



**HAL**  
open science

# Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *Botrytis cinerea*; agent causal de la pourriture grise sur tomate

Ahmed Adjebli

► **To cite this version:**

Ahmed Adjebli. Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de *Botrytis cinerea*; agent causal de la pourriture grise sur tomate. Sciences agricoles. Université Abderrahmane Mira de Béjaïa, 2014. Français. NNT: . tel-02800419

**HAL Id: tel-02800419**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02800419>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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

## THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE

DOCTORAT

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie** Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Présentée par :

**Mr ADJEBLI Ahmed**

Thème

**Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de  
*Botrytis cinerea* ; agent causal de la pourriture grise sur  
tomate**

Soutenue le : 24/12/2014

Devant le Jury composé de :

Nom et prénom

Grade

Mr. BENALLAOUA Said

Professeur

Univ. de Béjaïa

Président

Mr. AISSAT Kamel

M.C.A

Univ. de Béjaïa

Directeur de thèse

Mr. ZAIDI Farid

Professeur

Univ. de Béjaïa

Examineur

Mr. ZERROUG Mohamed Mihoub

Professeur

UFA. de Sétif

Examineur

Mme. MEZAACHE Samia  
née AICHOUB

M.C.A

UFA. de Sétif

Examinatrice

Mr. NICOT Philippe

Docteur

INRA Avignon  
France

Invité

Année universitaire 2014-2015

*« La science de l'ignorant, c'est de reprendre  
les choses bien dites » «M.A.»*

## Dédicaces

*À la mémoire de mon père*

*À ma mère*

*À tous ceux qui me sont chers*

*AHMED*

# REMERCIEMENTS

Ce n'est pas évident d'exprimer en quelques lignes ma gratitude à toutes les personnes qui ont participé au bon déroulement et à l'aboutissement de mon travail de thèse. Voici une petite liste de ces personnes en sachant qu'il en existe d'autres qui restent cachées derrière chaque mot de ce manuscrit.

Mes premiers remerciements vont aux agriculteurs de la région de Tichy, Souk el Tenine, Baccaro et Merdjouamane, qui nous ont permis d'effectuer des échantillonnages durant plusieurs saisons et de réaliser l'expérimentation sur leur exploitation agricole. Sans leur collaboration ce travail n'aurait jamais vu le jour. J'espère que ce travail contribuera à maîtriser les pertes occasionnées par le *Botrytis cinerea*.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à **M<sup>r</sup> BENALLAOUA Said**, Professeur à l'université de Béjaia et Directeur du Laboratoire de Microbiologie Appliquée pour tout le savoir qu'il nous transmis durant tout notre cursus universitaire et pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider ce jury.

Je tiens a remercié également les autres membres de jury **M<sup>me</sup> MEZAACHE Samia** née **AICHOOR**, **M<sup>r</sup> ZERROUG Mohamed Mihoub** et **M<sup>r</sup> ZAIDI Farid**, d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie vivement **M<sup>r</sup> Kamel AISSAT** et **M<sup>r</sup> Philippe NICOT**, directeur et co-directeur de ma thèse de m'avoir encadré. Je les remercie chaleureusement pour leur soutien sans faille dans les nombreuses difficultés que j'ai pu rencontrer, soutien sans lequel bien peu de choses auraient été rendues possibles. Leurs disponibilités et leurs généreux secours au cours de certains de mes moments difficiles ont été d'une très grande qualité, et d'un immense réconfort.

Je remercie chaleureusement **M<sup>elle</sup> Christel Leyronas** de m'avoir aidé durant les stages que j'ai effectué à l'INRA AVIGNON et ces pertinents conseils lors des discussions sur la partie génotypage ; merci infiniment **Christel**. Merci également à **M<sup>me</sup> Cindy Morris** de m'avoir accueilli dans l'unité de Pathologie Végétale.

Je remercie du fond du cœur **Claire Troulet**, **Véronique Decognet**, **Dominique Andurand**, **Magali Duffaud**, **Gwénaëlle Alcaras** et **Ali Abro Manzoor** pour leurs collaborations, leurs précieuses aides, leur disponibilité et leur sympathie.

Tout ceci n'aurait pas eu la même saveur sans, **Frédéric, Pascale, Claudine, Michel, Hélène, Magali, Laurent** et l'ensemble de l'équipe culture pour lesquels j'exprime toute ma sympathie, ainsi qu'à tous les membres de l'unité de Pathologie Végétale-INRA d'Avignon.

Je suis très reconnaissant à toutes les personnes de l'équipe de mycologie **Fatima, Djahida, Nadhira, Saadia, Houa, Narimene** et **Yousra** pour leurs aides, conseils et soutient au cours de ce travail.

Je remercie du fond du cœur **Bettache Azzeddine, Messis A/Aziz, Ladjouzi Rabia, Nabil Kadri, Kamel Cherk, Ilyas Cherchour, Karim Tighilet** pour leurs aides, leurs disponibilités et leurs sympathies.

Enfin, je n'aurais pas pu mener cette thèse à son terme sans le soutien de ceux qui me sont les plus proches : Ma **chère mère**, merci pour toute ton affection, l'éducation que tu m'as prodiguée et tes encouragements constants, tu es ma source d'inspiration. Je remercie **mes frères** et mes **chères sœurs**, ainsi que toute **ma famille**, à ma très chère **Lydia**, en témoignage des liens solides et intimes qui nous unissent.

**Merci à tous.**

## Liste des Figures

Figure 1. 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.....	8
Figure 2. Cycle de développement (production asexuée) de <i>B. cinerea</i> sur différentes culture.....	10
Figure 3. Symptômes causés par l'agent pathogène <i>B. cinerea</i> sur différents hôtes	11
Figure 4. Représentation des sites d'échantillonnage de <i>B. cinerea</i> dans la région de Bejaia, en Algérie.. ..	30
Figure 5. Technique d'isolement des échantillons de <i>B. cinerea</i> sur les chancres de tomate. ....	31
Figure 6. Les différentes étapes de purification des isolats par la technique d'isolement monospore.....	32
Figure 7. Différents aspects du mycélium de <i>B. cinerea</i> obtenu sur gélose à l'extrait de malt à 21°C.....	36
Figure 8. Différents aspects de la sporulation observés des souches de <i>B. cinerea</i> sur milieu gélose à l'extrait de malt à l'obscurité à 21°C.....	36
Figure 9. Distribution du nombre d'isolats de <i>B. cinerea</i> selon le type morphologique.	38
Figure 10. Représentation schématique d'une serre non chauffée recouvertes d'un film en polyéthylène. ....	41
Figure 11. Les températures quotidiennes enregistrées dans deux serres de tomates au cours des saisons de croissance 2012 et 2013.. ..	45
Figure 12. La comparaison de la dynamique du développement de la pourriture grise.....	46
Figure 13. Progression de l'épidémie de la pourriture grise causée sur les serres de tomates pendant deux années (2012 et 2013). ....	47
Figure 14. Effet de la température sur la vitesse de croissance mycélienne de <i>B. cinerea</i> .....	49
Figure 15. Effet de différentes températures sur la germination des spores exprimées en pourcentage de germination des isolats de <i>B. cinerea</i> . ....	50
Figure 16. Technique d'inoculation des folioles de tomates par les isolats de <i>B. cinerea</i> .....	54
Figure 17. Production des tomates sous serre .....	56
Figure 18. Mise en culture des souches de <i>B. cinerea</i> .....	57
Figure 19. Dispositif de filtration de la suspension.....	57
Figure 20. Technique d'inoculation des plantes de tomates par les isolats de <i>B. cinerea</i> .....	59

Figure 21. Mise en culture des plantes de tomate en chambre humide .....	59
Figure 22. Vitesse de croissance mycélienne des isolats de <i>B. cinerea</i> à différentes températures sur milieu PDA.....	61
Figure 23. Lésions de la pourriture grise sur les folioles de tomates.. .....	63
Figure 24. Inhibition de l'agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> produit à 21 °C sur des folioles de tomates incubées à 28 °C et 29 °C. ....	63
Figure 25. Inhibition de l'agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> produit à 21 °C sur des folioles de tomates incubées à 30 °C. ....	64
Figure 26. Inhibition de l'agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> produit à 28 et 29 °C sur des folioles de tomates incubées à 21 °C.....	65
Figure 27. Inhibition de l'agressivité des isolats de <i>B. cinerea</i> produit à 28 et 29 °C sur des folioles de tomates incubées à 28 et 29 °C.....	66
Figure 28. La notation de symptômes de la pourriture grise sur tomates causés par les isolats de <i>B. cinerea</i> .....	68
Figure 29. Comparaison des AUDPC de la progression de la pourriture grise des différents isolats de <i>B. cinerea</i> sur plantes de tomate. ....	68
Figure 30. Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.....	73
Figure 31. Profil attendu d'un marqueur de taille ayant correctement migré. ....	75
Figure 32. Vérification de la bonne migration du marqueur de taille.....	75
Figure 33. Détermination de la taille de l'allèle d'un microsatellite pour les différents isolats. ....	75
Figure 34. Distribution de la fréquence d'haplotypes de <i>B. cinerea</i> dans la population totale.....	80

## Liste des tableaux

Tableau I. Les plages de températures pour les différentes phases de développement de <i>B. cinerea</i> .....	14
Tableau II. Classification morphologique de <i>B. cinerea</i> sur milieu Malt-Agar. ....	22
Tableau III. Nombre d'isolats de <i>B. cinerea</i> échantillonnés dans la région de Bejaia durant la période 2007, 2008 et 2010. ....	35
Tableau IV. Classification phénotypique des isolats de <i>B. cinerea</i> sur le milieu gélose à extrait de malt.....	37
Tableau V. Origine des isolats de <i>B. cinerea</i> collectés dans des serres de tomates commerciales dans la région de Bejaia. ....	44
Tableau VI. Analyse de la variance de la vitesse de croissance mycélienne des isolats de <i>B. cinerea</i> . ....	48
Tableau VII. Analyse de la variance de la germination des spores des isolats de <i>B. cinerea</i> .....	49
Tableau VIII. Origine des isolats de <i>B. cinerea</i> testés .....	53
Tableau IX. Comparaison des moyennes de vitesse de croissance des isolats de <i>B. cinerea</i> .....	61
Tableau X. Comparaison de la moyenne de la croissance mycélienne des isolats de <i>B. cinerea</i> selon l'origine d'isolement. ....	62
Tableau XI. Caractéristiques des 09 microsattellites isolés de <i>B. cinerea</i> .....	74
Tableau XII. Indices de la diversité génétique calculés pour les sous-populations de <i>B. cinerea</i> avec les 09 microsattellites.....	79
Tableau XIII. Distribution de la fréquence des haplotypes de <i>B. cinerea</i> partagés au sein des sous-populations isolées dans les régions de Bejaia. ....	82
Tableau XIV. Effet de la distance géographique sur la différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) des sous-populations de <i>B. cinerea</i> isolées dans les régions Bejaia.....	84

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphisms

**ALG**: Algérie

**ANOVA**: Analysis of Variance

**ARN** : Acide RiboNucléique

**AUDPC** : Area Under the Disease Progress Curves

**BET** : Bromure d'Ethidium

**BSTM** : Botrytis Spore Trap Medium

**dNTP** : désoxyriboNucléotide Tri-Phosphate

**EDTA** : éthylène diamine tétra acétique

**GML**: Génotype MultiLocus

**Ha** : Hectare

**HR** : Humidité Relative

**MAT**: mating type gene

**MEA** : Malt Extract Agar

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PDA**: Potato Dextrose Agar

**RAPD**: Random Amplification of Polymorphic DNA

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphisms

**T** : Température

**T<sub>m</sub>** : Température moyenne.

**T<sub>max</sub>** : Température maximale.

**T<sub>min</sub>** : Température minimale.

**TAE** : Tris, Acétate, EDTA

**UV**: Ultra Violet

## Glossaire

**Agressivité** : Pouvoir pathogène d'un parasite défini par rapport à la résistance horizontale de variétés de l'hôte.

**Amorce** : Oligonucléotide qui, hybridé avec une matrice d'acide nucléique, permet à une enzyme polymérase d'initier la synthèse du brin complémentaire.

**Anamorphe** : Se dit de la phase ou de la forme asexuée des champignons.

**Apothécie** : Formation reproductrice particulière aux Ascomycètes et aux lichens caractérisée par sa forme de coupe ouverte au sein de laquelle se localise l'hyménium.

**Appressorium** : Organe de fixation et de pénétration des champignons dans les plantes.

**Asque** : Cellule spécialisée chez les Ascomycètes à l'intérieur de laquelle se forment les spores sexuées.

**Clone** : Ensemble de la descendance asexuée d'un génotype déterminé.

**Conidie** : Spore participant à la reproduction asexuée du champignon formée à l'extrémité d'un conidiophore.

**Conidiophore** : Hyphe aérien spécialisé qui produit à son extrémité plusieurs conidies.

**Electrophorèse** : Technique permettant de séparer des molécules en fonction de leur taille (ou poids moléculaire) en les faisant migrer à travers un gel par application d'un champ électrique. Plus la taille des molécules est faible, plus loin elles migrent sur le gel.

**Fluorochrome** : Substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

**Génotype** : Ensemble ou partie de la composition génétique d'un individu.

**Haplotype** : Génotype d'un organisme haploïde. Dans la présente étude, il s'agit de l'ensemble des tailles d'allèle des microsatellites pour un individu (haploïde).

**Hôte (plante)** : organisme utilisé comme support de développement de l'agent pathogène. Ici, il faut distinguer la plante hôte d'origine des souches sur laquelle les souches ont été isolées, de la plante sur laquelle elles sont testées.

**Hyphe** : Filament tubulaire (ramifié ou non) constituant l'appareil végétatif filamenteux des champignons.

**Inoculum** : Terme générique qui désigne tout élément d'un parasite capable d'infecter l'hôte.

**Isolat** : Matériel biologique prélevé sur un organisme vivant, en vue de son étude ou de sa culture *in vitro*.

**Microsatellite** : Série de nucléotides dans le génome d'un individu formant une ou plusieurs répétitions d'un motif court.

**Mycélium** : Appareil végétatif d'un champignon constitué d'un ensemble d'hyphes.

**Nécrotrophe**: Organisme pathogène dont la première phase au moins de l'installation nécessite la nécrose des tissus.

**Phénotype** : Aspect observable d'un organisme déterminé par son génotype et l'environnement.

**Phytopathogène** : Qui cause une maladie chez les plantes.

**Saprophyte** : Organisme capable de se nourrir de matière organique en décomposition.

**Souche** : Microorganisme fongique ou bactérien échantillonné sur un hôte infecté et qui a été caractérisé génotypiquement et/ou phénotypiquement.

**Téléomorphe** : Se dit de la phase ou de la forme sexuée des champignons.

**Virulence** : Composante qualitative du pouvoir pathogène. Aptitude d'un agent pathogène à causer des troubles chez l'organisme hôte.

## Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. <i>B. cinerea</i>, agent de la pourriture grise</b> .....	<b>7</b>
I.1. Position taxonomique .....	7
I.2. Cycle de développement de la pourriture grise .....	8
I.3. Gamme d'hôte .....	10
I.4. Importance de la pourriture grise .....	11
<b>II. Facteurs influençant l'infection et le développement de <i>B. cinerea</i></b> .....	<b>12</b>
II.1. Les conditions environnementales.....	12
II.1.1. La température .....	13
II.1.2. L'humidité relative et la période de ventilation .....	14
II.1.3. Les méthodes d'irrigation.....	16
II.1.4. La lumière .....	16
II.2. Les facteurs physiologiques .....	17
II.2.1. La susceptibilité de la plante hôte .....	17
II.2.2. La nutrition de la plante hôte .....	18
II.2.3. La présence des blessures sur plante .....	19
<b>III. Variabilité phénotypique de <i>B. cinerea</i></b> .....	<b>21</b>
III.1. Morphotypes .....	21
III.2. Sensibilité à la qualité de la lumière.....	21
III.3. Agressivité sur la plante.....	21
III.4. Sensibilité aux fongicides .....	22
<b>IV. Variabilité génétique de <i>B. cinerea</i></b> .....	<b>23</b>
IV.1. Spéciation cryptique au sein des populations de <i>B. cinerea</i> .....	23
IV.2. Structure génétique des populations .....	24
IV.3. Différenciation génétique des populations.....	25
<b>V. Stratégies de lutte en culture de tomates</b> .....	<b>26</b>
V.1. Lutte chimique .....	26
V.2. Lutte biologique .....	26
V.3. Mesures prophylactiques .....	27

## PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

<b>Chapitre I : Isolement, purification et caractérisation morphologique des isolats de <i>B. cinerea</i></b> .....	<b>29</b>
I.1. Matériel et Méthodes .....	<b>30</b>
I.1.1. Choix des sites d'échantillonnages .....	<b>30</b>
I.1.2. Méthodes d'isolement .....	<b>31</b>
I.1.3. Purification des isolats par la technique monospore .....	<b>31</b>
I.1.4. Stockage et lyophilisation des isolats monospores.....	<b>32</b>
I.1.5. Caractérisation morphologique .....	<b>33</b>
I.2. Résultats et discussion .....	<b>34</b>
I.3. Conclusion .....	<b>39</b>
<b>Chapitre II : Effet de la température sur développement de la pourriture grise..</b>	<b>40</b>
II.1. Matériel et méthodes .....	<b>41</b>
II.1.1. Effet de la température et de développement de la pourriture grise dans les serres commerciales de tomate.....	<b>41</b>
II.1.2. L'effet de la température sur la vitesse de croissance mycélienne .....	<b>43</b>
II.1.3. L'effet de la température sur la germination des spores .....	<b>44</b>
II.2. Résultats et discussion .....	<b>45</b>
II.3. Conclusion.....	<b>51</b>
<b>Chapitre III : Effet des températures élevées sur l'agressivité des souches de <i>B.cinerea</i> isolées dans deux régions différentes Europe (France et Norvège) et Algérie.....</b>	<b>52</b>
III.1. Matériel et méthodes .....	<b>53</b>
III.1.1. Choix de souches .....	<b>53</b>
III.1.2. L'effet de la température sur la vitesse de croissance mycélienne.....	<b>53</b>
III.1.3. Effet de l'inoculum primaire de <i>B. cinerea</i> produit à 21°C sur l'agressivité des folioles de tomate à des températures élevées .....	<b>54</b>
III.1.4. Effet de l'inoculum primaire produit à des températures élevées sur l'agressivité de <i>B. cinerea</i> sur les folioles de tomates .....	<b>55</b>
III.1.5. Effet de l'inoculum primaire de <i>B. cinerea</i> sur l'agressivité des plantes entières de tomate.....	<b>56</b>
III.2. Résultats et discussion .....	<b>61</b>
III.3. Conclusion.....	<b>69</b>

<b>Chapitre IV : Etude de la structure et la diversité génétique des populations de <i>B. cinerea</i> isolées en Algérie</b> .....	<b>71</b>
IV.1. Matériel et Méthodes.....	<b>72</b>
IV.1.1. Échantillonnage fongique .....	<b>72</b>
IV.1.2. Extraction de l'ADN .....	<b>72</b>
IV.1.3. Amplification des microsatellites.....	<b>73</b>
IV.1.4. Détermination de la taille des microsatellites .....	<b>74</b>
IV.1.5. Les analyses de la génétique de la population.....	<b>75</b>
IV.1.6. La différenciation génétique entre sous-populations .....	<b>76</b>
IV.2. Résultats et discussion.....	<b>77</b>
IV.3. Conclusion.....	<b>85</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	<b>88</b>
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>92</b>

# Introduction Générale

**Introduction générale****Situation du sujet**

Depuis sa découverte au 16<sup>ème</sup> siècle et ses premiers pas dans la domestication, la tomate est devenue l'une des cultures légumières les plus importantes sur le plan économique dans le monde entier. La production mondiale de la tomate augmente avec les besoins sans cesse grandissant de l'augmentation de la population mondiale.

Aujourd'hui, elle est l'un des légumes les plus consommés dans le monde, après la pomme de terre et les oignons (**Bergougnoux, 2014**). La tomate n'est pas seulement commercialisée dans le marché du frais, mais également utilisée dans l'industrie de transformation. Sa production a atteint près de 160 millions de tonnes à travers le monde en 2011 (**FAOSTAT, 2011**). Au cours des 20 dernières années, la surface dédiée à cette culture a doublé. Elle est passée de 2.25 à 4.50 millions Ha. Étonnamment, alors qu'il y a 20 ans, l'Europe et l'Amérique étaient les producteurs les plus importants. Aujourd'hui l'Asie domine le marché mondial et la Chine est le premier producteur (**FAOSTAT, 2011**). L'augmentation récente de la production de la tomate répond à l'augmentation de sa consommation, pour atteindre une moyenne de 20,5 kg/habitant/an en 2009. D'un point de vue général, c'est dans les pays méditerranéens et arabes que la consommation de la tomate est la plus élevée avec une moyenne de 40 à 100 kg/habitant/an (**Bergougnoux, 2014**).

Dans le bassin Méditerranéen, la superficie consacrée à cette culture a augmenté durant la dernière décennie pour atteindre 1 million Ha en 2011 alors qu'elle était de 800000 Ha en 2001 (**FAOSTAT, 2013**). En Algérie, la culture de la tomate occupe une place importante dans l'économie nationale, tant sur le plan des superficies que sur le plan de la production. C'est la principale culture sous serre avec une superficie de 2945 ha en 2011, générant une production moyenne de 3 millions de quintaux, soit 38% de la production totale de tomate (**MADR, 2011**).

L'un des facteurs limitant les rendements de tomates est dû au stress biotique représenté par les parasites destructeurs qui peuvent causer des pertes économiques importantes (**Bai et Lindhout, 2007**). Cette culture est la cible de plus de 200 micro-organismes et ravageurs nuisibles causant des maladies sur toutes les parties de la plante (**Blancard, 2009**). Parmi ces bio-agresseurs, les champignons

phytopathogènes sont les agents les plus dommageables. *Botrytis cinerea*, agent causal de la pourriture grise, apparaît comme le champignon le plus dévastateur des cultures de tomates sous serres. En se basant sur son intérêt scientifique et économique, *B. cinerea* a été classé récemment comme le 2<sup>ème</sup> champignon parmi les 10 premiers champignons phytopathogènes à dissémination aérienne (**Dean et al., 2012**). Ce champignon infecte les feuilles, les tiges, les fleurs et les fruits des tomates par pénétration directe, par contact avec les tissus infectés ou par les blessures (**Dik et Wubben, 2004 ; Agrios, 2005**).

Le mode de production de la tomate sous serres fournit un environnement idéal pour le développement de la pourriture grise en termes d'humidité et de température. Les facteurs favorables au développement des maladies sont aggravés par la densité élevée des plantes (2 plants/m<sup>2</sup>) ainsi que les manipulations fréquentes (effeuillages, ébourgeonnage) sont des conditions propices à l'établissement et à la dissémination de *B. cinerea*. Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'impact de ces deux principaux facteurs sur le développement de *B. cinerea*. Les climats frais caractérisés par des températures modérées (20-25°C) et une humidité élevée (>90%) à l'intérieur des serres constituent un environnement favorable pour le développement de l'épidémie (**Baptista et al., 2011 ; Yunis et al., 1990 ; O'Neill et al., 1997 ; Elad et al., 1992 ; Keressies, 1994**).

Les pertes causées par *B. cinerea* sont très difficiles à estimer en raison de la large gamme d'hôtes (plus de 230 plantes hôtes). Dans les cultures de tomates sous serres, la pourriture grise pourrait être responsable des pertes de production de 20%. Malgré l'efficacité de la lutte biologique dans certaines cultures (**Moser et al., 2008**), L'application de fongicides reste la méthode commune pour contrôler ce champignon. Le coût moyen pour le contrôle chimique de *B. cinerea* est d'environ 40 €/ha (**Steiger, 2007**) et les traitements fongicides contre *B. cinerea* pourraient représenter environ 60% du total des fongicides utilisés sur une saison de culture (**Prieto et al., 2003**). Au total, les dépenses globales consacrées pour le contrôle de *B. cinerea* (mesures culturales, Botryticide, fongicides à large spectre, la lutte biologique) dépassent facilement 1 million €/an. Malgré les efforts consacrés au contrôle de la maladie, les pertes de cultures et de production sont susceptibles d'être beaucoup plus élevées (**Dean et al., 2012**).

La situation de cette maladie en Algérie n'est pas très bien étudiée et peu d'informations sont disponibles. Dans les cultures légumières sous abris en Algérie, la pourriture grise, causée par *B. cinerea*, est l'une des plus graves maladies aériennes, tant en terme d'incidence qu'en terme de difficultés rencontrées par les producteurs pour sa gestion (**Aissat, 2000**). L'impact de pourriture grise dans les cultures de tomates sous serres a été étudié par **Aissat et al., (2008)**. Ils ont montré que le taux de mortalité des plantes infectées atteint les 20 %. Cette situation se trouve aggravée par le fait que le système de production sous serre se caractérise par des conditions microclimatiques qui favorisent le développement de différents bio-agresseurs (**Eden et al., 1996 ; Baptista et al., 2011**).

Actuellement les scientifiques se sont orientés vers la gestion intégrée de la pourriture grise par l'intégration de toutes les méthodes de luttés et par l'exploration des connaissances sur l'épidémiologie de *B. cinerea*. Les études épidémiologiques permettront d'envisager des programmes de lutte rationnels et souvent moins coûteux pour maîtriser la pourriture grise. C'est dans cette perspective que s'inscrit le travail présenté dans ce manuscrit.

**Les hypothèses et les objectifs de notre travail ont été formulés comme suit :**

- **Existe-t-il une variabilité phénotypique à l'intérieur des populations locales de *B. cinerea* ? et quels sont les morphotypes dominants dans les populations de *B. cinerea* en Algérie ?**

Pour les études de population de ce champignon et sur les espèces cryptiques de *Botrytis pseudocinerea* (**Walker et al., 2011**), des échantillons de terrain (sous serres) sont systématiquement recueillis à partir des lésions porteuses de spores (**Fournier et Giraud, 2008**). En raison de la présence possible sur une même lésion de spores ayant des propriétés différentes (**Giraud et al., 1997 ; Munoz et al., 2002**), de tels échantillons sont souvent soumis à l'isolement de spore unique avant d'effectuer des test de caractérisation phénotypique et génotypique.

- **Serait-il possible que la pourriture grise soit capable de se développer dans des conditions de température très élevée (>30 °C), qui caractérise la période de culture de la tomate sous serres dans la région de Bejaia ?**

La température est considérée comme l'un des facteurs environnementaux les plus importants qui influence le développement de la pourriture grise dans une

variété de cultures en serre (**Baptista et al., 2011 ; Elad et al., 1988 ; Yunis et al., 1990**). Dans les serres de tomates, le développement de la pourriture grise est connu pour être dépendante de la phase de croissance des plantes (**Davidson et Krysinska-Kaczmarek, 2007**). L'effet de la température de l'air à l'intérieur des serres sur la progression de la pourriture grise n'est pas bien étudié avec le modèle de la tomate pendant les périodes chaudes (été) sous serres en conditions commerciales.

- **Et si oui, existe-t-il une adaptation aux températures élevées des isolats locaux de *B. cinerea* isolés dans les serres non chauffées de tomates situées dans une région chaude (Algérie) comparées avec ceux isolés dans une région froide (Europe : France et Norvège) ?**

Divers facteurs externes ou dépendant de la plante hôte sont impliqués dans les premiers stades de l'infection, du développement de la maladie et de la sporulation de *B. cinerea* (**Elad et Yunis, 1993 ; Yunis et al., 1990**). Cependant, l'infection de la tomate est favorisée par le taux élevé d'humidité à des températures basses (**Morgan, 1984 ; O'Neill et al., 1997**), par contre à des températures plus chaudes, la fréquence de *B. cinerea* sur des plaies de tiges a été fortement réduite (**Eden et al., 1996**). **O'Neill et al., (1997)** ont montré que la température optimale pour l'infection de la tomate variait entre 10 et 20 °C, mais l'infection peut se produire même au-dessus 25 °C. La lutte climatique tel que l'utilisation de la température peut aider à déterminer les conditions qui empêchent le développement de la pourriture pendant la croissance de la tomate (**Yunis et al., 1990 ; Baptista, 2007**).

- **Quel est le profil génétique des populations de *B. cinerea* en Algérie ? Existe-t-il une variabilité génétique à l'intérieur des populations locales de *B. cinerea* ?**

La propagation de l'inoculum au-delà de la proximité d'une serre a un impact potentiel sur les pratiques de gestion de la maladie. La caractérisation moléculaire des isolats et l'utilisation des outils de la génétique des populations offrent la possibilité d'une approche indirecte à ce sujet par la comparaison des sous-populations éloignées de l'agent pathogène. Dans le cas de *B. cinerea*, les marqueurs microsatellites sont disponibles (**Fournier et al., 2002**) et des études antérieures ont montré un niveau élevé de diversité parmi les isolats de ce champignon sur une grande variété de cultures, ce qui permet de comparer les

structures de la population (**Fournier et Giraud, 2008 ; Isenegger et al., 2008a; Karchani-Balma et al., 2008**). Bien que les populations de *B. cinerea* ont été bien caractérisées dans différentes régions du monde (**Zhonghua et al., 2005 ; Fournier et Giraud, 2008 ; Decognet et al., 2009 ; Mirzaei et al., 2009 ; Esterio et al., 2011 ; Fekete et al., 2012**), les informations sont rares pour les pays d'Afrique du Nord (**Karchani-Balma et al., 2008**).

Afin de tester ces hypothèses de recherches, nous avons opté pour la méthodologie suivante :

**La première partie** de ce document rapporte une synthèse bibliographique sur *B. cinerea*, l'importance de la pourriture grise dans les cultures légumières ainsi que quelques généralités sur les facteurs influençant *B. cinerea* et les méthodes de luttés utilisées pour gérer cette maladie.

**La partie II** se présente sur quatre chapitres :

Dans **le chapitre 1** nous avons caractérisé les morphotypes de tous les isolats de *B. cinerea* collectés durant 03 saisons culturales, ainsi que les techniques d'échantillonnage et d'isolement utilisées.

Dans **le chapitre 2**, nous avons mis en place un protocole expérimental dans les serres de tomates auprès des agriculteurs de la région de Béjaia, afin de suivre la cinétique du développement de l'épidémie durant l'été. Nous avons aussi étudié dans ce chapitre l'effet des températures élevées sur la vitesse de croissance mycélienne, la germination des spores *in vitro* des isolats locaux de *B. cinerea*.

Dans **le chapitre 3**, une étude comparative a été entreprise entre les isolats collectés en Algérie et les isolats collectés en France et en Norvège. Dans un premier temps, la comparaison a porté sur l'effet des températures élevées vis-à-vis de la vitesse de croissance mycélienne *in vitro*. Dans un second temps, elle a porté sur l'évolution de l'agressivité de ces isolats sur des folioles et sur des plantes entières de tomates en conditions contrôlées.

Dans **le chapitre 4**, nous avons caractérisé le profil génétique des populations de *B. cinerea* en Algérie durant plusieurs saisons de cultures. Dans ce chapitre nous avons étudié la diversité génétique de chaque population, le mode de reproduction, la dispersion des génotypes entre les régions étudiées et l'impact de la géographie sur la différenciation génétique des populations de *B. cinerea*.

Le but de notre approche est d'apporter quelques éléments de réponse afin de mieux comprendre l'épidémiologie (la dispersion des isolats), la variabilité génétique et phénotypique des populations de *B. cinerea* qui sont des éléments indispensables pour l'élaboration d'un programme de production intégrée de la culture de tomate en Algérie. Ce travail est une contribution pour la valorisation des méthodes de lutte alternatives et durables.

Partie I :  
Synthèse bibliographique

## I. *B. cinerea*, agent de la pourriture grise

Le genre *Botrytis* a été reconnu pour la première fois par Micheli en 1729 où il a été répertorié dans son livre «Nova Plantarum Genera» (**Coley-Smith et al., 1980**). Au début il a été confondu avec *Sclerotinia spp.* Par la suite, des précisions ont été apportées par **Smith, (1900)** et finalement la confusion a été dissipée par **Whetzel (1945)**. Le genre, a été redéfini en 1973 par Hennebert, ce genre comprend 22 espèces dont la plupart ont un spectre d'hôtes restreint comme par exemple *B. tulipae* sévissant sur les tulipes, *B. fabae* sur les légumineuses ou *B. squamosa* sur les oignons (**Hennebert, 1973**). Au contraire, *B. cinerea* est un champignon ubiquitaire et on dénombre de nombreuses espèces de plantes végétales, ornementales et fruits sur lesquelles il peut engendrer des dégâts sérieux avant et après la récolte (**Jarvis, 1992 ; Williamson et al., 2007**).

### I.1. Position taxonomique

Le nom *Botrytis cinerea* a été attribué par Persoon en 1801 à un agent pathogène de la vigne. La classification de ce champignon comme beaucoup d'autres connaît une double classification :

- Une forme parfaite (téléomorphe), *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Wetz. C'est un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.
- Une forme imparfaite (anamorphe), *B. cinerea* Pers. C'est un Deutéromycète de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae.

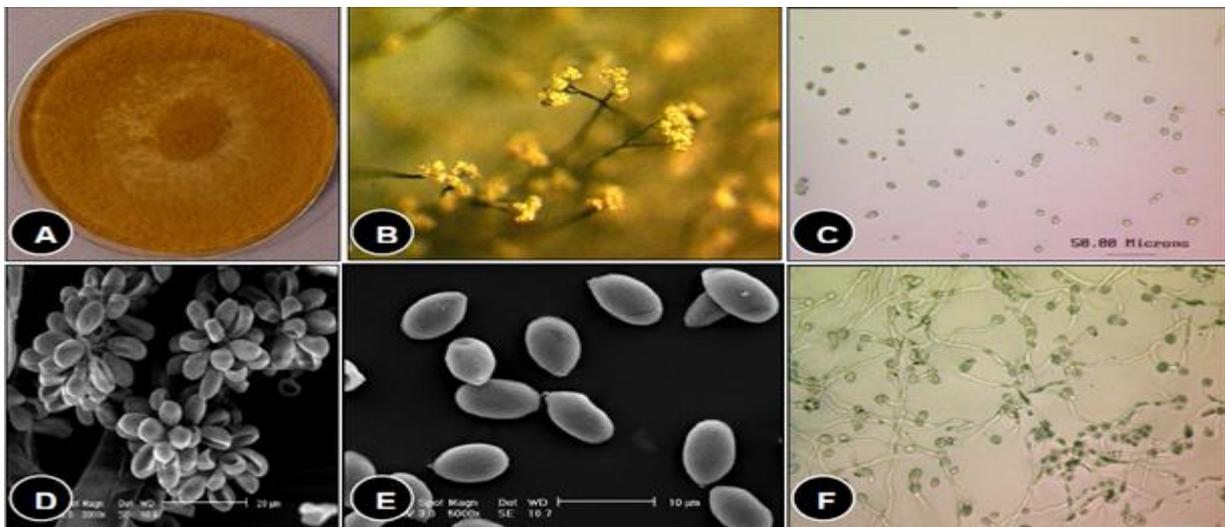
C'est de Bary (1866) qui a établi une relation génétique entre *B. cinerea* Pers., organisme asexué, et *Botryotinia fuckeliana* appelé au départ *Peziza fuckeliana*, organisme sexué. **Groves et Drayton, (1939)** ont observé pour la première fois, *in vitro*, la formation d'apothécies par *B. cinerea* confirmant ainsi le lien systématique entre les deux formes. C'est cependant le nom de *B. cinerea*, largement connu par les mycologistes et phytopathologistes qui a été retenu.

Actuellement, *B. cinerea* a été considéré comme un complexe d'espèces sympatriques. Selon de récentes analyses phylogénétiques, deux principaux groupes génétiques ont été identifiés, le groupe I et le groupe II. Le groupe I regroupe des isolats présentant une compatibilité végétative entre eux, c'est-à-dire

ayant la capacité de former un hétérocaryon viable par la fusion des hyphes (Fournier *et al.*, 2005), et une sensibilité réduite au fongicide anti-Botrytis fenhexamid (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003). Walker *et al.*, (2011) ont mis en évidence une nouvelle espèce nommée *Botrytis pseudocinerea* (groupe I), qui est morphologiquement identique aux isolats de *B. cinerea* (groupe II), mais qui peuvent être identifiés par la taille de l'allèle situé sur le locus Bc6.

