l'ensemble de la plante par systémie (acide salicylique, éthylène, acide jasmonique, ...), enfin, accumulation de protéines de défense (Elmer et Reglinski, 2006).
Combinaison des mécanismes	Dans de nombreux cas, il peut être supposé que la lutte biologique est le résultat de plusieurs modes d'action combinée de l'antagoniste (Edwards et Seddon, 1992). Le cas de <i>Trichoderma ssp</i> qui combine l'antibiose, le parasitisme et la compétition pour la suppression de <i>B. cinerea</i> .

II. 4. Protection intégrée

L'importance des dégâts occasionnés aux cultures et aux denrées stockées par divers pathogènes, contraint l'agriculteur à recourir à des mesures de protection. Parmi celles-ci, protection agrochimique, qui prouve son efficacité mais elle ne donne pas assez de satisfaction, non seulement pour la durabilité des agroécosystèmes (diversité biologique, qualité physico-chimique du milieu), mais aussi à cause de son efficacité limitée par la manifestation du phénomène de résistance (Poitout et Leclant, 1986 ; Deguine et Ferron, 2004). La solution alternative serait donc la lutte biologique qui montre une efficacité relative, comparant à la lutte chimique, mais à long terme, est plus intéressante sur tous les plans. Cependant, la complexité des interactions hôte/pathogène/environnement génère une efficacité très variable de cette méthode de lutte.

Afin d'assurer une meilleure protection en essayant de minimiser l'ensemble de contraintes limitant les différentes méthodes de lutte, la protection intégrée impliquant une combinaison rationnelle les différentes méthodes de lutte (Lepoivre, 2001). Cette nouvelle stratégie repose, d'une part, sur le principe d'intégration de différentes méthodes de lutte (dont les techniques sont sélectionnées pour leurs effets aussi réduits que possible sur l'environnement) et, d'autre part, sur une aide personnalisée à la décision permettant à l'agriculteur d'évaluer les risques réellement en cours au niveau de chacune de ses parcelles afin qu'il puisse décider quand et comment intervenir (Ferron, 1999).

La protection intégrée répond à des critères d'ordre économique, écologiques et toxicologiques et elle s'inscrit dans le contexte de système de protection raisonnée assurant un maintien durable de la biosphère (Poitout et Leclant, 1986 ; Ferron, 1999).

La durabilité de la protection intégrée dépend de la durabilité de l'efficacité des différentes composantes sur lesquelles elle s'appuie. Pour les cultures sous serre comme pour les autres systèmes de production, on peut trouver de nombreux exemples de résistance de certains agents pathogènes à divers pesticides (Nicot, 2008).

Un autre aspect de la durabilité de la protection intégrée est sa robustesse face à des perturbations extérieures au système. Ces perturbations peuvent résulter de l'émergence de nouveaux problèmes phytosanitaires. D'autres types de perturbations sont d'ordre réglementaire, impliquant notamment des produits phytosanitaires ou des pratiques culturales (obligation de recyclage des solutions nutritives en culture hors sol), ou bien résultent d'évolutions technologiques majeures du système de production (utilisation des bourdons

pour la pollinisation). Toutes ces perturbations ont des conséquences sur la protection intégrée (Nicot, 2008).

Une évolution de la lutte contre les pathogènes est ainsi tracée. D'une lutte chimique aveugle vers une protection intégrée, avec, comme étapes intermédiaires, la lutte chimique dirigée ou raisonnée. De statique au départ, la lutte se dynamise, car elle est évolutive et spécifique des situations, et prend en compte non seulement les exigences économiques mais également les exigences écologiques et toxicologiques (Poitout et Leclant, 1986).

III. Diversité de *B. cinerea*

III.1. Diversité phénotypique

III.1.1. Morphotype

Selon Martinez *et al.* (2003), la diversité morphologique des souches de *B. cinerea* sur milieu artificiel gélosé de Malt-Agar est déterminée par une classification visuelle en huit types morphologiques différents, dont quatre mycéliens caractérisés par une quasi-absence de sclérotés et quatre types sclérotiens.

La croissance mycélienne et les sclérotés (la forme, la taille, le nombre et la distribution des sclérotés) présentent donc des éléments de variabilité morphologique pour ce champignon (Mirzaei *et al.*, 2007).

III.1.2. Agressivité

Le pouvoir pathogène se décline traditionnellement en une composante qualitative, la capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte donné et à causer une maladie et une composante quantitative, le degré de dommages infligés à l'hôte par l'infection pathogène. Pour la majorité des phytopathologistes européens, la composante qualitative est appelée virulence. La composante quantitative quant à elle est nommée agressivité.

Le niveau d'agressivité des isolats naturels de *B. cinerea* est très variable sur une plante hôte donnée, ainsi une différence d'agressivité d'isolats a été mise en évidence sur diverses plantes. Martinez *et al.* (2003) et Decognet *et al.* (2009), ont remarqué une variation d'agressivité de souches de *B. cinerea* sur la vigne et sur la tomate.

III.1.3. Résistance aux fongicides

B. cinerea est considéré comme un agent pathogène à haut risque en terme de résistance aux fongicides (Leroux, 2007). Selon Hmouni *et al.* (2003), les souches de *B. cinerea* ne présentent pas le même profil de résistance aux fongicides, même pour une même famille chimique. Plusieurs auteurs ont mis en évidence des niveaux différents de résistance aux fongicides dans les populations naturelles de *B. cinerea* (Moorman et Lease, 1992 ; Raposo *et al.*, 2000).

L'incidence élevée des isolats de *B. cinerea* résistants aux fongicides, rencontrée sur de nombreuses cultures dans le monde, peut être attribuée à l'instabilité du génome de ce champignon. Les populations de *B. cinerea* peuvent développer une résistance aux benzimidazoles et aux dicarboximides en absence de leur utilisation, et ces phénotypes résistants peuvent être stables (Yourman *et al.*, 2001). Les relations entre l'acquisition de la résistance et la virulence des souches font l'objet de controverse. Certaines études montrent que des souches de *B. cinerea* résistantes aux dicarboximides se présentent moins compétitives que les souches sensibles, alors que d'autres études infirment ce résultat et rapportent un potentiel d'infection similaire sinon supérieur pour les souches résistantes (Hmouni *et al.*, 2003).

III.2. Diversité génotypique

Plusieurs études ont également mis en évidence une forte diversité génétique (Beever et Weeds, 2007). Cette grande diversité pourrait s'expliquer par la nature multi-nucléée et hétérocaryotique du champignon, et le recours possible à la reproduction sexuée (Martinez *et al.*, 2003 ; Beever et Weeds, 2007). Une partie de cette variabilité peut aussi être due à l'activité des éléments transposables. *B. cinerea* peut être divisé en deux sous-populations caractérisée par la présence d'éléments transposables. Un groupe d'isolats « *transposa* » contient les éléments transposables *Boty* et *Flipper*, l'autre « *vacuma* » ne les possède pas (Giraud *et al.*, 1997).

Par exemple, sur 184 isolats de *B. cinerea* échantillonnés sur vigne et sur ronces dans six régions de France, 180 génotypes ont pu être différenciés à l'aide de marqueurs microsatellites (Fournier et Giraud, 2008).

Decognet *et al.* (2009), ont observé une grande diversité génétique dans des populations aériennes de *B. cinerea*. En effet, une caractérisation avec des marqueurs

microsatellites d'un échantillon de 80 isolats collectés à partir des serres expérimentales de tomate a révélé 63 haplotypes distincts. La plupart des haplotypes (53 haplotypes) n'ont été observés qu'une seule fois.

Karchani-Balma *et al.* (2008) ont géotypé 153 isolats de *B. cinerea* provenant de différentes cultures en Tunisie à l'aide de 9 microsatellites. Le champignon présente une grande diversité génotypique et cette diversité est modelée par le lieu d'échantillonnage (serre *versus* plein champ), la plante hôte et l'origine géographique des isolats.

Sur 209 isolats, la majorité (62,7%) contenait les éléments transposables : *boty* et *flipper* (groupe *transposa*), tandis que les petites populations ne contenait que *boty* (23,5%) ou aucun, ni *boty* ni *flipper* (14,4%; groupe *vacuma*). La caractérisation génotypique des isolats de différents marqueurs moléculaires a révélé un degré élevé de diversité génétique de la population, avec la plupart des isolats fongiques étant de différents haplotypes (Kretschmer et Hahn, 2008). Les marqueurs moléculaires basés sur l'hétérogénéité de la région IGS, microsatellites, et la présence ou l'absence d'éléments transposables ont permis de distinguer 88% des 209 isolats en haplotypes différents (Kretschmer et Hahn, 2008).

Matériel

et

Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Obtention du matériel fongique

I.1. Prélèvement

Les isolats de *B. cinerea* ont été prélevés à partir des chancres sporulés de différentes parties aériennes de la tomate à l'aide des cotons tiges. Les isolats obtenus sont ensuite maintenus dans des tubes Eppendorf à -20°C jusqu'à leur purification. La figure 3 présente le protocole général pour le prélèvement des isolats de *B. cinerea*.

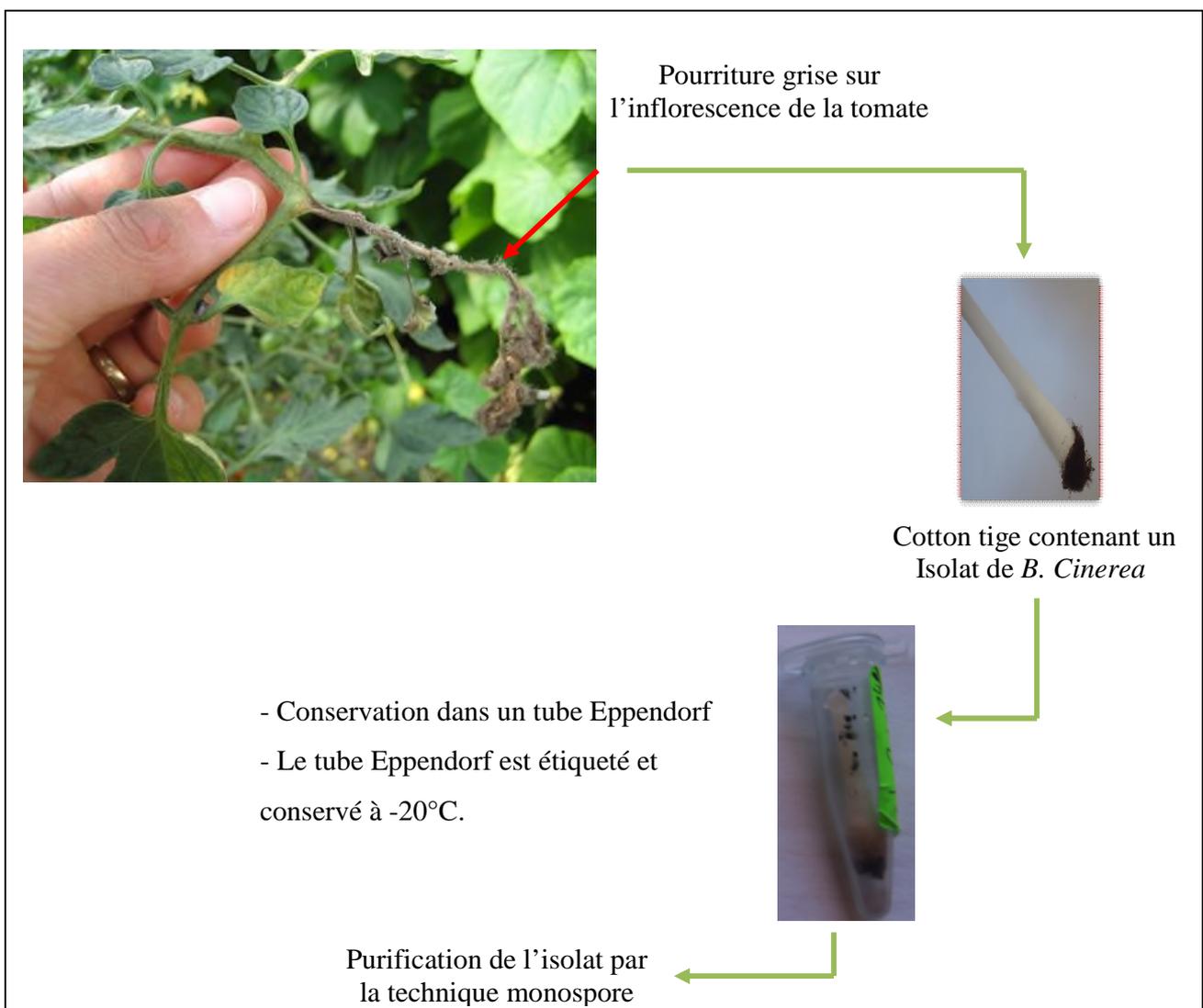


Figure 3. Technique de prélèvement de *B. cinerea* sur les chancres de tomate.

I.2. Purification des isolats

La caractérisation phénotypique des champignons nécessite une purification des isolats. Pour cela la technique de purification adoptée est la technique monospore (Figure 4). Cette technique est basée sur le prélèvement d'une seule spore bien germée et suffisamment isolée.

Un ensemencement par touches est réalisé sur milieu PDA (pH 5,4) ou milieu Malt-Agar (pH 5,4 ± 0,2) à partir d'un isolat conservé à - 20°C. Une incubation est effectuée pendant 3 jours à 21°C à l'obscurité.

Après incubation, des implants mycéliens de 5 mm de diamètre sont repiqués sur un milieu neuf et mis en culture, à 21°C pendant 15 jours dans le but d'obtenir des cultures sporulées. Les spores de chaque isolat ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine humide et mises en suspension dans de l'eau distillée stérile. Une goutte de la suspension préparée a ensuite été étalée sur une lame préalablement coulée par la gélose blanche. Ces dernières sont incubées à 21°C pendant 18 heures dans des boîtes de Pétri tapissées par un papier absorbant humidifié.

