

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Ecologie Microbienne



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Isolement et caractérisation des souches de *Botrytis cinerea* sur le vignoble dans la région de Bejaïa

Présenté par :
Khelifa Katia
Soutenu le : **19 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mr. Belhadi Djellali	MAA	Président
Mr. Adjebli Ahmed	MCB	Encadreur
Mr. Ramdani Nacer	MAA	Examineur

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

En premier lieu je remercie le bon Dieu pour sa Bienveillance.

Je tien à exprimer mes profonds respects et remerciement à mon promoteur Mr. Adjebli A d'avoir accepté de me encadrer et pour ces précieux conseils, son aide, et ses orientations.

Je tien à remercie également Mr. Belhadi D d'avoir fait l'honneur de juger ce travail et de présider le jury.

Je tien à remercie aussi Mr. Ramdani N d'avoir accepté de donner de leur temps pour examiner ce travail.

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

Et je vous souhaite une bonne réussite dans vos projets.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A la mémoire de mes grands parents paternels
et maternels, que dieu garde leurs âmes dans
son vaste paradis*

- ❖ *A mes chers parents*
- ❖ *frères et sœurs*
- ❖ *A mes belles sœurs*
- ❖ *A mon mari*
- ❖ *Ma belle famille*
- ❖ *A tous mes amis*

katia

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I. *B. cinerea* agent causale de la pourriture grise.....3

I.1. Position taxonomique.....3

I.2. Gamme hôte.....3

I.3. Importance économique de la maladie.....4

II. Cycle biologique de *B. cinerea*4

II.1. Facteurs influençant le développement de *B. cinerea*6

II.2. Dissémination.....6

II.3. Conservation.....7

III. Diversité de *B. cinerea*.....7

III.1. Diversité phénotypique.....8

III.2. Diversité génotypique.....9

IV. La pourriture grise sur le vignoble..... 10

IV.1. symptômes de la pourriture grise sur vigne..... 10

V. Moyens de lutte 10

V.1. lutte chimique..... 11

V.2. lutte culturale 11

V.3. lutte biologique..... 12

Matériel et méthodes

I. purification des isolats par l'isolement monospore..... 13

I.1. Matériels biologique.....	13
I.2. Caractérisation morphologiques	15
I.3. Conservation des isolats	16
II. Test d'agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> sur les feuilles de vigne.....	17
II.1.Choix des isolats	17
II.2. préparation des prés cultures	17
III. Analyse des données.....	19

Résultats et Discussion

I. Résultats de caractérisation morphologique des isolats de <i>B. cinerea</i>	20
II. Résultats de test d'agressivité sur les feuilles de vigne.....	23
Conclusion et Perspectives.....	26

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des tableaux

Tableau I : Classification de <i>B. cinerea</i> selon le mode de reproduction.....	3
Tableau II : Classification morphologique de <i>B. cinerea</i> sur milieu Malt-Agar.....	16
Tableau III : Caractéristiques des isolats de <i>B. cinerea</i> sélectionnées.....	17
Tableau IV : Caractérisation Morphologique des isolats de <i>B. cinerea</i> sur le milieu PDA.....	21

Liste des figures

Figure 01: Symptômes de la pourriture grise causée par <i>B. cinerea</i> sur différents hôtes.....	4
Figure 02: Cycle de développement de <i>B. cinerea</i>	5
Figure03: Spores de <i>B. cinerea</i> produites sur boîte de pétri après 14 jours de culture sur un milieu PDA à 21 °C en présence de lumière.....	6
Figure 04: Symptômes de la pourriture grise sur différents parties de la vigne.....	10
Figure 05: Technique d'échantillonnage des isolats fongiques.....	13
Figure 06: Ensemencement de milieu PDA par touche.....	14
Figure 07: Préparation des lames avec de l'agar blanche.....	14
Figure 08: Les différentes étapes de purification des isolats de <i>B. cinerea</i> par la technique d'isolement monospore.....	15
Figure 09: Repiquages des isolats de <i>B. cinerea</i> sur milieu PDA.....	18
Figure 10: Etapes du Teste d'agressivité des souches de <i>B. cinerea</i> sur les feuilles de vigne.....	18
Figure 11: Distribution globale de la classification morphologique des isolats de <i>B. cinerea</i>	21
Figure 12: Distribution des différents morphotypes Mycéliens.....	22
Figure 13: Distribution des différents morphotypes Sclérotien.....	22
Figure 14: les lésions causées par les isolats de <i>B. cinerea</i> à différents intervalles de temps.....	23
Figure15: Agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> sur feuille de vigne.....	24
Figure 16: Distribution de l'agressivité sur les feuilles de vigne selon le type morphologique.....	25

Introduction

La vigne (*Vitis vinifera*) est considérée comme l'une des cultures fruitières cultivée la plus importante au monde depuis l'antiquité (**Grimplet et al., 2014**). A l'échelle mondiale *Vitis vinifera* est l'espèce viticole la plus commune et la plus importante au niveau économique (**Galet, 1993**). Selon (**Attia, 2007**), le raisin produit à partir du genre *Vitis* est le fruit au premier rang parmi les productions fruitières dans le monde après l'orange, du point de vue de sa production ainsi que son importance économique. Cette espèce occupe la 14^{ème} culture au niveau mondiale (**Carrier, 2011**). D'après OIV (Organisation International de la Vigne et du Vin), en 2015 elle atteint une superficie de 7528 million hectare. L'Espagne possède la plus grande superficie viticole avec 1023 million d'hectares suivi par la France avec 793 million d'hectares. En terme de production totale de raisin estimée à 691million quintaux. Sa grande valeur se situe surtout au niveau de la production du vin du raisin commercialisé comme raisin de table ou transformé comme le jus de raisin.

La production viticole est concentrée en Europe et en Asie et représente presque les $\frac{3}{4}$ de la production mondiale. La chine occupe la première place suivie par l'Italie, les Etats – Unis d'Amérique puis l'Espagne en terme de production (**Faostat, 2013**). Cela témoigne de l'importance de cette culture pour ces deux régions dont la finalité est essentiellement la production du vin. Par contre la production africaine ne représente que 5,8% de la production mondiale avec l'Afrique du sud, l'Egypte, l'Algérie, le Maroc et la Tunisie comme les principaux producteurs. Ainsi en termes de production l'Algérie peut être classé comme le 3^{ème} producteur viticole en Afrique juste après la Tunisie (**Faostat, 2013**). Les raisins sont destinés à la fabrication du vin à partir de leur jus fermentés ou consommés directement comme fruit ou jus de raisin frais ou sec utilisé surtout en pâtisserie ou en cuisine.

De même que toute les autres plantes cultivées elle sujette de nombreux problèmes sanitaires, les parasites, les pathogènes ainsi que les conditions climatiques provoquant d'importantes pertes de récoltes au cours des années, les champignons sont les agents qui causent les plus important dégâts sur les vignes. Les maladies qu'ils provoquent sont très redoutées car ils peuvent s'attaquer à toutes les parties de la plante en occasionnant la diminution sensible de volume de récolte, ainsi que l'altération considérable de la qualité des produits (**Robert, 2007**).

Botrytis cinerea Pers. :Fr. (télémorphe *Botryotinia fuckliana* (de Bary Whetzel) est l'agent causal de la pourriture grise, l'une des maladies qui occasionne le plus de dommages sur la vigne et la récolte aussi bien au niveau quantitatif que qualitatif. Il est capable de se

Introduction

développer aussi bien en saprophyte sur des débris végétaux, qu'en parasite aux dépens d'une plante vivante. Celui-ci a été classé second parmi les 10 champignons phytopathogènes les plus importants scientifiquement et économiquement car elle détruit chaque année une partie des récoltes viticoles et horticoles (fraises, concombres, tomates, vigne...) (**Dean et al., 2012**). En effet, sur la vigne, les pertes de récolte engendrées par ce pathogène peuvent atteindre 40 % (**données 2006 ; <http://www.viniflor.fr>**).

De ce fait et dans le cadre de notre projet de recherche, nous nous sommes penchées sur les problèmes causés par les bio agresseurs de la vigne. Notre modèle d'étude *B. cinerea*, est l'un des champignons le plus répandus dans les cultures, est un agent responsable de la pourriture grise de la vigne. Le présent travail constitue une partie d'un projet de recherche sur les populations de *B. cinerea* est dans le but de vérifier les hypothèses suivantes:

Existe-t-il une variabilité morphotypique à l'intérieur des isolats de *B. cinerea* collectés dans le vignoble de la région de Bejaia ? Quels sont les morphotypes dominants ? Existe-il une relation entre le morphotype et l'agressivité de *B. cinerea* sur les feuilles de vigne?

Synthèse bibliographique

I. *B. cinerea* Agent de la pourriture grise:

I.1. Position taxonomique:

Le genre *Botrytis*, comprend 22 espèces dont la plupart ont un spectre d'hôtes restreint comme *B. tulipae* (tulipe), *B. fabae* (légumineuses) ou *B. squamosa* (oignons) (**Hennebert 1973**). Au contraire *B. cinerea* est ubiquiste et très polyphage sa classification est la suivante (tableau I).

Tableau I: Classification de *B. cinerea* selon le mode de reproduction (**Williamson et al., 2007**):

Forme	Sexuée (forme parfaite)	Asexuée (forme imparfaite)
Règne	Fungi	Fungi
Phylum	Ascomycète	Deutéromycète
Classe	Discomycète	Hyphomycète
Ordre	Léotiale	Monoliale
Famille	Sclérotiniaceae	Moniliaceae
Genre	<i>Botryotinia</i>	<i>Botrytis</i>
Espèce	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>

B. cinerea est considéré comme un complexe d'espèces sympatriques ou 2 groupes coexistant. Le groupe I est exclusivement de type *vacuma* et présentent une résistance naturelle au fongicides fenhexamid. Alors que ceux du groupe II peuvent être soit de type *transposa*, *Flipper* (possédant l'élément transposable *Flipper* uniquement), *Boty* (possédant l'élément *Boty* uniquement) ou *vacuma* (**Fournier et al., 2005; Ma and Michailides, 2005; Isenegger et al., 2008; Esterio et al., 2011**). Les isolats *transposa* ont des petites macro conidies, sont résistantes à vinclozoline et au diethofencarbe (**Giraud et al., 1999**), et présentent des taux de développement mycélien plus lent lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu riche en nutriments (**Martinez et al., 2003**).

I.2. Gamme hôte:

B. cinerea, est un champignon polyphage capable d'attaquer plus de 220 hôtes (**Walker et al., 2015**), souvent connu sous le nom de moisissure grise. Il peut survenir sur de nombreuses cultures d'importance économique : légumes (laitue), les plantes (rose), et fruits (vigne, fraise, kiwi, cerise) (**Fernández-Acero et al., 2011**) (**Figure 1**).



Figure I : Symptômes de la pourriture grise causée par *B. cinerea* sur différents hôtes (Agrios, 2005).

I.3. Importance économique de la maladie:

B. cinerea est l'agent responsable de la pourriture grise. Cet agent pathogène peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et dans certains cas de la récolte. Sur le plan économique, ce champignon est par exemple considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (Martinez et al., 2005). Les pertes mondiales sont estimées à 2 milliards \$ par an (Elmer and Michailides, 2004). En cultures sous abris, les risques d'attaque par ce champignon pathogène sont permanents sur par exemple, la tomate, le poivron, la laitue ou la fraise (Jarvis, 1992). Pour combattre la maladie, l'utilisation de fongicides entraîne des coûts financiers importants qui s'élèvent à 15-25 Millions de dollars par an (Elad and Stewart, 2004).