## I.2. Cycle de développement de la pourriture grise

Lorsque les conditions deviennent favorables, *B. cinerea* fructifie pour donner des conidies (Figure 1 et 2). Ce champignon produit des conidies sur de très nombreux substrats. Le développement des conidies se manifeste par la production de conidiophores dressés en touffes souvent étendues, constituant un feutrage intense gris (Figure 1). Les conidies prennent une part importante dans la dissémination du champignon. Les conidies sont produites dès le printemps dans le cas de culture en plein champ. En revanche, elles peuvent être produites en continue, selon les conditions climatiques, dans le cas de cultures sous serre. Leur libération est favorisée par un climat humide, puis elles sont transportées par le vent, la pluie et les insectes (Holz *et al.*, 2004).



**Figure 1. 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). Conidiophores 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).**

Au cours de son cycle biologique, *B. cinerea* peut produire du mycélium, des spores sexuées et asexuées (**Figure 2**). Le mycélium de *B. cinerea* comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelquefois vésiculeux au niveau de la cloison médiane, dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des touffes de conidiophores grisâtres. Parfois, ce mode de multiplication peut disparaître et laisser la place à une prolifération mycélienne blanche qui correspond à l'élongation d'hyphes grêles (**Viennot, 1965**). Le mycélium peut se conserver dans les débris de plantes de la culture précédente (**Figure 2**).

Lorsque les conditions deviennent défavorables au développement du mycélium et des spores, des sclérotés se forment. Ils sont constitués par du mycélium agrégé blanchâtre. En vieillissant, ils durcissent et deviennent noirâtres (**Figure 2**). Ils sont composés d'un cortex de cellules épaisses formant une mince barrière de cellules pseudo-parenchymateuses composée d'hyphes filamenteux (**Coley-Smith, 1980**). Au printemps, les sclérotés peuvent germer et produire du mycélium ou des spores. Ils peuvent également être à l'origine de la formation des apothécies (**Coley-Smith et Cooke, 1971**). **Van den Ende et Pennock, (1996)** ont observé que la formation de sclérotés sur les débris végétaux de lys se produit préférentiellement après la récolte entre le mois d'octobre et décembre. La large gamme de température (5-25 °C) à laquelle sont formés les sclérotés suggère que leur formation au champ est rarement limitée par la température (**Lorbeer et al., 2004**).

Lorsque les conditions sont favorables, les sclérotés peuvent germer pour produire des apothécies (**Figure 2**). Les apothécies sont obtenues par le croisement d'isolats sexuellement compatibles portant des allèles de type sexuel différents, MAT1-1 et MAT1-2 (**Faretra et al., 1988**). Les descendants issus d'un croisement entre 2 souches sont tous hétérothalliques et transportent l'un ou l'autre allèle du gène de type sexuel (**Beever et Weeds, 2004 ; Delcán et Melgarejo, 2002 ; Faretra et al., 1988**). Les apothécies contiennent des asques linéaires contenant eux-mêmes des ascospores (**Beever et Weeds, 2004**). Chaque asque contient quatre paires d'ascospores. Les noyaux de chaque paire d'ascospores sont génétiquement identiques car produits par une division mitotique de l'un des quatre produits de la méiose (**Faretra et Antonacci, 1987 ; Lorenz et Eichhorn, 1983**). Bien que les

apothécies soient rarement observées au champ (Faretra et Antonacci, 1987 ; Faretra et al., 1988). Certaines études montrent que les ascospores peuvent avoir une importance épidémiologique. Par exemple chez *B. cinerea*, les ascospores libérées peuvent infecter les feuilles d'oignon au champ et par conséquent, servir de source d'inoculum primaire du champignon (Lorbeer et al., 2004). D'autre part, de récentes études de génétique des populations semblent indiquer que la reproduction sexuée est plus importante que généralement supposée (Beever et Weeds, 2004). Malgré la rareté d'observation des apothécies dans la nature, elles peuvent être obtenues au laboratoire (Faretra et al., 1988). Leur production est déclenchée par des conditions stressantes défavorables à la multiplication végétative comme par exemple une température élevée, une humidité relative réduite ou un appauvrissement nutritionnel du milieu (Urbasch, 1984).

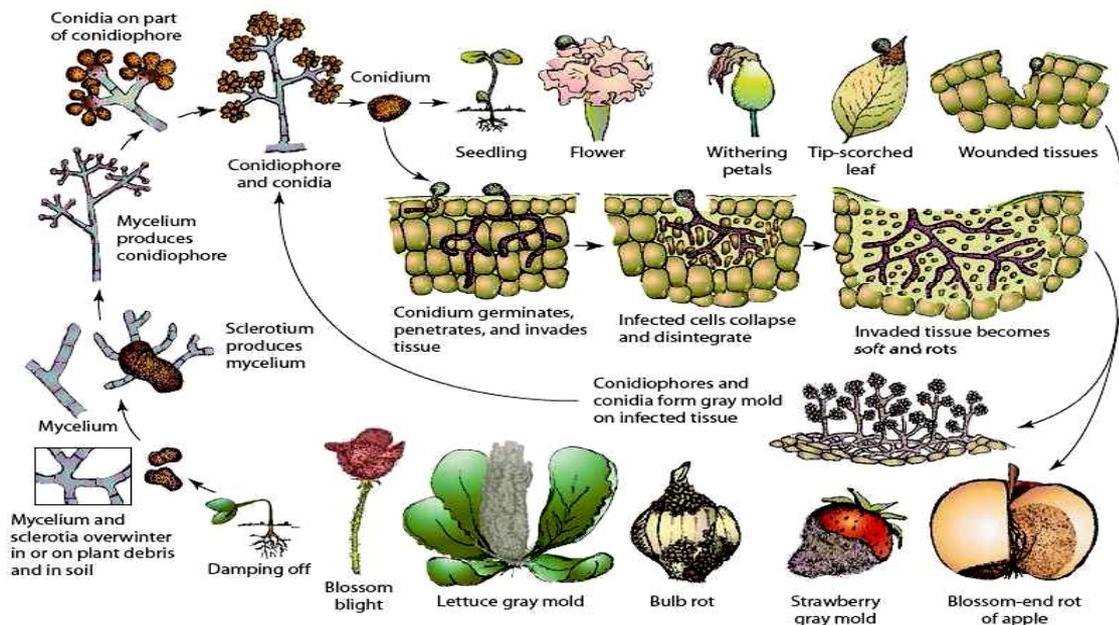


Figure 2. Cycle de développement (production asexuée) de *B. cinerea* sur différentes culture (Agrios, 2005).

### I.3. Gamme d'hôte

*B. cinerea* est un champignon polyphage capable d'attaquer plus de 230 espèces de plantes végétales (Jarvis, 1980 ; Agrios, 2005). Il affecte de

nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ, comme par exemple : le raisin, la pomme, la poire, la cerise, la fraise et le kiwi en production fruitière, l'aubergine, la carotte, la laitue, le concombre, le poivron, la tomate, la courgette en production légumière ou des plantes ornementales comme la rose, le gerbera ou le cyclamen. Ce champignon est responsable de lourdes pertes économiques sur de nombreuses cultures (**Gullino, 1992**). Un exemple de cette large gamme d'hôtes est présenté dans la **Figure 3**.



**Figure 3. Symptômes causés par l'agent pathogène *B. cinerea* sur différents hôtes (Source INRA).**

#### **I.4. Importance de la pourriture grise**

Ce champignon, ubiquiste et polyphage, est observé sur la tomate dans pratiquement toutes les zones de production dans le monde, ou il peut être à l'origine de dégâts ponctuellement importants. Il peut attaquer plusieurs organes comprenant les feuilles, tiges et les fruits, souvent il cause des dégâts très importants (**Eden et al., 1996 ; Elad, 1995**). En cultures sous serres, les risques d'attaque par ce champignon pathogène sont permanents sur par exemple, la tomate, le poivron, la laitue ou la fraise (**Jarvis, 1992**). Dans les serres chauffées de tomates, l'infection des blessures peut résulter des chancres sur tiges ou ils peuvent directement

détruire la plante entière (**Decognet et al., 2010**). Dans une étude utilisant 15 serres non chauffées dans le sud de la France, (**Nicot et Baille, 1996**), ont montré que l'incidence de *B. cinerea* durant le mois de Mai et Juin 1991 était comprise entre 32 et 100%, la mortalité des plantes atteignait 46% dans certaines serres. Dans une enquête plus large menée dans la même région de culture à la fin du mois d'Avril 1993, par **Terrentroy, (1994)** a montré que les attaques de *B. cinerea* ont été trouvés dans 58 sur 73 serres de tomates étudiées et la mortalité des plantes a été observée dans 31 serres. Ce pathogène peut causer la destruction partielle ou totale de la plante hôte et dans certains cas toute la culture. Il est considéré comme un problème majeur de la viticulture dans le monde (**Martinez et al., 2005**), avec des pertes estimées chaque année à 2 Milliards de dollars (**Elmer et Michailides, 2004a**).

Les pertes estimées dans les vignobles français s'élèvent entre 15 et 40% au cours de la récolte, en fonction des conditions météorologiques. En Champagne, les taux d'infection peuvent atteindre 15 à 25% selon les années (**Cilindre et al., 2007**). Dans les cultures protégées, par exemple les tomates, les poivrons, la laitue et les fraises, le risque d'attaque par ce champignon est toujours fréquent (**Jarvis, 1992**). Pour combattre la maladie, l'utilisation de fongicides entraîne des coûts financiers importants. Le marché mondial des produits de contrôle de *B. cinerea* est estimé entre 15 et 25 millions de dollars par an (**Elad et Stewart, 2004**).

## **II. Facteurs influençant l'infection et le développement de *B. cinerea***

### **II.1. Les conditions environnementales**

La maladie se développe en raison de la combinaison de plusieurs éléments durant une saison de la plante hôte sensible, de la présence de l'agent pathogène et des conditions environnementales favorables sur une longue période. En fait, les épidémies commencent avec la première introduction de l'agent pathogène, lorsque l'inoculum pénètre dans un hôte sensible à un environnement favorable.

Le développement de la pourriture grise passe par plusieurs étapes, à savoir la germination des spores, l'infection, la propagation du mycélium dans les tissus infectés, la sporulation et la dispersion. L'épidémie est influencée par toutes ces étapes et par la sensibilité du tissu de l'hôte, la survie des spores en dehors de la saison de culture et l'état physiologique de l'hôte. Au cours du processus d'une épidémie, il est difficile de déterminer l'influence des conditions météorologiques sur chaque composant de la maladie (**Jarvis, 1989**).

Les conditions de culture sous serre sont très différentes de celles en plein champ. Les plantes et les agents pathogènes peuvent se développer au cours des différentes saisons, ce qui est limité dans les conditions en plein champ. Le comportement de la même maladie sur le même hôte peut varier en fonction du type de serre utilisée. Les facteurs climatiques à l'intérieur des serres qui affectent la variation de développement de la maladie comprennent le type de système de chauffage, l'architecture de la serre, le matériau de revêtement, le système de ventilation et de l'irrigation, le milieu de culture, la direction générale de la culture et les facteurs qui influent sur l'interaction entre les agents pathogènes et leurs hôtes **(Elad, 1999)**.

La combinaison entre les facteurs influençant la fréquence et la gravité de la maladie ne sont pas très bien connus **(Elad et Shtienberg, 1995)**. La plupart des épidémies se produisent dans des conditions fraîches et humides, ce qui favorise l'infection et peuvent aussi prédisposer l'hôte de devenir plus sensible **(Jarvis, 1980)**. Les facteurs climatiques les plus importants qui influencent l'infection des plantes par *B. cinerea* sont souvent liés à une humidité relative élevée, humidité libre sur la surface des plantes et des températures modérées **(Smith, 1970 ; Blakeman, 1980)**. D'autres facteurs qui influent sur l'infection de la plante sont l'intensité de la lumière, l'humidité du sol, l'état nutritionnel, les traitements hormonaux et les dommages mécaniques, tels que l'effeuillage **(Elad et al., 1992)**. Ces conditions sont souvent amplifiées par le développement d'un couvert végétal luxuriant, ce qui réduit l'aération et l'éclairage, et facilite le développement de maladies.

### II.1.1. La température

*B. cinerea* possède plusieurs températures optimales pour chaque stade de son cycle biologique, ce qui rend difficile l'identification d'une température qui peut prévenir l'infection. De plus, parfois, la température optimale pour la croissance des plantes est comparable à la température pour le développement des agents pathogènes **(Jarvis, 1992)**, ce qui rend le contrôle de la maladie plus difficile. La température nocturne faible et une humidité relative élevée dans la serre prédisposent à la maladie.

Dans le **tableau I**, les plages de températures minimales, optimales et maximales ont été présentées pour les différentes étapes du développement de *B. cinerea*. L'effet de la température sur la croissance de *B. cinerea* a été étudié depuis

1912 (Jarvis, 1977). La température globale optimale pour la croissance végétative de la tomate est d'environ 20-25 °C, ce qui coïncide avec une température optimale pour la croissance de *B. cinerea* (Yoder et Whalen, 1975). O'Neill et al., (1997) ont observé que la température optimale pour l'infection des fleurs de tomates, les fruits et les feuilles se situait entre 10 et 20 °C, mais l'infection peut se produire même à 2 °C et au-dessus de 25 °C. Une interaction semble exister entre le temps et la température pour la germination des spores de *B. cinerea*. Haas et Wennemuth (1962) ont rapporté qu'à 1 °C, la germination des spores était de 80% en 40 jours à 10 °C dont il y avait 95% de germination à 14 jours.

Eden et al., (1996) ont rapporté que des températures plus chaudes peuvent réduire l'incidence de *B. cinerea* sur les plaies de plantes, mais contribuent à une augmentation des pertes des fleurs. Cet auteur a estimé qu'il est plus important de réduire l'infection sur les tiges. L'infection des fleurs accrue à des températures plus élevées est partiellement compensée par une meilleure croissance des plantes.

**Tableau I. Les plages de températures pour les différentes phases de développement de *B. cinerea*.**

Stade de développement	Nombre d'isolats	Plante hôte	T°C Min	T°C Max	T°C Opt	Plages de T °C	Référence
Croissance mycélienne	8	Poichiche	10	30	25	10,15,20,25,30	Pande et al., 2010
	1	Fleurs de tournesol	5	30	25	5,10,15,20,25,30	Kerssies, 1994
	2	Cerise	5	32	25	8,12,16,20,24,28,32	Chen et Hsieh, 2009
	44	-	5	35	25	5,10,15,20,25,30,35	Mirzaei et al., 2009
	10	Poichiche	5	30	20	5,10,15,20,25,30,35	Hosen et al., 2010
Germination de spore	3	Oignon	6	30	24	0,5,10,15,20,25,30	Ramsey et lorbeer, 1986
	1	Tournesol	4	30	25	4,15,20,25,30	Salinas et al., 1989
	1	Fleurs de tournesol	5	30	25	5,10,15,20,25,30	Kerssies, 1994
	2	Cerise	5	32	25	8,12,16,20,24,28,32	Chen et Hsieh, 2009
	1	Fleurs de fraise	5	30	20	5,10,15,20,25,30	Sosa-Alvarez et al., 1995
Sporulation	1	Feuilles de fraise	5	30	18	5,10,15,20,25,30	Sosa-Alvarez et al., 1995
	1	Fleurs de raisin	5	30	20	5,10,15,20,25,30	Nair et Allen, 1993
	8	Poichiche	10	30	25	10,15,20,25,30	Pande et al., 2010
	3	Oignon	9	27	21	0,5,10,15,20,25,30	Ramsey et lorbeer, 1986
L'infection des Plantes	1	Tournesol	4	30	25	4,15,20,25,30	Salinas et al., 1989
	1	Fleurs de tournesol	5	30	25	5,10,15,20,25,30	Kerssies, 1994
	1	Tige de tomate	5	26	15	0,10,20,30	O'Neill et al., 1997

T°C Min : Température minimale, T°C Max : Température maximale, T°C Opt : Température optimale

### II.1.2. L'humidité relative et la période de ventilation

La teneur en vapeur d'eau de l'air à l'intérieur d'une serre est déterminée par divers processus, dont la transpiration des cultures, la condensation, l'évaporation et la ventilation. Une humidité relative élevée et l'humidité libre sur la surface des

plantes sont considérées comme des facteurs environnementaux les plus importants qui favorisent l'infection par *B. cinerea*.

Dans des conditions d'humidité élevée prévalent principalement dans les serres non chauffées est un facteur majeur favorisant l'infection des feuilles par des spores de *B. cinerea*. L'augmentation de l'humidité et une mauvaise ventilation de la serre ont des effets néfastes sur le développement de la plante. Dans ces conditions, la translocation de certains ions et les hormones de la racine vers les pousses et les feuilles est réduite (**Elad, 1999**). Les spores de *B. cinerea* contiennent peu d'eau et ont besoin d'absorber de l'environnement humide à l'intérieur des serres. L'humidité libre est probablement nécessaire à la germination rapide et l'infection, une courte durée de l'humidité de la feuille peut provoquer la croissance et le développement de la maladie (**Nederhoff, 1997a**).

Le dépôt de rosée est l'un des facteurs les plus importants qui peuvent affecter une maladie. Une rosée se dépose sous forme de petites gouttelettes sur les fruits, les tiges et les feuilles au cours de la condensation. Lorsque l'humidité relative est élevée ceux-ci peuvent s'accumuler dans les grandes gouttelettes (**Jarvis, 1980**).

Le feuillage dense va restreindre la circulation de l'air et empêcher l'évaporation, afin que l'eau provenant de la condensation ou guttation puisse persister, ce qui augmente les risques d'infection de la maladie fongique (**Jarvis, 1980**). La présence de rosée et la persistance de l'eau libre sur la surface des plantes offrent des conditions dans lesquelles les spores fongiques peuvent germer et infecter l'hôte (**Jarvis, 1992 ; Lhomme et Jimenez, 1992**).

**Elad et al., (1992)** ont rapporté que l'infection par *B. cinerea* a été favorisée par une humidité relative supérieure à 91% dans une gamme de températures comprises entre 9 et 24 °C. L'infection a eu lieu 7 à 8 jours après que les symptômes étaient visibles. La germination des spores a été maximale lorsque l'humidité relative est supérieure à 95%. Pour une humidité relative de 90%, 80 à 85% des spores sont germées (**Wei, 1995**). Cet auteur a également étudié l'effet combiné de la température et de l'humidité relative sur la germination des spores. Lorsque l'humidité relative était de 95%, il a été observé que 80% des spores germées à 15 et 5 °C. A une température de 20 °C, il y avait 100% de germination à 100% d'humidité relative, 85% ont germé à 90% d'humidité relative.

**O'Neill et al., (1997)** ont conclu que dans des conditions sèches, la sporulation est inhibée, même si le développement de l'infection de la tige peut se produire. Une réduction de la sporulation peut ralentir la progression de l'épidémie dans une serre commerciale. **Nicot et Alex, (1991)**, ont montré que la tomate reste intacte même en présence d'eau libre qui est nécessaire pour la germination des spores pendant au moins 7 h.

### II.1.3. Les méthodes d'irrigation

Les méthodes d'irrigation peuvent également avoir des effets importants sur le développement des maladies des végétaux (**Rotem et Palti, 1969**). La pourriture grise a été moins développée sur les plantes arrosées par l'irrigation goutte à goutte par rapport à l'irrigation par rigole, ce qui a été associée à la différence de mouillure du feuillage (**McQuilken, 2001**). Cependant, l'irrigation par goutte-à-goutte n'a pas réduit la pourriture grise et cela peut être expliqué par un microclimat plus humide dans le couvert végétal, surtout à la base de la plante, ce qui peut encourager l'infection par *B. cinerea*. Les méthodes d'irrigation par goutte-à-goutte semblent être un élément utile pour la lutte intégrée contre la pourriture grise. La modification des pratiques d'irrigation pour réduire l'humidité des feuilles peut réduire la maladie chez certaines espèces de plantes ornementales (**O'Neill et McQuilken, 2000**). Les résultats de l'étude menée par **Aissat et al., (2008)** ont montré que le passage du système traditionnel d'irrigation à la rigole au système goutte-à-goutte dans la production de tomates sous serre pourrait avoir un effet bénéfique dans le contrôle de *B. cinerea*.

### II.1.4. La lumière

Le contrôle des longueurs d'onde de lumière dans la serre peut réduire l'accumulation de l'inoculum de *B. cinerea* et de réduire ainsi les épidémies de la pourriture grise (**Elad, 1997**). Plusieurs études ont été menées sur l'effet de la lumière sur la sporulation de *B. cinerea* (**Nicot et al., 1996 ; Elad, 1997**). Différentes gammes de longueur d'onde, peuvent promouvoir ou inhiber la sporulation de *B. cinerea*. L'ultra-violet (300 à 400 nm) et le rouge lointain (>720 nm) induisent la sporulation, tandis que le bleu (380-530 nm) inhibe la sporulation (**Elad, 1999**). Le contrôle de la pourriture grise sur tomate à l'aide d'un couvercle en polyéthylène qui réduit de façon significative l'irradiation UV (**Elad, 1999**).

Toutefois, la charge de spores dans des serres est en général élevée, **Elad (1997)** a indiqué que dans les serres commerciales, l'utilisation du polyéthylène pigmenté en vert réduit d'environ 35 à 75% la charge des spores et la pourriture grise sur la tomate et le concombre. **Nicot et al., (1996)** ont montré que l'incubation de *B. cinerea* sous un film contenant des additifs qui absorbent la lumière proche d'ultraviolet inférieure à 380 nm a entraîné une inhibition considérable de la production de spores. En outre, dans des serres de concombre et tomates au Japon (**Honda et Mizumura, 1991**) et en Israël (**Reuveni et al., 1989**), l'utilisation des films absorbant près d'ultra-violet entraîne la réduction de l'incidence de la pourriture grise par rapport aux films classique.

Les films en polyéthylène enrichi avec de l'acétate de vinyle et ou de silicate d'aluminium en tant que moyen pour réduire la transmission des rayons infra-rouges, fournissent un effet thermique, ainsi ils contribuent à l'élévation de la température et à la diminution de l'humidité des feuilles (**Vakalounakis, 1992 ; Elad, 1999**). Un exemple a été donné par **Elad et al., (1988)**, dans les serres de concombre non chauffées recouvertes de différents types de films de polyéthylène, avec ou sans blocage des rayons infrarouges. L'application de cette technique a montré que la non-persistence de la rosée sur les feuilles est le facteur limitant pour le développement de la pourriture grise dans un hiver relativement sec. Dans cette étude, la sévérité de la maladie sous différentes feuilles infra-rouge est en corrélation avec la durée de rosée. Dans un hiver pluvieux, les périodes de rosée étaient longues et la pourriture grise a été corrélée avec des heures d'études accumulées près de la température optimale pour le développement de la maladie (15-25 °C).

En général, le polyéthylène à infra-rouge thermique permet de réduire la durée de la rosée sur les plantes, mais la prolongation de la durée des températures favorables à l'épidémie. C'est l'une des difficultés dans le contrôle de la maladie, car il est nécessaire de connaître tous les facteurs qui permettent la réduction de la maladie sans influencer d'une manière négative la culture.

## **II.2. Les facteurs physiologiques**

### **II.2.1. La susceptibilité de la plante hôte**

Les plantes de tomates sont un hôte important pour *B. cinerea*, il est possible de trouver des cultivars de sensibilités différentes, mais aucun n'est résistant à *B.*

*cinerea* (Nicot et Alex, 1991 ; Elad et Shtienberg, 1995 ; Nicot et Baille, 1996 ; Nicot *et al.*, 1996 ; Lamboy, 1997).

Plusieurs facteurs internes et externes dépendant de la plante hôte jouent un rôle important dans le développement de la maladie. Certaines plantes présentent une résistance naturelle à certains agents pathogènes, qui empêchent le développement de la maladie. En outre, la même plante à différents âges peut avoir un comportement différent concernant le même agent pathogène. En conclusion, le développement de la maladie dépend de la combinaison plante-pathogène et la saison de culture (Agrios, 2005). Stall *et al.*, (1965) ont observé que la pourriture grise a eu lieu sur les plantes à feuillage dense en raison d'un microclimat plus favorable au développement de la maladie. Jarvis, (1977) a indiqué que les jeunes tissus de la tige des tomates sont plus infectés par rapport aux vieux tissus qui sont plus résistants à la croissance de *B. cinerea* et également à la germination des spores.

### II.2.2. La nutrition de la plante hôte

Du fait du peu de réserves énergétiques endogènes présents dans les spores de *B. cinerea*, ce champignon a besoin d'une source exogène de nutriments pour se développer (Yoder et Whalen, 1975). Les nutriments sont nécessaires à la germination des spores, au développement du mycélium, et à la formation des appressorium (Li *et al.*, 2004). D'après Blakeman, (1975), la présence à la fois de carbone et d'azote est nécessaire à la germination des spores du champignon. La germination de spores de différents isolats de *B. cinerea* est significativement plus faible dans l'eau que dans une solution nutritive (Clark et Lorbeer, 1977). Dans l'eau, le filament germinatif cesse de croître presque immédiatement après l'émergence du tube germinatif de la spore (Clark et Lorbeer, 1977). La présence de nutriments tels que le glucose et le fructose favorise la germination et l'élongation du filament germinatif (Clark et Lorbeer, 1977) et permettent à des spores âgées de retrouver leurs pouvoir germinatif (Shiraishi *et al.*, 1970b). Ainsi l'addition de saccharose, maltose, lactose, mannose, galactose ou xylose stimule la germination des spores de *B. cinerea* âgées de plus de 40 jours (Shiraishi *et al.*, 1970b). La pulvérisation des feuilles d'oignons avec des spores de *B. cinerea* en suspension dans l'eau n'aboutit pas à des lésions, mais l'ajout d'une source d'éléments nutritifs

(sucres et minéraux) entraîne la formation des lésions (**Clark et Lorbeer, 1977**). **Yoder et Whalen, (1975)** ont montré que la germination des spores et la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* obtenues sur le chou nécessite une source externe de nutriment. La capacité d'infection des spores sur les tissus de chou dépend aussi d'une source exogène de nutriments (**Yoder et Whalen, 1975**). Les éléments nutritifs requis pour l'infection peuvent être fournis sous forme de glucose, d'extrait de feuille de chou, de milieu PDA (extrait de pomme de terre-dextrose agar), ou par une blessure au point d'inoculation. La concentration des éléments nutritifs influence la capacité de *B. cinerea* à provoquer la pourriture des tissus (**Yoder et Whalen, 1975**).

### II.2.3. La présence des blessures sur plante

Les spores de *B. cinerea* infectent les tissus végétaux dans des conditions d'humidité relative élevée, mais généralement elles ne peuvent pas envahir le tissu sain (vert) comme les feuilles et les tiges, sauf si une zone blessée ou morte est présente. La pénétration des spores se fait en présence des blessures, à l'exception des tissus à faible résistance tels que les pétales de fleurs. Tout agent qui provoque une plaie dans une surface de la plante rend celle-ci très sensible à l'infection par *B. cinerea* (**Jarvis, 1977**).

Dans les cultures sous serre, les opérations courantes de la transplantation, l'effeuillage, la superposition, l'élagage et la récolte peuvent provoquer des blessures ou des dommages aux plantes. Les agents pathogènes peuvent pénétrer dans les tomates par les blessures et les ouvertures naturelles telles que les stomates des feuilles ou des fruits poils (**Wei, 1995**). L'effeuillage est une pratique habituelle dans les cultures de tomates, car il permet une meilleure circulation de l'air entre les plantes en améliorant les conditions microclimatiques, mais en même temps provoque des plaies et ainsi créer les conditions idéales pour l'infection de *B. cinerea*. Les feuilles et les fruits qui ont été brûlés peuvent être des sites potentiels d'infection de *B. cinerea*. Lorsque les fruits ou les feuilles sont retirés de la plante, une petite goutte d'eau peut exsuder sur la surface de la coupure, qui est finalement réabsorbées dans le xylème. Si les spores de *B. cinerea* étaient présente dans la dernière goutte, elles entrent dans le xylème et se logent dans les touffes quelques millimètres sous la surface de coupure.

**Jarvis, (1992)** a signalé que *B. cinerea* peut souvent être trouvé sur les cotylédons cassés et des contusions de pincement sur les semis et sur les plaies générées lors de la taille. **O'Neill, (1994)** a constaté que certaines infections des feuilles de plantes de tomates ont suivi les dommages physiques et le champignon lui-même habituellement établis sur des tissus blessés avant de développer la pourriture des tissus sains adjacents. Les dégâts aux cultures associés à l'humidité sont les facteurs les plus importants au développement de la maladie.

**Nicot et Alex, (1991)** ont constaté que les spores de *B. cinerea* ne germent pas en absence d'eau libre. En présence de blessures, ils ont constaté que les spores germées à sec sans addition d'eau libre augmentent significativement avec l'augmentation du degré de blessure. Toutefois, en présence d'eau libre, ils ont montré que le taux de germination a fortement augmenté avec la durée d'humidité jusqu'à 7 h, au-dessus duquel il reste stable.

La susceptibilité de la plante hôte à l'infection diminue avec l'augmentation de l'âge des plaies sur la tige. L'infection des cicatrices foliaires sur la culture de plantes a conduit à un développement plus lent des lésions que dans les tiges, mais la sensibilité a persisté pendant au moins 13 jours (**O'Neill et al., 1997**). Les pratiques de gestion des cultures telles que l'élimination régulière des feuilles mortes et l'augmentation du mouvement d'air au niveau du couvert végétal réduit le développement de *B. cinerea* (**O'Neill et al., 2002**). Certaines études ont montré que les blessures sur des plantes de tomates sont moins susceptibles d'être infectés par *B. cinerea* si les feuilles sont coupées près de la tige que si un fragment de pétiole est laissé sur la tige (**Dik et Wuben, 2004**).

### III. Variabilité phénotypique de *B. cinerea*

#### II.1. Morphotypes

La diversité morphologique a été étudiée sur un milieu artificiel tel que la gélose à l'extrait de malt pour des isolats de *B. cinerea* par **Martinez et al., (2003)**. Dans cette étude, les colonies de 111 isolats de *B. cinerea* ont été classées visuellement en huit types morphologiques : quatre mycéliens caractérisés par une quasi-absence de sclérotés et quatre sclérotiens (**Tableau II**).

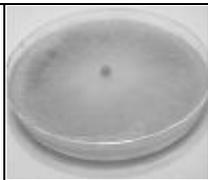
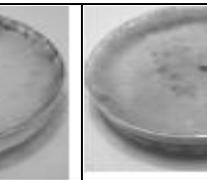
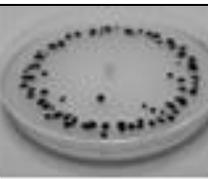
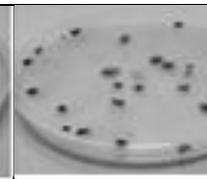
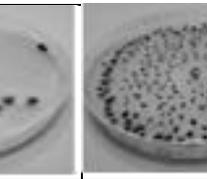
#### II.2. Sensibilité à la qualité de la lumière

Plusieurs études ont mis en évidence que les rayons ultraviolets proches (300 à 400 nm) stimulent la production des spores (**Epton et Richmond, 1980 ; Jarvis, 1992**). Cependant, l'ensemble des isolats naturels de *B. cinerea* ne présentent pas la même sensibilité aux UV. L'inhibition des champignons varie d'un isolat à l'autre, ainsi que selon la qualité de la lumière qui atteint la culture (**Dik et Wubben, 2004 ; Elad, 1997**). Il existe des isolats capables de sporuler en absence de rayons ultraviolets (**Nicot et al., 1996**). Certains isolats sont même capables de sporuler à l'obscurité (**Dik et Wubben, 2004 ; Steward et Long, 1987 ; Thomas et Marois, 1986**). Ces isolats ne semblent pas minoritaires dans les populations naturelles de *B. cinerea*. **Steward et Long, (1987)** ont montré que 31 isolats sur 43 testés étaient capables de sporuler à l'obscurité.

#### II.3. Agressivité sur la plante

L'ensemble des isolats naturels de *B. cinerea* ne présentent pas le même niveau d'agressivité sur une même plante hôte. Par exemple, **Tiedemann, (1997)**, a rapporté une différence d'agressivité d'isolats sur le haricot vert. **Decognet et al., (2009)** ont également remarqué une variation d'agressivité de 17 souches de *B. cinerea* sur la tomate. Sur la vigne, 9 isolats de *B. cinerea* sur 44 testés ne sont pas capables d'attaquer des feuilles de vigne en conditions contrôlées de laboratoire (**Mirzaei et al., 2009**).

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

Type Mycélien "M"				
Représentation				
Phénotype	<b>M 1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
Mycélium	rasant	aérien	masses	épais et dense
Sporulation (1)	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotos (2)	0	0	0	0
Type Sclérotien "S"				
Représentation				
Phénotype	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>
Mycélium	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt	plutôt rasant
Sporulation (1)	1	1	1	0
Sclérotos (2)	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grandes tailles, éparpillées	Nombreux

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

#### II.4. Sensibilité aux fongicides

Diverses études 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.*, 1995 ; Raposo *et al.*, 2000 ; Yourman *et al.*, 2003). Corbaz, (1993) a montré que sur 38 souches de *B. cinerea* isolées dans les cultures maraîchères en Suisse (tomate et laitue principalement), 44,7% sont résistantes aux dicarboximides, 73,6% aux benzimidazoles et 31,8% présentaient une double résistance. Sur 307 isolats de *B. cinerea* collectés de différents hôtes dans différentes serres du Sud-Est de l'Espagne, 90% étaient résistants aux benzimidazoles, 77% aux dicarboximides, 23% aux N-phenylcarbammates et 12% aux anilinyrimidines (Moyano *et al.*, 2003). Des isolats naturels de *B. cinerea* résistants au fenhexamide ont été détectés avec

une fréquence de 10% (sur 200 isolats de *B. cinerea*) alors que la population de l'agent pathogène n'avait jamais été exposée à ce fongicide (**Zhang et al., 2007**). 55 isolats de *B. cinerea* collectés au cours d'une saison de culture en 2005 sur des légumes cultivés dans 18 serres en Crète. Les résultats de cette étude ont révélé l'existence de souches résistantes aux benzimidazoles (61,8%), au cyprodinil (57,4%), au pyriméthanile (49,1%), aux dicarboximides (18%). Cependant, aucun isolat n'est résistant aux phenylpyrroles, et un seul isolat est résistant au fenhexamide (**Myresiotis et al., 2007**). Ils ont aussi détecté pour la première fois, le développement de souches résistantes aux anilinopyrimidines (**Myresiotis et al., 2007**). Sur 712 isolats de *B. cinerea* collectés sur tomates et autres cultures, 27% sont résistants aux benzimidazoles, 37% aux dicarboximides, 3% au pyriméthanile et une résistance de l'ordre de 0,2% au fludioxonil et au fenhexamide a été observée (**Korolev et al., 2011**).

#### IV. Variabilité génétique de *B. cinerea*

##### IV.1. Spéciation cryptique au sein des populations de *B. cinerea*

La spéciation est un problème majeur dans l'évolution des champignons. Il a été longtemps rapporté que les espèces originaires principalement par divergence allopatrique (**Mayr, 1963**). La possibilité de la spéciation sympatrique dans les populations sexuelles a longtemps été rejetée car la recombinaison entre les différents sous-ensembles d'une population qui se sont adaptés à différentes ressources ou habitats a été considérée pour contrarier la sélection naturelle pour les combinaisons de gènes adaptées localement (**Rice, 1984**). *B. cinerea* a longtemps été considéré pour être une seule espèce, mais morphologiquement variables. Plusieurs études récentes ont montré, que *B. cinerea* a été susceptible de former un complexe d'espèces (**Giraud et al., 1997 ; Albertini et al., 2002 ; Fournier et al., 2003 , 2005**). **Giraud et al., (1997)** ont identifié deux groupes en fonction de la présence ou de l'absence de deux éléments transposables (ET) dans le génome de *B. cinerea* var *vacuma* (isolats sans TE) et *B. cinerea* var *transposa* (isolats avec les deux TE actifs). Les groupes de *vacuma* et *transposa* ont été trouvés souvent en sympatrie mais semblaient présenter des différences dans leur gamme d'hôtes (**Giraud et al., 1999 ; Muñoz et al., 2002**), leur diversité génétique (**Giraud et al.,**

1997), leur succession temporelle (**Giraud et al., 1997; Martinez et al., 2005**) et leur taille de spores asexuées (**Giraud et al., 1997**).