Sous microscope et à partir de chaque lame, une spore germée et isolée a été prélevée et transférée sur une boîte de Pétri contenant le milieu PDA et incubée à 21°C pendant 3 jours. Chaque isolat purifié est par la suite repiqué et incubé pendant 15 jours à 21°C dans le but de produire une quantité suffisante de mycélium pour la conservation.

La conservation consiste à recueillir les spores à l'aide d'un coton tige et les transférer dans un tube Eppendorf contenant 600 µl du tampon Phosphate Glycérol à 20%. Il est également possible de conserver le mycélium dans un tube Eppendorf vide. Les tubes Eppendorf doivent être étiquetés et conservés à -20°C.

I.3. Choix de souches

Un nombre total de 12 souches de *Botrytis cinerea* est sélectionné dont 9 souches sont Algériennes. Le choix des souches Algériennes est fait sur la base des résultats de l'analyse des microsattellites réalisée par l'équipe de recherche de laboratoire de Mycologie.

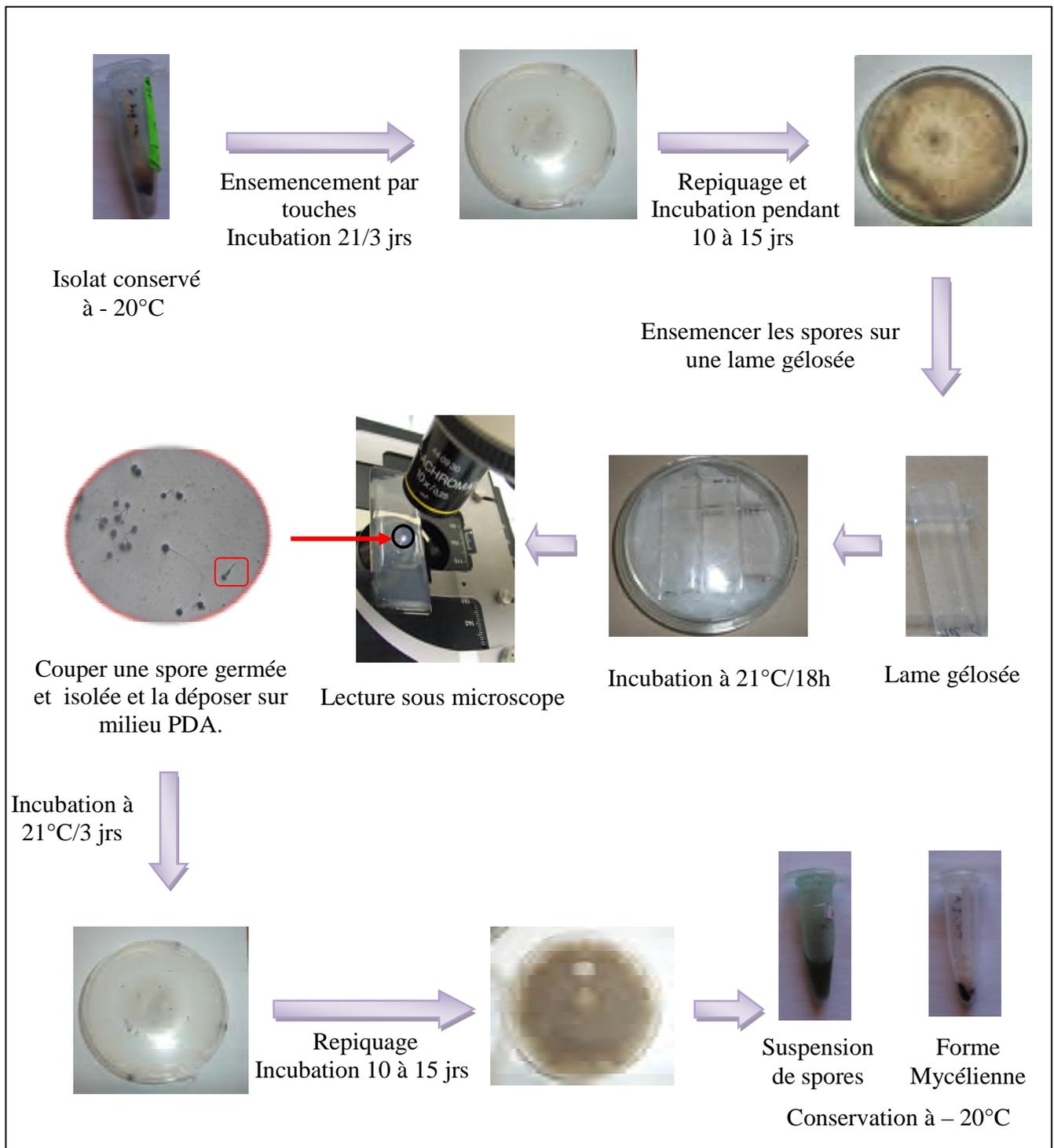


Figure 4. Les étapes de la purification de *B. cinerea* par la technique monospore

Les souches Européennes proviennent de collection de l'unité de phytopathologie d'INRA Avignon (France): Deux souches de référence d'origine française: BC1et BC21 choisies selon leur profil d'agressivité et une souche de Norvège (Tableau III).

Tableau III. Les souches de *Botrytis cinerea* étudiées.

<i>Souche</i>	<i>Origine</i>	<i>Saison</i>
ALG 66	A : Merdj Ouamen	2007
ALG 20	B : Baccaro	
ALG 34	C : Tichy	
ALG 85	A : Merdj Ouamen	2008
ALG 136	B : Baccaro	
ALG 175	C : Tichy	
ALG 200	A : Merdj Ouamen	2010
ALG 295	B : Baccaro	
ALG 235	C : Tichy	
BC1	France	1989
BC21	France	1991
BC142	Norvège	-

I.4. Repiquage des souches

A partir des suspensions de spore conservées dans le tampon phosphate-glycérol à 20%, 2 µl de chaque suspension sont déposés au milieu d'une boîte de Pétri de 50 mm de diamètre contenant le milieu PDA. A partir de celles-ci, des implants de 5 mm sont excisés à l'aide d'un emporte pièce et déposés au centre de boîtes de Pétri. Les boîtes sont ensuite incubées à 21°C pendant 4 jours à l'obscurité. Le deuxième repiquage est effectué sur deux boîtes de Pétri pour chaque souche.

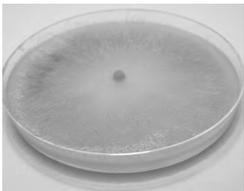
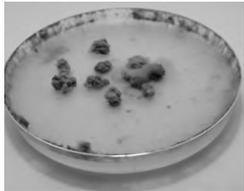
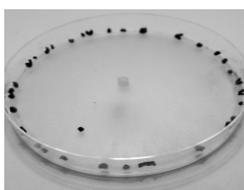
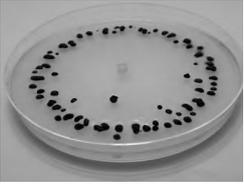
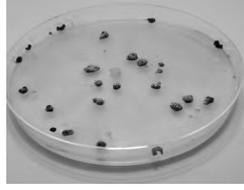
La caractérisation phénotypique des souches de *B. cinerea* a été réalisée par la détermination du morphotype, la quantification de l'agressivité sur les folioles de tomate et l'étude de l'effet des températures élevées sur le développement de ce champignon.

Les protocoles appliqués dans cette étude sont conformes à ceux utilisés par l'unité de phytopathologie d'INRA. Avignon (France).

II. Caractérisation morphologique

La caractérisation morphologique des souches de *B. cinerea* est déterminée sur milieu PDA. Un implant mycélien de chaque souche est déposé au centre d'une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre, une incubation est effectuée à 21°C pendant 2 semaines à l'obscurité. L'aspect macroscopique des colonies de *B. cinerea*, la répartition des spores et des sclérotés sur la surface de milieu sont notés selon la méthode décrite par Mirzaei *et al.*, 2007. La classification est établie selon les travaux de Martinez *et al.* (2003) (Tableau IV).

Tableau IV. Classification morphotypique des souches de *B. cinerea* sur milieu MA (Martinez *et al.*, 2003).

		Type Mycélien "M"			
Présentation					
Phénotype	M 1	M2	M3	M4	
Mycélium	rasant	aérien	masses mycéliennes	épais et dense	
Sporulation	0	1 ou 2	1 ou 2	1	
Sclérotés	0	0	0	0	
		Type Sclérotien "S"			
Présentation					
Phénotype	S1	S2	S3	S4	
Mycélium	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant	
Sporulation	1	1	1	0	
Sclérotés	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grandes tailles, éparpillées	Nombreux, petits et éparpillés	

Sporulation : 0 : absence; **1**:sporulation peu abondante; **2**: sporulation très abondante.

Sclérotés : 0 : absence; **1**: rares; **2**: très abondantes.

III. Test d'agressivité

L'agressivité du champignon constitue un trait de caractérisation très important. Il permet de déterminer le degré d'agressivité de la population étudiée. Ce test est effectué sur des folioles de tomate dans le but est de vérifier si les souches de *B. cinerea* issues de différentes origines sont identiques en termes de leur agressivité.

III. 1. Matériel végétal

Le degré d'agressivité des souches de *B. cinerea* sélectionnées est réalisé sur les folioles prélevées de plante de tomate *Lycopersicon esculentum* variété « Tavira F1 » âgée de deux mois cultivée sous abri dans une serre à Tichy. Les folioles sont déposées dans des boîtes appropriées, tapissées au préalable avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée, à raison de 5 folioles par boîtes et par souche.

III. 2. Repiquage des souches

Des cultures jeunes de 3 jours sont préparées en repiquant les 12 souches sur milieu PDA et incubées à 21°C.

III. 3. Inoculation des folioles

Après trois jours d'incubation, un implant mycélien de 3 mm est prélevé et déposé au centre de chaque foliole (Figure 5). Les boîtes sont incubées à température ambiante du laboratoire.

III. 4. Lecture

Le degré d'agressivité consiste à estimer la surface des lésions causées par les souches testées sur les folioles. Pour ceci, des photos ont été prises à différents intervalles du temps à partir de 12 h jusqu'à 96 h. Les photos sont ensuite analysées avec le logiciel « ASSESS 2.0 » (APS Press, St Paul, Minnesota) après calibration pour déterminer la surface en mm² des lésions (Annexe 3).

les surfaces de lésions obtenues sont transformées en AUDPC (Area Under the Disease Progress Curves) qui correspond à la surface présente sous la courbe de progression de la maladie puis analysé.

La formule permettant de calculer l'AUDPC est la suivante :

$$\text{AUDPC} = [Y_1/2 + \sum_2^{n-1} Y_j + Y_n/2] [I]$$

Avec :

Y_j : la surface de la lésion (en mm^2) au temps d'observation j ;

n : le nombre total d'observations ;

I : l'intervalle de temps entre chaque observation (en heures).

L'AUDPC, exprimée sans unité, a ainsi été calculée pour chaque lésion avec :

$n = 7$ observations

$I = 12\text{h}$

IV. Effet de la température sur le développement de *B. cinerea*

Le test de croissance mycélienne et de germination des spores à différentes températures est réalisé afin d'évaluer l'effet de celles-ci sur le comportement des souches de *B. cinerea* et de vérifier si leur développement à différentes températures est identique quelle que soit leur origine.

IV. 1. Croissance mycélienne

L'influence des températures élevées sur le développement des douze souches est évaluée sur milieu PDA. Un implant mycélien de 5 mm de diamètre, prélevé à partir de cultures jeunes de 3 jours de chaque souche, est repiqué en trois répétitions au centre d'une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Ces dernières sont incubées à 21°C, 28°C, 30°C, pendant 10 jours.

Le choix de températures est fait comme suit :

21°C : appartient à la gamme de températures optimales de croissance.

28°C : une température modérément élevée.

30°C : une température élevée.