II. Cycle biologique de *B. cinerea* :

B. cinerea est un champignon à dissémination aérienne, les lésions présentes sur les tiges ou les feuilles des plantes témoignent de la présence du champignon. Pour la phase asexuée, les conidiophores grisâtres produisent des spores (conidies) par mitose lorsque les conditions sont favorables, les conidiophores libèrent les conidies dans l'air. Les courants d'air transportent ces conidies ainsi que des fractions de mycélium et les dispersent plus ou moins loin vers de nouveaux hôtes (petit, 2008). Dans la région d'Avignon, des études ont

Synthèse bibliographique

montré que des conidies de *B. cinerea* sont présente dans l'air tout ou long de l'année (Leyronas et Nicot, 2013). La libération des spores par les conidiophores est attribuée par une chute brutale d'humidité relative et une augmentation de la température (Davidson et Kryszynska-Kaczumorek, 2007) (Figure 02).

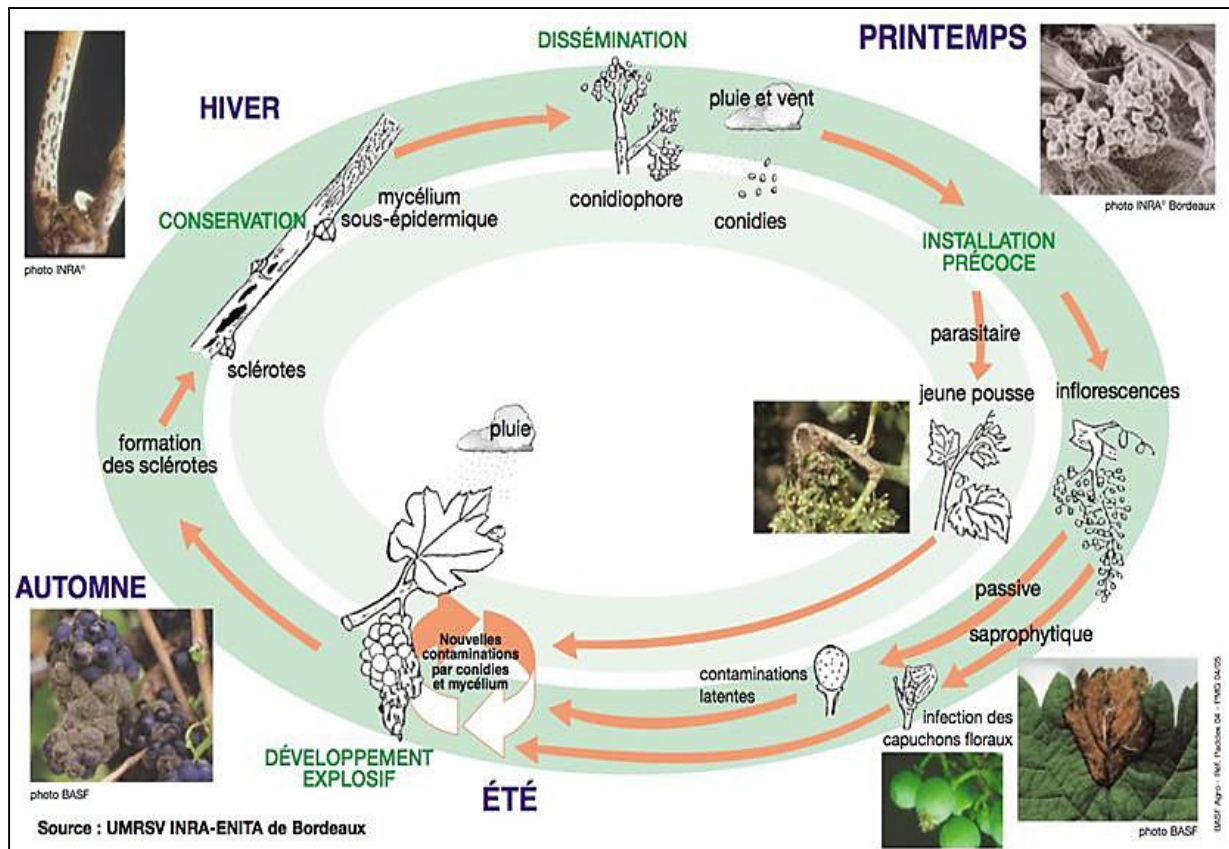


Figure 02: Cycle de développement de *B. cinerea* (Agrios, 2005).

Les conidies sont les principales sources de dissémination du champignon (Figure03). Une fois les conidies sont installées sur un tissu végétal blessé ou sénescant avec des conditions d'hygrométrie et de températures favorable, un mycélium cloisonné se développe et colonise les tissus. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des conidiophores et le cycle est relancé (Williamson et al., 2007).

Synthèse bibliographique

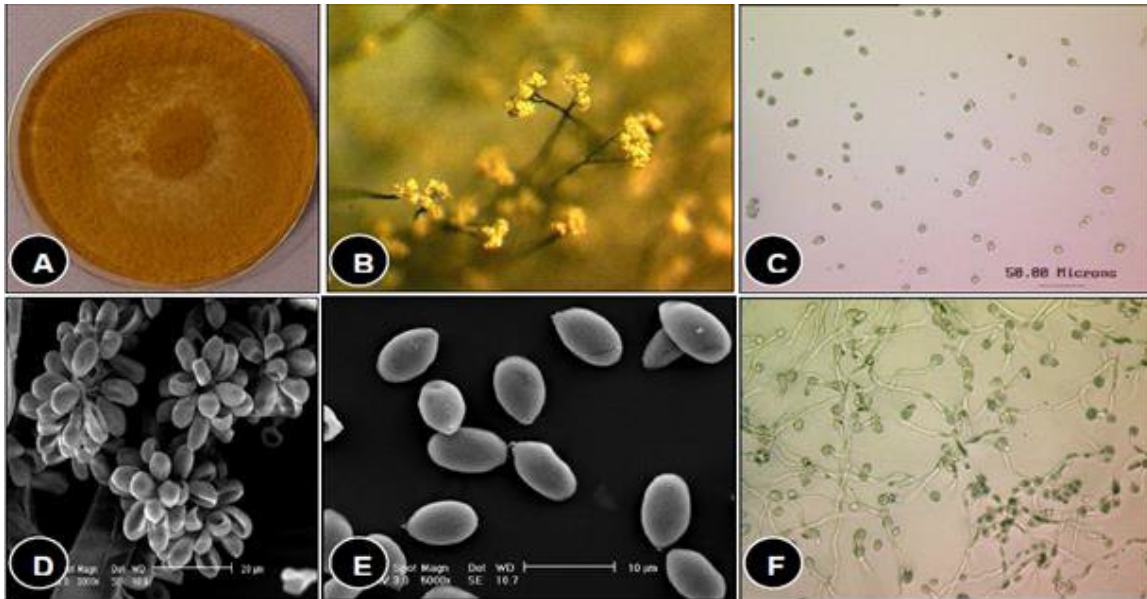


Figure 03 : Spores de *B. cinerea* produites sur boîte de pétri après 14 jours de culture sur un milieu PDA à 21 °C en présence de lumière. (A). Conidiphores observés en utilisant une loupe binoculaire (B) et un microscope électronique à balayage (D). Spores observées en microscopie optique (C) et en microscopie électronique à balayage (E). Observation de la germination des spores sur milieu riche PDA au microscope optique (F) (Abro, 2013).

II.1. Facteurs influençant le développement de *B. cinerea*:

- **Température:** *B. cinerea* exige pour son développement une température qui varie entre 18 et 25°C (Gomez, 2007).
- **Hygrométrie:** le développement du *B. cinerea* est favorisé par un taux d'humidité élevé (Hygrométrie atmosphérique de 80 à 90%) (Corbez, 1994).
- **Pollen:** L'ampleur de l'infection due au *B. cinerea*, peut être par la présence du pollen sur les feuilles des plantes (Corbaz, 1990).
- **lumière:** la lumière (l'intensité et la longueur d'onde) est un facteur important dans la protection des cultures sous serre. Selon Dik et Wubben, (2004) La lumière surtout UV, augmente la sporulation de *B. cinerea*.
- **Irrigation:** Le type d'irrigation peut également influencer sur le développement de la pourriture grise. Aissat et al., (2008), ont étudié l'effet de type d'irrigation sur le développement des maladies fongiques et les mauvaises herbes, ils ont constaté que les indicateurs de la pourriture grise (le degré de la sévérité et la mortalité des plantes) ont resté plus faible pour les serres irriguées par le système goutte à goutte par rapport au serre irriguées par sillon.

Synthèse bibliographique

II.2. Dissémination

La dispersion des spores de *B. cinerea* est assurée par plusieurs facteurs :

- **L'homme:** la dissémination par l'homme est généralement liée aux manques d'hygiène, par les outils ou par le manque de soin (**Agrios, 2005**).
- **La pluie:** Elle joue un rôle important dans la dissémination des spores. La chute d'une goutte d'eau avec une vitesse de 4m /s assure une dispersion des spores à une distance de plusieurs mètres carrés (**Corbaz, 1994**).
- **Le vent:** C'est un facteur très important dans la dispersion des spores à distances proportionnelles à la vitesse du courant et son intensité (**Holz et al., 2007**).
- **Les insectes:** l'exemple des abeilles, qui en butinant transportent des spores de champignons des fleurs atteintes aux saines (**Holz et al., 2007**).
- **Exigences nutritives:** Afin de pouvoir germer, croître et sporuler, les spores de *B. cinerea* ont des besoins nutritifs. De nombreuses expériences ont montré que la germination de *B. cinerea* dans l'eau était significativement plus faible que dans une solution nutritive (**Kosuge and Hewitt, 1964**). La germination des spores de *B. cinerea* dans l'eau (absence de nutriments) a cependant été observée pour certaines souches (**Doehlemann et al., 2006**).

II.3. Conservation:

Quand les conditions de vie deviennent défavorables, les filaments de *B. cinerea* s'entrelacent entre eux tout en formant les organes de conservation « sclérotés », ces dernières peuvent résister aux conditions extrêmes pendant trois ans à des températures extrêmement élevées sans perte ou modification de leurs caractéristiques vitales.

Les sclérotés peuvent être conservés soit au niveau des tissus morts, soit sur les débris des plantes (tige, feuille), ou bien au niveau des mauvaises herbes et même dans le sol (**Gindro, 2002**).

III. La diversité de *B. cinerea*:

B. cinerea est un champignon présentant une forte diversité phénotypique et génotypique considérable au sein des populations.

Synthèse bibliographique

III.1. La diversité phénotypique:

➤ Morphotype:

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

B. cinerea possède des conidies ovoïdes hyalines à marron pâle, unicellulaire et hydrophobe d'une taille de 8-14 X 6-9µm. Elles sont libérées par le mouvement hygroscopique de rétrécissement des cellules conidiogènes qui sont renflées et ornées de courts stigmates simple, sur lesquels se déposent les conidies (Katamoto et al., 1974 ; Onfroy, 1997). Les micro-conidies d'une taille de 2,5 à 3 µm de diamètre peuvent être retrouvées comme chez toutes les espèces des Sclérotiniacées (Willetts, 1996). Les sclérotés sont toujours petits, arrondis ou ovoïdes, aplatie a la surface de l'organe qui les porte. Ils mesurent 2 à 4mm de longueur et 1 à 3mm de largeur.