Plus récemment, des études de polymorphisme de l'ADN de différents gènes dans les populations de *B. cinerea* ont montré que les isolats de *B. cinerea* sont toujours regroupés dans deux groupes différents, les groupes I et II, qui ont été proposés comme des espèces phylogénétiques (**Albertini et al., 2002 ; Fournier et al., 2003, 2005**). Les souches du groupe I appartenaient exclusivement au type vacuma, alors que les souches du groupe II comprenaient à la fois le type vacuma et transposa. La diversité génétique était plus faible dans le groupe I, tel que révélé par le polymorphisme de l'ADN et des tests de compatibilité végétative. Les groupes I et II ont également montré des différences de morphologie (spores asexuées étant significativement plus faibles dans le groupe II que dans le groupe I), les isolats du groupe I se trouvent principalement au printemps sur la vigne, alors que les isolats du groupe II sont également présents au printemps et à l'automne et une gamme d'hôtes plus étroite dans le groupe I que dans le groupe II. Les analyses phylogénétiques ne pouvaient pas détecter toute différenciation entre les souches de vacuma et transposa dans le groupe II, ni parmi les souches de différents hôtes. Ceci peut être dû au faible nombre de souches analysées ou à l'absence de polymorphisme dans les séquences d'ADN.

#### **IV.2. Structure génétique des populations**

La connaissance de la diversité génétique dans une population d'agent pathogène est importante lors de l'évaluation du potentiel évolutif de ce dernier à surmonter les mesures de contrôle (**Brown, 1996 ; McDonald et Linde, 2002**). La variation génétique a été étudiée chez *B. cinerea* isolé à partir de différentes plantes hôtes dans le monde entier (**Karchani-Balma et al., 2008 ; Fekete et al., 2012 ; Alfonso et al., 2000 ; Giraud et al., 1997 ; Baraldi et al., 2002 ; Moyano et al., 2003 ; Muñoz et al., 2002**). **Giraud et al., (1997)**. Ces auteurs ont conclu que la reproduction sexuelle a un rôle important dans la structure génétique de *B. cinerea*, bien que la forme téléomorphe ait rarement été observée dans la nature. Comme pour les autres ascomycètes, la recombinaison sexuelle dans *B. cinerea* peut être un facteur important dans la détermination de la structure génétique de la population, car elle conduit à la création de nouveaux

génotypes et contribue à la diversité génétique et le potentiel évolutif (**Milgroom, 2003 ; McDonald et Linde, 2002**).

#### IV.3. Différenciation génétique des populations

Le développement des techniques moléculaires a révolutionné la génétique des populations fongiques en fournissant de nombreux marqueurs génétiques (**Bridge et al., 1998**). Différents types de marqueurs moléculaires ont été développés chez *B. cinerea* tels que les RAPDs, les RFLPs, les AFLPs et les marqueurs microsatellites (**Fournier et al., 2002 ; Giraud et al., 1997 ; McDonald et Linde, 2002**). **Thompson et Latorre, (1999)** ont étudié des isolats de *B. cinerea* collectés de différentes plantes hôtes au Chili, ils ont constaté une forte diversité génétique. **Alfonso et al., (2000)** ont étudié 40 isolats de *B. cinerea* en Espagne et ils ont trouvé que l'ensemble de la population est très hétérogène, avec peu de différences à l'intérieur des sous-populations issues d'une même serre ou d'une même région. **Yourman et al., (2000)** ont trouvé que sur 56 isolats de *B. cinerea* collectés dans des serres en Caroline du Sud (USA) sont différents, mais ils ont constaté certains regroupements par rapport à la sensibilité aux fongicides. Des haplotypes différents ont été identifiés sur 69 isolats de *B. cinerea* au Chili, dont deux issues d'un même fruit de kiwi (**Muñoz et al., 2002**).

Les données issues de cette étude montrent un regroupement des isolats par leur hôte d'origine (**Muñoz et al., 2002**). En utilisant 16 marqueurs moléculaires RFLP, **Giraud et al., (1997)** ont pu identifier 134 haplotypes différents dans un échantillon de 259 isolats de *B. cinerea* provenant de raisins en Champagne (France). Les isolats provenant de la même plante ont toujours des haplotypes différents et jusqu'à cinq haplotypes différents ont été trouvés dans des spores isolées à partir d'une seule plante (**Giraud et al., 1997**). **Karchani-Balma et al., (2008)** ont génotypé 153 isolats de *B. cinerea* provenant de différentes cultures en Tunisie à l'aide de 9 marqueurs microsatellites. Le champignon présente une grande diversité génotypique et cette diversité est modelée par le système de culture (serre et plein champ), la plante hôte et l'origine géographique des isolats (**Karchani-Balma et al., 2008**). L'échantillonnage de 184 isolats de *B. cinerea* dans six régions de France sur vigne et ronces, a permis de mettre en évidence 180 génotypes différents à l'aide de 9 marqueurs microsatellites (**Fournier et Giraud, 2008**). Enfin, une grande diversité génétique a été observée dans des populations aériennes

d'isolats de *B. cinerea* collectés dans des serres expérimentales de tomate (Decognet *et al.*, 2009).

## V. Stratégies de lutte en culture de tomates

A ce jour, la maîtrise des épidémies de la pourriture grise est difficile, notamment dans les cultures sous serres. Plusieurs raisons expliquent cette situation. Tout d'abord l'environnement est souvent plus humide qu'en plein champ favorisant le développement de la maladie (Elad, 1999). De plus, les organes des plantes produites sont plus tendres et emmagasinent davantage des quantités d'eau. Enfin, concernant la tomate, les blessures de taille et d'ébourgeonnage sont très propices à l'installation et à l'infection de *B. cinerea*.

### V.1. Lutte chimique

La lutte chimique reste encore le principal moyen de lutte pour réduire l'incidence de *B. cinerea* sur les cultures de tomates cultivées sous serres. En cas d'apparition de symptômes, il est possible de traiter avec un des fongicides homologués. La mise en place de traitements préventifs est également envisageable notamment à la suite des effeuillages sur tomates afin de protéger les plaies de taille. Toutefois, parmi les sept substances actives autorisées pour cette culture (iprodione, fenexamid, pyriméthanil, pyraclostrobine) en association avec boscalid et cyprodinyl associé au fludioxonil. Cependant les différents fongicides appartiennent à des familles chimiques très concernées par des phénomènes de résistance (Leroux *et al.*, 2002). Ceci s'explique par le nombre limité de matières actives qui ne permet pas d'alterner judicieusement les traitements et par la faible diversité de mode d'actions des fongicides disponibles. Par ailleurs, *B. cinerea* possède une capacité à s'adapter rapidement aux différents fongicides (Ajouz, 2009). Par conséquent, le développement de ces résistances constitue un réel obstacle au contrôle de ce champignon et augmente les coûts de reviens des produits chimiques.

### V.2. 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**).

### V.3. Mesures prophylactiques

Parmi les méthodes de luttés disponibles, une attention toute particulière doit être portée aux mesures prophylactiques. En complément des autres moyens de lutte, il s'agit d'une stratégie efficace pour limiter les dégâts causés par *B. cinerea*. Une aération optimale des abris est essentielle, notamment en période de temps couvert et humide, afin de diminuer l'hygrométrie ainsi que la présence d'eau libre sur les plantes (**Baptista et al., 2011**). Le chauffage est également une option intéressante. Sur des laitues, il est préférable d'éviter la mise en place d'écran thermique qui augmenterait l'humidité (**Blancard, 2009**).

L'irrigation doit être privilégiée le matin ou en début d'après-midi, afin de permettre aux plantes de sécher et d'évaporer rapidement. L'accumulation d'eau par les plantes rend les tissus plus sensibles à *B. cinerea*. La taille des plantes de tomate doit être régulière et soignée. Les bourgeons axillaires, feuilles et hampes des bouquets doivent être coupés au ras des tiges et de préférence le matin (**Decognet et al., 2010**). Les plaies ont ainsi davantage de temps pour sécher au cours de la journée. Le curage des jeunes chancre, consistant à retirer les tissus infectés, doit permettre d'éviter la propagation du champignon aux tissus sains. L'effeuillage de la partie basse des plantes permet d'améliorer le climat du couvert végétal par une meilleure circulation de l'air dans la culture (**Blancard, 2009**).

L'élimination des débris végétaux en cours et en fin de culture est primordiale. Ils ne doivent pas être laissés au sol surtout si celui-ci est humide. Leur

enfouissement doit également être évité afin d'empêcher l'agent pathogène de s'y conserver. Sous serres, il est préférable entre chaque culture d'opter pour un vide sanitaire, de remplacer le plastique couvrant le sol et de désinfecter soigneusement la serre. La fertilisation azotée doit être raisonnée : ni trop faible, ce qui engendrerait des feuilles chlorotiques idéales pour le développement du champignon, ni en excès, ce qui produirait des tissus succulents très réceptifs. L'impact de la fertilisation sur la pathogénicité de *B. cinerea* a été plusieurs fois démontré sur de nombreuses cultures hôtes (**Hoffland et al., 1999 ; Pitchay et al., 2007 ; Abro, 2013**). Sur tomate, l'enrichissement des tissus en azote réduirait fortement sa sensibilité à ce champignon (**Lecompte et al., 2010**). La préparation du sol des futures parcelles est une étape très importante. En plein champ, les cultures peuvent être orientées dans le sens des vents dominants afin de permettre une aération suffisante du collet des plantes. Les rotations culturales sont habituellement reconnues comme une méthode efficace pour réduire l'impact d'un agent pathogène dans le temps. La nature polyphage de *B. cinerea* et son comportement saprophyte sembleraient limiter l'intérêt de cette technique. Les autres bio-agresseurs doivent également être maîtrisés afin d'éviter l'apparition de blessures, propices à l'infection de *B. cinerea* (**Blancard, 2009**).

# **Partie II :**

# **Etude expérimentale**

Chapitre I : Isolement, purification et caractérisation morphologique des isolats de *B. cinerea*

Le concept d'espèce morphologique est le critère le plus largement utilisé pour la délimitation des espèces. Elle est basée sur la similarité morphologique. Les observations morphologiques peuvent être difficiles dans des organismes microscopiques, mais la diversité des structures de spores sexuée ou asexuée reste un critère largement utilisé dans la description des entités fongiques (**Giraud et al., 2008**).

La nécessité d'utiliser des cultures pures de souches dans les études de champignons phytopathogènes a longtemps été préconisée (**Hildebrand, 1938**). Elle est généralement reconnue comme une pratique courante avant d'effectuer les tests de caractérisation phénotypique et/ou génotypique d'un isolat. Une culture pure d'un micro-organisme a été décrite par **Orskov, (1922)** comme une culture composée d'individus, dont nous savons avec certitude que descendent tous d'une seule cellule. Un certain nombre de méthodes sont disponibles pour obtenir des cultures pures, dont beaucoup ont été décrites par **Hildebrand, (1938)**.

Pour la production de spores de champignons, le procédé classique de purification est basé sur l'isolement de spore unique (**Choi et al., 1999**). Tel est le cas, par exemple, pour le champignon pathogène *B. cinerea*. Cet ascomycète peut produire de grandes quantités de spores asexuées sur les plantes malades (**Jarvis, 1977 ; Nicot et al., 1996**). Le processus prend du temps, fastidieux et son accomplissement avec succès nécessite de l'expérience pour le traitement méticuleux de spores (souvent inférieure à 10 µm de diamètre) dans des conditions stériles sous le microscope. Cela pourrait être un facteur important afin d'obtenir des cultures pures destinées aux études des populations.

Dans cette première partie expérimentale de notre travail, Nous avons effectués des prélèvements des isolats fongiques dans les serres non chauffées situées dans la région de Bejaia à partir des plantes de tomates infectées. Par la suite les échantillons prélevés ont fait l'objet d'une purification des isolats de *B. cinerea* afin de caractériser les différents morphotypes.

## I.1. Matériel et Méthodes

### I.1.1. Choix des sites d'échantillonnages

Les échantillons fongiques ont été prélevés sur la cote littorale de la région Est de Bejaia qui couvre principalement les sites suivants : Souk El Tenine, Baccaro, Tichy ainsi que le site situé dans la vallée de la région de Merdjouamane (**Figure 4**) durant les saisons culturales de 2007, 2008 et 2010. La région de Bejaia concentre ses travaux sur la production protégée sous serres des cultures légumières. Sur les 210 hectares que couvre la surface allouée aux serres non chauffées dans lesquels coexistent les différents types de cultures légumières. L'une des principales productions sous serres de cette région est la tomate. Elle est cultivée pendant le mois de Décembre jusqu'à la fin du mois de Juillet et peut être alternée avec des cultures de laitues. Le choix de ces régions est dicté par leur représentativité en termes de nombre de serres et de la surface occupée par les cultures de tomate.

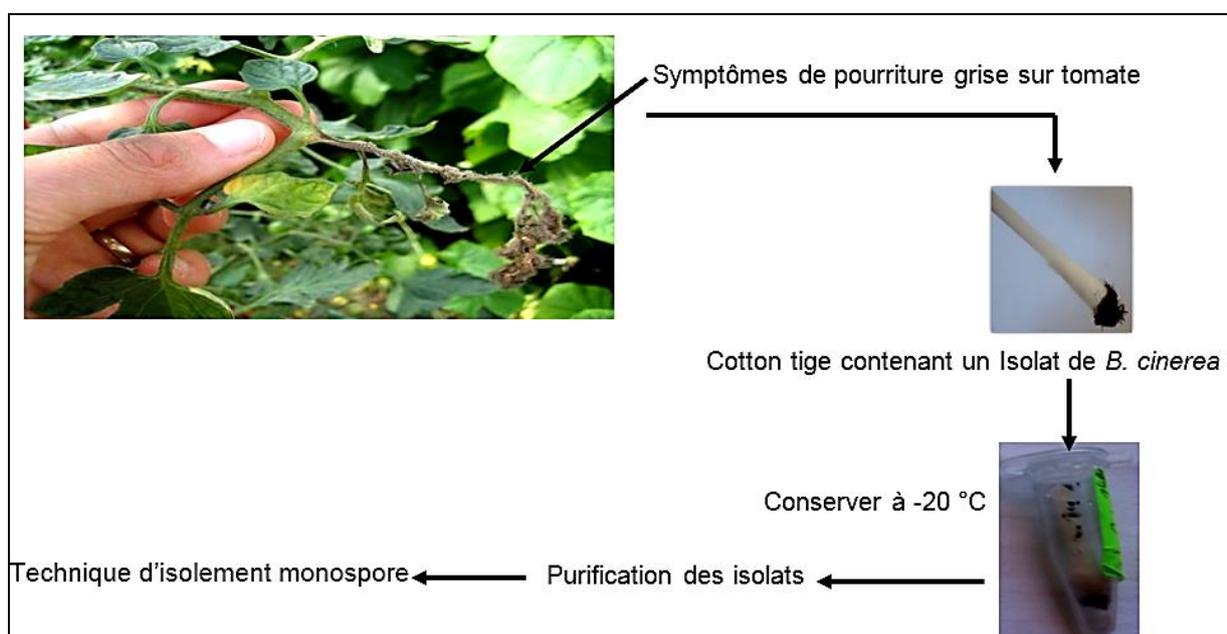


Figure 4. Représentation des sites d'échantillonnage de *B. cinerea* dans la région de Bejaia, en Algérie. (A: Souk-el-Tenine, B: Baccaro, C: Tichy et D: Merdjouamane). (Google Earth, 2013).

### I.1.2. Méthodes d'isolement

#### Prélèvements d'isolats de *B. cinerea* sur plantes

Sur les quatre sites cités précédemment, des prélèvements de *B. cinerea* ont été réalisés sur les plantes infectées de tomate. Ces prélèvements ont consisté à frotter, à l'aide d'un écouvillon stérile, des zones sporulantes de la plante. Les écouvillons ont été transportés au laboratoire à des températures ambiantes (25 °C). Ils ont été déposés dans des tubes Eppendorf puis stockés à -20 °C, jusqu'à l'étape de purification (**Figure 5**). Dans notre travail, nous avons échantillonné un total de 303 isolats fongiques à partir des quatre sites.



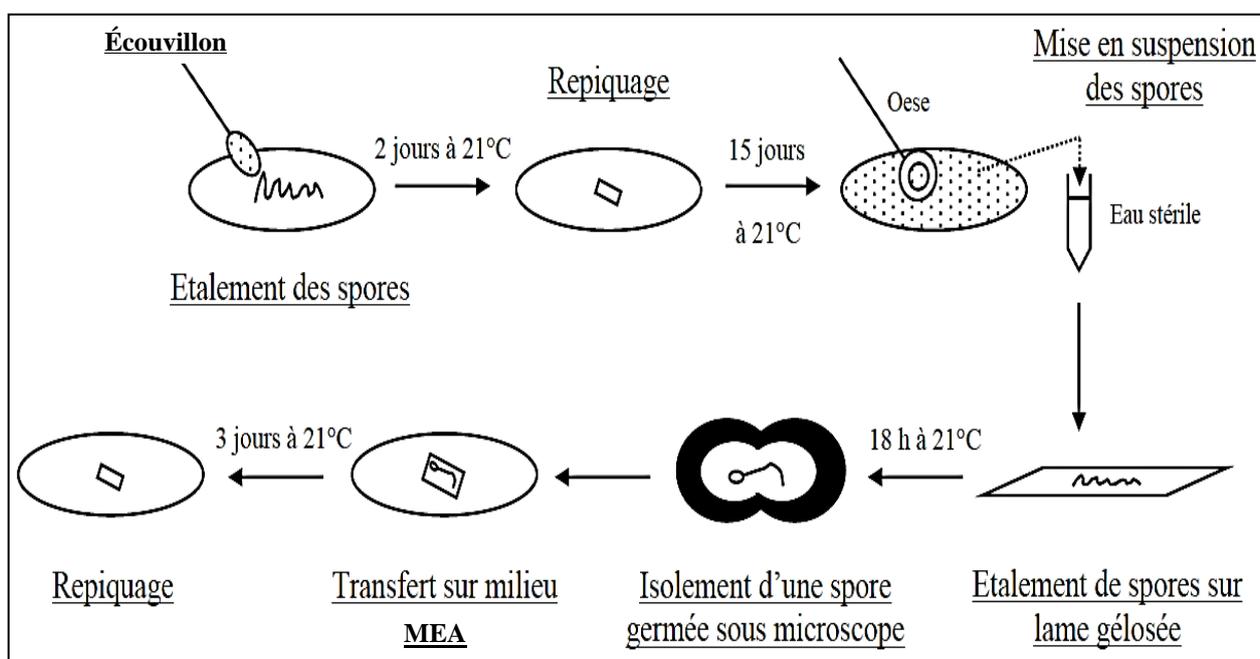
**Figure 5. Technique d'isolement des échantillons de *B. cinerea* sur les chancres de tomate.**

### I.1.3. Purification des isolats par la technique monospore

Avant la caractérisation génotypique et phénotypique des isolats, ceux-ci doivent être purifiés par des repiquages successifs afin de s'assurer qu'il s'agit des isolats de *Botrytis*. Afin d'obtenir un seul génotype par prélèvement. Une technique qui consiste à un isolement monospore a été réalisée (**Figure 6**).

Chaque écouvillon stocké à -20 °C et portant des spores a été frotté sur la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu de culture MEA (**Annexe I**). Les boîtes ont été placées deux jours dans une étuve réglée à 21 °C et à l'obscurité. Les colonies développées ont été repiquées et mises en culture dans les mêmes

conditions, le temps qu'elles sporulent. Quinze jours plus tard, des spores de chaque colonie ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine humide puis mises en suspension dans de l'eau stérile. Une goutte de cette suspension a été étalée sur une lame déjà préparé avec 5 ml d'un milieu de culture à base d'eau gélosée (**Annexe I**). Les lames ont été mises dans des boites humidifiées avec du papier absorbant puis incubées 18 heures dans une étuve (21°C, à l'obscurité), le temps nécessaire à la germination des spores. Pour chaque lame, sous microscope, une spore germée et suffisamment isolée a été transférée sur une boite de Pétri contenant du milieu MEA. Afin de permettre le développement mycélien du champignon, les boites ont été mises en culture durant trois jours à 21°C. Chaque isolat a été par la suite repiqué et incubée (21°C, obscurité) jusqu'à son stockage à -20 °C.



**Figure 6. Les différentes étapes de purification des isolats par la technique d'isolement monospore. (Protocole INRA).**

#### I.1.4. Stockage et lyophilisation des isolats monospores

Au bout de 15 jours, les isolats monospores ont été stockés. Pour chacun d'entre eux, 1 ml d'eau distillée stérile a été ajouté dans chaque boite de Pétri puis, à l'aide d'un coton-tige stérile, la surface de la gélose a été raclée superficiellement. Le mycélium a été rassemblé, essoré contre la paroi de la boite de pétri puis transféré dans un tube Eppendorf. Le coton-tige a été trempé dans une solution de glycérol et de phosphate monopotassique permettant de conserver les spores (**Annexe I**). La

suspension de spores obtenue a été stockée à -20°C. L'ensemble des tubes contenant le mycélium ont été lyophilisés. Ce processus de lyophilisation comportait deux phases : une congélation de 50 heures à -20°C puis une dessiccation, sous vide, à une pression de 1mbar, afin de sublimer la glace.

#### **I.1.5. Caractérisation morphologique**

La caractérisation morphologique des isolats de *B. cinerea* a été déterminée sur le milieu gélose à l'extrait de Malt (MEA). Un implant mycélien de chaque isolat a été déposé au centre d'une boîte de Pétri, l'incubation a été effectuée à 21°C pendant 2 semaines à l'obscurité. L'aspect macroscopique des colonies de *B. cinerea*, la répartition des spores et des sclérotas sur la surface du milieu de culture ont été notés. La classification a été établie selon les travaux de **Martinez et al., (2003)**. Huit différents types morphologiques ont été définis : quatre mycélium (M1, M2, M3 et M4) et quatre sclérotas (S1, S2, S3 et S4).

## I.2. Résultats et discussion

Au bout de 7 jours d'incubation à 21 °C dans l'obscurité totale, les échantillons isolés apparaissent et se développent sur le milieu gélose à l'extrait de malt. Le mycélium des isolats de *B. cinerea* comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelquefois vésiculeux au niveau de la cloison médiane. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des touffes de conidiophores grisâtres ce qui conduit à la libération des spores.

Les contaminants bactériens et fongiques autre que *Botrytis* contribuent fortement à la colonisation du milieu d'isolement. En revanche, de nombreux substrats favorisent le développement des champignons et des bactéries à croissance rapide (**Crawford et al., 1993**). Cependant, la diminution du pH du milieu d'isolement, diminue le nombre de Bactéries. Des repiquages successifs ont été réalisés afin d'éliminer les contaminants. Le **tableau III** représente un total de 264 isolats de *B. cinerea* à partir des 303 échantillons prélevés dans les serres de tomates de la région de Bejaia.

Le milieu de culture gélose à l'extrait de malt est très favorable pour l'isolement et le développement des champignons tel que *B. cinerea* (**Walker et al., 2011 ; Martinez et al., 2003 ; Mirzaei et al., 2009**). Un pourcentage de 87% des échantillons prélevés correspond à des isolats de *B. cinerea*, ce qui suggère que ce champignon est très impliqué dans les maladies de tomate cultivée sous serre. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Dean et al., (2012)**, ces derniers ont montré que la pourriture grise est la maladie la plus dominantes dans les culture légumières sous serres.

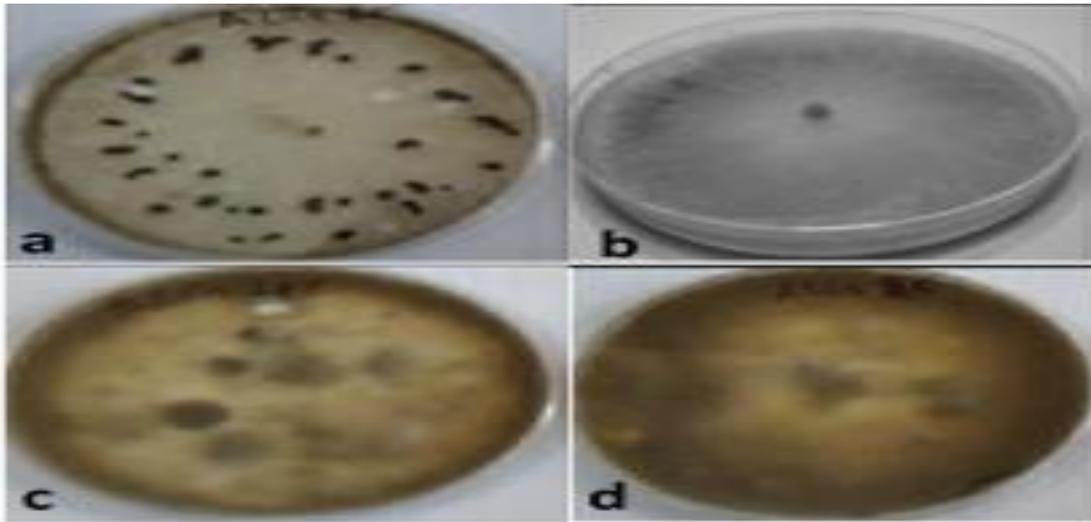
Tableau III. Nombre d'isolats de *B. cinerea* échantillonnés dans la région de Bejaia durant la période 2007, 2008 et 2010.

Lieux d'échantillonnage	Coordonnées GPS	Date d'échantillonnage	Nombre d'isolats collectés	Nombre d'isolats purifiés
A: Souk-el-Tenine	Latitude: <b>36.62958</b>	30 Mai 2007	36	32
	Longitude: <b>5.29764</b>			
B: Baccaro	Latitude: <b>36.64683</b> Longitude: <b>5.20958</b>	30 Mai 2007	33	33
		1 Juin 2008	33	26
		5 Juin 2010	33	33
C: Tichy	Latitude: <b>36.6938</b> Longitude: <b>5.10217</b>	30 Mai 2007	33	14
		1 Juin 2008	33	26
		5 Juin 2010	33	33
D: Merdjouamane	Latitude: <b>36.67619</b> Longitude: <b>4.94483</b>	1 Juin 2008	34	32
		5 Juin 2010	35	35
<b>Total</b>			<b>303</b>	<b>264</b>

### I.2.1. Caractérisation morphologiques

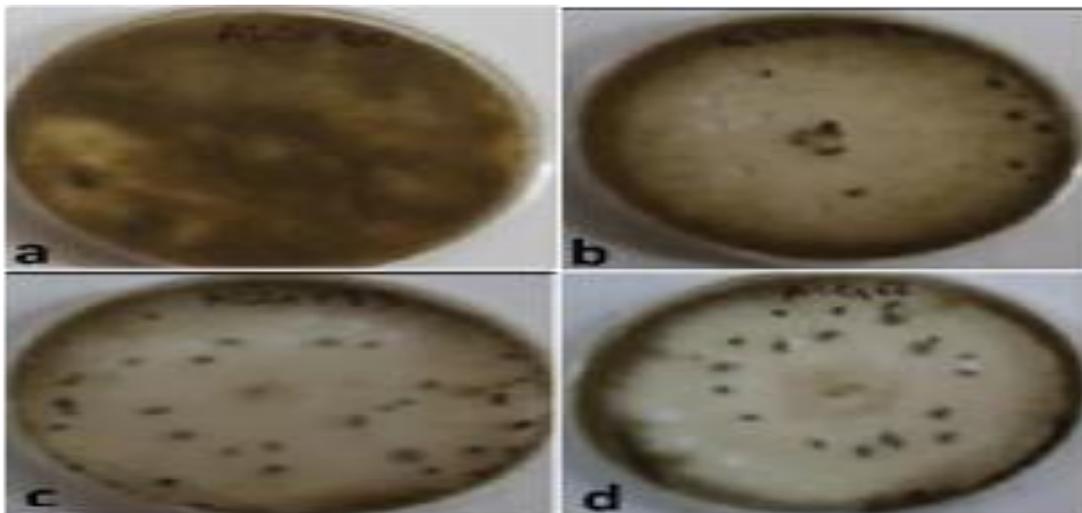
L'étude de la morphologie des isolats de *B. cinerea* prélevés à partir de quatre sites différents dans la région de Bejaia a été réalisée sur milieu gélose à l'extrait de malt à 21 °C à l'obscurité. L'observation macroscopique basée sur l'aspect du mycélium, la sporulation et la production des sclérotés a été effectuée après 14 jours d'incubation.

Différents aspects du mycélium observés ont été présentés dans la **figure 7**. Le mycélium produit a été aérien, rasant ou en masse. Les colonies ont été 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 7. Différents aspects du mycélium de *B. cinerea* obtenu sur gélose à l'extrait de malt à 21°C.** (a) Mycélium aérien blanc (b) Mycélium rasant blanc (c) Masses mycéliennes grises (d) Mycélium aérien gris verdâtre.

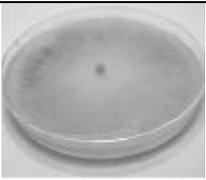
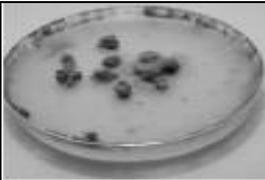
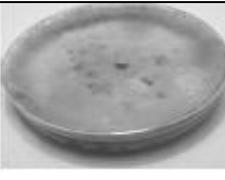
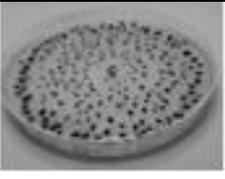
La sporulation est produite à la surface du mycélium à partir du 7<sup>ème</sup> jour. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 8**. Les spores sont produites soit sur toute la surface de la boîte de Pétri, sur la partie marginale ou en touffes. Les sclérotés varient également en abondance, 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 absentes chez d'autres isolats. Ils sont superficiels ou profonds encrés dans la gélose.



**Figure 8. Différents aspects de la sporulation observés des souches de *B. cinerea* sur milieu gélose à l'extrait de malt à l'obscurité à 21°C.** (a) en touffes. (b) sur toute la surface de la boîte de Pétri (c) et (d) sur la partie marginale.

Selon les travaux de **Martinez *et al.*, (2003)**, les colonies des isolats de *B. cinerea* testées ont été 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 une quasi-absence de sclérotés tandis que le deuxième est caractérisé par une production plus ou moins abondante de sclérotés (**Annexe II**).

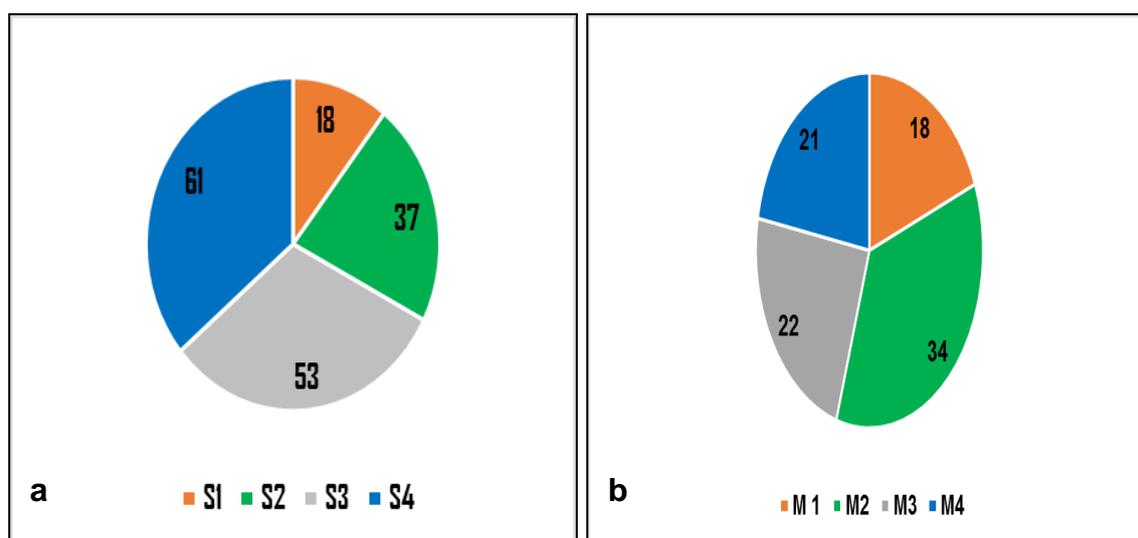
**Tableau IV. Classification phénotypique des isolats de *B. cinerea* sur le milieu gélose à extrait de malt**

Type Mycélien "M"				
Représentation				
<b>Phénotype</b>	<b>M 1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
Mycélium	rasant	aérien	masses mycéliennes	épais et dense
Sporulation (1)	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotés (2)	0	0	0	0
<b>Nombre d'isolat</b>	<b>18</b>	<b>34</b>	<b>22</b>	<b>21</b>
Type Sclérotien "S"				
Représentation				
Phénotype	S1	S2	S3	S4
Mycélium	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant
Sporulation (1)	1	1	1	0
Sclérotés (2)	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grandes tailles, éparpillées.	Nombreux
<b>Nombre d'isolat</b>	<b>18</b>	<b>37</b>	<b>53</b>	<b>61</b>

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

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

On note que les isolats collectés dans cette étude ont été composés essentiellement d'isolats du type morphologique sclérotien avec 169 isolats (**Figure 9a**), dont le morphotype majoritaire a été le «S4» avec 61 isolats qui est caractérisé par un mycélium rasant et une abondance de petite sclérote distribuée sur toute la surface de la boîte de pétri. Tandis que 95 isolats de *B. cinerea* du type morphologique mycélien (**Figure 9b**), dont le morphotype majoritaire a été le «M2» qui est caractérisé par un mycélium aérien et une abondante sporulation. Une différence significative a été détecté entre les deux groupes morphologiques ( $P < 0.05$ ).



**Figure 9. Distribution du nombre d'isolats de *B. cinerea* selon le type morphologique.** (a) type sclérotien, (b) type mycélien.

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 ; Mirzaei et al., 2008**). Cela a été remarqué dans cette étude, de sorte qu'à 21 °C, le mycélium a été aérien, dense gris dont la sporulation a été 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. Cela peut être lié au fait que les isolats de l'hiver sont issus à partir de forme de résistance «sclérote». La présence des deux types morphologiques dans les isolats de *B. cinerea* testés dans cette étude montre une variabilité phénotypique entre ces isolats. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Miclea et Puia, (2010)** qui ont montré une grande variabilité morphologique entre 12

isolats de *B. cinerea* sur milieu PDA. **Hosen et al., (2010)** ont observé une grande variabilité physiologique entre 10 isolats de *B. cinerea* cultivé sur différents milieux de cultures. Nos résultats sont encore en agrément avec ceux de **Tanovic, (2009)** qui a rapporté que sur 130 isolats de *B. cinerea* cultivés sur milieu PDA, 81.5% isolats sont du type sclérotien et 18.5% du type mycélien. **Goto et al., (1980)** ont étudié la morphologie des isolats de *B. cinerea*, ils ont constaté une dominance des morphotypes sclérotiens. Nos résultats sont en désaccord avec ceux rapportés par **Mirzaei et al., (2009)**, ces auteurs ont montré que sur 44 isolats de *B. cinerea*, ils ont trouvés 26 isolats de *B. cinerea* appartenant au type mycélien et 18 isolats au type sclérotien sur milieu gélose à l'extrait de malt.

### I.3. Conclusion

L'isolement sélectif des champignons phytopathogènes à partir des plantes infectées et la purification des isolats est une étape très essentielle. En effet la composition des milieux utilisés pour l'isolement favorise le développement des champignons et des bactéries indésirables, ce qui empêche de ce fait un isolement facile des champignons aériens tel que *B. cinerea* qui ont un temps de génération relativement long par rapport aux bactéries.

Dans cette étude 303 isolats fongiques ont été isolés dans les différents sites. 87% des échantillons prélevés correspondent à *B. cinerea*, ce qui confirme que le milieu de culture gélose à l'extrait de malt est un bon milieu de culture pour l'isolement des champignons aériens. 169 isolats présentent une morphologie du type sclérotien, tandis que 95 des isolats étaient du type mycélien et sont incapables de produire des sclérotés. Une grande variabilité morphologique a été montrée entre les isolats collectés de *B. cinerea*.

## Chapitre II : Effet de la température sur développement de la pourriture grise

Le développement de la pourriture grise est connue pour dépendre fortement des conditions climatiques, cette maladie est généralement associée à des périodes de forte humidité dans la serre (**Baptista et al., 2011 ; Yunis et al., 1990**). Néanmoins, un climat froid caractérisé par la température de l'air modérée à l'intérieur des serres est également considéré comme un facteur important influençant le développement de la pourriture grise, avec une fréquence réduite pendant la période chaude, avec des températures élevées qui inhibent le développement du champignon (**Kerssies, 1994 ; Morgan et al., 1984**).

