

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE -ENSA-
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques

Spécialité : Phytopathologie

Option : Biotechnologie

**Etude de la spécialisation parasitaire et de la diversité
génétique d'une collection d'isolats de *Botrytis* spp.**

Réalisé par MEAMICHE NEDDAF Hayet

Président : M^r BOUZNAD. Z. (Professeur, ENSA Alger)

Directeur de thèse : M^{me} LOUANCHI.M. (Maître de conférences, ENSA Alger)

Examineurs : M^r SABAOU.N. (Professeur, ENS Kouba)

: M^r KEDAD.A. (Chargé de cours, ENSA Alger)

Année Universitaire 2009/2010

AVANT PROPOS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier Dr LOUANCHI. M, Maître de conférences à l'ENSA El Harrach pour m'avoir soutenue et guidée tout au long de mon parcours.

J'exprime ma gratitude à Mr BOUZNAD. Z, Professeur à l'ENSA El Harrach de me faire l'honneur d'assurer la présidence du Jury. Je le remercie également pour tout l'intérêt qu'il a porté à mon travail. Ses conseils et ses critiques avisés ont contribué fortement à éclairer mon chemin.

Je tiens à remercier vivement Mr SABAOU. N, Professeur à l'ENS Kouba pour l'intérêt qu'il a bien voulu accorder à mon travail en acceptant de l'examiner. Aussi, je souhaite lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir facilité les choses en toutes circonstances.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mr KEDDAD, chargé de cours à l'ENSA El Harrach pour avoir accepté d'examiner mon travail. Je ne pourrais oublier combien il a été attentif à mes nombreuses sollicitations. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Je remercie également Mme BENHOUBOU, Mr TRAIKIA et Mr SELLAM, enseignants à l'ENSA pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont apporté durant mon travail.

Je ne peux évoquer ce travail sans me rappeler ma collègue et amie Lilette, qui depuis le début de cette aventure m'a aidée et soutenue sans jamais ménager ses efforts.

Je n'oublie pas non plus d'adresser mes vifs remerciements à mon collègue Rabah AOUDJIT, chercheur à l'INRAA, qui à travers sa bonhomie, son humour et son extrême gentillesse m'a apporté un soutien précieux comme seul un ami sait le faire.

Je tiens également à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à Mlle OUAKLI Khalissa et à Mr Salah CHOUAKI, chercheurs à l'INRAA. Leurs encouragements et leur soutien indéfectibles ont ponctué ma progression sans discontinuité.

J'adresse mes remerciements et ma reconnaissance à tous ceux qui n'ont pas été cités et que je porte dans mon cœur pour toutes les bonnes choses qu'ils m'ont apportées dans les moments de joie comme dans les moments de doute. Merci les Amis !!!

SOMMAIRE

I.	Introduction générale.....	01
II.	Analyse bibliographique.....	03
II.1	Intérêt de l'étude du genre <i>Botrytis</i> en phytopathologie.....	03
II.1.1.	Généralités.....	03
II.1.1.1.	Distribution géographique et données écologiques.....	03
II.1.1.2.	Structures de survie.....	04
II.1.1.2.1.	Les sclérotés.....	04
II.1.1.2.2.	Les chlamydospores.....	05
II.1.1.2.3.	Les conidies.....	05
II.1.1.2.4.	Le mycélium.....	05
II.1.1.3.	Dissémination de l'inoculum.....	05
II.1.2.	Position taxonomique.....	05
II.1.3.	Spécialisation parasitaire.....	08
II.1.3.1.	Données générales.....	08
II.1.3.2.	Médiateurs de la spécialisation parasitaire.....	08
II.2.	<i>Botrytis cinerea</i> : Agent de la pourriture grise.....	11
II.2.1.	Caractéristiques morphologiques de <i>Botrytis cinerea</i>	11
II.2.2.	Taxonomie de <i>Botrytis cinerea</i>	13
II.2.3.	Variabilité génétique chez <i>Botrytis cinerea</i>	13
II.2.3.1.	L'hétérocaryose.....	13
II.2.3.2.	Les variations du taux de ploïdie.....	13
II.2.3.3.	La reproduction sexuée.....	14
II.2.3.4.	Les éléments transposables.....	14
II.2.4.	Pathologie et parcours infectieux de <i>Botrytis cinerea</i>	14
II.2.4.1.	Symptomatologie.....	14

II.2.4.2.	Epidémiologie.....	15
II.2.4.2.1.	Sources de l'inoculum primaire.....	15
II.2.4.2.2.	Effet des conditions environnementales sur le développement de la Maladie.....	17
II.2.4.3.	Processus infectieux et mécanismes d'attaque.....	17
II.2.4.3.1.	Germination et pénétration des tissus de l'hôte.....	17
II.2.4.3.2.	Mort cellulaire et invasion des tissus hôtes.....	18
II.2.5.	Détection et quantification de <i>Botrytis cinerea</i>	18
II.2.5.1.	Méthodes immunologiques.....	18
II.2.5.2.	Méthodes moléculaires.....	19
II.2.6.	Moyens de lutte contre <i>Botrytis cinerea</i>	19
II.2.6.1.	Pratiques culturales.....	19
II.2.6.2.	Lutte chimique.....	20
II.2.6.3.	Résistance variétale.....	21
II.2.6.4.	Biocontrôle.....	21
III.	Matériel et méthodes.....	23
III.1.	Matériel biologique.....	23
III.1.1.	Matériel fongique.....	23
III.1.1.1.	Isolement.....	24
III.1.1.2.	Purification et conservation.....	24
III.2.	Caractérisation morphologique et culturale des isolats de <i>Botrytis</i> spp...	24
III.2.1.	Caractères cultureux.....	24
III.2.1.1.	Aspect général des colonies.....	24
III.2.1.2.	Etude de la croissance mycélienne.....	24
III.2.2.	Caractérisation des spores.....	25
III.2.2.1.	Etude de la taille des spores.....	25

III.2.2.2.	Estimation de la concentration en spores.....	25
III.2.3.	Caractérisation des sclérotas.....	25
III.2.3.1.	Détermination du temps nécessaire à la formation des sclérotas.....	25
III.2.3.2.	Etude de la taille des sclérotas.....	25
III.2.3.3.	Estimation de la densité des sclérotas.....	25
III.3.	Etude de la spécialisation parasitaire et de la variabilité du pouvoir pathogène.....	26
III.3.1.	Les isolats utilisés.....	26
III.3.2.	Matériel végétal.....	26
III.3.3.	Préparation de l'inoculum.....	26
III.3.4.	Inoculation artificielle par la technique des feuilles détachées.....	26
III.3.5.	Notations effectuées et analyse des résultats.....	28
III. 3.5.1.	Période d'incubation.....	28
III. 3.5.2.	Période de latence.....	28
III. 3.5.3.	Nombre de spores.....	28
III. 3.5.4.	Diamètre des lésions.....	28
III. 3.5.5.	Calcul de l'AUDPC.....	28
III. 3.5.6.	Analyse statistique des résultats.....	29
III.4.	Caractérisation moléculaire.....	29
III.4.1.	Echantillonnage.....	29
III.4.2.	Extraction et purification de l'ADN.....	29
III.4.3.	Contrôle de la qualité des ADN extraits.....	29
III.4.3.1.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	29
III.4.3.2.	Révélation et visualisation des ADN.....	29
III.4.4.	Amplification et RAPD.....	30
III. 4.4.1.	Préparation du milieu réactionnel.....	30
III. 4.4.2.	Paramètres de l'amplification par PCR.....	30
III. 4.4.3.	Electrophorèse et révélation des gels.....	31

III. 4.4.4.	Expression des résultats.....	31
IV.	Résultats et discussion.....	32
IV.1.	Etude de la variabilité morphologique et culturelle.....	32
IV.1.1.	Caractères culturaux.....	32
IV. 1.1.1.	Aspect général des colonies.....	32
IV. 1.1.2.	Estimation de la vitesse de la croissance mycélienne.....	34
IV.1.2.	Analyse des spores.....	35
IV. 1.2.1.	Etude de la taille des spores.....	35
IV. 1.2.2.	Estimation de la concentration en spores.....	37
IV.1.3.	Etude des sclérotés.....	38
IV. 1.3.1.	Temps nécessaire à la formation des sclérotés.....	40
IV. 1.3.2.	Taille des sclérotés.....	40
IV. 1.3.3.	Estimation de la densité des sclérotés.....	40
IV.1.4.	Discussion.....	40
IV.2.	Etude de la spécialisation parasitaire et de la variabilité du pouvoir pathogène.....	43
IV.2.1.	Cas de la vigne	43
IV. 2.1.1.	Période d'incubation.....	43
IV. 2.1.2.	Période de latence.....	44
IV. 2.1.3.	Nombre de spores.....	44
IV. 2.1.4.	Diamètre des lésions.....	44

IV. 2.1.5.	Discussion.....	
	46	
IV.2.2.	Cas de la fève.....	
	47	
IV. 2.2.1.	Période d'incubation.....	48
IV. 2.2.2.	Période de latence.....	48
IV. 2.2.3.	Nombre de spores.....	48
IV. 2.2.4.	Diamètre des lésions.....	48
IV. 2.2.5.	Discussion.....	
	50	
IV.2.3.	Cas du haricot.....	
	51	
IV. 2.3.1.	Période d'incubation.....	52
IV. 2.3.2.	Période de latence.....	52
IV. 2.3.3.	Nombre de spores.....	52
IV. 2.3.4.	Diamètre des lésions.....	52
IV. 2.3.5.	Discussion.....	
	54	
IV.2.4.	Cas de la tomate.....	
	55	
IV.2.4.1.	Période d'incubation.....	55
IV.2.4.2.	Diamètre des lésions.....	56
IV.2.4.3.	Discussion.....	
	57	
IV.2.5.	Cas de l'oignon.....	
	58	
IV. 2.5.1.	Période d'incubation.....	58
IV. 2.5.2.	Période de latence.....	
	58	
IV. 2.5.3.	Nombre de spores.....	59
IV. 2.5.4.	Diamètre des lésions.....	59
IV. 2.5.5.	Discussion.....	
	60	

IV.3.	Caractérisation moléculaire.....	61
IV.3.1.	Contrôle de la qualité des ADN extraits.....	61
IV.3.2.	Etude du polymorphisme des ADN par des marqueurs RAPD.....	61
IV. 3.2.1.	Analyse des profils obtenus avec l’amorce OPB06.....	63
IV. 3.2.2.	Analyse des profils obtenus avec l’amorce OPF04.....	64
IV. 3.3.	Discussion	67
V.	Conclusion générale.....	68
	Références Bibliographiques.....	70
	Annexes	

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADNr	: Acide Désoxyribonucléique ribosomique
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism.
ANOVA	: Analysis Of Variance
AOS	: Actif Oxygen Species
ARN	: Acide ribonucléique
AUDPC	: Area Under Disease Progression Curve
BET	: Bromure d'Ethidium
BFO	: Brûlures des Feuilles d'oignon
BCA	: Biologic control agent
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphism Sequence
CWDE	: Cell Wall Degradation Enzyme
DNTP	: 2'désoxynucléotide-5'triphosphate
EDTA	: Ethylène Diamine Tetra-Acetic-Acide
FRAC	: Fungicide Resistance Action Committee
HR	: Hypersensitive Reaction
HST	: Host Selectif Toxine
IGS	: Inter Genique spacer
ITGC	: Institut Technique des Grandes Cultures
ITS	: Espaceurs internes transcrits
Kb	: Kilo bases
LSD	: Least Significant Difference
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nUV	: Near Ultraviolet
OA	: Oxalic Acid
Pb	: Paires de bases
PCR	: Polymerase chain Reaction
PDA	: Potato Dextrose Agar
PG	: Polygalacturonases
PGIP	: Polygalacturonase-inhibiting proteins
PTA-ELISA	: Plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assays
RAPD	: Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SCAR	: Sequence Characterized Amplification Region
SDS	: Sodium-Dodecyl-Sulfate
SOD	: Super Oxyde Dismutase
TAQ polymerase	: Thermus aquaticus Polymerase DNA
TBE	: Tris Borate EDTA
TE	: Tris EDTA
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average.
UP PCR	: Universally Primed PCR
UV	: Ultraviolet.
VCG	: Vegetative Compatibility Groups

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1.** Protocole d'extraction de l'ADN à base de SDS 20% selon la méthode de Blaiseau *et al.* (1992).
- Annexe 2.** Protocole de purification des échantillons d'ADN.
- Annexe 3.** Composition des solutions et tampons pour l'extraction et la purification de l'ADN.
- Annexe 4.** Préparation du gel pour l'électrophorèse.
- Annexe 5.** Composition des solutions et tampons pour l'électrophorèse.
- Annexe 6.** Analyse de variance de l'effet de la taille des spores sur les isolats de *Botrytis* spp.
- Annexe 7.** Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles de vigne.
- Annexe 8.** Analyse de variance de l'effet de la période de latence sur les isolats inoculés sur les feuilles de vigne.
- Annexe 9.** Analyse de variance de l'effet du nombre de spores sur les isolats inoculés sur les feuilles de vigne.
- Annexe 10.** Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles de vigne.
- Annexe 11.** Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles de fève.
- Annexe 12.** Analyse de variance de l'effet de la période de latence sur les isolats inoculés sur les feuilles de fève.
- Annexe 13.** Analyse de variance de l'effet du nombre de spores sur les isolats inoculés sur les feuilles de fève.
- Annexe 14.** Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles de fève.
- Annexe 15.** Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles de haricot.
- Annexe 16.** Analyse de variance de l'effet de la période de latence sur les isolats inoculés sur les feuilles de haricot.
- Annexe 17.** Analyse de variance de l'effet du nombre de spores sur les isolats inoculés sur les feuilles de haricot.
- Annexe 18.** Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles de haricot.
- Annexe 19.** Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles de tomate.
- Annexe 20.** Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles de tomate.
- Annexe 21.** Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles d'oignon.
- Annexe 22.** Analyse de variance de l'effet de la période de latence sur les isolats inoculés sur les feuilles d'oignon.
- Annexe 23.** Analyse de variance de l'effet du nombre de spores sur les isolats inoculés sur les feuilles d'oignon.
- Annexe 24.** Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles d'oignon.

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Dendrogramme phylogénétique du genre <i>Botrytis</i>	10
Figure 2.	Caractéristiques morphologiques de <i>Botrytis cinerea</i>	12
Figure 3.	Symptômes de <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes plantes sensibles.....	16
Figure 4.	Dispositif expérimental de l'inoculation artificielle sur les feuilles détachées des 5 plantes hôtes.....	27
Figure 5.	Aspect général des colonies formées par les isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp.....	33
Figure 6.	Formes des conidies des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp. (Gx 40).....	36
Figure 7.	Aspect des sclérotés formés par quelques isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp.....	39
Figure 8.	Progression et sporulation des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de vigne.....	45
Figure 9.	Progression et sporulation des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de Fève.....	49
Figure 10.	Progression et sporulation des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de haricot... ..	53
Figure 11.	Types de lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de tomate.....	56
Figure 12.	Progression et sporulation des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées d'oignon.....	59
Figure 13.	Profils électrophorétiques obtenu avec l'amorce OPB06.....	62
Figure 14.	Dendrogramme obtenu avec l'amorce OPB06. Méthode UPGMA, Coefficient de Nei.....	63
Figure 15.	Profils électrophorétiques obtenu avec l'amorce OPF04.....	64
Figure 16.	Dendrogramme obtenu avec l'amorce OPF04. Méthode UPGMA, Coefficient de Nei.....	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Quelques espèces de <i>Botrytis</i> et de <i>Botryotinia</i>	07
Tableau 2.	Principales espèces de <i>Botrytis</i> , maladies causées, espèces et familles associées.....	09
Tableau 3.	Classification de <i>Botrytis cinerea</i> Pers. : Fr.. et de <i>Botryotinia fuckeliana</i> de Bary (Whetz).....	13
Tableau 4.	Isolats de <i>Botrytis</i> spp. Sélectionnés pour l'étude.....	23
Tableau 5.	Paramètres du programme d'amplification polymérase en chaîne (PCR) selon Muñoz <i>et al.</i> 2002.	31
Tableau 6.	Aspect cultural des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp.....	32
Tableau 7.	Couleurs des colonies formées par les isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp.....	32
Tableau 8.	Moyennes des vitesses de croissance (mm/j) des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp.....	34
Tableau 9.	Classes de moyenne en nombre d'isolats/classe.....	32
Tableau 10.	Mensuration des spores des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp.	35
Tableau 11.	Concentration en spores des isolats de <i>Botrytis</i> spp. cultivés sur milieu PDA.....	37
Tableau 12.	Effectif de chaque classe de concentration en spores/ml/cm ²	38
Tableau 13.	Caractéristiques des sclérotés produits par 9 isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp. cultivés sur milieu PDA (jour d'apparition, Nombre de sclérotés/cm ² , Moyennes des longueurs, Moyennes des largeurs, Intervalles de mesure).....	38
Tableau 14.	Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp. sur feuilles détachées de vigne.....	43
Tableau 15.	Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp. sur feuilles détachées de vigne.....	47
Tableau 16.	Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp. sur feuilles détachées de vigne.....	51
Tableau 17.	Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp. sur feuilles détachées de vigne.....	55
Tableau 18.	Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de <i>Botrytis</i> spp. sur feuilles détachées de vigne.....	58
Tableau 19.	Concentration des ADN obtenus.....	61

I. INTRODUCTION GENERALE

Le genre *Botrytis* P. Micheli ex Pers. (1974) comprend des espèces phytopathogènes redoutables vis-à-vis de nombreuses cultures telles que la vigne, les plantes à bulbe, les plantes ornementales, les cultures maraîchères ainsi que certaines essences forestières. Les maladies à *Botrytis* peuvent survenir durant la végétation, après la récolte ou encore pendant le transport et la conservation, démultipliant ainsi les risques de pertes considérables.

Le genre *Botrytis* comprend *Botrytis cinerea* Pers., (1974) qu'on décrit comme une espèce extrêmement cosmopolite et polyphage, puisque 235 plantes hôtes y sont sensibles de par le monde (Jarvis, 1977). En parallèle, les autres espèces de *Botrytis* sont spécifiques et ont des gammes d'hôtes plutôt restreintes comprenant seulement une ou quelques espèces voisines. L'identification des espèces de *Botrytis* est traditionnellement basée sur les caractères culturels, les caractéristiques morphologiques (conidies, conidiophores, sclérotés) et également sur la spécificité de l'hôte. Plus récemment, des approches ont été développées pour affiner l'identification des espèces et étudier la structure phylogénétique du genre.

L'Algérie est un pays méditerranéen réputé pour la diversité de son agriculture. Hormis la saison estivale, le climat reste doux et humide favorisant la profusion de nombreuses maladies d'origine fongique tout au long de l'année et les attaques de *Botrytis* y sont fréquentes. De nombreuses études ayant concerné quelques wilayates du pays ont permis l'observation de symptômes typiques de *Botrytis* spp. ainsi que l'isolement d'isolats à partir de plantes hôtes appartenant à différentes familles botaniques. Les résultats de la caractérisation des isolats ont permis dans la plupart des cas d'identifier principalement deux espèces *Botrytis cinerea* et *Botrytis fabae* ; la première étant polyphage et l'autre spécialiste de la fève, elles n'en demeurent pas moins très similaires du point de vue morphologique (Messgou, 1999 ; Merabti, 2003, Salhi, 2004 ; Bouznad *et al.*, 1998 ; Louanchi *et al.*, 2001).

Les maladies dues à *Botrytis* spp. sont récurrentes en Algérie aussi bien en plein champ que dans les serres. L'espèce *Botrytis cinerea* a déjà été isolée à partir de vignobles, de cultures maraîchères (tomate, oignon, poivron, courgette, aubergine, ail, concombre), de légumineuses, de rosiers et de fruits récoltés (fraises, poires). Peu d'études ont été menées sur l'impact des épidémies de *Botrytis* sur les cultures. Les données concernant les pertes occasionnées au champ ou lors de la récolte sont inexistantes.

Néanmoins, les deux espèces *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea* ont suscité un intérêt certain, en raison de leur similitude morphologique ainsi que leur effet dévastateur sur les cultures de fève et autres légumineuses (Sayoud *et al.*, 1999). En effet, dans les régions du Maghreb, lorsque les conditions climatiques s'y prêtent, les pertes peuvent atteindre 80% (1996 ; Bouhassan *et al.*, 2004). Les variétés de fève cultivées en Algérie sont adaptées au climat mais demeurent sensibles à la maladie « tache chocolat » causée conjointement par *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea*.

Au regard de l'importance des dégâts liés aux maladies causées par les espèces du genre *Botrytis* et la répercussion économique des pertes occasionnées, la lutte apparaît indispensable. L'usage des est prédominant depuis une vingtaine d'années, cependant, l'impact direct de la lutte chimique sur l'environnement et la santé

humaine ainsi que l'apparition fréquente de populations résistantes à un nombre élevé de matière active est une réalité. Des méthodes alternatives ont été développées, néanmoins, les fongicides demeurent le moyen de lutte le plus utilisé.

Le but de ce travail est de permettre une meilleure compréhension des maladies causées par *Botrytis* spp. et plus particulièrement celles liées à *Botrytis cinerea* sur différentes plantes hôtes. À cet effet, nous avons étudié l'interaction entre des isolats de *Botrytis* spp. collectés à travers cinq wilayates du centre Algérois (Alger, Blida, Tipaza, Boumerdes, Tizi Ouzou), à partir de plantes hôtes connues pour être sensibles vis-à-vis de *Botrytis*.

Une première partie du travail décrit la diversité phénotypique des 20 isolats de la collection sur la base de l'analyse des critères morphologiques et culturels, à savoir l'aspect des colonies et la croissance mycélienne, la taille des spores et leurs concentrations ainsi que la taille, la forme et la densité des sclérotés.

La deuxième partie porte sur l'étude de la spécialisation parasitaire et la variabilité du pouvoir pathogène des isolats en utilisant une méthode d'inoculation artificielle sur des feuilles détachées de fève (*Vicia faba* L.), de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), d'oignon (*Allium cepa* L.) et de vigne (*Vitis vinifera* L.). Les analyses comparatives effectuées ont permis de décrire le processus infectieux, y compris la pénétration, l'induction des premiers symptômes, la propagation du pathogène à travers les tissus et la sporulation du champignon sur les tissus nécrosés durant une période de notation déterminée.

La dernière partie du travail a été consacrée à l'étude du polymorphisme génétique de la collection d'isolats de *Botrytis* spp. par l'analyse du polymorphisme des profils RAPD.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. PRESENTATION DU GENRE *BOTRYTIS* EN PHYTOPATHOLOGIE

II.1.1. Généralités

Les espèces du genre *Botrytis* P. Micheli ex. Pers (1974). sont pour la plupart pathogènes. Les maladies qu'elles provoquent sont à l'origine de pertes économiques importantes (Jarvis, 1977). Elles attaquent les dicotylédones ainsi que quelques monocotylédones corollifères, les graminées ne semble pas constituer des hôtes potentiels de ce genre (Staats, 2007). Les espèces de *Botrytis* sont des pathogènes nécrotrophes et saprophytes (Martinez *et al.*, 2005), elles tuent activement les cellules de leurs hôtes et assurent leur survie au dépend des tissus morts (Jarvis, 1977).

Selon le cas, les maladies à *Botrytis* se manifestent par des flétrissements des fleurs et des feuilles, des pourritures sur fruits mais également par des lésions foliaires localisées ou étendues ainsi que des pourritures sur bulbes au champs ou durant le stockage (Hausbeck et Moorman, 1996). Des chancres sur tige peuvent également être observés (Sweets *et al.*, 1982; Hausbeck et Moorman, 1996; Kim et Cho, 1996). D'autre part, on associe au genre les infections quiescentes sur les tissus qu'il colonise (Elad, 1997). Cette période de latence, quelque soit sa durée a longtemps été désignée comme étant une « phase non agressive » et a été observée chez de nombreuses plantes hôtes (Verhoeff, 1970).

Botrytis spp. sont reconnaissables à leur mycélium blanc et duveteux avec une sporulation abondante dont la couleur tend vers le gris quelques jours suite à l'infection, d'où l'appellation « Pourriture grise » lorsque il s'agit de maladies causées par *Botrytis*. Les spores peuvent être transportées par le vent sur de longues distances (Jarvis, 1977). *Botrytis* se conserve dans le sol ou sur des débris en décomposition sous forme de mycélium ou de sclérotés.

Une sporulation abondante et une croissance mycélienne rapide à la faveur d'une large gamme de conditions microclimatiques ainsi qu'une aptitude peu commune à développer des résistances vis-à-vis de nombreux fongicides posent des problèmes sérieux de contrôle des maladies à *Botrytis* à travers le monde.

II.1.1.1. Distribution géographique et données écologiques

Le genre *Botrytis* est supposé provenir des régions de l'Hémisphère Nord (Whetzel, 1945) où les hivers sont longs, froids et humides et les journées y sont courtes et souvent enneigées. Ces régions sont caractérisées par des étés doux et frais, avec des précipitations régulières et de faibles intensités lumineuses (Willettts, 1997 ; Elad *et al.*,2004).

Botrytis spp. sont des pathogènes des régions tempérées, probablement en raison de la somme de données collectées sous des climats doux et tempérés (Coley-Smith *et al.* ,1980). Quoi qu'il en soit, les espèces du genre *Botrytis* surviennent là où leurs hôtes sont cultivés. Leur présence a été constatée aussi bien dans des régions

froides que dans des zones tropicales à subtropicales. D'ailleurs, Anderson (1924) a identifié *Botrytis cinerea* en Alaska alors que Yunis et Elad (1989) ont retrouvé le pathogène dans des régions chaudes voire arides.

A l'heure actuelle, l'aire de répartition de *Botrytis* ne se limite plus aux zones froides et humides, l'activité humaine a largement contribué à sa propagation transfrontalière. Les connaissances autour de la distribution géographique et des centres d'origines de *Botrytis* demeurent incomplètes. De plus, les données concernant les variations génétiques et la dynamique des populations sont inexistantes pour la plupart des espèces du genre mis à part celles de *Botrytis cinerea* (Staats, 2007).

En Algérie, les maladies dues à *Botrytis* spp. sont récurrentes aussi bien en plein champ que dans les serres. L'espèce *Botrytis cinerea* a déjà été isolée à partir de vignobles, de cultures maraîchères (tomate, oignon, poivron, courgette, aubergine, ail, concombre), de légumineuses, de rosiers et de fruits récoltés (fraises, poires). Peu d'études ont été menées sur l'impact des épidémies de *Botrytis* sur les cultures. Les données concernant les pertes occasionnées au champ ou lors de la récolte sont inexistantes.

Néanmoins, les deux espèces *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea* ont suscité un intérêt certain, en raison de leur similitude morphologique ainsi que leur effet dévastateur sur les cultures de fève et autres légumineuses (Sayoud *et al.*, 1999). En effet, dans les régions du Maghreb, lorsque les conditions climatiques s'y prêtent, les pertes peuvent atteindre 80% (Mabsout et Sadaoui, 1996 ; Bouhassan *et al.*, 2004). Les variétés de fève cultivées en Algérie sont adaptées au climat mais demeurent sensibles à la maladie « tache chocolat » causée conjointement par *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea*.

Les espèces de *Botrytis* vivent et se développent dans différents milieux (Jarvis, 1977). Elles sont présentes dans le sol (Lorbeer et Tichelaar, 1970) ou bien sur des semences et des bulbes. La plupart du temps, elle sont isolées à partir des parties aériennes des plantes infectées (feuilles, tiges, bourgeons, fleurs et fruits) à tous les stades de développement. L'agriculture intensive associée aux cultures abritées contribue largement à disséminer *Botrytis* spp. dans des habitats autrefois indemnes.

II.1.1.2. Structures de survie

La survie de *Botrytis* spp. dans des habitats parfois hostiles et peu favorables est cruciale pour l'accomplissement de son cycle infectieux. Les propagules et les structures de conservation dormantes ou métaboliquement inactives y sont impliquées.

II.1.1.2.1. Les sclérotés

Toutes les espèces de *Botrytis* forment des sclérotés en fonction des isolats et des conditions environnementales. Les sclérotés se distinguent par leur taille, leur densité et leur forme. Ils survivent aisément aux conditions environnementales hostiles et permettent au pathogène de perdurer dans le sol ou sur les débris végétaux de la récolte jusqu'à la prochaine plantation. Les sclérotés constituent un support potentiel pour la reproduction sexuée lorsque les conditions environnementales et physiologiques s'y prêtent et sont à l'origine de productions successives de conidies chez plusieurs espèces de *Botrytis* (Coley-Smith, 1980).

II.1.1.2.2. Les chlamydospores

Les chlamydospores ont été identifiées chez *Botrytis cinerea*, *Botrytis anthophila* et *Botrytis fabae* (Coley-Smith, 1980). Chez *Botrytis cinerea*, ce sont des cellules hyalines de tailles et de formes extrêmement variables (Urbasch, 1986). Dans des conditions d'humidité élevée et en absence de nutriments, les chlamydospores donnent naissance à des microconidies dormantes. Elles sont supposées jouer un rôle de structures de survie en l'absence de nutriments sur la surface de la plante hôte (Urbasch, 1983, 1986).