Des travaux menés en Algérie ont montré une variabilité intra spécifique importante des caractères morphologiques et bien qu'ils permettent d'identifier *B. cinerea*, il existe quelques problèmes de différenciation entre espèces proches (Adjebli, 2014).

➤ Agressivité sur plante:

Les isolats de *B. cinerea* ne présentent pas un même niveau d'agressivité sur une même plante hôte. Par exemple, Martinez et al., (2003) et Decognet et al., (2009) ont remarqué une variation d'agressivité des souches de *Botrytis cinerea* sur la vigne et sur la tomate. Meamiche- Neddaf (2010) a également observé une grande variabilité du pouvoir pathogène des isolats testés sur feuilles détachés de fève de haricot, d'oignon, de tomate et de la vigne.

➤ La Résistance aux fongicides :

B. cinerea est considéré comme un agent pathogène à haute risque en terme de résistance aux fongicides (Leroux, 2007). Selon Hmouni et al., (2003), les souches de *B. cinerea* ne présentent pas même profile de résistance aux fongicides, même pour une même famille chimique. Plusieurs auteurs ont mise en évidence des niveaux différents de

Synthèse bibliographique

résistances 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 stable (**Yourman et al., 2001**). La relation entre l'acquisition de la résistance et la virulence des souches font l'objet de controverse. Certaines études montrent que la souche de *B. cinerea* résistante aux dicarboximides se présente moins compétitive 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. La diversité génotypique:

La biologie moléculaire a révélé une grande variabilité génétique au sein de l'espèce *B. cinerea*. Différents types de marqueurs moléculaires ont été développés chez cette espèce tel que les RAPDs, les RFLPs, AFLPs et les marqueurs microsatellites (**Ross et al., 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 caractérisées par la présence d'éléments transposables. Un groupe d'isolats « *transposa* » contient des éléments transposables *Boty* et *Flipper*, l'autre « *vacuma* » ne les possède pas (**Giraud et al., 1997**), un groupe d'isolats a été mise en évidence et ne possède que le *transposon boty* au Chili ce qui suggère que ce groupe pourrait être le croisement entre *transposa* et *vacuma* dont seul *boty* a pu envahir *vacuma*, cependant la possibilité qu'il puisse aussi constituer en troisième groupe génétiquement isolé n'a pas été écarté (**Munoz et al., 2002**). Des travaux similaires réalisés en Californie sur différentes cultures confirment la prédominance de *transposa* et la présence d'isolats ne possède que *boty*. Mais un seul isolat *vacuma* a été observé sur une collection de 234 (**Zhonghwa et al. 2005**).

En Algérie, les études similaires ont été initiées en utilisant les marqueurs RAPD et Microsatellites. Les résultats montrent qu'il existe une diversité inter et intra spécifique pour deux espèces de *Botrytis sp.*, *B. cinerea* et *B. Fabae* (**Adjebli et al., 2015 ; Louanchi et al., 2010**).

Synthèse bibliographique

IV. La pourriture grise sur vignoble:

La pourriture grise de la vigne est une maladie très redoutée des agricultures est qui est du à *B. cinerea*.

IV. 1. Symptômes de la pourriture grise sur vigne:

B. cinerea peut attaquer presque tous les organes de la vigne (Alain, 2011) :

- Les **feuilles** : taches brunâtres à rougeâtres, ayant l'aspect de feuille brûlée, parfois couvert d'un feutrage grisâtre. L'attaque commence par le bord du limbe et envahit peu à peu toute la feuille qui prend alors l'aspect brûlé.
- Les **inflorescences** : l'attaque commence par une nécrose sur le pédoncule qui se développe en une pourriture humide, avec exsudation d'un liquide.
- Les **rameaux** : les attaques sont plus rares et surviennent les années très pluvieuses à partir d'autres organes infectés.
- Les **baies** : les baies sont réceptives au *Botrytis* en générale après la véraison. Les contaminations ont lieu à maturité, à partir de blessures. Les baies se recouvrant d'un feutrage gris caractéristique de *B. cinerea* (conidiophore et conidies) (Figure 04).

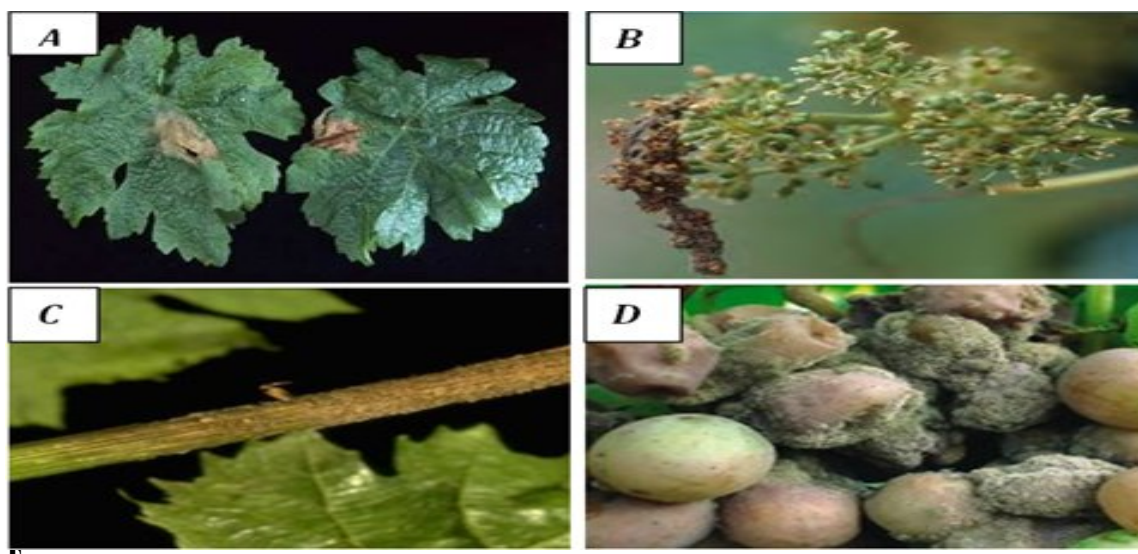


Figure 4: Symptômes de la pourriture grise sur différentes parties de la vigne (A) : sur feuille. (B) : sur inflorescence. (C) : sur rameau. (D) : sur baie (Agro.Basf.fr 2017).

V. Les moyens de lutte:

Les moyens de lutte contre la pourriture grise repose principalement sur l'utilisation des traitements chimiques mais également sur des stratégies de lutte culturale dont les

Synthèse bibliographique

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 (<20C°) et des mesures prophylactiques (les pratiques permettant de réduire la source de l'inoculum retiré 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 (**Dequigne et Ferron, 2004**).

V.1. La lutte chimique:

La pourriture grise conduit régulièrement à des pertes économiques importantes. La lutte chimique reste, à ce jour, le principal moyen pour réduire l'incidence de cette maladie sur les cultures majeures. Se définit par l'utilisation de grandes quantités de fongicides au cours de cycle saisonnier (**De Miccolis Angelini et al., 2014**). Parmi eux, les SDHI (Succinate Déshydrogénase Inhibitrice), ont un rôle dans l'inhibition de la respiration par inhibition de complexe II, connu aussi sous le nom succinate déshydrogénase, dans la chaîne respiratoire qui conduit au blocage de la production d'énergie cellulaire (**Cecchini, 2003**).

La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire (**Leroux, 2004**). Cependant l'utilisation régulières des fongicides anti-Botrytis conduit à l'apparition des souches résistantes (**Leroux, 2007; Hahn, 2014; Fillinger et Walker, 2016**). L'ensemble de phénomènes de résistance représente un problème dans la lutte contre *B. cinerea*, justifiant ainsi l'intérêt actuel pour l'étude de méthodes alternatives à la lutte chimique.

V.2. La lutte culturale:

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**).

- Favoriser la ventilation pour réduire l'humidité à l'intérieur de ces structures et minimiser le mouillage des feuilles (**Baptista et al. 2012**).
- La réduction de l'intensité de lumière dans les tunnels plastiques absorbant les UV pourrait également réduire l'infection et la sporulation de *B. cinerea* (**Nicot et al., 1996**).

Synthèse bibliographique

- 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, 2004**).
- L'assainissement peut également réduire l'intensité de la maladie. Ainsi, (**Hward et al., 1994, Decognet et al., 2010**), ont rapporté que l'élimination des feuilles sénescentes et les organes infectés des parcelles et des serres réduit les sources possibles d'inocula primaire. Le retrait des feuilles sénescentes dans les serres peut diminuer le nombre des lésions et la mort des plantes d'environ 50% (**Elad et al., 2004**). L'élimination des 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, 2004**).

V.3. Lutte biologique :

Les premières études d'écologie microbienne de la phyllosphère ont montré qu'un certain potentiel existait dans la lutte biologique contre *B. cinerea* avec l'utilisation d'antagonistes microbiens (champignons et bactéries). A ce jour, neuf produits ont été approuvés (**Ajouz, 2009**) pour un emploi sur des cultures sous serres, ou en plein champs dans plusieurs pays. Ils ont atteint des niches commerciales dans des situations où l'utilisation excessive de fongicides a été limitée en raison d'une accumulation des résidus ou de restrictions imposées par des pays importateurs (**Williamson et al., 2007**). En Grande-Bretagne, des extraits de composts ont été pulvérisés sur des plantes, réduisant les dégâts et augmentant le rendement des cultures. En Israël, des antioxydants et des huiles essentielles des plantes ont été utilisés pour freiner le développement du champignon (**Blancard, 2009**). En France, seul le produit Serenade formulé à base de *Bacillus subtilis* a été homologué sur cultures de tomates et laitues (**Ajouz et al., 2011**) et le champignon antagoniste *Microdochium dimerum* est actuellement en cours de développement industriel en vue d'une homologation sur tomates (**Abro et al., 2013**).

Matériel et méthodes

I. purification des isolats par l'isolement monospore:

I.1. Matériels biologique

Un total de 200 échantillons fongiques ont été collectés à partir des chancres sporulés de différentes parties aériennes de la vigne (feuilles, baies,...etc.) durant la saison culturale 2014 dans la région agricole d'Amizour, Bejaïa. D'une collection déjà réalisé par M. ADJEBLI à l'aide des écouvillons stériles. Les échantillons prélevés ont été conservées à (-20°C) jusqu'à leur purification par la méthode d'isolement monospore (**Figure 05**).