La température de l'air est considérée comme l'un des facteurs environnementaux les plus importants qui influence le développement de la pourriture grise dans une variété de cultures en serre (**Baptista et al., 2011 ; Elad et al., 1988 ; Yunis et al., 1990**). La température globale optimale pour la croissance végétative de tomate est de l'ordre de 20 à 25 °C (**Willits et Peet, 1998**), ce qui coïncide avec une température optimale pour le développement de *B. cinerea* (**Yoder et Whalen, 1975**).

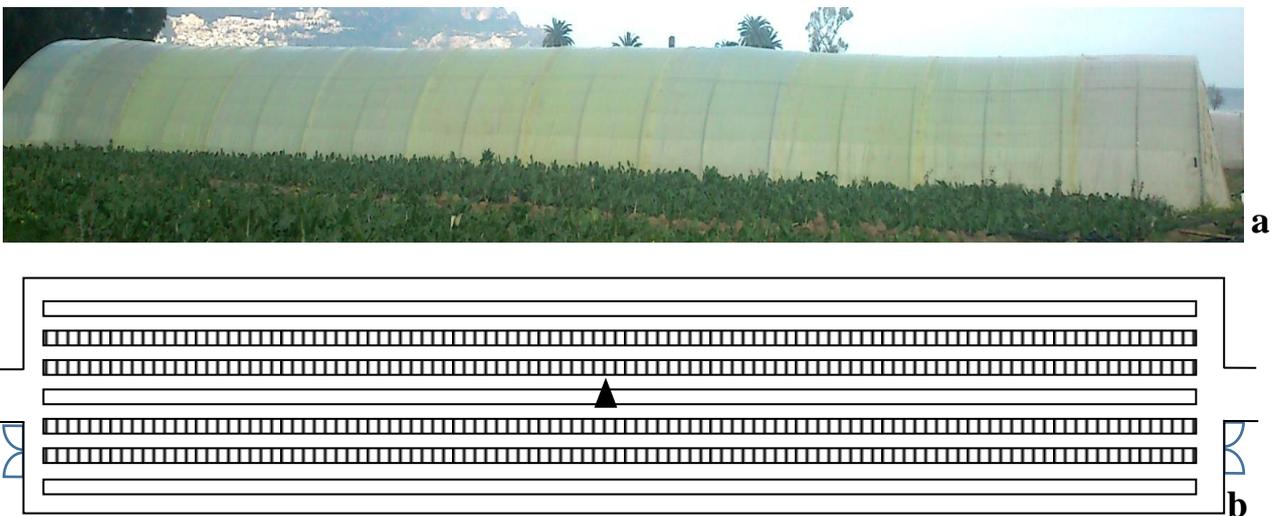
Les objectifs de la présente étude étaient de vérifier que les épidémies de pourriture grise se développent dans des conditions de haute température dans la région de Bejaia. De tester l'hypothèse que les isolats locaux de *B. cinerea* peuvent croître à des températures plus élevées que rapporté ailleurs. Pour cela, la température a été mesurée et les épidémies de pourriture grise ont été suivies dans les serres de tomate commerciales. En parallèle, l'effet de la température sur la germination des spores et la croissance du mycélium a été estimé *in vitro* sur des isolats collectés dans la région de Bejaia sur la côte méditerranéenne de l'Algérie.

## II.1. Matériel et méthodes

### II.1.1. Effet de la température et de développement de la pourriture grise dans les serres commerciales de tomate

L'expérience a été menée sur deux serres commerciales non chauffées situées dans la région de Bejaïa (Tichy), l'étude a été répétée durant la saison de culture de 2012 et de 2013. La conception des serres étudiées était de 50x8 m (longueur et largeur), et 3 m de hauteur, composait d'arches métalliques qui sont recouvertes avec un film de plastique en polyéthylène (**figure 10a**). Les serres ont été orientés Nord-Sud, avec le bord de la mer à environ 50 m au Nord.

Les graines de tomates var. "Tavira" ont été semées dans une pépinière sous forme de petite serre non chauffées (le 20 Décembre 2011 et 2012), Sur les deux sites, ensuite les plantules de tomates obtenues ont été transplanté dans les serres de production à l'âge de 60 jours. Chaque serre contenait 700 plantes disposées en sept rangées (**Figure 10b**). Les plantes étaient espacées de 0,5 m de distance dans une rangée, avec des lignes espacées de 1 m.



**Figure 10. Représentation schématique d'une serre non chauffée recouvertes d'un film en polyéthylène.** (a) Vue de l'extérieur de la serre, (b) l'organisation des rangs à l'intérieur de la serre, les 7 rangées de plantes (chacune étant représentée par un petit rectangle), (▲) : enregistreur de température.

Les plantes ont été cultivées selon des pratiques commerciales habituelles de production de la tomate sous serre en Algérie (**Aissat et al., 2008**). Chaque plante a été palissée et formée en une tige unique. L'ébourgeonnage des plantes a été répété tous les 15 jours à partir de début du mois d'Avril. Les feuilles situées en dessous du

premier bouquet de fleurs ont été retirés après la première récolte. Afin de réduire légèrement la quantité totale de feuillage, une seule feuille par plante a été retirée en suivant les récoltes successives sur les bouquets suivants.

Tout au long de la saison, différents engrais ont été appliqués en fonction du stade de développement des plantes. Les engrais de base, NPK (15-15-15) 100 kg/Ha, a été appliqué au sol avant la plantation. Ensuite, de 20 à 30 kg/ha de nitrate d'ammonium (33,5%N) a été appliqué à travers le système d'irrigation goutte-à-goutte, au moment du premier binage, trois semaines après la plantation. Cette application a été répétée au début de la fructification et immédiatement après la première récolte.

Chaque plante a été irriguée par le système goutte-à-goutte pendant 2 heures deux fois par semaine, offrant à chaque fois environ 8 litres d'eau par plante. Les serres ont été ventilées en ouvrant les événements latéraux pendant la journée (**Aissat et al., 2008**). Plusieurs pesticides ont été appliqués à plusieurs reprises par les agriculteurs. Iprodione, le méthyl-thiofanate, le manèbe et le soufre ont été utilisés pour lutter contre les pathogènes fongiques, et le spinosad a été utilisé contre les insectes nuisibles. Dans les deux saisons, la récolte a commencé pendant la deuxième semaine du mois de Mai et a duré jusqu'à la fin du mois de Juillet.

Pendant l'expérimentation, les fongicides tels que Hexaconazole, Dichlofuanide, Promocydone sont utilisés étaient essentiellement préventifs contre certaines maladies phytopathogènes comme l'oïdium et la pourriture grise après que les symptômes visibles ont été observés. Les insecticides tels que Alpha Cepermethrine, Cyfluthrine, Abamecrin sont utilisés contre la mouche blanche, la mineuse des feuilles et des vers de fruits de tomate ont été utilisés lorsque cela étant nécessaire.

Les données de température ont été recueillies au centre de chaque serre. La température de l'air a été mesurée toutes les 30 minutes en utilisant un enregistreur de température Voltcraft DL-101T USB (Hirschau, Allemagne). Les capteurs ont été placés à l'abri de la lumière du soleil dans une boîte appropriée et placés à une hauteur de 1,5 m (**Figure 10a**). Les données ont été utilisées pour calculer les températures moyennes quotidiennes, puis les températures moyennes

hebdomadaires. En outre, nous avons enregistré pour chaque jour le nombre d'heures où la température était supérieure à 28 °C et celles où elle était au-dessus de 30 °C, ces données ont été transformées en moyennes hebdomadaires.

Le suivi du développement de la pourriture grise a été effectué chaque semaine à partir du 10 Mai au 5 Juillet pour la saison de 2012 et du 11 Mai au 6 Juillet pour la saison 2013. Dans chaque serre, 400 plantes ont été examinées individuellement (100 plantes dans chacune des quatre lignes, comme illustré sur la **(Figure 10b)**, le nombre de chancre présents dans chaque rangée de plantes ont été enregistrés.

### **II.1.2. L'effet de la température sur la vitesse de croissance mycélienne**

#### **a) Choix de souches**

Les isolats *B. cinerea* ont été collectés à partir des tomates infectées, cultivées sous serres et à différents organes tels que les tiges, les feuilles, les fruits et les fleurs durant les saisons de cultures de 2007, 2008 et 2010. Ils ont été purifiés par un isolement de monospore en utilisant un milieu d'eau gélosée (1,5% agar Difco) **(Figure 6)**. Neuf isolats de *B. cinerea* ont été utilisés dans cette étude, ils ont été collectés dans la région de Béjaia situées dans le Nord d'Algérie **(Tableau V)**.

La vitesse de la croissance mycélienne a été étudiée à quatre températures : 21, 28, 30 et 32 °C sur un milieu extrait de pomme de terre-dextrose agar (PDA 39 g l<sup>-1</sup> ; Laboratoire Difco, Detroit, Michigan, USA) **(Annexe I)**. Les expériences ont été menées dans des boîtes de Pétri de 9 cm inoculés avec un implant mycélien de 5 mm de diamètre. Les implants ont été placés avec la surface du mycélium en contact direct avec le milieu. Trois déterminations par isolat et par température ont été effectuées. L'expérience a été répétée trois fois simultanément. Les boîtes ont été incubées dans l'obscurité totale. Deux diamètres perpendiculaires par colonie ont été mesurés quotidiennement sans ouvrir les boîtes de pétri.

**Tableau V. Origine des isolats de *B. cinerea* collectés dans des serres de tomates commerciales dans la région de Bejaia.**

Isolats	Nombre d'isolats	Origine	Coordonnées GPS
ALG 66, ALG 85, ALG 200	3	MerdjOuamene	Latitude : 36.67619 Longitude : 4.94483
ALG 34, ALG 175, ALG 235	3	Tichy	Latitude : 36.6938 Longitude : 5.10217
ALG 295, ALG 20, ALG 136	3	Baccaro	Latitude : 36.64683 Longitude : 5.20958

### II.1.3. L'effet de la température sur la germination des spores

L'effet de la température sur la germination des spores a été évalué sur le milieu extrait de pomme de terre-dextrose agar (PDA 39 g l<sup>-1</sup>) (**Annexe I**), les boîtes ont été inoculées avec 10 µl de 10<sup>6</sup> spores/ml à 21, 28, 30 et 32 °C, dans l'obscurité pendant 10 heures. Cinq déterminations pour chaque isolat et chaque température. L'expérience a été répétée deux fois simultanément. Le pourcentage de germination (G%) a été calculé selon la formule suivante :

$$G\% = \frac{GS}{GS + NGS} * 100$$

Où GS et NGS sont le nombre moyen de spores germées et non germées, respectivement.

### Analyse statistique

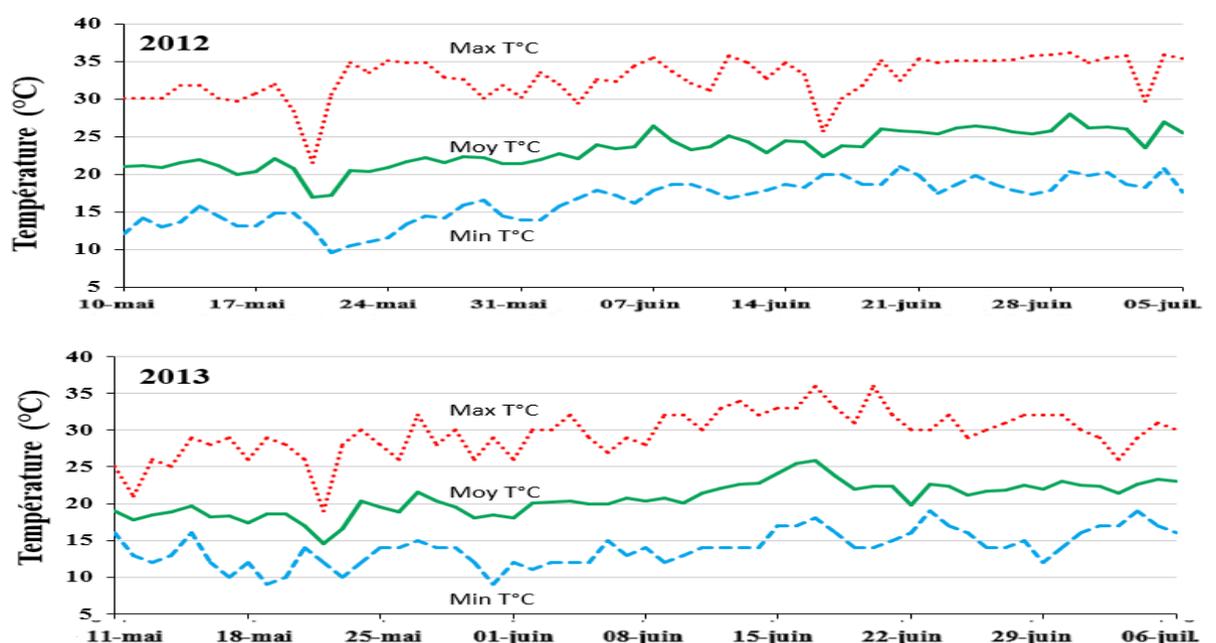
Le model logistique décrit par Van der Plank pour les épidémies polycycliques (**Van Mannen et Xu, 2003**) a été ajusté aux données décrivant la dynamique de développement de la maladie. Pour cela, les données ont été transformées comme  $Y_t = \ln(X / (100 - X_t))$ , où  $X_t$  représente le nombre de chancre enregistrés par rangée de 100 plantes examinées à la date  $t$ . Les données transformées ont été représentées dans le temps et soumises à une analyse de régression linéaire à l'aide du logiciel Statistica.

Les analyses statistiques du test *in vitro* ont été effectuées par la comparaison de la variance en utilisant le module ANOVA implémenté dans le logiciel STATISTICA 5.0. Le test de comparaison multiple de Newman-Keuls a été utilisé pour la comparaison de développement du champignon (mycélium et la germination des spores) des isolats de *B. cinerea* à des différentes températures.

## II.2. Résultats et discussion

### II.2.1. Occurrence de températures élevées dans les serres commerciales

Les conditions chaudes ont été observées dans les serres à partir du mois de Mai et le mois de Juin pour les deux années (**Figure 11**). En 2012, des températures au-dessus de 30 °C ont été enregistrées pour la plupart du temps et étaient souvent supérieures à 35 °C, tandis que les températures minimales ont été supérieures à 15 °C en mois de Juin. En 2013, au début de la saison de culture, les températures ont été apparues généralement plus fraîche. Néanmoins le nombre moyen d'heures journalières où les températures étaient supérieures à 28 °C et supérieures à 30 °C ont été augmenté en mois Juin jusqu'à atteindre les 16 et 10 heures par jour, respectivement (**Figure 11**).



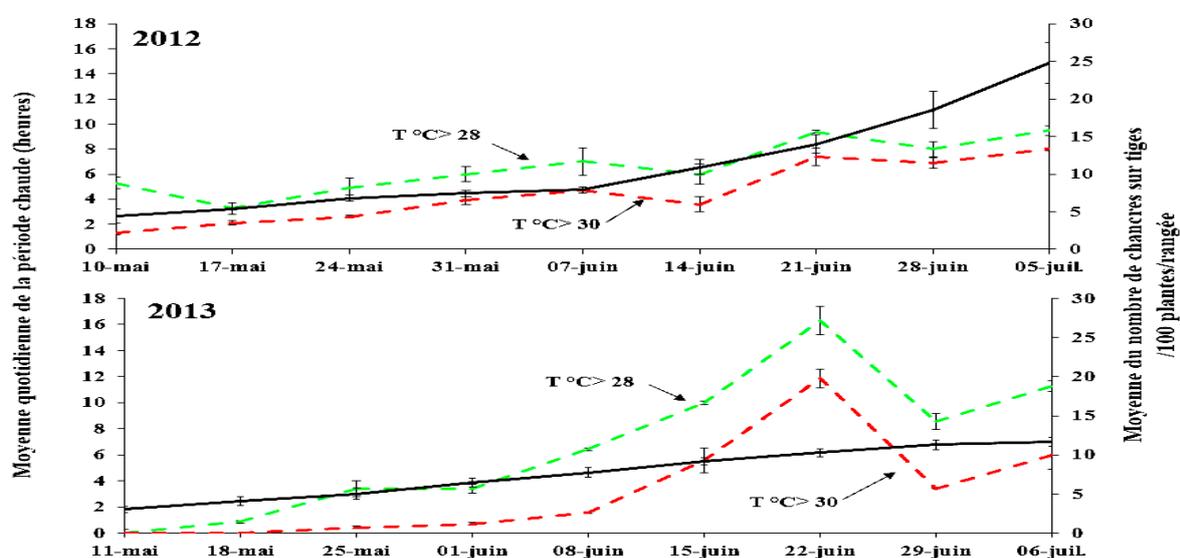
**Figure 11. : Les températures quotidiennes enregistrées dans deux serres de tomates au cours des saisons de croissance 2012 et 2013.** (Maximum : pointillé ligne rouge ; moyenne : ligne verte ; minimum : ligne pointillée bleue.

### II.2.2. Développement de la pourriture grise dans les serres commerciales

Durant le début de la saison de cultures 2012 et 2013, peu de chancres sur tige de tomate causés par *B. cinerea* ont été enregistrés durant le premier jour de l'observation (**Figure 12**). L'épidémie a été nettement plus sévère en 2012, avec une moyenne de 25 chancres par rangée de 100 plantes à la fin de l'expérimentation.

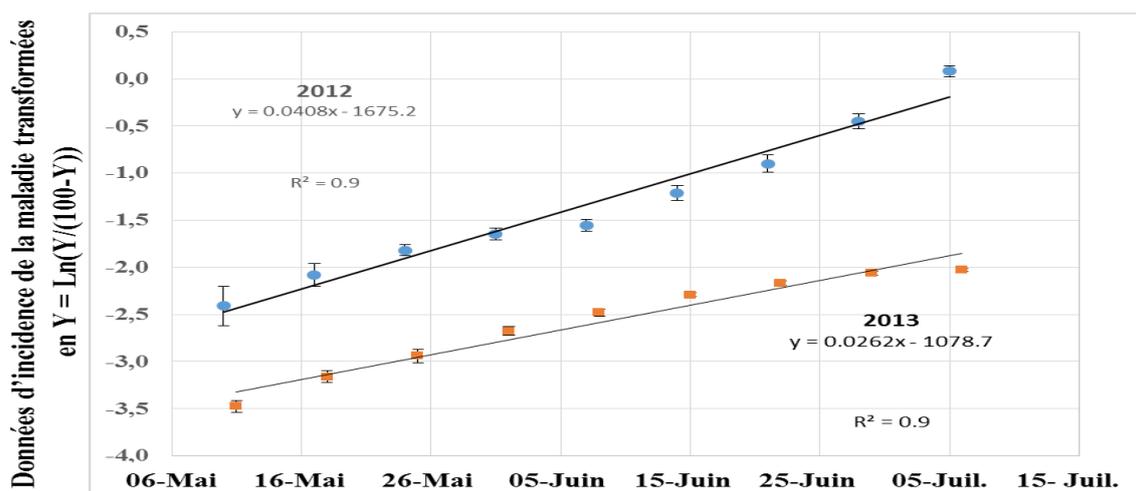
Cependant, durant les deux années d'étude, les épidémies ont progressé régulièrement.

La dynamique de développement de la pourriture grise a été représentée de manière adéquate par le modèle logistique de Van der Plank comme hypothèse pour les épidémies polycycliques (**Figure 13**), avec des valeurs de  $R^2$  pour les régressions de 0,963 et 0,957 pour les deux années 2012 et 2013 d'expérimentation respectivement ( $P < 0,0001$  dans les deux cas). Le taux de croissance de la maladie indiqué par la pente de la droite de régression est significativement plus élevée ( $P = 0,0016$ ) en 2012 (0,0408) de 2013 (0,0262) (**Figure 13**).



**Figure 12. Comparaison de la dynamique du développement de la pourriture grise.** (ligne noire) développement de *B. cinerea* et la durée moyenne quotidienne de températures supérieures à 28 °C (ligne verte en pointillés) et 30 °C (ligne rouge pointillée) dans deux serres de tomates commerciales en 2012 et 2013. Les barres d'erreur indiquent les erreurs standard des moyennes.

Dans le nord Algérien, les symptômes de la pourriture grise ont été détectés au cours de l'été où la température peut facilement atteindre 30 °C. Afin d'avoir une explication de l'apparition de la pourriture grise dans la région de Béjaia, la biologie de ce pathogène, notamment le suivi de développement de la pourriture grise a été effectué en conditions de serres commerciales ainsi que l'effet de la température sur la croissance mycélienne et la germination de spores en conditions *in vitro*.



**Figure 13. Progression de l'épidémie de la pourriture grise causée sur les serres de tomates pendant deux années (2012 et 2013).** Les valeurs sont la moyenne de quatre répétitions, transformé à l'équation suivante  $Y_t = \ln(X / (100 - X_t))$ , où  $X_t$  représente le nombre de chancres enregistrés par rangée de 100 plantes examinées à la date  $t$ . Les barres d'erreur indiquent les erreurs types des moyennes.

L'impact de la température de l'air à l'intérieur des serres sur le développement de la pourriture grise a montré que l'infection peut se produire à des températures relativement élevées (**Figure 12**). Il convient de noter que la période où la température est plus élevée que 28 °C, varie entre 1 et 16 heures par jour durant toute l'expérimentation dans les deux années. Cette période n'a pas bloqué le développement de *B. cinerea*. La température pendant la nuit et pendant une partie du jour était inférieure à 28 °C qui correspond à la plage de température optimale pour l'infection. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Aissat et al., (2008)** qui ont observé l'évolution directe des symptômes de la pourriture grise sur les tiges, les feuilles et les fruits depuis le 1er Février jusqu'à la fin du mois de Juin 2004 dans les serres de tomates situées dans les régions de Bejaia.

D'autres travaux ont montrés des températures qui permettent aux isolats de *B. cinerea* d'infecter les fleurs, les fruits et les feuilles de tomate. L'optimum de l'infection des plantes de tomates varie entre 10 à 20 °C, mais l'infection peut se produire à des températures supérieures à 25 °C (**O'Neill et al., 1997 ; Elad et al., 1988 ; Alderman et Lacy, 1983 ; Salinas et al., 1989**). En revanche, **Baptista et al., (2011)** ont observé que l'incidence de la pourriture grise diminue de façon significative à partir de 31 mai 1998 à 2000 dans les serres de tomate.

**II.2.3. Effet de la température sur la vitesse de croissance mycélienne *in vitro***

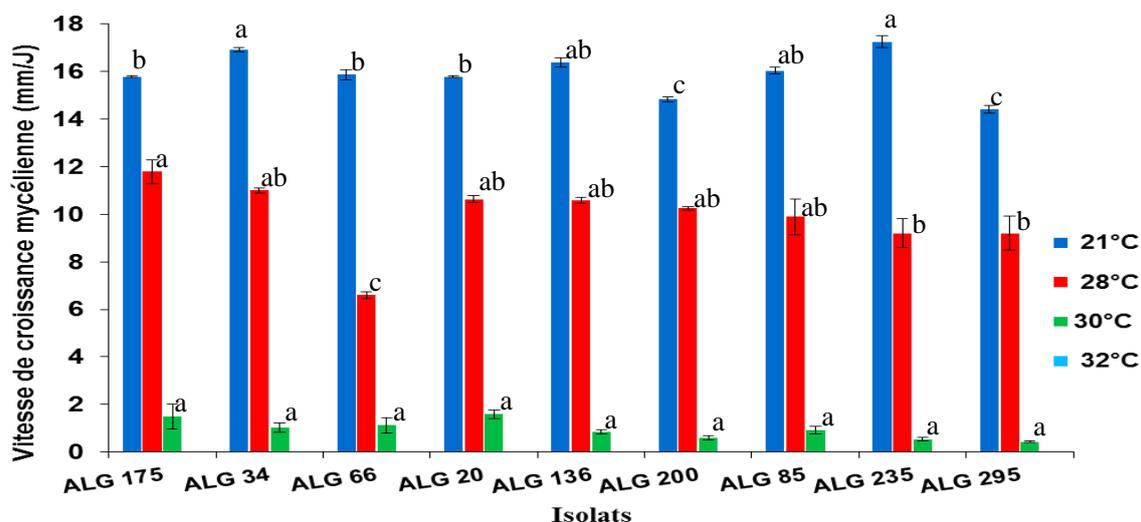
Les neuf isolats utilisés dans cette étude ont été capables de croître sur le milieu PDA à une température de 30 °C et tous ont été inhibés à 32 °C. L'analyse de la variance à deux facteurs a montré que la croissance du mycélium diffère de manière significative ( $P < 0,0001$ ) entre les isolats, elle est significativement influencée par les températures ( $P < 0,0001$ ) (**Tableau VI**), avec une interaction significative entre les isolats et la température ce qui suggère que les différents isolats ont été affectés différemment par la température.

**Tableau VI. Analyse de la variance de la vitesse de croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea*.**

Source de variation	dl	Moyenne carrée	F	Valeur P
Isolat	9	11.76	14.13	<0.0001
Température	3	6237.20	7493.49	<0.0001
Isolat x Température	27	8.86	10.65	<0.0001
Erreur	81	0.83		
<b>Total</b>	<b>120</b>			

dl : degré de liberté ; F : Valeur Fisher

En effet, des différences significatives ont été observées entre les isolats à 21 °C et 28 °C (**Figure 14**) et la réduction de la vitesse de croissance à 28 °C, par rapport à celle à 21 °C, elle varie de 25 à 58% à un niveau moyen plus au moins l'erreur standard  $37,6 \pm 3,2\%$ . En revanche, la réduction du taux de croissance à 30 °C par rapport à 21 °C a été également élevée pour tous les isolats, avec une gamme de 90 à 97% et une moyenne de  $94,1 \pm 0,8\%$ .



**Figure 14. Effet de la température sur la vitesse de croissance mycélienne de *B. cinerea*.** Les valeurs sont exprimées comme la moyenne ( $\pm$ ) écart-type de trois répétitions. Pour une température donnée, différentes lettres indiquent des différences significatives entre les souches selon le test de Newman et Keuls ( $P < 0,05$ ).

#### II.2.4. Effet de la température sur la germination des spores *in vitro*

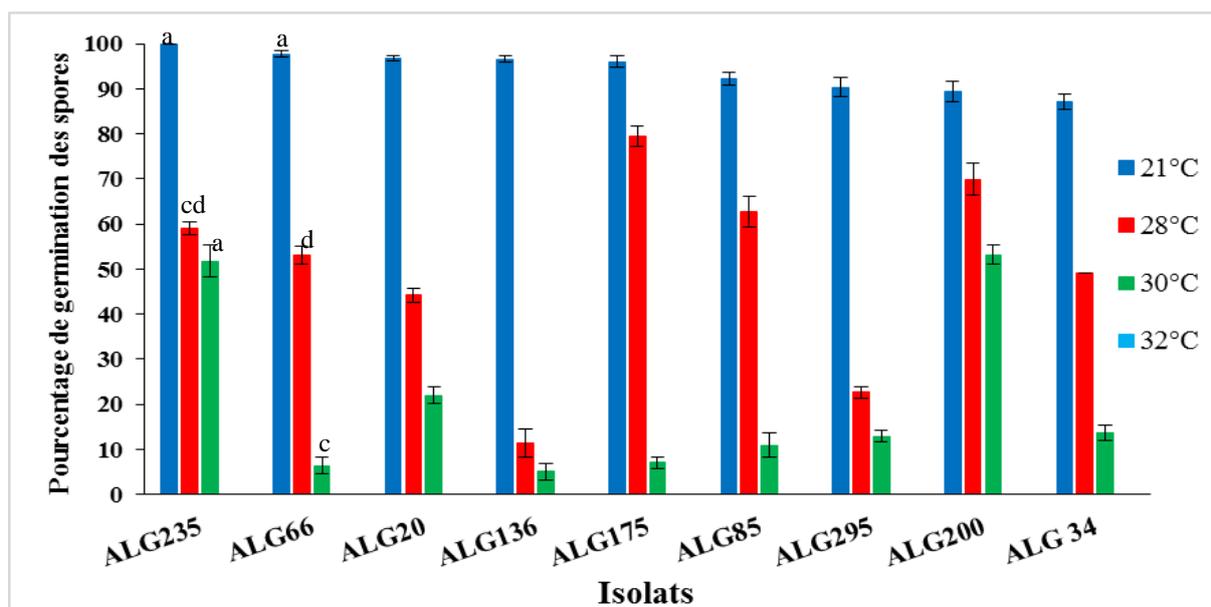
Une bonne germination des spores a été observée à 21 °C pour tous les isolats testés, la germination des spores a été réduite à partir de 28°C. Aucune germination n'a été observée à 32 °C pour tous les isolats. En revanche, le taux de germination a été élevé pour tous les isolats à 21 °C ( $94,0 \pm 1,5\%$ ). À 28 °C et 30 °C, la germination a été globalement réduite à  $50,2 \pm 7,3\%$  et  $20,3 \pm 6,3\%$ , respectivement, tandis que l'effet de la température diffère significativement entre tous les isolats et à différentes températures (**Tableau VII**).

**Tableau VII. Analyse de la variance de la germination des spores des isolats de *B. cinerea***

Source de variation	dl	Moyenne carrée	F	Valeur P
Isolat	9	1599.98	109.21	<0.0001
Température	3	67538.88	4610.06	<0.0001
Isolat x Température	27	1063.67	72.60	<0.0001
Erreur	81	14.65		
Total	120			

dl : degré de liberté ; F : Valeur Fisher

Certains isolats ont été très affecté (ALG 136) ou peu affecté (ALG 200) par des températures élevées, par contre la germination de l'isolat (ALG 175) a été moins inhibée à 28 °C et a été parmi les plus réduite à 30 °C (**Figure 15**). L'effet de la température sur les isolats de *B. cinerea* a été plus variable sur la germination des spores que sur la croissance du mycélium, il n'y avait pas de corrélation significative entre les deux types d'effets ( $R^2 = 0,06$  et  $0,26$  à 28 °C et 30 °C, respectivement).



**Figure 15.** Effet de différentes températures sur la germination des spores exprimées en pourcentage de germination des isolats de *B. cinerea*. Les valeurs sont exprimées par la moyenne ( $\pm$ ) l'erreur standard de cinq répétitions.

L'effet de la température sur *B. cinerea* dans les conditions du laboratoire montre que la croissance du mycélium et la germination des spores des isolats de *B. cinerea* testés a été significativement affectés par la température ( $P < 0,05$ ). Un taux élevé de croissance du mycélium et la germination des spores a été montré à 21 °C et 28 °C. Aucun développement n'a été enregistré à 32 °C. Par contre les résultats ont montré que tous les isolats de *B. cinerea* sont capables de croître à 30 °C et une variabilité significative a été détectée entre eux.

Les présents résultats sont en désaccord avec les études antérieures (**Kerssies, 1994 ; Judet-Correia et al., 2010 ; Pande et al., 2010 ; Bautista-Banos et al., 1998**), où les auteurs ont montré que la croissance des isolats de *B. cinerea* recueillies sur différentes plantes hôtes a été entièrement arrêté à 30 °C. Plusieurs autres études ont été menées sur l'effet des températures sur d'autres espèces de *Botrytis*. **Chen et al., (1998)** ont montré que la germination des spores de *B. elliptica*

a été observée à une température supérieure à 28 °C. **Clarkson et al., (2000)** ont remarqué que le taux de germination de *B. squamosa* était plus élevé à 16 °C. A des températures supérieures à 20 °C, le pourcentage de germination des spores produites diminue rapidement. D'autres études ont montré une situation similaire avec notre résultat sur l'effet de la température sur le développement de *B. cinerea* (**Hosen et al., 2010 ; Mirzaei et al., 2009**), où ils ont observés une grande variabilité entre les isolats de *B. cinerea*, et ont démontré la possibilité de développement de certains isolats de *B. cinerea* à des températures supérieures à 30 °C.

### II.3. Conclusion

Les résultats de cette étude ont montré clairement que le microclimat à l'intérieur des serres de tomates a été caractérisé par des températures élevées (>30 °C) durant la journée. La cinétique de développement de l'épidémie progresse malgré l'augmentation de la température. Le model de Van der Plank appliquée a montré que l'épidémie durant 2012 et 2013 a été polycyclique. Ce qui a été confirmé par le développement des différentes étapes du cycle biologique de *B. cinerea* (développement du mycélium, production de spores, germination et infection des tissus). Les résultats obtenus *in vitro*, et ceux obtenus sous serres montrent que cet agent pathogène peut facilement se développer à des températures élevées.

**Chapitre III : Effet des températures élevées sur l'agressivité des souches de *B. cinerea* isolées dans deux régions différentes Europe (France et Norvège) et Algérie**

Les conditions de culture des tomates sous serres fournissent un environnement idéal pour le développement des maladies fongiques tel que la pourriture grise causée par *B. cinerea* (Dik et Wubben, 2007). La chaleur et le taux d'humidité élevé dans les serres favorisent le développement de *B. cinerea*. Les contaminations par *B. cinerea* sont plus virulentes dans les cultures sous serres soumises à des températures modérées, une humidité relative élevée et de l'air stagnant (Baptista et al., 2011). La maîtrise de *B. cinerea* a été toujours difficile, plus particulièrement sous serres. Cette situation est favorisée par plusieurs facteurs à savoir le climat, les plantes qui sont particulièrement réceptives (disposant d'organes succulents, blessées par la taille ou l'ébourgeonnage), aptitude particulière de ce champignon à s'adapter rapidement aux traitements chimiques utilisés.

*B. cinerea* est caractérisé par sa capacité d'adaptation, ce qui limite les méthodes de lutte entreprises (Baptista, 2007). 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. Plusieurs études ont démontré la variabilité phénotypique de *B. cinerea* dans de nombreux aspects, notamment, la morphologie, l'agressivité, l'effet des facteurs environnementaux et la résistance aux différents fongicides (Ajouz et al., 2011 ; Martinez et al., 2009 ; Lorbeer et Vencelli, 1990 ; Barnes, 1930), ainsi que la variabilité génétique entre les populations de *B. cinerea* (Fournier et al., 2005 ; Karchani-Balma et al., 2008 ; Adjebli et al., 2014 ; Decognet et al., 2009 ; Fekete et al., 2012). La difficulté dans la gestion de la pourriture grise a augmenté dont le besoin de rechercher des méthodes alternatives. L'adoption de techniques culturales, comme la ventilation et le chauffage des serres, qui se sont révélés très efficaces (Jarvis, 1992).

Les objectifs principaux de ce chapitre sont : (i) la détermination de l'effet des températures élevées sur l'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur des folioles de tomate dans des conditions contrôlées ; (ii) déterminer si l'inoculum secondaire produit à des températures élevées peut infecter des folioles de tomates ; (iii) la vérification de l'existence d'une tolérance aux températures élevées entre les isolats de *B. cinerea* collectés en Algérie, en France et en Norvège.

### III.1. Matériel et méthodes

#### III.1.1. Choix de souches

Quatorze isolats de *B. cinerea* ont été collectés à partir de tomates sous serres (chauffées et non chauffées) et recueillies à différents organes de la plante de trois régions géographiques différentes (**Tableau VIII**). La purification des isolats a été effectuée par la technique d'isolement monospore en utilisant un milieu de culture eau gélosée (1,5% agar Difco) (**Figure 6**). Le stockage des isolats a été réalisé à -20 °C dans un tampon phosphate (0,06 M) contenant 20% (v/v) de glycérol (**Annexe I**).