II.1.1.2.3. Les conidies

Les conidies de *Botrytis* sont considérées comme des propagules asexuées dont la durée de vie dans le sol est limitée. Leur survie est largement tributaire des nutriments, de la température, de l'humidité, de l'activité microbienne et de l'exposition à la lumière (Coley-Smith, 1980). Des microconidies sont également produites par toutes les espèces de *Botrytis*. Ce sont des propagules microscopiques alternatives lorsque le champignon est confronté aux aléas du milieu. Les microconidies sont impliquées dans le processus de spermatisation et assureraient le passage au stade sexué (Fukumori *et al.*, 2004).

II.1.1.2.4. Le mycélium

La survie du mycélium de *Botrytis* spp. dans les conditions naturelles est limitée. Néanmoins, pour les espèces spécialisées, le mycélium peut perdurer sous forme latente dans les bulbes, la semence et autres organes végétatifs des plantes hôtes (Coley-Smith, 1980).

II.1.1.3. Dissémination de l'inoculum

Le champignon survit dans différents habitats grâce à ces structures de survie qui sont propagés par différents moyens (Jarvis, 1980). La dissémination de l'inoculum dépend de facteurs essentiels tels que la viabilité des propagules, la source de l'inoculum, les conditions favorables à la production et au transport (Jarvis, 1980).

La dissémination des conidies de *Botrytis* se fait par la libération, le transport et le dépôt. Les éclaboussures dues à l'irrigation par aspersion ou aux précipitations participent activement à détacher les conidies des lésions foliaires. Le vent contribue au transport et au dépôt de ces dernières sur des plantes saines (Jarvis, 1977).

Les propagules de *Botrytis* sont également transportées par des insectes tels que la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* (Louis *et al.*, 1996), la mouche de la vigne *Lobesia botrana* (Fermaud et Le Menn, 1989), le thrips des fleurs *Thrips obscuratus* (Fermaud et Gaunt, 1995) et la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* (Engelbrecht, 2002).

II.1.2. Position taxonomique

Le genre a été identifié et répertorié pour la première fois par Pierre-Antoine Micheli en 1729 dans son ouvrage "Nova plantarum Genera" (Coley-Smith, 1980). Il a été classé parmi la classe des *Léotiomycètes*, le sous phylum des *Pezizomycotina* et l'ordre des *Hélotiales* au sein de la famille des *Sclerotiniaceae*. On a souvent confondu *Botrytis* spp. avec *Sclerotinia* spp. Depuis, des clarifications furent apportées (Smith, 1900) et les doutes se sont dissipés quant à sa position taxonomique (Whetzel, 1945).

Pour certaines espèces de *Botrytis*, le téléomorphe est mal connu ou n'a jamais été observé dans la nature, pour cette raison, les scientifiques se sont accordés à utiliser *Botrytis* comme appellation générique qui inclut à la fois *Botrytis* et *Botryotinia* (Ten Have, 2001). *Botrytis* ainsi que sa forme parfaite, *Botryotinia* Whetzel. comptent actuellement plus de 20 espèces en plus d'un hybride (Hennebert 1973; Yohalem *et al.*, 2003), elles sont présentées dans le Tableau 1.

La classification des champignons est historiquement basée sur l'étude des caractéristiques morphologiques et biologiques. L'identification est alors effectuée par la comparaison d'un grand nombre de critères (Guarro *et al.*, 1999). Dans le cas de *Botrytis* spp. la taille et la densité des conidies, l'aspect du mycélium, la grosseur des sclérotés sont autant de critères d'identification de l'espèce. Dans certains cas, la spécialisation parasitaire et le pouvoir pathogène sont également utilisés comme données discriminantes (Jarvis, 1977 ; Hennebert, 1973). L'étude des traits morphologiques peut s'avérer utile pour une caractérisation préliminaire. Outre le temps considérable nécessaire à la culture du champignon après isolement, ces méthodes d'identification requièrent un œil expert et sont sujettes à la subjectivité de l'observateur.

L'identification de la totalité des espèces du genre à partir de leur morphologie est peu fiable. D'ailleurs, Menzinger (1966) a démontré que les conditions culturales pouvaient modifier les critères taxonomiques des isolats comme la forme et la taille des conidies. Dans le même ordre d'idées, Venev (Cité in Jarvis, 1977) a manipulé la taille des conidies en modulant la température et le milieu de culture, il a indiqué que ces changements morphologiques étaient réversibles (Mirzaei *et al.*, 2007).

Au-delà des traits morphologiques et biologiques, la taxonomie du genre *Botrytis* a été remaniée grâce aux techniques de biologie moléculaire. Leur application a permis de déterminer le statut d'hybride de *Botrytis allii* (Nielsen *et al.*, 2001 ; Nielsen et Yohalem., 2001; Yohalem, 2003 ; Staats, 2007). L'analyse phylogénétique a corroboré la classification classique et a permis de confirmer la nature hybride de *Botrytis allii*. L'approche moléculaire a également permis d'étudier le complexe *Botrytis cinerea* qui s'est avéré être composé de deux espèces sympatriques *vacuata* et *transposa*. Par ailleurs, les études de phylogénétiques ont confirmé l'étroite relation qui lie *Botrytis calthae*, *Botrytis convulata*, *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea*. Corroborant ainsi les observations de Hennebert et Groves, (1963). Staats *et al.* (2005) ont tenté de dresser une classification sur la base de séquences d'ADN de 3 gènes codant pour des protéines nucléaires (*RPB2*, *G3PDH* et *HSP60*).

Tableau 1. Quelques espèces de *Botrytis* et de *Botryotinia*

<i>Botrytis</i> sp.	<i>Botrytinia</i> sp.	Système d'accouplement
<i>B. aclada</i> Fresen.	-	-
<i>B. allii</i> Munn	-	-
<i>B. anthophila</i> Bondartsev	?	-
<i>B. byssoidea</i> J.C. Walker	?	-
<i>B. calthae</i> Hennebert	<i>Bt. calthae</i> Hennebert et M.E. Elliott	-
<i>B. cinerea</i> Pers.:Fr.	<i>Bt. fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel	Heterothallique
<i>B. convallariae</i> (Kleb.) Ondrej	-	-
<i>B. convoluta</i> Whetzel et Drayton	<i>Bt. convoluta</i> (Drayton) Whetzel	-
<i>B. croci</i> Cooke et Masee	-	-
<i>B. elliptica</i> (Berk.) Cooke	<i>Botryotinia</i> sp.	Heterothallique
<i>B. fabae</i> Sardiña	<i>Bt. fabae</i> J.Y. Lu et T.H. Wu	-
<i>B. ficariarum</i> Hennebert	<i>Bt. ficariarum</i> Hennebert	-
<i>B. galanthina</i> (Berk. & Broome) Sacc.	-	-
<i>B. gladiolorum</i> Timmerm.	<i>Bt. draytonii</i> (Buddin et Wakef) Seaver	-
<i>B. globosa</i> A. Raabe	<i>Bt. Globosa</i> N.F. Buchw	Homothallique
<i>B. hyacinthi</i> Westerd. et J.F.H. Beyma	-	-
<i>B. narcissicola</i> Kleb. Ex Westerd.	<i>Bt. narcissicola</i> (P.H. Greg.) N.F. Buchw	-
<i>B. paeoniae</i> Oudem.	-	-
<i>B. pelargonii</i> Røed	<i>Bt. pelargonii</i> Røed	-
<i>B. polyblastis</i> Dowson	<i>Bt. polyblastis</i> (P.H. Greg.) N.F. Buchw	-
<i>B. porri</i> N.F. Buchw.	<i>Bt. porri</i> (JFH Beyma) Whetzel	Homothallique
<i>B. ranunculi</i> Hennebert	<i>Bt. ranunculi</i> Hennebert et W.H. Groves	Heterothallique
<i>B. ricini</i> N.F. Buchw.	<i>B. ricini</i> (G.H. Godfrey) Whetzel	Homothallique
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Bt. fritillarii-pallidiflori</i> Q.T. Chen et J. LI	-
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Sclerotinia spermophila</i> Noble	Homothallique
<i>B. sphaerosperma</i> N.F. Buchw.	<i>Bt. sphaerosperma</i> (P.H. Greg.) N.F. Buchw	-
<i>B. squamosa</i> J.C. Walker	<i>B. squamosa</i> Vienn-Bourg	Heterothallique
<i>B. tulipae</i> Lind	-	-

B : *Botrytis*, Bt : *Botryotinia*, - : Inconnu, ? : En cours d'étude.

(Beever et Weeds, 2004)

II.1.3. Spécialisation parasitaire

II.1.3.1. Données générales

Les espèces de *Botrytis* sont spécialisées et s'attaquent à une gamme d'hôtes plutôt restreinte, principalement les monocotylédones corollifères et quelques dicotylédones (Hennebert, 1973 ; Jarvis, 1977) (Tableau 2). *Botrytis cinerea* est une espèce pathogène généraliste alors que les espèces spécialisées peuvent s'associer à une ou deux espèces appartenant au même genre (Mansfield, 1980) à l'exception de *Botrytis fabae*, qui infectent les espèces appartenant aux genres *Vicia*, *Lens*, *Pisum*, et *Phaseolus* de la famille des *Fabaceae* (Jarvis, 1977; Lindbeck *et al.*, 2003).

Les études phylogénétiques ont indiqué que les interactions à caractère spécifique sont plus étroites chez les hôtes monocotylédones. Le genre serait compartimenté en deux clades où le premier regrouperait 4 espèces associées exclusivement aux dicotylédones, y compris *Botrytis cinerea* et *Botrytis fabae*. Le deuxième clade comprendrait la majorité des espèces du genre qui peuvent être associées aussi bien aux dicotylédones qu'aux monocotylédones (van Baarlen, 2004 ; Staats, 2007) (Figure 1a).

La spécialisation parasitaire chez *Botrytis* n'est pas exclusive, d'ailleurs, il est possible de rencontrer un groupe de plusieurs espèces de *Botrytis* sur des plantes de la même famille ou du même genre. C'est le cas de trois espèces spécifiques à la famille des *Ranunculaceae* (Hennebert et Groves, 1963). Le genre *Allium* spp. présente un autre type de combinaison, vu qu'il est attaqué par sept espèces de *Botrytis* (Freisen *et al.*, 2001). Le genre fait partie des monocotylédones pétaloïdes (Friesen *et al.*, 2006) qui comportent des cultures importantes telles que l'ail, l'oignon et l'échalote auxquelles s'associent les espèces *Botrytis byssoidea*, *Botrytis aclada*, *Botrytis squamosa* et *Botrytis allii* (Figure 1b).

II.1.3.2. Médiateurs de la spécialisation parasitaire chez *Botrytis* spp.

La relation de spécificité est déterminée par un certain nombre de facteurs. Les toxines spécifiques (HST) ont été étudiées chez les genres *Cochliobolus* et *Alternaria* (Turgeon, 2000 ; Thomma, 2003) pour identifier les souches pathogènes et saprophytes. Concernant *Botrytis*, les HST ont été rapportées pour *Botrytis fabae* sur *Vicia fabae* (Harrison, 1988) et *Botrytis elliptica* sur des lys (Wolpert *et al.*, 2002 ; Van Baarlen *et al.*, 2004). En revanche, aucune HST n'a été identifiée chez *Botrytis cinerea*, ce qui s'accorde avec son régime polyphage.

Des facteurs auxiliaires sont produits par le pathogène pour l'aider à détoxiquer les composés de défense de la plante hôte, c'est le cas de *Botrytis tulipae* qui dégrade la tulipaline A de la tulipe grâce à des enzymes spécifiques (Schönbeck et Schlösser 1976). *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea* réagissent différemment aux dérivés de la wyerone qui correspondent à une famille de phytoalexines induites chez les plants de fève confrontés à des bioagressions. Cette différence est expliquée par l'existence d'un nombre réduit de récepteurs-acides wyerones chez *Botrytis fabae* (Rossal et Mansfield, 1984), mais aussi, par l'aptitude de l'espèce à métaboliser et à inactiver les phytoalexines de la fève plus rapidement que *Botrytis cinerea*. De ce fait, l'espèce spécialisée domine celle qui est polyphage par sa résistance aux réponses défensives et son agressivité envers son hôte (Harrison, 1980).

Tableau 2. Principales espèces de *Botrytis*, maladies causées, espèces et familles hôtes associées.

<i>Botrytis</i> spp.	Nom de la maladie	Espèces hôtes	Espèces hôtes
<i>B. aclada</i>	Pourriture grise du collet	<i>Allium</i> spp. L.	Alliaceae
<i>B. allii</i>	Pourriture grise du collet	<i>Allium</i> spp. L.	Alliaceae
<i>B. byssoidea</i>	Pourriture du collet	<i>Allium</i> spp. L.	Alliaceae
<i>B. calthae</i>	-	<i>Caltha palustris</i>	Ranunculaceae
<i>B. cinerea</i>	Pourriture grise	>235 hôtes	Polyphage
<i>B. convoluta</i>	Pourriture du rhizome	<i>Iris</i> Spp. L.	Iridaceae
<i>B. croci</i>	Flétrissement du Corcus	<i>Corcus</i> spp. L.	Iridaceae
<i>B. elliptica</i>	Feu du lis	<i>Lilium</i> spp. L.	Liliaceae
<i>B. fabae</i>	Taches chocolat	<i>Vicia</i> spp. L., <i>Lens</i> spp. L., <i>Pisum</i> spp. L., <i>phaseolus</i> spp.L.	Fabaceae
<i>B. ficariarum</i>	-	<i>Ficaria verna</i>	Ranunculaceae
<i>B. galanthina</i>	Flétrissement	<i>Galanthus</i> spp. L.	Amaryllidaceae
<i>B. gladiolorum</i>	Flétrissement du glaïeul	<i>Gladiolus</i> spp. L.	Iridaceae
<i>B. globosa</i>	Pourriture du collet	<i>Alium ursinum</i> .	Alliaceae
<i>B. hyacinthi</i>	Pourriture de la jacinthe	<i>Hyacinthus</i> spp. L.	Hyacinthaceae
<i>B. narcissicola</i>	Pourriture cendrée du narcisse	<i>Narcissus</i> spp.L.	Amaryllidaceae
<i>B. paeoniae</i>	Flétrissement de la pivoine	<i>Paeoniae</i> spp. L.	Paeoniaceae
<i>B. pelargonii</i>	-	<i>Pelargonium</i> spp. L.	Geraniaceae
<i>B. polyblastis</i>	Feu du narcisse	<i>Narcissus</i> spp.L.	Amaryllidaceae
<i>B. porri</i>	-	<i>Allium</i> spp. L.	Alliaceae
<i>B. ranunculi</i>	-	<i>Ranunculus</i> spp. L.	Ranunculaceae
<i>B. sphaerosperma</i>	-	<i>Allium triquetrum</i>	Alliaceae
<i>B. squamosa</i>	Flétrissement des feuilles d'ognon	<i>Allium cepa</i>	Alliaceae
<i>B. tulipae</i>	Feu de la tulipe	<i>Tulipa</i> sp. L.	Liliaceae

B : *Botrytis*, **Bt** : *Botryotinia*, - : Inconnue.

(Staats et al., 2005)

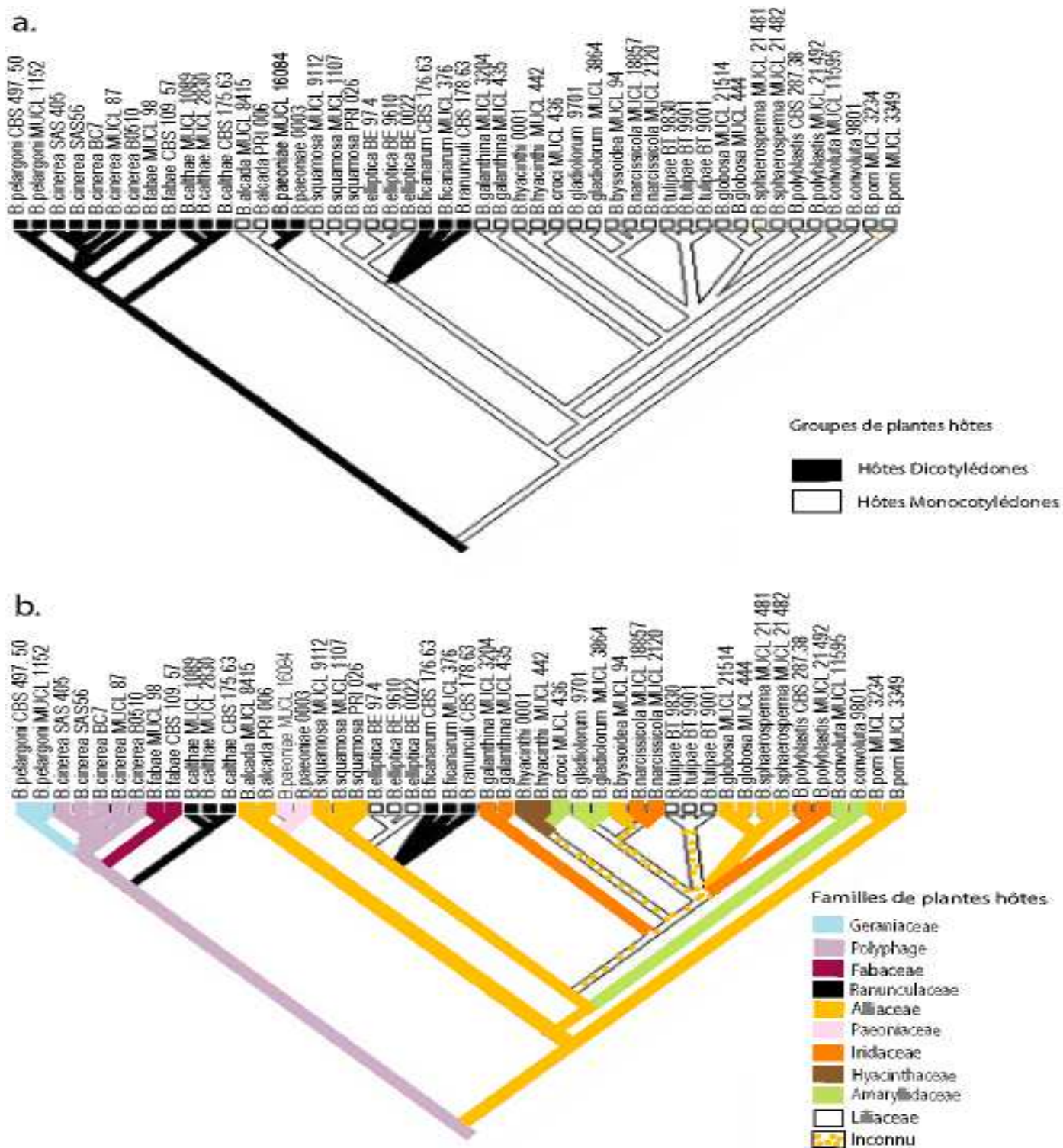


Figure 1. Dendrogramme phylogénétique du genre *Botrytis* basé sur le degré de similitude. **a** : En fonction des groupes de plantes hôtes, **b** : En fonction des familles de plantes hôtes (Staats *et al.*, 2005).

II.2. *BOTRYTIS CINEREA* : AGENT DE LA POURRITURE GRISE

Botrytis cinerea Persoon est l'agent responsable de la pourriture grise, c'est une espèce nécrotrophe et ubiquiste qui sévit sur plus de 235 plantes hôtes et cause des pertes sévères au champ, sous serre et après la récolte (Jarvis, 1977). Sa capacité à demeurer actif en dessous de 0°C en fait un pathogène redoutable en phase de stockage (Elad, 1988 ; Hammer *et al.*, 1990 ; Berrie, 1994).

II.2.1. Caractéristiques morphologiques de *Botrytis cinerea*

Les colonies de *Botrytis cinerea* arborent des nuances grisâtres (blanc, vert olive ou brun) (Figure 2a). Le mycélium est constitué d'hyphes cylindriques, cloisonnés transversalement, quelques fois vésiculeux au niveau des cloisons médianes. Ils sont hyalins, souvent bruns ou olivâtres chez les cultures âgées. Le diamètre des hyphes est variable selon les conditions de développement et peut aller de 10 à 24 µm (Roger, 1955).

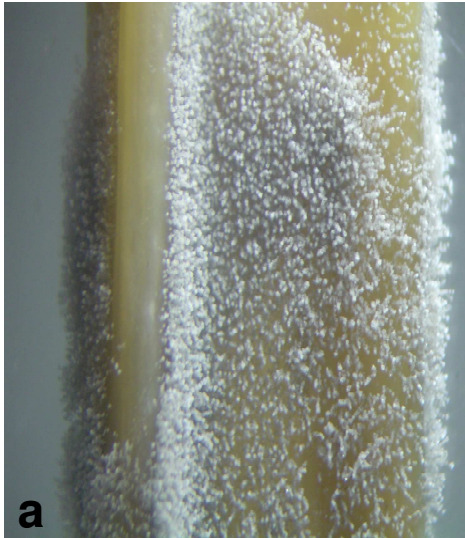
Le mycélium développe des conidiophores qui se dressent en touffes grisâtres. Les sommets des conidiophores sont ramifiés, ils émettent des prolongements latéraux terminés soit en pointe soit par une cellule protubérante en forme de massue ponctuée de stérigmates (denticules). Chaque stérigmate donne naissance à une seule macroconidie (Figure 2b).

Les macroconidies sont insérées en bouquets sur les stérigmates qui les portent et apparaissent comme des grappes de raisin (Roger, 1955; Viennot-Bourgin, 1967; Barnett et Hunter, 1972; Barron, 1977; Galet, 1977; Jarvis, 1977; Semal, 1989). Les macroconidies de *Botrytis cinerea* sont unicellulaires et multinucléées, on compte de 3 à 6 noyaux par macroconidie (Shirane *et al.*, 1989). De forme ovoïde ou sphérique, hyalines ou légèrement colorées, leur paroi est mince, lisse et hydrophobe (Epton et Richmond, 1980) et mesurent environ 10 x 8,5 µm (Agrios, 1988 ; Pezet et Pont, 1990).

Botrytis cinerea produit des microconidies (Brierley, 1918) auxquelles on attribue une fonction de conservation. Fukumori *et al.* (2004) avancent que les microconidies jouent le rôle de spermaties (gamètes mâles) lors de croisements sexués chez *Botrytis cinerea*. Leur taille varie entre 2,5 et 3 µm (Willetts, 1969).

Les sclérotes de *Botrytis cinerea* sont arrondis ou ovalaires et mesurent 2-4 x 1-3 mm environ (Willetts, 1969). A leur formation, ils sont blancs et noircissent par la suite (Figure 2c). Leur surface est luisante, granulée et marquée de fines ponctuations régulières. Lorsque les conditions environnementales sont favorables, leur fertilisation avec des microconidies (spermaties) donne naissance à des apothécies correspondant à la forme sexuée *Botryotinia fuckeliana* (Urbasch, 1985).

Les apothécies de *Botrytis cinerea* ont rarement été observées en conditions naturelles (Lorbeer, 1980). Leur obtention au laboratoire est toutefois possible (Faretra et Antonacci, 1987; Faretra *et al.*, 1988). Les apothécies sont brunâtres, pédicellées et se développent en cupules largement étalées en forme de trompette et portent des asques cylindriques mêlés à des paraphyses filiformes renflés à leur sommet (Figure 2d). Les ascospores contenues dans les asques sont oblongues à ovoïdes, au nombre de 8 et mesurent 6,9 x 5,6 µm selon de Bary (Gregory, 1949).



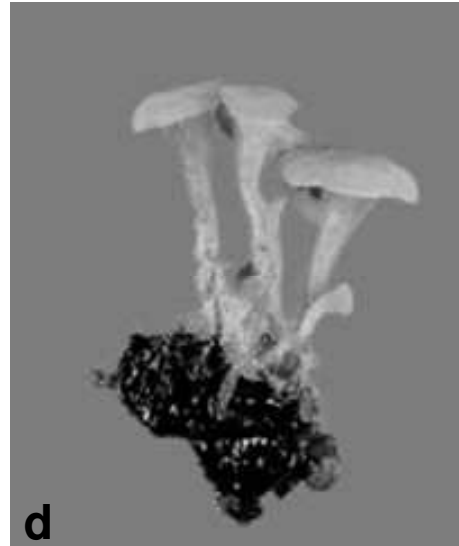
a
Laboratoire de phytopathologie, INA



b
www.tristaterestores.com/Commonmold.html



c
<http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYP3/pathogene/3botci8.htm>



d
Beever et Weeds, 2004

Figure 2. Caractéristiques morphologiques de *Botrytis cinerea*. **a:** Mycélium de *Botrytis* sur une feuille infectée d'oignon, **b:** Conidiophores et conidies de *Botrytis cinerea*, **c:** Sclérotés de *Botrytis cinerea* sur des rameaux de vigne, **d:** Apothésies de *Botryotinia fuckeliana* obtenues en conditions de laboratoires

II.2.2. Taxonomie de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers. correspond à la forme asexuée (anamorphe) de *Botryotinia fuckeliana* de Bary (Whetz). L'espèce *Botryotinia fuckeliana* a rarement été observée dans la nature. Pour cette raison, le nom de l'anamorphe a été retenu pour désigner le champignon (XI^{ème} Symposium International sur *Botrytis*, 1996). La classification établie par Agrios (1997) a permis de classer les deux formes du champignon (Tableau 3).

Tableau 3. Classification de *Botrytis cinerea* Pers. et de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. Selon Agrios (1997).

	Forme sexuée (téleomorphe)
Reigne	Eumycota
Embranchement	Ascomycota
Sous phylum	Pezizo mycotina
Classe	Léotiomycètes
Ordre	Hélotiales
Famille	Sclerotiniaceae
Genre	Botryotinia
Espèce	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

II.2.3. Variabilité génétique chez *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea se démarque des autres espèces du genre par sa polyphagie. De plus, ses populations exhibent une variabilité génétique et phénotypique peu commune (Elead *et al.*, 2004). L'exposition des populations de *Botrytis cinerea* aux xénobiotiques a induit l'apparition de résistances aux fongicides de plus en plus récurrentes, rendant difficile la lutte contre ce champignon. L'adaptabilité de *Botrytis cinerea* est due à plusieurs phénomènes :

II.2.3.1. L'hétérocaryose

L'hétérocaryose est un générateur de variabilité chez *Botrytis cinerea* (Hansen, 1938 ; Jarvis, 1977 ; Lorbeer, 1980). Les macroconidies ainsi que les compartiments des hyphes du champignon sont multinucléées, les noyaux sont génétiquement différents et des hétérocaryons (morphotypes) distincts peuvent être obtenus à partir d'un même parent (Lorbeer, 1980). L'hétérocaryose peut avoir pour origine une mutation au niveau d'un noyau résidant, comme elle peut être le résultat d'une fusion somatique (anastomose) suivi d'une cohabitation *in situ* de deux noyaux génétiquement distincts.

II.2.3.2. Les variations du taux de ploïdie

Sur la base de la microscopie fluorescente de l'ADN nucléaire, différents degrés de ploïdie ont été déterminés chez *Botrytis cinerea* ; les isolats peuvent être haploïdes, diploïdes ou encore triploïdes (Büttner *et al.*, 1994). L'hétéroploïdie chez le champignon peut être due à un dysfonctionnement mitotique ou à une fusion de noyaux avec une perte ou un gain chromosomique. Les processus par lesquels l'hétéroploïdie risque d'affecter la

croissance mycélienne, la production conidienne, l'activité enzymatique ou la pathogénicité de *Botrytis cinerea* restent néanmoins inconnus.

II.2.3.3. La reproduction sexuée

Les études des populations et des groupes végétatifs compatibles (VCG) ont démontré le rôle que pouvait jouer la reproduction sexuée pour générer une variabilité génétique au sein des populations. Entre autres, l'hétérothallisme est courant chez les populations de *Botrytis cinerea* (Giraud *et al.*, 1997 ; Corell et Gordon, 1999 ; Glass *et al.*, 2000). Cela dit, les conditions environnementales inhibent fortement la formation d'apothécies qui se développent uniquement dans des sols humides et froids situés dans des zones ombragés et faiblement éclairés (Lorbeer, 1980).