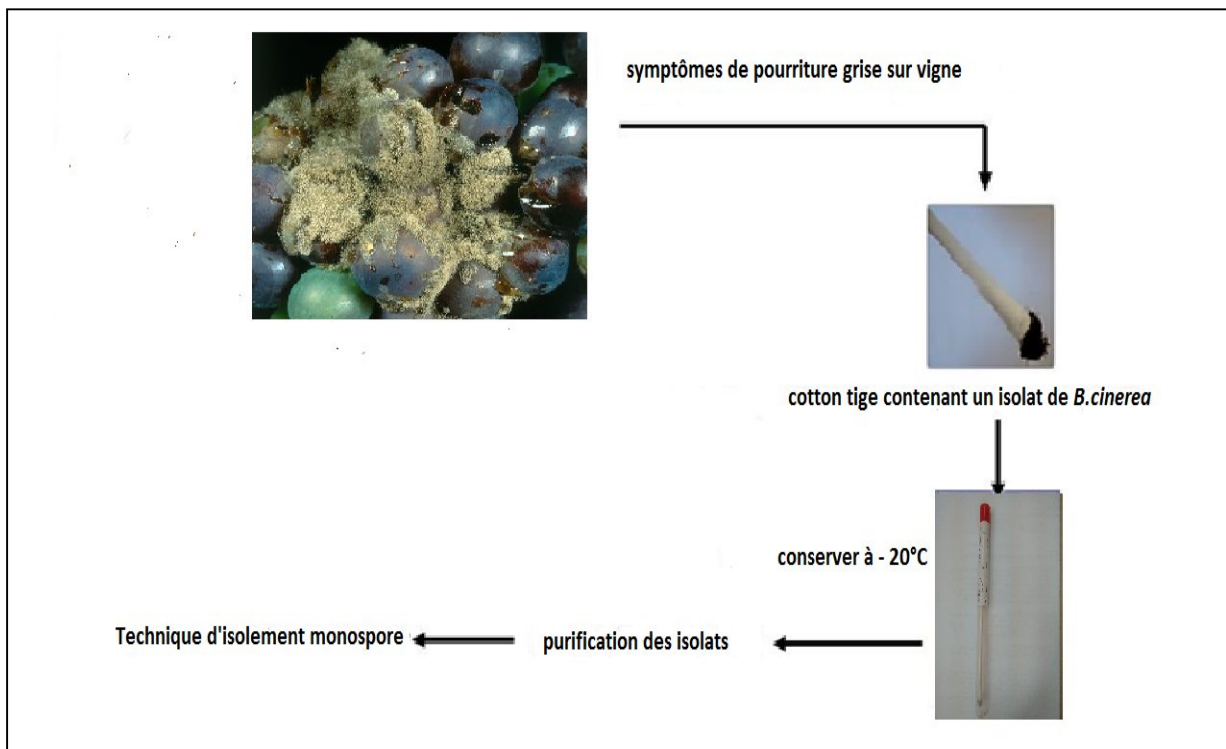


Figure 05: Technique d'échantillonnage des isolats fongiques

Chaque prélèvement sporale a été ensemencé par touche sur la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture PDA (**Potato Dextrose Agar**). Les boîtes ont été incubées sept jours dans une étuve réglée à 21 °C et à l'obscurité (**Figure 06**).

Matériel et méthodes



Figure 06 : Ensemencement de milieu PDA par touche

Les colonies développées ont été repiquées et mises en culture dans les mêmes conditions, le temps qu'elles sporulent (environ 07 jours). Les spores de chaque colonie ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine humide puis mises en suspension dans de l'eau distillée stérile. Une goutte de cette suspension a été prélevée avec une anse de platine puis étalée sur une lame déjà préparée avec 5 ml de la gélose blanche (Agar agar) (**Annexe I**). Les lames ont été mises en culture dans des boîtes humidifiées avec du papier absorbant puis incubées 18 heures à 21°C dans l'obscurité, le temps nécessaire à la germination des spores (**Figure07**).

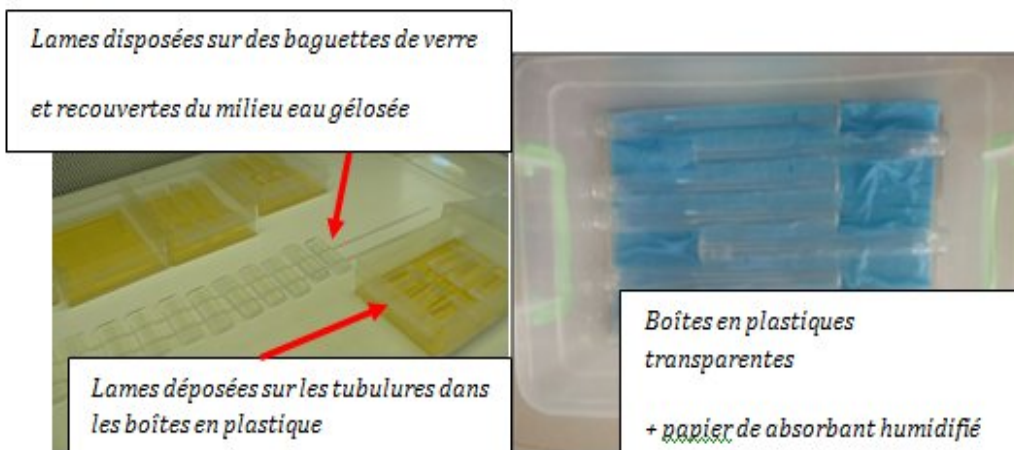


Figure 07 : Préparation des lames avec de l'agar blanche.

Matériel et méthodes

Pour chaque lame, sous microscope optique (objectif X10), une spore suffisamment germée et isolée a été découpée avec la gélose puis transférée sur une boîte de Pétri contenant du milieu PDA. Afin de permettre le développement du mycélium fongique, les boîtes ont été mises en culture durant trois jours à 21°C. Chaque isolat a été repiqué et incubée à 21°C, pendant 03 semaines dans le but dans le but d'établir une classification morphologique.

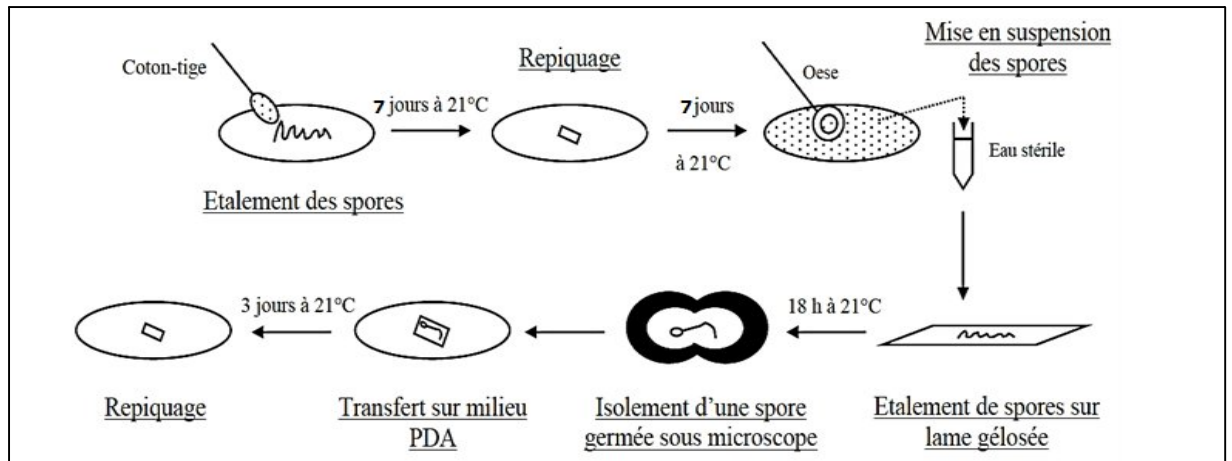










Figure 08: Les différentes étapes de purification des isolats de *B. cinerea* par la technique d'isolement monospore. (Protocole INRA Avignon France).

I.2. Caractérisation morphologique des isolats :

Avant la conservation des isolats monospores, une caractérisation morphologique a été réalisée après 03 semaines d'incubation sachant que les isolats qui ne correspondent pas à *B. cinerea* seront éliminés en se basant sur les critères cités dans le tableau ci-dessous.

Matériel et méthodes

Tableau II : Classification morphologique de *B. cinerea* sur milieu Malt-Agar (Martinez et al., 2003).

Type Mycélien "M"				
Présentation				
Phénotype mycélium	M1 Rasant	M2 aérien	M3 Masses mycélienne	M4 Epais et dense
Sporulation	0	1ou2	1ou2	1
Sclérotés	0	0	0	0
Type Sclérotien "S"				
Présentation				
Phénotype Mycélium	S1 plutôt rasant	S2 plutôt rasant	S3 plutôt rasant	S4 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

1) Sporulation : 0 : absence ; 1 : sporulation peu abondante ; 2 : sporulation très abondante

(2) Sclérotés : 0 : absence ; 1 : rares ; 2 : très abondantes

I.3. Conservation des isolats :

La conservation consiste à recueillir les spores, sclérotés, mycélium à l'aide des cotons tiges stérile et les transférer dans un tube Eppendorf 2ml contenant 1,5ml du tampon phosphate Glycérol 20%. Les tubes Eppendorf par la suite doivent être étiquetés et conservés à -20°C.

Matériel et méthodes

II. Test d'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur les feuilles de vigne:

L'agressivité constitue un trait de caractérisation très important. Il permet de déterminer le niveau d'agressivité des isolats sélectionnés sur les feuilles de vigne.

Les tests ont été effectués sur les feuilles de vigne (*Vitis vinifera* cv. Seedless) qui proviennent de la région de Bejaïa (Amizour). Des feuilles âgées de deux mois, n'ayant subi aucun traitement fongicide, de taille uniforme, ont été recueillies. Les feuilles ont été placées dans des boîtes en plastique transparentes avec un fond humidifié avec du papier absorbant bleu (**Protocole INRA AVIGNON France**). Les feuilles ont été inoculées avec des implants mycéliens âgés de trois jours de chaque isolat de *B. cinerea*.

II.1. Choix des d'isolats

Huit isolats de *B. cinerea* sélectionnés à base de leurs types morphologiques ont été testés sur les feuilles de vigne (**Tableau III**).

Tableau III : Caractéristiques des isolats de *B. cinerea* sélectionnés

Code des isolats	Type Morphologique
BCV2 BCV3	M2 (Mycelium aérien)
BCV8 BCV9	M4 (Mycélium épais et dense)
BCV10 BCV14	S2 (Sclérotés plutôt de grande taille formant un ou des cercles)
BCV20 BCV23	S3 (sclérotés plus grandes tailles, éparpillés)

II.2. préparation des prés cultures

A partir des cultures conservées, 5µl d'une suspension de spore de chaque isolat à été repiqué sur milieu PDA et incubées à 21°C pendant 3 jours à l'obscurité (le temps nécessaire pour le développement de mycélium des isolats de *B. cinerea*) (**Figure 09**).

Matériel et méthodes



Figure 09: Repiquages des isolats de *B. cinerea* sur milieu PDA

L'inoculation des feuilles se fait après trois jours d'incubation ; trois implants mycéliens de 3 mm de diamètre ont été prélevés et déposés au centre de chaque feuille (trois implant mycélien par feuille et par isolats) (**Figure 10**), les boîtes contenant les feuilles inoculées avec les implants mycéliens de chaque isolat ont été incubées à température ambiante du laboratoire.