**Tableau VIII. Origine des isolats de *B. cinerea* testés**

Isolats	Origine	Année
ALG 66, ALG 257, ALG 258	Algérie	2007
ALG 260, ALG 263, ALG 264		2008
NHne1, NHne2, NHpm6, BC45,	France	1989
BC90, BC1, BC21		1991
BC142	Norvège	-

ALG : Algérie, NHne : Souche collectée dans la neige, BC : *Botrytis cinerea*

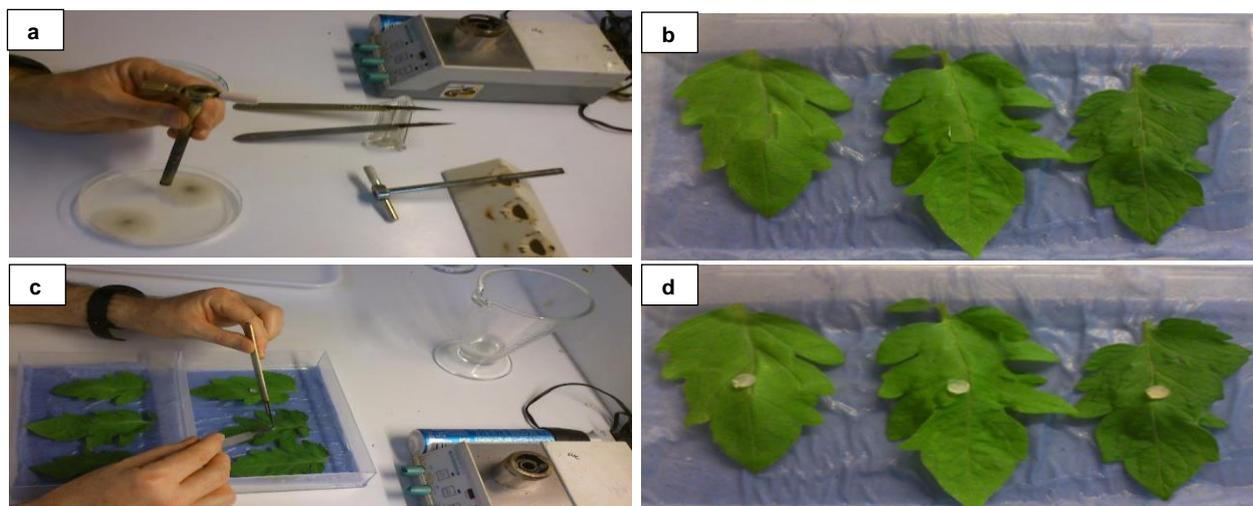
#### III.1.2. L'effet de la température sur la vitesse de croissance mycélienne

La vitesse de croissance mycélienne a été étudiée à six températures différentes (21, 28, 29, 30, 31 et 32 °C) sur un milieu de culture PDA (39 g l<sup>-1</sup> ; Laboratoire Difco, Detroit, Michigan, USA) (**Annexe I**). Les expériences ont été menées dans des boîtes de Pétri de 90 mm inoculées avec un implant mycélien de 3 mm de diamètre. Les implants contenant du mycélium de chaque isolat ont été placés en contact direct avec le milieu de culture. Trois boîtes ont été utilisées pour chaque isolat et température. L'expérience a été répétée trois fois simultanément. Les boîtes contenant les implants mycéliens ont été incubées à l'obscurité pendant 7 jours. Deux diamètres perpendiculaires par colonie ont été mesurés quotidiennement sans avoir ouvert les boîtes de Pétri et la vitesse de croissance a

été calculé sur la base de ces deux diamètres. Les données ont été analysées en utilisant le module ANOVA/MANOVA implémenté dans le logiciel Statistica 5.0.

### III.1.3. Effet de l'inoculum primaire de *B. cinerea* produit à 21°C sur l'agressivité des folioles de tomate à des températures élevées

L'agressivité a été étudiée sur des folioles de tomate (*Lycopersicon esculuntum* v. Monalbo) à différentes températures (21 °C comme optimum de l'agressivité, et 28, 29, 30 °C, comme températures élevées) sur des folioles de tomates. L'inoculum a été produit à 21 °C sur milieu PDA (39 g l<sup>-1</sup>; Laboratoire Difco, Detroit, Michigan, USA) (**Annexe I**). Les tests ont été effectués sur des folioles de tomates cv. Monalbo (INRA, Avignon, France) âgées de six à huit semaines. Des folioles de taille uniforme, ont été recueillies à partir de feuilles de tomates, puis placés dans des boîtes en plastique transparentes avec un fond humidifié avec du papier absorbant bleu (**Figure 16**) (Protocole INRA AVIGNON France). Trois folioles par isolat et par température ont été utilisées, les folioles ont été inoculées avec implant mycélien âgé de trois jours de chaque isolat de *B. cinerea*.



**Figure 16. Technique d'inoculation des folioles de tomates par les isolats de *B. cinerea*.** (a) préparation des implants mycéliens de *B. cinerea* ; (b) préparation des folioles de tomates dans des boîtes humidifiées avec du papier de germination ; (c) et (d) inoculation des folioles.

Les boîtes contenant les folioles inoculées avec les implants de chaque isolat ont été incubées dans des enceintes climatiques à l'obscurité. L'expérience a été répétée trois fois indépendamment. Les notations ont été effectuées à partir du deuxième jour, et pendant cinq jours suivant l'inoculation. Les surfaces des lésions résultant ont été mesurées pour chaque boîte par un le logiciel Asses 2.0 (APS

Press, StPaul, Minnesota, USA) qui consiste à une prise de photo toutes les 24 heures puis analysées par ce dernier logiciel (**Annexe III**). Afin de tenir compte de la cinétique de développement de la maladie, et de faciliter la comparaison de l'agressivité des isolats, le pourcentage d'inhibition de l'agressivité (I%) pour chaque isolat à différentes températures a été calculé par la formule suivante :

$[100 \times (SL_{21\text{ °C}} - SL_{TE}) / SL_{21\text{ °C}}]$ , où  $SL_{21\text{ °C}}$  représente la surface lésions produites sur des folioles inoculées à 21 °C, et  $SL_{TE}$  les surface de lésions produites sur folioles inoculées à des températures élevées (TE).

#### **III.1.4. Effet de l'inoculum primaire produit à des températures élevées sur l'agressivité de *B. cinerea* sur les folioles de tomates**

2 µl d'une suspension de spores (stocké à -20 °C) de chaque isolat a été placée sur milieu PDA (39 g l<sup>-1</sup>; Laboratoire Difco, Detroit, Michigan, USA) (**Annexe I**). Les boîtes ensemencées ont été incubées à 21, 28, et 29 °C dans l'obscurité pendant trois jours, le temps nécessaire pour le développement du mycélium des isolats de *B. cinerea*. Des folioles de taille uniforme, ont ensuite été prises à partir de jeune plants de tomates cv. Monalbo (INRA, France) produite entre six à huit semaines, puis placée dans des boîtes en plastique transparentes avec un fond humidifié avec du papier absorbant bleu. Un implant mycélien d'un diamètre de 3 mm a été obtenu à partir de culture jeunes de chaque isolat puis déposé au centre de chaque foliole (1 implant mycélien par foliole). Les implants mycéliens ont été systématiquement placés au centre de des folioles (**Figure 16**) (Protocole INRA AVIGNON France). Trois folioles ont été inoculées par isolat, et par température. Les boîtes ont été placées dans une chambre climatique à la température appropriée pendant cinq jours. Dès le deuxième jour après l'inoculation, chaque boîte a été analysée par le logiciel Asses 2.0 (APS Press, Minnesota) afin de déterminer la surface de lésion (mm<sup>2</sup>) toutes les 24 heures pendant trois jours pour observer l'évolution des surfaces de lésions (**Annexe III**).

### III.1.5. Effet de l'inoculum primaire de *B. cinerea* sur l'agressivité des plantes entières de tomate

#### a) Production du matériel végétal

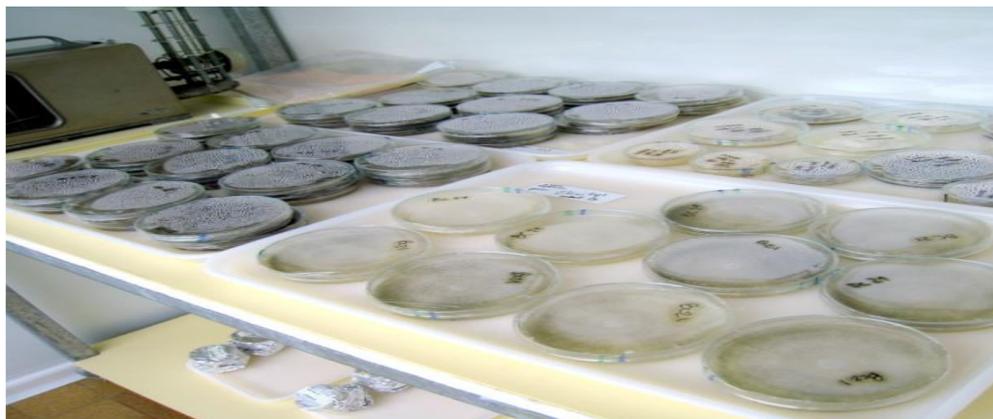
Trois lots de 42 plants de tomate (*Lycopersicon esculuntum* v. Monalbo) ont été semés huit semaines avant l'inoculation dans un mélange de germination (Klasmann-Deilmann) composé de tourbe blonde, brune et de fibre de coco. Ces lots ont été cultivés sous serre où ils ont été arrosés une à plusieurs fois par jour avec une solution nutritive (**Figure 17**) (Protocole INRA AVIGNON France). Onze jours après le semis, les plantules ont été repiquées dans des pots en plastique contenant un substrat de type TS3 Standard (Klasmann-Deilmann) composé d'un mélange de tourbe, de sphaigne moyennement décomposée et d'argile.



**Figure 17. Production des tomates sous serre**

#### b) Préparation des suspensions de spores

Les isolats de *B. cinerea* sont mis en culture sur milieu PDA (extrait de pomme de terre-dextrose agar) (**Annexe I**) qui est un milieu de culture universel pour les champignons favorisant leur sporulation. Pour cela, 6  $\mu$ L d'une suspension de spores stockée à -20 °C dans du glycérol sont déposées sur des boîtes contenant le milieu PDA. Les boîtes de Pétri sont stockées en chambre de culture (Température : 21 °C ; Photopériode : 14h d'éclairage par jour) pendant quatorze jours afin de permettre le développement mycélien et la production de spores (**Figure 18**).



**Figure 18. Mise en culture des souches de *B. cinerea***

Pour réaliser la suspension de spores, un volume de 3 ml d'eau distillée stérile est ajouté dans chaque boîte de Pétri et le mycélium est raclé avec un râteau en verre stérile. La suspension constituée de spores et de mycélium est récoltée dans un pilulier stérile contenant des billes en verre. Elle est alors vortexée pendant quelques secondes afin de bien séparer les spores du mycélium et des conidiophores. La suspension est ensuite passée à travers un filtre percé de pores d'un diamètre de 30  $\mu\text{m}$  afin de ne conserver que les spores (**Figure 19**).



**Figure 19. Dispositif de filtration de la suspension**

La concentration de la suspension de spores obtenue est estimée sur cellule de Malassez. Une suspension concentrée à  $10^6$  spores.ml<sup>-1</sup> est réalisée pour l'inoculation des plantes. Il s'agit de la concentration optimale pour le développement de *B. cinerea* qui permet une apparition rapide de symptômes mesurables et quantifiables. Par ailleurs, une suspension concentrée à  $10^5$  spores.ml<sup>-1</sup> est réalisée pour contrôler le taux de germination des spores pour chaque souche.

### c) Contrôle du taux de germination

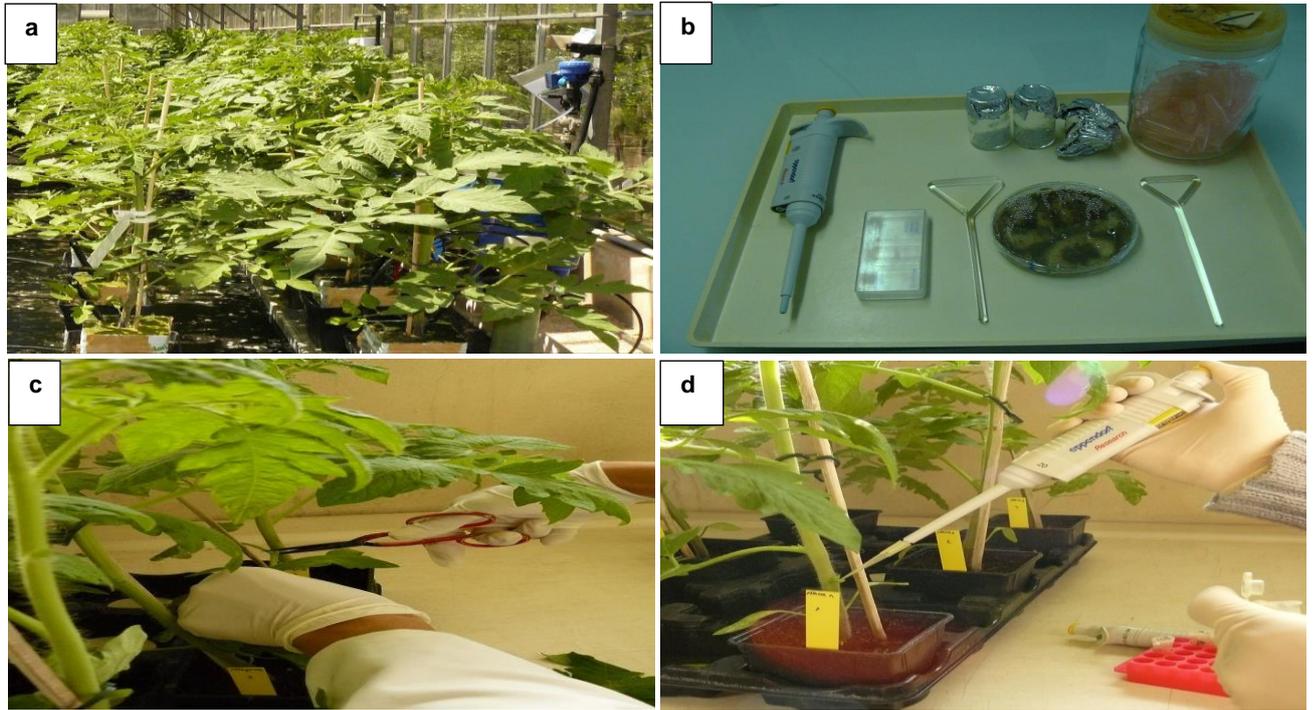
Pour chaque isolat, un volume de 100  $\mu\text{l}$  de la suspension à  $10^5$  spores.ml<sup>-1</sup> est étalé sur milieu PDA. Les boîtes de Pétri sont stockées en chambre climatique (Temperature : 21°C. Photopériode : 14h d'éclairage par jour) pendant 24 heures. Elles sont ensuite observées sous microscope optique (grossissement x100) et cent spores sont dénombrées. Chaque spore germée est enregistrée sur un compteur afin de déterminer un pourcentage de germination.

Cette estimation permet de vérifier que les souches inoculées sur les plantes ont bien la capacité de germer et qu'un éventuel résultat négatif (agressivité nulle) ne serait pas dû à une absence de germination des spores.

### d) Inoculation des plantes entières

Pour chaque isolat, trois plantes sont inoculées. La troisième, cinquième et septième feuille en partant du collet sont sectionnées à environ 1cm de la tige. Une feuille saine est laissée entre chaque chicot inoculé afin de permettre à la plante de survivre jusqu'à la fin de l'expérimentation. Une goutte de 10  $\mu\text{l}$  de la suspension à  $10^6$  spores.ml<sup>-1</sup> est déposée à l'extrémité des trois chicots. Les plantes sont laissés immobiles pendant au moins dix minutes pour permettre l'absorption de la suspension (**Figure 20**) (Protocole INRA AVIGNON France).

Les plantes sont ensuite placées en chambre climatique (Temperature : 21°C. Photopériode : 14h d'éclairage par jour. Hygrométrie : 90%) pendant sept jours au cours desquels ils sont arrosés deux fois par jour (**Figure 21**). D'autre part, les plantes sont randomisées afin que la variabilité des résultats soit indépendante de leur position dans la chambre de culture.



**Figure 20. Technique d'inoculation des plantes de tomates par les isolats de *B. cinerea*.** (a) préparation des plantes de tomates ; (b) préparation de la suspension de spores des isolats de *B. cinerea* ; (c) préparation des chicots et (d) inoculation des chicots par la suspension des isolats.



**Figure 21. Mise en culture des plantes de tomate en chambre humide**

L'expérience a été répétée trois fois simultanément, chacune avec une répétition de trois plantes par chaque isolat. La longueur de la lésion causée par chaque isolat a été suivie quotidiennement pendant 7 jours après l'inoculation. Pour tenir compte de la cinétique de développement de la maladie, nous avons calculés une superficie moyenne sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) pour chaque isolat **(Annexe V) (Madden et al., 2007)**.

#### **e) Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le module ANOVA/MANOVA implémenté dans le logiciel STATISTICA 5.0, et le test de comparaison multiple de Newman-Keuls a été utilisé pour comparer les moyennes de chaque isolat. Afin de savoir s'il existe ou non une différence significative entre les isolats de *B. cinerea* et entre chaque origine des isolats testés.

### III.2. Résultats et discussion

#### III.2.1. Effet des températures élevées sur la vitesse de croissance mycélienne

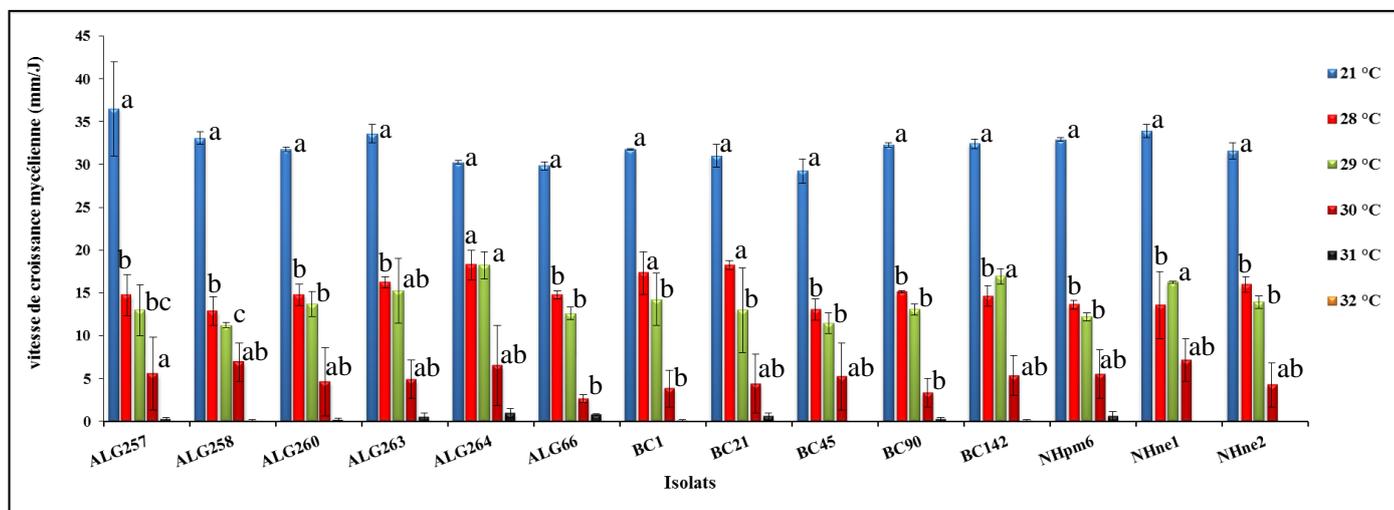
La vitesse de croissance mycélienne des différents isolats de *B. cinerea* a été significativement affectée par des températures élevées telles que 28, 29, 30, 31, et 32 °C par rapport à 21 °C sur le milieu PDA ( $P < 0.05$ ) (Tableau IX).

**Tableau IX. Comparaison des moyennes de vitesse de croissance des isolats de *B. cinerea*.**

Température	21 °C	28 °C	29 °C	30 °C	31 °C	32 °C
PDA	32,459 <sup>a</sup>	15,290 <sup>b</sup>	14,079 <sup>b</sup>	5,302 <sup>c</sup>	0,292 <sup>d</sup>	0,000 <sup>e</sup>

Les mêmes lettres dans la même ligne indiquent qu'il n'y a pas de différence significative, selon le test de Newman–Keuls ( $P = 0.05$ )

La vitesse de croissance de tous les isolats diminue avec l'augmentation de la température d'incubation pour le milieu utilisé, le taux de croissance a été complètement stoppé à 32 °C (Figure 22).



**Figure 22. Vitesse de croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* à différentes températures sur milieu PDA.** Les valeurs marquées par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes pour chaque température, selon le test de Newman–Keuls ( $P = 0.05$ )

La comparaison des vitesses de croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les isolats collectées dans les régions d'isolement ( $P > 0, 05$ ) (Tableau X).

**Tableau X. Comparaison de la moyenne de la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* selon l'origine d'isolement.**

Températures	21 °C	28 °C	29 °C	30 °C	31 °C	32 °C
Valeur <i>P</i> (Algérie/France et Norvège)	0.25	0.87	0.76	0.54	0.26	-

Les mêmes lettres dans la même colonne indique qu'il n'y a pas de différence significative, selon le test de Newman-Keuls ( $P = 0.05$ )

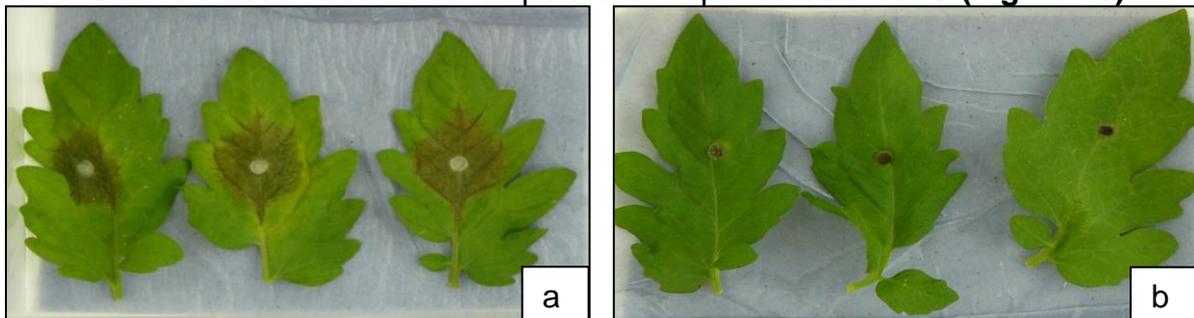
Le résultat de cette étude a permis de mieux comprendre l'effet des températures élevées sur la croissance des isolats de *B. cinerea* sur un milieu de culture PDA, la croissance des isolats a été réduite d'une façon remarquable à 28, 29, 30 et 31 °C par rapport à 21 °C et stoppée à 32 °C. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans plusieurs études antérieures. **Martinez et al., (2003)** ont étudié l'effet des températures à (5, 20, 25, 28 °C) sur la variabilité des isolats de *B. cinerea*. Ils ont conclu qu'à des températures élevées (28 °C) et basses (5 °C), la croissance mycélienne a été fortement réduite à ces deux températures. D'autres études ont montré que la croissance mycélienne radiale des isolats de *B. cinerea* augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à 20 °C puis elle diminue progressivement jusqu'à 30 °C et l'absence de croissance a été observée à 35 °C (**Hosen et al., 2010 ; Ahmed et al., 2007**). Contrairement à nos résultats, **Mirzaei et al., (2009)** ont montré que des isolats de *B. cinerea* peuvent pousser à des températures élevées (35 °C). **Boneche et Pucheu, (1986)** ont étudié l'effet de la température sur la croissance de *B. cinerea* sur un milieu gélosé. La vitesse de croissance de *B. cinerea* augmente avec la température dans la plage de température de 5 °C à 22 °C, Au-dessus de 25 °C, le développement du champignon est ralenti et il y a très rapidement inhibition totale.

La comparaison de l'effet des températures élevées entre l'origine d'isolement des isolats de *B. cinerea* (isolats d'Algérie/France et Norvège) *in vitro* sur PDA, n'a montré aucune différence significative (**Tableau X**), ce résultat peut s'expliquer par la présence de spores en suspension de *B. cinerea* soulève la possibilité d'une longue dissémination à grande distance de cet agent pathogène. On note que des différences ont été détectées au sein des isolats de la même origine géographique.

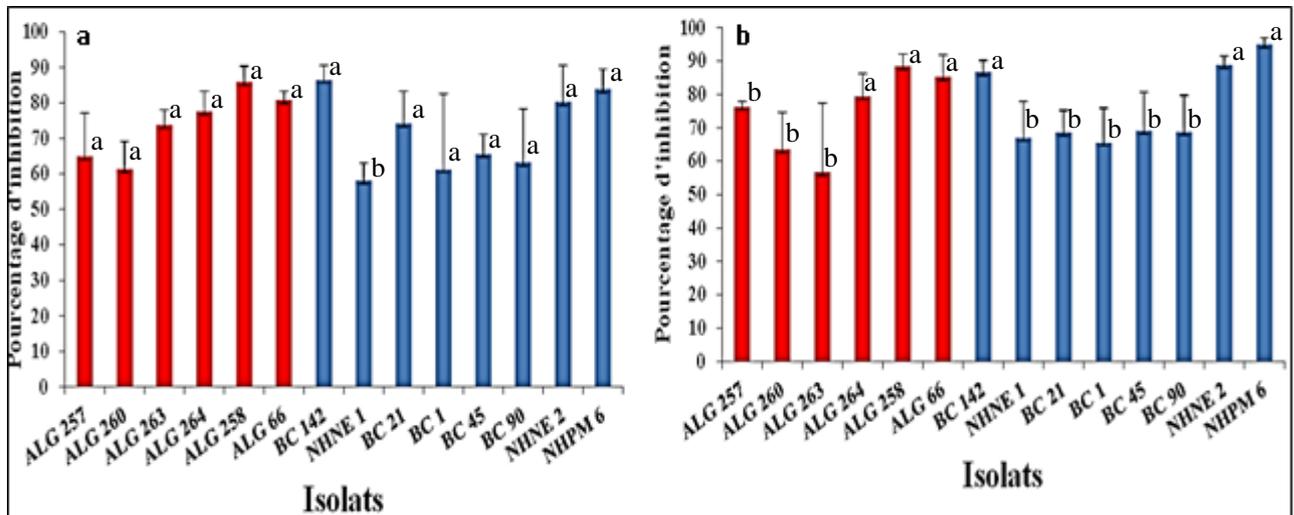
Cependant, les isolats de la même plante hôte ont eu tendance à se regrouper, indépendamment de leur origine géographique (Muñoz *et al.*, 2002 ; Giraud *et al.*, 1999).

**III.2.2. Effet des températures élevées sur l'agressivité de *B. cinerea* sur folioles de tomate**

Le test d'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur les folioles de tomates montre des surfaces de lésions différentes selon la température d'incubation. Des surfaces de lésions élevées à 21 °C, en parallèle une réduction des surfaces de lésions ont été observées à des températures supérieures à 21 °C (Figure 23).



**Figure 23. Lésions de la pourriture grise sur les folioles de tomates. (a) lésions à 21 °C ; (b) lésions à 30 °C.**

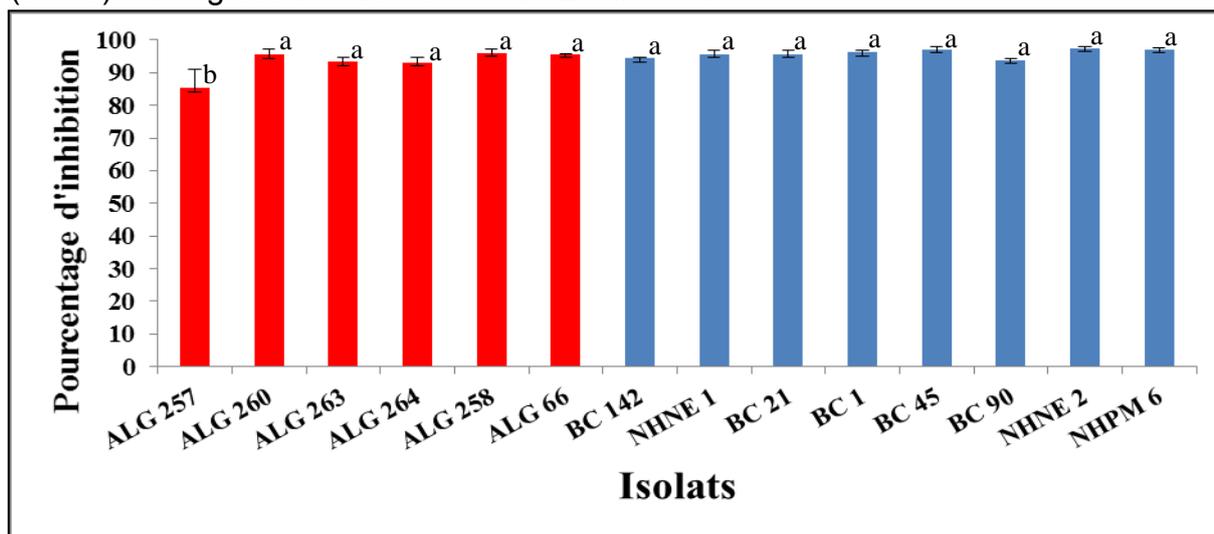


**Figure 24. Inhibition de l'agressivité des isolats de *B. cinerea* produit à 21 °C sur des folioles de tomates incubées à 28 °C (a) et 29 °C (b).** Les valeurs marquées par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes pour chaque température, selon le test de Newman–Keuls (P = 0.05).

L'inhibition de l'agressivité des isolats de *B. cinerea* par des températures élevées a été similaire à 28 et 29 °C (Figure 24). Aucune différence significative de l'agressivité a été trouvée entre les isolats de *B. cinerea* testés à ces deux

températures ( $P = 0,15$  ;  $28\text{ °C}$  et  $P = 0,65$  ;  $29\text{ °C}$ ), quelle que soit la température d'incubation ( $28$  ou  $29\text{ °C}$ ), le pourcentage moyen d'inhibition de l'agressivité des isolats à ces deux températures a été élevé ce qui indique une réduction de l'agressivité des isolats *B. cinerea* ( $75,66 \pm 2,14\%$  à  $28\text{ °C}$  et  $72,69 \pm 2,14\%$  à  $29\text{ °C}$ ).

L'agressivité de tous les isolats testés a été complètement stoppée à  $30\text{ °C}$  (**Figure 25**), les résultats de ce test ont révélé un effet significatif de la température ( $30\text{ °C}$ ) sur l'agressivité des isolats de *B. cinerea*.



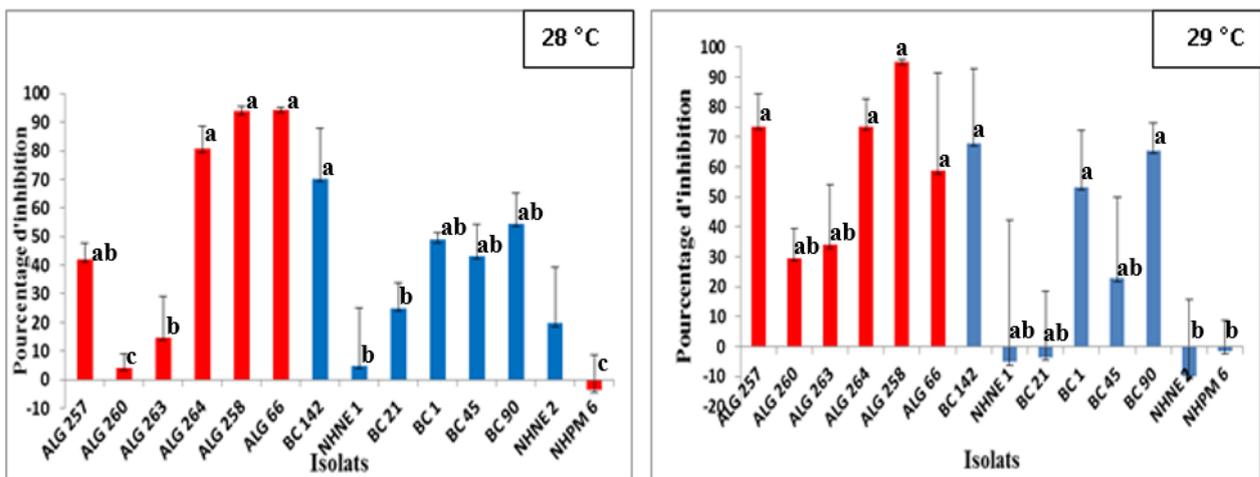
**Figure 25.** Inhibition de l'agressivité des isolats de *B. cinerea* produit à  $21\text{ °C}$  sur des folioles de tomates incubées à  $30\text{ °C}$ . Les valeurs marquées par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, selon le test de Newman-Keuls ( $P = 0.05$ )

L'étude de l'agressivité des isolats de *B. cinerea* provenant de fruits de fraise ont montré des variations de degrés d'agressivité des trois isolats étudiés sur les différentes parties de la plante de fraise (**Valiuskaite et al., 2010**). La comparaison de l'agressivité de 15 isolats de *B. cinerea* isolés à partir de l'air et deux isolats de référence révèle que ces deux derniers montrent une agressivité supérieure aux 15 isolats testés. 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 isolats de *B. cinerea* sur les feuilles de concombre. Ces auteurs ont remarqué une différence importante de pathogénicité entre les isolats testés. 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 de tomate incubés à haute pression de vapeur plutôt qu'à une pression de vapeur faible (Shtienberg *et al.*, 1998).

### III.2.3. Effet de l'inoculum secondaire produit à différentes températures sur l'agressivité de *B. cinerea* sur folioles de tomate

Lorsque l'inoculum de *B. cinerea* a été produit à des températures de 28 et de 29 °C, le test d'agressivité sur les folioles réalisé à 21 °C montre une grande variabilité d'agressivité entre les isolats testés. (Figure 26). Des différences significatives ont été observées entre tous les isolats de *B. cinerea* testés ( $P < 0,05$ ).

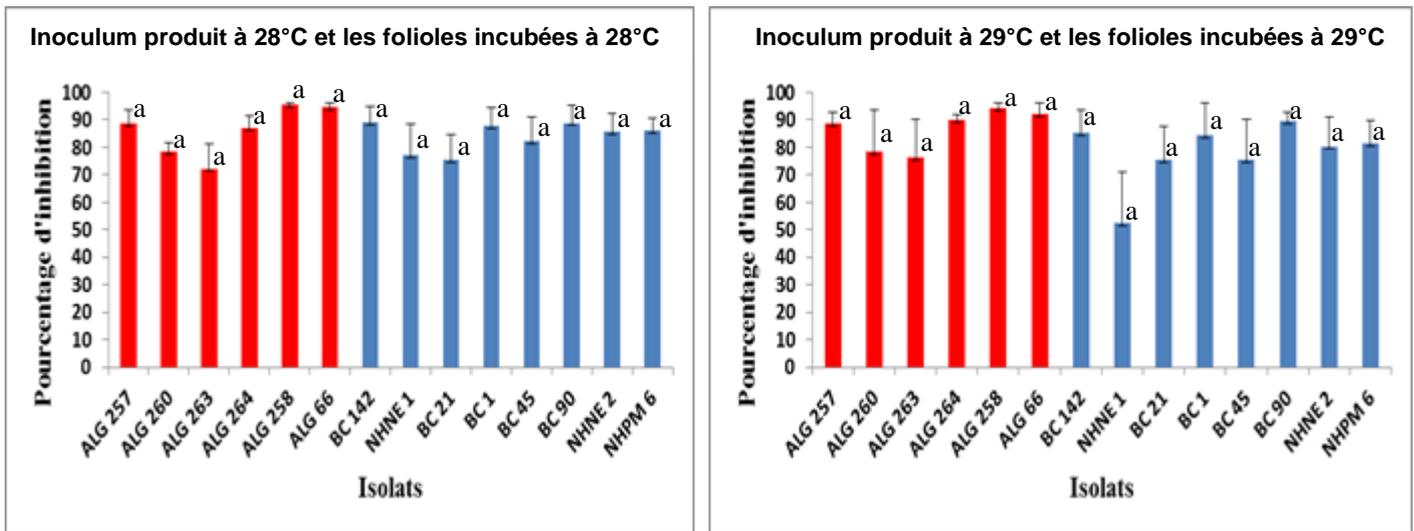


**Figure 26.** Inhibition de l'agressivité des isolats de *B. cinerea* produit à 28 et 29 °C sur des folioles de tomates incubées à 21 °C. Les valeurs marquées par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes pour chaque température, selon le test de Newman-Keuls ( $P = 0.05$ ).

Des résultats similaires ont été obtenus entre tous les isolats de *B. cinerea*, lorsque l'inoculum de *B. cinerea* a été produit à des températures de 28 et de 29 °C, le test d'agressivité sur les folioles à 28 et 29 °C ( $P = 0,67$  ; 28 °C et  $P = 0,24$  ; 29 °C) (Figure 27).

Les résultats de ce test ont montré que l'agressivité de tous les isolats testés à des températures élevées a été réduite de manière significative. Aucune différence

significative n'a été détectée entre les isolats collectés de l'Algérie (Bejaia) et d'Europe (France et Norvège) ( $P > 0,05$ ).



**Figure 27. Inhibition de l'agressivité des isolats de *B. cinerea* produit à 28 et 29 °C sur des folioles de tomates incubées à 28 et 29 °C.** Les valeurs marquées par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes pour chaque température, selon le test de Newman-Keuls ( $P = 0.05$ ).