II.2.3.4. Les éléments transposables

Le taux de mutations est élevé chez des populations fongiques possédant des éléments transposables actifs (Daboussi, 1996). Deux éléments transposables *Boty* et *Flipper* ont été identifiés chez les souches de *Botrytis cinerea* (Diolez *et al.*, 1995 ; Levis *et al.*, 1997). Giraud *et al.* (1997) ont étudié la diversité génétique d'une population de *Botrytis cinerea* sur des vignobles en France sur la base de la présence ou de l'absence d'éléments transposables. L'étude a révélé l'extrême diversité de *Botrytis cinerea* et l'implication des recombinaisons dans cette dernière. De plus, il a été établi que *Botrytis cinerea* n'est en fait que l'association de deux sous espèces jumelles, génétiquement distinctes qui évoluent en sympatrie sur les mêmes hôtes et dans la même région (Giraud *et al.*, 1997). La sous espèce *transposa* possède les deux transposons *Boty* et *Flipper*, alors que la sous espèce *vacuma* ne contient aucun des deux. La sous espèce *transposa* semble plus disposée physiologiquement à développer des résistance aux fongicides que *vacuma* (Martinez *et al.*, 2005).

II.2.4. Pathologie et parcours infectieux de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est un champignon ubiquiste, il mène une vie entre saprophytisme et parasitisme. Les symptômes sont variables selon l'organe et l'hôte et peuvent être quiescents dans certains cas. Son développement est tributaire des conditions microclimatiques et des pratiques culturales.

II.2.4.1. Symptomatologie

Les symptômes sont variables, ce sont des décolorations, des taches localisées ou étendues, des pourritures molles gorgées d'eau à l'aspect opaque ou translucide. Les tissus infectés sont recouverts d'un duvet grisâtre supportant des spores volatiles. Selon l'organe et l'hôte, le pathogène induit des lésions et des taches foliaires variées, des fontes de semis, des pourritures des tiges et des bourgeons, des pourritures de bulbes et de racines, des dépérissements sur fleurs et des pourritures de fruits.

Chez certaines cultures, l'infection peut se manifester sur les feuilles. De petites taches jaunâtres à sombres apparaissent. Plus tard, elles blanchissent et s'étendent pour devenir coalescentes jusqu'à couvrir la totalité de la feuille. Le champignon commence par infecter les feuilles âgées situées à la base du plant (Figure 3a).

Botrytis cinerea cause également des fontes de semis et il n'est pas rare que des plantules infectées s'affaissent et flétrissent soudainement avant ou après la levée. Le phénomène est fréquent chez les cultures maraîchères (Hausbeck et Moorman, 1996) et les plantes ornementales en pépinière où l'humidité est élevée ou en plein champ lorsque le sol est contaminé par du mycélium ou des sclérotés (Figure 3b).

Les tiges et les bourgeons sont attaqués à travers les blessures et les plaies d'effeuillage (Aleid et Wubben, 2004). L'infection peut également provenir des feuilles atteintes. Les lésions sur tiges sont sombres et enfoncées aux contours apparents. Dans des conditions pluvieuses et humides, les tissus infectés sont recouverts d'une pourriture grisâtre typique et des sclérotés peuvent s'y former (Braun et Sutton, 1987) (Figure 3c).

Les racines et les bulbes sont également touchés suite à une attaque de *Botrytis cinerea*. Les lésions molles, brunes ou marron-roux se localisent sur le collet ou aux extrémités racinaires. Les tissus malades peuvent sécher et former un mycélium grisâtre sur lequel des sclérotés se développent (Figure 3d).

Les brûlures des fleurs précèdent souvent les pourritures sur les fruits et les tiges. Les Inflorescences âgées de fève, de haricot, de carotte, d'aubergine, d'oignon de poivron, de tomate et de rosier sont particulièrement sensibles aux attaques de *Botrytis cinerea* (Figure 3e). Le champignon se développe à partir des pétales de fleurs fanées et envahit le reste de l'inflorescence qui constitue une des portes d'entrée au fruit. Les fruits atteints avortent ou développent des lésions molles, aquifères ou spongieuses de couleur variable et à contour irrégulier. les fruits pourrissent sous l'effet d'un mycélium dense et sporifère. Les symptômes peuvent être latents comme sur les jeunes feuilles de vigne et de fraisier (Holz *et al.*, 2003) (Figure 3f).

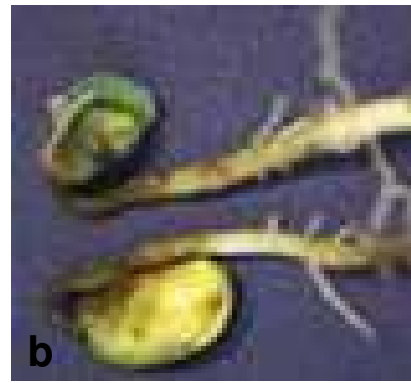
II.2.4.2. Epidémiologie

Le cycle de la maladie causée par *Botrytis cinerea* s'accomplit en plusieurs étapes. Sa capacité à infecter plusieurs plantes hôtes laisse supposer que certaines étapes n'apparaissent pas systématiquement à chaque infection et sur chaque hôte.

Le cycle classique de la maladie de la pourriture grise débute au printemps. Les sclérotés et le mycélium conservés dans le sol et sur les débris en décomposition germent et sporulent en abondance pour former l'inoculum primaire. Les conidies sont transportées sur des distances variables par le vent, les courants d'air humides, l'eau, les outils de taille ou les vêtements des ouvriers (Jarvis, 1977). Elles germeront préférentiellement sur les tissus endommagés ou affaiblis qui seront envahis en premier (McFarlane, 1968 ; Mansfield, 1980). L'infection est ensuite transmise aux tissus sains par pénétration directe si les conditions environnementales et l'état général de la plante hôte sont propices. Une fois installé, le champignon progresse dans le végétal et envahit peu à peu les différents organes, produisant en surface de nouvelles fructifications correspondant à l'inoculum secondaire. Ce dernier assurera la transmission du champignon vers des plants sains.



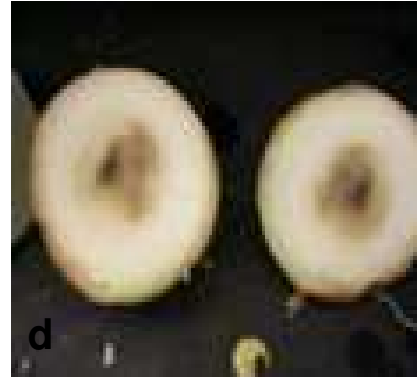
a
Laboratoire de Phytopathologie de l'ENSA
El Harrach



b
www.agric.wa.gov.au/PC92103.html?s=1001



c
www.omafra.gov.on.ca/.../gray-mold.html



d
www.gov.mb.ca/.../2008/Summary/index.fr.html



e
Laboratoire de Phytopathologie de l'ENSA
El Harrach



f
www.unige.ch/.../Perret/these_boddy.html

Figure 3. Symptômes de *Botrytis cinerea* sur différentes plantes sensibles. **a** : Taches chocolat sur feuilles de fève, **b** : Fonte de semis sur plantules de fève, **c** : Chancres sur tige de tomate, **d** : Pourriture molle sur bulbe d'oignon, **e** : Brûlures sur pétales de rose, **f** : Pourriture grise sur grappe de raisin.

II.2.4.2.1. Sources de l'inoculum primaire

L'inoculum primaire constitué de conidies de sclérotés et de mycélium, garanti au champignon d'accomplir son cycle infectieux. Une large gamme d'hôtes assure à *Botrytis cinerea* de perdurer en plein champ sur des hôtes alternatifs servant de source permanente d'inoculum primaire (Sutton *et al.*, 1991).

Par ailleurs, la semence peut être un vecteur important de *Botrytis cinerea* sur un nombre importants de cultures comme c'est le cas pour les jeunes plantules de pois chiches qui pourrissent suite à la prolifération du champignon à partir de la semence contaminée (Burgess *et al.*, 1997).

II.2.4.2.2. Effet des conditions environnementales sur le développement de la maladie

Lorsque les conditions environnementales s'y prêtent, La pourriture grise se développe rapidement à travers le temps et l'espace sur plus de 200 espèces. L'humidité relative (RH) et la température sont des facteurs importants qui conditionnent l'installation et l'expansion de la maladie (Shtienberg et Elad, 1997).

Pour sa germination, le champignon a besoin d'humidité relative élevée (70%-97%) et de températures clémentes et douces (15°C à 25°C). La température optimale étant de 20°C. Les extrêmes se situent à 2°C et à 30°C (Elad et Yunis, 1993 ; Yunis *et al.*, 1994). Un temps nuageux, saturé et légèrement venteux favorise l'infection, la croissance, la sporulation et la dissémination du pathogène. Les brouillards matinaux épais sont synonymes d'une forte hygrométrie et assurent au champignon un développement important. De même, la succession de journées pluvieuses favorise également les attaques. *Botrytis cinerea* peut être actif et induire l'infection à des températures basses allant de 0 à 10°C, ce qui le rend redoutable sur les produits stockés. Lorsque l'infection est induite, le champignon peut se développer à des températures comprises entre 0°C et 35°C.

La lumière a également un effet sur les processus de germination et d'infection du champignon (Epton et Richmond, 1980). L'exposition des conidies de *Botrytis cinerea* à la lumière directe en milieu de journée limite leur survie à seulement quelques minutes (Rotem et Aust, 1991). Du point de vue qualitatif, le spectre lumineux auquel sont exposés l'hôte et le pathogène influence également le processus infectieux (Islam *et al.*, 1998).

II.2.4.3. Processus infectieux et mécanismes d'attaque

Les espèces de *Botrytis* sont nécrotrophes. Elles doivent provoquer la mort cellulaire des cellules hôtes durant le processus infectieux (van Kan, 2006). *Botrytis cinerea* dispose d'une série de mécanismes et de médiateurs chimiques qu'il déploie habilement pour assurer sa survie sur plus de 200 plantes (Staples et Mayer, 1995).

II.2.4.3.1. Germination et pénétration des tissus de l'hôte

Le cycle de la maladie est entamé dès lors que la conidie atterrit à la surface de la plante. Lorsque la plante hôte est réceptive, l'interaction est dite « compatible ». L'invasion des tissus de l'hôte est réalisée de manière passive à travers les ouvertures naturelles (le stomate le plus proche), les blessures et les microlésions ou par une pénétration active des surfaces épidermiques saines (van Kan, 2006).

Les données cytologiques (Tenberge, 2004), génétiques et moléculaires (Gourgues *et al.*, 2004) indiquent que la germination des conidies de *Botrytis cinerea* est suivie de la formation d'appressoria qui contribuent à rompre la paroi cuticulaire par action mécanique (Tenberge, 2004 ; Gourgues *et al.*, 2004).

Durant la pénétration, *Botrytis cinerea* combine l'action mécanique des appressoria à un arsenal enzymatique intriqué, essentiellement des cutinases et des lipases qui contribuent activement à la dissolution de la couche cireuse et la perforation de la cuticule (Ten Have, 2000 ; Doss *et al.*, 2003). *Botrytis cinerea* produit également des enzymes de dégradation des parois cellulaires (CWDE) (Mansfield et Richardson, 1981) pour permettre la progression vers les cellules sous jacentes des tissus.

II.2.4.3.2. Mort cellulaire et invasion des tissus hôtes

Botrytis cinerea tue activement les cellules hôtes avant d'entamer sa multiplication en induisant la mort cellulaire programmée (Govrin et Levine, 2000). C'est au cours de cette phase que se forment les premières nécroses, c'est aussi le moment où les réponses défensives de la plante deviennent perceptibles (Brett et Waldron, 1996 ; Lyon *et al.*, 2004).

Au cours de l'invasion, *Botrytis cinerea* produit des métabolites phytotoxiques à faible poids moléculaire dont le botrydial et le botcinolide (Colmenares *et al.*, 2002 ; Culter *et al.*, 1993). Par ailleurs, le pathogène produit l'acide oxalique (OA) qui optimise la production et l'activité d'enzymes fongiques en milieu acide (Manteau *et al.*, 2003). La virulence du champignon est renforcée par son aptitude à générer un burst oxydatif autour des sites infectés.

II.2.5. Détection et quantification de *Botrytis cinerea*

La détection et la quantification de *Botrytis cinerea* sur les plants et les semences se sont appuyées sur des méthodes classiques d'isolement et d'identification. Elles sont faciles à mettre en place et nécessitent peu de moyens, cependant le manque de fiabilité et de rapidité se sont révélés être des limites indiscutables. Des méthodes d'immunologie et de biologie moléculaire ont été mises au point pour améliorer à la fois la spécificité et la sensibilité de la détection.

II.2.5.1. Méthodes immunologiques

La mise au point de méthodes immunologiques pour la détection des *Botrytis cinerea* a connu une progression lente et fastidieuse en raison de la présence d'autres champignons sur le matériel examiné, auquel s'ajoute la difficulté à obtenir des antisera spécifiques (Dewey, 1996). L'avènement de la technologie des hybridomes a rendu possible la production et la sélection d'anticorps monoclonaux qui se rapprochent ou sont spécifiques au genre *Botrytis* (Bossi et Dewey, 1992 ; Mayer et Dewey, 2000). Il existe des essais immunologiques tels que PTA-ELISA qui permettent de déterminer la concentration d'antigènes de *Botrytis cinerea* dans du jus de raisin infecté (Ricker *et al.*, 1991). L'anticorps monoclonal BC-12.CA4 spécifique a rendu possible la détection et la quantification de *Botrytis cinerea* sur les raisins (Dewey *et al.*, 2000), les rameaux de poirier stockés (Mayer *et al.*, 2000) et les fruits de tomate (Lurie *et al.*, 2003). L'anticorps en question a également permis la détection de l'infection latente sur feuilles d'oignon due à *Botrytis aclada* (Yohalem *et al.*, 2004). Il a été à l'origine de

l'élaboration d'un tube à essai pour un test ultrarapide de quantification des antigènes de *Botrytis cinerea* sur site à partir des jus de raisin lors de la récolte ou à partir des vins stockés en caves (Dewey et Mayer, 2004). Il existe également des techniques d'immunofluorescence qui permettent l'immunolocalisation et le suivi du parcours des conidies de *Botrytis cinerea* et de *Botrytis fabae* sur les feuilles de fève (Cole *et al.*, 1998).

II.2.5.2. Méthodes moléculaires

De nombreux protocoles de biologie moléculaire ont été mis au point pour le diagnostic de *Botrytis cinerea* (Nielson *et al.*, 2002). Mathur et Utkhede (2002) ont conçu une paire d'amorce en étudiant les régions ITS de l'ADNr, alors que Rigotti *et al.* (2002) ont ciblé des séquences de fragments amplifiés de manière aléatoire pour produire des amorces spécifiques à une région commune aux souches de *Botrytis cinerea*. Récemment, Rigotti *et al.* (2006) ont désigné deux nouvelles amorces hautement spécifiques pour la détection de 39 souches de *Botrytis cinerea*. Kerssies *et al.* (1997) ont utilisé des marqueurs RAPD avec l'amorce D6 pour produire une bande de 45-kb hautement spécifique.

II.2.6. Moyen de lutte contre *Botrytis cinerea*

Les maladies que cause *Botrytis cinerea* induisent des pertes économiques considérables à travers le monde. Durant de longues années, le contrôle de la pourriture grise s'est principalement axé sur l'utilisation de fongicides synthétiques, alors qu'au même moment *Botrytis cinerea* affichait une aptitude surprenante à développer très rapidement une tolérance voire une résistance aux fongicides. Actuellement, des efforts considérables sont fournis pour limiter l'installation et l'extension de la maladie par le recours à des stratégies de contrôle basées sur des approches diverses, utilisées seules ou en association.

II.2.6.1. Pratiques culturales

Selon la culture et le mode de conduite, des approches préventives sont préconisées et visent essentiellement à réduire les risques de contaminations et de propagation de la maladie et à mettre en place des systèmes culturaux moins vulnérables aux attaques du champignon.

Le choix de la parcelle est important dans la mesure où il faut privilégier des sols aérés et bien drainés, tout en évitant les irrigations excessives qui favorisent le développement de la végétation alentour. Un sol désinfecté par solarisation est idéal pour prévenir les maladies et les adventices.

Lors de la plantation, il est conseillé d'espacer les semis pour garantir une bonne aération (Bakr *et al.*, 1993 ; Pande *et al.*, 2002) et une luminosité homogène. Le paillage est conseillé pour les cultures maraîchères. Une nutrition azotée excessive risque d'augmenter la sensibilité des cultures vis-à-vis de *Botrytis cinerea*.

Un désherbage régulier élimine les adventices qui constituent des hôtes alternatifs pour *Botrytis cinerea*. Il faut néanmoins veiller à éliminer les débris végétaux qui en résultent ainsi que les repousses qui pourraient être des sources d'inoculum primaire.

Pour la pourriture grise des grappes de vigne, le mode de conduite du vignoble et les techniques de taille agissent fortement sur l'intensité de la maladie (Steel, 2001). En Italie, le système « Pergola » augmente le risque d'incidence de *Botrytis cinerea* contrairement au système « Guyot » (Cargnello *et al.*, 1991). L'architecture compacte des grappes de certains cépages les expose à des attaques sévères de *Botrytis cinerea*. Une taille adaptée pour éclaircir et alléger les grappes réduirait les risques d'attaque (Fermaud *et al.*, 2001), il en est de même pour l'effeuillage autour des zones fructifères de la vigne. La récolte précoce est une pratique culturelle répandue en viticulture, les grappes sont récoltées entre 23 et 25°C pour limiter les pertes dues à *Botrytis*.

Pour les légumineuses et particulièrement pour la fève, il est recommandé d'éviter les semis précoces afin d'échapper aux gelées printanières qui prédisposent fortement les cultures aux attaques de *Botrytis cinerea* et de *Botrytis fabae* (Jellis *et al.*, 1998).

En cultures abritées, la réduction de l'impact de la pourriture grise se fait par la modulation du régime chauffage/ventilation (Dik et Wubben, 2004). Les systèmes de contrôle de l'humidité sont tout aussi efficaces (Salinas *et al.*, 1989). L'utilisation de films polyéthylène absorbants les rayons nUV réduirait la sporulation et l'infection dues à *Botrytis cinerea* de 35 à 75% sur tomate (Elad, 1997). Il est également conseillé d'éliminer tout plant, fruit ou débris infecté à l'intérieur et à l'extérieur des serres (Yunis et Elad, 1989). L'effeuillage des plants de tomate sous serre diminue la densité foliaire, néanmoins, l'utilisation du sécateur réduit la taille des blessures qui cicatrisent plus vite que celles provoquées par un effeuillage manuel (Verhoeff, 1968).

II.2.6.2. Lutte chimique

La lutte chimique a longtemps été considérée comme la solution ultime pour atténuer l'incidence des maladies causées par *Botrytis*. Le marché mondial des produits anti-*Botrytis* a été estimé à plus de 25 millions d'US\$ durant les 15 dernières années (Elad *et al.*, 2004).

En général, les fongicides agissent directement sur le champignon en affectant divers aspects de son développement. Les Dithiocarbamates sont des fongicides à activité fongistatique multi sites affectant principalement les processus respiratoires ainsi que la germination. C'est le cas du thirame (dialkyldithiocarbamate), du mancozèbe et du manèbe (alkylènebisdithiocarbamate) qui sont appliqués sur plusieurs cultures pour prévenir l'infection de *Botrytis cinerea*. Leur action multi sites diminue largement la résistance du champignon à leur égard (Corbett *et al.*, 1984 ; Leroux et Moncomble, 1993).

Les Benzimidazoles comme le carbendazime, le bénomyl et le méthyl-thiophanate sont des fongicides systémiques à large spectre d'action (Delp, 1995) à activité antimétabolites (Buchenauer, 1988 ; Leroux et Moncomble, 1993). Cependant, de nombreux cas de résistance aux Benzimidazoles à travers le monde ont été rapportés. L'hétérocaryose est supposée être à l'origine de la résistance chez *Botrytis cinerea* (Leroux, 1984).

Les Dicarboximides sont des imides cycliques (l'iprodione et vinchlozoline) qui ont supplanté les Benzimidazoles dans la lutte contre la pourriture grise à la fin des années 70 (Hmouni *et al.*, 2003). Ils inhibent à la fois la germination des spores et l'élongation des hyphes (Buchenauer, 1988). Les Dicarboximides interfèrent également avec les protéines de la membrane cytoplasmique ou inhibent des enzymes fongiques spécifiques, les

formes oxygénées actives qui en résultent induisent la peroxydation des lipides, la destruction des membranes fongiques ainsi que d'autres effets toxiques non spécifiques (Buchenauer, 1988). Selon Faretra et Pollastro (1991), la résistance au Dicarboximides est portée par un seul gène polymorphe nommé *Daf1*. Leur emploi de manière alternée est conseillé par le guide FRAC qui recommande des traitements limités à 2 ou 3 applications par saison et par culture.

Les Hydroxyanilides sont des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols. Le fenhexamide exhibe une forte toxicité vis-à-vis de *Botrytis cinerea* (Rosslénbroich et Stuebler, 2000), Il induit l'accumulation de composés toxiques vis-à-vis du champignon. Il est appliqué de manière préventive et agit par contact. Il inhibe la croissance du tube germinatif en détruisant les parties apicales des filaments mycéliens présents à la surface des organes colonisés (Leroux *et al.*, 1999).

Le recours massif et répété à certains fongicides ainsi que l'aptitude surprenante de *Botrytis cinerea* à s'adapter aux différents groupes de xénobiotiques sont autant d'inconvénients non négligeables. La résistance du champignon aux anilopyrimidines, aux Benzimidazoles et aux Dicarboximide devient de plus en plus récurrente (Rosslénbroich et Stuebler, 2000 ; Leroux *et al.*, 2002a,b). Face à ce phénomène, des stratégies anti-résistance sont envisagées par l'utilisation de matières actives plus variées et moins agressives. Il est notamment conseillé d'alterner les différents types de matières actives avec un maximum d'une application annuelle par famille.

II.2.6.3. Résistance variétale

Chez la vigne, le cultivar affecte largement le développement de la pourriture grise. Les caractéristiques morphologiques, anatomiques, biochimiques et physiologiques des cultivars déterminent leurs aptitudes à tolérer les attaques du champignon. 12 cultivars de vigne qui disposent d'un taux élevé de cuticule et de cire ont été identifiés pour leur résistance à *Botrytis cinerea* (Mlikota Gabler *et al.*, 2003). Le resveratrol et ses dérivés sont des inducteurs de défense chez la vigne et une corrélation positive a été observée entre le taux de resveratrol et le degré de résistance des cultivars de vigne vis-à-vis de la pourriture grise (Langcake et McCarthy, 1979 ; Douillet-Breuille *et al.*, 1999).

Chez les légumineuses, quelques lignées de pois chiche modérément tolérantes aux *Botrytis cinerea* ont été identifiées (Bakr *et al.*, 2002 ; Pandé *et al.*, 2002). Des germoplasmes de lentilles résistants à la pourriture grise ont été détectés en Australie (Lindbeck *et al.*, 2003) au Canada (Morall, 1977), au Népal (Karki, 1993) et au Pakistan (Erskin *et al.*, 1994). Des croisements entre les variétés canadiennes et Indiennes ont montré un degré de résistance plus élevé que celui des variétés commercialisées (Lindbeck *et al.*, 2003).

Concernant les cultures abritées, la résistance à la pourriture grise reste peu étudiée. Cependant, il existe des variétés de fraises et de géranium plus résistantes à *Botrytis cinerea* (Legard *et al.*, 2000 ; Xiao *et al.*, 2001). Pour la tomate, il n'existe pas de variétés résistantes, néanmoins, ces dernières restent compatibles avec des espèces sauvages porteuses de gènes de résistance (Rick et Chatelat, 1995).

II.2.6.4. Le biocontrôle

Le biocontrôle s'applique par l'utilisation d'agents de biocontrôle (BCA). Ils sont considérés comme des produits phytosanitaires dont le principe actif est un organisme vivant ou un de ses dérivés. Les BCA agissent contre le pathogène à travers la compétition, le parasitisme ou la diffusion de métabolites toxiques dans l'environnement du pathogène (Elmer et Riglinski, 2006).

Botrytis cinerea est extrêmement sensible à la compétition vu sa dépendance aux nutriments exogènes pour la germination et la croissance des tubes germinatifs infectieux. De plus, le champignon subit l'effet des antibiotiques et des enzymes lytiques secrétés par les microorganismes du phylloplan qui inhibent la germination et lysent les tubes germinatifs, entravant ainsi sa progression et son développement (Elad et Freeman, 2002).

Les espèces *Pseudomonas* spp. et *Bacillus brevis* interfèrent avec l'adhésion et la croissance du champignon sur le phylloplan (Bunster *et al.*, 1986 ; Edwards et Seddon, 1992). L'espèce *Bacillus brevis* secrète la *Gramicidine S*, un antibiotique puissant contre *Botrytis cinerea* (Edwards et Seddon, 1992).

De nombreuses espèces de levures rentrent en compétition pour les nutriments et l'espace avec *Botrytis cinerea* comme c'est le cas de *Candida* spp. (McLaughlin *et al.*, 1990), *Cryptococcus laurentii* (Roberts, 1990), *Sporobolomyces roseus* (Janisiewicz *et al.*, 1994) et *Candida oleophila* (Mercier et Wilson, 1994).

Les espèces fongiques *Trichoderma*, *Gliocladium* et *Pythium* spp. sont les mycoparasites les mieux étudiés (Elad, 1995). L'action antagoniste de *Trichoderma reesei* et *Trichoderma harzianum* est liée à leur capacité à produire plusieurs enzymes de dégradation des parois cellulaires telles que les protéinases, les mannases, les laminarinases et les chitinases (Labudova et Gogorova, 1988). L'espèce *Trichoderma hamatum* est également connue pour réduire l'intensité de la pourriture grise de 77 à 97% sur les tiges de haricot (Nelson et Powelson, 1988). La souche T39 de *Trichoderma harzianum* se distingue par sa capacité à atténuer le pouvoir pathogène de *Botrytis cinerea* en interférant avec le processus infectieux de ce dernier.

Les produits commerciaux à base de BCA occupent une part infime du marché des pesticides. Les produits enregistrés et homologués sont le Binab à base de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma polysporum*, destiné aux sols infectés des cultures sous serre (tomate, concombre, plantes ornementales), le Mycostop contenant la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* et prévient les fontes de semis et les pourritures de tiges sur tomate, concombre, laitue et poivron (White *et al.*, 1990), le Botry-Zen à base d'*Ulocladium atrum* conseillé pour lutter contre la pourriture des grappes de vigne et l'Aspire contenant la levure *Candida oleophila*, utilisé contre les attaques de *Botrytis* en post-récolte (Droby *et al.*, 1991).

MATERIEL ET METHODES

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel biologique

III.1.1. Matériel fongique

L'étude a été menée sur une collection de 20 isolats de *Botrytis* spp. Deux séries de prospections ont été réalisées dans cinq wilayates (Alger, Blida, Tipaza, Boumerdes et Tizi Ouzou). La première série a concerné les cultures maraîchères et les légumineuses durant le mois de Mars 2008. La seconde a principalement ciblé le prélèvement d'échantillons sur des vignobles durant les mois de Juin et de Juillet de la même année. Le nombre et l'origine des isolats étudiés sont reportés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Isolats de *Botrytis* spp. sélectionnés pour l'étude.

N°	Isolats	Plantes hôtes	Origines	Périodes d'isolement
01	BVA01	Vigne	Alger/Ouled Fayet	Juin/Juillet 2008
02	BVA02	Vigne	Alger/Rouiba	Juin/Juillet 2008
03	BVB01	Vigne	Blida/Mouzaia	Juin/Juillet 2008
04	BVB02	Vigne	Blida/Chiffa	Juin/Juillet 2008
05	BVT01	Vigne	Tipaza/Koléa	Juin/Juillet 2008
06	BVZ01	Vigne	Tizi Ouzou/Si Mustache	Juin/Juillet 2008
07	BVZ02	Vigne	Tizi Ouzou/ Si Mustache	Juin/Juillet 2008
08	BVZ03	Vigne	Tizi Ouzou/ Si Mustache	Juin/Juillet 2008
09	BFZ01	Fève	Tizi Ouzou/Draa Mizone	Février/Avril 2008
10	BFB01	Fève	Blida/Mouzaia	Février/Avril 2008
11	BFT01	Fève	Tipaza/Chenoua	Février/Avril 2008
12	BFA01	Fève	Alger/Rouiba	Février/Avril 2008
13	BFA02	Fève	Alger/Steouali	Février/Avril 2008
14	BFA03	Fève	Alger/Zéralda	Février/Avril 2008
15	BTA01	Tomate	Alger/Ouled Fayet	Février/Avril 2008
16	BTA02	Tomate	Alger/Steouali	Février/Avril 2008
17	BOA01	Oignon	Alger/Bouchaoui	Février/Avril 2008
18	BOA02	Oignon	Alger/Cheraga	Février/Avril 2008
19	BHB01	Haricot	Alger/Steouali	Février/Avril 2008
20	BHA01	Haricot	Blida/Hamr el Ain	Février/Avril 2008

III.1.1.1. Isolement

L'isolement se fait en repérant les conidiophores naissant à la surface des tissus infectés (cas des fruits). Les fragments mycéliens sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu PDA. Ils sont incubés dans une chambre de culture durant 24 à 48 heures à 20°C. Lorsque les lésions ne sont pas sporulantes (cas des feuilles de fève et de vigne), l'échantillon est stérilisé à l'hypochlorite de sodium à 2% durant 3 à 5 minutes, rincé dans 3 bains d'eau distillée stérile, puis mis en chambre humide durant 2 à 3 jours jusqu'à l'apparition de conidiophores qui seront prélevés par la suite et déposés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu PDA.