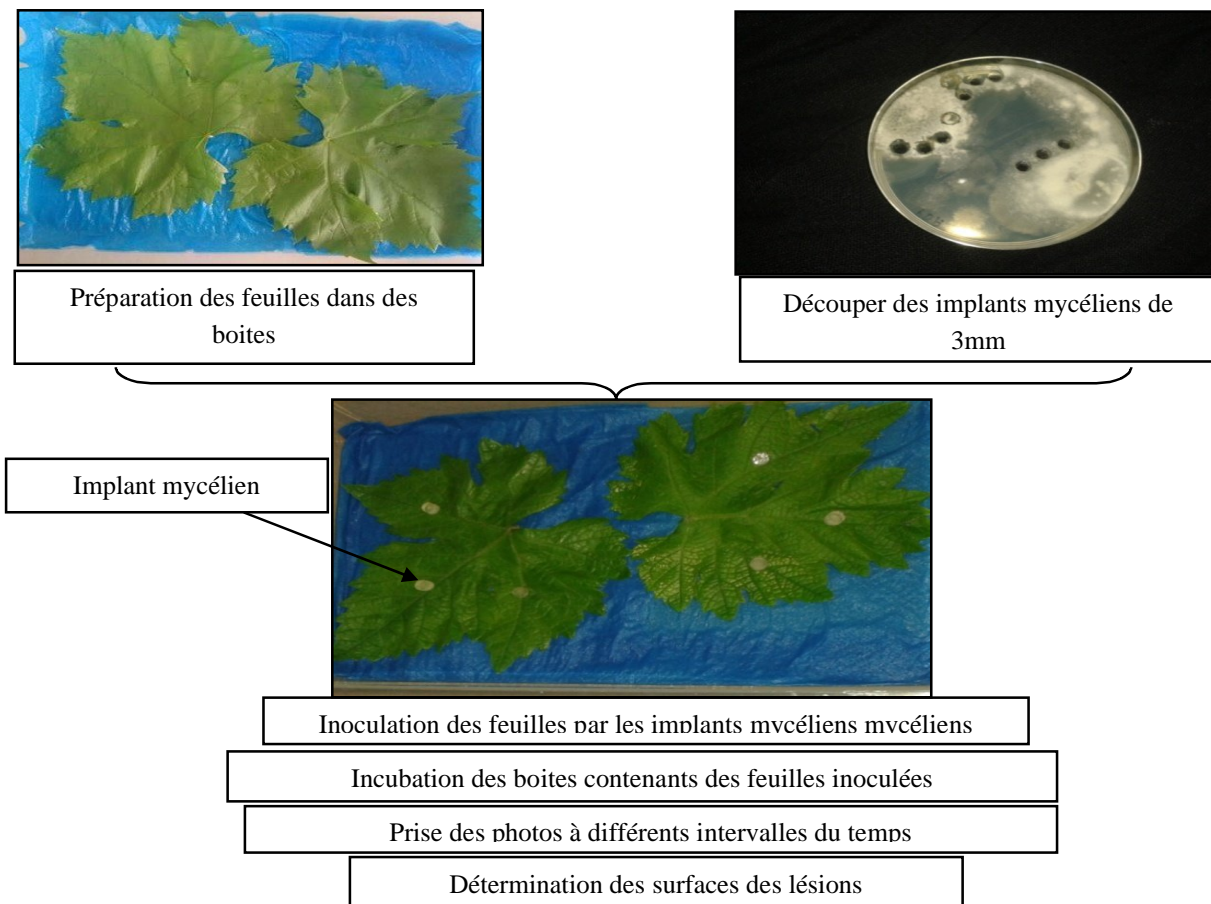


Figure 10: Etapes du Test d'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur les feuilles de vigne

III. Analyse des données :

Le niveau d'agressivité consiste à estimer la surface des lésions causées par les isolats testés sur les feuilles. Chaque boîte a été photographiée à différents intervalles de temps à partir de 24h jusqu'à 96h. Les photos prises ont été analysées avec logiciel «ASSESS 2.0» (APS Press, St Paul, Minnesota) après calibration pour déterminer la surface en mm² des lésions (AnnexeIII).

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 (Madden et al., 2007). 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 mm²) 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 = 24 h

Analyse statistique :

Afin de savoir s'il existe ou non une différence significative du niveau d'agressivité entre les différents types morphologiques de *B. cinerea*, le test Newman-Keuls a été appliqué à l'aide du logiciel STATISTICA Edition '99.

Résultats et Discussion

I. Résultats de Caractérisation morphologique des isolats de *B. cinerea* :

La caractérisation morphologique des isolats de *B. cinerea* dans la région de Bejaïa est réalisée sur milieu PDA à 20°C à l'obscurité. L'observation macroscopique est basée sur l'aspect de mycélium, la sporulation et la production des sclérotés sont effectuées après 21 jours d'incubation.

Le mycélium produit est aérien, rasant ou en masse. Les colonies sont de couleur blanche ou blanche grisâtre au début puis elles deviennent grises claires à grises foncées à la fin de la période de l'incubation (à partir du 7^{ème} jour).

La sporulation est apparue à la surface du mycélium à partir du 7^{ème} jour. 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 certains isolats, les sclérotés sont abondants, rares ou absents chez d'autres souches. Ils sont superficiels ou profonds encreés dans la gélose.

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

Les résultats de caractérisation phénotypique (morphotype) des isolats sont représentés dans le tableau ci-dessous

Résultats et Discussion

Tableau IV : Caractérisation Morphologique des isolats de *B. cinerea* sur le milieu PDA

Type Mycélien "M"				
Phénotype	M1	M2	M3	M4
Mycélien	rasant	aérien	Masses mycélienne	épais et dense
Sporulation(1)	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotés (2)	0	0	0	0
Nombre d'isolats	41	41	7	47
Type Sclérotien "S"				
Phénotype	S1	S2	S3	S4
Mycélien	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant
Sporulation(1)	1	1	1	1
Sclérotés (2)	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grandes tailles, éparpillées.	Nombreux, petits et éparpillés
Nombre d'isolats	0	4	28	2

(1) Sporulation : 0 : absence ; 1 : sporulation peu abondante ; 2 : sporulation très abondante

(2) Sclérotés : 0 : absence ; 1 : rares ; 2 : très abondantes

Un total de 170 isolats a été caractérisé à partir de 200 échantillons, une dominance du morphotype Mycélien avec un total de **136** isolats par apport au type Sclérotien représenté seulement avec **34** isolats (**Figure 11**).

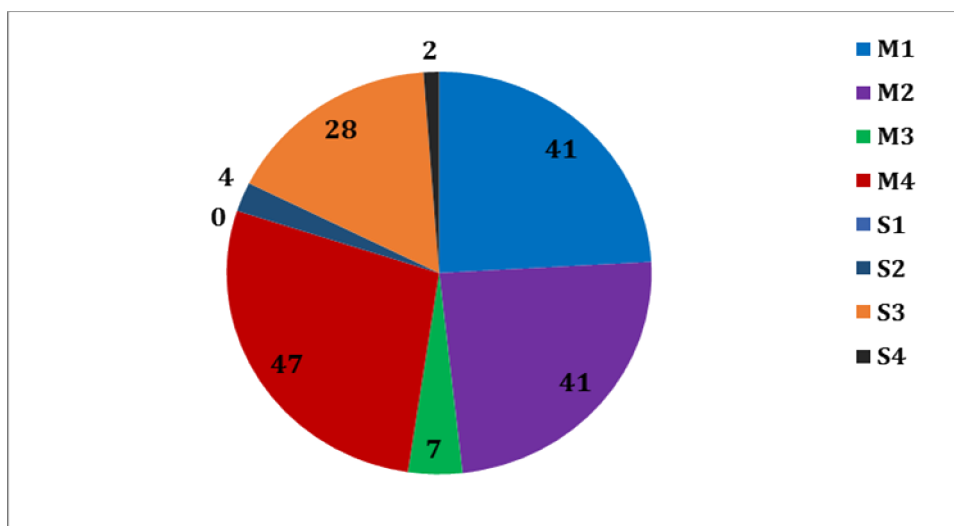


Figure 11: Distribution globale de la classification morphologique des isolats de *B. cinerea*

Résultats et Discussion

La distribution morphologique des isolats collectés dans cette étude ont été composés essentiellement d'isolat du type morphologique Mycélien avec **136** isolats, dans le morphotype majoritaire a été le "M4" avec **47** isolats qui est caractérisée par un mycélium épais et dense avec sporulation peu abondante suivie du morphotype M1 M2 avec 41 isolats et M3 avec 7 isolats (**Figure 12**),

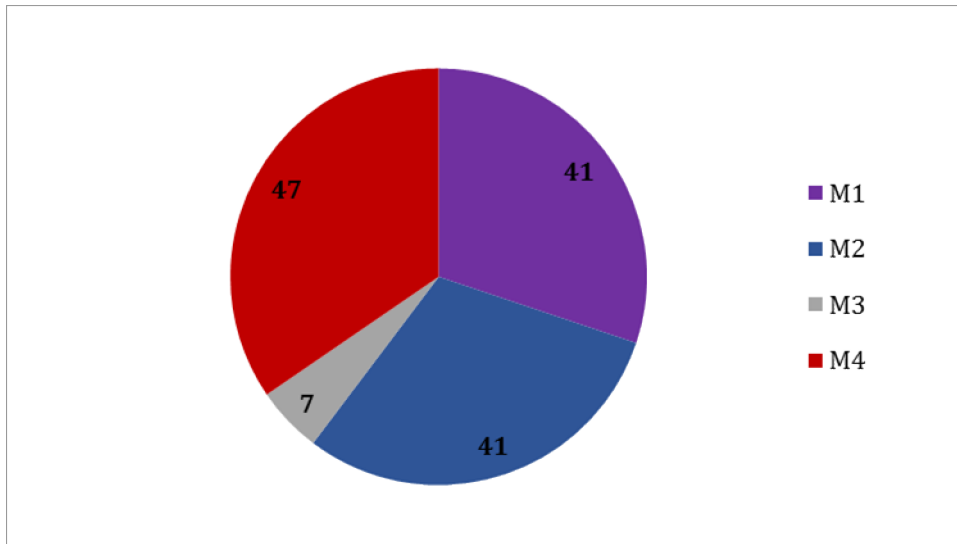


Figure 12: Distribution des différents morphotypes Mycéliens

Tandis que **34** isolats de *B. cinerea* de type morphologique Sclérotien dans le morphotype majoritaire a été "S3" avec **28** isolats qui est caractérisé par des Sclérotés de grande taille éparpillés et un mycélium rasant suivie du morphotype S2 S4 avec 4 et 2 isolats respectivement et de morphotype S1 aucune résultat n'a été détectée (**Figure 13**).