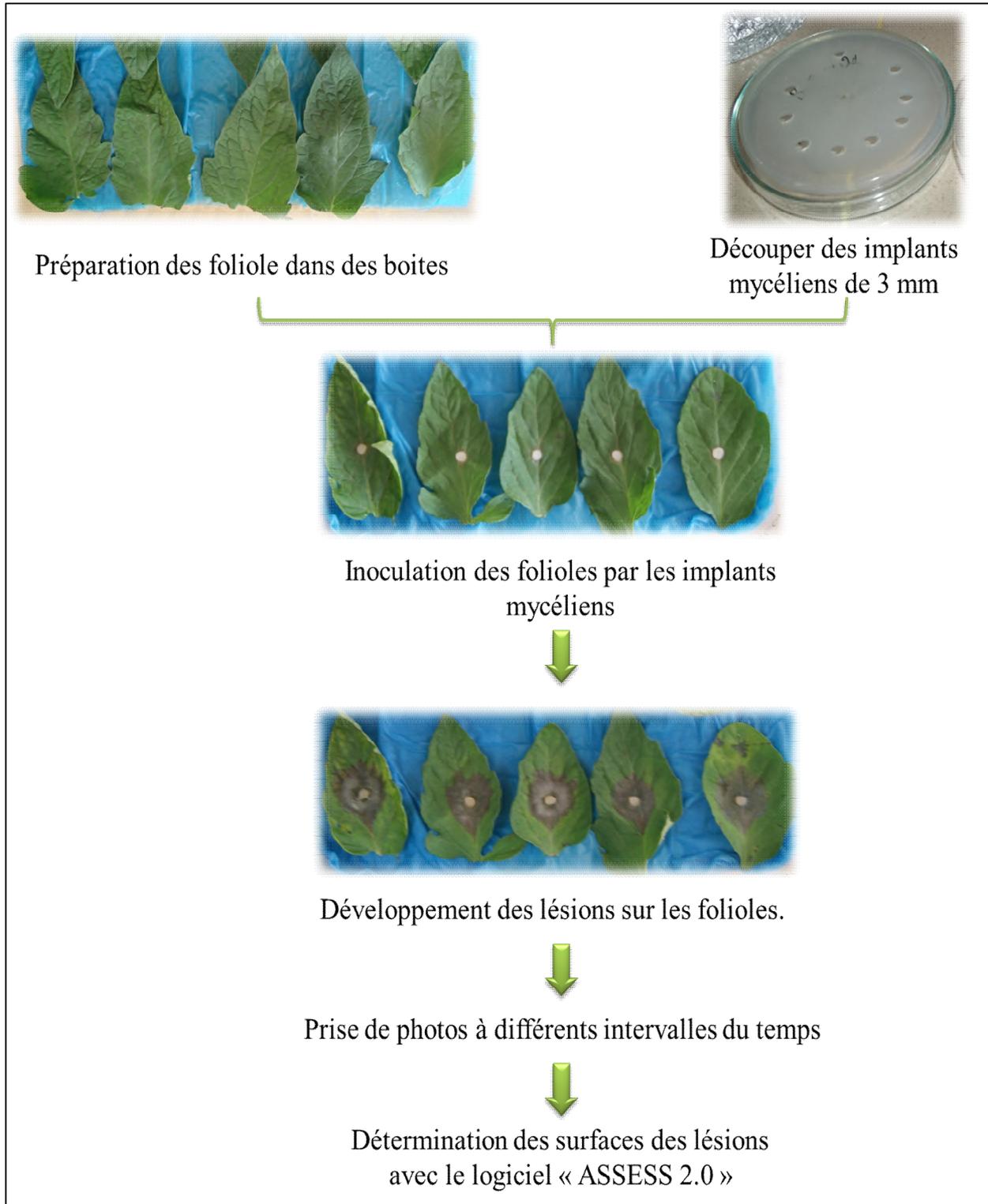


Figure 5. Etapes du Test d’agressivité des souches de *B. cinerea* sur des folioles de tomate

La croissance mycélienne est estimée chaque jour pour chaque température en mesurant deux diamètres perpendiculaires (Annexe 3). Une vitesse de croissance est par la suite calculée selon la formule suivante:

$$\text{Vitesse de croissance} = \frac{\Delta D}{\Delta t}$$

Où :

D : diamètre moyen calculé entre le diamètre maximum et minimum;

t : temps en jours entre le jour 1 et le jour où le diamètre est maximum.

IV. 2. Germination de spores

IV. 2. 1. Préparation des suspensions de spores

Après avoir obtenu des cultures sporulées de 15 jours d'incubation à 21°C, 3 ml d'eau physiologique stérile sont ajoutés dans des conditions stériles. A l'aide d'un râteau stérile, étaler l'eau dans la boîte et racler de façon à détacher les spores. La suspension obtenue est prélevée à l'aide d'une micropipette dans un tube Eppendorf et vortexé (Figure 6).

Le comptage de spores est effectué sur la cellule de Malassez dans le but de standardiser la suspension à 10^6 spores/ml selon Ajouz *et al.* (2011). En agitant la suspension de spores, 17µl sont prélevés et déposés sur les deux grilles d'une cellule de la lame Malassez (Annexe 2). Pour obtenir les 10^6 spores/ml dans la suspension, la formule suivante est appliquée :

$$C_i V_i = C_f V_f$$

C_i : concentration initiale de la suspension.

V_i : volume initial prélevé de la suspension.

C_f : concentration finale de la suspension.

V_f : volume final de la suspension préparée.

IV. 2. 2. Inoculation

Des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sont coulées par la gélose à Glucose-Agar (GA) et divisées en cinq compartiments chacune. Chaque boîte de Pétri servira pour ensemer une souche avec cinq répétitions. 10 µl de la suspension de spore sont déposés dans chaque compartiment, étalé à l'aide d'un râteau. Les boîtes sont incubées à différentes températures à savoir 21°C, 28°C, 30°C, 31°C et 32°C pendant 8h (Figure 7).

Le comptage de spores germées est fait sous microscope au grossissement 100. Le taux de germination est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de germination} = \frac{\text{Nombre de spores germées}}{\text{Nombre de spores totales}} \times 100$$

V. Analyse statistique

Des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT 7.5.2. Une analyse ANOVA (analyses de variance) à un facteur au risque de 5% associée au test de Newman Keuls (SNK) a permis d'analyser les résultats du test d'agressivité et du test de effet des différentes températures sur le développement de *B. cinerea*.

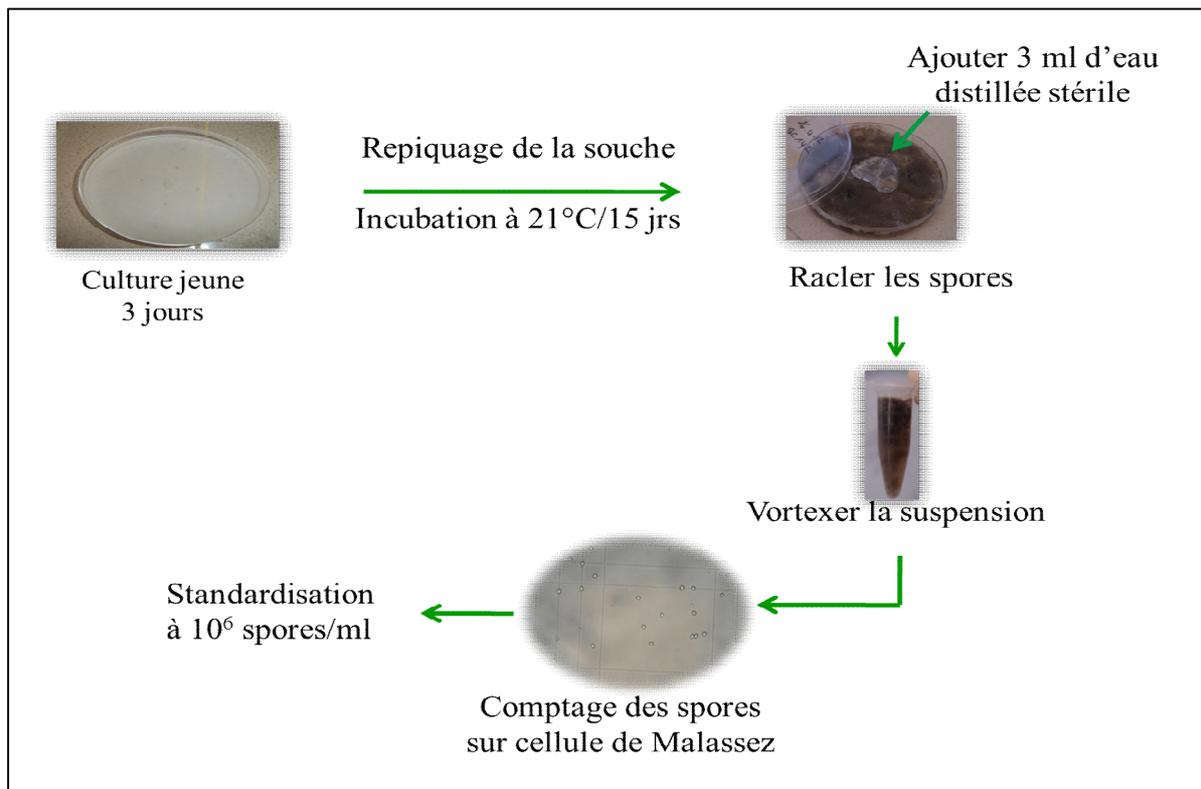


Figure 6. Préparation de la suspension de spores de *B. cinerea*

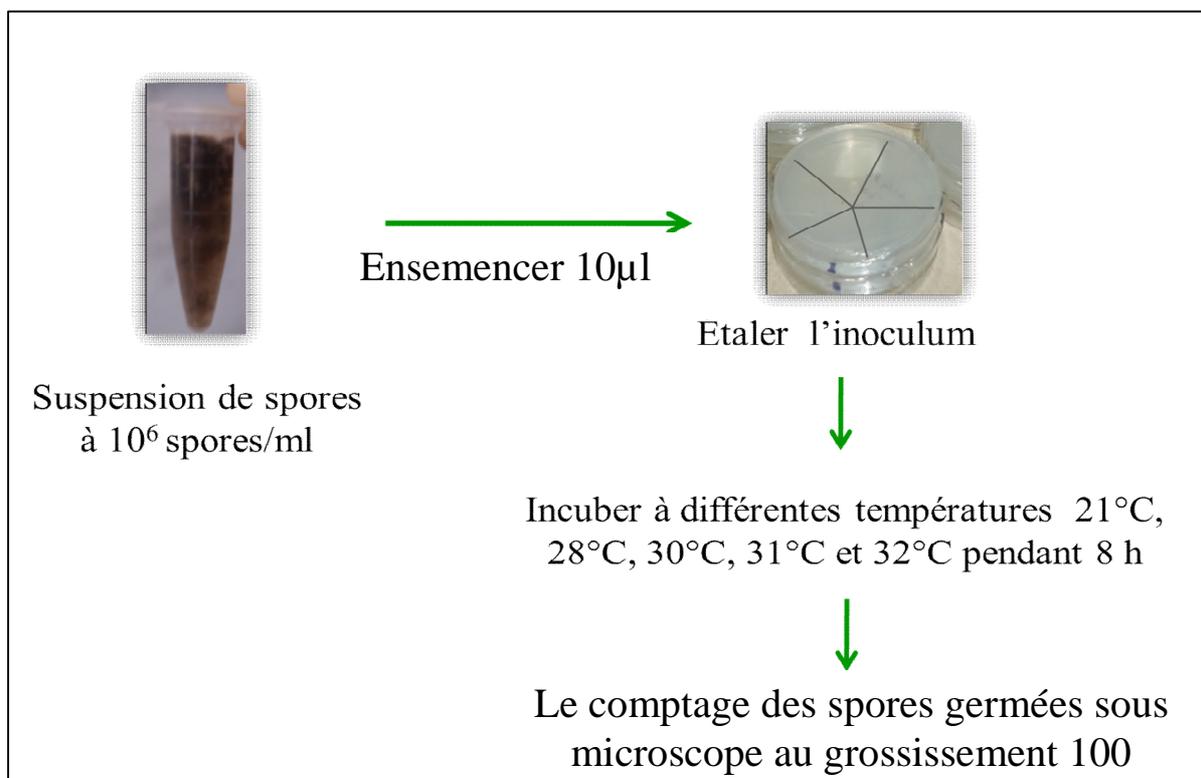


Figure 7. Etapes du test de l'effet de la température sur la germination des spores de *B. cinerea*.

*Résultats
et
Discussion*

I. Caractérisation morphologique

L'étude de la morphologie des souches de *B. cinerea* de deux origines différentes (Algérie et Europe) est réalisée sur milieu PDA à 21°C à l'obscurité. L'observation macroscopique basée sur l'aspect du mycélium, la sporulation et la production des sclérotés est effectuée après 2 semaines d'incubation.

Différents aspects du mycélium observés sont présentés dans la figure 8. Le mycélium produit était aérien, rasant ou en masse. Les colonies sont de couleur blanche ou blanche grisâtre au début puis elles deviennent grises claires à grises foncées ou terne à la fin de la période de l'incubation (à partir du septième jour).

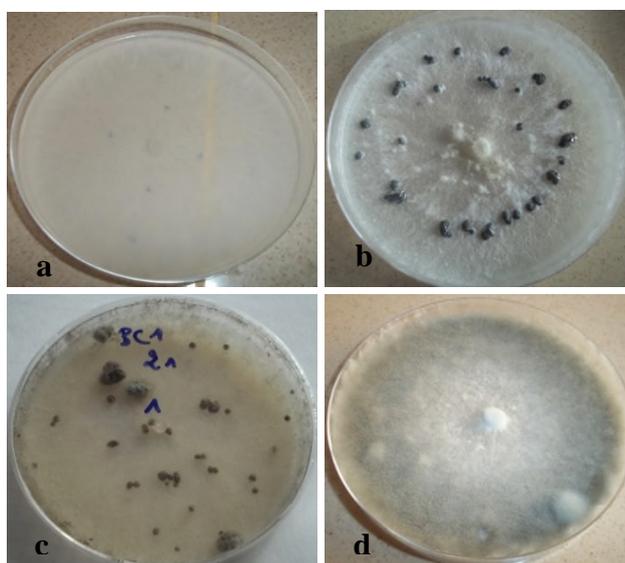


Figure 8. Différents aspects du mycélium de *B. cinerea* obtenu sur PDA à 21°C.

- a. Mycélium rasant blanc. b. Mycélium aérien blanc.
c. Masses mycéliennes grises d. Mycélium aérien gris verdâtre.

La sporulation est produite à la surface du mycélium à partir du 7^{ème} jour. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 9. Les spores sont produites soit sur toute la surface de la boîte de Pétri, sur la partie marginale ou en touffes.

Les sclérotés varient également en abondance, en dimension et en distribution. Ils sont au début de leur formation blanchâtre puis ils se durcissent et enfin se noircissent. Chez certaines souches, les sclérotés sont abondants, rares ou absentes chez d'autres souches (tableau V). Ils sont superficiels ou profonds enrés dans la gélose.