III.1.1.2. Purification et conservation

Des suspensions de spores de 10^2 à 10^3 /ml sont préparées à partir de cultures âgées de 7 à 10 jours. Un volume équivalent à 0,5 ml est prélevé de chaque suspension et étalé sur des boîtes de Pétri contenant une fine couche d'eau gélosée à 2%. Après 24 à 48 heures d'incubation à 22°C, les spores en germination sont localisées sous la loupe binoculaire et prélevées individuellement pour être repiquées sur milieu PDA. Les colonies pures issues de la germination d'une spore unique sont mises à incuber à 22°C, elles sont ensuite conservées dans des tubes à cultures en verre AR-GLASS^R avec capuchon à vis à 4°C.

III.2. Caractérisation morphologique et culturelle des isolats de *Botrytis* spp.

III.2.1. Caractères cultureux

III.2.1.1. Aspect général des colonies

Les isolats sont cultivés sur un milieu PDA à 20°C durant 10 à 12 jours. La forme et la couleur des colonies ainsi que l'aspect général du mycélium sont notés sur la base d'observations visuelles. Des groupes sont formés en fonction des caractères macroscopiques observés (Couleur du mycélium et aspect général de la colonie).

III.2.1.2. Etude de la croissance mycélienne

La vitesse moyenne de la croissance mycélienne de chaque isolat est estimée par le dépôt de disques mycéliens de 5mm de diamètre qu'on prélève à partir de jeunes colonies âgées de 7 jours.

Chaque disque est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu PDA à raison de cinq répétitions par isolat. Les boîtes sont mises à incuber à 20°C. La vitesse moyenne de la croissance mycélienne est estimée en mesurant quotidiennement le diamètre moyen de chaque colonie (deux diamètres perpendiculaires) durant 4 jours, selon la formule suivante :

$$V_m = \sum_{i=1}^n [(D_i - d_i)/2] \cdot 4$$

V_m : Vitesse moyenne de la croissance mycélienne, **D_i** : Diamètre de la colonie, **d** : diamètre de l'explant.

III.2.2. Caractérisation des spores

III.2.2.1. Etude de la taille des spores

Des colonies âgées de 10 jours et incubées à 22°C sur milieu PDA sont sélectionnées pour la mensuration de la taille des conidies. Pour chaque isolat, on prépare une suspension de spores avec de l'eau distillée stérile. La longueur et la largeur de 100 conidies par isolat sont mesurées à l'aide d'un microscope photonique étalonné et muni d'un micromètre avec un grossissement x40. Les moyennes des longueurs, des largeurs et des ratios sont par la suite calculées et les limites supérieures et inférieures déterminées.

L'analyse de variance de la taille des spores a été réalisée avec le logiciel STATITCF (Version 5, 1998). Elle permet d'établir des liens entre les isolats étudiés en les regroupant dans des groupes homogènes sur la base du test de Newman et Keuls à 5%.

III.2.2.2. Estimation de la concentration en spores

L'estimation de la concentration en spores par ml et par cm² est réalisée sur la totalité des isolats de la collection. Un explant d'1 cm² est prélevé et mis dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension est mise en agitation pendant 10 minutes environ pour permettre la libération d'un nombre maximal de spores. La concentration de la suspension est alors estimée à l'aide d'une cellule de Malassez à raison de 3 répétitions par isolat.

III.2.3. Caractérisation des sclérotés

III.2.3.1. Détermination du temps nécessaire à la formation des sclérotés

L'étude concerne l'ensemble des isolats qui composent la collection et vise à identifier les isolats qui produisent des sclérotés, ainsi que le temps (jours) nécessaire à la formation du premier sclérote à partir du premier jour d'ensemencement.

III.2.3.2. Etude de la taille des sclérotés

Les isolats qui produisent des sclérotés sont cultivés sur un milieu PDA à 18°C durant 30 jours. Pour chaque isolat, les sclérotés qu'il forme sont mesurés (longueur et largeur) sous une loupe binoculaire à l'aide d'un papier millimétré. Les tailles moyennes sont ensuite calculées et les intervalles de mesures déterminés.

III.2.3.3. Estimation de la densité des sclérotés

L'estimation de la densité des sclérotés est réalisée pour les isolats qui les produisent. Les couvercles des boîtes de Pétri sont fractionnés à l'aide d'un marqueur indélébiles en carreaux de 1 cm². Pour chaque isolat, le nombre de sclérotés à la surface de chaque carreau est comptabilisé à raison de 3 répétitions par isolat. Le résultat est exprimé en nombre de sclérotés/cm²/isolat.

III.3. Etude de la spécialisation parasitaire par la technique des feuilles détachées

III.3.1. Les isolats utilisés

La totalité des isolats de la collection a été utilisée pour l'étude de la spécialisation parasitaire et la variabilité du pouvoir pathogène (Tableau 4). Les isolats ont préalablement été repiqués dans des boîtes de Pétri sur milieu PDA et mis à incuber à une température de 20°C durant 12 jours.

III.3.2. Matériel végétal

Afin de mener l'étude de la spécialisation parasitaire et du pouvoir pathogène, nous avons opté pour la technique d'inoculation artificielle sur des feuilles détachées de fève, de haricot, de vigne, de tomate et d'oignon. Les semences de fève et de haricot proviennent de la station de l'ITGC de Oued Smar. Les plants de tomate et d'oignon ont été fournis par un agriculteur de la région de Staoueli et les feuilles de vigne ont été prélevées à la fin du mois de Mai 2009 à partir d'un vignoble situé à Ouled fayet au niveau de l'exploitation Baba Salem.

III.3.3. Préparation de l'inoculum

Les suspensions de spores ont été préparées à partir de colonies âgées entre 12 et 14 jours (Verdie et le Normand, 1984). Plusieurs explants de 2 cm de diamètre ont été prélevés et mis dans des erlenmeyers contenant de l'eau distillée stérile. Les flacons ont été ensuite déposés sur un agitateur durant quelques minutes afin de permettre une libération maximale des conidies dans la suspension. A l'aide d'une cellule de Malassez, la concentration en spores a été estimée et ajustée à 3×10^6 spores/ml pour chaque isolat (Bouhassan *et al.*, 2004).

III.3.4. Inoculation artificielle sur feuilles détachées

Les premières feuilles étalées sous l'apex ont été excisées à l'aide d'un sécateur sur des plants âgés de quatre semaines pris au hasard. Au laboratoire, les folioles ont été détachées, désinfectées, séchées et immédiatement placées dans des bacs en plexiglas (120cm x 60cm x 7cm) soigneusement désinfectés et tapissés d'un support synthétique en éponge de 1,5 cm d'épaisseur.

Pour chaque plante hôte, 5 feuilles par isolat sont inoculées. L'inoculation a été réalisée par le dépôt de 20 µl de chaque suspension conidienne sur la face supérieure de chaque feuille. L'opération est effectuée à l'aide d'une micropipette. 5 feuilles témoins ont été inoculées avec une goutte d'eau distillée stérile. Les bacs ont été ensuite recouverts par un film en polyéthylène afin de maintenir une atmosphère saturée en humidité (Hanounik, 1986 ; Bouhassan *et al.*, 2004). Les feuilles ont été mises à incuber durant 11 jours à une température comprise entre 18 et 20°C. Durant cette période, les feuilles ont été quotidiennement pulvérisées d'eau distillée stérile pour maintenir une humidité relative comprise entre 70 et 100%. Les 5 dispositifs expérimentaux sont représentés dans la Figure 6.



Figure 4. Dispositif expérimental de l'inoculation artificielle sur les feuilles détachées des 5 plantes hôtes.
a : Dispositif expérimental de l'oignon, **b** : Dispositif expérimental de la fève, **c** : Dispositif expérimental de la tomate,
d : Dispositif expérimental de la vigne, **e** : Dispositif expérimental du haricot.

III.3.5. Notations effectuées et analyse des résultats

III.3.5.1. Période d'incubation

A partir du 1^{er} jour d'inoculation, les feuilles ont été examinées durant les deux premiers jours d'incubation afin de déterminer le temps nécessaire à l'apparition des premiers symptômes correspondant à la période d'incubation exprimée en jours.

III.3.5.2. Période de latence

L'observation visuelle quotidienne des lésions a permis d'estimer la période de latence, définie comme étant le temps nécessaire à l'apparition des premiers conidiophores à la surface des tissus nécrosés (Parlevliet, 1979).

III.3.5.3. Nombre de spores

Au bout du 11^{ème} jour, les feuilles sont immergées une à une dans un Erlen Mayer contenant 100 ml d'eau distillée stérile. Les flacons contenant les feuilles sont mis en agitation pendant 15 minutes pour libérer les spores à la surface des feuilles. La concentration en spores de chaque suspension est estimée à l'aide d'une cellule de Malassez. La production moyenne de spores pour chaque isolat et pour chaque culture est ainsi exprimée en nombre de spores/feuille.

III.3.5.4. Diamètre des lésions

Deux jours après l'inoculation, nous avons mesuré quotidiennement le diamètre des lésions en millimètre durant 8 jours pour chaque plante hôte. Les mesures impliquent la moyenne de deux diamètres perpendiculaires par lésion et par feuille qui permettront par la suite de calculer la valeur de l'aire sous la courbe de la progression de la maladie (AUDPC).

III.3.5.5. Calcul de l'AUDPC

La progression de la maladie sur les feuilles détachées de chaque plante testée a été estimée pour une période de 8 jours. L'aire comprise entre la courbe de la progression de la maladie et l'axe du temps (AUDPC) a été ensuite calculée sur la base des diamètres journaliers des lésions.

L'AUDPC originellement définie par Shaner et Finney (1977) est utilisée pour résumer la progression du pathogène. L'AUDPC standardisée est calculée selon la formule suivante :

$$\text{AUDPC standardisée} = \sum_{i=1}^n [(x_i + x_{i-1})/2] (t_i - t_{i-1})$$

Avec : n = Nombre total d'observations, x_i = Diamètre des lésions à chaque observation, $(t_i - t_{i-1})$ = Temps séparant deux observations consécutives.

III.3.5.6. Analyse statistique des résultats

Pour chaque dispositif, l'inoculation est répétée 5 fois, les feuilles sont disposées dans les bacs de manière aléatoire. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel XLS *stat*. Les résultats expérimentaux ont été comparés par analyse de variance (ANOVA), suivie par le test de comparaisons multiples Fisher (LSD) par l'analyse des différences entre les groupes avec un intervalle de confiance de 95%.

III.4. Caractérisation génétique

III.4.1. Extraction et purification de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée selon la méthode décrite par Blaiseau *et al.* (1992) et est détaillée en Annexe 1. Le mycélium, obtenu à partir de boîtes de Pétri, est repris dans des microtubes avec du tampon d'extraction (SDS, EDTA). Les protéines sont éliminées par une précipitation à l'acétate de potassium. Plusieurs passages au phénol/chloroforme/alcool isoamérique sont nécessaires jusqu'à la suppression de l'interface blanche. Les ADN obtenus sont purifiés selon le protocole décrit en Annexe 2 et repris dans du tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). La composition des solutions utilisées lors de l'extraction et de la purification des ADN est décrite en Annexe 3.

III.4.3. Contrôle des ADN extraits et estimation des concentrations

La qualité de l'ADN est vérifiée sur mini-gel d'agarose à 0,8% et suivie d'une révélation sous lumière UV. Ceci est également valable pour le contrôle des fragments obtenus après amplification de l'ADN par PCR. Les concentrations d'ADN sont déterminées respectivement par le dépôt dans le gel des ADN de référence d'une concentration connue de 50 ng/μl, 100 ng/μl, 150 ng/μl, 200 ng/μl et d'un marqueur de poids moléculaire (1 Kb Ladder). Des comparaisons entre ces ADN et les bandes d'ADN de *Botrytis* spp. sont effectuées après chaque électrophorèse. Les résultats sont exprimés en ng/μl.

III.4.3.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique basée sur le déplacement de particules chargées en solution sous l'influence d'un champ électrique généré par un courant continu. Les molécules d'ADN à pH neutre sont chargées négativement et migrent vers l'anode (+) où leur vitesse de migration est inversement proportionnelle à leur taille. Par ailleurs, la mobilité électrophorétique des fragments d'ADN à taille égale dépend principalement de la porosité du milieu. La taille des pores d'un gel d'agarose varie selon sa concentration (0,5 à 2%). L'utilisation du gel d'agarose permet la détection de fragments dont la taille est comprise entre 0,5 et 50 kb. La concentration du gel d'agarose choisie est de 0,8%. Sa préparation ainsi que la composition des solutions utilisées sont décrites respectivement en Annexe 4 et 5.

III.4.3.2. Révélation et visualisation des ADN

La visualisation de l'ADN est possible grâce au Bromure d'ethidium (BET) dont la composition est décrite en Annexe 5. Il s'intercale dans l'ADN et émet une fluorescence orange lorsqu'il est excité sous une lumière UV. La longueur optimale est de 254 nm.

III.4.4. Amplification par PCR des fragments d'ADN

La PCR (Polymerase chain Reaction) rend possible l'amplification directe d'une séquence d'ADN comprise entre deux régions s'hybridant chacune avec une amorce spécifique (primer). Elle permet l'obtention *in vitro* d'un grand nombre de copies (plusieurs millions) à partir d'un fragment d'ADN spécifique.

La RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) consiste à réaliser une amplification PCR avec des amorces d'environ 10 pb définies de façon aléatoire. Les amplifications ont été réalisées avec 4 amorces (Eurofins MWG-operon) dont les séquences sont les suivantes :

OPF04 : 5'-GGTGATCAGG-3'

OPF08 : 5'-GGGATATCGG-3'

OPB06 : 5'-TGCTCTGCCC-3'

OPB01 : 5'-GGAGGGTGTT-3'

III.4.4.1. Préparation du milieu réactionnel

La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans des microtubes qui contiennent chacun 10 ng/ μ l d'ADN auxquels on ajoute le milieu réactionnel suivant : 10 mM de dNTP (concentration finale de chacun des 4 oligodéoxynucléotides : 200 μ M), 10 picomoles de chacune des amorces, 5 unités de Taq polymérase et 55 μ l de tampon de réaction 10X. 394 μ l d'eau distillée stérile sont ajoutés à chaque microtube.

Le milieu réactionnel a été préparé à l'aide d'un programme composé avec le logiciel Excel 2003 où apparaissent le volume final de la réaction, le nombre d'échantillons à tester, la quantité d'ADN utilisée ainsi que les concentrations initiales et finales de chaque composants du milieu réactionnel.

Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (appareil qui comporte une enceinte où l'on dépose les tubes échantillons et dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100°C par effet Peltier). L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois étapes+ de quelques dizaines de secondes.

III.4.4.2. Paramètres de l'amplification par PCR

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur programmable PTC100 (M.J.Research) en utilisant le programme cité par Muñoz *et al.* (2002) qui comporte les paramètres présentés dans le Tableau 6.

En fin de programme, une extension finale de 5 minutes à 72°C est ajoutée. Une fois l'amplification achevée, les échantillons sont soit déposés sur gel d'agarose pour la migration soit conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

Tableau 5. Paramètres du programme d'amplification polymérase en chaîne (PCR).

Étapes		Température de consigne	Durée programmée	Nombre de cycles
1	Dénaturation de l'ADN	94°C	60 secondes	3
2	Hybridation des amorces	37°C	60 secondes	
3	Elongation des ADN	72°C	80 secondes	
4	Amplification	94°C	40 secondes	35
		40°C	40 secondes	
		72°C	80 econdes	

Muñoz *et al.*, 2002

III.4.4.3. Electrophorèse et révélation des gels

Les résultats de l'amplification sont visualisés sur gel d'agarose à 1,2% dans le tampon TBE (Annexe 5). 12 µl de l'amplifiat sont déposés sur le gel. Un marqueur de poids moléculaire (1Kb Ladder) est déposé en parallèle des échantillons et à l'extrémité du gel, de manière à déterminer la taille des fragments amplifiés. Le gel est soumis à un courant continu de 80 volts durant 3 heures et 45 minutes. Par la suite, il est posé sur un transilluminateur émettant une lumière UV puis photographié.

III.4.4.4. Expression des résultats

La taille de chaque bande est estimée par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire (1Kb DNA Ladder). La présence ou l'absence de bandes dans le profil détermine une matrice qui a été traitée avec le logiciel NTSYSpc V2.01. Un indice de dissimilarité a été ensuite défini pour comparer les isolats 2 à 2. La construction d'un dendrogramme a été effectuée selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average) qui fait appel à l'indice de Nei et Li (Van der Vlugt-Bergman *et al.*, 1997).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV. Résultats et discussion

IV.1. ETUDE DE LA VARIABILITE MORPHOLOGIQUE ET CULTURALE

IV.1.1. CARACTERES CULTURAUX

IV.1.1.1. Aspect général des colonies

Les caractères macroscopiques de la collection d'isolats de *Botrytis* spp. ont été décrits sur la base d'observations visuelles de la couleur, de la forme des colonies et l'aspect général du mycélium (Tableau 6, Tableau 7).

Tableau 6. Aspect cultural des isolats de la collection de *Botrytis* spp.

Isolats	Aspect général du mycélium
BTA02	Compact
BFB01	Cotonneux
BVA02, BHA01	Aérien dense
BVZ02, BFZ01, BFT01, BVA01, BVT01	Aérien à contour circulaire dense
BVZ01, BFA01, BFA02, BFA03, BHB01,	Aérien à contour circulaire peu dense
BVB01, BVB02	Aérien peu dense
BVZ03	Aérien verruqueux
BOA01	Poudreux et ras

Tableau 7. Couleurs des colonies formées par les isolats de la collection de *Botrytis* spp.

Isolats	Couleur
BTA02	Blanchâtre
BFB01	Beige
BHB01, BVB02, BVT01, BVA01	Blanc grisâtre
BVZ02, BFT01, BVA02, BFA03, BFZ01, BVB01, BTA01	Gris cendré
BHA01, BOA02, BOA01, BFA01, BFA02, BVZ03, BVZ01	Marron verdâtre

90% des isolats ont présenté une progression régulière où la croissance du mycélium est radiale. Parfois la progression se fait en cercles concentriques (Figure 7). Le mycélium produit est compact, cotonneux, poudreux, verruqueux ou ras. 35% des isolats ont produit un mycélium aérien avec une concentration plus ou moins forte de conidiophores à la périphérie des boîtes de Pétri. L'isolat BOA01 s'est distingué par rapport au reste des isolats par un mycélium poudreux et ras à conidiophores courts et trapus.

Tous les isolats ont produit en début de croissance un mycélium blanc. Plus tard, ce dernier tend vers le crème, le gris, le gris cendré, le marron ou le vert olive.

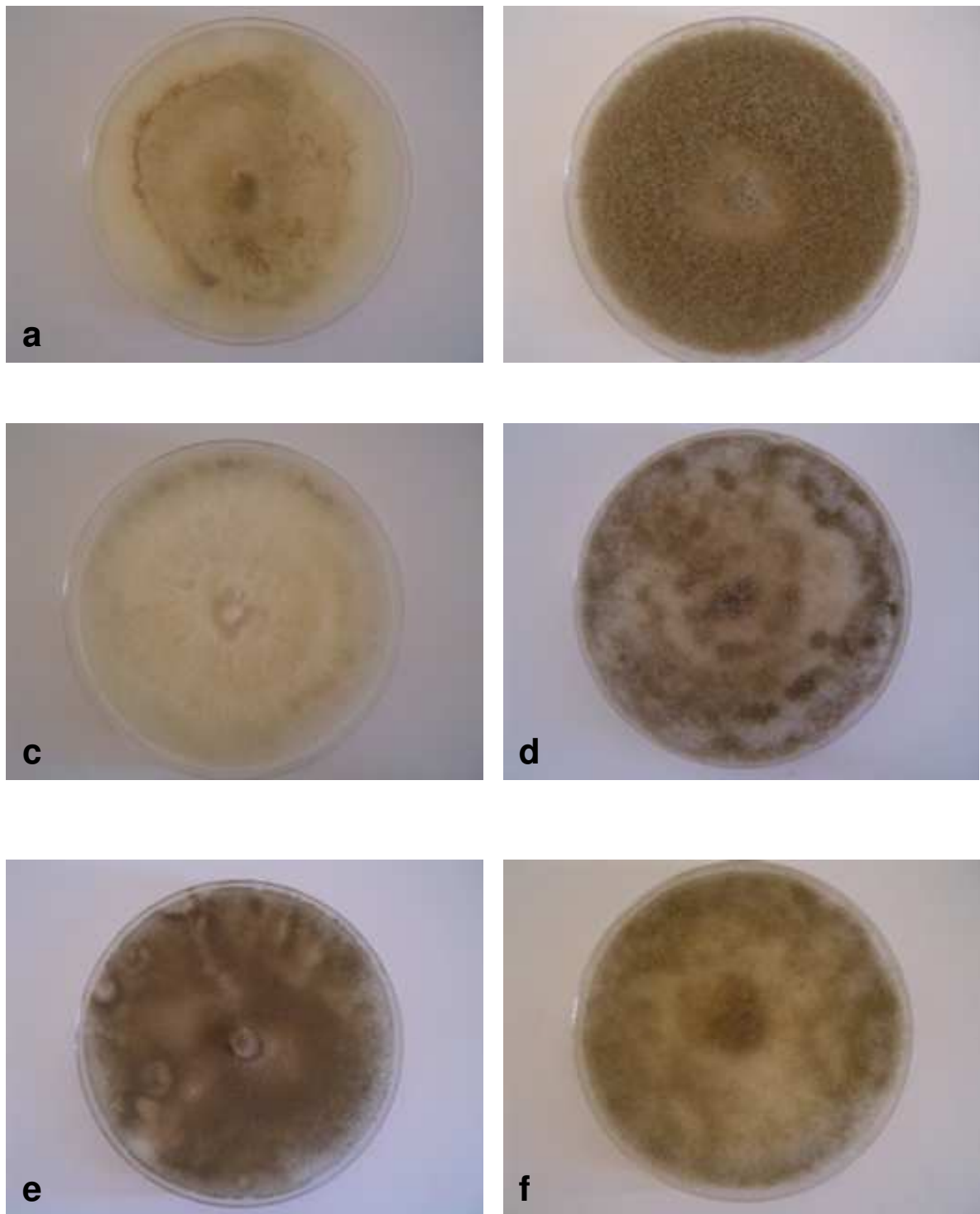


Figure 5. Aspect général des colonies formées par les isolats de la collection de *Botrytis* spp. **a** : Mycélium compact (BTA02), **b** : Mycélium dense (BHA01), **c** : Mycélium cotonneux (BFB01), **d** : Mycélium verruqueux (BVZ03), **e** : Mycélium poudreux (BOA01), **f** : Mycélium aérien peu dense (BVB02).

IV.1.1.2. Estimation de la vitesse de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne des isolats de la collection de *Botrytis* spp. a été estimée au bout de 4 jours d'incubation à 20°C en chambre de culture. La vitesse moyenne de croissance mycélienne a été calculée pour chaque isolat (Tableau 8). Les isolats ont été ensuite classés selon leur moyenne de croissance mycélienne (Tableau 9).

Tableau 8. Moyennes des vitesses de croissance (mm/j) des isolats de la collection de *Botrytis* spp.

Isolats	Moyenne de la vitesse de croissance (mm/j)	Isolats	Moyenne de la vitesse de croissance (mm/j)
BVA01	9,40	BFT01	15,75
BVA02	11	BFA01	16,43
BVB01	17,06	BFA02	18,5
BVB02	15	BFA03	17,68
BVT01	9,06	BTA01	16,20
BVZ01	14	BTA02	16,62
BVZ02	16,06	BOA01	9,68
BVZ03	15,06	BOA02	18,5
BFZ01	16,31	BHB01	17,56
BFB01	19,12	BHA01	14,43

Tableau 9. Classe de moyenne en nombre d'isolats/classe

Moyenne de la vitesse de croissance (mm/j)	Effectif	Pourcentage (%)
9,01-11	4	20
14,01-16	5	25
16,01-19	10	50
19,01-21	1	5

La majorité des isolats ont investi les boîtes de Pétri au bout de 4 jours, à l'exception des isolats BVA01, BVA02, BVT01 et BVZ01, BOA01 et BHA01, ces derniers ont eu une croissance plus lente et ont recouvert les boîtes de Pétri au bout de 5 à 6 jours.

Les valeurs des vitesses moyennes de croissance mycélienne ont varié entre de 9,06 et 19,12 mm/jour. La croissance mycélienne la plus lente a été notée chez l'isolat BVT01 avec une vitesse moyenne de 9,06 mm/jour, alors que l'isolat BFT01 de la fève s'est distingué par la vitesse moyenne de croissance mycélienne la plus élevée (19,12 mm/jour). Des valeurs intermédiaires ont été enregistrées pour le reste des isolats.

Le classement des isolats a permis de distinguer 4 classes. La première classe est représentée par 20% de l'effectif total, elle regroupe les isolats à croissance lente avec des valeurs comprises entre 9,01 et 11 mm/jour. La deuxième classe regroupe 25% de l'effectif ayant une vitesse de croissance mycélienne comprise entre 14,01 et

16 mm/jour, c'est le cas d'isolats de vigne de fève et de haricot. 50% de l'ensemble se situe dans la classe où la vitesse moyenne de croissance mycélienne va de 16,01 à 19 mm/jour, les isolats de la vigne, de la fève, de l'oignon, du haricot et de la tomate y sont présents.

IV.1.2. ANALYSE DES SPORES

IV.1.2.1. Etude de la taille des spores

La mesure de la taille des spores a permis de calculer les moyennes des longueurs et des largeurs ainsi que la détermination des valeurs minimales et maximales des intervalles de mesures (Tableau 10). Les limites supérieures et inférieures sont systématiquement analysées. Dans certains cas elles peuvent être utiles pour distinguer entre les différentes espèces du genre *Botrytis*.

Tableau 10. Mensuration des spores des isolats de la collection de *Botrytis* sp. (μm).

Isolat	Moyenne de longueur	Moyenne de largeur (μm)	Intervalles de mesure
BVA01	12,5	8,85	10-15 x 7,5-11,25
BVA02	15,01	8,06	12,5-18,75 x 7,5-11,25
BVB01	12,42	9,86	10-15 x 7,5-12,2
BVB02	12,68	7,92	10-16,25 x 5-11,25
BVT01	11,72	7,71	10x12,5 x 6,25-10
BVZ01	11,52	7,47	10-15 x 5-10
BVZ02	11,88	8,25	10-15 x 6,5-11,5
BVZ03	13,86	8,66	12,5-20 x 7,5-12,5
BFZ01	10,85	7,46	7,5-12,5 x 5-7,5
BFB01	11,67	7,76	10-15 x 7,5-10
BFT01	10,03	6,66	10-11,25 x 5-7,5
BFA01	11,68	6,61	10-13,75 x 5-8,75
BFA02	12,3	8,76	10-17,5 x 7,5-10
BFA03	11,6	7,5	10-15 x 6,25-10
BTA01	9,81	6,5	7,5-11,25 x 5-10
BTA02	9,86	7,16	7,5-12,5 x 5-10
BOA01	11,46	5,12	7,5-13,75 x 3,75-7,5
BOA02	10,25	7,66	7,5-13,75 x 6,25-10
BHB01	9,21	6,47	7,5-10 x 5-7,5
BHA01	11,22	7,98	8,75-13,75 x 5-10

Tous les isolats de la collection produisent des conidies présentant diverses formes, ovoïdes, ellipsoïdales, pyriformes, citrifomes, rondes ou globulaires (Figure 8). L'observation des conidies produites a indiqué une variabilité morphologique importante.