Le test d'effet de la température sur l'agressivité des isolats de *B. cinerea* mené sur les folioles de tomates a révélé que tous les isolats ont été agressifs sur les folioles de tomates à 21 °C. Nos résultats sont en accord avec les résultats de **Mirzaei et al., 2009** et **Martinez et al., 2009**. Ces auteurs ont montré que les températures optimales d'agressivité étaient comprises entre 20 et 25 °C sur milieu PDA. **Kerssies, (1994)** a montré que il y a plus de lésions de *B. cinerea* sur les fleurs de gerbera à des températures de 20 et 25 °C que de 10 et 15 °C. À 30 °C, l'agressivité des isolats de *B. cinerea* a été stoppée.

Cependant l'agressivité des isolats a fortement été réduite lorsque les folioles ont été soumises à 28 et 29 °C et aucune lésion n'a été rapportée pour tous les isolats à 30 °C. Ce résultat a été confirmé par les études antérieures montrant que le développement de *B. cinerea* est limité par les températures chaudes (**Yunis et al., 1990 ; Korolev et al., 2006**). Il est à noter que les isolats testés dans cette étude ont montré une variabilité vis-à-vis des températures élevées (28 et 29 °C). Lorsque l'inoculum des isolats a été produit à 28 et 29 °C et les folioles ont été incubées à 21 °C, certains isolats de *B. cinerea* ont été capables de reprendre leur pouvoir agressif ainsi traduit par les taux variables du pourcentage d'inhibition de l'agressivité observée (**Figure 26**). Par contre, lorsque l'inoculum a été produit à 28 et 29 °C et

les folioles ont été incubées à ces mêmes températures, l'agressivité des isolats a été fortement réduite ainsi traduit par les taux élevés du pourcentage d'inhibition d'agressivité (**Figure 27**). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **O'Neill et al., (1997)** qui ont observé que la température optimale de l'infection des feuilles, des fruits, et des fleurs de tomate a été comprise entre 10 et 20 °C. Au-delà de cette plage de température, l'infection diminue graduellement. **Bulger et al., (1987)** ont montré que l'infection des feuilles et des fruits du fraisier a été fortement réduite à des températures supérieures à 25 °C et inférieures à 15 °C. D'autres travaux menés sur d'autres plantes hôtes ont confirmés nos résultats. **Nair et Allen, (1993)**, ces auteurs ont étudié l'effet de température sur l'infection des fleurs et baies de raisin en condition contrôlés, ils ont montré qu'à la température de 30 °C, peu de fleurs et baies ont été infectées par rapport aux autres températures. **Thomas et Marois, (1986)**, ont étudié le développement du mycélium de *B. cinerea* sur les baies de raisin en condition de températures contrôlées. Ces auteurs ont montré que le développement du mycélium a été réduit à 26 °C par rapport à 15 et 20 °C.

#### III.2.4. Test d'agressivité de *B. cinerea* sur plante de tomate

L'infection des plaies et le développement de lésions sur les tiges a été observée pour tous les isolats testés, ce qui se traduit par la formation de chancres sur la tige (**Figure 28**). Des différences significatives du niveau d'agressivité sur les plantes de tomate des isolats de *B. cinerea* ont été observées (**Figure 29**).

La comparaison des AUDPC des lésions sur les tiges de tomate ont révélés des tendances parmi les isolats de *B. cinerea* testés. Pour les isolats les plus agressifs (BC1, NHne1, ALG 257, ALG 260, ALG 263), le taux d'expansion de la lésion pour les autres isolats a été moins important.



avirulentes. Des résultats similaires ont été obtenus par **Pie et Brower, (1993)**. Des souches de *B. cinerea* collectées sur des roses étaient davantage agressives sur des pétales de rose que des souches provenant des fleurs de gerbéra ou de petit pois (**Salinas et al., 1989**). Tout ces résultats viennent appuyer l'existence d'une grande variabilité des isolats de *B. cinerea* quel que soit leur origine d'isolement.

### III.3. Conclusion

Notre étude nous a permis de conclure que l'exposition à des températures élevées tel que 28, 29, 30, 31 et 32 °C réduit d'une façon significative la vitesse de croissance mycélienne et l'infection sur des folioles de tomate. Une grande variabilité entre les isolats a été détectée quand ils sont exposés aux températures élevées, qui est probablement due à la diversité génétique et phénotypiques des populations de *B. cinerea*. L'effet de la température nous a révélé qu'il n'y a pas de différence significative entre les isolats collectés à Bejaia et les isolats collectés en France et Norvège, ce qui peut être expliqué par la biologie de ce champignon qui est très polyphage et très ubiquitaire ainsi que sa capacité à se disséminer à travers de longue distance.

#### Chapitre IV : Etude de la structure et la diversité génétique des populations de *B. cinerea* isolées en Algérie

Les études de la génétique des populations offrent des outils puissants pour élucider les histoires de vie des agents phytopathogènes et répondre à des questions fondamentales sur la biologie de ces organismes. Une meilleure connaissance de la biologie des populations d'agent pathogène est susceptible de conduire à une meilleure gestion de la maladie dans les écosystèmes agricoles. L'étude de la diversité et la structure génétique de la population d'un agent phytopathogène est important afin d'évaluer le potentiel d'adaptation et de surmonter les stratégies de lutte telles que les applications de fongicides (**McDonald et Linde, 2002**).

Dans le cas de *B. cinerea*, des marqueurs microsatellites sont disponibles (**Fournier et al., 2002**) et des études antérieures ont montré un niveau élevé de diversité génétique parmi les isolats de ce champignon dans plusieurs système et différentes cultures agricoles, ce qui permet de comparer les structures de la population (**Fournier et Giraud, 2008 ; Isenegger et al., 2008a; Karchani-Balma et al., 2008**). Bien que les populations de *B. cinerea* ont été bien caractérisées dans différentes régions du monde (**Zhonghua et al., 2005 ; Fournier et Giraud, 2008 ; Decognet et al., 2009 ; Mirzaei et al., 2009 ; Esterio et al., 2011 ; Fekete et al., 2012**), peu de données sur la diversité et la structure génétique des populations de *B. cinerea* sont disponibles pour les pays d'Afrique du Nord (**Karchani-Balma et al., 2008**).

Les principaux objectifs de ce chapitre sont : (i) d'établir un premier rapport détaillé des caractéristiques génétiques de la population de *B. cinerea* dans une zone de culture de légumes du nord d'Algérie. (ii) d'identifier les traits qui sont compatibles avec l'hypothèse que l'échange d'inoculum a eu lieu entre les fermes. Pour cela, les isolats ont été recueillis à partir de plantes malades dans les serres de tomates de la région de Bejaïa pendant trois saisons de culture, et leurs caractéristiques génétiques ont été examinées afin de vérifier l'hypothèse de l'effet de la géographie sur la structure génétique de la population.

## IV.1. Matériel et Méthodes

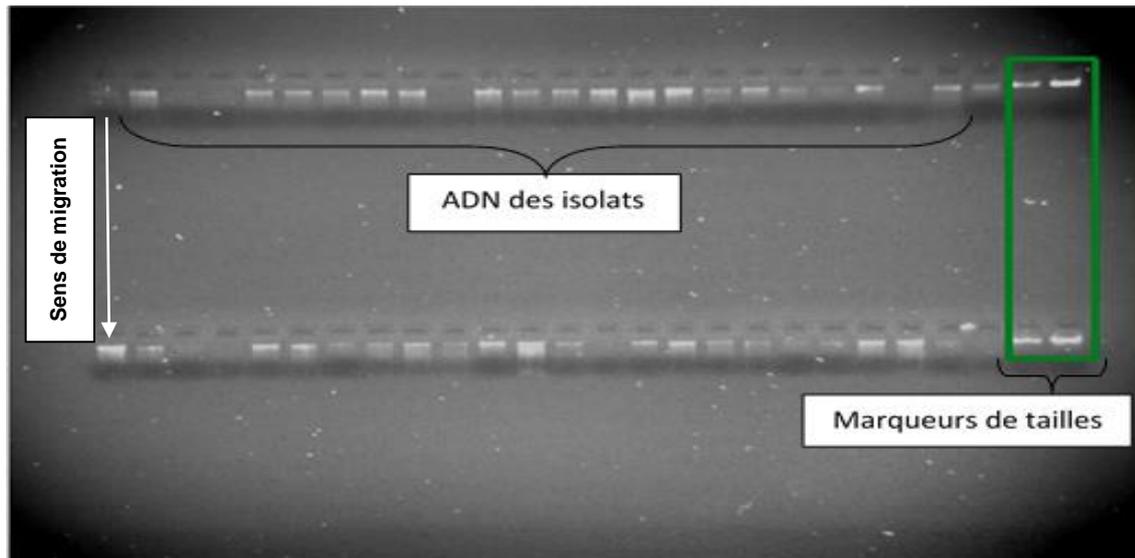
### IV.1.1. Échantillonnage fongique

Un total de 264 isolats de *B. cinerea* a été recueilli dans des serres commerciales de tomate en Mai-Juin de 2007, 2008, et 2010, dans la région de Bejaia Algérie (**Tableau III**). Les isolats ont été collectés à partir de fruits malades, feuilles, fleurs et tiges montrant une sporulation abondante à l'aide des cotons tiges stériles transporter au laboratoire et stockés à -20 °C jusqu'à l'isolement monospore (**Figure 6**).

Afin de produire des tissus de mycélium pour l'extraction de l'ADN, les isolats monospores ont été cultivées sur un milieu de gélose à l'extrait de malt à 25 °C dans l'obscurité. Après 10-14 jours d'incubation, le mycélium et les spores ont été collectées en ajoutant 1 ml d'eau distillée stérile dans les boites de pétri, puis en grattant la surface de la colonie avec un coton-tige stérile afin de récupérer la matière fongique, cette dernière a été lyophilisée et stockée à -20 °C jusqu'à son utilisation pour l'extraction d'ADN.

### IV.1.2. Extraction de l'ADN

L'ADN de tous les isolats de *B. cinerea* a été extrait à partir de 15 mg de matériel fongique lyophilisé dans des plaques de 96 puits, en utilisant un kit d'extraction maxi DNeasy Plant (Qiagen®) (**Annexe VI**). 12 à 15 mg de mycélium lyophilisé ont été prélevés de chaque isolat, puis déposés dans un puits d'une plaque d'extraction (**Decognet et al., 2009**). Cette extraction d'ADN comporte quatre étapes : la lyse des cellules du champignon, l'élimination des protéines, l'élimination des autres acides nucléiques (ARN) et la concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool. La qualité de l'extraction a ensuite été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%, à l'aide de bromure d'éthidium (BET), dans un tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA). Deux marqueurs de masse (20 µg et 40 µg) ont été utilisés afin d'évaluer la quantité d'ADN extraite (**Figure 30**). Les plaques ont ensuite été stockés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour l'amplification des microsatellites (**Decognet et al., 2009**).



**Figure 30. Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.** Les bandes blanches représentent l'ADN révélé sous UV à l'aide du BET. Les puits entourés en vert correspondent aux marqueurs de taille (20 $\mu$ g et 40 $\mu$ g). En comparant la fluorescence de chaque puits avec les puits de référence de taille, on estime la quantité d'ADN présente.

#### IV.1.3. Amplification des microsatellites

Les réactions d'amplification pour les neuf loci microsatellites décrits par (Fournier *et al.*, 2002) (Tableau XI), ont été réalisées en utilisant un kit PCR multiplex d'amplification (QIAGEN®). Certaines amorces ont la même température d'hybridation, ce qui permet aux amplifications à être multiplexées. Le mélange réactionnel est constitué de 552  $\mu$ l du Master Mix (contenant de l'ADN polymérase, tampon de PCR multiplex MgCl et triphosphate désoxyribonucléotides), 242,88  $\mu$ l d'eau MilliQ et 22,08  $\mu$ l de chaque amorce multiplexée. Chaque puits d'une plaque PCR contient 8  $\mu$ l de mélange réactionnel et 2  $\mu$ l de l'ADN d'un isolat de *B. cinerea* (Annexe VII).

Les amplifications ont été effectuées en utilisant un thermocycleur Eppendorf. Elles comportent un préchauffage pendant 15 min à 95 °C, suivi par 25-40 cycles comprenant 0,5 min de dénaturation à 94 °C, 1,5 min d'hybridation à 50 °C (pour les marqueurs microsatellites Bc1, Bc3, Bc6, Bc9) , 53 °C (pour Bc2 et Bc5) et 59 °C (pour Bc4, Bc7, Bc10) et 1 min d'élongation à 72 °C. Les amplifications ont été conclues par une étape d'extension finale de 30 min à 60 °C. Afin de vérifier que l'amplification est réussite, chaque échantillon a été pris de chaque puits et déposé sur des gels d'agarose à 1%.

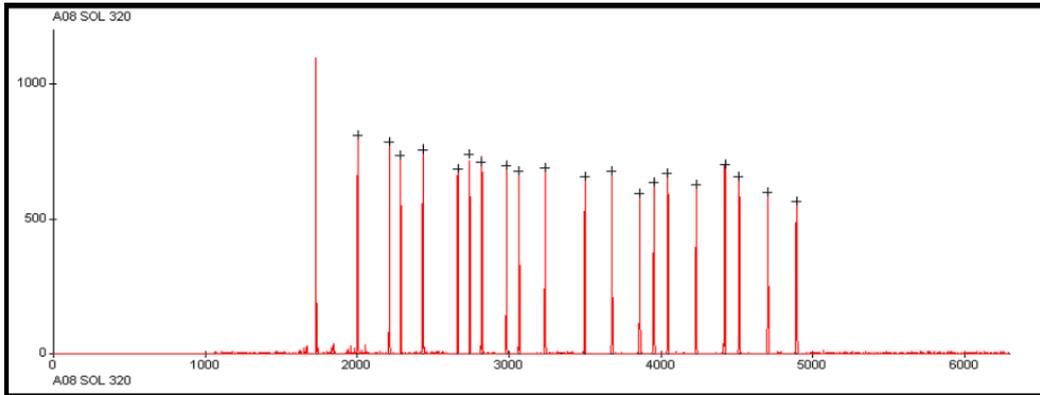
**Tableau XI. Caractéristiques des 09 microsattellites isolés de *B. cinerea*. (Fournier *et al.*, 2002).**

a	répétition de base <sup>b</sup>	Séquences d'amorces(5'-3')	Ta (°C)	Taille (pb)
Bc1	(CTTT)10-...- (CA)2CG(CA)10	F:AGGGAGGGTATGAGTGTGTA R:TTGAGGAGGTGGAAGTTGTA	50	245
Bc2	(AC)12AT(AC)4	F:CATACACGTATTTCTTCCAA R:TTTACGAGTGTTTTTGTTAG	53	161
Bc3	(GA)10	F:GGATGAATCAGTTGTTTGTG R : CACCTAGGTATTTCTGTA	50	197
Bc4	(TTC)6TTATC(TTC)2	F:CATCTTCTGGGAACGCACAT R:ATCCACCCCAAACGATTGT	59	98
Bc5	(AT)12	F:CGTTTTCCAGCATTCAAGT R:CATCTCATATTCGTTCTCA	53	143
Bc6	(CA)10	F:ACTAGATTTCGAGATTCAGTT R:AAGGTGGTATGAGCGGTTTA	50	88
Bc7	(TA)9	F:CCAGTTTCGAGGAGGTCCAC R:GCCTTAGCGGATGTGAGGTA	59	113
Bc9	(CT)11	F:CTCGTCATAACCACGCAGAT R:GCAAGGTCTCGATGTCGATC	50	150
Bc10	(AC)13	F:TCCTCTCCCTCCCATCAAC R:GGATCTGCGTGGTTATGACG	59	158

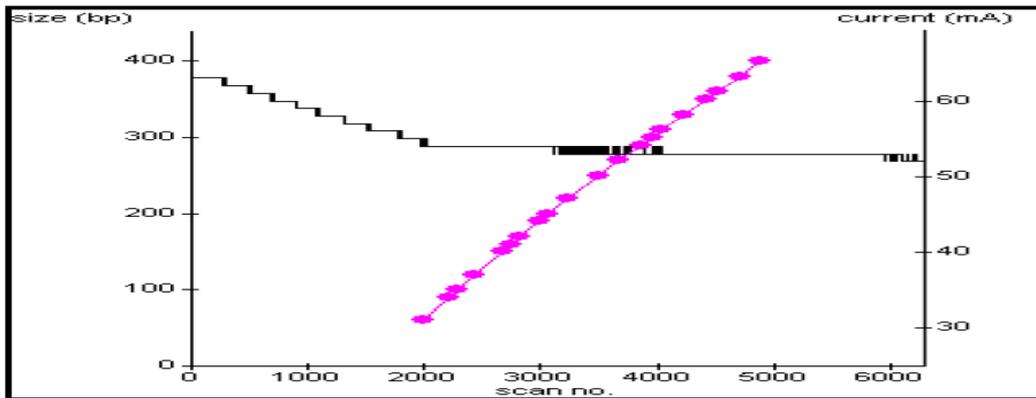
<sup>a</sup> Nom locus, <sup>b</sup> répétition de base, (Ta) Température d'analyse des séquences d'amorces

#### IV.1.4. Détermination de la taille des microsattellites

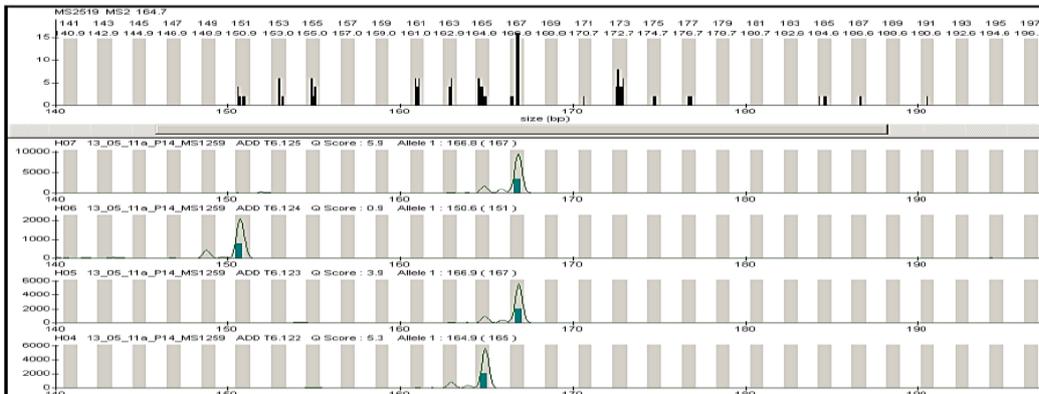
Les produits d'amplification ont été stockés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour déterminer la taille des microsattellites. Après une phase de dénaturation à 94 °C pendant 3 min, le marqueur de taille a été ajouté, les produits d'amplification ont été analysés avec un séquenceur d'ADN (ABI 3730 xl). Les données récupérées ont été analysées avec le logiciel GeneMapper (Applied Biosystem) (**Figure 31 et 32**). La présence d'un marqueur microsatellite dans chaque puits a été vérifiée. Celle-ci se traduit par un pic de fluorescence sur une couleur donnée (couleur portée par les amorces spécifiques du microsatellite ; **Figure 33**). Basé sur la taille des 9 marqueurs microsattellites, un profil haplotypique a été attribué pour chaque isolat (**Annexe VIII**). Les isolats appartenant à la sous-espèce *B. pseudocinerea* peuvent être identifiés sur la base de la taille de l'allèle composé de 84 pb sur le locus Bc6 (**Walker *et al.*, 2011**).



**Figure 31. Profil attendu d'un marqueur de taille ayant correctement migré.**  
Les barres rouges surmontées d'une croix représentent les 20 fragments d'ADN du marqueur.



**Figure 32. Vérification de la bonne migration du marqueur de taille.**  
Les 20 fragments, représentés par des points roses, doivent être alignés sur une même droite.



**Figure 33. Détermination de la taille de l'allèle d'un microsatellite pour les différents isolats.**

#### IV.1.5. Les analyses de la génétique de la population

Les analyses génétiques ont été effectuées uniquement pour les isolats de *B. cinerea* (à l'exception des isolats de *B. pseudocinerea*) dont le profil haplotypique des 9 microsatellites est complet.

Le logiciel Genetix 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996) a été utilisé pour calculer la diversité allélique non biaisée (Hnb) et le nombre moyen d'allèles par locus, cela est basé sur la fréquence des allèles et la richesse allélique sur tous les loci dans la

population totale et dans chaque sous- population collectées dans chaque serre. La diversité intra- population a été caractérisée par le calcul des indices de diversité avec l'aide de logiciels Genclone (version 2.0) (**Arnaud-Haond et Belkhir, 2007a**). Les indices suivants ont été utilisés : indice de Simpson ( $D^*$ ), indice d'équitabilité ( $ED^*$ ) et l'indice de la diversité clonale ( $R$ ). L'indice  $D^*$  mesure la probabilité que deux individus choisis au hasard dans une population ont des haplotypes différents (**Arnaud- Haond et al., 2007b**). L'indice  $ED^*$  est égal à 1 lorsque tous les haplotypes représentés dans une population ont la même abondance (répartition équitable des clones) (**Arnaud- Haond et al., 2007b**). Enfin, l'indice  $R$  estime la proportion d'haplotypes distincts présents dans une population (**Dorken et Eckert, 2001**) et prend une valeur de 1 quand une population est composée exclusivement d'haplotypes uniques.

Afin de tester la recombinaison sexuelle, l'indice d'association standardisé ( $r_D$ ) a été calculé en utilisant le logiciel Multilocus 1.3b (**Agapow et Burt, 2001**). L'indice  $r_D$  est une mesure du déséquilibre de liaison multilocus (**Brown et al., 1980 ; Haubold et al., 1998**). Dans le cas où  $r_D$  équivaut à zéro, il n'y a pas de déséquilibre de liaison, et l'indice augmente à mesure que le déséquilibre de liaison s'intensifie. L'hypothèse nulle de panmixie complète ( $r_D = 0$  ; reproduction sexuée exclusivement) a été testée avec la procédure mise en œuvre dans le logiciel, en comparant l'ensemble de 1000 séries de données aléatoires dans lequel la recombinaison infinie a été imposée par brassage aléatoire des allèles entre les individus observés, indépendamment pour chaque locus.

#### IV.1.6. La différenciation génétique entre sous-populations

L'estimation de la différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) a été effectuée par la comparaison des paires entre les sous-populations collectées dans chaque serre et saison donnée en utilisant le logiciel ARLEQUIN 3.5 (Université de Genève, Suisse; <http://lgb.unige.ch/Arlequin/>). Le logiciel effectue 3024 permutations suivi d'une correction de Bonferroni progressive (**Rice, 1989**). Selon (**Wright, 1978**), la différenciation génétique entre les deux populations est faible lorsque  $0 < F_{ST} \leq 0,05$ , modérée quand  $0,05 < F_{ST} \leq 0,15$ , significatif lorsque  $0,15 < F_{ST} \leq 0,25$  et très élevé lorsque  $F_{ST} > 0,25$ .

## IV.2. Résultats et discussion

Les neuf marqueurs microsatellites se sont avérés polymorphes et informatifs pour discriminer les populations de *B. cinerea*, notre recherche a été également la première étude pour évaluer l'effet du site et la saison d'isolement sur la structure génétique des populations de *B. cinerea*.

### IV.2.1. Mise en évidence des isolats de *B. pseudocinerea*

Après l'isolement, la purification, l'extraction d'ADN et le génotypage, un total de 174 isolats a été complètement génotypés avec les neuf microsatellites. Quatre d'entre eux ont été caractérisés comme des souches *B. pseudocinerea*. Les quatre isolats ont été collectés dans la serre située à Tichy en 2007 et 2008.

*B. pseudocinera* a été détecté pour la première fois dans le Nord d'Algérie (Bejaia). Une faible fréquence de 2,29 % de *B. pseudocinerea* trouvé parmi les 174 isolats génotypés dans cette étude. Notre résultat est en accord avec plusieurs études qui montrent que les isolats de *B. pseudocinerea* ont été trouvées en sympatrie avec les populations de *B. cinerea* plutôt à des faibles fréquences qui varient entre 2,5 et 15 % en fonction du lieu et de la saison d'isolement (**Fekete et al., 2012** ; **Zhonghua et al., 2005** ; **Fournier et al., 2005** ; **Fournier et al., 2003** ; **Martinez et al., 2005** ; **Walker et al., 2011**).

Une différenciation génétique importante a été signalée entre les deux espèces cryptiques (**Fournier et al., 2005**). Les isolats de *B. pseudocinerea* ont été détectés en Algérie (**Adjebli et al., 2014**) et en France (**Fournier et al., 2005**) , cela suggère qu'une possibilité de migration de l'inoculum entre ces deux régions. Ce résultat est en accord avec l'étude précédente qui suggère la présence des deux espèces cryptiques *B. cinerea* en Europe et en Amérique, ils ont montré que cet événement de spéciation et de migration ont eu lieu récemment entre ces deux régions (**Isenegger et al., 2008a**).

### IV.2.2. La diversité génétique globale

Un total de 109 génotypes multilocus (MLG) ont été distingués parmi les 170 isolats entièrement génotypés, le niveau global de la diversité génétique calculé pour la population totale a été élevé avec une diversité allélique non biaisée (Hnb) de 0,57 ( $\pm 0,17$  écart type [ED]), et le nombre moyen d'allèles par locus a atteint 8,22.

L'indice de diversité génotypique ( $D^*$ ) est de 0,98 a été trouvé avec un indice d'équitabilité élevé ( $ED^* = 0,90$ ) a été enregistré pour la population totale. L'indice de la clonalité ( $R$ ) a été de 0,64. Ces résultats indiquent que la population totale a été génétiquement très diverse avec une distribution inéquitable des clones. L'estimation de déséquilibre de liaison a montré que l'indice d'association standardisé obtenue a été très faible  $r_D = 0,07$ , ce qui suggère probablement une reproduction sexuée (**Tableau XII**).

Malgré un niveau élevé de la diversité génétique chez *B. cinerea* dans toutes les populations (**Tableau XII**), on suggère qu'il peut y avoir un niveau relativement élevé de reproduction sexuée chez ces populations ( $r_D = 0,075$ ) dans l'échantillon total et variant de 0,075 au 0,285 dans d'autres sous-populations. Ce résultat est en accord avec des études antérieures menées en Europe (**Baraldi et al., 2002 ; Fournier et Giraud, 2008 ; Váczy et al., 2008**), en Argentine (**Vallejo et al., 2002**), et dans les populations tunisiennes (**Karchani-Balma et al., 2008**). Une autre étude menée en Californie (**Zhonghua et al., 2005**), les auteurs n'ont pas détectés l'existence d'une recombinaison régulière dans les populations sur le terrain. Par conséquent, le niveau élevé de la diversité génétique des populations de *B. cinerea* peut résulter principalement de la reproduction sexuée (**Giraud et al., 1997 ; Zhonghua et al., 2005**). Le phénomène d'hétérocaryose, d'aneuploïdie, des mutations spontanées et le brassage sont des sources importantes de variation des populations de *B. cinerea* (**Van Der Vlugt-Bergmans et al., 1993**)

#### IV.2.3. La diversité génétique entre les sous-populations

Les différentes sous-populations collectées dans les quatre serres ont été analysées séparément pour chaque année afin de fournir des réponses à la problématique du sujet. L'analyse de la diversité génétique des sous-populations collectées en 2007 a révélé une diversité allélique non biaisée ( $H_{nb}$ ) qui variait entre 0,45 ( $\pm 0,25$ ) et 0,68 ( $\pm 0,14$ ). Le nombre moyen d'allèles par locus variait entre 2,77 et 3,33, avec un plus grand nombre qui a été détecté dans la serre de Souk El Tenine, alors qu'un faible nombre a été enregistré dans la serre de Baccaro. La sous-population de Tichy n'est pas prise en considération en raison de son petit échantillon de cinq isolats. L'analyse de la diversité génotypique a montré que les deux serres étaient très diverse ( $D^* > 0,90$ ), avec une répartition inéquitable des

clones. L'indice de la clonalité variait entre 0,59 et 0,66, ce qui signifie une grande clonalité dans la serre de Baccaro et une faible clonalité a été obtenue dans la serre de Souk El Tenine. Une faible et significative valeur de l'indice de déséquilibre de liaison ( $r_D$ ) a été enregistrée dans les trois sous-populations. Les sous-populations collectées en 2008 et 2010 ont présenté des niveaux très similaires de différents indices de diversité génétique (**Tableau XII**).

**Tableau XII. Indices de la diversité génétique calculés pour les sous-populations de *B. cinerea* avec les 09 microsatellites.**

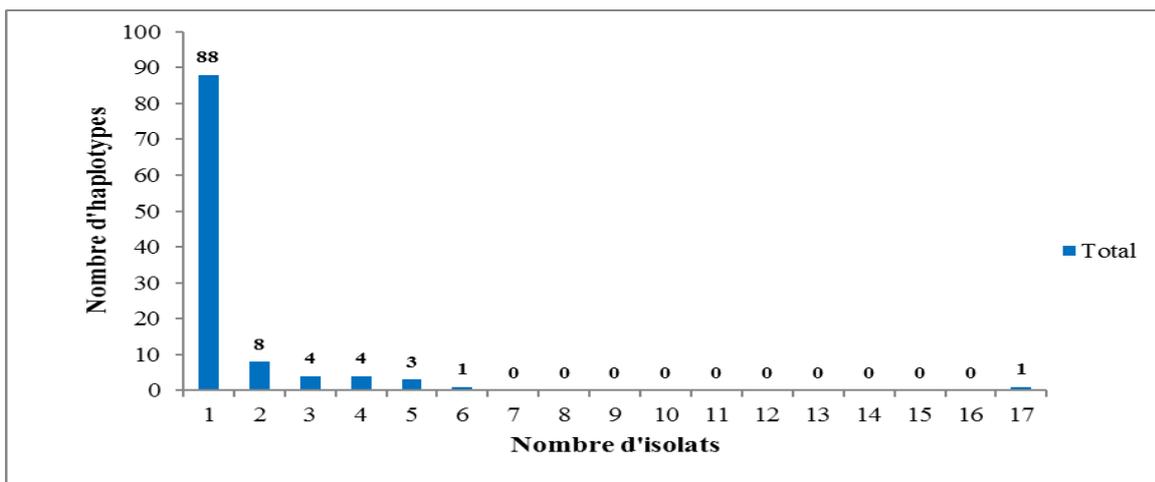
Population	Nombre d'isolats	Nombre d'MLG <sup>a</sup>	Diversité Allélique <sup>b</sup>		Diversité Haplotypique <sup>c</sup>			Indice de déséquilibre de liaison <sup>d</sup>	
			Hnb	Nombre d'allèles par locus	D*	ED*	R	$r_D$	p< value
<b>2007</b>									
Souk-el-Tenine	23	14	0.45 (0.25)	3.33	0.90	0.53	0.59	0.28	<0.001
Baccaro	21	17	0.47 (0.21)	2.77	0.97	0.66	0.80	0.13	<0.001
Tichy	5	5	0.68 (0.14)	3.33	1	ND	1	-0.01	0.587
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>35</b>	<b>0.54 (0.18)</b>	<b>5.33</b>	<b>0.97</b>	<b>0.71</b>	<b>0.71</b>	<b>0.12</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>2008</b>									
Baccaro	19	15	0.56 (0.11)	3.44	0.96	0.40	0.77	0.11	<0.001
Tichy	22	14	0.50 (0.17)	3.44	0.91	0.54	0.61	0.16	<0.001
Merdjouamane	23	13	0.40 (0.20)	3.55	0.87	0.50	0.54	0.21	<0.001
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>39</b>	<b>0.54 (0.14)</b>	<b>4.66</b>	<b>0.97</b>	<b>0.85</b>	<b>0.60</b>	<b>0.08</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>2010</b>									
Baccaro	19	16	0.57 (0.25)	4.44	0.97	0.47	0.83	0.12	<0.001
Tichy	19	17	0.65 (0.13)	5.22	0.98	0.53	0.89	0.12	<0.001
Merdjouamane	20	15	0.50 (0.21)	3.55	0.95	0.60	0.74	0.15	<0.001
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>45</b>	<b>0.60 (0.20)</b>	<b>6.55</b>	<b>0.99</b>	<b>0.86</b>	<b>0.77</b>	<b>0.10</b>	<b>&lt;0.001</b>

<sup>a</sup> MLG : Génotypes multi locus. <sup>b</sup> Hnb : diversité génétique non biaisée, calculé avec des génotypes répétés (écarts-types entre parenthèses), ND : Non identifié. <sup>c</sup> D\*: Indice de diversité génotypique ; E : Indice d'équitabilité ; R : indice de la richesse. <sup>d</sup>  $r_D$  : Indice d'association standardisé.

Sur 109 haplotypes caractérisés dans 170 isolats analysés dans les quatre sous-populations Béjaïa collectés sur les trois saisons. Le nombre d'haplotypes détecté varient dans chacune des serres et chaque année d'isolement, avec le plus grand nombre a été détecté dans la serre de Baccaro avec 17 MLG distinct en 2007 et 15 MLG en 2008, le plus faible a été détecté dans la serre de Souk El Tenine avec 14 MLG. En 2008, nous avons détecté 15 MLG dans la serre de Baccaro, 14 MLG dans la serre de Tichy et 13 MLG dans la serre de MerdjOuamane. En 2010, le plus grand nombre d'MLG a été détecté dans Tichy avec 17 MLG et le plus petit dans serre de Merdjouamane avec 15 MLG (**Tableau XII**).

L'ensemble des indices de diversités génétiques calculées pour la population totale a été élevé, ces résultats indiquent que la population a été génétiquement diversifiée avec un faible niveau d'échange d'haplotypes entre les serres et les années d'isolement.

Parmi ces 109 MLG sein de l'échantillon total, 88 haplotypes ont été observés une fois, 21 haplotypes ont été observés au moins deux fois et partagées entre les sous-populations collectées dans différentes serres et les saisons. La fréquence la plus élevée d'un seul haplotype a été détecté 17 fois dans l'échantillon total et partagé entre les sous-populations (**Figure 34**). Le nombre d'haplotypes partagés entre les serres varient pour chaque année, avec le plus élevé obtenu en 2008 (3 haplotypes) et le moins en 2007 (1 haplotype) (**Tableau XIII**).



**Figure 34.** Distribution de la fréquence d'haplotypes de *B. cinerea* dans la population totale.

Ce travail a été la première étude qui vise à évaluer la dispersion des spores de *B. cinerea* entre sous-populations isolées dans les serres de tomates en Algérie. Notre première constatation montre que la dispersion de spores de *B. cinerea* peut être lieu entre les serres espacées de quelques kilomètres (10 à 20 km) dans la région de Bejaia. Ce résultat a été certifié par l'existence de six haplotypes partagés entre les serres (**Tableau XIII**), qui ont été observés à une fréquence de deux à huit clones par haplotypes dans chacune des trois années étudiées. Notre résultat a été en accord avec l'étude menée sur les échanges entre le champ et les serres (**Korolev et al., 2006**), et dans les serres (**Decognet et al., 2009**). Les observations antérieures ont montré que les génotypes clonales de *B. tulipae* et *B. elliptica* ont été fréquemment trouvés dans différents domaines de Netherland (**Staats, 2007**), les flux des génotypes de *B. cinerea* entre les régions ont été détectés à partir des champs de pois chiches au Bangladesh (**Isenegger et al., 2008b**).

La présence d'haplotypes clonales parmi les sous-sites au sein de la population a été compatible avec des spores asexuées qui pourraient se propager facilement dans un champ (**Coley-Smith et al., 1980**). Par ailleurs, nous avons également constaté la présence de sept haplotypes clonales (**Tableau XIII**) partagées sur les trois saisons entre les sous- populations, ce qui suggère probablement une survie de l'inoculum qui a été produit au cours des trois années étudiées. Ce résultat est cohérent avec ceux trouvés par (**Isenegger et al., 2008b**), où ils ont trouvé un haplotype de *B. cinerea* partagé en 2003 et en 2004, ce qui suggère la survie des sclérotés entre saisons de croissance. **Thomas et al., (1981)**, ont constaté que le nombre d'élagages colonisés par *B. cinerea* sur la surface du sol fortement diminué entre le mois d'octobre jusqu'à décembre, et ont augmenté à partir de février jusqu'à mai, ce qui suggère la ré-infestation des élagages sur le sol. Notre résultat est aussi en contraste avec ceux rapportés par **Alfonso et al., (2000)**. Où ils n'ont montré aucune différenciation génétique entre les populations de *B. cinerea* selon le temps d'échantillonnage.