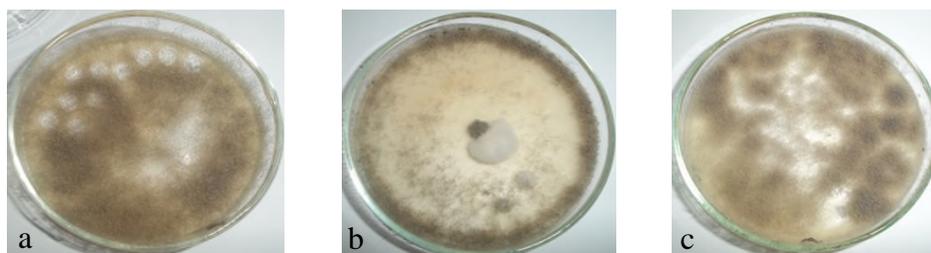


Figure 9. Différents aspects de la sporulation observés des souches de *B. cinerea* sur milieu PDA à l'obscurité à 21°C.

a. Sur toute la surface de la boîte de Pétri. **b.** Sur la partie marginale. **c.** En touffes.

Selon les travaux de Martinez *et al.* (2003), les colonies de souches *B. cinerea* testées sont classées visuellement en huit morphotypes distincts (tableau V). Deux principaux types morphologiques sont identifiés : un type mycélien et un type sclérotien. Le premier type est caractérisé par une quasi-absence de sclérotés tandis que le deuxième est caractérisé par une production plus ou moins abondante de sclérotés.

Dans la présente étude et sous les conditions expérimentales appliquées (température et obscurité), les souches Algériennes testées sont de type sclérotien à l'exception de la souche ALG175 qui est de type mycélien. Quant aux souches Européennes, la BC1 et BC21 sont de type mycélien et BC142 est de type sclérotien.

L'identification de *B. cinerea* est traditionnellement basée sur les caractéristiques culturales et morphologiques couplées avec la spécificité de l'hôte. Cependant, les caractéristiques morphologiques sont influencées par les conditions culturales (température, lumière/obscurité, humidité, saison de l'échantillonnage...) (Jarvis, 1977 cité par Mirzaei *et al.*, 2007). Cela était remarqué dans cette étude, de sorte qu'à 28°C, le mycélium est aérien, dense gris dont la sporulation est très abondante dès le début de la croissance mycélienne.

Martinez *et al.* (2003), ont remarqué que les souches isolées de l'écorce de la canne en hiver sont exclusivement de type sclérotien *in vitro*. Cela peut être lié au fait que les isolats de l'hiver sont issus à partir de forme de résistance «sclérotés».

Tableau V. Classification des souches de *B. cinerea* testées selon leurs Morphotypes.

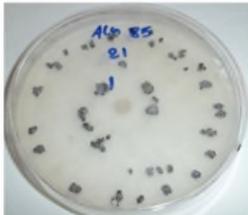
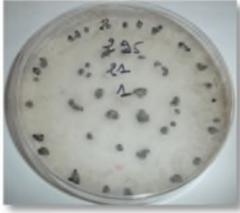
Souche	Type mycélien	Sporulation	Type sclérotien	Nombre de sclérotés	Photos
ALG20	M1 Mycélium rasant	1 Peu abondante	S2 Sclérotés de grande taille formant un ou des cercles	2 Abondant	
ALG34			S3 Sclérotés de grande taille et éparpillés		
ALG66			S3 Sclérotés de grande taille et éparpillés		
ALG85			S4 Sclérotés nombreux, petits et éparpillés		
ALG136			S3 Sclérotés de grande taille et éparpillés		
ALG175			S3 Sclérotés de grande taille et éparpillés		

Tableau V. Classification des souches de *B. cinerea* testées selon leurs Morphotypes (suite).

Souche	Type mycélien	Sporulation	Type sclérotien	Nombre de sclérotés	Photo
ALG200	M1 Mycélium rasant	1 Peu abondante	S4 Sclérotés nombreux, petits et éparpillés	2 Abondant	
ALG235			S3 Sclérotés de grande taille et éparpillés		
ALG295			S3 Sclérotés de grande taille et éparpillés		
BC1	M3 Masse mycélienne	2 abondante	0	0	
BC21	M2 Mycélium Aérien		0		
BC142			S4 Sclérotés nombreux, petits et éparpillés		2 Abondant

II. Test d'agressivité

Le test d'agressivité a pour objectif de quantifier le pouvoir pathogène des souches de *B. cinerea* *in vivo*. Pour cela, les souches sélectionnées sont inoculées sur des folioles de tomate. Les surfaces des lésions produites sont mesurées et transformées en AUDPC.

Toutes les souches produisent des lésions progressives sur les folioles de tomate. Les lésions commencent à apparaître à partir de 12h de l'inoculation sous forme de petites taches grises puis elles s'élargissent de plus en plus à différentes vitesses de propagation selon le niveau d'agressivité des souches (figure 10).

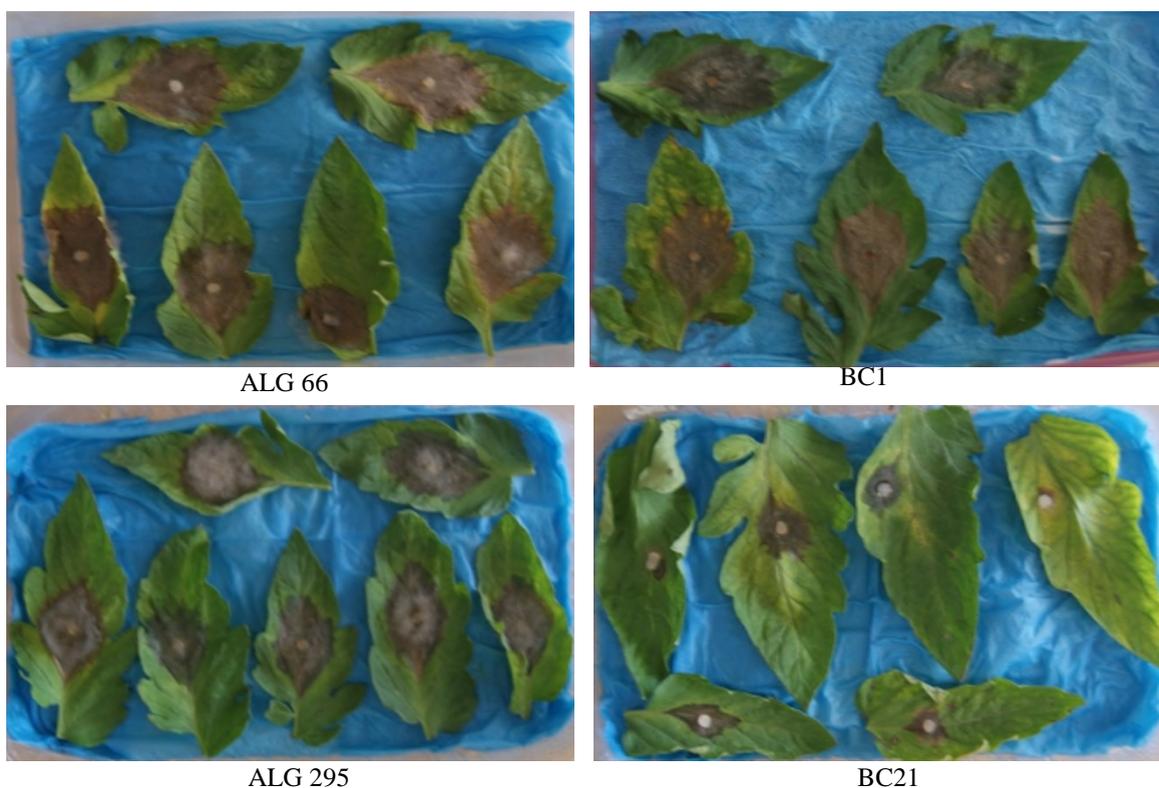


Figure 10. Les lésions causées par les souches de *B. cinerea* les plus agressives (ALG66 et BC1) et les moins agressives (ALG295 et BC21) d'origine d'Algérie et d'Europe sur les folioles de tomates

Différents niveaux d'agressivité ont été obtenus par les souches de *B. cinerea* testées. Selon l'origine, les souches Algériennes se montrent plus agressives que les souches Européennes (Figure 11).

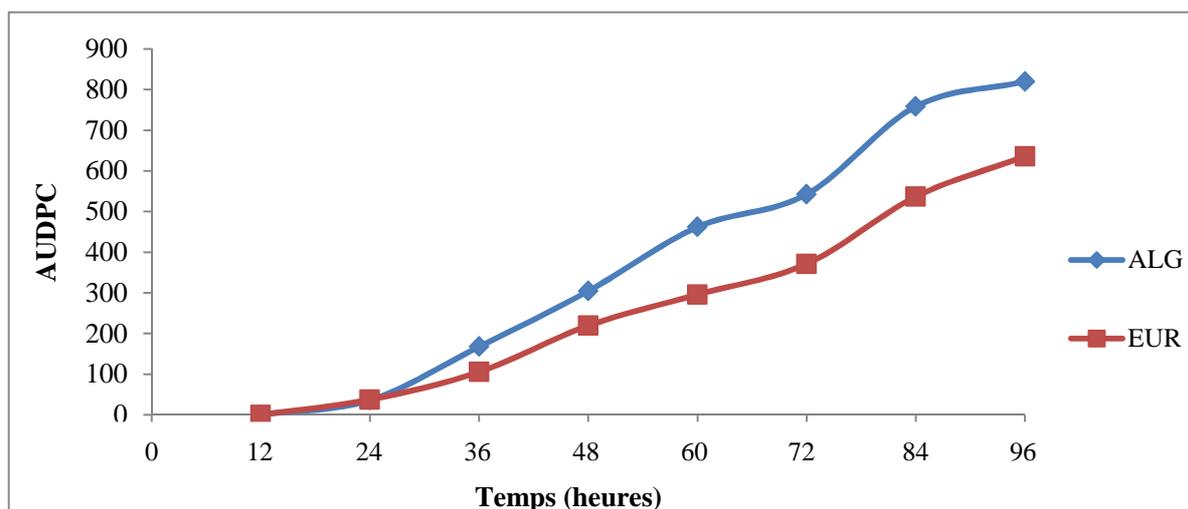


Figure 11. Cinétique de l'incidence de la pourriture grise sur les folioles de tomate.

Les souches Algériennes montrent une grande diversité dans leur agressivité sur les folioles de la Tomate ($P < 0,0001$). Les souches les plus agressives sont ALG 66, ALG85 et ALG235 avec des AUDPC respectives de 42347, 40588 et 39387. Tandis que la souche ALG295 montre un pouvoir agressif le plus faible avec une AUDPC de 19855 parmi les souches Algériennes testées (figure 12).

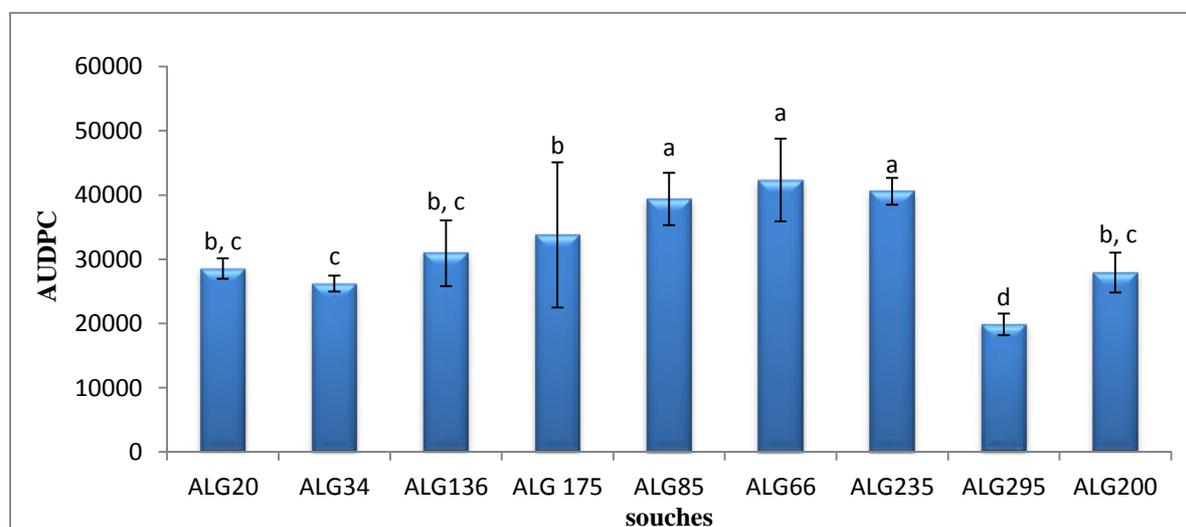


Figure 12. AUDPC moyens des différentes souches Algériennes testées.

Les barres verticales (I) représentent l'erreur standard de cinq répétitions d'AUDPC. Les moyens d'AUDPC des souches marquées par la même lettre ne sont pas significativement différents selon le test de Newman et Keuls ($P < 0,0001$).

Les trois souches européennes étudiées sont divisées en deux groupes significativement différents ($P < 0,0001$). La souche BC142 et la souche BC1 montrent des niveaux d'agressivité similaires avec des AUDPC respectivement de 33837 et 28002. Par

contre, la souche BC21 montre le niveau d'agressivité le plus faible avec une AUDPC de 5992 (Figure 13).