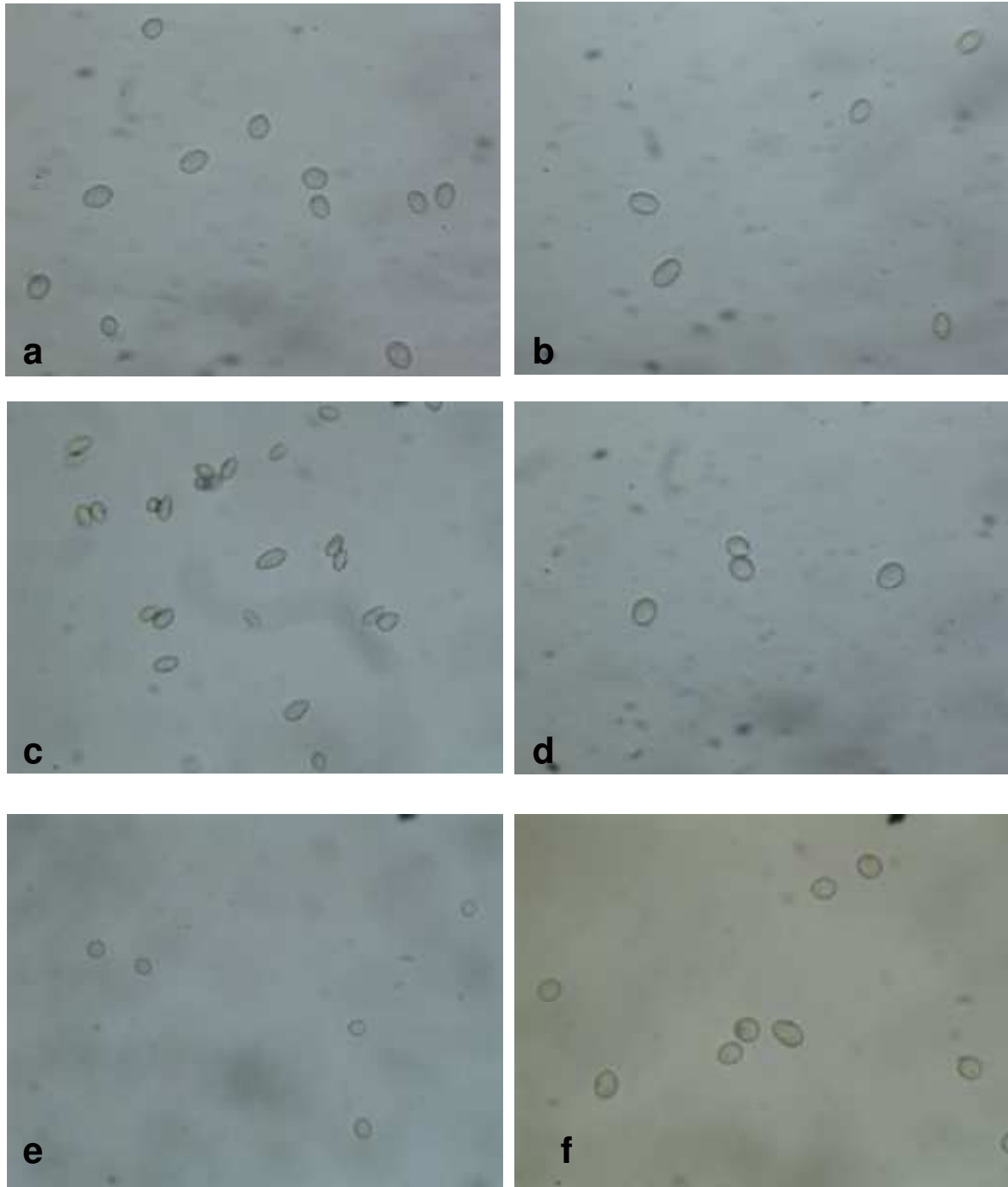


Figure 6. Forme des conidies de *Botrytis* spp. observées au microscope optique (Grossissement x 40). **a**: Ovoïde (BVA02), **b** : Ellipsoïde (BVZ03), **c** : Pyriforme (BOA01), **d** : Sub-globuleuse (BVT01), **e** : Sphérique (BHB01), **f** : Globeuse (BHA01).

Les spores des isolats de la collection ont présenté des tailles comprises dans l'intervalle de mesure 7,5-20 x 5-12,5. Les tailles les plus importantes ont été observées chez les isolats BVA02 (15,01 x 8,06 μm), BVZ03 (13,86 x 8,66 μm) et BVB02 (12,68x792 μm) alors que l'isolat BHB01 s'est caractérisé par les spores les plus petites (9,21 x 6,47 μm). Des tailles intermédiaires ont été notées pour le reste des isolats étudiés.

L'analyse de variance a montré une différence hautement significative concernant l'effet de la longueur, de la largeur et du ratio sur les isolats étudiés. Le test de Newman et Keuls à 5% effectué pour les trois paramètres a permis de classer les isolats en groupes homogènes (Annexe 6). Le classement des groupes non significativement différents a permis de différencier des groupes homogènes pour les trois paramètres mesurés. Les groupes obtenus indiquent une variabilité importante au sein des isolats de la collection étudiée, en dépit du fait que la majorité des isolats sont supposés appartenir à l'espèce *Botrytis cinerea*.

IV.1.2.2. Estimation de la concentration en spores

Les observations indiquent que certains isolats produisent des spores en abondance sur la totalité de la surface, pour d'autres isolats, les fructifications sont peu abondantes et organisées en touffes, en paquets ou en cercles concentriques.

La concentration en spores a été estimée sur des cultures âgées de 12 jours. Le comptage des spores a été réalisé pour chaque isolat. La moyenne est exprimée en nombre de spores par millilitre et par centimètre carré (Tableau 11).

Tableau 11. Concentration en spores des isolats de *Botrytis* spp. cultivés sur milieu PDA (spores/ml/cm²).

Isolat	Concentration en spores	Isolat	Concentration en spores
BVA01	13 x10 ⁴	BFT01	43 x10 ⁴
BVA02	20,3 x10 ⁴	BFA01	27,6 x10 ⁴
BVB01	18 x10 ⁴	BFA02	21 x10 ⁴
BVB02	5 x10 ⁴	BFA03	26,3 x10 ⁴
BVT01	30,6 x10 ⁴	BTA01	62,3 x10 ⁴
BVZ01	34,3 x10 ⁴	BTA02	40,6 x10 ⁴
BVZ02	59,6 x10 ⁴	BOA01	129,3 x10 ⁴
BVZ03	43,6 x10 ⁴	BOA02	24,6 x10 ⁴
BFZ01	30 x10 ⁴	BHB01	7,3 x10 ⁴
BFB01	53,3 x10 ⁴	BHA01	38,3 x10 ⁴

Les valeurs moyennes de la concentration en spores obtenues pour les isolats de la collection sont très variables et vont de 5 x10⁴ à 129,3 x10⁴ spores/ml/cm². Les concentrations les plus faibles ont été notées pour les isolats BVB02 et BHB01 tandis que la concentration la plus importante est notée pour l'isolat BOA01 de l'oignon. Selon l'importance de la sporulation, les isolats ont été regroupés dans des classes de concentration (Tableau 12).

Tableau 12. Effectif de chaque classe de concentration en spores/ml/cm².

Concentration en spores spores/ml/cm ² (x10 ⁴)	Effectif	Pourcentage (%)	Isolats
0-10	2	10	BVB02 et BHB01
10,1-30	8	40	BVA01, BVA02, BVB01, BFB01, BFA01, BFA02, BFA03 et BOA02
30,1-50	6	30	BVT01, BVZ01, BVZ03, BFZ01, BTA02 et BHA01
50,1-70	3	15	BVZ02, BFT01 et BTA01
110,1-130	1	5	BOA01

40% de l'effectif total présente une sporulation moyenne allant de 10 à 30 x10⁴ spores/ml/cm². C'est le cas des isolats BVA01, BVA02, BVB01 de la vigne et aussi celui des isolats BFB01, BFA01, BFA02 et BFA03 provenant de la fève ainsi que l'isolat BOA02 de l'oignon.

15% de l'effectif total a produit une sporulation relativement élevée allant de 50 à 70 x10⁴ spores/ml/cm² tels que les isolats BVZ02 de la vigne, l'isolat BFT01 de la fève et l'isolat BTA01 de la tomate. Un seul isolat représente la classe où la sporulation est très abondante dépassant 100 spores/ml/cm², il s'agit de l'isolat BOA01 de l'oignon.

IV. ETUDE DES SCLEROTES

La formation de sclérotés par les isolats de la collection de *Botrytis* spp. a été observée. Au début de leurs formation, les sclérotés sont blanc cotonneux ou vert foncé. Ils noircissent par la suite et présentent un aspect luisant. Des formes diverses ont été observées, les sclérotés sont plats, convexoïdes, arrondis, circulaires ou à contours irréguliers (Figure 9). Les résultats obtenus lors de l'étude des sclérotés sont présentés en Tableau 13.

Tableau 13. Caractéristiques des sclérotés produits par 9 isolats de la collection de *Botrytis* spp. cultivés sur milieu PDA (jour d'apparition, Nombre de sclérotés/cm², Moyennes des longueurs, Moyennes des largeurs, Intervalles de mesure)

Isolats	Jour d'apparition	Nombre de sclérotés/cm ²	Moyennes des longueurs (mm)	Moyennes des largeurs (mm)	Intervalles de mesure
BVA01	13 ^{ème} jour	0,12	2,62	2,37	1-4 x 1-4
BVA02	10 ^{ème} jour	2,08	2,74	2,35	0,5-5 x 0,5-4
BVZ02	20 ^{ème} jour	1,16	3,25	2,63	1-5,5 x 1-4,5
BVZ03	18 ^{ème} jour	1,03	2,68	1,86	1-4 x 0,5-3,5
BFA01	10 ^{ème} jour	0,14	3,9	3,5	1-6 x 1-4,5
BFA03	11 ^{ème} jour	0,25	2,85	2,08	1,5-4 x 1,5-3
BFT01	8 ^{ème} jour	0,55	3,85	2,85	2-5 x 1,5-5
BTA01	16 ^{ème} jour	3,28	2,62	1,91	1-4,5 x 1-4
BHB01	6 ^{ème} jour	0,83	5,34	3,87	2,5-9 x 2-6

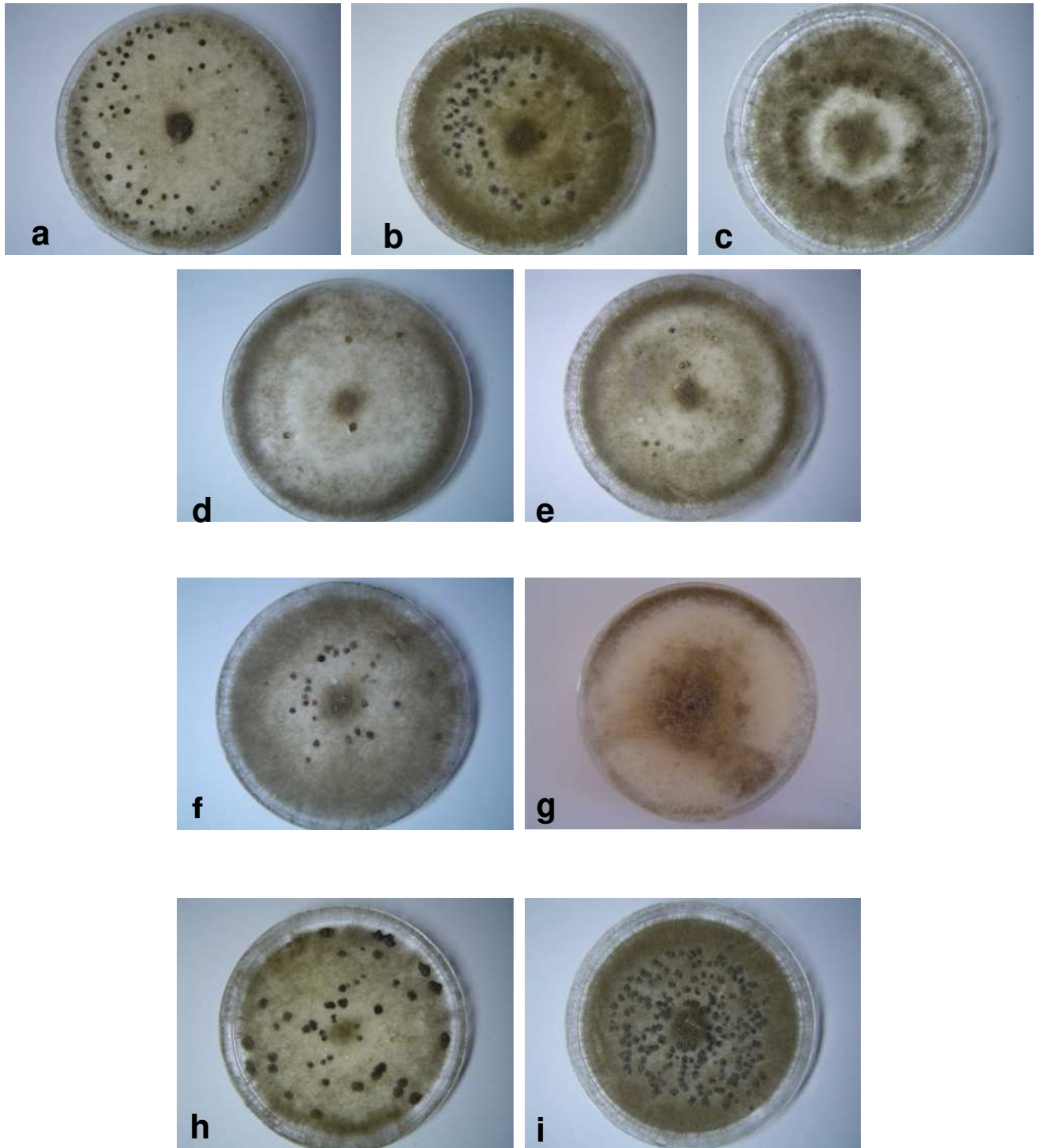


Figure 7. Aspect des sclérotés formés par quelques isolats de la collection de *Botrytis* spp. **a :** BVA02, **b :** BVZ02, **c :** BVZ03, **d :** BFA01, **e :** BFA03, **f :** BFT01, **g :** BVA01, **h :** BHB01, **i :** BTA01.

IV.1.3.1. Temps nécessaire à l'apparition des sclérotés

Le temps nécessaire pour l'apparition des premiers sclérotés a été estimé pour les 9 isolats de la collection qui ont produit des sclérotés. Il a varié de 6 à 20 jours (Tableau 13). Le reste des isolats n'ont pas produit de sclérotés, et ce, même au-delà de 45 jours d'observation.

Les premiers sclérotés ont été formés par l'isolat BHB01 du haricot au bout de 6 jours d'observation, suivi par l'isolat BFT01 de la fève. D'autres isolats tels que BVA02 de la vigne, BFA01 et BFA03 de la fève ont produit des sclérotés après une dizaine de jours après l'ensemencement. Les isolats BVZ03 et BVZ02 de la vigne ont produit des sclérotés respectivement au 18^{ème} et au 20^{ème} jour.

IV.1.3.2. Taille des sclérotés

Les sclérotés formés par les 9 isolats de la collection de *Botrytis* spp. ont été mesurés afin de déterminer les moyennes des longueurs, les moyennes des largeurs ainsi que les intervalles de mesures qui reflètent les limites inférieures et supérieures (Tableau 13).

L'intervalle de mesure pour l'ensemble des isolats ayant produit des sclérotés se situe aux alentours de 0,5-9 x 0,4-6 mm. Les résultats ont montré que l'isolat BHB01 s'est distingué par les sclérotés les plus volumineux avec 5,34 mm de longueur en moyenne et 3,87 mm de largeur en moyenne. Les sclérotés les plus petits ont été observés chez l'isolat BVA02 de la vigne avec une taille moyenne de 2,74 x 2,35 mm comprise dans l'intervalle 0,5-5 x 0,5-4.

IV.1.3.3. Estimation de la densité des sclérotés

Le dénombrement des sclérotés a permis d'estimer la densité moyenne par centimètre carré (Tableau 13). Les données indiquent une densité de sclérotés (sclérotés/cm²) variable entre 0,12 et 3,28 sclérotés/cm². L'isolat BTA01 de la tomate ainsi que les 3 isolats de la vigne BVA02, BVZ02 et BVZ03 ont présenté les densités les plus élevées en comparaison avec l'isolat BVA01 de la vigne qui a produit très peu de sclérotés.

IV.1.4. DISCUSSION

Les résultats obtenus lors de l'étude des caractères culturels indiquent une grande variabilité des isolats de notre collection. La variabilité morphologique et la diversité génétique des espèces du genre *Botrytis* et particulièrement celles de l'espèce *Botrytis cinerea* ont largement été décrites dans de nombreux travaux auparavant (Morgan *et al.*, 1971 ; Harrison, 1976 ; Jarvis, 1977) et approfondies durant les dernières décennies (Van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1993; Dioloz *et al.*, 1995; Giraud *et al.*, 1998, Salhi, 2004, Meamiche, 2005, Rami, 2006).

Les observations ont permis de regrouper les isolats sur la base de la densité du mycélium. Cependant, ces regroupements ne procurent pas de résultats exploitables par les outils statistiques. De plus, leur obtention est basée sur des observations visuelles sujettes à la subjectivité de l'observateur. D'autant plus que les caractères

macroscopiques tels que la couleur et l'aspect du mycélium peuvent varier chez le même isolat au fur et à mesure des repiquages.

Néanmoins, l'isolat BOA01 de l'oignon s'est distingué par un aspect mycélien, une croissance mycélienne et des spores n'ayant aucune similarité avec les autres isolats de la collection. A partir de cette observation, l'isolat a été soupçonné appartenir à une espèce associée à l'oignon autre que *Botrytis cinerea*, l'isolat a de ce fait bénéficié d'une attention particulière durant les études ultérieures.

La plupart des isolats se sont caractérisés par un mycélium à dominance gris cendré à marron grisâtre, ce qui est confirmé par les résultats obtenus par Merad et Merdjani (1997), Messgou (2000) et Salhi (2004) qui se sont penchés sur la variabilité morphologique et culturale d'isolats Algériens.

L'étude de la croissance mycélienne a été réalisée sur le milieu de culture PDA qui est décrit comme étant le milieu qui génère le moins de variabilité (Salhi, 2004 ; Abou Zeid *et al.*, 1996 ; Abou Zeid *et al.*, 1998 ; Cherif *et al.*, 1998). La croissance mycélienne à l'image d'autres traits morphologiques et culturaux est souvent prise en compte pour distinguer entre les espèces de *Botrytis* spp. Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par Abou Zeid *et al.* (1998) pour l'ensemble des isolats. Nous avons noté que les isolats de la fève ont présentés une croissance régulière similaire à celle des isolats des autres cultures supposés appartenir à l'espèce *Botrytis cinerea*. Seul l'isolat BOA01 s'est démarqué encore une fois par une progression très lente.

La taille des conidies est considérée comme un critère de discrimination entre les espèces de *Botrytis* spp. Harrison (1983) a rapporté que l'aspect des colonies étant similaire, la taille des conidies demeurerait le trait le plus significatif pour distinguer des espèces telles que *Botrytis cinerea* et *Botrytis fabae*. La littérature indique que les conidies de *Botrytis cinerea* sont généralement subglobuleuses ou elliptiques avec une tailles de 9-12 x 7-10 μm (Jarvis, 1980), alors que les conidies de *Botrytis fabae* sont plutôt sphériques à ovales, parfois bi ou tricellulaires (Epton et Richmond, 1980), leur taille est comprise dans l'intervalle 15-24 x 12-20 μm (Jarvis, 1980). D'autres auteurs ont noté des tailles de conidies pour *Botrytis fabae* comprises dans l'intervalle 14-29 x 11-20 μm . Mais dans la plupart du temps l'intervalle évoqué est 16-25 x 13-16 μm (Ellis et Waller, 1974b, Harrison, 1983).

Les isolats de la vigne, de la tomate, du haricot et de l'oignon ont présenté des tailles caractérisant l'espèce *Botrytis cinerea*. Les 6 isolats de la fève ont présenté des tailles comprises dans l'intervalle 10,03 -12,3 x 6,66 - 8,76 μm correspondant également à l'intervalle caractérisant *Botrytis cinerea*. On a même noté que les conidies des isolats de la fève étaient sensiblement plus petites que celles des isolats de la vigne, ce qui laisserait supposer que les 6 isolats de la fève appartiendraient à l'espèce *Botrytis cinerea*.

Bien que les prélèvements aient été effectués sur 5 Wilayas et que les échantillons sélectionnés aient présenté des lésions étendues correspondant aux phases agressives de la maladie taches chocolat, les isolats de la fève semblent appartenir à l'espèces *Botrytis cinerea*. Ce résultat indique que les champs de fève sont attaqués non seulement par *Botrytis fabae* comme l'indique la bibliographie (Ellis et Waller, 1974a, 1974b) mais également par *Botrytis cinerea* qui est tout aussi capable de causer des dégâts sérieux. Le phénomène a déjà été rapporté par Bouznad *et al.* (1998) qui ont constaté qu'en Algérie, l'espèce *Botrytis cinerea* était prédominante sur les cultures

de fève. Ils soupçonnent que les conditions climatiques défavoriseraient l'installation de *Botrytis fabae*. Kenaoui et Lounis (1998) ont supposé l'existence de compétition entre les deux espèces.

De plus, Mirzaei *et al.* (2008) ont étudié la distribution des espèces du genre *Botrytis* à travers l'Iran sur 150 échantillons (Feuilles, tiges, gousses) de fève qui présentaient des symptômes de la maladie taches chocolat. Seulement 2 isolats ont été identifiés comme étant des isolats de *Botrytis fabae*.

La taille moyenne des conidies de l'isolat BOA01 est de 11,46 x 5,12 µm et se situe dans l'intervalle 7,5-13,75 x 3,75-7,5 qui se rapproche des intervalles attribués à *Botrytis aclada* et *Botrytis allii* par Nielsen *et al.* (2001) (8,4-12 x 4,6- 6,5 µm) et Yohalem *et al.* (2003) (6,5-11 x 4-6). Par ailleurs, l'aspect cultural, la couleur des colonies ainsi que la forme des conidiophores sont compatibles avec les descriptions retenues pour les espèces *Botrytis aclada* et *Botrytis allii* selon les mêmes auteurs. Il existe un risque de confusion entre ces deux espèces en raison de similitudes morphologiques. Néanmoins, la clé de détermination proposée par Chilvers et du Toit (2006) nous laisse supposer que l'isolat BOA01 correspond plus à l'espèce *Botrytis aclada*.

La concentration en spore est également prise en compte pour différencier entre les espèces du genre *Botrytis* (Stakman, 1929 ; Zriba, 1993, Abou Zeid *et al.*, 1996). Les résultats obtenus durant notre étude se rapprochent de ceux obtenus par Abou Zeid *et al.* (1996). Par contre, ils ne correspondent pas à ceux obtenus par Salhi (2004), sans doute en raison de l'âge de la collection, car dans notre cas, l'estimation de la concentration des spores a été effectuée dès la purification des isolats. Par ailleurs, nos résultats ont révélé une variabilité intra spécifique évidente au sein de l'espèce *Botrytis cinerea*. L'isolat BOA01 supposé appartenir à l'espèce *Botrytis alacada* s'est distingué par une sporulation largement plus importante que celles des autres isolats. Nous ne disposons pas de références bibliographiques quant au taux de sporulation des espèces spécialisées sur l'oignon, cependant, cette différence significative ne fait que renforcer l'hypothèse émise précédemment.

Botrytis cinerea produit des sclérotés extrêmement variables en forme et en densité (Jarvis, 1977 ; Messgo, 2000, Salhi, 2004). Roussel et Bouard (1971) in Galet (1977) ont décrit les sclérotés de *Botrytis cinerea* comme des structures polymorphes avec des tailles allant de 1 à 2 mm, parfois 2 à 3 sclérotés peuvent confluer. Nos résultats indiquent que les 3 isolats de la fève ont présenté des tailles moyennes correspondant plus à *Botrytis cinerea* qu'à *Botrytis fabae*. Les mêmes observations ont été obtenus pour les isolats des autres plantes. L'isolat BOA01 n'a pas produit de sclérotés. Yohalem *et al.* (2003), Nielsen *et al.* (2001) ainsi que Chilvers et Du Toit (2007) ont souligné qu'aucun cas de *Botrytis aclada* ayant produit des sclérotés n'a été rapporté.

Compte tenu de ce qui précède et sur la base des associations avec les plantes à partir desquelles nos isolats ont été récoltés, les résultats obtenus concernant les caractéristiques morphologiques et culturales des isolats de la collection de *Botrytis* spp. nous laissent supposer que 19 isolats, y compris les 6 isolats de la fève appartiennent à l'espèce *Botrytis cinerea* alors que l'isolat BOA01 de l'oignon pourrait appartenir à l'une des espèces *Botrytis aclada*, *Botrytis allii* ou *Botrytis squamosa*.

IV. 2. ETUDE DE LA SPECIALISATION PARASITAIRE ET DE LA VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE DES ISOLATS DE LA COLLECTION DE *BOTRYTIS* SPP.

IV.2.1. Cas de la vigne

Les résultats issus de l'inoculation artificielle des isolats sur les feuilles de vigne sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14. Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de *Botrytis* spp. sur feuilles détachées de vigne.

Isolats	Période d'incubation (Jours)	Période de latence (Jours)	Nombre de spores (sp/ml/f)	AUDPC des Lésions
BVA01	2,6	5,8	370 x 10 ⁴	103,5
BVA02	1,8	7,8	173,3 x 10 ⁴	95,7
BVB01	-	-	-	-
BVB02	1	4,8	386,7 x 10 ⁴	187,4
BVT01	2,6	8,4	366,7 x 10 ⁴	224
BVZ01	-	-	-	-
BVZ02	1	5,4	293,3 x 10 ⁴	234
BVZ03	1,6	7,8	350 x 10 ⁴	185
BFZ01	1,2	7,4	296,7 x 10 ⁴	240,7
BFB01	-	-	-	-
BFT01	1	4,8	300 x 10 ⁴	213,6
BFA01	2	5,6	270 x 10 ⁴	172,7
BFA02	2	6,6	406,7 x 10 ⁴	135,6
BFA03	1,6	8	436,7 x 10 ⁴	97,5
BTA01	1,6	6,6	466,7 x 10 ⁴	190,2
BTA02	2,8	7,8	203,3 x 10 ⁴	203,8
BOA01	-	-	-	-
BOA02	2,4	8,4	166,7 x 10 ⁴	118,2
BHB01	1,8	6,4	410 x 10 ⁴	222
BHA01	-	-	370 x 10 ⁴	-

IV.2.1.1. Période d'incubation

Les résultats indiquent que 15 isolats ont produit des interactions compatibles avec les feuilles détachées de vigne. Les isolats de la vigne BVB02 et BVZ02 ainsi que l'isolat BFT01 de la fève ont induit des lésions nécrotiques 24 heures après l'inoculation artificielle avec 15% de sites infectés. Les autres isolats ont induit des lésions au 2^{ème} et au 3^{ème} jour au bout desquels 61% des sites inoculés ont été infectés. L'isolat BTA02 de la tomate a présenté la période d'incubation la plus longue (2,8 jours).

Les lésions naissantes observées sous la goutte de l'inoculum ont présenté une couleur marron et une forme ronde ou ovale. Leurs contours deviennent irréguliers au fil des jours et leur parcours suit le prolongement des nervures de la feuille (Figure 10a,b). Les feuilles témoins ainsi que celles inoculées avec les isolats BVB01, BVZ01 de la vigne, BFB01 de la fève et BOA01 de l'oignon n'ont pas présenté de lésions au cours de la période de notation. L'analyse de variance de l'effet des isolats sur la période d'incubation a montré des différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a classé les 15 isolats dans des groupes homogènes (Annexe 7).

IV.2.1.2. Période de latence

La période de latence va de 5 à 8 jours en moyenne. Les isolats BVB02 de la vigne et BFT01 de la fève ont été les premiers à sporuler à partir des tissus infectés (4,8 jours). La sporulation des autres isolats s'est échelonnée du 5^{ème} au 8^{ème} jour. L'isolat BVT01 a présenté la période de la latence la plus longue (8,4 jours). L'analyse de variance de l'effet des isolats sur la période de latence a montré des différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a classé les 15 isolats dans des groupes homogènes (Annexe 8).

IV.2.1.3. Nombre de spores

La production de spores moyenne est de 326×10^4 spores/feuille. L'isolat BTA01 a produit le plus de spores (467×10^4 spores/feuille) avec un recouvrement total de la surface foliaire au bout du 11^{ème} jour (Figure 10c), suivi par les isolats BFA01 de la Fève et l'isolat BHB01 du haricot. Le groupe suivant s'est caractérisé par une production allant de 270 à 386×10^4 spores/feuille et a regroupé 6 isolats de vigne, de fève et de haricot. La sporulation la moins importante a été enregistrée pour l'isolat BOA02 de l'oignon avec 166×10^4 spores/feuille. Aucune sporulation n'a été observée sur les feuilles inoculées avec les isolats BVB01, BVZ01, BFB01, BOA01 et BHA01. Il en a été de même pour les sites témoins. L'analyse de variance de l'effet des isolats sur le nombre de spores a montré des différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a classé les 15 isolats dans des groupes homogènes (Annexe 9).