IV.2.4. Effet de la géographie sur *B. cinerea* populations

La différenciation génétique reportée entre les différentes sous-populations a montré des valeurs élevées et significatives des  $F_{ST}$  (**Tableau XIV**). La valeur  $F_{ST}$  la plus élevée a été obtenue dans les comparaisons des sous-populations rassemblées en 2007 entre la serre de Souk El Tenine avec celle de Baccaro et Tichy respectivement, ce qui indique une présence de structure géographique des sous-populations.

**Tableau XIII. Distribution de la fréquence des haplotypes de *B. cinerea* partagés au sein des sous-populations isolées dans les régions de Bejaia.**

Années Haplotypes	2007		2008				2010		
	sA <sup>a</sup> /23 <sup>b</sup>	sB/21	sC/5	sB/19	sC/22	sD/23	sB/19	sC/19	sD/19
H20 <sup>c</sup>		2		1	1		2		
H32		1		1					
H89				2			3		
H25								2	2
H30	7	1				8		1	
H55		2							
H65					1	2			
H80					1				1
H82		1			1				
H88				1		3			
H100			1		1		1		
H108							1	1	

<sup>a</sup> Localisation des sites de différents isolats (A : Souk el Tenine, B : Baccaro, C : Tichy, D, Merdjouamane). <sup>b</sup> Nombre d'isolats. <sup>c</sup> H : haplotypes.

Les sous-populations collectées en 2008 dans les trois régions (cité précédemment) ont présenté un niveau élevé de diversité génétique et de clonalité (**Tableau XII**). Les valeurs  $F_{ST}$  des comparaisons par paire obtenue entre la serre de Merdjouamane avec celle de Baccaro et Tichy ont été élevée et très significatives (**Tableau XIV**). Des valeurs  $F_{ST}$  faible et non significatives ont été obtenues dans les comparaisons entre les sous-populations collectées en 2010, d'autres comparaisons ont donné des valeurs  $F_{ST}$  non significatif (**Tableau XIV**).

La comparaison de différenciation génétique signalée entre les sous-populations de différentes régions (nous avons considéré que l'échelle temporelle ne peut pas influencer la différenciation génétique) a été élevée ainsi que des valeurs  $F_{ST}$  significative.  $F_{ST}$  ont été obtenus dans les comparaisons entre les sous-

populations collectées dans différents endroits de Bejaia ( $0.227 <_{FST} < 0,080$ ,  $P < 0,01$  ; lorsque tous les individus ont été pris en compte) (**Tableau XIV**).

Ces résultats indiquent également la présence d'un effet de la géographie sur la structure des populations de *B. cinerea* collectées dans les régions et Bejaia, suggérant d'une part un niveau élevé de diversité génotypique et la reproduction sexuée et le faible niveau d'échange des spores entre les trois serres étudiées. Ces résultats sont probablement dû à des échanges de spores (dispersion) a été produit à partir d'autres sites géographiques.

Notre travail est aussi la première étude à évaluer la différenciation génétique entre les populations de *B. cinerea* isolées à partir des serres de tomates en Algérie. Le résultat obtenu dans notre étude révèle un niveau élevé de différenciation génétique entre les sous-populations collectées dans les quatre serres quand l'analyse a été effectuée avec les MLG répétés et non répétés (**Tableau XIV**), et a montré que la distance géographique a un effet significatif sur la différenciation génétique des sous-populations de *B. cinerea* collectées dans les quatre serres de Bejaia. En contraste avec des études récentes menées sur l'effet de la géographie sur la structure des populations de *B. cinerea* (**Alfonso et al., 2000**; **Fournier et Giraud 2008** ; **Isenegger et al., 2008b** ; **Mirzaei et al., 2009** ; **Thompson et Latorre, 1999** ; **Váczy et al., 2008**), montrent également un niveau très faible e différenciation génétique entre les sous-populations en fonction du lieu d'échantillonnage. Le manque d'haplotypes en communs détectés entre sous-population suivant de serre et la saison d'isolement et le niveau élevé des valeurs  $F_{ST}$  détectées entre sous-populations montre que peu d'échanges de spores entre les serres et peu de spores survivent d'une année à l'autre.

**Tableau XIV. Effet de la distance géographique sur la différenciation génétique ( $F_{ST}$ ) des sous-populations de *B. cinerea* isolées dans les régions Bejaia.**

Saison	Site A <sup>c</sup> -Site B (13 km <sup>a</sup> )		Site A-Site C (19 km)		Site B-Site C (10 km)		Site B-Site D (20 km)		Site C-Site D (15 km)	
	Avec MLG répétés	Sans MLG répétés	Avec MLG répétés	Sans MLG répétés	Avec MLG répétés	Sans MLG répétés	Avec MLG répétés	Sans MLG répétés	Avec MLG répétés	Sans MLG répétés
2007	<u>0,132</u> <sup>b</sup>	0,062	<u>0,227</u>	<u>0,167</u>	<u>0,139</u>	<u>0,115</u>	ND	ND	ND	ND
2008	ND	ND	ND	ND	<u>0,129</u>	<u>0,095</u>	<u>0,124</u>	0,058	<u>0,137</u>	-0,019
2010	ND	ND	ND	ND	0,004	0,011	0,022	0,016	<u>0,080</u>	0,050

<sup>a</sup> Distances entre les différents sites. <sup>b</sup> Pairwise  $F_{ST}$  calculés suivant Weir et Cockerham, avec et sans MLG répété. Les valeurs soulignées indiquent des  $F_{ST}$  significative ( $P < 0,01$ ) après 3200 permutations et une correction de Bonferroni. ND : Non définie. <sup>c</sup> Localisation des sites de différents isolats (A : Souk el Tenine, B : Baccaro, C : Tichy, D, Merdjouamane).

### IV.3. Conclusion

En conclusion, nos résultats indiquent que la population a été génétiquement très diverse avec le niveau élevé de diversité génotypique et un faible niveau d'échange d'haplotypes entre les serres étudiées, ce résultat suggère que probablement une ou plusieurs populations de *B. cinerea* avaient été installées dans la région de Bejaia. Les résultats obtenus dans cette étude concernant l'effet géographique sur la différenciation génétique, la diversité haplotypique entre les serres ont un impact direct sur la gestion des stratégies de la pourriture grise, en particulier la résistance aux fongicides et les pratiques culturales. Les stratégies de lutte doivent être prises en considération à petite échelle (comme dans les régions Bejaia). Les génotypes résistants aux fongicides (résultant des mutations spontanées) peuvent se propager vers d'autres régions par le phénomène de dispersion. Les pratiques abusives (débris de végétaux, matériels non désinfecter...etc) dans les serres pourries augmenter l'inoculum dans l'ensemble de la superficie cultivée. Les perspectives ultérieures peuvent être focalisées sur l'étude du mode de survie et la dispersion des populations de *B. cinerea* à grande échelle pour obtenir une meilleure information sur l'épidémiologie de *B. cinerea*.

# **Conclusion générale et perspectives**

### Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier l'épidémiologie de *B. cinerea* qui est un agent causal de la pourriture grise sur tomate dans la région de Bejaia. Le premier chapitre de ce travail a été consacré à l'étude des morphotypes présents dans les populations de *B. cinerea*. Des différences morphotypiques ont été observées au sein des sous-populations de *B. cinerea*. Un total de 264 isolats a été caractérisé à partir de 303 échantillons collectés au niveau de 4 sites différents de la région de Bejaia. Une dominance de morphotype sclérotien a été notée avec 169 isolats contre 95 isolats de morphotype mycélien. Ces différences sont d'intérêt car ils peuvent résulter directement de la présence des isolats résistants et/ou agressifs.

Un protocole expérimental a été mis en place dans le chapitre 2 afin de suivre la cinétique de développement de la pourriture grise en fonction de la température à l'intérieur des serres de tomates. Les mesures effectuées, les résultats obtenus et les analyses entreprises ont montré que la pourriture grise a été capable de se développé dans un climat chaud où les températures sont largement supérieur à 30 °C durant les deux saisons étudiées. La dynamique de développement de la pourriture grise a été représentée de manière adéquate par le modèle logistique de Van der Plank comme hypothèse pour les épidémies polycycliques

Dans le chapitre 3, l'effet des températures élevées sur le développement des isolats de *B. cinerea* a été étudié dans des conditions contrôlées (*in vitro*, sur folioles). Il est à noter que les résultats obtenus ont montré que la température de 32 °C a été inhibitrice pour la croissance mycélienne de tous les isolats testés. Une approche géographique a été entreprise dans ce chapitre afin de comparer la tolérance des isolats de *B. cinerea* collectés en Algérie (Bejaia) et en Europe (France et Norvège) face aux températures élevées. On note que l'effet des températures élevées (>30°C) a montré une grande variabilité entre les isolats quel que soit leurs origine d'isolement. Les résultats obtenus ont montré que l'agressivité des isolats de *B. cinerea* collectés dans la région de Bejaia a été similaire avec celle obtenue avec les isolats collectés en France et en Norvège.

Notre étude menée *in vitro*, sur les folioles et les plantes entières nous a permis de conclure que l'exposition des isolats de *B. cinerea* à des températures

élevées tel que 28, 29, 30, 31 et 32 °C réduit d'une façon significative la croissance mycélienne, la germination des spores et l'infection des folioles. L'effet de la température nous a révélé qu'il n'y a pas de différence significative entre les isolats collectés à Bejaia et les isolats collectés en France et en Norvège.

Les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude ont été jugé suffisamment discriminatoires pour évaluer le niveau de diversité dans les populations de *B. cinerea*. La diversité génétique globale des populations a été très hétérogène dans son ensemble. La diversité génotypique des populations, dans les serres de tomates, a indiqué la présence de lignées clonales entre les sous-populations. En outre, l'observation des génotypes communs entre les 4 serres, en particulier entre le génotype composé de 17 clones, a fourni des preuves directes d'un échange de génotype entre les serres.

L'analyse de la situation des espèces cryptiques des isolats de *B. cinerea* a révélé que 170 isolats appartenaient au groupe II (*B. cinerea*) tandis que 4 isolats appartenaient au groupe I (*Botrytis pseudocinerea*) en fonction de la taille de l'allèle au locus Bc6 (**Walker et al., 2011**). Dans la présente étude, l'indice d'association standardisé ( $r_D$ ) était dans tous les cas significatif et proche de zéro. Cela indique que les populations étudiées se reproduisent d'une façon asexuée mais l'hypothèse de reproduction sexuée n'est pas à exclure.

Les génotypes communs entre les différentes sous-populations au sein de chaque serre ainsi que la tendance de regroupement des isolats par la distance a été observée, cela suggère que le phénomène de dispersion peut être possible ou que les populations étudiées représentent des événements fondateurs récents. Il en résulte une perturbation des flux de gènes et la diversité génétique, affectant de nouveau l'analyse de déséquilibre de liaison. Un total de 109 haplotypes ont été caractérisés parmi les isolats, dont quelques-uns ont été partagés entre les sous-populations. Au même temps la différenciation génétique entre les sous-populations en fonction de l'origine géographique a été significativement modéré ( $0,080 < F_{ST} < 0,167$ ), avec un niveau d'échange d'inoculum entre les serres qui est faible d'une saison d'échantillonnage à l'autre. Ces résultats montrent que les populations de *B.*

*cinerea* (groupe II) ne sont pas influencées de manière significative par des considérations géographiques, au moins à l'échelle étudiée.

En conclusion, les niveaux observés de déséquilibre de liaison globale peuvent contribuer au maintien de combinaisons bien adaptées de gènes entre eux par la reproduction asexuée, avec la recombinaison sexuée intercalés étant les plus susceptibles, malgré l'absence des apothécies observées dans les serres de tomates. Un système de reproduction mixte pose un grand risque en termes d'effondrement rapide des mesures de contrôle possible. La gestion intégrée de la maladie, dans les serres de tomates au niveau régional, est donc souligné par les conclusions de la dynamique des populations étudiées de *B. cinerea* (groupe II) sur tomates cultivées sous serres. La connaissance de la génétique des populations des isolats de *B. cinerea* dans les serres de tomates peut constituer dans l'avenir une aide à l'élaboration des stratégies de gestion plus intégrés. Par exemple, les mesures prophylactiques des serres de tomates devraient être plus efficaces pour éviter l'accumulation d'inoculum, qui pourrait s'étendre à d'autres régions.

Un résultat agronomique original de ce travail de thèse est que les températures élevées réduisent significativement le développement *in vitro* et l'agressivité de l'inoculum produit par *B. cinerea* sur des folioles et des plantes entières de tomates. Cette information ouvre la possibilité de manipuler ce paramètre climatique dans les cultures de tomate dans la région de Bejaia, non seulement pour réduire la vulnérabilité des plantes mais aussi pour limiter l'impact de l'inoculum secondaire et réduire le besoin de l'utilisation des pesticides. En revanche, elle pourrait conduire à de nouvelles études pour élucider les mécanismes cellulaires impliqués.

Dans l'avenir d'autres études seront nécessaires afin de rechercher un éventuel effet de la température élevée sur la sensibilité de la tomate. Il est encore nécessaire d'étudier le complexe entre le climat, le pathogène et les différents organes de plantes.

Dans l'avenir des études devraient inclure des populations de *B. cinerea* échantillonné à partir d'autres systèmes de culture (par exemple, vigne, fraise et verger) afin de déterminer si elles représentent des populations de *B. cinerea*

génétiquement isolées ou similaires. Plusieurs prélèvements doivent être effectués sur une période de temps dans chaque système pour déterminer s'il existe ; I) une structure entre les populations de *B. cinerea* selon l'échelle temporelle, II) une structuration des populations de *B. cinerea* à grande échelle (Bassin méditerranéen) III) des changements dans la fréquence des différents types d'éléments transposables se produisant, IV) un profil de résistance à divers fongicides de synthèse chimique. Cela devrait fournir une image claire de l'épidémiologie et la dynamique des populations de *B. cinerea* en Algérie.

# Références

## Bibliographiques

### 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 *Botrytis cinerea* secondary inoculum, as well as the efficacy of biological control. Phd Thesis. University of Avignon. France.

**Adjebli A., Leyronas C., Aissat K., Nicot P.C (2014).** Comparison of *Botrytis cinerea* populations collected from tomato greenhouses in Northern Algeria. *J. Phytopathol.* *In press.*

**Agapow P.M., Burt A (2001).** Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Notes.* **1**: 101-102.

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

**Ahmed A.U., Pande S., Basandrai A.K., Kishore G.K., Rao J.N (2007).** Variation in isolates of *Botrytis cinerea* causing botrytis gray mold in chickpea. Bangladesh. *J. Agric. Res.* **32**: 135-143.

**Aissat K (2000).** Diseases of the major vegetable crops under greenhouses in the Bejaia region (Algeria). International conference of plant protection. Tours . 349- 354 p.

**Aissat K., Nicot P.C., Guechi A., Bardin M., 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.

**Albertini C., Thebaud G., Fournier E., Leroux P (2002).** Eburicol 14 [alpha]- demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **106**: 1171-1178.

**Alderman S.C., Lacy M.L (1983).** Influence of dew period and temperature on infection of onion leaves by dry conidia of *Botrytis squamosa*. *Ecol. Epidemiol.* **73**: 1020-1023.

**Alfonso C., Raposo R., Melgarejo P (2000).** Genetic diversity in *Botrytis cinerea*

populations on vegetable crops in greenhouses in southeastern Spain. *Plant. Pathol.* **49**: 243-251.

**Arnaud-Haond S., Duarte C.M., Alberto F., Serrao E.A (2007a)**. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Mol. Ecol.* **16**: 5115-5139.

**Arnaud-Haond S., Belkhir K (2007b)**. genclone: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol. Eco. Notes.* **7**: 15-17.

### *B*

**Bai Y., Lindhout P (2007)**. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. *Ann. Bot.* **100**:1 085–1094.

**Baptista F. J (2007)**. Modelling the climate in unheated tomato greenhouses and predicting *Botrytis cinerea* infection. Phd Thesis. Universidade de évora. Portugal.

**Baptista F.J., Bailey B.J., Meneses J.F (2011)**. Development of a warning system for controlling *Botrytis cinerea* in unheated tomato greenhouses. *Acta. Hort.* **893** :1263-1269.

**Baraldi E., Bertolini P., Chierici E., Trufelli B., Luiselli D (2002)**. Genetic diversity between *Botrytis cinerea* isolates from unstored and cold stored kiwi fruit. *J. Phytopathol. Z.* **150**: 629-635.

**Barnes B. (1930)**. Variations in *Botrytis cinerea*, Pers., Induced by the Action of High Temperatures. *Ann. Bot.* **44**: 825-858.

**Bautista-Banos S., Long P.G., Ganesh S (1998)**. Effect of relative humidity and time of exposure at different temperatures on survival of conidia of *Botrytis cinerea*. *Rev. Mex. Fitopatol.* **16**: 109-114.

**Beever R.E., Weeds P.L (2004)**. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delan N, eds. *Botrytis: biology, pathology and control*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press. 29-52.

**Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F (1996)**. Genetix 4.05, Logiciel sous Windows pour la g en etique des Populations. Montpellier, France, Laboratoire Genome, Populations, Interactions. CNRS UMR5000, Université de Montpellier II.

**Bergougnoux V (2014)**. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotech. Adv.* **32**: 170-189.

**Blakeman J.P (1980)**. Behaviour of conidia on aerial plant surfaces, pp115-151. In *The Biology of Botrytis* Ed by J.R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W.R. Jarvis, Academic Press, London. 318 pp.

**Blakeman J.P (1975)**. Germination of *Botrytis cinerea* conidia *in vitro* in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. *T. Brit. Mycol. Soc.* **65**: 239-247.

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

**Boneche B., Pucheu B (1986)**. Influence de divers effecteurs sur le développement de

*Botrytis binerea* en milieu synthétique : définition d'un cycle conidien. *Vitis*. **25**: 21- 30.

**Bridge P., Couteaudier Y., Clarkson J (1998)**. Molecular variability of fungal pathogens. CAB International, Wallingford, UK. 319 p.

**Brown A.H.D., Feldman M.W., Nevo E (1980)**. Multilocus structure of natural-populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics*. **96** : 523-536.

**Brown J.K.M (1996)**. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytologist*. **133**: 183-195.

**Bulger M.A., Ellis M.A., Madden L.V (1987)**. Influence of temperature and wetness duration on infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and disease incidence of fruit originating from infected flowers. *Phytopathol.* **77**: 1225-1230.

### C

**Chen L.C., Chen T.Z., Chung Y.W (1998)**. Effect of temperature, water potential, and light illumination on the spore and sclerotia germination, mycelial growth, sporulation, and sclerotia formation of *Botrytis elliptica* and *B. cinerea*. *Plant. Pathol. Bul.* **7**: 167-176.

**Chen C.H., Hsieh T.F. (2009)**. First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold of Jamaica cherry in Taiwan. *Plant. Pathol. Bul.* **18**: 119-123.

**Cilindre C., Castro A.J., Clément C., Jeandet P., Marchal R (2007)**. Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by two-dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. *Food. Chem.* **103**: 139-149.

**Clark C.A., Lorbeer J.W (1977)**. Comparative nutrient dependency of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* for germination of conidia and pathogenicity on onion leaves. *Phytopathol.* **67**: 212-218.

**Clarkson K., Phelps (2000)**. The effect of temperature and water potential on the production of conidia by sclerotia of *Botrytis squamosa*. *Plant. Pathol.* **49**: 119-128.

**Coley-Smith J.R (1980)**. Sclerotia and other structures in survival, 85-114 pp, in: The biology of Botrytis. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.

**Coley-Smith J.R., Cooke, R.C (1971)**. Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev. Phytopathol.* **9**: 65-92.

**Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R (1980)**. The biology of Botrytis. Academic Press, London, UK.

**Corbaz R (1993)**. Résistance aux fongicides de *Botrytis cinerea* isolé de cultures maraîchères. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture. Horticulture.* **24**: 233-236.

**Cotoras M., Evelyn S (2005)**. Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *In Mycologia.* 485-492.

**Crawford D.L., Lynch J.M., Ousley M.A (1993)**. Isolation and characterization of

actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Env. Microbiol.* **59**: 3899–3905.

### D

**Davidson J.A., Kryszynska-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., Kan J.A.L.V., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Pietro A.D., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D (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 *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathol.* **99**: 185-193.

**Decognet V., Ravetti F., Martin C., Nicot P.C (2010).** Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. *Agron. Sustain. Dev.* **30**: 465-472.

**Delcán J., Melgarejo P (2002).** Mating behaviour and vegetative compatibility in Spanish populations of *Botryotinia fuckeliana*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **108**: 391-400.

**Derckel J.P., Baillieul F., Manteau S., Audran J.C., Haye B., Lambert B., Legendre L (1999).** Differential Induction of Grapevine Defenses by Two Strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.* **89**:197-203.

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

**Dorken M.E., Eckert C.G (2001).** Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *J. Ecol.* **89**: 339-350.

### E

**Eden M.A., Hill R.A., Stewart A (1996).** Biological control of Botrytis stem infection of greenhouse tomatoes. *Plant. Pathol.* **45**: 276-284.

**Elad Y (1999).** Plant diseases in greenhouses. 191-211 pp. In *Greenhouse Ecosystems.* Ed by G. Stanhill and H. Zvi Enoch, Elsevier. 423 pp.

**Elad Y., Yunis H., Mahrer Y (1988).** Effect of climate conditions in polyethylene-covered structures on grey mould disease of winter cucumbers. *Appl. Agric. Res.* **3**:243-247.

**Elad Y (1997).** Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop. Prot.* **16**: 635-642.

**Elad Y., Yunis H (1993).** Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber grey mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica.* **21**: 257-268.

**Elad Y., Shtienberg D (1995).** *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural,

physiological and biological controls and their integration. *Integ. Pest. Manag. Rev.* **1**:15-29.

**Elad Y., Stewart A (2004).** Microbial control of *Botrytis* spp. 223-241pp, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

**Elad Y., Malathrakis N.E. Dik A.J (1996).** Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop. Prot.* **15**: 229-240.

**Elad Y., Yunis H., Volpin H (1992b).** Effect of nutrition on susceptibility of cucumber, eggplant and pepper crops to *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* **71**: 602-608.

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

**Epton H.A.S., Richmond D.V (1980).** Formation, structure and germination of conidia, 41-83 pp, in: *The biology of Botrytis*. Coley-Smith J. R., Verhoeff K., Jarvis W.R., eds. Academic Press, London, UK.

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

### *F*

**Faretra F., Antonacci E (1987).** Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathol. Mediterr.* **26**: 29-35.

**Faretra F., Antonacci E., Pollastro S (1988).** Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2543-2550.

**Fekete É., Fekete E., Irinyi L., Karaffa L., Arnyasi M., Asadollahi M., Sandor E (2012).** Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiol. Res.* **167**: 283-291.

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

**Fournier E., Giraud T., Loiseau A., Vautrin D., Estoup A., Solignac M., Cornuet J.M., Brygoo Y (2002).** Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). *Mol. Ecol. Notes.* **2**: 253-255.

**Fournier E., Levis C., Fortini D., Leroux P., Giraud T., Brygoo Y (2003).** Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia.* **95**: 251-261.

**Fournier E., Giraud T (2008).** Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J. Evol. Biol.* **21**: 122-132.

## G

- Giraud T., Refregier G., Le Gac M., de Vienne D.M., Hood M.E (2008).** Speciation in fungi. *Fungal. Genet. Biol.* **45**: 791-802.
- Giraud T., Fortini D., Levis C., Lamarque C., Leroux P., Lobuglio K., Brygoo Y (1999).** Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuata*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathol.* **89**: 967-973.
- 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.
- 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.
- Groves J.W., Drayton F.L (1939).** The perfect stage of *Botrytis cinerea*. *Mycologia.* **31**: 485-489.
- Gullino M.L (1992).** Chemical control of *Botrytis* spp, 217-222 pp, in: Recent advances in *Botrytis* research. Verhoeff K., Malathrakis N.E., Williamson B., eds. Pudoc, Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.

## H

- Haas P.G., Wennemuth G (1962).** Kuhlagerung von Baumschulgehölzen. III. *Botrytis*-und *Fusarium* befall an Gehölzen im Kuhlager. *Gartenbauwissensch.* **27**: 231-242.
- Haubold B., Travisano M., Rainey P.B., Hudson R.R (1998).** Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations. *Genetics.* **150**: 1341-1348.
- Hennebert G.L (1973).** *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia.* **7**: 183-204.
- Hildebrand E.M (1938).** Techniques for the isolation of single microorganisms. *Bot Rev.* **4**: 628–654.
- Hoffland E., Van Beusichem M.L., Jeger M.J (1999).** Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant. Soil.* **210**: 263–272.
- Holz G., Coertze S., Williamson B (2004).** The ecology of *Botrytis* on plant surfaces, p. 9-27, in: *Botrytis: biology, pathology and control.* Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N., eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Honda Y., Mizumura Y (1991).** Light and temperature dependent conidium and sclerotium formation in *Botrytis* spp. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Shimane University,* 27-35.
- Hosen M.I., Ahmed A.U., Islam M.R (2010).** Variability and pathogenicity in Bangladeshi isolates of *Botrytis cinerea* causing botrytis grey mould in chickpea (*Cicer arietinum* L). *Span. J. Agric. Res.* **9**: 129-134.

## I

- Isenegger D.A., Ades P.K., Ford R., Taylor P.W.J (2008a).** Status of the *Botrytis cinerea*

species complex and microsatellite analysis of transposon types in South Asia and Australia. *Fungal Divers.* **29**: 17-26.

**Isenegger D.A., Macleod W.J., Ford R., Taylor P.W.J (2008b)**. Genotypic diversity and migration of clonal lineages of *Botrytis cinerea* from chickpea fields of Bangladesh inferred by microsatellite markers. *Plant. Pathol.* **57**: 967-973.

### J

**Jarvis W.R (1977)**. Botryotinia and Botrytis species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada, 195 pp.

**Jarvis W.R (1980)**. Epidemiology, 219-50 pp, in: The biology of Botrytis. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.

**Jarvis W.R (1989)**. Managing diseases in greenhouse crops. *Plant. Dis.* **73**:190-194.

**Jarvis W.R (1992)**. Managing diseases in greenhouse crops American Phytopathological Society, St Paul, MN.

**Judet-Correia D., Bollaert S., Duquenne A., Charpentier C., Bensoussan M., Dantigny P (2010)**. Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *Int. J. Food. Microbiol.* **142**: 106-113.

### K

**Karchani-Balma S., Gautier A., Raies A., Fournier E (2008)**. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathol.* **98**: 1271-1279.

**Kerssies A. (1994)**. Effects of temperature vapour pressure deficit and radiation on infectivity of conidia of *Botrytis cinerea* and on susceptibility of gerbera petals. *Eur. J. Plant. Pathol.* **100**: 123-136.

**Korolev N., Katan T., Elad Y (2006)**. Use of Selenate-Resistant Strains as Markers for the Spread and Survival of *Botrytis cinerea* Under Greenhouse Conditions. *Phytopathol.* **96**: 1195-1203.

**Korolev N., Mamiev M., Zahavi T., Elad Y (2011)**. Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. *Eur. J. Plant. Pathol.* **129**: 591-608.

### L

**Lamboy J.S (1997)**. Disease prevention in greenhouse tomato: an IPM perspective. Proc. New England Vegetable and Berry Conference and Trade Show. December 16-18. 198-200 pp.

**Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., Chapeland F (2002)**. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest. Manag. Sci.* **58**: 876-88.

**Leyronas C., Nicot P (2013)**. Monitoring viable airborne inoculum of *Botrytis cinerea* in the

South-East of France over 3 years: relation with climatic parameters and the origin of air masses. *Aerobiologia*. **29**: 291-299.

**Leyronas C., Duffaud M., Nicot P.C (2012)**. Compared efficiency of the isolation methods for *Botrytis cinerea*, *Mycology*. *Int. J. Fungal. Biol.* **4**: 221-225.

**Leyronas C., Fatnassi H., Bardin M., Boulard T., Nicot P.C (2011)**. Modelling *Botrytis cinerea* spore exchanges and production in unheated greenhouses. *J. Plant. Pathol.* **93**:407-414.

**Lhomme J.P., Jimenez O.F (1992)**. Estimating dew duration on banana and plantain leaves from standard meteorological observations. *Agric. Forest. Meteorol.* **62**:263-274.

**Lorbeer J.W., Seyb A.M., de Boer M., Van den Ende J.E (2004)**. *Botrytis* species on bulb crops, p. 273-294, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., d N. Delen, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.

**Lorenz D.H., Eichhorn K.W (1983)**. Investigations on *Botryotinia fuckeliana* Whetz., the perfect stage of *Botrytis cinerea* Pers. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. **90**: 1-11.

### 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 *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathol.* **95**: 692-700.

**Martinez J.A., Gomez-Bellot M.J. Banon S (2009)**. Temperature-dependent growth of *Botrytis cinerea* isolates from potted plants. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. **74**: 729-738.

**Mayr, E (1963)**. *Animal Species and Evolution*. Harvard University. Press, Cambridge.

**McDonald B.A., Linde C (2002)**. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **40**: 349-379.

**Mcquilken M.P (2001)**. Evaluation of novel fungicides and irrigation methods for grey mould control on *Calluna vulgaris*. *Proc. Int.Soc. Plant. Propagators*.pp1-9.

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

**Milgroom M.G, Peever T.L (2003)**. Population biology of plant pathogens - The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Dis.* **87**: 608-617.

**Mirzaei S., Goltapeh E.M., Shams-Bakhsh., M., Safaie, N (2008).** Identification of *Botrytis* spp. on Plants Grown in Iran. J. Phytopathol. **156**: 21-28.

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

**Moorman G.W., Lease R.J (1992).** Benzimidazole and dicarboximide resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. Plant. Dis. **76**: 477-480.

**Morgan W.M (1984).** The effect of night temperature and glasshouse ventilation on the incidence of *Botrytis cinerea* in a late-planted tomato crop. Crop. Prot. **3**: 243-251.

**Moser R., Pertot I., Elad, Y., Raffaelli R (2008).** Farmers' attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries. Biol. Control. **47**, 125–132.

**Moyano C., Alfonso C., Gallego J., Raposo R., Melgarejo P (2003).** Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations. Eur. J. Plant. Pathol. **109**: 515-522.

**Muñoz G., Hinrichsen P., Brygoo Y., Giraud T (2002).** Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. Mycol. Res. **106**: 594-601.

**Myresiotis C.K., Karaoglanidis G.S., Tzavella-Monari K (2007).** Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. Plant. Dis. **91**: 407-413.

## N

**Nair N.G., Allen R.N (1993).** Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. Mycol. Res. **97**: 1012–1014.

**Nederhoff E (1997a).** High humidity and plant diseases. New Zeland Commercial Grower. **52**:18.

**Nicot P., Alex D (1991).** Grey mold of greenhouse-grown tomatoes: disease control by climate management? Proc. Bull. Working Group Integrated Control in Protected Crops under Mediterranean Climate, Italy. pp 200-210.

**Nicot P.C., Mermier M., Vaissière B.E., Lagier J (1996).** Differential spore production by *Botrytis cinerea* on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. Plant. Dis. **80**:555-558.

**Nicot P.C., Baille A (1996).** Integrated control of *Botrytis cinerea* on greenhouse tomatoes, p. 169-189, in: Aerial plant surface microbiology. C. E. Morris, P. C. Nicot and C. Nguyen-The, eds. Plenum Press, New York, USA.

## O

**O'Neill T.M (1994).** Resurgence of tomato stem Botrytis. Grower. **21**: 54-55.

**O'Neill T.M. Mcquilken M.P (2000).** Influence of irrigation method on development of grey mould (*Botrytis cinerea*) in greenhouse crops of calluna, cyclamen and primula. Proc. BCPC

Conference – Pests and Diseases, 13-16 November, Brighton. pp 267-272.

**O'Neill T.M., Pettitt T.R., Mcquilken M.P., Hamer P.J.C (2002).** Integrated approach to control grey mould (*Botrytis cinerea*) in greenhouse crops of container-grown ornamentals. Proc. British Crop Protection Conference. Pests and Diseases. **1**:213-218.

**O'Neill T.M., Shtienberg D., Elad Y (1997).** Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. Plant. Dis. **81**: 36-40.

**Orskov J (1922).** Method for the isolation of bacteria in pure culture from single cells and procedure for the direct tracing of bacterial growth on a solid medium. J. Bacteriol. **7**: 537–549.

*P*

**Pande S., Sharma M., Kishore G.K., Shivram L., Mangala U.N (2010).** Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from chickpea: DNA polymorphisms, cultural, morphological and virulence characteristics. Afr. J. Biotech. **9** : 7961-7967.

**Pie K., Brower Y (1993).** Susceptibility of cut rose flower cultivars to infections by different isolates of *Botrytis cinerea*. J. Phytopathol. **137**: 233-44.

**Pitchay, D.S., Frantz, J.M., Locke, J.C., Krause, C.R., and Fernandez, 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*. J. Am. Soc. Hortic. Sc. **132**: 193-201.

**Prieto R., Rodrigues S., Henriques S (2003).** ptProteção integrada de tomate em estufa. Relatório Projecto Agro 4-Desenvolvimento de técnicas de produção integrada na horticultura protegida e de ar livre na região Oeste. 2 pp.

*R*

**Ramsey G.R., Lorbeer J.W (1986).** Pathogenicity of botrytis species on onion umbels and scapes under controlled conditions. Phytopathol. **76**: 604-611.

**Raposo R., Delcan J., Gomez V., Melgarejo P (1995).** Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. Plant. Pathol. **45**: 497-505.

**Raposo R., Gomez V., Urrutia T., Melgarejo P (2000).** Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. Phytopathol. **90**: 1246-1249.

**Reuveni R., Raviv M., Bar R (1989).** Sporulation of *B. cinerea* as affected by photosensitive polyethylene sheets and filters. Ann. Appl. Biol. **115**:417-424.

**Rice W.R (1989).** Analyzing tables of statistical tests. Evolution. **43**: 223-225.

*S*

**Salinas J., Glandorf D., Picavet F., Verhoeff K (1989).** Effects of temperature, relative

humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant. Pathol. **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., Wang H.P (2009)**. Pathogenicity analysis of different *Botrytis cinerea* strains in cucumber. China. Vegetables. 25-28.

**Shiraishi M., Fukutomi M., Akai S (1970b)**. Recovery of germinability of aged conidia of *Botrytis cinerea* Pers. by several saccharides. Ann. Phytopathol. Soc. Jap. **36**: 297-303.

**Shtienberg D., Elad Y., Niv A., Nitzani Y., Kirshner B (1998)**. Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. Eur. J. Plant. Pathol. **104**: 753-763.

**Smith P.M (1970)**. The integrated control of *Botrytis cinerea* on glasshouse tomatoes. PhD Thesis, University of Reading, U.K. 289 pp.

**Smith R.E (1900)**. Botrytis and Sclerotinia: Their relation to certain plant diseases and to each other. Bot. Gaz. **29**:369-407.

**Sosa alvarez M., Madden L.V., Ellis M.A (1995)**. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. Plant Dis.**79**: 609-615.

**Staats M (2007)**. Botrytis species on flower bulb crops: phylogeny, genetic variation and host specificity. Ph D thesis. Wageningen University.

**Stall R.E., Hortenstine C.C. Iley J.R (1965)**. Incidence of Botrytis gray mold of tomato in relation to a calcium-phosphorous balance. Phytopathol. **55**:447-449.

**Steiger D (2007)**. Global economic importance of Botrytis protection. In: Book of Abstracts, 14th International Botrytis Symposium, Cape Town, South Africa, 21–26 October 2007.

**Steward T.M., Long P.G (1987)**. Sporulation of *Botrytis cinerea* in the dark. New. Zeal. J. Exp. Agr.**15**: 389-392.

### T

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

**Terrentroy A (1994)**. Tomate serre : enquête sur le Botrytis dans les cultures de tomate précoce. APREL Bulletin N°S-641 Chamber of Agriculture of Bouches du Rhône, France.

**Thomas A.C., Matthee F.N., Kotze J.M (1981)**. Survival of *Botrytis cinerea* from table grapevines in South Africa. Phytophylactica. **13**: 157-160.

**Thomas C.S., Marois J.J (1986)**. Effect of wind and relative humidity on sporulation and external mycelium formation of Botrytis on grape. Phytopathol. **76**: 1114.

**Thompson J.R., Latorre B.A (1999)**. Characterization of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile using RAPD-PCR. Plant. Dis. **83**: 1090-1094.