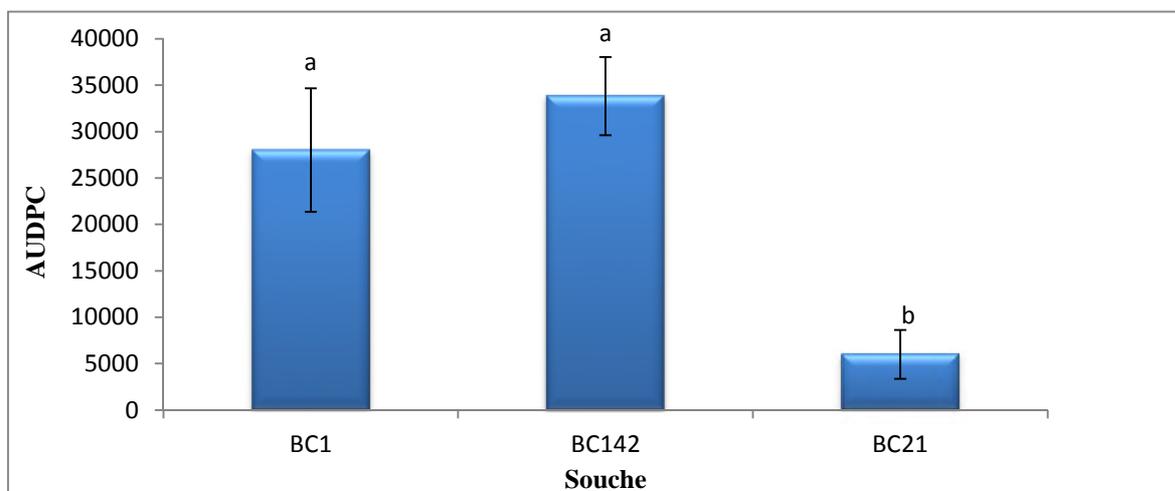


Figure 13. AUDPC moyennes des souches européennes testées.

Les barres verticales (I) représentent l'erreur standard de cinq répétitions d'AUDPC. Les moyens d'AUDPC des souches marquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman et Keuls ($P < 0,0001$).

A l'exception de ALG295, les souches Algériennes comparé à la souche BC1 montrent une agressivité similaire ou supérieure ($P < 0,0001$). Les souches ALG66, ALG85 et ALG235 montrent une agressivité supérieure à la BC1. Le reste des souches Algériennes (ALG20, ALG34, ALG135, ALG175, ALG200 et ALG295) présentent un niveau d'agressivité similaire à la BC1. Tandis que la BC21 reste la souche la moins agressive (Tableau VI).

Tableau VI. Classement des groupes non significativement différents des valeurs d'AUDPC des souches testées obtenus par le test de Newman et Keuls à intervalle de confiance de 95%

Souche	Valeur Moyenne d'AUDPC	Regroupements		
ALG66	42347 ¹	A ²		
ALG235	40588	A	B	
ALG85	39387	A	B	
BC142	33837		B	C
ALG 175	33784		B	C
ALG136	30945			C
ALG20	28540			C
BC1	28002			C
ALG200	27913			C
ALG34	26205			C
ALG295	19855			D
BC21	5992			E

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (12 souches × 3 répétitions) de la croissance mycélienne des souches de *Botrytis cinerea*.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Newman et Keuls.

Les résultats d'agressivité obtenus coïncident avec ceux obtenus dans d'autres études réalisées sur différentes parties aériennes de différentes plantes hôtes.

L'étude des traits de pathogénicité des isolats de *B. Cinerea* provenant de fruits de fraise ont montré des variations de degrés de virulence des trois isolats étudiés sur les différentes parties de la plante de fraise à côté de différences dans leurs caractéristiques culturelles, morphologiques (Valiuskaite *et al.*, 2010).

La comparaison de 15 souches de *Botrytis* isolées à partir de l'air et deux souches de référence révèle que ces deux dernières montrent une agressivité supérieure aux 15 souches isolées. Cela est due au fait que les spores de *B. cinerea* isolées à partir de l'air ont été peut être endommagées par différentes contraintes physiques rencontrées pendant la dissémination à savoir, le taux faible d'humidité, les températures élevées de l'air ou leur exposition aux rayons solaires (Decognet *et al.*, 2009)

Shen *et al.* (2009) ont réalisé une étude sur la pathogénicité de 26 souches de *B. cinerea* sur les feuilles de concombre. Ces auteurs ont remarqué une différence importante de pathogénicité entre les souches testées.

Les conditions de culture influencent l'apparition et la progression de la maladie. En effet, dans des serres non chauffées, la plupart des lésions sur les tiges provenaient de la progression de l'agent pathogène le long des pétioles infectés. L'infection des feuilles proches de la tige nécessite 6 semaines pour qu'elle soit établie. L'influence de l'environnement sur la progression de *B. cinerea* sur les pétioles a été également déterminée. Dans la gamme de température allant de 5-30°C, plus la température augmente, plus rapide est la progression de la maladie. Le champignon a progressé plus rapidement sur les pétioles tomate incubés à haute pression de vapeur plutôt qu'à une pression de vapeur faible (Shtienberg *et al.*, 1998).

III. Effet de la température sur le développement de *B. cinerea*

III. 1. Croissance mycélienne

L'effet de la température sur la croissance mycélienne de quelques souches de *B. cinerea* est déterminé à trois températures : 21°C, 28°C et 30°C. Une différence de croissance radiale entre les souches à une même température est constatée. L'augmentation de la température entraîne une diminution de la croissance radiale des souches.

Toutes les souches testées atteignent le maximum de croissance radiale (85 mm) à 21°C au bout du troisième jour. A 28°C, le diamètre maximal est observé à partir du cinquième jour au septième jour pour la souche ALG66. Tandis qu'à 30°C, le diamètre maximal enregistré ne dépasse pas 40 mm pour toutes les souches, et la croissance mycélienne est arrêté au bout du troisième jour (Annexe 4).

Les vitesses moyennes de la croissance des souches *B. cinerea* testées sont significativement influencées par la température ($P < 0,0001$; tableau VII). En revanche, il n'y a pas d'interaction entre l'effet de la température et l'origine des souches sur la croissance mycélienne ($P < 0,0001$; tableau VIII). Les vitesses moyennes de croissance varient considérablement d'une température à l'autre : entre 32 et 36 mm/j à 21°C, 12 et 22 mm/j à 28°C et entre 1,5 et 11,8 mm/j à 30°C (Tableau IX). À 21°C, les vitesses moyennes de croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* sont signalées comme les plus élevées par rapport aux vitesses obtenues à d'autres températures (28°C et 30°C). Ce qui signifie que 21°C est la température optimale de croissance mycélienne.

Tableau VII. Taux de croissance mycélienne moyenne totale de *Botrytis cinerea* à différentes températures sur milieu PDA

Température	Moyenne
21°C	34,1 ¹ a ²
28°C	19,9 b
30°C	8,3 c
<i>P</i> valeur ³	<0,0001

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (12 souches × 3 répétitions) de la croissance mycélienne des souches de *Botrytis cinerea*.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Newman et Keuls.

³ *P* valeur du test Newman-Keuls pour l'analyse de variance.

Tableau VIII. Analyse de la variance du taux moyen de croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* sur PDA

Source	F de Fisher	Pr > F
Origine	0,041	0,840
Température	653,223	< 0,0001
Origine*Température	0,463	0,631

La vitesse moyenne de croissance à différentes températures pour chaque souche est présentée dans la figure 14. Plus d'hétérogénéité entre les souches est détectée à 21°C et à 30°C comparativement à 28°C ($P < 0,0001$; tableau IX).

A 21°C, la comparaison des vitesses moyennes de la croissance des différentes souches révèle que la souche ALG136 présente la vitesse la plus grande (36 mm/j). La vitesse de croissance la plus faible est montrée par la souche BC142 (32,2 mm/j).

À 28°C, uniquement la souche ALG66 montre la vitesse moyenne de croissance la plus faible (12mm/j) classée dans un groupe et toutes les autres des souches sont classées dans un groupe significativement différent du premier.

A 30°C, les vitesses moyennes de croissance mycélienne sont significativement réduites. La souche ALG66 présente également le taux de croissance le plus faible (0,7 mm/j).

En conclusion, la souche ALG66 est très affectée par les températures élevées ce qui se traduit par un taux de croissance significativement réduit à 28°C (12,0 mm/j) et à 30°C (0,7 mm/j).

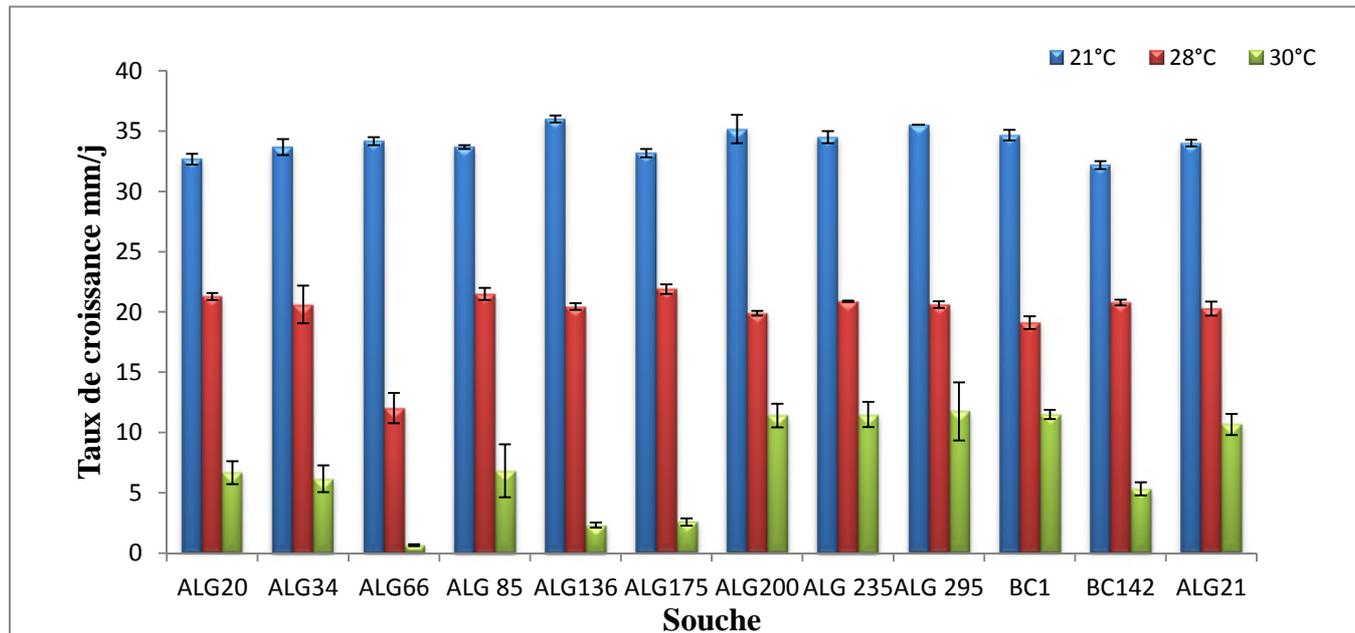


Figure 14. Vitesses moyennes de croissance radiale des souches de *B. cinerea* à différentes température. Les barres verticales (I) représentent l'erreur standard de trois répétitions.

Tableau IX. Les vitesses moyennes de croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* à différentes températures.

Souche	Vitesse à 21°C (mm/j)	Vitesse à 28°C (mm/j)	Vitesse à 30°C (mm/j)
ALG20	32,7 ¹ cd ²	21,3 a	6,7 abc
ALG34	33,7 abcd	20,6 a	6,2 bc
ALG66	34,2 abcd	12,0 b	0,7 d
ALG 85	33,7 abcd	21,5 a	6,8 abc
ALG136	36 a	20,4 a	2,3 cd
ALG175	33,2 bcd	21,9 a	2,6 cd
ALG 235	34,5 abc	20,9 a	11,4 a
ALG200	35,2 ab	19,9 a	11,5 a
ALG 295	35,5 ab	20,6 a	11,7 a
BC1	34,7 abc	19,1 a	11,5 a
BC21	34,0 abcd	20,3 a	5,3 c
BC142	32,2 d	20,8 a	10,7 ab
<i>P valeur</i> ³	<0,0001	<0,0001	<0,0001

¹Chaque valeur représente le taux moyen (3 répétitions) de la croissance mycélienne des souches de *Botrytis cinerea* à différentes températures.

²Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Newman et Keuls.

³ *P valeur* du test Newman-Keuls pour l'analyse de variance.

III. 2. Germination

L'effet de la température sur la germination des spores des souches de *B. cinerea* testées est déterminé à 21°C, 28°C, 30°C, 31°C et 32°C. Une spore est considérée germée si la taille de tube germinatif est deux fois supérieure à la taille de la spore elle-même.

Les taux moyens de la germination des spores des souches de *B. cinerea* sont significativement influencées par la température ($P < 0,0001$; tableau X). Par contre, ni l'origine des souches, ni l'interaction entre les régions d'isolement et les températures n'influencent sur les taux de germination des spores des souches de *B. cinerea* ($P > 0,05$; tableau XI).

Tableau X. Les taux moyens totaux de la germination des spores de *Botrytis cinerea* à différentes températures sur milieu PDA.

Température	Moyenne
21°C	93,3 ¹ a ²
28°C	35,8 b
30°C	19,7 c
31°C	2,9 d
<i>P valeur</i> ³	0,0001

¹ Chaque valeur représente le taux moyen total (12 souches × 3 répétitions) de la croissance mycélienne des souches de *Botrytis cinerea*.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Newman et Keuls.

³ P valeur du test Newman et Keuls pour l'analyse de variance.

Tableau XI. Analyse de la variance du taux moyen de croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* sur PDA

Source	F de Fisher	Pr > F
Origine	0,677	0,411
Température	273,877	< 0,0001
Origine*Température	0,678	0,566

Les pourcentages moyens de germination des spores des souches de *B. cinerea* sélectionnées sont illustrés dans la figure 15. Le taux de germination maximal est enregistré à 21°C et il diminue avec l'augmentation de la température. Les températures 31°C et 32°C, sont considérées comme des températures supérieures limites de germination. La germination à 31°C est significativement réduite et aucune spore n'a germé à 32°C.