IV.2.1.4. Diamètre des lésions

L'analyse de la progression du diamètre des lésions a révélé une variabilité importante entre les isolats. Les lésions des isolats BVZ03 et BVZ02 ont progressé très rapidement envahissant entièrement la surface foliaire. Ces isolats se sont également distingués par les valeurs AUDPC les plus importantes (234-240). Les isolats tels que ceux de la tomate, du haricot et de la fève, ont également causé des lésions étendues, cependant la vitesse de progression était plus modérée et les valeurs AUDPC ont varié entre 135 et 222. Les deux isolats de la vigne BVA01 et BVA02 ainsi que l'isolat BFA03 de la fève ont induit des lésions dont la progression est plus lente en comparaison aux autres isolats, ils ont présenté les valeurs AUDPC les plus faibles (95 et 103). L'analyse de variance de l'AUDPC du diamètre des lésions a indiqué des différences significatives entre les isolats et a permis de classer ces derniers en groupes homogènes selon le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% (Annexe 10).

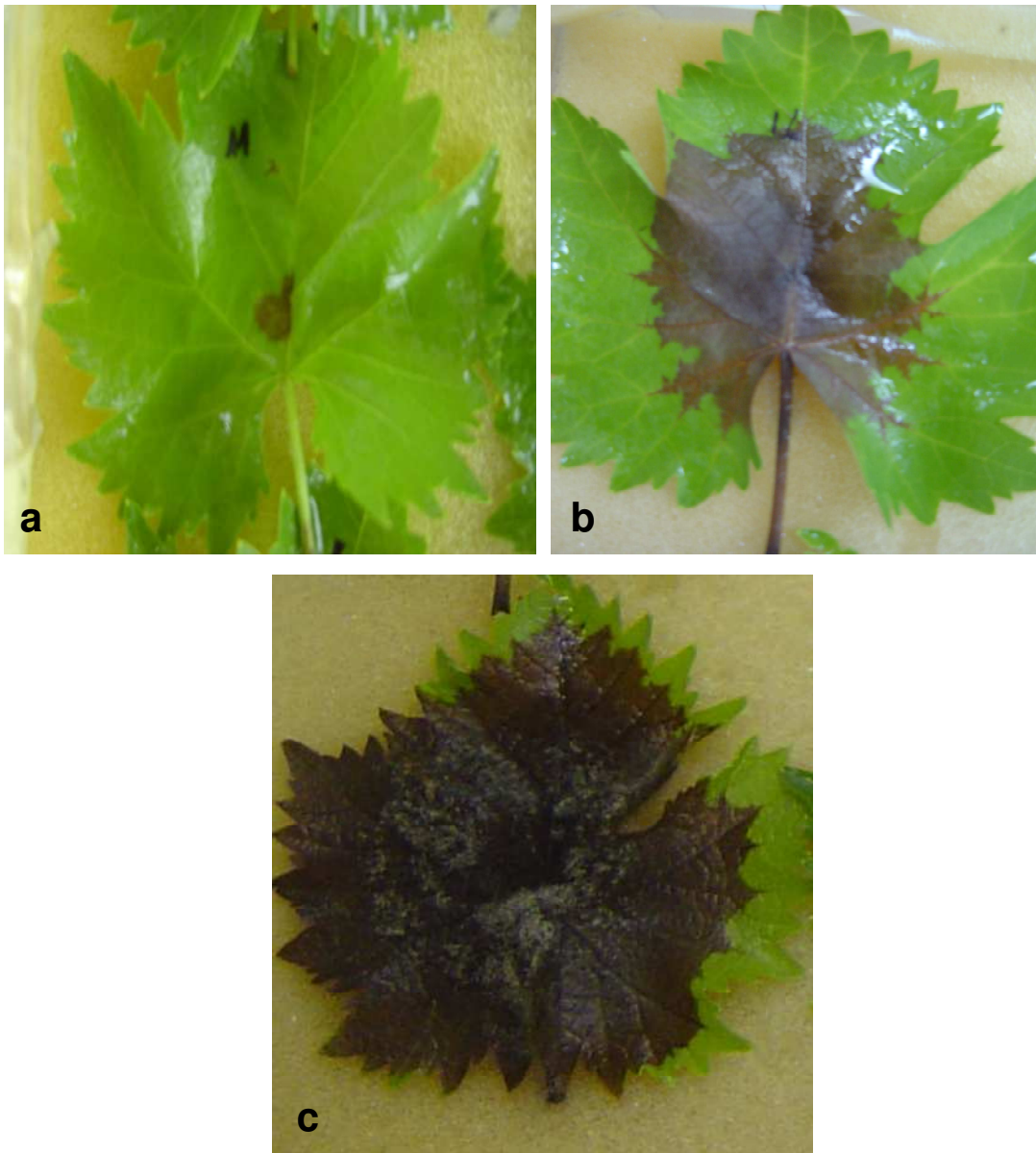


Figure 8. Progression et sporulation des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de vigne. **a:** Lésion nécrotique après 48 heures d'incubation, **b:** Lésion nécrotique après 9 jours d'incubation, **c:** Sporulation de l'isolat BOA02.

IV.2.5.5. Discussion

Botrytis cinerea attaque les feuilles, les bourgeons, les rameaux, les fleurs et les grappes de vigne. C'est un pathogène dangereux et redouté par les viticulteurs (Nair et Hill, 1992). L'industrie vitivinicole est particulièrement affectée par ce champignon (Derckel *et al.*, 1999). L'inoculation artificielle des feuilles détachées de vigne avec les isolats de la collection de *Botrytis* spp. a fait ressortir une variabilité remarquable du pouvoir pathogène à travers les paramètres étudiés.

Les lésions ont présenté une couleur marron, une forme circulaire au départ puis des contours irréguliers suivant le profile des nervures des feuilles. Ces mêmes symptômes ont été décrits sur des feuilles détachées de vigne inoculées avec des isolats de *Botrytis cinerea* de la vigne et d'autres cultures (Derckel *et al.*, 1999 ; Pearson, 1998 ; Rami, 2006).

Les premières lésions sont apparues après 24 heures d'incubation. Derckel *et al.* (1999) ont rapporté que les isolats les plus agressifs induisent des lésions nécrotiques visibles au bout de 3 jours, cependant, ils ont ajouté que la germination des conidies de *Botrytis cinerea* se fait entre 2 et 10 heures après l'inoculation. Cette différence peut être liée au fait que nos isolats soient plus agressifs que ceux étudiés par Derckel *et al.* (1999) ou bien que notre matériel végétal soit plus sensible.

Les périodes de latences ont varié à travers les isolats et ne semblent pas être proportionnelles aux périodes d'incubation. Le nombre de spores/feuille pour chaque isolats indique également une variabilité significative qui semble indépendante de l'agressivité des isolats et de leur origine vue que ce sont des isolats de fève, de tomate et de haricot qui ont présenté le nombre de spores par feuille le plus élevé. Ceci peut être imputé à la tendance saprophyte et opportuniste de *Botrytis* qui s'installe et se multiplie à la faveur des tissus sénescents et putréfiés. Ces résultats illustrent le rôle que peuvent jouer les feuilles infectées dans les vignobles en conditions naturelles, car elles assurent à ce dernier un support en début de saison pour des attaques ultérieures. L'âge des feuilles ainsi que leur état physiologique ont pu avoir une influence sur la sporulation. Le phénomène a été observé lors de nombreuses interactions plante/pathogène (Creighton *et al.*, 1986 ; Roumen, 1992).

L'analyse des valeurs AUDPC indique une variabilité du pouvoir pathogène (Madden *et al.*, 2007), ces résultats s'accordent avec ceux obtenus par d'autres auteurs (Van der Vlugt-Bergman *et al.*, 1993 ; Derckel *et al.*, 1999 ; Cotoras et Silva, 2005). Les isolats de la tomate ont été plus agressifs que ceux de la vigne ce qui contredit les conclusions de Derckel *et al.* (1999), de Cotoras et Silva (2005) et de Pie et Brower (1993) qui avancent une spécificité à l'hôte au sein des populations de *Botrytis cinerea*. Néanmoins, Derckel *et al.* (1999) ont constaté que la souche T8 de la tomate présentait le même degré d'agressivité que les souches de vigne sur des feuilles de vigne. Malgré tout, les mécanismes impliqués dans le degré de spécialisation de *Botrytis cinerea* sur différents hôtes restent peu connus

Les isolats de vigne de notre collection ont présenté une variabilité du pouvoir pathogène pouvant être liée à l'existence des deux sous espèces *transposa* et *vacuma*. Martinez *et al.* (2003) ont d'abord considéré que les isolats *transposa* et *vacuma* présentaient le même degré d'agressivité vis-à-vis de la vigne. Plus tard, ils

souligneront que les isolats *transposa* sont plus virulents que les isolats *vacuma*. Des analyses génétiques plus approfondies pourront nous apporter plus d'information concernant la typologie génétique et la virulence des isolats de notre collection vis-à-vis de la vigne.

L'isolat de l'oignon BOA01 n'a pas induit de lésions durant l'étude. Ce fait pourrait confirmer d'une part l'appartenance de l'isolat à l'espèce associée à l'oignon *Botrytis aclada* et d'autre part la possibilité de discriminer certaines espèces du genre *Botrytis* sur la base de la spécialisation parasitaire comme l'indiquent certains auteurs (Hennebert, 1973 ; Prins *et al.*, 2000).

IV.2.2. Cas de la fève

Les résultats obtenus lors de l'inoculation des isolats de la collection sur les feuilles détachées de fève sont présentés en Tableau 15.

Tableau 15. Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de *Botrytis* spp. sur feuilles détachées de fève.

Isolats	Période d'incubation (Jours)	Période de latence (Jours)	Nombre de spores (spores/ml/feuilles)	AUDPC des Lésions
BVA01	3,4	6,3	163 x 10 ³	23,4
BVA02	1,4	-	-	46,4
BVB01	1,2	6,6	63 x 10 ³	66,2
BVB02	1,6	-	-	44,9
BVT01	1,4	-	-	46,6
BVZ01	1,2	5,3	120 x 10 ³	79,1
BVZ02	-	-	-	-
BVZ03	-	-	-	-
BFZ01	-	-	-	-
BFB01	1	5	43 x 10 ³	128
BFT01	-	-	-	-
BFA01	1,1	-	-	56,4
BFA02	1,5	-	-	84,1
BFA03	1,6	-	-	41,6
BTA01	-	-	-	-
BTA02	-	-	-	-
BOA01	2,8	-	-	29,3
BOA02	3	6,3	56 x 10 ³	37,5
BHB01	1,4	7	340 x 10 ³	102,2
BHA01	1,6	-	-	42,3

IV.2.2.1. La période d'incubation

Suite à l'inoculation artificielle des feuilles détachées de fève, 14 isolats ont induit des lésions nécrotiques avec 74% de sites infectés. La période d'incubation a varié de 1 jour pour l'isolat de la fève BFB01 à 3,6 jours pour l'isolat de l'oignon BOA01. Les sites témoins inoculés avec l'eau distillée stérile n'ont présenté aucune lésion sous la goutte d'eau. L'analyse de variance de la période d'incubation des isolats ayant induit des lésions indique des différences significatives entre les isolats. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a permis de classer les groupes non significativement différents (Annexe 11).

IV.2.2.2. La période de latence

Seuls 6 isolats ont initié une sporulation à la surface des lésions. La période de latence moyenne est de 6 jours. L'isolat de la fève BFB01 a été le premier à produire des spores sur les tissus infectés (5 jours) suivis de près par l'isolat de la vigne BVZ01 (5,3 jours).

L'analyse de variance de la période de latence des isolats ayant sporulé a indiqué une différence significative entre les 6 isolats. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a permis de classer des groupes non significativement différents (Annexe 12).

IV.2.2.3. Le nombre de spores

L'isolat BHB01 du haricot s'est distingué par une production de spores de 340×10^3 spores/feuille. Dans une moindre mesure, les isolats de la vigne BVA01 et BVZ01 ont produit des spores à raison de 163 et 120×10^3 spores/feuille. L'isolat de la vigne BVB01 et l'isolat de l'oignon ont produits moins de spores, entre 63 et 56×10^3 spores/feuille. L'isolat BFB01 de la fève a présenté le nombre de spores le plus faible.

L'analyse de variance de la production de spores des isolats ayant sporulé a indiqué une différence significative entre les 6 isolats. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a permis de classer les groupes non significativement différents (Annexe 13).

IV.2.2.4. Le diamètre des lésions

En analysant la progression du diamètre des lésions, nous avons relevé une variabilité à travers les isolats, la progression de la taille des lésions est présentée en Figure 11. Les lésions des isolats BFB01 de la fève et BHB01 du haricot ont évolué très rapidement, particulièrement du 6^{ème} au 9^{ème} jour de notation, où des surfaces importantes des feuilles ont été détruites. Les lésions induites par les isolats BFA01, BFA02 de la fève, BVB01 et BVZ01 de la vigne ont eu une progression moins rapide et des surfaces plus limitées. La progression la plus lente a été observée pour les lésions induites par les isolats BVA01 de la vigne et BOA01 de l'oignon. En effet, suite à leur formation, leur diamètre a cessé d'augmenter au delà du 4^{ème} jour.

L'analyse de variance de l'AUDPC du diamètre des lésions a indiqué des différences significatives entre les isolats et a permis de classer ces derniers en groupes homogènes (Annexe 14).

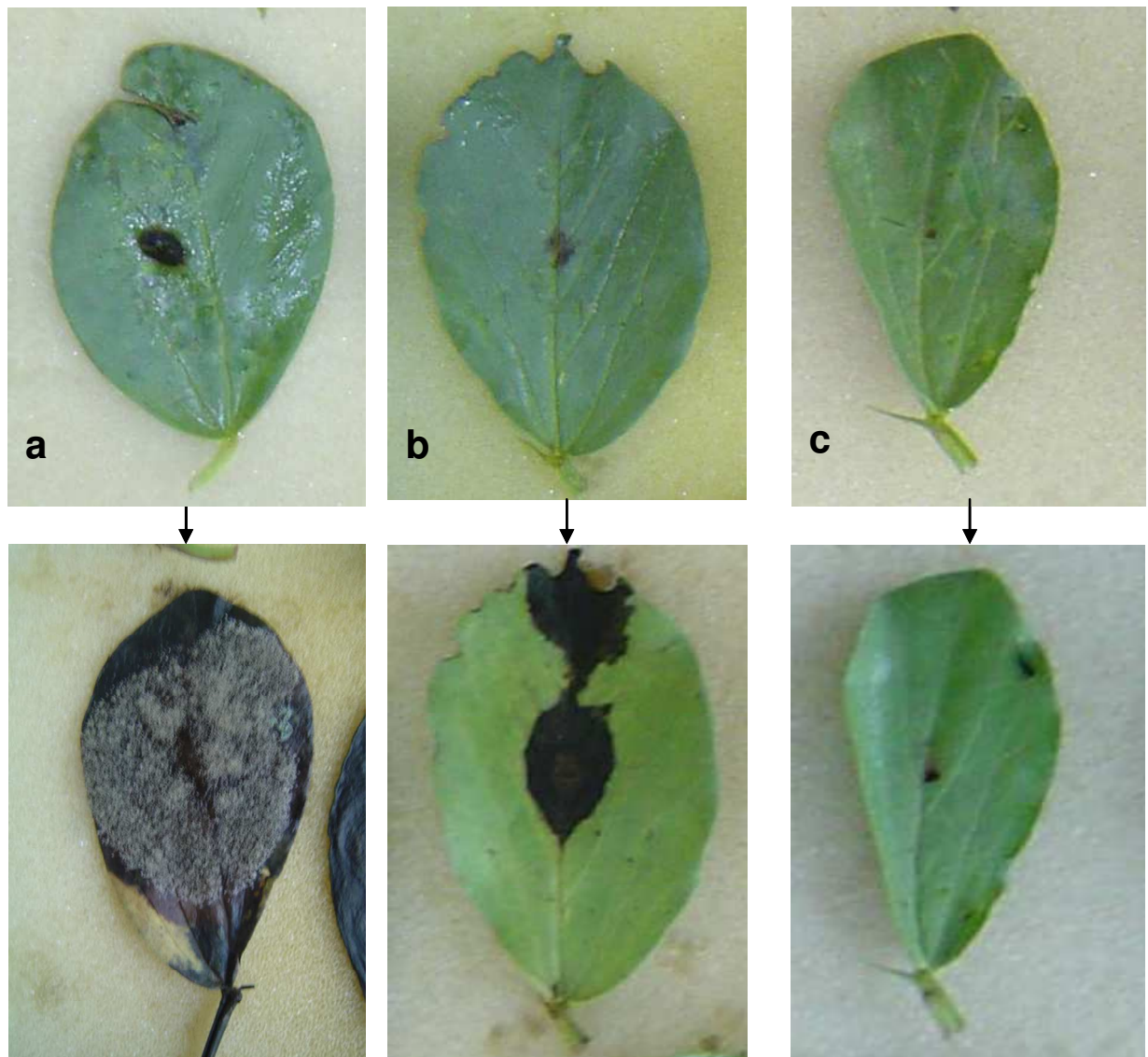


Figure 9. Progression des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de fève.
a: Feuille de fève inoculée avec l'isolat BFB01, **b:** Feuille de fève inoculée avec l'isolat BFA01, **c:** Feuille de fève inoculée avec l'isolat BOA01.

IV.2.2.5. Discussion

l'aspect des lésions induites par les isolats de *Botrytis* spp sur les feuilles détachées de fève correspond aux descriptions faites par de nombreux auteurs concernant les symptômes caractérisant la maladie tache chocolat associée aux deux espèces *Botrytis fabae* et à *Botrytis cinerea* (Harrison, 1988 ; Messgo, 1999 ; Rhaïem *et al.*, 2002 ; Salhi, 2004).

Les lésions de *Botrytis* ont été induites sur les feuilles de fève au bout 1,7 jours. Bouhassan *et al.* (2003) ont rapporté que la période d'incubation de *Botrytis fabae* sur fève (variété Aguadulce) était de 11 heures environ en comparaison avec celle de *Botrytis cinerea* qui dure davantage. Les isolats de la fève de notre collection ont affiché une période d'incubation de plus de 24 heures. Cette différence laisse penser que nos isolats appartiennent à l'espèce *Botrytis cinerea* comme le suggère les données morphologiques.

La période de latence et le nombre de spores obtenus se rapprochent de ceux de Bouhassan *et al.* (2003) et Rhaïem *et al.* (2002). Par contre, il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres. Dans le cas où la plante résiste, la période de latence est retardée et le nombre de spores réduit, ce qui ne correspond pas à certains résultats obtenus durant notre essai. Ceci pourrait suggérer l'intervention de contrôles génétiques à différentes échelles comme l'avancent certains auteurs (Roumen et De Boef, 1993 ; Broers, 1997).

L'isolat BOA01 de l'oignon a également induit la production de spores alors qu'il a été supposé appartenir à l'espèce *Botrytis aclada*. La littérature indique que les espèces de *Botrytis* associées au genre *Allium* se limitent au genre en question (Lacy et Lorbeer, 1995). Cependant, Tichelaar (1967) a observé des colonies de *Botrytis allii* sur des débris décomposés de lin, de luzerne, de haricot et de pois, alors que Chilvers (2003) a démontré qu'en absence de compétition, *Botrytis allii* était capable de coloniser des tissus sains et de sporuler abondamment sur des feuilles stérilisées de *Papaver somniferum*.

Les diamètres des lésions et les valeurs AUDPC obtenus lors de ce test se sont avérés importants pour l'étude du pouvoir pathogène des isolats de notre collection. Les différences deviennent de plus en plus significatives en fonction du temps, elles suggèrent ainsi que les mécanismes de défense des feuilles s'enclenchent suite à la pénétration et durant les différentes phases de l'infection et s'expriment différemment selon le pouvoir pathogène de l'isolat et la réceptivité de l'hôte comme l'avancent plusieurs auteurs (Bouhassan *et al.*, 2003; Bouhassan *et al.*, 2004 ; van Kan, 2006).

Nos observations ont indiqué que plus la progression du diamètre des lésions étaient lente et limitée plus les valeurs des AUDPC étaient faibles. Les isolats concernés par ces valeurs (BVA01, BOA01, BVB02, BOA02) sont donc les moins agressifs. Des résultats similaires ont été obtenus par Bouhassan *et al.* (2003, 2004) et Rhaïem *et al.* (2002) lors d'essais de sélection de génotypes de fève résistants à *Botrytis fabae*. Les raisons peuvent être liées à des phénomènes de résistance des feuilles qui ralentissent ou stoppent la progression de la maladie immédiatement après l'initiation de l'infection. On pourrait supposer l'implication des phytoalexines (wyerones et dérivés) qui sont synthétisées par la fève et dont l'accumulation au niveau des tissus infectés inhibe la

progression du pathogène et particulièrement celle de *Botrytis cinerea* (Mansfield et Deverall, 1974 ; Mansfield, 1980, Mansfield, 1982, EL Hawa, 1998).

L'analyse des valeurs AUDPC indique que les isolats les plus agressifs proviennent de la fève et du haricot alors que les autres isolats se sont montrés modérément agressifs. Ceci suggère l'existence d'une spécificité à l'hôte au sein *Botrytis cinerea* comme l'avancent certains auteurs (Sundheim, 1973 ; Ondrej, 1973). Des études approfondies sont préconisées pour comprendre les interactions hôte/pathogène.

IV.2.3. Cas du haricot

Les résultats obtenus lors de l'inoculation des isolats de *Botrytis* spp. sur les feuilles détachées de haricot sont présentés en Tableau 16.

Tableau 16. Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de *Botrytis* spp. sur feuilles détachées de haricot.

Isolats	Période d'incubation (Jours)	Période de latence (Jours)	Nombre de spores (spores/ml/feuilles)	AUDPC des	Lésions
BVA01	2,2	8,2	92 x 10 ³	50,1	
BVA02	2,2	8,2	107 x 10 ³	42,8	
BVB01	3	8	13,4 x 10 ³	36	
BVB02	2,4	7	135 x 10 ³	55,6	
BVT01	2,5	-	-	32,9	
BVZ01	-	-	-	-	
BVZ02	-	-	-	-	
BVZ03	-	-	-	-	
BFK01	-	-	-	-	
BFB01	2,6	-	-	22,7	
BFT01	-	-	-	-	
BFA01	-	-	-	-	
BFA02	2,7	-	-	12,4	
BFA03	-	-	-	-	
BTA01	-	-	-	-	
BTA02	2,4	8,2	168 x 10 ³	42,5	
BOA01	-	-	-	-	
BOA02	-	8	220 x 10 ³	-	
BHB01	2,2	7	214 x 10 ³	76,6	
BHA01	2,2	8,2	318 x 10 ³	91,7	

IV.2.3.1. La période d'incubation

L'inoculation artificielle des feuilles détachées de haricot a induit 10 réactions compatibles. La période d'incubation a varié entre 2 et 3 jours. Les sites témoins inoculés avec l'eau distillée stérile n'ont présenté aucune lésion sous la goutte d'eau. L'analyse de variance de l'effet des isolats sur la période d'incubation ne montre pas de différences significatives. Cependant, le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a permis de scinder les isolats en deux groupes (Annexe 15).

IV.2.3.2. La période de latence

Seuls 8 isolats de la collection ont induit une sporulation. Les isolats BVB02 de la vigne et BHB01 du haricot ont initié les premières fructifications au 7^{ème} jour de notation. Le reste des isolats a produit des spores entre le 8^{ème} et le 9^{ème} jour. L'analyse de variance de la période de latence des isolats ayant sporulé n'a pas relevé de différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a permis de classer les groupes non significativement différents (Annexe 16).

IV.2.3.3. Le nombre de spores

Une grande variabilité a été notée pour le nombre de spores, l'isolat BHA01 du haricot a sporulé à hauteur de 318×10^3 spores/feuille alors que l'isolat BVB01 de la vigne a affiché le nombre de spores/feuille le plus faible avec seulement $13,4 \times 10^3$ spores/feuille. Des valeurs intermédiaires ont été notées pour le reste des isolats. Nous avons constaté que l'isolat BOA02 de l'oignon a initié une sporulation abondante alors qu'aucune lésion nécrotique sous la goutte de l'inoculum n'a été observée. L'analyse de variance de la production de l'effet des isolats sur le nombre de spores/feuille a indiqué une différence significative. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a permis de classer les groupes non significativement différents (Annexe 17).

IV.2.3.4. Le diamètre des lésions

Les lésions se sont d'abord formées sous la goutte de l'inoculum et sont circulaires ou aux contours irréguliers avec un aspect desséché, huileux ou translucide (Figure 12). La couleur a varié du marron chocolat au marron clair. Dans certain cas, des lésions secondaires se sont propagées sur l'ensemble de la feuille sous forme de mouchetures. Certains isolats ont induit des lésions à progression rapide à l'image des isolats du haricot BHB01 et BHA01. Ces mêmes isolats ont présentés les valeurs d'AUDPC les plus élevées. D'autres isolats tels que ceux de la vigne et de la tomate ont induit des lésions à progression moins rapide avec des diamètres moins importants. Les deux isolats de la fève BFB01 et BFA02 ont induit des lésions à progression lente avec des diamètres qui n'ont pas dépassé les 7 mm au 9^{ème} jour d'observation. Ils ont par ailleurs affiché les valeurs d'AUDPC les plus faibles. L'analyse de variance des AUDPC des diamètres de lésions a indiqué que les différences ne sont pas significatives. Par ailleurs, le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a permis de classer les isolats dans des groupes différents (Annexe 18).

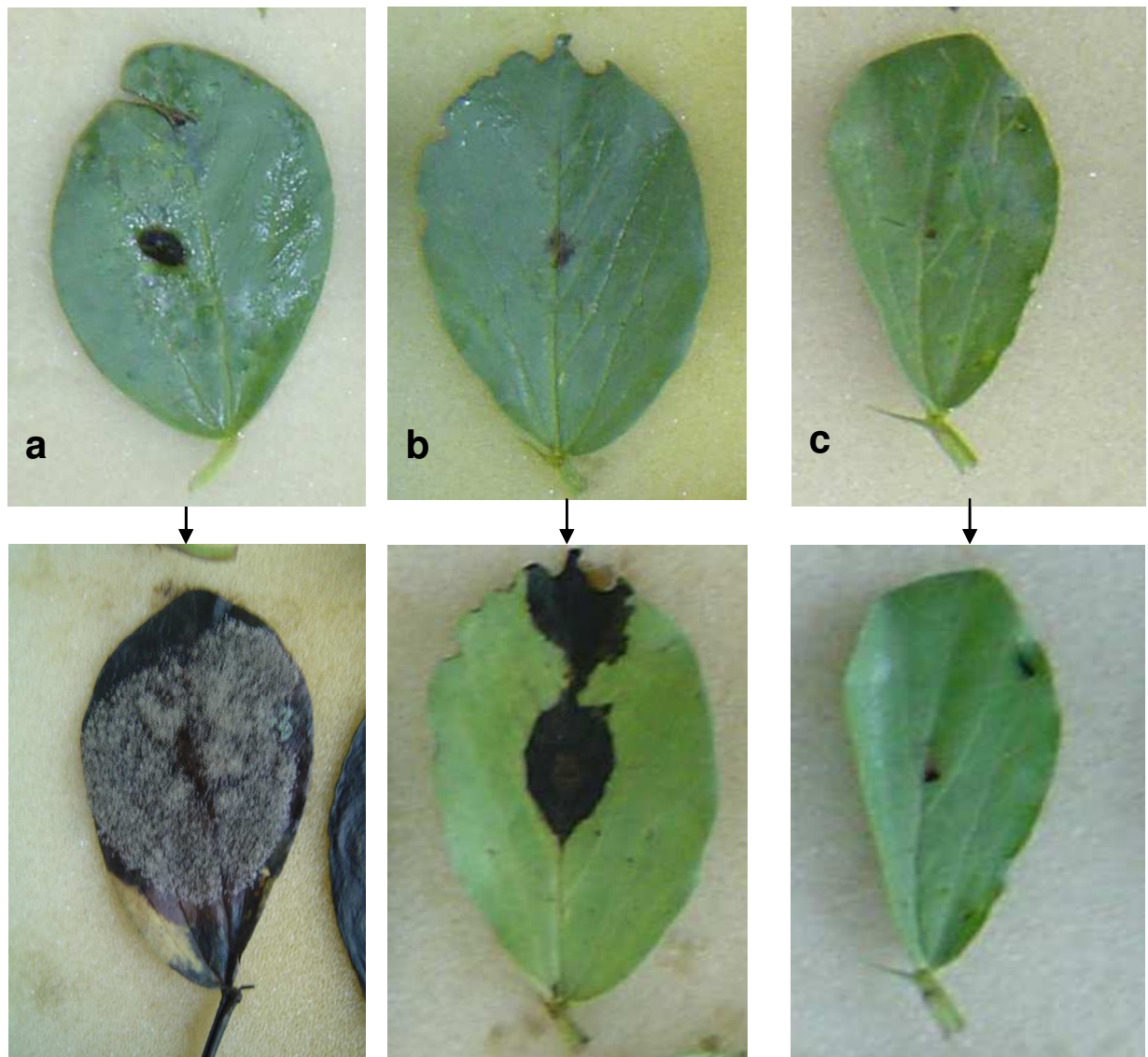


Figure 9. Progression des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de fève.
a: Feuille de fève inoculée avec l'isolat BFB01, **b:** Feuille de fève inoculée avec l'isolat BFA01, **c:** Feuille de fève inoculée avec l'isolat BOA01.