**Tiedemann A (1997)**. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of

host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **50**: 151-166.

U

**Urbasch I (1984)**. Kugelige, umhüllte Mikrokonidien-Aggregate als Überdauerungs- und Verbreitungseinheiten von *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopatholo. Zeitschrift.* **109**: 241-244.

V

**Váczy K.Z., Erzsebet S., Levente K., Erzsebet F., Eva F., Mariann A., Levente, C., Gyorgy J.K., Irina S.D., Christian P.K (2008)**. Sexual Recombination in the *Botrytis cinerea* Populations in Hungarian Vineyards. *Phytopathol.* **98**: 1312-1319.

**Vakalounakis D.J (1992)**. Control of fungal diseases of greenhouse tomato under long-wave infrared absorbing plastic film. *Plant. Dis.* **76**:43-46.

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

**Vallejo I., Carbu M., Muñoz F., Rebordinos L., Cantoral J.M (2002)**. Inheritance of chromosome-length polymorphisms in the phytopathogenic ascomycete *Botryotinia fuckeliana* (anam. *Botrytis cinerea*). *Mycol. Res.* **106**: 1075-1085.

**Van den Ende J.E., Pennock I (1996)**. The perfect stage of *Botrytis elliptica*, pp. 16. Xlth International Botrytis Symposium, Wageningen, The Netherlands.

**Van Der Vlucht-Bergmans C.J.B., Brandwagt B.F., Vantt Klooster J.W., Wagemakers C.A.M., Van Kan J.A.L (1993)**. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **97**: 1193-1200.

**Van Maanen A., Xu X.M (2003)**. Modelling plant disease epidemics. *Eur. J. Plant. Pathol.* **109** : 669–682

**Viennot B (1965)**. Encyclopédie mycologique XXVII. Lechevalier, Paris. 350 p.

W

**Walker A.S., Gautier A.L., Confais J., Martinho D., Viaud M., Le Pécheur P., Dupont J., Fournier E (2011)**. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.* **101**: 1433-1445.

**Wei Y (1995)**. Environmental control to prevent condensation on tomato plants in greenhouses. PhD Thesis, Granfield University, Silsoe College. 218pp.

**Wessels B., Lamprecht S., Linde C., Fourie P., Mostert L (2013)**. Characterization of the genetic variation and fungicide resistance in *Botrytis cinerea* populations on rooibos seedlings in the Western Cape of South Africa. *Eur. J. Plant. Pathol.* **136**: 407-417.

**Whetzel H.H (1945)**. A synopsis of the genera and species of the Sclerotiniaceae, a family of stromatic inoperculate discomycetes. *Mycologia* **37**:648-714.

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

**Willits D.H., Peet M.M (1998).** The effect of night temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climates. *Agric. Forest. Meteorol.* **92**:191-202.

**Wright S (1978).** *Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among natural populations.* University of Chicago Press.

### Υ

**Yoder O.C., Whalen M.L (1975).** Factors affecting postharvest infection of stored cabbage tissue by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* **53**: 691-699.

**Yourman L.F., Jeffers S.N., Dean R.A (2000).** Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathol.* **90**: 851-859.

**Yourman L.F., Jeffers S.N., Dean R.A. (2003).** Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **109**: 311-317.

**Yunis H., Elad Y., Mahrer Y (1990).** Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on grey mould of cucumbers in unheated greenhouses. *Phytoparasitica.* **3** : 203-215.

### Z

**Zhang,C.Q., Zhu J.W., Wei F.I., Liu, S.Y., Zhu G.N (2007).** Sensitivity of *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables to DMIs and fenhexamid. *Phytoparasitica* **35**: 300-313.

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

### Sites internet

<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/F> Page consultée le 20 Octobre 2013.

<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/F> Page consultée le 20 Octobre 2011.

<http://www.minagri.dz/actualites.html> Page consultée le 10 Juillet 2013.

# 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 à extrait de malt (MEA)**

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

**Tampon phosphate glycérol à 20%**

Tampon phosphate .....	80 ml
Glycérol pur.....	20 ml
Autoclavage.....	121°C/20 min

Annexe II : Exemple de morphotypes des isolats de *B. cinerea*

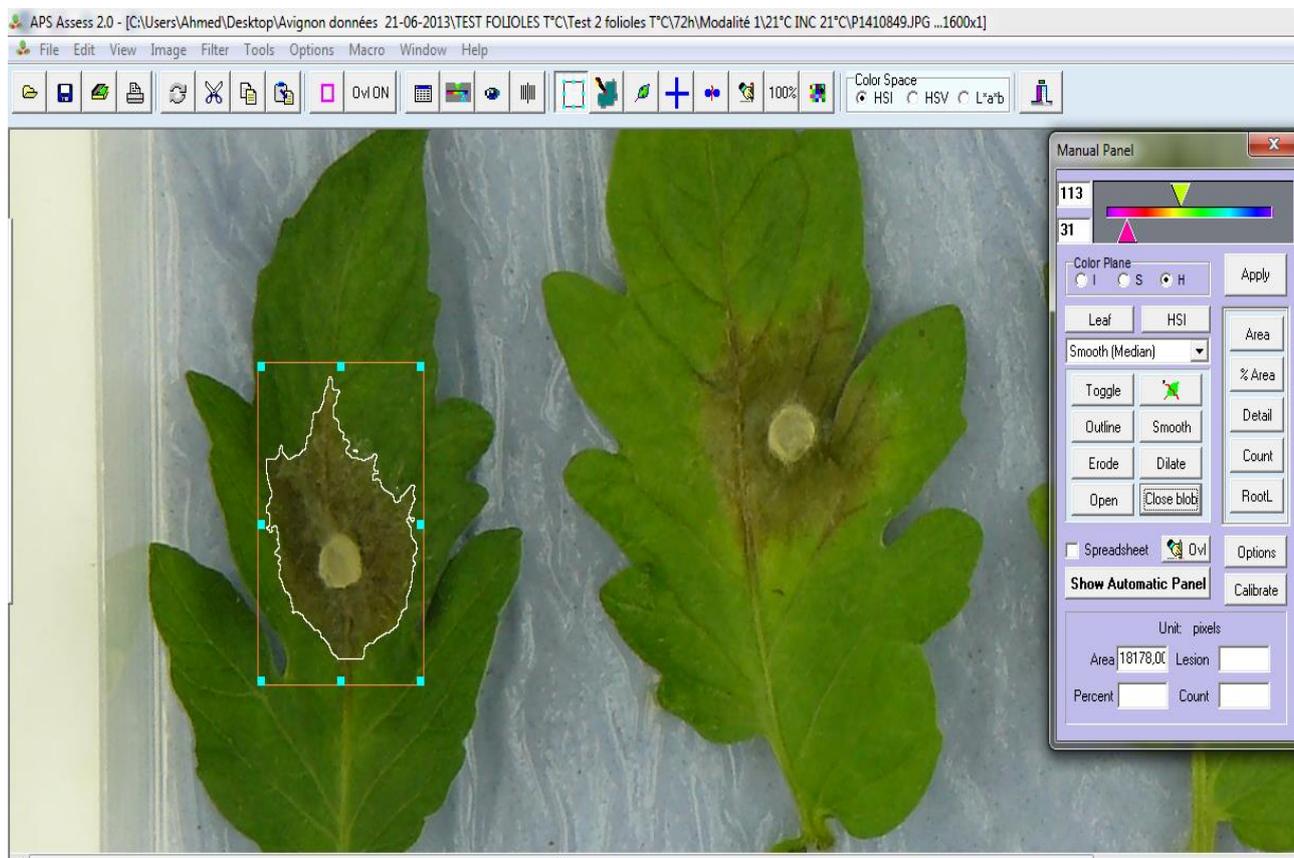
Nom de souche	Type mycélien <sup>1</sup>			Nombre de sclérotos
	Mycélium	Sporulation	Sclérotos	
ALG 88	M2	2	0	0
ALG 89	M2	1	0	0
ALG 90	M2	2	0	0
ALG 91	M2	1	0	0
ALG 92	M3	2	0	0
ALG 93	M4	2	0	0
ALG 94	M3	2	0	0
ALG 95	M2	2	0	0
ALG 96	M3	2	0	0
ALG 97	M2	2	0	0
ALG 99	M4	2	0	0
ALG 101	M2	2	0	0
ALG 102	M4	2	0	0
ALG 103	M2	2	0	0
ALG 105	M2	2	0	0
ALG 107	M4	2	0	0

Nom de souche	Type Sclérotien <sup>2</sup>			Nombre de sclérotos
	Mycélium	Sporulation	Sclérotos	
ALG 3	M1	1	S1	2
ALG 6	M1	1	S4	2
ALG 8	M2	2	S4	1
ALG 9	M1	1	S4	1
ALG 20	M3	2	S4	2
ALG 21	M1	1	S3	1
ALG 26	M2	2	S1	2
ALG 27	M1	1	S4	1
ALG 34	M1	2	S2	1
ALG 36	M1	1	S2	2
ALG 40	M4	2	S3	1
ALG 42	M4	1	S3	1
ALG 43	M1	1	S2	2
ALG 44	M4	2	S4	1
ALG 45	M4	2	S3	1
ALG 46	M4	1	S4	2

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

**2 Sclérotos** : 0 : absence ; 1 : rares ; 2 : très abondantes

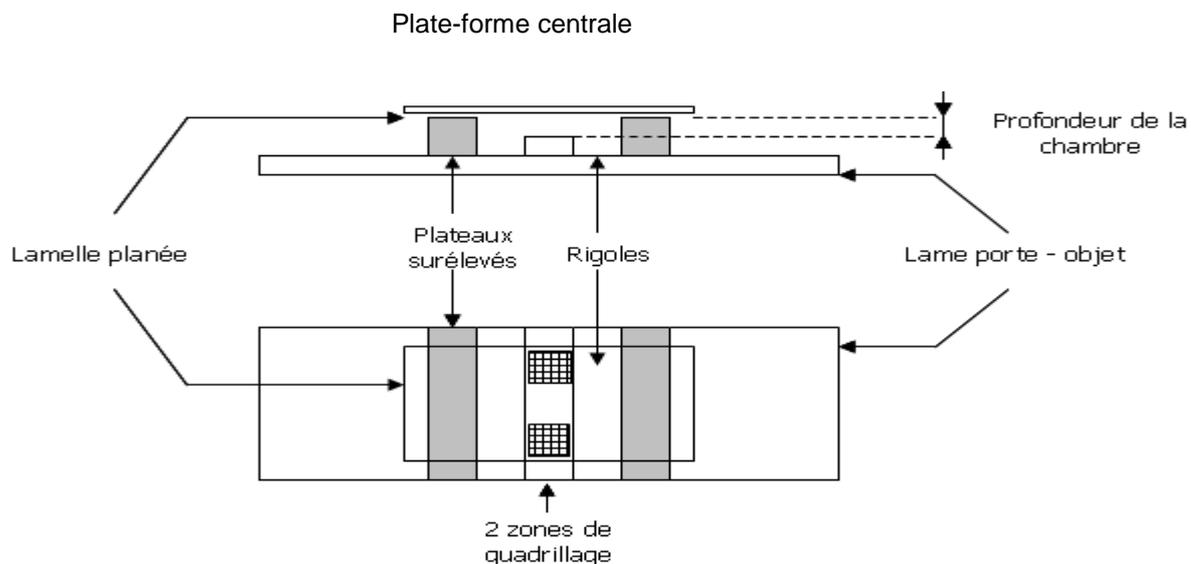
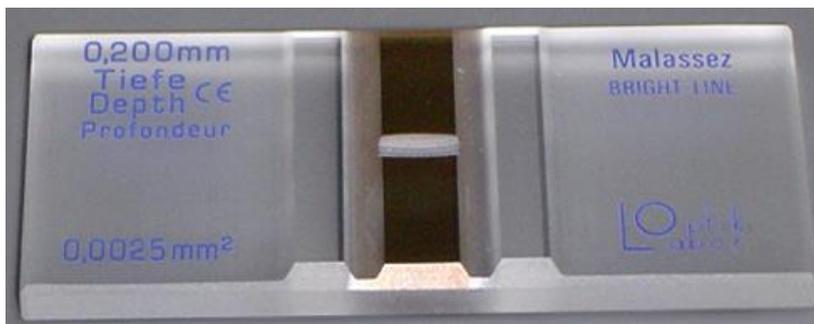
## Annexe III : Analyse d'une photographie avec le logiciel ASSESS 2.0



## Annexe IV : Utilisation de l'hématimètre de Malassez pour quantifier la concentration d'une suspension de spores de *B. cinerea*

### 1- Description de la cellule de Malassez

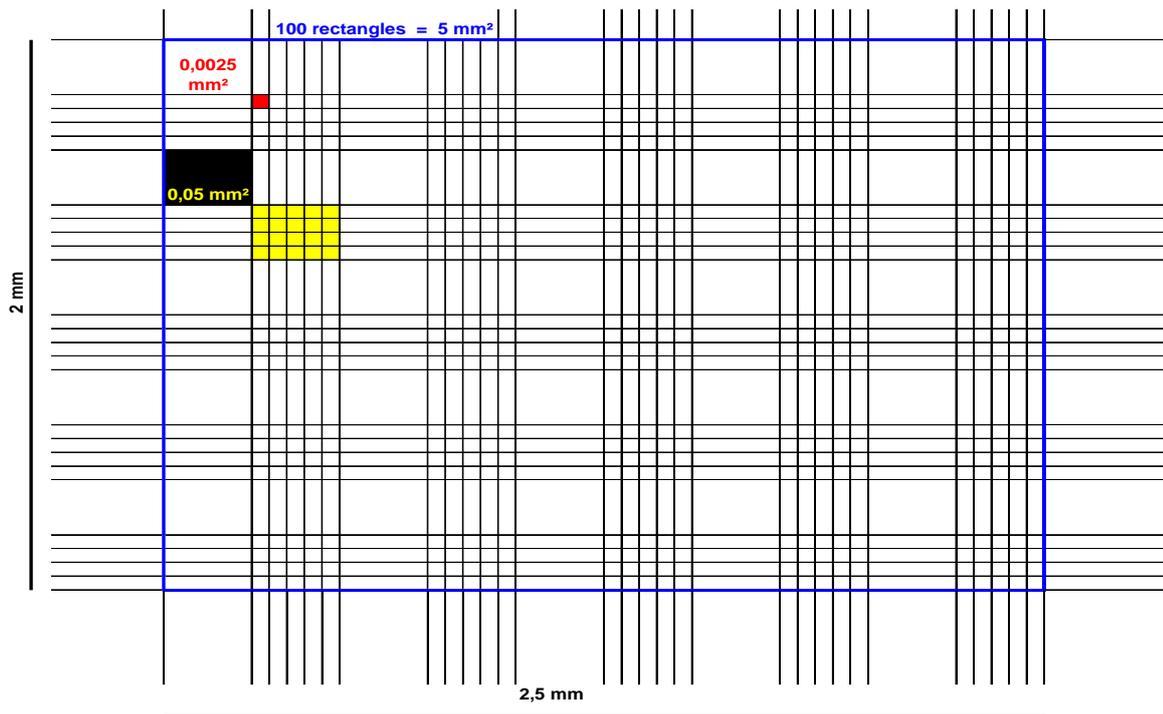
La cellule de numération est une lame épaisse en verre dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. Elle comporte des rigoles et deux zones de quadrillage :



**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

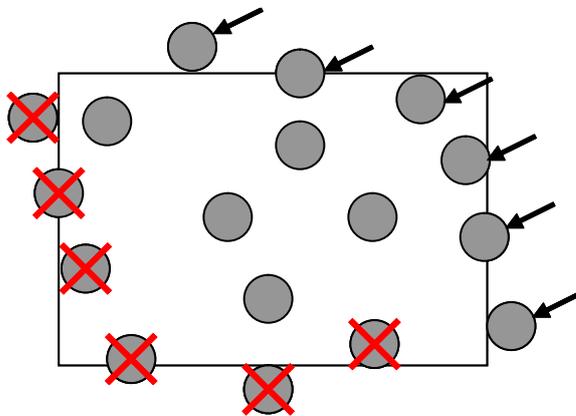
- Humectation les deux plateaux latéraux.
- Adhésion de la lamelle aux plateaux latéraux
- Homogénéisation de la suspension cellulaire, et prélèvement de  $17 \mu\text{l}$  de cette suspension à l'aide d'une micropipette.
- Remplissage de chacune des deux chambres de comptage par capillarité en plaçant 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).



Exemple : numération sur le rectangle = 11 spores

- Le dénombrement doit être réalisé sur les deux zones de quadrillage de la cellule.

### Calcul de la concentration

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

$$C = N / V$$

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

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, la concentration  $C$  est égale à :

$$C = (N / n) \times 10^5 \text{ spores / ml, avec } n = \text{nombre de rectangles dénombrés}$$

$$\text{Si la suspension avait été diluée : } (N / n) \times f \times 10^5 \text{ spores / ml}$$

**Annexe V : 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<sub>j</sub>** : la surface de la lésion (en mm<sup>2</sup>) 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

## Annexe VI: Protocole d'extraction d'ADN (Frozen plant tissue DNeasy 96 Qiagen)

Au préalable :

- Mettre le bain marie et l'étuve en marche.
- Préparer le mélange : 90ml AP1 + 225µlRNase + 225µlreagent DX.
- Mettre dans le bain marie a 65°C (RNase stockée au frigo).

1- Mettre 400 µl de tampon (AP1+ RNase + reagent DX) dans chaque tube (avec une bille de Tungsten). Boucher les plaques avec leurs barrettes précédentes.

2- Secouer 2 x 2 minutes avec la machine à secouer. (30 hz). Prendre les éléments en inox, enlever les couvercles des plaques d'extraction.

3- Incuber 65 °C pendant 15 minutes dans l'étuve.

4- Secouer 15 secondes à la main puis centrifuger a 3000 rpm.

5- Ajouter 130 µl de tampon AP2 + boucher avec nouveau tapis (ne pas jeter le précédent, le laver).

6- Secouer 15 secondes à la main puis centrifuger a 3000 rpm.

7- Incuber 10 minutes à -20°C.

8- Centrifuger 10 minutes à 4600 rpm.

9- Pipeter 400 µl de surnageant et le transférer dans une nouvelle plaque (boite bleue identique à la première).

10-Ajouter 600 µl de tampon AP3. Fermer avec un nouveau tapis.

11- Secouer 15 secondes puis centrifugé à 3000 rpm.

12- Transférer 1 ml vers la plaque à filtre (rouge). Placer une plaque poubelle en dessous (non fournie dans le kit).

13- Fermer avec airpore tapsheet puis centrifuger 10 minutes à 4600 rpm.

14- Ajouter 800 µl de tampon AW puis refermer avec airpore tapsheet.

15- Centrifuger 20 minutes à 4600 rpm.

16- Placer la plaque à filtre sur une plaque à élution.

17- Ajouter 50 µl de tampon AE et recouvrir d'un airpore tapsheet. Laisser 1 minute à temperature ambiante. Centrifuger 4 minutes à 4600 rpm.

18- Recommencer l'étape 17.

19- Fermer les plaques avec des barrettes de bouchons en plastique puis mettre au congélateur (-20 °C).

## Annexe VII : Protocole d'amplification des microsatellites en utilisant la PCR multiplex

Tableau I : Préparation de la PCR en plaque

Solution	Volume (µl)/Tube	Volume (µl)/Plaque +10%
Master Mix	5,0	264
Amorces Fw	0,2	10,6
Amorces Rv	0,2	10,6
Solution Q	1,0	52,8
H2O	1,6	84,5
ADN	2,0	-

Tableau II : Programme du thermocycleur

Phase de la PCR	Durée (min)	Température (°C)
Activation de la Taq	15'00	95
Dénaturation	00'30	94
Hybridation	01'30	51
Extension	01'30	72
Extension finale	10'00	72
Attente (facultatif)	-	04

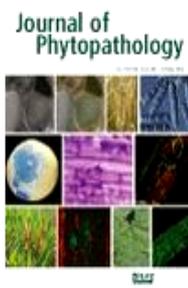
} x 40 cycles

**Annexe VIII : Exemple de profils haplotypiques obtenus après géotypage de souches de *B. cinerea***

Nom de souche	Taille des 9 microsatellites (en paire de bases)								
	MS1	MS2	MS5	MS9	MS10	MS3	MS4	MS6	MS7
ALG_2	235	142	159	148	164	221	124	128	128
ALG_4	231	158	159	144	172	219	124	122	122
ALG_6	231	158	159	148	186	213	124	114	128
ALG_7	235	142	157	148	186	213	124	122	122
ALG_8	235	158	159	144	172	221	124	122	128
ALG_9	235	142	157	148	186	213	124	122	124
ALG_14	235	142	157	148	186	213	124	122	124
ALG_17	231	158	159	144	172	221	124	114	114
ALG_18	231	158	159	144	172	219	124	114	114
ALG_19	231	142	159	148	186	221	124	122	124
ALG_20	231	142	159	148	186	221	124	122	122
ALG_21	235	142	157	148	186	213	124	122	122
ALG_22	235	142	157	148	186	229	124	122	124
ALG_23	235	142	157	148	186	213	124	122	124
ALG_25	231	158	159	148	186	221	124	122	128
ALG_27	231	142	159	148	186	221	124	122	124
ALG_28	231	158	159	144	172	223	124	122	122
ALG_29	235	142	159	152	164	219	124	122	124
ALG_30	235	158	159	148	186	221	124	122	122
ALG_33	235	142	157	148	186	221	124	128	128
ALG_34	231	142	155	144	172	219	115	122	128
ALG_35	235	164	159	144	172	221	115	128	124
ALG_36	235	142	167	148	186	219	115	122	124

# Publication

Home / Life Sciences / Plant Science / Plant Pathology



JOURNAL

## Journal of Phytopathology

Vol 162 (10 Issues in 2014)

Edited by: Editor-in-Chief: Andreas von Tiedemann; Associate Editors: Brigitte Mauch-Mani, Dale Walters, Robert C. Seem

Print ISSN: 0931-1785

Online ISSN: 1439-0434

Impact Factor: 0.921

---

### Description

This international journal publishes original scientific articles, short communications and reviews on all aspects of phytopathology on the population, organism, physiological, biochemical and molecular genetic level. The journal is eminently suitable for university teachers, researchers in universities, research institutes, and industry as well as for postgraduate and advanced students. The publication language is English.

Fields of interest: phytopathology, plant protection

**Titre:** Comparison of *Botrytis cinerea* Populations Collected from Tomato Greenhouses in Northern Algeria

Journal of  
Phytopathology

J Phytopathol

ORIGINAL ARTICLE

## Comparison of *Botrytis cinerea* Populations Collected from Tomato Greenhouses in Northern Algeria

Ahmed Adjebli<sup>1</sup>, Christel Leyronas<sup>2</sup>, Kamel Aissat<sup>1</sup> and Philippe C. Nicot<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'écologie Microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, Bejaia 06000, Algeria  
<sup>2</sup> INRA, UR407 Pathologie Végétale, Domaine St Maurice CS 60094, F-84143 Montfavet Cedex, France

### Keywords

genetic diversity, grey mould, inoculum exchange, microsatellite markers

### Correspondence

P.C. Nicot, INRA, Unité de Pathologie végétale, 67 allée des Chênes, CS 60094, F-84143 Montfavet Cedex, France.  
E-mail: philippe.nicot@avignon.inra.fr

Received: December 18, 2013; accepted: May 22, 2014.

doi: 10.1111/jph.12289

### Abstract

To estimate the genetic diversity and population structure for a better understanding of the spread of *Botrytis cinerea*, we genotyped with nine microsatellite markers 174 isolates collected from four greenhouses during three growing seasons in the region of Bejaia. Four of these isolates were detected as *Botrytis pseudocinerea* according to the allele size at locus Bc6. For all other isolates further studied, all loci were polymorphic, with the mean number of alleles per locus ranging from 2.77 to 5.22. Considerable genetic variability was detected in all subpopulations ( $D^* > 0.87$ ;  $Hnb > 0.40$ ). Based on the standardized index of association analysis, significant but low levels of clonality occurred, not excluding the possibility of recombination ( $r_D = 0.07$ ,  $P < 0.001$ ). A total of 109 haplotypes were characterized among the isolates, few of which were shared between subpopulations. This, together with moderate genetic differentiation among

## Résumé :

Pour estimer la diversité génétique et la structure de la population pour une meilleure compréhension de la propagation de *B. cinerea*, nous avons génotypé avec neuf marqueurs microsatellites 174 isolats collectés à partir de quatre serres pendant trois saisons de croissance dans la région de Bejaia. Quatre de ces isolats ont été détectés comme *Botrytis pseudocinerea* en fonction de la taille de l'allèle au locus Bc6. Pour tous les autres isolats étudiés, tous les loci étaient polymorphes, avec un nombre moyen d'allèles par locus allant de 2,77 à 5,22. Une variabilité génétique considérable a été détectée dans toutes les sous-populations ( $D^* > 0,87$  ;  $HNB > 0,40$ ). Sur la base de l'analyse de l'indice l'association standardisé, un faible niveau significatif de clonalité a été observé, sans exclure la possibilité d'une recombinaison ( $r_D = 0,07$ ,  $P < 0,001$ ). Un total de 109 haplotypes ont été caractérisés parmi les isolats, dont quelques-uns ont été partagés entre les sous-populations. La différenciation génétique a été modérée entre les sous-populations en fonction de l'origine géographique ( $0,080 < F_{ST} < 0,167$ ), ce qui a suggéré un niveau faible d'échange d'inoculum entre serres d'une saison d'échantillonnage à l'autre. L'importance de la structure génétique des populations de *B. cinerea* a été discutée et devrait être pris en considération pour la gestion de la pourriture grise.

**Mots clés :** Diversité génétique, Pourriture grise, Echange d'inoculum, Marqueurs Microsatellites.

La pourriture grise, causée par le champignon *Botrytis cinerea*, est l'une des principales maladies fongiques aériennes qui touche diverses cultures d'importance agronomique. La diversité phénotypique et génotypique de *B. cinerea* est très grande et la capacité d'adaptation de ce champignon à une pression sélective est rapide, ce qui limite considérablement les méthodes de lutte entreprises. Les objectifs de ce travail visent à étudier la variabilité phénotypique montrée par des isolats de *B. cinerea* en réponse aux températures élevées. Ceci est conduit par l'étude du développement de la pourriture grise et les fluctuations de températures à l'intérieur des serres commerciales de tomates de la région de Bejaia durant deux saisons (2012 et 2013), ainsi que par l'étude de l'effet de la température sur la croissance mycélienne et la germination des spores des isolats locaux. L'effet des températures élevées sur le développement *in vitro*, l'agressivité sur des folioles de tomate des isolats de *B. cinerea* isolés dans les différentes régions géographiques (Algérie, France et Norvège), ainsi que l'agressivité de ces isolats sur la plante entière de tomate en conditions optimales sont également abordés. Un dernier objectif vise à étudier la variabilité génotypique des populations de *B. cinerea* isolés dans les serres de tomates de la région de Bejaia. Le développement de la pourriture grise sous les serres de tomates augmente malgré les températures élevées de l'air à l'intérieur de serre non chauffée, ce qui est confirmé par le taux de plantes infectées depuis le début (3,02%) et la fin de l'expérimentation (25%), respectivement. Des différences significatives sont enregistrées entre les isolats locaux sur la germination des spores, et la vitesse de croissance mycélienne. Plus de 90% des spores sont germées à 21 °C, tandis qu'à 28 °C et 30 °C, la germination des spores a été réduite à moins de 79% et 50% respectivement au bout de 10 heures. La vitesse de croissance mycélienne a été significativement réduite à 28 °C et 30 °C pour tous les isolats testés. Aucun des isolats ne s'est développé à 32 °C. L'effet de la température sur l'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur folioles de tomates et sur les plantes entières a révélé une grande variabilité entre les isolats testés. 30 °C, correspond à la température d'inhibition de l'agressivité sur les folioles de tomate. Aucune différence significative de l'agressivité n'a été détectée entre les isolats de *B. cinerea* collectés en Algérie, France et Norvège. Enfin, nous avons analysé génotypiquement 174 isolats avec neuf marqueurs microsatellites. Quatre d'entre eux ont été identifiés comme *Botrytis pseudocinerea* en fonction de la taille de l'allèle au locus Bc6. Pour tous les autres isolats étudiés, tous les loci ont été polymorphes, avec un nombre moyen d'allèles par locus allant de 2,77 à 5,22. Une variabilité génétique considérable a été détectée dans toutes les sous-populations ( $D^* > 0,87$ ;  $HNB > 0,40$ ). Sur la base de l'analyse de l'indice l'association standardisé, un faible niveau de clonalité a été observé, sans exclure la possibilité d'une recombinaison ( $r_D = 0,07$ ,  $P < 0,001$ ). Un total de 109 haplotypes a été caractérisé parmi les isolats, dont quelques-uns ont été partagés entre les sous-populations. La différenciation génétique a été modérée entre les sous-populations en fonction de l'origine géographique ( $0,080 < FST < 0,167$ ), ce qui a suggéré un niveau faible d'échange d'inoculum entre serres d'une saison d'échantillonnage à l'autre. L'importance de la structure génétique des populations de *B. cinerea* a été discutée et devrait être pris en considération pour la gestion de la pourriture grise.

**Mots clés :** *Botrytis cinerea*, Tomate, Foliole, Serre non chauffée, Croissance mycélienne, Germination, Spore, Température, Agressivité, Diversité génétique, Marqueurs microsatellites.

#### Abstract

Gray mold, caused by *Botrytis cinerea* fungus, is a major aerial fungal disease, which affects various important agronomical crops. Phenotypic and genotypic diversity of *B. cinerea* is very strong and its quick adaptability to selective pressure was reported, which makes the control methods very limited. The objectives of this work aim to study the phenotypic variability exhibited by isolates of *B. cinerea* in response to high temperatures. This by studying firstly the development of gray mold and temperature fluctuations in commercial tomato greenhouses in the region of Bejaia during two seasons (2012 and 2013), and then, by studying of the effect of temperature on the mycelial growth and spore germination of local isolates. The effect of high temperatures on the development *in vitro*, aggressiveness on tomato leaflets of *B. cinerea* isolates collected from different geographical regions (Algeria, France and Norway), as well as the aggressiveness of these isolates on tomato plant in optimal conditions were reported. A final objective aims to study the genotypical variability of *B. cinerea* populations isolated in tomato greenhouses of Bejaia region. The development of gray mold in tomato greenhouse, despite the high air temperatures recorded inside unheated greenhouse, which is confirmed by the rate of infected plants from the beginning (3.02%) and end of the experiment (25%), respectively. A significant difference was found between local isolates on spore germination and mycelial growth rate differences. Over 90% of the spores were germinated at 21 °C, whereas at 28 °C and 30 °C, spore germination was reduced to less than 79% and 50% respectively after 10 hours. The mycelial growth rate was significantly reduced at 28 °C and 30 °C for all tested isolates. No isolates were developed at 32 °C. The effect of temperature on the aggressiveness of *B. cinerea* isolates on tomato leaflets and full plants revealed considerable variability between tested isolates. Temperature of 30 °C corresponds to the inhibition of aggressiveness on tomato leaflets. No significant differences in aggressiveness were detected among isolates of *B. cinerea* collected in Algeria, France and Norway. Finally, a genotypic analysis of 174 isolates using nine microsatellite markers identified four of these isolates as *Botrytis pseudocinerea* based on the size of the allele at locus Bc6. For all other isolates studied, all loci are polymorphic, with an average number of alleles per locus from 2.77 to 5.22. Considerable genetic variability was detected in all subpopulations ( $D^* > 0,87$ ;  $HNB > 0,40$ ). Based on the analysis of the standardized index association, a significant low level of clonality was observed, without excluding the possibility of recombination ( $r_D = 0,07$ ,  $P < 0,001$ ). A total of 109 haplotypes were characterized, some of which were shared between sub-populations. Genetic differentiation was moderate between sub-populations according to geographical origin ( $0,080 < FST < 0,167$ ), which suggested a low level of inoculum exchange between greenhouse of a sampling season to other. The importance of the genetic structure of *B. cinerea* populations was discussed and should be considered for the management of gray mold.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, Tomato, Leaflet, Greenhouse unheated mycelial growth, germination, Spore, Temperature, Aggression, Phenotypic diversity, Genetic diversity, Microsatellite Markers.

#### المخلص

التعفن الرمادي، ناجم عن الفطر *Botrytis cinerea*، هي من أهم الأمراض الفطرية التي تمس مختلف المحاصيل الزراعية. التنوع في النمط الظاهري والوراثي والقدرة الهائلة في التأقلم لمختلف أنواع الضغط الخارجي الذي يتميز به هذا الفطر جعل من طرق مكافحة هذا المرض محدودة. ومن الأهداف المسطرة في هذا العمل هي دراسة التباين الظاهري لهذا الفطر استجابة لدرجات الحرارة العالية. وهذا بدراسة في المقام الأول تطور التعفن الرمادي والتغيرات في درجات الحرارة داخل البيوت البلاستيكية للطماطم خلال موسمي 2012 و 2013 في منطقة بجاية وكذلك دراسة تأثير درجات الحرارة على نمو وإنبات الأبواغ للعزلات المحلية لهذا الفطر داخل المختبر. وفي المقام الثاني دراسة تأثير درجات الحرارة المتوقعة على نمو ودرجات العدوانية على وريقات الطماطم لسلاسل *B. cinerea* ذات أصول مختلفة (الجزائر، فرنسا والنرويج)، هذه الدراسة تمت أيضاً على مستوى نباتات الطماطم بأكملها. الهدف الأخير من هذا العمل هو دراسة التباين الوراثي للعزلات *B. cinerea* المأخوذة من الطماطم المزروعة داخل البيوت البلاستيكية في منطقة بجاية. أظهرت النتائج ارتفاع التعفن الرمادي داخل البيوت البلاستيكية رغم ارتفاع درجات الحرارة. كما أظهرت نسبة نباتات الطماطم المتعفنة منذ بداية الدراسة (13.02%) وفي نهايتها (25%). هناك اختلافات ذات دلالة إحصائية على إنبات الأبواغ ونمو الفطر بين السلالات المحلية لـ *B. cinerea*. أكثر من 90% من الأبواغ نبتت تحت درجات حرارة 21 °C بينما تحت درجات حرارة (28-30) إنبات الأبواغ نقصت تحت معدل 79% و-50% خلال 10 ساء. سرعة نمو الفطر نقصت بصفة هامة تحت 28 °C و-30 لكل العزلات. ولا عزلة من *B. cinerea* تطورت تحت 32 °C. تأثير درجات الحرارة على مستوى عدوانية العزلات لوريفات ونباتات الطماطم أظهر اختلافات كبيرة بين العزلات. تعتبر درجة الحرارة 30 °C الدرجة المثبتة لعدوانية الـ *B. cinerea* على وريقات الطماطم. ولا فرق ذو دلالة إحصائية وجد بين عزلات *B. cinerea* المأخوذة من مختلف الدول المدرسة، وأخيراً 174 عزلة تم تعريفها وراثياً باستخدام تسعة واسمات وراثية. 4 منها تم تعريفها على أنها *Botrytis pseudocinerea*. اعتماداً على حجم اللؤلؤ BC6. أظهرت باقي العزلات أن جميع المواقع الوراثية كانت متعددة الأشكال مع متوسط عدد الأليلات في موضع تتراوح بين 2.77-5.22. تم الكشف عن تباين وراثي كبير في جميع المجموعات ( $D^* > 0,87$ ;  $Hnb > 0,40$ ). استناداً إلى تحليل المؤشر الجامع، لوحظ وجود مستوى منخفض من التناسل، دون استبعاد إمكانية التكاثر الجنسي لدى هذا الفطر. ما مجموعة 109 من النسخ المتنوعة تم تمييزها، بعضها مشترك بين مجموعات فرعية لهذا الفطر. كان التمايز الوراثي بين المجموعات الفرعية وفقاً لأصولها الجغرافية بين ( $0,08 < FST < 0,167$ )، وهذا ما يدل على تبادل ضعيف للعزلات بين البيوت البلاستيكية وبين السنوات الثلاثة المدرسة في منطقة بجاية. أهمية التركيب الوراثي لمجموعات الـ *B. cinerea* قد تمت مناقشتها ويجب أن تؤخذ بعين الاعتبار لتطوير طرق جديدة لمكافحة التعفن الرمادي.

**الكلمات المفتاحية:** *Botrytis cinerea*، الطماطم، وريقات، بيوت بلاستيكية، نمو الفطر، الإنبات، الأبواغ، الحرارة، عدوانية، التباين الوراثي، التباين الظاهري، الواسمات الوراثي