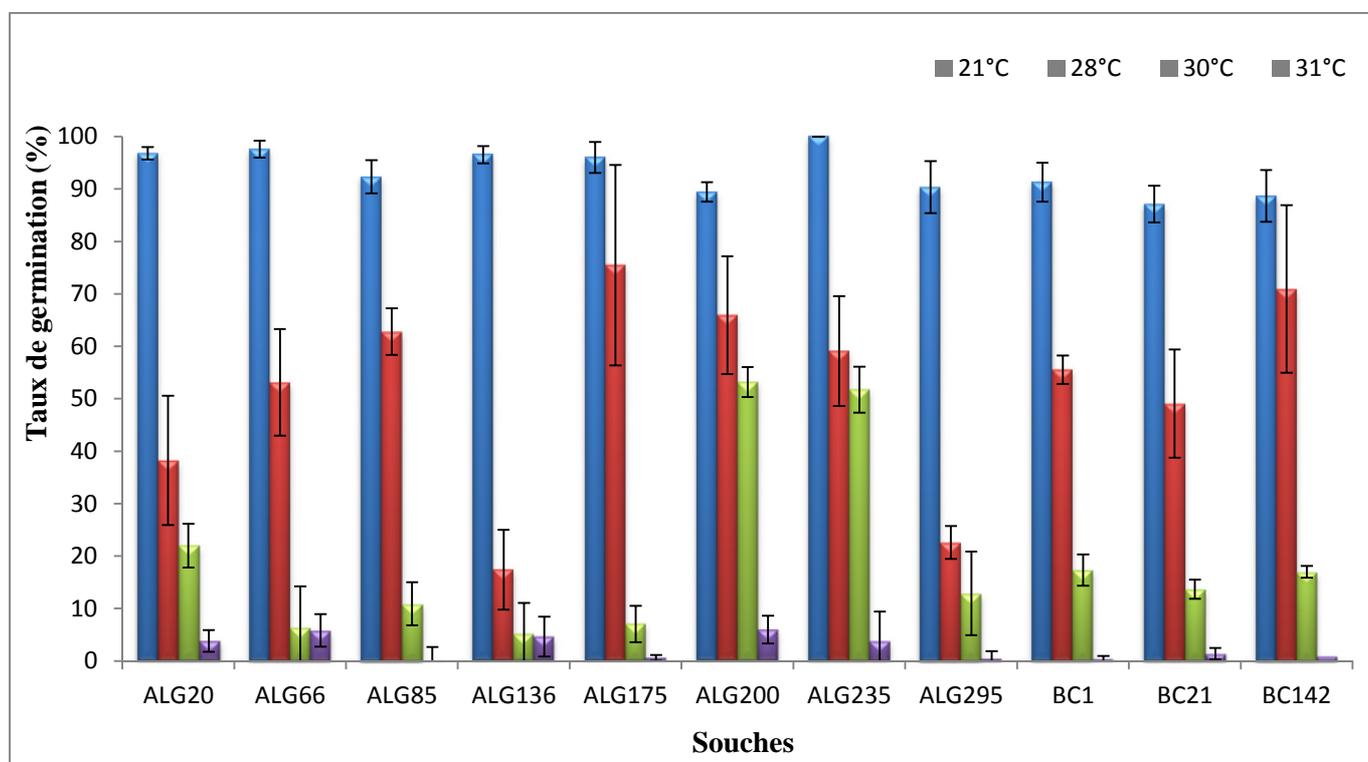


Figure 15. Taux de germination des spores de *B. cinerea* à différentes températures.

Les barres verticales (I) représentent l'erreur standard de trois répétitions.

L'analyse statistique des résultats de germination montre une grande variabilité entre les souches testées ($P < 0,0001$) (Tableau XII).

Tableau XII. Pourcentage de germination des spores des souches de *B. cinerea* à différentes températures.

Souche	21°C	28°C	30°C	31°C
ALG 20	96,8 ¹ abc ²	38,2 d	22,0 b	3,8 a
ALG66	97,6 ab	53,1 bcd	6,4 de	5,8 a
ALG85	92,3 bcd	62,8 abc	10,9 cde	4,7 a
ALG136	96,5 abc	17,4 e	5,1 e	4,6 a
ALG175	96,0 abc	75,5 a	7,0 de	0,6 a
ALG200	89,5 d	66,0 abc	53,2 a	6,0 a
ALG235	100,0 a	59,1 abc	51,7 a	3,8 a
ALG295	90,4 d	12,9 e	12,9 cde	0,6 a
BC1	91,3 cd	55,5 abcd	17,3 bc	0,4 a
BC21	87,1 d	49,1 cd	13,7 cd	1,4 a
BC142	88,7 d	70,9 ab	17,0 bc	1,0 a
<i>P</i> valeur³	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

¹ Chaque valeur représente le taux moyen (3 répétitions) de la croissance mycélienne des souches de *Botrytis cinerea* à différentes températures.

² Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Newman et Keuls.

³ *P* valeur du test Newman et Keuls pour l'analyse de variance.

A 21°C, le taux de germination des spores de toutes les souches de *B. cinerea* étudiées était supérieur à 85%. Les spores de la souche ALG235 germent à 100%. Tandis que les souches ALG295 ; ALG200 ; BC142 et BC21 montrent les taux de germination les plus faibles (90,4%, 89,5%, 88,7% et 87,1%).

A 28°C, les taux moyens de germination des spores sont affectés par l'élévation de la température notamment pour les souches ALG136 et ALG295 qui présentent des taux de germination inférieurs à 20%.

A 30°C, la germination diminue pour toutes les souches avec des taux de germination inférieurs à 30% à l'exception des souches ALG200 et ALG235 qui présentent les taux de germination les plus élevés (53,2% et 51,7%). La souche ALG136 présente le pourcentage de germination le plus faible (5,1%).

A 31°C, les pourcentages de la germination sont très faibles (< 6%) et pour certaines souches telles que ALG85, ALG175, ALG295, BC1, BC21 et BC142, la germination est

presque nulle (<1%). Le test statistique de Newman et keuls ne détecte aucune différence significative entre les souches à 31°C (Tableau XII).

En résumé, à 21°C, la vitesse de croissance mycélienne et le taux de germination ont été maximal, ce qui signifie que cette température (21°C) est optimale pour le développement de *B. cinerea*. Les températures 28°C, 30°C, 31°C, et 32°C n'ont pas le même effet sur la croissance mycélienne et la germination. Le développement de ce champignon est ralenti à des températures élevées et il y'a une inhibition de la croissance mycélienne à 30°C et de la germination des spores à 32°C.

Plusieurs études antérieures ont évalué l'impact de la température sur le développement de *B. cinerea* et confirment les résultats obtenus dans cette étude. En effet, Boneche et Pucheu (1986) ont étudié l'effet de la température sur la croissance de *B. cinerea* sur un milieu gélosé. Entre 5°C et 22°C, la vitesse de croissance de *B. cinerea* augmente avec la température. Au dessus de 25°C, le développement du champignon est ralenti et il y a très rapidement inhibition totale. Il n'a pas été possible d'obtenir la germination des conidies pour des températures supérieures à 35°C.

A des températures favorables (15 °C, optimale 20 et 25 °C), les souches ont montré des différences significatives du taux de croissance du mycélium. À des températures limites inférieure et supérieure (5 et 28 °C), le taux de croissance du mycélium de *B. cinerea* est significativement affecté. Les différences entre les souches ne sont significatives qu'à 20 °C, mais pas aux deux températures limites (Martinez *et al.*, 2003).

La germination de conidies est supposée être entre 5 °C et 30 °C. Salinas *et al.* (1989) ont montré que la germination de conidies et la formation de lésions nécrotiques sur des fleurs de Gerbera sont observées à une gamme de températures comprises entre 4°C et 25°C avec un optimum allant de 18°C à 25°C.

Conclusion
et
Perspectives

La pourriture grise est une maladie cryptogamique causée par *Botrytis cinerea*. Cette pathologie est l'une des principales maladies aériennes fongiques de diverses cultures d'importance agronomique. La haute capacité d'adaptation (diversité phénotypique et génotypique) de ce champignon est l'objet des travaux actuels sur *Botrytis cinerea*. Cette capacité d'adaptation limite les méthodes de lutte entreprises. Les mutations dues aux traitements chimiques sont confirmées, mais la diversité des souches a d'autres origines : reproduction sexuée (jamais observée sur le terrain), les facteurs environnementaux (température,...) et ainsi qu'à d'autres contraintes. Les travaux de recherche actuels visent à comprendre la dynamique des populations dans le monde.

C'est dans ce cadre que s'est inscrite notre étude sur la caractérisation phénotypique (morphotype, agressivité et impact de la température) de neuf souches de *B. cinerea* d'origine Algériennes et de trois souches d'origine Européenne, issues de la collection de laboratoire de Mycologie Université de A/ MIRA de Béjaia et l'Unité de phytopathologie (INRA Avignon France).

L'étude phénotypique basée sur le morphotype a montré une grande variabilité entre les souches. Deux principaux morphotypes sont identifiés : un type mycélien et un type sclérotien. Notant une prédominance de type sclérotien pour les souches Algériennes à l'exception de la souche ALG175 qui est de type mycélien. Quant aux souches Européennes, la BC1 et BC21 sont de type mycélien et BC142 est de type sclérotien.

En deuxième lieu, le test d'agressivité effectué sur des folioles de tomate nous a permis de mettre en évidence une grande diversité du niveau d'agressivité des souches de *B. cinerea* étudiées. Les souches algériennes ont été plus agressives que les souches Européennes testées. Les souches ALG66, ALG85 et ALG235 avec des AUDPC respectivement 42347, 40588 et 39387 sont plus agressives que BC1 (souche de référence) dont l'AUDPC est de 28002. La souche ALG295 est la souche la moins agressive des souches algériennes testées avec une AUDPC de 19855. Cependant la souche BC21 reste la moins agressive de l'ensemble des souches étudiées.

L'étude de l'effet de la température sur le développement de souches de *B. cinerea* (croissance mycélienne et germination des spores) *in vitro* a constitué le troisième niveau de

caractérisation de notre étude. Les températures testées sur la croissance mycélienne étaient 21°C, 28°C et 30°C. Les vitesses moyennes de croissance varient considérablement d'une température à l'autre : entre 32 et 36 mm/j à 21°C, entre 12 et 22 mm/j à 28°C et entre 1,5 et 11,8 mm/j à 30°C. A 21°C, la comparaison des vitesses moyennes de la croissance des différentes souches révèle que la souche ALG136 montre la vitesse la plus grande (36 mm/j) et la vitesse de croissance la plus faible est montrée par la souche BC142 (32,2 mm/j). À 28°C, uniquement la souche ALG66 montre la vitesse moyenne de croissance la plus faible (12 mm/j). A 30°C, les vitesses moyennes de croissance mycélienne sont significativement réduites. La souche ALG66 présente également le taux de croissance le plus faible (0,7 mm/j).

La germination des spores des souches de *B. cinerea* testées est déterminée à 21°C, 28°C, 30°C, 31°C et 32°C. A 21°C, le taux de germination des spores de toutes les souches de *B. cinerea* étudiées était maximal (>85%). A 28°C, les taux moyens de germination des spores sont affectés par l'élévation de la température notamment pour les souches ALG136 et ALG295 qui présentent des taux de germination inférieurs à 20%. A 30°C, la germination diminue pour toutes les souches avec des taux de germination inférieurs à 30% à l'exception des souches ALG200 et ALG235 (53,2% et 51,7%). La souche ALG136 présente le pourcentage de germination le plus faible (5,1%). La germination à 31°C est significativement réduite (< 6%) et aucune spore n'a germé à 32°C.

Les résultats obtenus dans le test d'agressivité et ceux obtenus dans le test de l'effet de la température montrent que la souche ALG66 présente d'une part un pouvoir d'agressivité le plus élevé et d'autre part une sensibilité à l'augmentation de température.

L'hypothèse que nous avons approché sous l'angle de la température et de l'agressivité nous a permis de dresser un profil partiel des souches Algériennes, l'étude comparative (comparaison selon le site géographique) nous donne une indication partielle sur la dynamique des populations d'une région à une autre. Cependant, ces résultats ne sont que la première étape et méritera d'être poursuivis pour affiner la réponse aux hypothèses posées dans notre problématique :

1. Elargir l'échantillon afin de confirmer les résultats obtenus et de les généraliser dans le but de comprendre la biologie de ce champignon et par conséquent pouvoir le lutter efficacement.

2. Réaliser des tests de température *in vivo* pour déterminer la réaction de la plante à ce champignon à différentes températures.
3. Réaliser le test d'agressivité *in planta* afin de pouvoir évaluer l'agressivité de ce pathogène dans des conditions contrôlées.
4. Réaliser des études sur le terrain dans le but de déterminer l'impact des pratiques culturales (irrigation, lutte par des fongicides, système d'aération dans les serres,...) sur la variabilité de ce champignon.
5. Essayer de comprendre comment ce champignon se conserve durant les périodes où les cultures sont inexistantes ou pendant les périodes de l'hiver. Y'a-t-il reproduction sexuée sur des plantes hôtes intermédiaires ?
6. Y'a-t-il des déplacements de populations au niveau du bassin méditerranéen avec les vents ? Tunisie, Maroc, Algérie, Espagne, France.... Et qui pourrai expliquer la grande variabilité ?