IV.2.3.5. Discussion

Les lésions nécrotiques sont apparues sous forme de brunissements circulaires à l'aspect aquifère et huileux, ces observations s'accordent avec les descriptions rapportées dans la littérature (van den Heuvel et Grootveld, 1980 ; Ten Have *et al.*, 1998 ; Muckenschnabel *et al.*, 2001 ; Cotoras et Silva, 2005 ; Segmüller *et al.*, 2007).

Les lésions sont apparues au 2^{ème} jour d'incubation en moyenne. Cependant, il est possible que le processus infectieux à l'échelle microscopique ait débuté plus tôt si l'on se réfère à Ten Have (2002) qui rapporte que l'infection primaire de *Botrytis cinerea* est visible environ 12 heures après l'inoculation. La période d'incubation a légèrement varié entre les isolats et les différences ne sont pas significatives. Cependant, les isolats de la fève ont présenté des périodes d'incubation plus longues que ceux de la vigne et du haricot.

La période de latence est peu variable entre les isolats, ce qui laisserait supposer que la sporulation survient indépendamment de l'agressivité ou de l'origine de l'isolat comme l'avancent certains auteurs (Roumen et De Boef, 1993; Prins, 2001) qui soutiennent que la période de latence ne peut pas indiquer à elle seule si l'isolat est virulent ou pas.

Le nombre de spores/feuille indique une variabilité significative qui semble indépendante de l'agressivité des isolats contrairement à ce qu'avance Broer (1997) qui estime que la sporulation est un indicateur de virulence de l'isolat. L'âge des feuilles ainsi que leur état physiologique ont pu avoir une influence sur la sporulation. Le phénomène a été observé lors de nombreuses interactions plante/pathogène (Creighton *et al.*, 1986 ; Masterbroek et Balkema-Boomstra, 1991 ; Roumen, 1992). A la fin de la période de notation, il est apparu que les feuilles fragilisées et sénescentes ont été plus favorables à la sporulation qu'à la pénétration dans la mesure où l'isolat BOA01 de l'oignon a induit une sporulation abondante alors qu'aucune lésion n'a été observée au cours du test, confirmant ainsi le caractère opportuniste du champignon.

Les valeurs AUDPC ont varié considérablement d'un isolat à un autre. Les isolats de la fève ont été les moins agressifs avec des lésions peu étendues et limitées par un halo chlorotique sous-jacent aux tissus infectés évoquant une réaction d'hypersensibilité induite. Dans ce cas, la progression du pathogène peut être ralentie par des protéines inhibitrices des polygalacturonases (PGIP) synthétisées par les feuilles de haricot comme l'ont suggéré Albersheim et Anderson (1971). Manfredini *et al.* (2005) ont soupçonné leur intervention dans l'expression de la réaction de défense gène pour gène dans l'interaction hôte/pathogène. D'autre part, l'implication des phaseollines n'est pas exclue. Leur accumulation dans les tissus infectés est fortement corrélée avec la résistance du haricot vis-à-vis de *Botrytis cinerea* (van den Heuvel et Grootveld, 1980).

L'isolat supposé appartenir à l'espèce *Botrytis aclada* a produit une interaction incompatible constatée par l'absence de lésions nécrotiques. Ce fait pourrait confirmer d'une part l'identification de l'espèce effectuée à partir des critères morphologiques et d'autre part la possibilité de discriminer entre certaines espèces du genre *Botrytis* sur la base de la spécialisation parasitaire comme l'indique Hennebert (1973) et Prins *et al.* (2000).

IV.2.4. Cas de la tomate

IV.2.4.1. La période d'incubation

Parmi les 20 isolats de la collection, 12 ont induit des lésions nécrotiques sur les feuilles détachées de tomate suite à l'inoculation artificielle (Tableau 17). Par contre, aucune sporulation n'a été observée durant la période de notation et les sites infectés ont produit un résultat négatif y compris les sites témoins.

Tableau 17. Périodes d'incubation et AUDPC des isolats de la collection de *Botrytis* spp. sur feuilles détachées de tomate.

Isolats	Période d'incubation (Jours)	AUDPC des Lésions
BVA01	3,2	12,4
BVA02	-	-
BVB01	-	-
BVB02	3,2	20,6
BVT01	-	-
BVZ01	3,4	16,95
BVZ02	3,4	10
BVZ03	3,2	29,9
BFK01	3	33
BFB01	3,2	31,5
BFT01	3	16
BFA01	3,2	18,3
BFA02	-	-
BFA03	3,2	14,3
BTA01	-	-
BTA02	3	44
BOA01	-	-
BOA02	-	-
BHB01	-	-
BHA01	2,2	29,3

La période d'incubation a peu varié et s'est située entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour, où 41% des sites inoculés ont été infectés. Les isolats BHA01 du haricot, BTA02 de la tomate, BFT01 et BFZ01 de la fève ont présenté la période d'incubation la plus courte. Ils ont été suivis par les isolats de la vigne et de la fève. Les sites témoins n'ont présenté aucune lésion sous la goutte d'eau. L'analyse de variance de l'effet des isolats sur la période d'incubation ne montre pas de différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a regroupé les 12 isolats dans le même groupe (Annexe 19).

IV.2.4.2. Le diamètre des lésions

Les lésions sont apparues comme de petites taches discrètes, elles s'étendent lentement et sont souvent entourées d'une zone aquifère à l'aspect huileux. Dans d'autres cas, les lésions sont auréolées par un halo chlorotique plus ou moins étendu (Figure 13).

L'isolat BTA02 de la tomate a affiché la progression la plus rapide avec les diamètres les plus importants du 2^{ème} au 9^{ème} jour. Il a également présenté la valeur AUDPC moyenne la plus élevée. Des isolats comme BVZ03 de la vigne, BFZ01 et BFB01 ont induits des lésions moins étendues avec une progression moins rapide. Les lésions induites par l'isolat BOA01 de l'oignon ont été entourées d'un halo chlorotique apparent. Les lésions induites par les isolats BVA01 et BVZ02 de la vigne ont présenté la progression la plus lente avec les valeurs AUDPC les plus faibles. L'analyse de variance de l'effet des isolats sur l'AUDPC des diamètres de lésions a indiqué des différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a classé les isolats dans 3 groupes homogènes (Annexe 20).

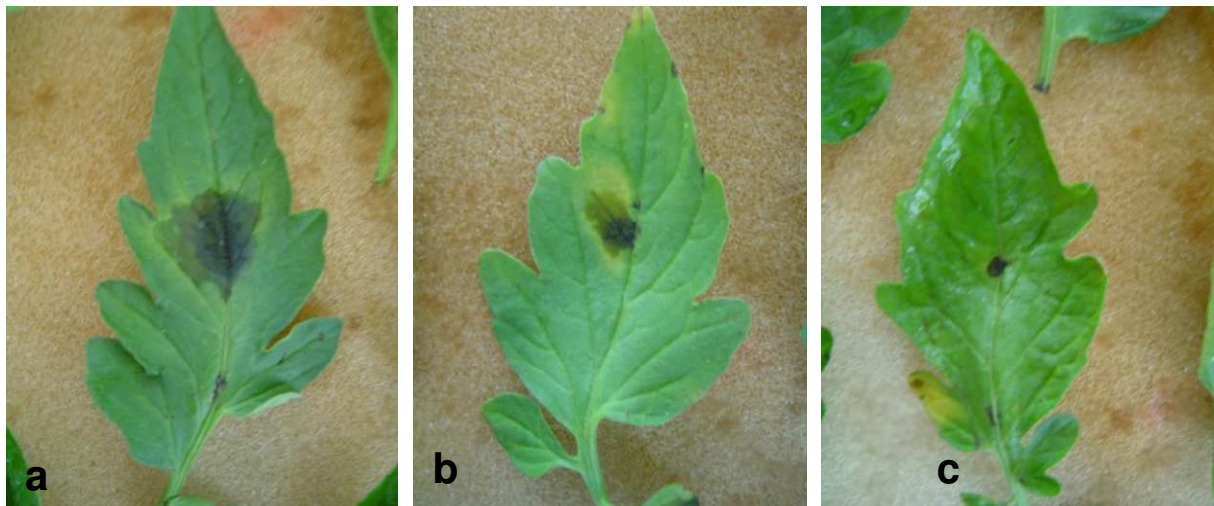


Figure 11. Types de lésions induites par les isolats BTA01, BOA01 et BVB. **a:** Lésion à contours huileux, **b:** Lésion entourée d'un halo chlorotique **c:** Lésion discrète à progression limitée.

IV.2.4.3. Discussion

La tomate (*Lycopersicon esculentum*. L) est sujette aux attaques de *Botrytis cinerea*. Ce couple hôte/pathogène a fait l'objet de nombreuses études (van Kan *et al.*, 1997 ; Com ménil *et al.*, 1998 ; Benito *et al.*, 1998 ; Diaz *et al.*, 2002) compte tenu de l'importance des dégâts causés sur cette culture.

L'aspect des lésions induites correspond à celui décrit par de nombreux auteurs ayant étudié des pathosystèmes similaires (Verhoeff, 1970 ; Ten Have *et al.*, 1998 ; Benito *et al.*, 1998 ; Ten Have, 2000 ; Elad *et al.*, 2004). Les lésions nécrotiques ont été visibles à l'œil nu au 3^{ème} jour en moyenne, la même période a été rapportée par Ten Have *et al.* (1998, 2000). En revanche, la période d'incubation de *Botrytis cinerea* sur des feuilles de tomate est plus courte si l'on se réfère à d'autres travaux (Cotoras et Silva, 2005). Cet écart de temps pourrait être éclairci avec une étude microscopique approfondie des premières phases d'adhésion, de germination et de pénétration de nos isolats. La période d'incubation a peu varié, cependant, des différences de 24 heures ont été relevées entre l'isolat de la tomate et quelques isolats de la vigne. Des différences similaires ont été rapportées par Cotoras et Silva (2005).

La sporulation est considérée comme un segment fondamental dans le processus infectieux d'un pathogène nécrotrophe et correspond à la phase où le champignon se multiplie pour assurer la perpétuation de son cycle biologique (Tenberge, 2004 ; van Kan, 2006). Or, durant notre test, cette phase ne semble pas avoir été atteinte. Les raisons peuvent être attribuées à une résistance de la plante hôte. Dans ce cas, on pourrait supposer l'intervention de l' α -tomatine à laquelle on attribue une action fongistatique (Sandrock et VanEtten, 1998 ; Friedman, 2002) et insecticide (Kowalski *et al.*, 2000). Verhoeff et Liem (1975) ont rapporté que l' α -tomatine inhibait la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* et qu'elle était responsable du maintien du stade quiescent de *Botrytis cinerea* durant lequel la sporulation est stoppée (Quidde *et al.*, 1998).

Le pouvoir pathogène des isolats a varié. L'isolat de la tomate a été plus agressif vu que le diamètre de ces lésions était de 13 mm au 9^{ème} jour contrairement à celui de la vigne dont le diamètre des lésions ne dépassait pas les 3 mm au bout de la même période. Des résultats similaires ont été obtenus par Cotoras et Saliva (2005) qui ont constaté que sur des feuilles de tomate, les isolats de la tomate étaient nettement plus virulents que les isolats de la vigne et ont lié le phénomène à une sorte de spécialisation parasitaire qui pourrait exister entre les populations de pathogènes et les cultures à partir desquelles elles sont isolées.

Les isolats de la fève ont produit des lésions avec des degrés d'agressivité variables ce qui éloigne l'hypothèse de leur appartenance à l'espèce *Botrytis fabae*. Par ailleurs, l'isolat BOA01 supposé appartenir à l'espèce *Botrytis aclada* a produit une interaction négative avec les feuilles de tomate. Ce constat consolide d'avantage la caractérisation effectuée sur la base des critères morphologiques et culturaux.

IV.2.5. Cas de l'oignon

Les résultats obtenus lors de l'inoculation artificielle des feuilles d'oignon avec les isolats de la collection sont présentés en Tableau 18.

Tableau 18. Périodes d'incubation, de latence, nombre de spores et AUDPC des isolats de la collection de *Botrytis* spp. sur feuilles détachées d'oignon.

Isolats	Période d'incubation (Jours)	Période de latence (Jours)	Nombre de spores (spores/ml/feuilles)	AUDPC des Lésions
BVA01	4,6	6,6	31,4 x 10 ³	15,7
BVA02	4,4	6	40,6 x 10 ³	17,5
BVB01	3,8	-	-	68,7
BVB02	-	8,3	10,8 x 10 ³	-
BVT01	1,6	4,3	11,4 x 10 ³	62,5
BVZ01	4,8	-	-	5,5
BVZ02	4,2	5	49 x 10 ³	21,7
BVZ03	3	-	-	47,4
BFZ01	3	3,4	19,4 x 10 ³	82,8
BFB01	3,4	6	37,2	46,8
BFT01	-	-	-	0
BFA01	3,4	6	10 x 10 ³	13
BFA02	3	4,6	18 x 10 ³	33,75
BFA03	3,2	-	-	35,5
BTA01	-	-	-	-
BTA02	-	-	-	-
BOA01	1,2	6,6	27,4 x 10 ³	64,7
BOA02	3,8	6,3	16 x 10 ³	44
BHB01	4,3	-	-	40,8
BHA01	4,4	-	-	56,9

IV.2.5.1. La période d'incubation

Les lésions nécrotiques ont été induites sur les feuilles d'oignon 3 jours en moyenne après l'inoculation où 74% des sites inoculés ont été infectés à l'exception des sites inoculés avec les isolats BVB02, BFT01, BTA01 et BTA02. Les sites témoins n'ont présenté aucune lésion sous la goutte d'eau. L'analyse de variance de l'effet des isolats sur la période d'incubation a indiqué des différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a classé les isolats en groupes homogènes (Annexe 21).

IV.2.4.2. La période de latence

La sporulation a été initiée au centre des lésions ou aux extrémités des feuilles. L'isolat BVB02 n'a pas induit de lésions, néanmoins, une sporulation a été observée sur les extrémités des feuilles au 7^{ème} jour après l'inoculation.

L'analyse de variance de l'effet des isolats sur la période de latence a indiqué des différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) a classé les isolats en groupes homogènes (Annexe 22).

IV.2.5.3. Le Nombre de spores

Au terme de la période de notation, 64% des isolats inoculés sur les feuilles d'oignon ont induit une sporulation plus ou moins abondante indépendamment de la formation des lésions et de leur diamètre. L'isolat BVZ02 de la vigne a produit le plus de spores avec 49×10^3 spores/feuille suivis par l'isolat BVA02 de la vigne. Les isolats BFA02, BOA01, BVT01 et BVB02 ont produit une sporulation moyenne comprise entre 18×10^3 et 10^4 spores/feuille, avec la valeur la moins élevée pour l'isolat BFA01. L'analyse de variance de l'effet des isolats sur la période d'incubation a indiqué des différences significatives. Le test de comparaisons multiples de Fisher (LSD) avec un intervalle de confiance à 95% a classé les isolats en groupes homogènes (Annexe 23).

IV.2.5.4. Le diamètre des lésions

les lésions ont présenté une couleur à tendance aquifère ou huileuse (Figure 14). Les lésions induites par les isolats BVA01, BVA02 et BFA01 ont progressé de manière lente et régulière suivant une forme circulaire marquée alors que les isolats BVT01 et BFZ01 ont présenté des lésions à contours irréguliers et une progression rapide suivant les nervures longitudinales. Les isolats les plus agressifs sont ceux de la vigne, de l'oignon et de la fève, ils ont présenté les valeurs AUDPC les plus élevées. L'isolat BFA01 a présenté les valeurs les plus faibles reflétant la progression la plus lente. La comparaison des valeurs d'AUDPC a révélé une différence significative concernant l'effet des isolats sur la progression de la maladie et nous a permis de classer les isolats ayant induit des lésions en 4 groupes homogènes (Annexe 24).

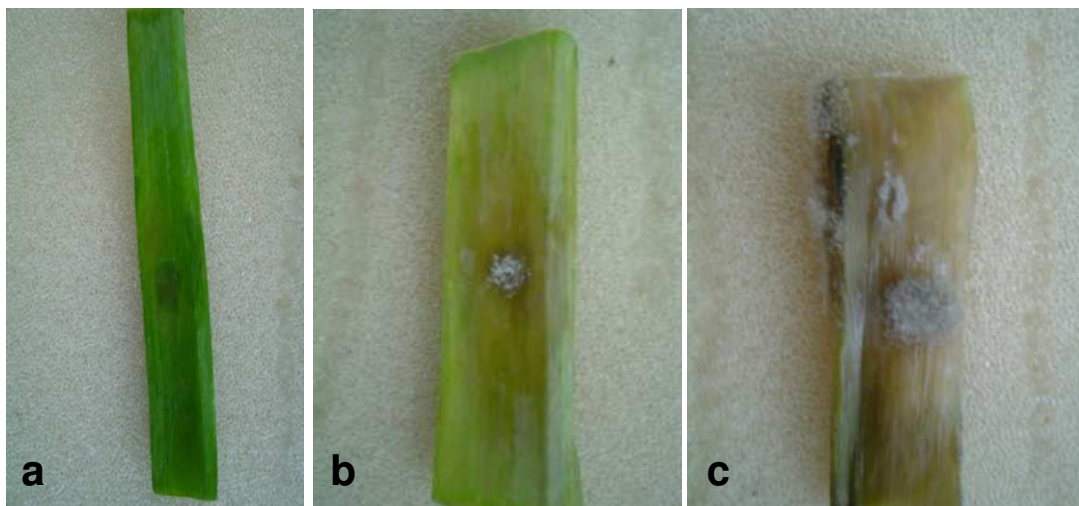


Figure 12. Types de lésions et sporulation de quelques isolats sur les feuilles détachées d'oignon. **a:** Lésion peu développée au contours réguliers. **b:** Lésion étendue à l'aspect huileux **c:** Sporulation au centre de la lésion et aux extrémité de la feuille d'oignon.

IV.2.5.5. Discussion

L'oignon (*Allium cepa* L.) est sensible aux attaques de plusieurs espèces de *Botrytis*. Les résultats obtenus lors de la confrontation des isolats de notre collection avec les feuilles détachées d'oignon ont permis d'observer une variabilité incontestable des paramètres étudiés pour chaque isolats.

L'aspect des lésions induites par les isolats de la collection correspond aux descriptions faites par d'autres auteurs concernant les symptômes de *Botrytis cinerea* et de *Botrytis aclada* sur les feuilles d'oignon (Stewart et Mansfield, 1984 ; Kucharek, 2006 ; Chilvers et du Toit, 2006).

La période d'incubation est de 3,5 jours en moyenne. Une moyenne similaire a été notée par Stewart et Mansfield (1984) avec *Botrytis allii* et *Botrytis cinerea*. L'isolat BOA01 supposé appartenir à l'espèce *Botrytis aclada* a présenté la période d'incubation la plus courte, ceci laisse supposer qu'il aurait eu plus de facilités à pénétrer son hôte que les autres isolats.

La période de latence a considérablement varié (de 3 à 8 jours) et s'est produite indépendamment de la présence de lésions nécrotiques. Le phénomène a été décrit par Chilvers et Du Toit (2006) qui rapportent que les espèces de *Botrytis* associées au genre *Allium* produisent des spores au bout d'une période variable dépendante de l'étendue des tissus infectés ainsi que de l'âge des plantes. Il est également admis que les tissus âgés et sénescents sont plus vulnérables à la colonisation par ces dernières (Lorbeer et Andaloro, 1983 ; Sutton *et al.*, 1984, 1990), ce qui a été observé durant notre étude.

Nous avons noté que la production de spores est plus importante lorsque les tissus sont détruits et présentent un état de macération avancé, ce qui s'accorde avec les observations de Kucharek (2000) et Chilvers *et al.* (2007). Ces résultats laissent supposer que la production de spores chez *Botrytis* dépend directement de sa capacité à pénétrer son hôte et à provoquer une macération des tissus, le phénomène a d'ailleurs été décrit par de nombreux auteurs (Lesley et Maude, 1984 ; Kucharek, 2000 ; Chilvers et du Toit, 2006). Nous avons également constaté que l'isolat de la vigne BVB02 a produit des spores au bout de 8 jours sur des feuilles où aucune lésion n'a été observée, ce qui confirme que la pénétration s'est faite vraisemblablement de manière passive à la faveur des altérations de la feuille en conditions artificielles.

A travers nos résultats, l'intensité de sporulation exprimée en nombre de spores/feuille n'apparaît pas comme un indicateur d'agressivité étant donné que ce sont les isolats qui ont présenté les valeurs d'AUDPC les plus faibles qui ont produit le plus de spores par feuille. A contrario, des isolats plus agressifs ont présenté des intensités de sporulation moindres. Ce phénomène peut être expliqué par la nature opportuniste de *Botrytis* qui s'exprime par ces tendances tantôt pathogène tantôt saprophyte comme l'indique la littérature (van Kan, 2006).

IV.3. CARACTERISATION GENETIQUE

IV.3.1. Contrôle de la qualité des ADN extraits

Le contrôle de la qualité de l'ADN obtenus se fait grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose. A ce stade, l'ADN précipité correspond à l'ADN total présent dans les cellules du champignon. Les extraits d'ADN de bonne qualité y sont représentés par des bandes intenses au sommet du gel, tandis que les bandes diffuses (smear) révèlent une légère dégradation de l'ADN. Après la migration sur le gel d'agarose, certaines bandes d'ADN sont apparues avec une intensité moyenne voir faible, ceci pourrait être dû à une présence d'ADN en faible quantité pour qu'il soit révélé de manière claire et évidente sur le gel. Les concentrations sont présentées en Tableau 24.

Tableau 24. Concentrations des ADN obtenus.

Isolat	Concentration (ng/μl)	isolat	Concentration (ng/μl)
BVA01	150	BFT01	100
BVA02	100	BFA01	100
BVB01	100	BFA02	150
BVB02	100	BFA03	100
BVT01	50	BTA01	100
BVZ01	100	BTA02	150
BVZ02	50	BOA01	100
BVZ03	50	BOA02	100
BFZ01	50	BHB01	150
BFB01	150	BHA01	100

IV.3.2. Etude du polymorphisme de l'ADN par les marqueurs RAPD

L'étude du polymorphisme génétique a été réalisée pour les 20 isolats de la collection de *Botrytis* spp. Lors de la migration des produits amplifiés, l'amorce OPF08 a été la seule à n'avoir pas produit d'amplification. Cette dernière ne semble pas être adaptée aux espèces de *Botrytis*. Les 3 amorces ayant produit une amplification ont permis d'observer des profils où 15 bandes ont été amplifiées, dont 11 bandes polymorphes.

L'amorce OPB01 a amplifié des bandes non polymorphes. Seulement 4 fragments ont été produits au total chez trois isolats de la fève. Les isolats BFZ01, BFB01 ont produit un même profil du type 1. L'isolat BFT01 se distingue des deux autres isolats par la bande 2 (750-1000 pb).

IV.3.2.1. Analyse des profils obtenus avec l'amorce OPB06

En ce qui concerne l'amorce OPB06, les profils ont reflété une variation entre 18 isolats exceptés pour les isolats BVZ02 et BFZ01 qui n'ont pas produit de fragments. Les différences d'intensité entre les bandes ont rendu difficile l'interprétation des résultats. Néanmoins, 7 profils différents ont pu être identifiés (Figure 17).

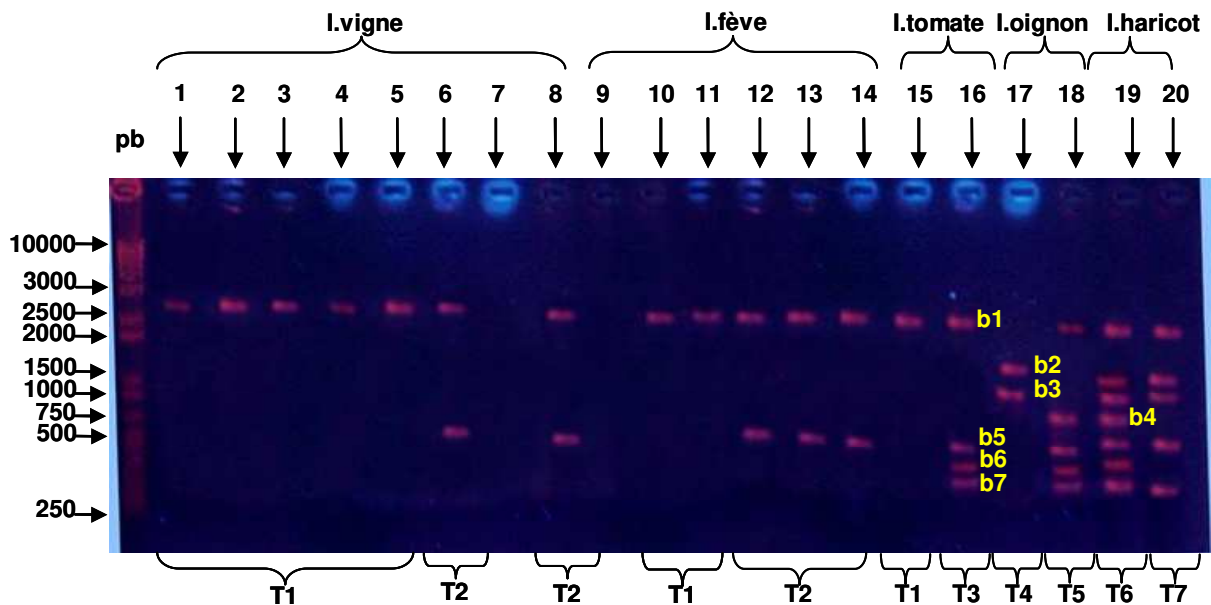


Figure 13. Profils électrophorétiques obtenus avec l'amorce OPB06. **I:** Isolats, **T:** Type de profil, **b:** Bande, **1:** BVA01, **2:** BVA02, **3:** BVB01, **4:** BVB02, **5:** BVT01, **6:** BVZ01, **7:** BVZ02, **8:** BVZ03, **9:** BFZ01, **10:** BFB01, **11:** BFT01, **12:** BFA01, **13:** BFA02, **14:** BFA03, **15:** BTA01, **16:** BTA02, **17:** BOA01, **18:** BOA02, **19:** BHB01, **20:** BHA01.

Le profil du type 1 est commun à 8 isolats de vigne (BVA01, BVA02, BVB01, BVB02, BVT01), 2 isolats de fève (BFB01 et BFT01) et 1 isolat de tomate (BTA01). 2 isolats de vigne (BVZ01 et BVZ03) issus de la région Est d'Alger (Tizi Ouzou) ainsi que 3 isolats de fève (BFA01, BFA02 et BFA03) de la région centre (Alger) ont présenté un profil de type 2. Les isolats de tomate (BTA02), d'oignon (BOA01) et de haricot (BHB01) ont présenté les profils respectifs de type 3, 4, 5, 6 et 7.

L'analyse des 7 profils a révélé que la taille des bandes obtenues varie entre 250 et 3000 pb. La bande 1 (2500-3000pb) est commune aux 18 isolats mis à part l'isolat BOA01 qui a présenté un profil de type 4. Par ailleurs, aucune bande caractéristique n'a été produite chez ce dernier. D'autres bandes peuvent être communes aux différents types de profils, comme c'est le cas pour la bande 5 (750 pb) que l'on observe chez certains isolats de vigne, de fève, de tomate et d'oignon ainsi que chez les deux isolats de haricot et ce, indépendamment de l'origine géographique des isolats. Les bandes 6 et 7 (entre 250 et 500 pb) ont été observées uniquement chez des isolats de tomate, d'oignon et de haricot et déterminent les profils de type 3, 5 et 6.

A un seuil de coupure de 70% de similitude, le dendrogramme a permis de différencier 3 groupes (Figure 18). Le groupe 1 réunit 5 isolats de vigne (Alger, Blida, Tipaza), 2 isolats de fève (Blida, Tipaza) et un isolat de tomate (Alger). Le groupe 2 rassemble 3 isolats de vigne (Tizi Ouzou) et 3 isolats de fève (Alger), un isolat de tomate BTA01 (Alger) et deux isolats d'oignon BOA01 et BOA02 (Alger). Le groupe 3 rassemble l'isolat de fève BFZ01 (Tizi Ouzou) et les deux isolats du haricot BHA01 et BHB01 (Alger, Blida).

L'analyse des groupes obtenus à un seuil de coupure de 78% de similitude a permis d'observer une diversité intra spécifique indépendante de la plante hôte si l'on considère que 19 isolats de la collection de *Botrytis* spp. appartiennent à l'espèce *Botrytis cinerea*. Par ailleurs, les deux isolats de l'oignon ont été rassemblés au sein du même sous groupe. Une diversité inter spécifique peut être évoquée vu que les données morphologiques et pathologiques indiquent que l'isolat BOA01 est proche des espèces *Botrytis aclada*, *Botrytis allii* et *Botrytis squamosa*.