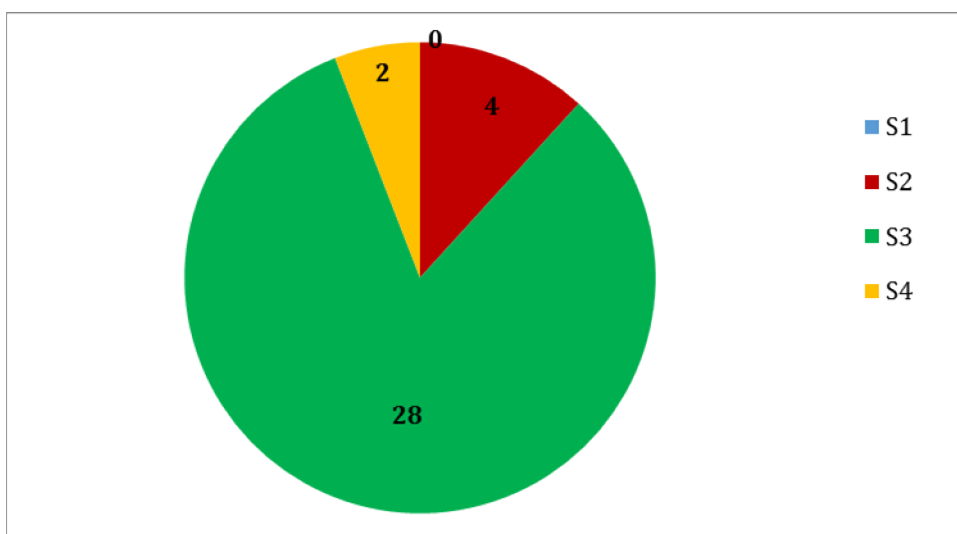


Figure 13: Distribution des différents morphotypes Sclérotien

Résultats et Discussion

Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans une étude morphologique de 12 isolats de *B. cinerea* qui ont montré une grande variabilité entre 12 isolats de *B. cinerea* sur milieu PDA (Miclea et Puia, 2010). La dominance du morphotype Mycélien dans notre étude a été confirmée par les résultats de Mirzaei *et al.*, (2009) qui ont montré que sur 44 isolats de *B. cinerea* ils ont trouvé 26 isolats de *B. cinerea* appartenant au type mycélien et 18 isolat de type Sclérotien sur milieu gélose à l'extrait de Malte. Nos résultats sont en désaccord avec ceux de Martinez *et al.*, (2003), qui ont remarqué que les souches isolées de l'écorce de la canne en hiver sont exclusivement de type Sclérotien ce qui confirme le mode de conservation du *B. cinerea* hors des saisons de culture. Une dominance du morphotype Sclérotien par rapport au morphotype Mycélien a été obtenue dans les populations de *B. cinerea* dans divers plante hôte et dans différentes régions du monde (Tanovic, 2009 ; Goto *et al.*, 1980 ; Adjebli, 2014).

II. Résultats de Test d'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur les feuilles de vigne

Tous les isolats ont produit des lésions sur les feuilles de vigne. Les lésions commencent à apparaître à partir de 24h de l'inoculation sous forme de petites taches grises puis elles s'élargissent avec le temps d'incubation à différentes vitesses de propagation selon le niveau d'agressivité des isolats. (Figure 14).

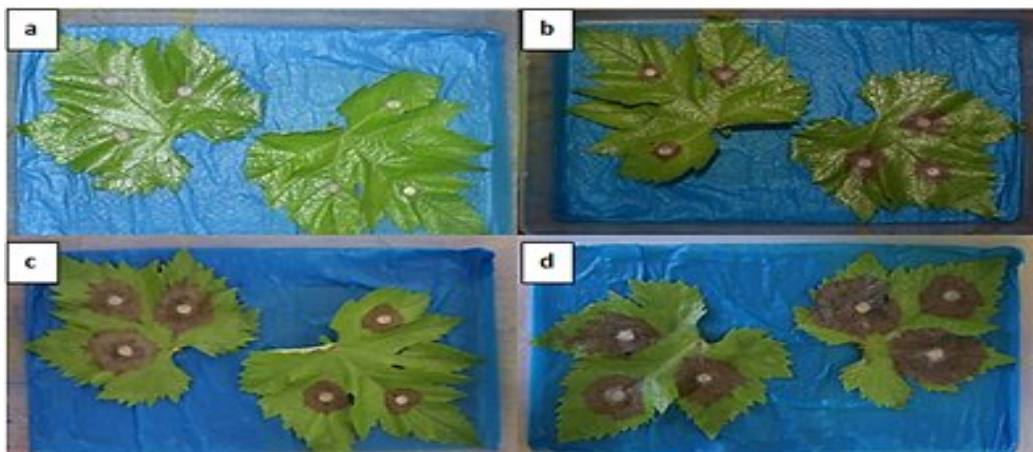


Figure 14: les lésions causées par les isolats de *B. cinerea* à différents intervalles de temps. (a) : après 24h, (b) : après 48h, (c) : après 72h, (d) : après 96h

Résultats et Discussion

Les isolats de *B. cinerea* montrent une variabilité significative dans leur agressivité sur les feuilles de vigne ($P < 0.05$). Les isolats désignés BCV20, BCV10 et BCV2 sont les plus agressifs avec des AUDPC respectives de 489, 389 et 352. Tandis que l'isolat BCV8 montre une agressivité plus faible avec une AUDPC moyenne de 157 parmi les isolats testés (**Figure 15**).

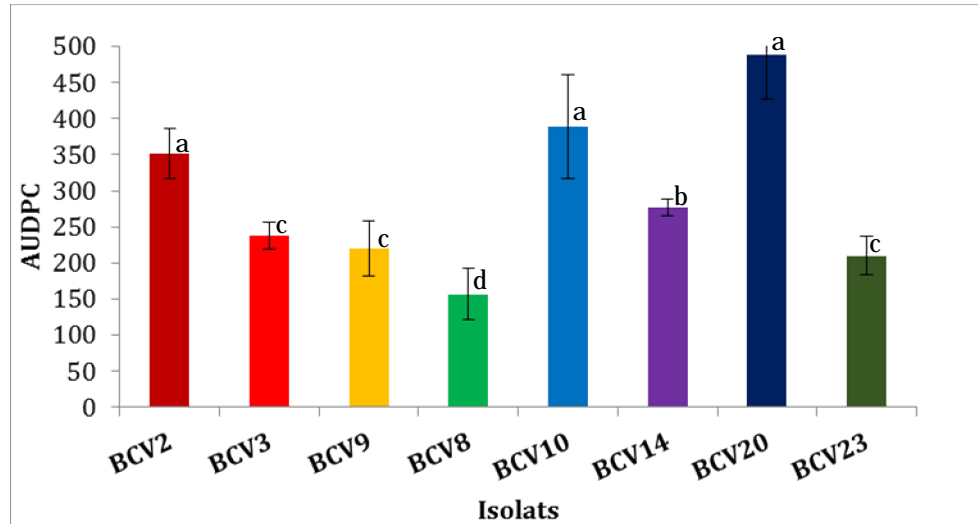


Figure 15: Agressivité des isolats de *B. cinerea* sur feuille de vigne. Les (I) représentent les écartypes. Les même lettres indiquent aucune différence significative selon le test de Newman & keuls ($P < 0.05$).

Les quatre morphotypes testés sur les feuilles de vigne sont divisés en deux groupes mycéliens et Sclérotien. Les isolats de type Sclérotien S3 et S2 montrent des niveaux d'agressivité similaire avec AUDPCs 349,35 et 332,89 respectivement ($P > 0.05$). Par contre les isolats du type Mycélien M4 montrent un niveau d'agressivité plus faible avec une AUDPC 188,75 par rapport aux isolats du type M2 ($P < 0.05$). L'analyse statistique a révélé une différence significative entre l'agressivité des isolats de *B. cinerea* du type Sclérotien et ceux du type Mycélien ($P < 0.05$) (**Figure 16**).

Le test d'agressivité des isolats sélectionnés sur les feuilles de vigne montre qu'il y'avait une corrélation entre le morphotype et l'agressivité. Les isolats de type Sclérotien ont été très agressifs par rapport au type Mycelien. Ce qui coïncide avec les résultats obtenus dans d'autres études réalisées sur différentes parties aériennes de différents plants hôtes (**Benfedala. 2012**).

Résultats et Discussion

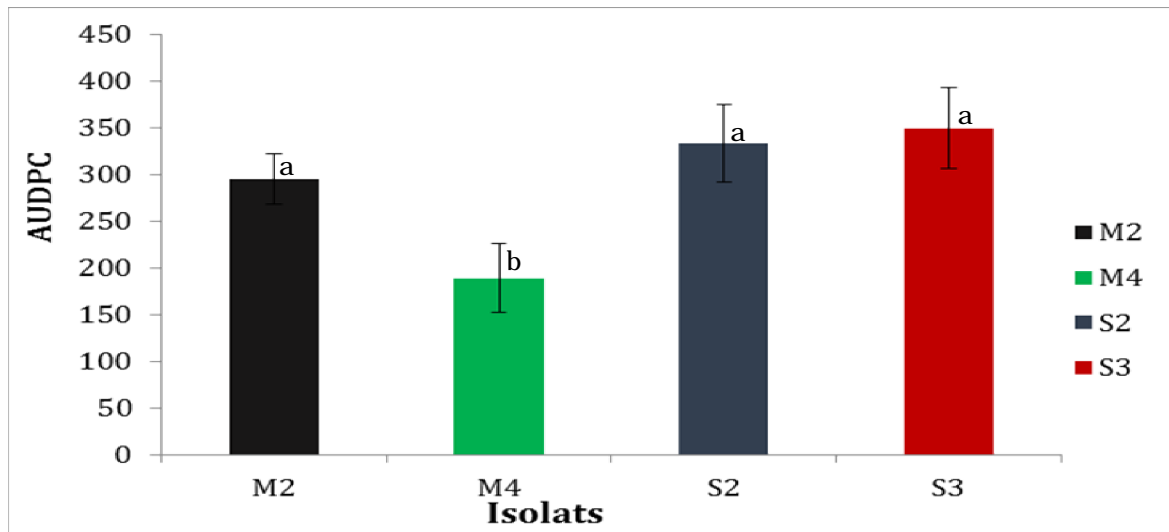


Figure 16: Distribution de l'agressivité sur les feuilles de vigne selon le type morphologique. Les (I) représentent les ecartypes. Les même lettres indiquent aucune différence significative selon le test de Newman & keuls ($P < 0.05$).

L'étude des traits de pathogénicité des isolats de *B. cinerea* provenant de fruits de fraise ont montré des variations de degrés d'agressivité des trois isolats étudiés sur les différents partie de la plante de fraise à coté de différences dans leurs caractéristiques culturelles, morphologique (**Valiuskaite et al., 2010**).

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. **Decognet et al., (2009)**, ont aussi réalisé une comparaison de 15 souches de Botrytis isolées à partir de l'air et deux souches de référence révèlent que ces deux dernières montrent une agressivité supérieure aux 15 souches isolées. Cela est due au fait que les spores 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. **Martinez et al., (2003)** ont remarqué une variation d'agressivité des souches de *B. cinerea* sur la vigne et sur la tomate. **Mirzaei et al., (2009)**.ont également détectés une différence significative de l'agressivité de 44 isolats de *B. cinerea* provenant de différentes régions géographiques d'Iran sur des feuilles de vigne.

Conclusion

La pourriture grise causée par *B. cinerea* est considérée comme l'une des principales maladies aérienne fongique de diverses cultures d'importance agronomique. La diversité phénotypique et génotypique des isolats de *B. cinerea* est l'objet des travaux actuels afin d'apporter des éléments de réponse sur le mode de dissémination, de reproduction afin de mieux comprendre la biologie de ce champignon dans le monde.

L'isolement sélectif des champignons phytopathogènes à partir des plantes infectées et la purification des isolats est une étape essentielle en Mycologie. Dans la présente étude, un total de 200 échantillons fongiques ont été isolés à partir de différentes parties aériennes de vigne. Après purification par l'isolement monospore, 84% des échantillons prélevé correspondaient à l'espèce *B. cinerea*.