*Références
bibliographiques*

- Agrios G. N. 2005.** Plant pathology. Ed. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, 922 p.
- Aissat K., Nicot P. C., Guechi A., Bardin M. et Chibane M. 2008.** Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agronomy for Sustainable Development*. **28**, 403–409.
- Ajouz S., Walker AS., Fabre P., Leroux P., Nicot PC. et Bardin M. 2011.** Variability of *Botrytis cinerea* sensitivity to pyrrolnitrin, an antibiotic produced by biological control agents. *BioControl*. **56**, 353-363.
- Beever R. et Weeds P. 2007.** Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*, 29-52, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 402 p.
- Benito E. P., Arranz M. et Eslava A. P. 2000.** Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*. **17**, S43-S46.
- Blancard D., Laterrot H., Marchoux G. et Cettesse T. 2009.** Les maladies de la tomate, identifier, connaitre maitriser. Ed. Quae, Paris, 691p.
- Boneche B. et Pucheu B. 1986.** Influence de divers effecteurs sur le développement de *Botrytis cinerea* en milieu synthétique : difinition d'un cycle conidien. *Vitis*. **25**, 21- 30.
- Carlen C., Faby R., Karjalainen R., Pommier J. J. et Steffek R. 2003.** Control of air borne diseases in strawberries with natural and synthetic elicitors. *ActaHorticulturae*. **649**, 237-240.
- Chardonnet C. O., Sams C. E., Trigiano R. N. et Conway W. S. 2000.** Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology*. **90**, 769-774.
- Decognet V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y. et Nicot, P. C. 2009.** Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology*. **99**, 185-193.
- Deguine J. P. et Ferron P. 2004.** Protection des cultures et développement durable : bilan et perspectives. *Courrier de l'environnement de l'INRA*. **52**, 57-65.

- Dik A. J. et Wubben J. P. 2007.** Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. 319-333 in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 402 p.
- Dubos B. 2002.** Maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Ed. Féret, 207p.
- Eden M.A., Hill R.A. et Stewart A. 1996.** Biological control of *Botrytis* stem infection of green house tomatoes. *Plant Pathology*. 45, 276-284.
- Edwards S. G. et Seddon B. 1992.** *Bacillus brevis* a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected chinese cabbage, 267-271, in: *Recent advances in Botrytis research*. K. Verhoeff, N. E. Malathrakis and B. Williamson, eds. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Elad Y. et Stewart A. 2007.** Microbial control of *Botrytis* spp, p. 223-241, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 402 p.
- Elad Y. et Younis H. 1993.** Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica*. 21, 257-268.
- Elmer P. A. G. et Reglinski T. 2006.** Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*. 55, 155-177.
- Ferron P. 1999.** Protection intégrée des cultures: évolution du concept et de son application. *Cahier agricultures*. 8, 389-396.
- Fournier E. et Giraud T. 2008.** Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology*. 21, 122-132.
- Giraud T., Fortini D., Levis C., Leroux P. et Brygoo Y. 1997.** RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular and Biological Evolution*. 14, 1177- 1185.
- Hensen M. I., Ahmed A. U. et Islam M. R. 2010.** Physiological variability and *in vitro* antifungal activity against *Botrytis cinerea* causing *Botrytis* gray mold of chickpea (*L. Cicerarietinum*). *Spanish Journal of Agricultural Research*. 8 (3), 750-756

- Hmouni A., Oihabi L., Badoc A. et Douira A. 2003.** Étude de la résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles, dicarboximides et dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région du Gharb (Maroc). Bulletin - Société de Pharmacie de Bordeaux. **142**, 79-100.
- Hofflet E., van Beusichem M.L. et Jeger M. J. 1999.** Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. Plant and Soil. **210**, 263–272.
- Holz G., Coertze S. et Williamson B. 2007.** The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. 9–27., in : *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 402 p.
- Jarvis W. R. 1977.** *Botryotinia and Botrytis* species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity, A guide to the Literature. Monograph No. 15, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada. in Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. Journal of Agricultural Technology. Mirzaei S., Goltapeh E.M. and Shams-bakhsh M. 2007. **3** (1), 65-76.
- Jeandet P., Adrian M., Breuil A. C., Sbaghi M., Debord S., Bessis R., Weston L. A. et Harmon R. 2000.** Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: 189 application to the control of grey mould in the vineyard. ActaHorticulturae. **528**, 591-596.
- Karchani-Balma S., Gautier A., Raies A. et Fournier E. 2008.** Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. Phytopathology. **98**, 1271-1279.
- Kretschmer M. et Hahn M. 2008.** Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. Journal of Plant Diseases and Protection, **115** (5), 214–219.
- Lahlali R., Serrhini M. N., Friel D. et Jijakli M. H. 2007.** Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. International Journal of Food Microbiology. **114**, 1–9.
- Latorre B.A., Rioja M.E. et Lillo C. 2002.** . Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. Ciencia e investigación agraria. **29** (3), 145-151.

- Lepoivre P. 2001.** Editorial: Les systèmes de production agricole et la protection des cultures à la croisée des chemins. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. **5** (4), 195-199.
- Leroux P., Chapelet F., Desbrosses D., Gredt M. 1999.** Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*. **18**, 687-697
- Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., et Chapelet F. 2002.** Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*. **58**, 876-888.
- Leroux P. 2007.** Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides, 195-222, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 402 p.
- Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B. et Fermaud M. 2003.** Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. **109**, 479-488.
- Masih E. I., Alie I. et Paul B. 2000.** Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. **189**, 233-237.
- Mertely J. C., Chetler C. K., Xiao C. L. et Legard D. E. 2000.** Comparison of sanitation and fungicides for management of *Botrytis* fruit rot of strawberry. *Plant disease*. **84**, 1197-1202.
- Mirzaei S., Goltapeh E.M. et Shams-bakhsh M. 2007.** Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology*. **3** (1), 65-76.
- Moorman G. W. et Lease R. J. 1992.** Benzimidazole and dicarboximide resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant Disease*. **76**, 477-480.
- Nicot P. C. 2008.** Protection intégrée des cultures maraîchères sous serre : expérience et atouts pour un contexte en évolution. *Cahiers Agricultures*. **17**(1), 45-49.

- Nicot P.C., Mermier M., Vaissière B. E. et Lagier J. 1996.** Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light absorbing polyethylene film. *Plant Disease*. **80**, 555-558.
- O'Neill T. M., Shtienberg D. et Elad Y. 1997.** Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. **81**, 36-40.
- Paul B. 1999.** *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. **181**(2), 277–280.
- Pitchay D. S., Frantz J. M., Locke J. C., Krause C. R. et Fernetz G. C. J. 2007.** Impact of applied nitrogen concentration on growth of *Elatior begonia* and New Guinea impatiens and susceptibility of begonia to *Botrytis cinerea*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **132**, 193-201.
- Poitout S. H. et Leclant F. 1986.** Progrès en protection des plantes cultivées et évolution sociale et industrielle aux XIX^e et XX^e. *Culture technique*. **16**, 160-175.
- Polach F. J. et Abawi G. S. 1975.** The occurrence and biology of *Botryotinia fuckeliana* on beans in New York. *Phytopathology*. **65**, 657-660.
- Raposo R., Gomez V., Urrutia T. et Melgarejo P. 2000.** Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology*. **90**, 1246-1249.
- Rosslénbroich H. J. et Stuebler D. 2000.** *Botrytis cinerea*: history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*. **19**, 557-561.
- Salinas J., Gletorf D. C. M., Picavet F. D. et Verhoeff K. 1989.** Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. **95**, 51-64
- Shen D., Li B., Li X., Song J., Shi Y., Wang H., Shen D., Li B.J., Li X. X., Song J. P., Shi Y. X., et Wang H. P. 2009.** Pathogenicity analysis of different *Botrytis cinerea* strains in cucumber. *China Vegetables*. 25-28.
- Shtienberg D., Elad Y., Ariela Niv, Nitzani Y. et Kirshner B. 1998.** Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology*. **104**: 753–763

- Staats M., van Baarlen P. et van Kan J. A. 2005.** Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*. **22**, 333-346.
- Thomas C. S., Marios J. J. et English J. T. 1988.** The effects of wind speed, temperature and relative humidity on development of aerial mycelium and conidia of *Botrytis cinerea* on grape .*phytopathology*. **78**, 260-265.
- Tosi B., Donini A., Romagnoli C. et Bruni A. 1996.** Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy Research*. **10**, 335-336.
- Valiuskaite A., Surviliene E. et Baniulis D. 2010.** Genetic diversity and pathogenicity traits of *Botrytis spp.* isolated from horticultural hosts. *Zemdirbyste-Agriculture*. **97**, 85-90.
- Verhoeff K. 1968.** Studies on *Botrytis cinerea* in tomatoes. Effect of soil nitrogen level and of methods of defoliation upon the occurrence of *Borytis cinerea* under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*. **74**, 184-192.
- Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. et Valéro J. R. 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. **37**, 1–20
- Volpin H. et Elad Y. 1991.** Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to *Botrytis* blight. *Phytopathology*. **81**, 1390-1394.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. et vanKan J. A. L. 2007.** *Botrytis cinerea* : the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*. **8** (5), 561–580.
- Walter M., Zydenbos S. M., Jaspers M. V. et Stewart A. 2006.** Laboratory assays for selection of *Botrytis* suppressive micro-organisms on necrotic grape leaf discs. *New Zealand Plant Protection*. **59**, 348-354.
- Xiao C. L., Chetler C. K., Price J. F., Duval J. R., Mertely J. C. et Legard D. E. 2001.** Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Disease*. **85**, 901-909.
- Yourman L. F., Jeffers S. N. et Dean R. A. 2001.** Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology*. **91**, 307-315.

Annexes

Annexe 1. Milieux de culture et tampons

Milieu PDA

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	20g
Agar	15g
Eau distillée	1l
pH.....	5,4±0,2
Autoclavage.....	120°C/20min

Gélose à extrait de malt

Extrait de malt	30g
Peptone mycologique	05g
Agar agar	15g
Eau distillée	1l
pH.....	5,40 ±0,2

Gélose blanche

Agar	15g
Eau distillé.....	1l
pH.....	7±0,2
Autoclavage.....	120°C/20min

Milieu GA (Glucose Agar)

Agar	10g
Glucose.....	10g

Eau distillée1l

pH7±0,2

Autoclavage 115°C/10min

Tampon phosphate glycérol à 20%

Tampon phosphate80 ml

Glycérol pur.....20 ml

Autoclavage..... 121°C/20 min

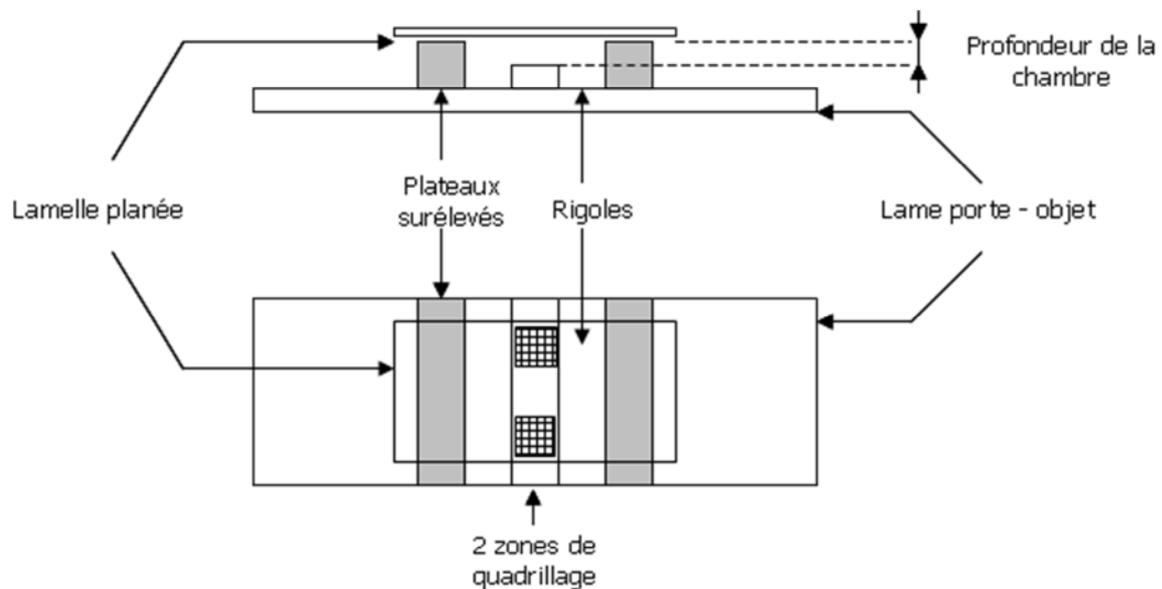
Annexe 2. Cellule de Malassez

Description de la cellule de Malassez

La cellule de numération est une lame épaisse en verre dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. Elle comporte des rigoles et deux zones de quadrillage:



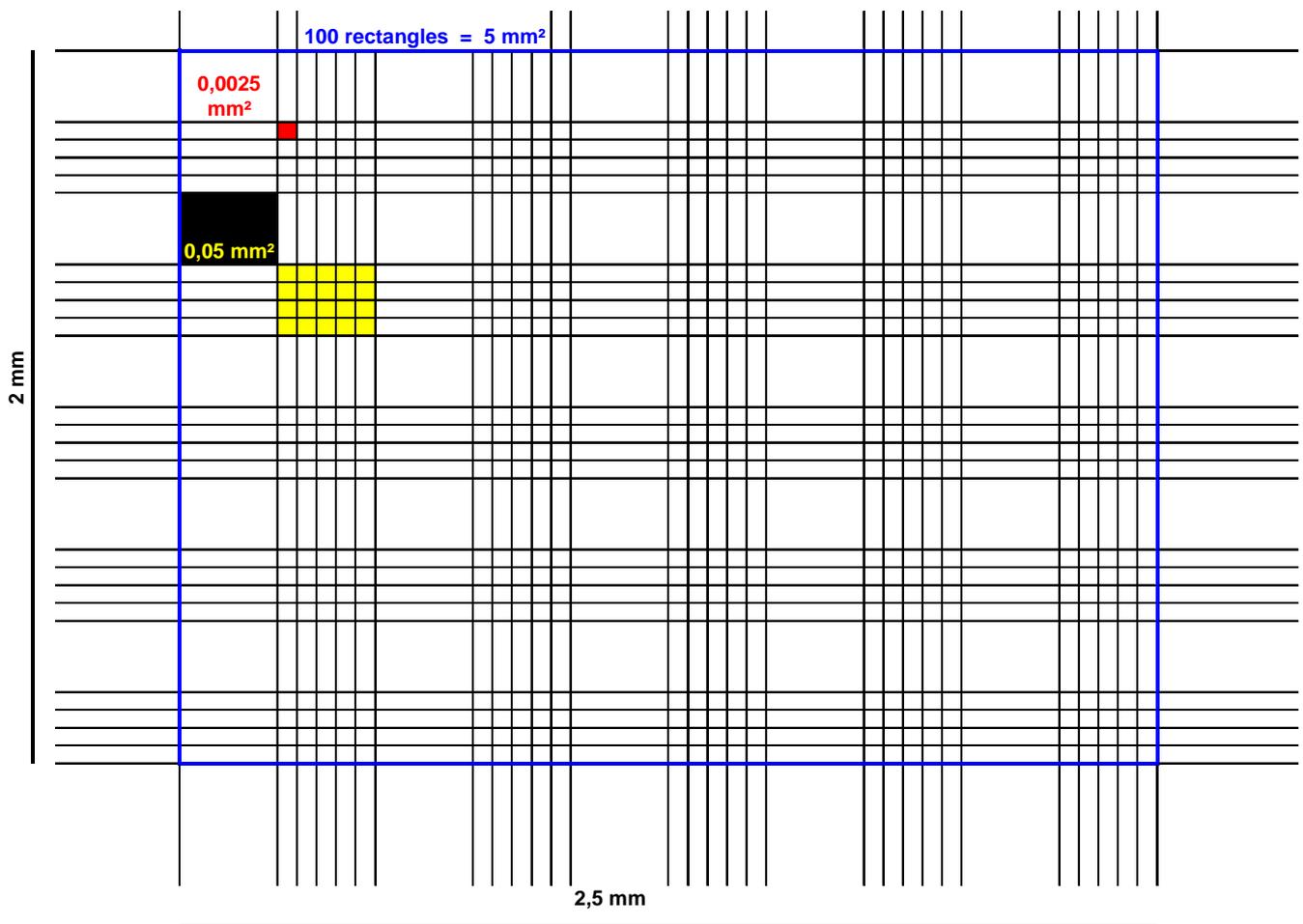
Plate-forme centrale



Le volume de comptage est déterminé par :

- la surface du quadrillage gravé sur la lame
- la profondeur de la chambre (0,200 mm)

Les deux zones quadrillées comportent chacune 100 rectangles :



Parmi ces 100 rectangles, 25 sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

- Le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l} = 10^{-3} \text{ ml}$.
- Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-5} \text{ ml}$.

Dilution préalable de la suspension

Lorsque la suspension est trop concentrée, il est difficile de compter les spores sur la cellule de Malassez. Il est donc nécessaire de réaliser une dilution préalable.

Remplissage de la cellule

- Humectation les deux plateaux latéraux.

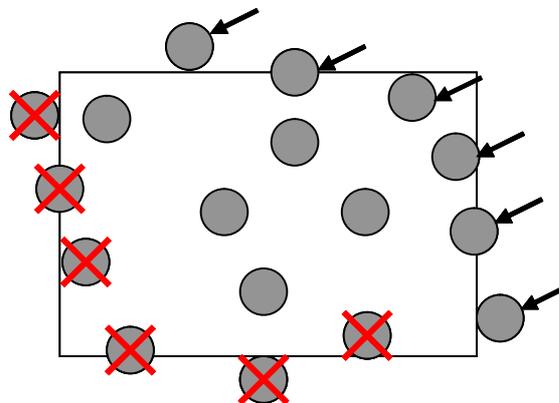
- Adhésion de la lamelle aux plateaux latéraux
- Homogénéisation de la suspension cellulaire, et prélèvement de 17µl de cette suspension à l'aide d'une micropipette.
- Remplissage de chacune des deux chambres de comptage par capillarité en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée.
- Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles.
- Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

Comptage des spores

- Observation à l'objectif **X10** pour repérer la position du quadrillage, et vérification de l'homogénéité de la répartition des spores à compter.
- Réalisation du comptage à l'objectif **X10** dans 5 rectangles ou carrés selon une ligne diagonale de quadrillage.

Remarque

- Pour les spores chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules touchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).
- Le dénombrement doit être réalisé sur les deux zones de quadrillage de la cellule.



Calcul de la concentration

Exemple : numération sur le rectangle = 11 spores

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration C de la suspension.

$$C = N / V$$

$$\text{Si la suspension avait été diluée: } C = (N / V) \cdot f$$

- Avec :
- N : nombre total de spores comptées
 - V : volume total de comptage (en ml)
 - f : facteur de dilution
 - C : concentration de la suspension en nombre de spores par ml

En pratique

Si le comptage a été réalisé sur n rectangles ou carrées, la concentration C est égale à:

Petits carrés	$(N / \text{nombre de carrés comptés}) \cdot 20 \cdot 10^5 \text{ spores / ml}$
Petits rectangles horizontaux	$(N / \text{nombre de rectangles comptés}) \cdot 4 \cdot 10^5 \text{ spores / ml}$
Petits rectangles verticaux	$(N / \text{nombre de rectangles comptés}) \cdot 5 \cdot 10^5 \text{ spores / ml}$
Grands rectangles	$(N / \text{nombre de rectangles comptés}) \cdot 10^5 \text{ spores / ml}$

Si la suspension avait été diluée, on multiplie la concentration obtenue fois l'inverse de la dilution effectuée.

Annexe 3. Résultats de test d'agressivité.

Tableau. Evolution des surfaces des lésions, en mm², causées par les différentes souches de *B. cinerea* sur folioles de tomates

Isolats	0h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	96h
ALG20	0	26	208	305	368	439	678	710
ALG34	0	26	219	275	435	407	498	649
ALG136	0	50	154	348	427	548	690	725
ALG 175	0	50	159	227	377	603	906	989
ALG85	0	47	176	376	517	699	980	975
ALG66	0	40	191	375	580	750	1041	1103
ALG235	0	50	177	337	683	701	926	1017
ALG295	0	18	87	202	307	318	465	517
ALG200	0	19	137	293	465	417	646	696
BC1	0	41	142	285	311	457	722	753
BC142	0	60	136	320	473	553	777	1002
BC21	0	12	38	54	104	103	112	152

Annexe 4. Résultats de test de l'effet de température sur le développement de *B. cinerea*

Tableau I. Diamètres moyennes, en mm, de croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* testées à différentes températures.

T°C	Souches	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7	mm/j
21°C	ALG20	17,00	49,67	80,17	85,00	85,00	85,00	85,00	32,67
	ALG34	11,33	45,00	79,00	85,00	85,00	85,00	85,00	33,67
	ALG66	17,17	51,33	80,67	85,00	85,00	85,00	85,00	34,17
	ALG85	17,00	50,67	81,17	85,00	85,00	85,00	85,00	33,67
	ALG136	16,00	52,00	81,50	85,00	85,00	85,00	85,00	36,00
	ALG175	16,50	49,67	79,67	85,00	85,00	85,00	85,00	33,17
	ALG200	23,50	58,67	82,83	85,00	85,00	85,00	85,00	35,17
	ALG235	15,67	50,17	85,00	85,00	85,00	85,00	85,00	34,50
	ALG295	23,50	59,00	81,17	85,00	85,00	85,00	85,00	35,50
	BC1	19,67	54,33	82,33	85,00	85,00	85,00	85,00	34,67
	BC142	16,17	48,33	77,50	85,00	85,00	85,00	85,00	32,17
BC21	14,50	48,50	79,83	85,00	85,00	85,00	85,00	34,00	
28°C	ALG20	17,17	41,17	63,83	81,00	85,00	85,00	85,00	21,3
	ALG34	12,33	35,50	60,00	78,33	85,00	85,00	85,00	20,6
	ALG66	16,00	39,00	60,50	74,17	80,17	82,00	85,00	12,0
	ALG85	15,33	41,17	63,83	79,83	85,00	85,00	85,00	21,5
	ALG136	16,00	38,83	58,33	77,33	85,00	85,00	85,00	20,4
	ALG175	14,67	38,83	61,83	80,33	85,00	85,00	85,00	21,9
	ALG200	16,33	39,83	57,33	76,00	85,00	85,00	85,00	19,9
	ALG235	16,33	39,33	60,33	79,00	85,00	85,00	85,00	20,9
	ALG295	16,33	40,17	60,67	78,17	84,50	85,00	85,00	20,6
	BC1	16,33	37,67	58,00	73,67	82,50	84,67	85,00	19,1
	BC142	15,83	39,83	61,00	78,17	85,00	85,00	85,00	20,8
BC21	15,83	38,67	58,00	76,67	85,00	85,00	85,00	20,3	
30°C	ALG20	9,83	16,17	23,17	23,17	23,17	/	/	6,7
	ALG34	5,67	10,50	18,00	18,00	18,00	/	/	6,2
	ALG66	5,00	6,33	6,33	6,33	6,33	/	/	0,7
	ALG85	8,33	15,17	22,00	22,00	22,00	/	/	6,8
	ALG136	6,67	7,83	11,33	11,33	11,33	/	/	2,3
	ALG175	7,33	8,33	12,50	12,50	12,50	/	/	2,6
	ALG200	7,00	17,50	29,83	29,83	29,83	/	/	11,4
	ALG235	11,50	23,83	34,50	34,50	34,50	/	/	11,5
	ALG295	7,83	18,00	31,33	31,33	31,33	/	/	11,8
	BC1	8,33	19,17	31,33	31,33	31,33	/	/	11,5
	BC142	5,67	7,00	16,33	16,33	16,33	/	/	5,3
BC21	8,67	18,50	30,00	30,00	30,00	/	/	10,7	

Résumé

La pourriture grise, causée par le champignon *Botrytis cinerea*, est l'une des principales maladies aériennes fongiques sur diverses cultures d'importance agronomique. La diversité phénotypique et génotypique de ce champignon fait que les méthodes de lutte entreprises restent limitées. L'objectif de ce travail est de comprendre la variabilité montrée par *B. cinerea* en étudiant les niveaux d'agressivité des souches sur folioles de tomate et l'effet de la température sur le développement de ce pathogène. Cette étude a intégré une dimension comparative géographique entre des souches Algériennes, Françaises et Norvégienne. Le test d'agressivité révèle une grande hétérogénéité entre les souches testées. Les souches Algériennes sont plus agressives que les souches Européenne testées avec des AUDPC respectives 32174 et 22610. L'analyse statistique a montré que les souches ALG66 et BC21 ont été respectivement la plus agressive et la moins agressive avec des AUDPC de 42347 pour la ALG66 et 5992 pour la BC21. Le test de température a montré qu'à 21°C, la vitesse de croissance mycélienne et le taux de germination ont été maximal pour toutes les souches avec des vitesses moyennes de 34 mm/j et des taux moyens de germination >85%. Les températures 28°C, 30°C, 31°C, et 32°C n'ont pas le même effet sur la croissance mycélienne et la germination. Le développement de ce champignon a été significativement affecté à des températures élevées et il y'a une inhibition de la croissance mycélienne à 30°C et de la germination des spores à 32°C.

Mots clés : *Botrytis cinerea*, tomate, croissance mycélienne, germination, morphotype, température, agressivité.

Abstract

Gray mould, caused by *Botrytis cinerea*, is a severe disease on a wide range of crops. Phenotypic and genotypic diversity of this fungus limited the control methods. The objective of this research is to understand the variability shown by *B. cinerea*, studying the levels of aggressiveness strains on tomato leaflets and the effect of temperature on the development of this pathogen. This study integrated a comparative dimension geographical between Algerian, French and Norwegian strains. The aggressiveness test reveals a great heterogeneity among the strains tested. Algerian strains are more aggressive than European strains tested with AUDPC 32174 and 22610 respectively, the statistical analysis showed that the strains ALG 66 and 21 BC were respectively the most aggressive and less aggressive with AUDPC 42347 for ALG66 and 5992 for BC21. The test showed that the temperature 21°C, the rate of mycelial growth and spore germination rate were maximal for all strains with average speeds of 34 mm / day, and average rates of germination > 85%. Temperature 28°C, 30°C, 31°C and 32°C does not have the same effect on mycelial growth and spore germination. The development of this fungus was significantly affected at high temperatures and there's an inhibition of mycelial growth at 30°C and spore germination at 32°C.

Keywords : *Botrytis cinerea*, tomato, mycelial growth, germination, morphotype, temperature, aggressiveness.

الملخص

العفن الرمادي، الناجمة عن الفطريات بترينس سنريه *Botrytis cinerea* هي من أهم الأمراض الفطرية ذات الأهمية الزراعية. التنوع الفينوتيبي والوراثي جعل طرق كفاح هذا الفطر محدودة. والهدف من هذا العمل هو فهم اختلافات التي يبديه بترينس سنريه بدراسة مستويات عدوانية لسلاسل على وريقات الطماطم و اثر درجة الحرارة على تنميته. هذه الدراسة ذات البعد المقارن بين سلالات الجزائرية الاصل، الفرنسية الاصل والنرويجية. اختبار الكشف عن عدوانية الفطر يظهر ان السلالات الجزائرية اكثر عدوانية من السلالات الاوروبية. التحليل الاحصائي اظهر ان ALG66 اكثر عدوانية و BC 21 اقل عدوانية. و اظهر اختبار درجات الحرارة ان 21 درجة مئوية، سرعة النمو قصوى بمعدل 34مم/يوم. درجة حرارة 28°م، 30°م، 31°م، 32°م لا يكون له نفس التأثير على النمو والانبات الفطوري. وقد تأثر بشكل كبير في تطوير هذه الفطريات في درجات حرارة عالية، حيث تثبيط نمو فطر عند 30°م وانبات الجراثيم عند 32°م

كلمات مفتاحية: *Botrytis cinerea*، الطماطم، النمو أفطوري، الإنبات، نمط شكلي، ودرجة الحرارة