Un total de 170 isolats de *B. cinerea* ont fait l'objet d'une caractérisation morphologique. Différents morphotypes ont été observés au sein des isolats de *B. cinerea*. Un total de 136 isolats a présenté une morphologie du type Mycélien, tandis que 34 isolats ont été du type Sclérotien. Une grande variabilité morphologique a été observée entre les isolats de *B. cinerea* avec une dominance du morphotype Mycélien 80%.

L'agressivité de quelques isolats sélectionnés selon leur morphotype a été évaluée sur des feuilles de vigne. Une grande diversité du niveau d'agressivité des isolats de *B. cinerea* testés sur les feuilles de vigne. Une relation positive a été obtenue entre le type morphologique et l'agressivité des isolats de *B. cinerea*. Les isolats de type Sclérotien ont été plus agressifs que les isolats de type Mycélien avec des AUDPCs moyenne 682,24, 483,66 respectivement. Les isolats BCV20 et BCV23 (Morphotype : S3) ont été les plus agressifs que les isolats BCV10 et BCV14 (Morphotype : S2) avec des AUDPCs moyennes de 349,35 et 332,89 respectivement. Tandis que les isolats de type mycéliens BCV2 et BCV3 (Morphotype : M2) ont été les plus agressifs que les isolats BCV8 BCV9 (Morphotype : M4) avec des AUDPC moyennes de 294,91 et 188,75 respectivement.

Ces résultats ne sont que la première étape préliminaire et mérite d'être poursuivis dans l'avenir à fin de :

- ✓ Elargir l'échantillonnage afin de confirmer les résultats obtenus dans cette étude,
- ✓ Réaliser les études sur le terrain dans le but de déterminer l'impact de certaines pratiques culturales sur la variabilité de ce champignon,
- ✓ Réaliser le test d'agressivité *in planta* afin de pouvoir évaluer l'agressivité de ce pathogène dans les conditions contrôlées.

Références bibliographiques

A

Abro M.A., Lecompte F., Bryone F., Nicot P.C (2013). Nitrogen fertilization of the host plant influences production and pathogenicity of *Botrytis cinerea* secondary inoculum. *Phytopathol.* **103**: 261-267.

Abro M.A (2013). Nitrogen fertilization of the host plant influences susceptibility, production and pathogenicity of *B. cinerea* secondary inoculum, as well as the efficacy of biological control. PhdThesis. University of Avignon. France.

Adjebli A., (2014):Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *B. cinerea* ; agent causal de la pourriture grise sur tomate. Thèse de doctorat. Université A. Mira-Bejaia.

Adjebli A, Leyronas C, Aissat K, Nicot P. (2015): Comparaison of *B. cinerea* Population Collected from Tomato green houses in Northern Algeria. *J Phytopathol* in press. **163**; 124-132

Agrios G.N (2005). Plant pathology. Elsevier Academic Press, Oxford, UK, p. 922.

Aissat K, Nicot PC, Abdelhadi G, Bardin M et Chibane M. (2008). Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agron. Sustain. Dev* **28** ; 403- 409.

Ajouz S (2009). Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. France.

Ajouz S., Decognet V., Nicot P.C., Bardin M (2011). Microsatellite stability in the plant pathogen *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures. *Fungal. Biol.* **114**: 949-954.

Alain Reynier, Manuel de viticulture : guide technique du viticulteur, Paris, Éd. Tec & doc, 2011.

Attia F., (2007). Effet du stress hydrique sur le comportement ecophysiologique et la maturité phénolique de la vigne *Vitis vinifera* L: étude de cinq cépages autochtones de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse. 185p

B

Baptista F.J., Bailey B.J., Meneses J.F (2012). Effect of nocturnal ventilation on the occurrence of *B. cinerea* in Mediterranean unheated tomato greenhouses. *Cro Pro.* **32** ; 144-149.

Benfedala S. (2012). Etude de la variabilité phénotypique des souches de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate. Mémoire Magister. Université A. Mira-Bejaia.

Références bibliographiques

Blancard D., (2009). Les maladies de la tomate : identifier, connaître, maîtriser. Versailles: Éditions Quae. 679 pp.

C

Carrier G., (2011). Bases moléculaire de la variation clonale chez la vigne (*Vitis vinifera*). Approche pangénomique. Thèse doctorat en biologie. Montpellier. 138.

Cecchini,G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. Annu. Rev.Biochem. **72**, 77–109.

Corbez R. (1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Edition : presses polytechniques et universitaires romandes. Paris. 298p.

Corbez R. (1994). Principe de pathologie. Edition : INRA. Paris. 168P.

D

Davidson J.A., Krysinska-Kaczmarek M (2007). Effects of inoculum concentration, temperature, plant age and interrupted wetness on infection of lentil (*Lens culinaris*) by *Botrytis spp.* conidia. Australas. Plant Pathol. **36**: 389-396.

Dean R., van Kan J. A., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., et al. (2012).The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology.Mol. Plant Pathol.**13**: 414–430.

Decognet V., Bardin M., Trottin-Caudal Y., Nicot P.C (2009). Rapid change in the genetic diversity of *B. cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse.Phytopathol.**99**: 185-193.

Decognet, V., Ravetti F., C. Martin & Nicot A., (2010) Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. Agronomy for Sustainable Development **30**: 465 -472.

DeMiccolisAngelini,R.M.,Rotolo,C.,Masiello,M.,Gerin,D.,Pollastro,S.,andFaretra,F.(2014).Occurrence of fungicide resistance in populations of *B. fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. Pest Manag. Sci. **70** : 1785-1796.

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., Wubben J.P (2004). Epidemiology of *B. cinerea* diseases in greenhouses. In Botrytis: biology, pathology and control. 319-333.

Doehlemann, G., Berndt, P., and Hahn, M. (2006). Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. Microbiology **152**: 2625-2634.

Références bibliographiques

E

Elad, Y. & Stewart, A (2004) Microbial Control of Botrytis spp. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen (eds). Springer Netherlands, pp. 223-241.

Elmer P.A.G., Michailides T.J (2004). Epidemiology of *B. cinerea* in orchard and vine in Botrytis: biology, pathology and control. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. crops, pp 243-272.

Esterio M., Muñoz G., Ramos C., Cofre G., Estevez R., Salinas A., Auger J (2011). Characterization of *B. cinerea* isolates present in Thompson seedless table grapes in the central valley of Chile. Plant. Dis. **95**: 683-690.

F

FAOstat ,(2013). Food and Agriculture. Organisation. Statistics database, 2013.

Fekete E, Fekete E, Irinyi L, Karaffa L, Árnayasi M, Asadollahi M, et al (2011). Genetic diversity of a *B. cinerea* cryptic species complex in Hungary. Microbiol Res; **167**:283–291.

Fernández-Acero F. J., Carbú M., El-Akhal M. R., Garrido C., González-Rodríguez V. E., Cantoral J. M. (2011). Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. Int. J. Mol. Sci. **12**: 795–816.

Fillinger, S., and Walker, A.-S. (2016). Chemical control and resistance management of *Botrytis* diseases, in *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*, eds S. Fillinger and Y. Elad (Berlin: Springer).

Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., and Brygoo, Y. (2005). Partition of the *B. cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. Mycologia **97**: 1251-1267.

G

Galet p. (1977). Les maladies et les parasites de la vigne. Tome 1 : Les maladies dues à des végétaux : champignon, bactéries, viroses et phanérogame. Ed. Paysans du midi. Montpellier France. pp 872.

Galet P., (1993). Précis de viticulture 6^{ème} Ed. Déhan, Montpellier. pp 575

Giraud T, Fortini D, Levis C, Leroux P, Brygoo Y. (1997). RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. Mol Biol Evol **14**:1177–1185.

Références bibliographiques

Giraud T., Fortini D., Levis C., Lamarque C., Leroux P., Lobuglio K., Brygoo Y (1999). Two sibling species of the *B. cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathol.* **89**: 967-973.

Gindro K. (2002). Etude de la sporulation et des mécanismes d'infections du champignon responsable de la pourriture grise (*B. cinerea pers*). Station fédérale de recherche en production végétale de Changins. Institut d'écologies université de Lausanne. 122p

Gomez. HV. (2007). Relations entre états de croissance de la vigne et maladies cryptogamiques sous différentes modalités d'entretien du sol en région méditerranéenne. Thèse de doctorat en Agronomie et Science du sol. Ecole Doctorale. Montpellier. France. 257p.

Goto S., Terabayashi T., Yokotsuka I (1980). Identification, cultural properties and pathogenicity of grey mould of grape, *Botrytis cinerea*. *Nippon.Nogeik.Kaishi.* **54**: 117–121

Grimplet J., Adam-Blondon A.F., Bert P.F., Bitz O., Cantu D., Davies C., Delrot S., Pezzotti M., Rombauts S., Cramer G.R. (2014). The grapevine gene nomenclature system *BMC Genom* **15**:1077

H

Hahn,M.(2014).The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *J. Chem. Biol.* **7**: 133–141.

Hennebert, G.L. (1973). *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* **7**: 183-204.
Hilber, U.W., Schwinn, F.J., and Schuepp, H. 1995. Comparative resistance patterns of fludioxonil and vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *Journal of Phytopathology* **143**: 423-428.

Hmouni A., Oihabi L., Badoc A. et Douira A.(2003). Etude de la résistance de *B. 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.

Holz G, Coertze S et Williamson B. (2007). The Ecology of *Botrytis* on plant surfaces in *Botrytis* : biology, pathology and control. In: Elad Y Williamson B, Tudzynski P et Delen N published by Springer, Dordrecht, the Netherlands. pp. 9-24

Howard, R. J., Garland J. A & Seaman W. L.(1994). Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada. The Canadian Phytopathological Society and the Entomological Society of Canada: 590.

I

Isenegger DA, A des P.K., Ford R., Taylor P.W.J., (2008): Status of the *B. cinerea* species complex and microsatellite analysis of transposon types in south Asia and Australia. *Fungal Divers.* **29**: 17-26.

K

Références bibliographiques

Katumoto K., H. Lzumi et Y. Yukawa. (1974). Scanning electron microscopy of morphological aspects of the gray mold, *Botrytis cinerea*. Bull. Fac. Agri. Yamaguti. Univ.**25**: 965- 978.

Kosuge, T., and Hewitt, W.B. (1964). Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytis cinerea*. Phytopathology **54**: 167-172.

L

Leroux, P. (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides in *Botrytis*: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. P 195-222.

Leroux P. (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides, 195-222, in: *Botrytis*: biology and control. Elad Y., Williamsson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. Ed. Springer, Dordrecht, the Netherlands, 402 p.

Leyronas C., Nicot P (2013). Monitoring viable airborne inoculum of *B. cinerea* in the South-East of France over 3 years: relation with climatic parameters and the origin of air masses. *Aerobiologia*. **29**: 291-299.

Louanchi M., Meamiche H. et Salhi L. (2010). Etude de la spécialisation parasitaire et du polymorphisme génétique par les marqueurs RAPD de *Botrytis sp.* Accepté pour communication au séminaire international de biologie végétale et écologie 22-25 Novembre 2010 Constantine, Algérie.

M

Madden L.V., Hughes G., van den Bosch F (2007). The study of plant disease epidemics, APS press, Minnesota, USA.

Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., Fermaud M (2003). Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant. Pathol.***109**: 479-488.

Martinez F., Dubos B., Fermaud M (2005). The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *B. cinerea* in vineyards. *Phytopathol.***95**: 692-700.

MaZ.H et Michailides T.J., (2005). Genetic structure of *B. cinerea* populations from different host plant in California. *Plant Dis.* **89**: 1083- 1089.

Meamiche-Neddaf H. (2010). Etude de la spécialisation parasitaire et de la diversité génétique d'une collection d'isolats de *Botrytis spp.* Mémoire de Magistère. Ecole nationale supérieure Agronomique, Alger. 82p.

MicleaR., and Puia C (2010). Phenotypic differences between isolates of *B. cinerea* Pers. From different host plants Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Agriculture.**67**: 325.

Références bibliographiques

Mirzaei S., Goltapeh E.M., Shams-Bakhsh M., Safaie N., Chaichi M (2009). Genetic and phenotypic diversity among *B. cinerea* isolates in Iran. *J. Phytopathol.* **157**: 474-482.

Moorman G. W. et Lease R. J. (1992). Benzimidazole and dicarboximide resistant *B. cinerea* from pennsylvania greenhouses. *Plant disease.***76**, 477- 480

Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y. and Giraud, T. (2002). Genetic Characterisation of *B. cinerea* Populations in Chile. *Mycological Research*, **106**, 594-601.

N

Nicot PC, Mermier M, Vaissiere BE, Lagier J, (1996). Differential spore production by *B. cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. *Plant Disease* **80**: 555-558.

O

Onfroy C. (1997). Maladies fongique aériennes des légumineuses alimentaires, rapport INRA.11p.

P

Petit AN. (2008). Effet de fongicides anti-botrytis sur les organes végétatifs et reproducteurs de la vigne. Thèse doctorat de biologie et physiologie végétale. Université de Reims champagne-andrenne, faculté des sciences, technologie. Santé. Reims.179p.

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 *B.cinerea*. *Journal of the American Society for Horticultural science.* **132**, 193-201.

R

Raposo R., Gomez V., Urrutia T. et Melgarejo P. (2000). Finess of *B. cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathology.* **90**, 1246- 1249.

Robert M., (2007). Protection de la vigne contre *B. cinerea* et stimulation des mécanismes de défense à l'aide de Bacteria issues du vignoble champenois. Thèse doct. Univ. de reims champagne –Ardenne, France 188P.

Ross E. Beever et Pauline L. (2007).Weeds Taxonomy and Genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia* in *Botrytis* Biology, Pathology and Control. In: Elad. Y Williamson. B. Tudzynski P et Delen N. Published by Springer, Dordrecht, the Netherlands. pp. 29- 34.

S

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., Wang H.P (2009). Pathogenicity analysis of different *B. cinerea* strains in cucumber. China. *Vegetables.* 25-28.

Références bibliographiques

T

Tanovic B., Delibasic G., Milivojevic J., Nikolic M (2009). Characterization of *B. cinerea* isolates from small fruits and grapevine in serbia. Arch. Biol. Sci. **61**: 419-429.

V

Valiuskaite A., Surviliene E., Baniulis D (2010). Genetic diversity and pathogenicity traits of *Botrytis spp.* isolated from horticultural hosts. Zemdirbyste-Agriculture. **97**: 85-90.

W

Walker, AS, Gladieus, P, Decognet, V, Fermaud, M, Confals, J, Roudet, J, Bardln, M, Bout, A, Nicot, P, Poncet, C, and Fournier, E. (2015). Population structure and temporal maintenance of the multihost fungal pathogen *Botrytis cinerea*: causes and implications for disease management. Environmental Microbiology **17**: 1261-1274.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Mol. Plant Pathol. **8**:561–580.

Y

Yourman L. F., Jeffers S. N. et Dean R. A.(2001). Phenotype instability in *B. cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. Phytopathology. **91**: 307-315.

Z

Zhonghua M.A., Michailides T.J (2005). Genetic structure of *B. cinerea* populations from different host plants in California. Phytopathol. **89**: 1083-1089.

Annexes

Annexe I : Milieux de culture et tampons

Milieu PDA

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	20g
Agar	15g
Eau distillée	1l
PH.....	5,40±0,2
Autoclavage.....	120°C/20min

Gélose blanche

Agar	1.5g
Eau distillé	100 ml
PH.....	7±0,2
Autoclavage.....	120°C/20min

Tampon phosphate mono potassique

Tampon phosphate mono potassique KH_2PO_4	4,25g
Eau distillé.....	500 ml
Autoclavage.....	121°C/20 min

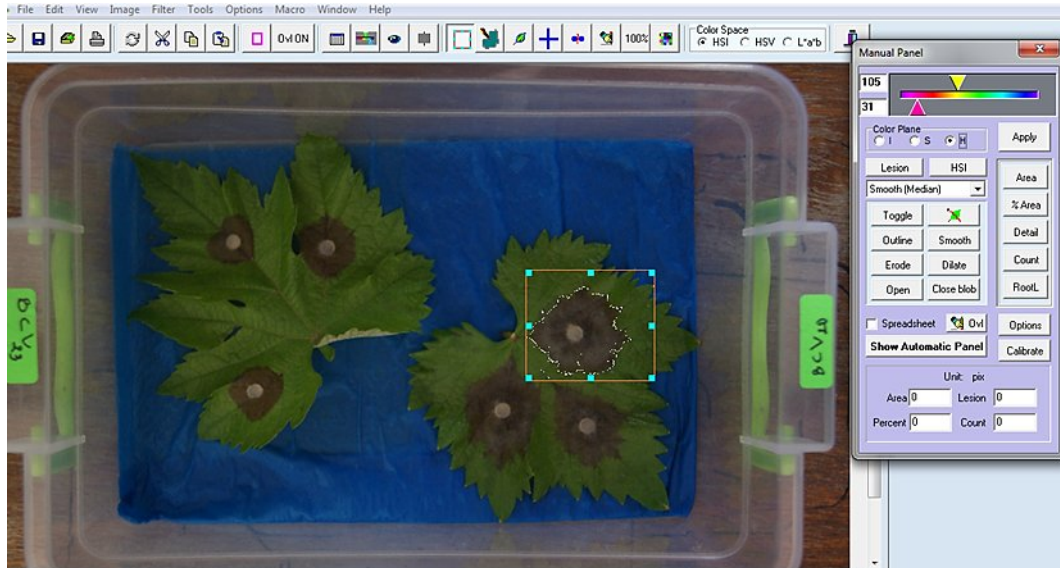
Annexes

Annexe II : Exemples de la classification morphologique des isolats de *B. cinerea* sur milieu PDA

codes	Mycelium	Sclérote	Degré de sporulation	Nombre de sclérote
BCV2	M2	0	-	0
BCV3	M2	0	-	0
BCV4	M2	0	-	0
BCV7	M1	0	-	0
BCV8	M4	0	±	0
BCV9	M2	±	±	±
BCV10	M1	0	-	0
BCV11	M2	0	±	0
BCV12	M1	0	-	0
BCV13	M4	±	+	±
BCV14	M4	S2	+	+
BCV15	M1	0	-	0

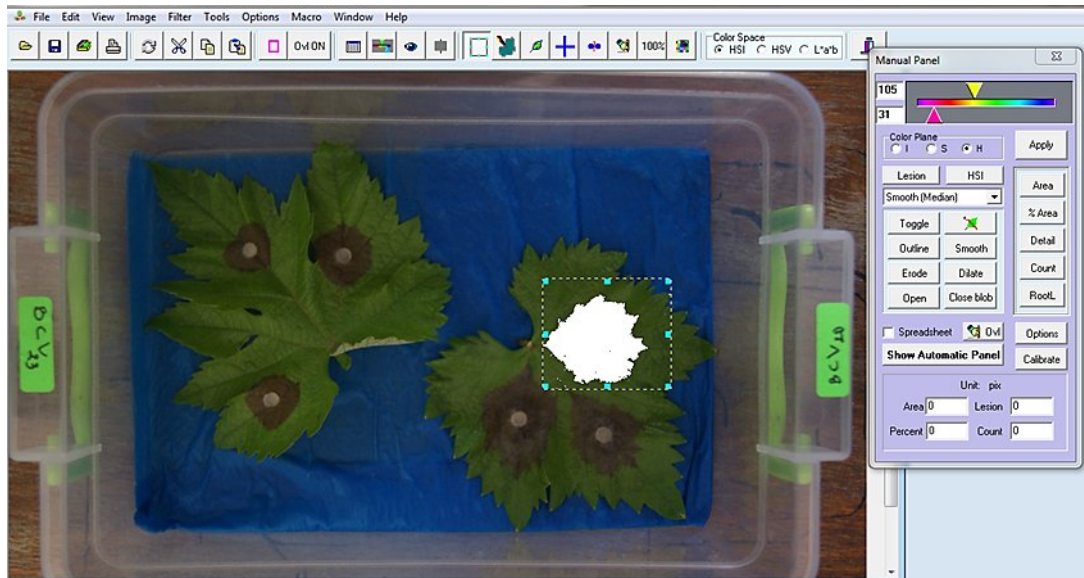
Annexes

Annexe III : Analyse d'une photographie avec le logiciel ASSESS 2.0



Annexes

Annexe III : Analyse d'une photographie avec le logiciel ASSESS 2.0



Résumé :

La pourriture grise est une maladie cryptogamique causée par *B. cinerea*. Ce dernier a été désigné comme modèle d'étude dans notre cadre de recherche sur les bio-agresseurs de la vigne, est un champignon très répandu dans ces cultures. La première partie de ce travail, qui constitue une caractérisation phénotypique de nos isolats a révélé une grande variabilité au sein de notre collection. Un total de 170 isolats a été caractérisé à partir de 200 échantillons collectés de différentes parties de la vigne dans la région de Bejaïa (Amizour). Une dominance de morphotype Mycélien a été notée par 136 isolats contre 34 isolats de morphotype Sclérotien. Le test d'agressivité révèle une grande hétérogénéité entre les isolats sélectionnés. Les isolats les plus agressifs sont BCV20, BCV10 et BCV2 avec des AUDPC moyennes respectives de 489, 389 et 352. Tandis que l'isolat BCV8 montre une agressivité plus faible avec une AUDPC moyenne de 157 parmi les isolats testés. La distribution de l'agressivité selon leurs morphotypes montre une dominance de type morphologique Sclérotien par rapport au type morphologique mycélien avec des AUDPCs respectives 682,24 et 483,66.

Mots clés : *Botrytis cinerea*, Vigne, Morphotype, Agressivité, Variabilité

Abstract:

Gray mold is a cryptogamic disease caused by *B. cinerea*. It has been designated as a model of study in our framework of research on the biological aggressors in the vineyard. The first part of this work, which constitutes a morphotypic characterization of all isolates purified. A total of 170 isolates were characterized from 200 samples collected from different parts of the vineyard in the Bejaïa region. A total of 136 isolates were characterized as Mycelial morphotype against 34 isolates as Sclerotial morphotype. Aggressiveness test reveals a great heterogeneity between the selected isolates. The most aggressive isolates were BCV20, BCV10 and BCV2 with average AUDPCs of 489, 389 and 352 respectively. While the BCV8 isolate showed lower aggressiveness with an average AUDPC of 157. The distribution of aggressiveness according to their morphotype shows a dominance of Sclerotial morphotype compared to the Mycelial morphotype.

Key words: *Botrytis cinerea*, Vineyard, Morphotype, Aggressiveness, Variability