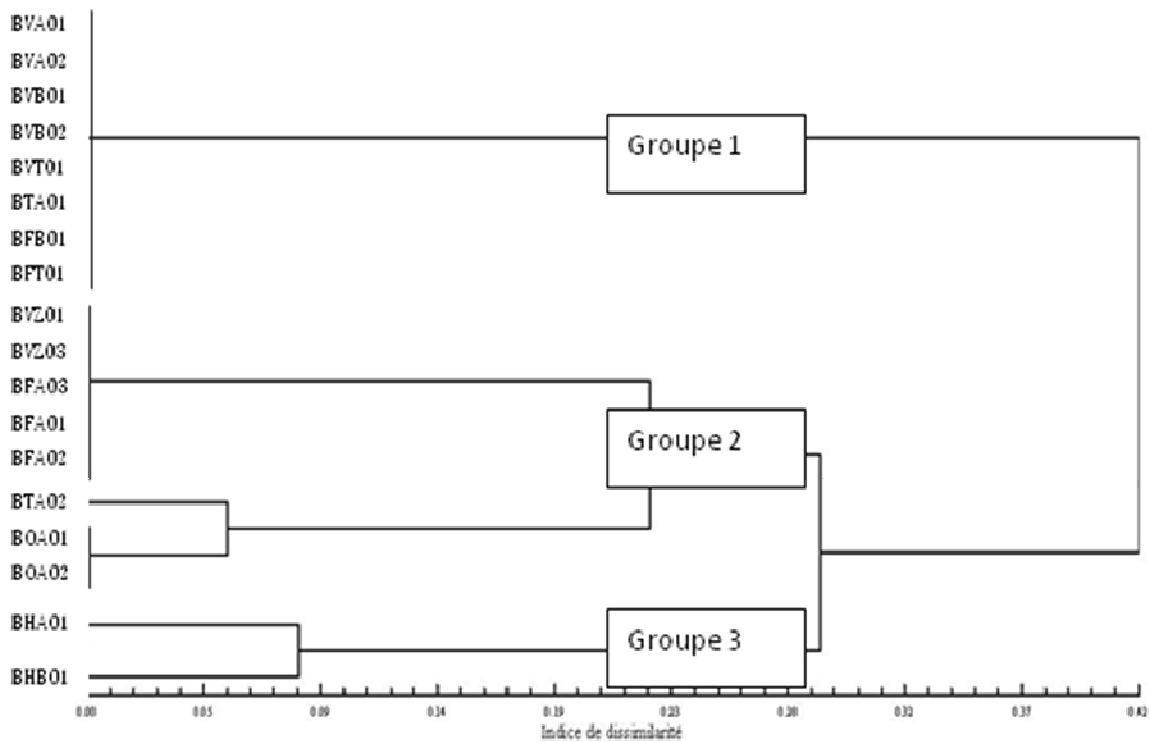


Figure 14. Dendrogramme obtenu avec l'amorce OPB06. Méthode UPGMA, Coefficient de Nei

IV.3.2.2. Analyse des profils obtenus avec l'amorce OPF04

Les profils obtenus avec l'amorce OPF04 ont montré une variation intra et inter spécifique (Figure 19). Les trois isolats BVT01, BFB01 et BHB01 n'ont pas produit de fragments.

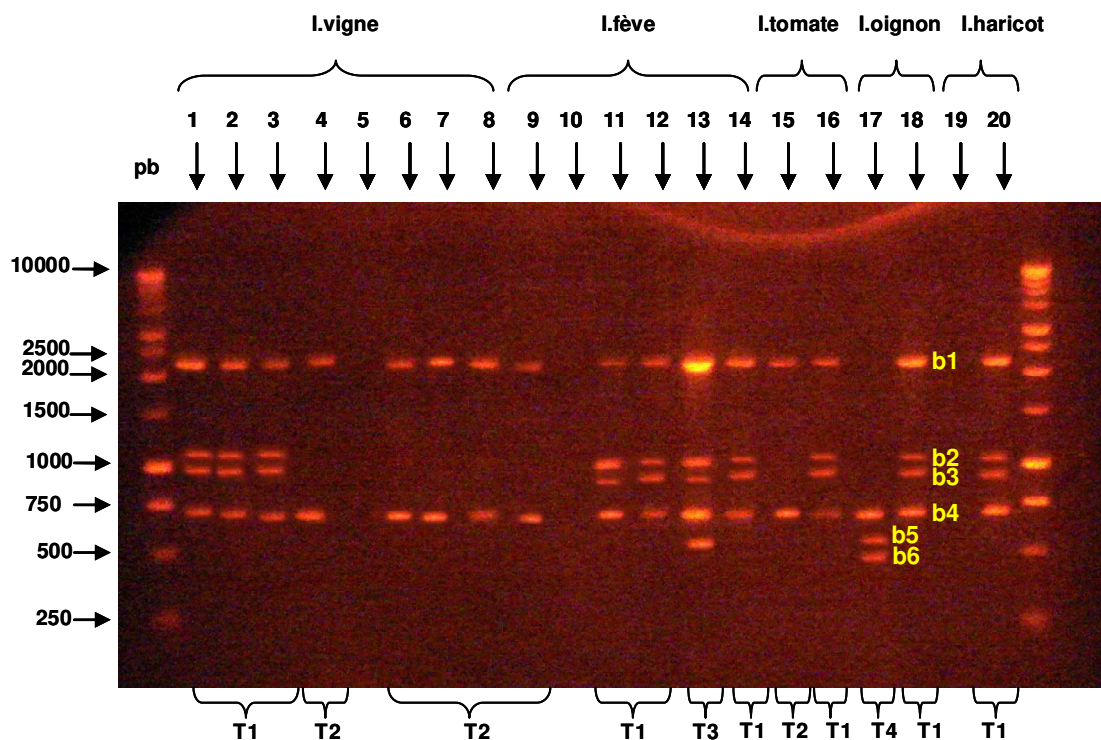


Figure 15. Profils électrophorétiques obtenu avec l'amorce OPF04. I: Isolats, T: Type de profil, b: Bande, 1: BVA01, 2: BVA02, 3: BVB01, 4: BVB02, 5: BVT01, 6: BVZ01, 7: BVZ02, 8: BVZ03, 9: BFZ01, 10: BFB01, 11: BFT01, 12: BFA01, 13: BFA02, 14: BFA03, 15: BTA01, 16: BTA02, 17: BOA01, 18: BOA02, 19: BHB01, 20: BHA01.

L'analyse des bandes a mené à l'identification de 4 profils distincts. Le profil du type 1 regroupe trois isolats de vigne (BVA01, BVA02 et BVB01), deux isolats de fève (BFT01 et BFA01), un isolat de tomate (BTA02) et un isolat de haricot (BHA01). Le profil du type 2 regroupe quatre isolats de vigne (BVB02, BVZ01, BVZ02 et BVZ03), un isolat de fève (BFZ01) et un isolat de tomate (BTA01). Les profils du type 3 et 4 sont respectivement représentés par les isolats BFA02 et BOA01 qui sont les seuls à avoir produit la bande 5 (environ 500 pb). On note également chez cet isolat l'absence de la bande 1 (2000- 2500 pb) qui est présente chez le reste des isolats. La bande 4 (750 pb) est commune à tous les isolats dont l'ADN a été amplifié alors que les bandes 2 et 3 (800 et 1200 pb) sont commune à seulement 50% des isolats.

Le dendrogramme obtenu pour l'amorce OPF04 à un seuil de coupure de 9% (Figure 20) a permis de distinguer clairement l'isolat de l'oignon BOA01 des isolats issus des autres cultures. A un seuil de coupure à 77% de similitude, le dendrogramme classe les isolats indépendamment de leurs plantes hôte d'origine. Cependant, les isolats de vigne ont été groupés différemment en fonction de leurs origines géographiques. Ces résultats indiquent que l'amorce OPF04 peut révéler une diversité inter spécifique entre *Botrytis cinerea* et d'autres espèces spécialistes de l'oignon qui semblent être génétiquement éloignées.

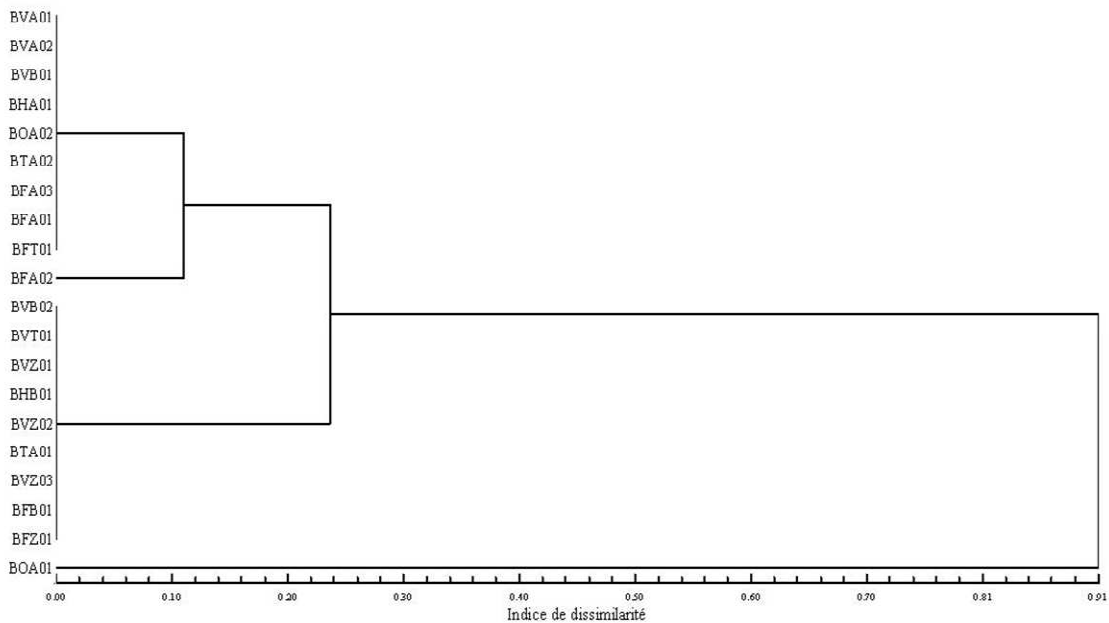


Figure 16. Dendrogramme obtenu avec l'amorce OPF04. Méthode UPGMA, Coefficient de Nei

IV.3.3. Discussion

L'étude du polymorphisme a été réalisée sur les 20 isolats de la collection de *Botrytis* spp. Suite aux étapes d'extraction de l'ADN, quatre amorces ont été choisies pour l'amplification des échantillons. Seules deux amorces ont produit des fragments qui ont exhibé une diversité intra et inter spécifique.

L'amorce OPF08 n'a produit aucun fragment lors de la révélation sur gel d'agarose. Il se pourrait que cette dernière ne soit pas adaptée pour l'étude des espèces du genre *Botrytis*. Cela indique de manière claire qu'une seule amorce n'est pas suffisante pour estimer la diversité génétique d'une population pathogène comme l'indiquent Van der Vlugt Bergman *et al.* (1993).

Les isolats BFZ01, BFB01 et BFT10 de la fève ont été les seuls à avoir généré des produits d'amplification avec l'amorce OPB01. Ces derniers se sont révélés monomorphes. Nos résultats ne correspondent pas à ceux obtenus par Salhi (2004) qui a utilisé la même amorce. Ceci peut être dû à des conditions de conservation inadéquates ayant altéré l'amorce lors de notre étude. Il serait intéressant de réutiliser l'amorce OPB01 avec un nombre d'échantillons plus élevé afin de lever les ambiguïtés liées aux résultats obtenus.

L'analyse des dendrogrammes montre que les isolats de la collection sont génétiquement proches. Les groupes ont été séparés à des seuils de coupures supérieurs à 70% de similitude, exception faite de l'isolat BOA01 qui s'est démarqué des autres isolats à un seuil de coupure de 9% avec l'amorce OPF04. Ce résultat s'accorde avec les données recueillies lors de l'étude des critères morphologiques et du pouvoir pathogène. Cependant des études plus poussées avec un nombre plus élevé d'isolats issus d'oignon et l'utilisation de marqueurs plus

spécifiques peuvent nous permettre de savoir si l'isolat en question correspond à *Botrytis aclada* ou à *Botrytis allii*. En effet, *Botrytis allii* est considéré comme un polyploïde résultant de l'hybridation inter spécifique entre le type AI de *Botrytis aclada* et *Botrytis byssoidae* (Nielsen et Yohalem 2001, Staats, 2007).

Les isolats de la fève se sont révélés génétiquement similaires aux autres isolats. Ceci consolide les données morphologiques qui nous ont permis de caractériser les 6 isolats de fève comme des *Botrytis cinerea*. Ça implique que *Botrytis cinerea* est plus répandu que *Botrytis fabae* dans les parcelles de fève visitées comme l'avancent Bouznad *et al.* (1998) qui ont montré qu'en Algérie, l'espèce *Botrytis cinerea* était dominante par rapport à *Botrytis fabae*, les conditions climatiques ont été évoquées comme un facteur important dans la répartition des deux espèces à travers le territoire.

De nombreux travaux ont montré que les populations de *Botrytis cinerea* sur vigne présentaient une diversité génétique intrinsèque importante due aux éléments transposables (Giraud *et al.*, 1997 ; Giraud *et al.*, 1998 ; Giraud *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2005 ; Muñoz *et al.*, 2002). Nos résultats indiquent une diversité génétique entre les isolats de vigne à un seuil de coupure de 77% de similitude avec l'amorce OPF04. En effet, deux isolats provenant de vignobles voisins ont été classés dans des groupes différents. Werlemark *et al.* (2006) expliquent ce phénomène par l'existence de subpopulations ou de races dans la zone de prélèvement. A contrario, le dendrogramme de l'amorce OPB06 à un seuil de coupure de 78% de similitude indique que les isolats de vigne provenant de la même région présentent des profils similaires. Le concept selon lequel *Botrytis cinerea* sur vigne soit un complexe de deux espèces jumelles vivant en sympatrie à travers une structure de subpopulations morphologiquement similaires et distinctes du point de vue génétique (Giraud *et al.*, 1999 ; Martinez *et al.*, 2005 ; Muñoz *et al.*, 2002) n'a pas encore été étudié en Algérie. Par contre, l'étude de la diversité génétique d'une population tunisienne de *Botrytis cinerea* par des marqueurs moléculaire a permis d'identifier les deux groupes *transposa* et *vacuma* (Dorsaf et Hamada, 2005). Un échantillonnage plus large permettrait sans doute d'approfondir nos connaissances concernant la dynamique des populations de *Botrytis cinerea* évoluant sur les vignobles Algériens.

Le croisement des données relatives à la taille des spores des isolats de la collection de *Botrytis* spp. avec le profil RAPD de l'amorce OPB06 indique des similitudes non négligeables dans le classement des isolats. En effet, les isolats BHB01, BHA01 et BFZ01 ont présenté les tailles de spores les plus petites et ont été classés dans le même groupe homogène, plus tard, le dendrogramme obtenu avec l'amorce OPB06 a révélé que ces mêmes isolats étaient très proches. Il se pourrait que l'amorce en question ait révélé une diversité génétique intra spécifique liée au phénotype des isolats. Par ailleurs, l'isolat BOA01 de l'oignon s'est distingué par des caractéristiques morphologiques peu communes consolidées par le profil de l'amorce OPF04 qui a permis de discriminer cet isolat à un seuil de coupure de 9% de similitude. Ces résultats indiquent que l'étude des caractères morphologiques est une étape importante dans l'étude des champignons pathogènes et que dans certains cas, elle peut se révéler utile pour discriminer les souches entre elles à l'échelle intra et inter spécifique comme l'indique Staats (2007).

Nous avons comparé les résultats obtenus à travers l'analyse des profils RAPD avec ceux obtenus lors de l'étude de la spécialisation parasitaire. Il est apparu que l'isolat BOA01 cause des lésions infectieuses uniquement sur les feuilles détachées d'oignon. L'analyse des profils RAPD a montré que l'isolat en question n'était pas similaire aux autres isolats. Cela indique que dans certains cas, il est possible d'identifier les espèces du genre *Botrytis* sur la base de leur spécialisation parasitaire comme l'indique Hennebert (1973) et Staats (2007). Il semblerait qu'il n'y est pas de lien direct entre les profils RAPD et le pouvoir pathogène des isolats de la collection. Kerssies *et al.* (1997) ont rapporté l'absence de relation évidente entre la pathogénicité des souches de *Botrytis cinerea* vis-à-vis des pétales de roses et les profils RAPD qu'elles génèrent.

Dans notre étude, nous avons utilisé 4 amorces. Deux d'entre elles ont généré des fragments polymorphes qui nous ont permis de distinguer l'isolat BOA01 des autres isolats. Sa provenance (feuilles et bulbes d'oignon), ses caractères morphologiques et son degré d'agressivité vis-à-vis des plantes hôtes testées ont suggéré que l'isolat BOA01 appartenait à une des espèces associées au genre *Allium*. De nombreux auteurs ont mis au point des techniques d'identification et de détection de ce groupe d'espèces. Nielsen *et al.*(1999) ont utilisé une technique PCR pour l'identification des deux espèces *Botrytis aclada* et *Botrytis allii* en se basant sur l'étude des régions ITS. Nielsen *et al.*(2002) ont également développé un système PCR-RFLP étudiant les régions SCAR afin d'identifier les 7 espèces de *Botrytis* associées aux plantes à bulbes. Chilvers *et al.* (2007) ont utilisé une technique de RT-PCR hautement spécifique pour détecter les espèces de *Botrytis* responsables de la pourriture du collet dans les semences d'oignon. Ce sont là autant de techniques que l'on pourrait appliquer pour approfondir nos connaissances vis-à-vis de ce groupe d'espèces.

V. CONCLUSION GENERALE

Les espèces du genre *Botrytis* sont d'importants pathogènes qui s'attaquent à de nombreuses cultures (légumineuses, cultures maraîchères, plantes ornementales, vigne, plantes à bulbes, essences forestières...etc). Les maladies qu'elles engendrent sont redoutées par les producteurs du monde entier en raison de l'importance des dégâts occasionnés durant la culture et des pertes enregistrées après la récolte et en cours de stockage. En Algérie, l'espèce polyphage *Botrytis cinerea* et l'espèce spécialisée sur les légumineuses, *Botrytis fabae* sont les plus étudiées, principalement du fait de leurs similarités morphologiques et symptomatiques. Par contre, il n'existe pas de données qui puissent permettre d'affirmer ou d'infirmer la présence d'autres espèces du genre *Botrytis* en Algérie. L'isolement et la caractérisation de certaines d'entre elles, sont susceptibles d'apporter un nombre important de données concernant la spécialisation parasitaire et les facteurs qui déterminent la virulence au sein du genre.

La caractérisation biologique basée sur l'étude des critères morphologiques et cultureux permet d'observer la grande diversité phénotypique à l'échelle intra et inter spécifique qui caractérise les espèces du même genre. C'est une étude simple et rapide à mettre en œuvre. Néanmoins, le manipulateur risque d'être confronté à des difficultés d'identification, surtout lorsque certaines espèces présentent des similarités morphologiques, comme c'est le cas pour les deux espèces *Botrytis cinerea* et *Botrytis fabae*.

L'étude morphologique et culturelle des isolats de la collection de *Botrytis* spp. a montré une grande diversité phénotypique indépendamment de l'origine géographique et de la plante hôte. Les résultats obtenus permettent de suggérer que les 19 isolats de la collection appartiennent à l'espèce *Botrytis cinerea* y compris les isolats issus de la fève et dont les caractéristiques morphologiques ne correspondaient pas à ceux de *Botrytis fabae*. Seul l'isolat BOA01 de l'oignon est supposé appartenir à l'espèce *Botrytis aclada*, en raison de son comportement cultural et de ses caractéristiques morphologiques typiques des espèces associées au genre *Allium*.

L'étude de la spécialisation parasitaire et du pouvoir pathogène des isolats de la collection de *Botrytis* spp. par la technique d'inoculation artificielle sur les feuilles détachées de la fève, du haricot, de l'oignon, de la tomate et de la vigne a permis d'observer une grande variabilité du pouvoir pathogène des isolats vis-à-vis des plantes hôtes testées. Dans certains cas, les résultats suggèrent un phénomène de spécialisation chez l'espèce *Botrytis cinerea*. Dans d'autres cas, le caractère nécrotrophe et saprophyte des espèces du genre *Botrytis* a été observé. Cette étude a permis également d'observer le comportement de l'isolat BOA01 qui s'est montré agressif sur les feuilles détachées d'oignon et peu ou pas agressif sur les feuilles détachées des autres plantes testées.

L'étude des caractères biologiques des champignons pathogènes est une étape cruciale en phytopathologie, elle permet d'observer la diversité morphologique et la variabilité du pouvoir pathogène, ce qui constitue un apport non négligeable dans l'identification des espèces. Cependant, les limites de cette méthode en termes de précision impliquent le recours à des techniques plus performantes et plus sensibles. L'outil moléculaire apparaît

alors comme un atout précieux en phytopathologie vue qu'il rend possible l'identification de chaque souche par des séquences nucléiques spécifiques. La diversité génétique au sein d'une population peut également être estimée à travers la similitude exprimée entre les différents isolats et ce sur la base du degré de polymorphisme de l'ADN pour chaque amorce.

Une des étapes charnières de toute caractérisation moléculaire est l'extraction de l'ADN, elle conditionne l'étude de la diversité génétique d'une population par le biais de marqueurs moléculaires adéquats. Durant notre étude, nous avons opté pour un protocole d'extraction d'ADN à base de SDS connu pour convenir aux espèces du genre *Botrytis*. Ce qui nous a permis d'obtenir des ADN de bonne qualité à des concentrations appréciables.

Les variations génétiques existantes au sein des 20 isolats de la collection de *Botrytis* spp. ont été étudiées par la technique RAPD. Sur les quatre amorces utilisées, deux seulement ont permis d'observer des fragments polymorphes. Une diversité inter et intra spécifique a été mise en évidence avec la distinction d'un isolat issu de l'oignon supposé appartenir à l'espèce *Botrytis aclada*. Les autres isolats sont supposés appartenir à l'espèce *Botrytis cinerea* conformément à leurs caractéristiques morphologiques et leurs similitudes génétiques. Les isolats ayant produit les spores les plus petites ont présenté des profils similaires. En revanche, la variabilité du pouvoir pathogène ne semble pas avoir de liens avec les profils RAPD obtenus.

En définitive, notre étude nous a conduit à recueillir des données importantes concernant la caractérisation morphologique, la spécialisation parasitaire, la variation du pouvoir pathogène et la diversité génétique de la collection de *Botrytis* spp. Elle ouvre des perspectives intéressantes pour des études ultérieures relatives à l'épidémiologie, l'interaction plante/pathogène, les mécanismes infectieux et la caractérisation moléculaire des populations algériennes de *Botrytis* spp. L'utilisation d'un nombre plus élevé d'amorces RAPD ainsi que l'exploration d'autres marqueurs plus puissants tels que les microsatellites, l'AFLP et la technique CAPS sont susceptibles d'étendre nos connaissances concernant les facteurs et les conditions qui rendent les espèces du genre *Botrytis* aussi préjudiciables vis-à-vis de plantes cultivées dans le monde entier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abou-Zeid N.M., G.A El-Morsy, Hassanein A.M. and S. Abdel-Rahman.1996. Variability and distribution of *Botrytis* Isolates in Egypt. Pp. 141-150. In : Proceeding du Symposium Régional sur les maladies des Céréales et des Légumineuses Alimentaires 11-14 novembre 1996, Rabat, Maroc.
- Abou-Zeid N.M., El-Hady M. and S.S. Abdel-Rahman. 1998. Pathogenic, Morphological and physiological variability in *Botrytis* spp. Affecting faba bean in Egypt. In: Part II – Workshop 3 – Genetic resources. 3rd European Conference on Grain Legumes. Valladolid.
- Agrios G.N. 1988. Plant pathology (3rd ed) Academic press, San Diego.
- Agrios G.N. 1997. Plant Pathology. (4th ed) Academic Press, 609 p. San Diego, USA.
- Albersheim P. and A.J. Anderson. 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 68: 1815-1819.
- Aleid J.D. and J.P. Wubben. 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In: Elad Y, Williamson B. Tudzynski P. and Delen N. (eds.) *Botrytis: Biology, Pathology, and Control* (pp. 319-333) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Anderson J.P. .1924. *Botrytis cinerea* in Alaska. *Phytopathology* 14: 152-155.
- Bakr M.A., M.M. Rahman, F. Ahmed and J. Kumar. 1993. Progress in management of *Botrytis* gray mold of chickpea in Bangladesh. In: Haware MP, Gowda CLL and McDonald D (eds) Recent Advances in Research in *Botrytis* Gray Mold of Chickpea, Second Working Group Meeting. (pp. 17-19), ICRISAT, Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- Bakr M.A., M.L. Rahman and A.U. Ahmed. 2002. Manifestation of *Botrytis* grey mould in chickpea in Bangladesh. In: Bakr MA, Siddique KHM and Johansen C (eds) Integrated Management of *Botrytis* Grey Mould of Chickpea in Bangladesh and Australia. Summary Proceedings of a Project Inception Workshop. (pp. 63-69) Bangladesh Agricultural Research Institute, Joydebpur, Gazipur, Bangladesh.
- Barnett H.L. et Hunter B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3^{ème} Edition. Ed by Burgess Publishing Company, 241 p.
- Barron G.L. 1977. The genera of Hyphomycetes from soil. Ed by Robert E. Krieger. 364p.
- Benito E.P., Ten Have A., Van't Klooster J.W. and J.A.L. Van Kan. 1998. Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 207-220.
- Berrie A. 1994. The importance of *Botrytis cinerea* as a storage rot of apple cv. Cox and pear cv. *Conference. Norwegian Journal of Agricultural Science*. 17: 383-389.
- Blaiseau P.L., Kunz C., Grison R., Bertheau Y. and Y. Brygoo. 1992. Cloning and expression of a chitinase gene from the hyperparasitic fungus *Aphanocladium album*. *Current Genetic* 21: 61-66.
- Bossi R. and F.M. Dewey. 1992. Development of a monoclonal antibody-based immunodetection assay for *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 41: 472-482.
- Bouhassan A., Sadiki M., Tivoli B. and N. El Khiati. 2003. Analysis by detached leaf assay of components of partial resistance of faba bean (*Vicia faba* L.) to chocolate spot caused by *Botrytis fabae* Sard.
- Bouhassan A., Sadiki M. and B. Tivoli. 2004. Evaluation of a collection of faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes originating from the Maghreb for resistance to chocolate spot (*Botrytis fabae*) by assessment in the field and laboratory. *Euphytica*. 135: 55-62.

- Bouznad Z., Corbiere R., Labdi M. et D. Spire. 1998. Apport des techniques biochimiques et moléculaires pour la caractérisation des champignons pathogènes des légumineuses a grosses graines, dans les pays du pourtour méditerranéen. In: Les légumineuses alimentaires méditerranéennes. 2^{ème} séminaire GRAM. 20 -22 février1997, Ed. I.N.R.A. Paris 1998.
- Braun P.G. and J.C. Sutton. 1987. Inoculum sources of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberries in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9: 1-5.
- Brett C. and K. Waldron. 1996. The cell wall and interactions with other organisms, in : M. Black B. Charwood (eds), *Physiol Biochem Plant Cell Walls*, Chapman & Hall, London, pp. 173-191.
- Brierley W.B. 1918. Microconidia of *Botrytis cinerea*. *Bull Misc Inf. Royal Bot Gard Kew* 4:129–146.
- Broers L.H.M. 1997. Components of quantitative resistance to yellow rust in ten spring bread wheat cultivars and their relations with field assessments. *Euphytica* 96: 215–223.
- Buchenauer H. 1988. Physiological in reactions the inhibition of plant pathogenic fungi. In: chemistry of plant protection. Berlin. Springer Verlag, p 217-292.
- Bunster L., Fokkema N.J. and B. Schippers. 1986. Effect of surface active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1340-1345.
- Burgess D.R., Bretag T.W., and P.J. Keane. 1997. Seed to seedling transmission of *Botrytis cinerea* in chickpea and disinfestation of seed with moist heat. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37: 223-229.
- Büttner P., Koch F., Voigt K., Quidde T., Risch S., Blaich R., Brückner B. and P. Tudzynski. 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* 25: 445-450.
- Cargnello G., Forno S. and S. Terzuolo. 1991. Research on the influence of agricultural techniques on epidemic patterns: investigations of grape training systems. *Vignevini* 18: 53-57.
- Cherif M., Amari I. and M. Harrabi. 1998. Morphological characterization of *Botrytis fabae* and *Botrytis cinerea* isolates from Tunisia. In: Part III - Posters – Diseases and pests. 3rd European Conference on Grain Legumes. Valladolid.
- Cole L., Dewey F.M. and C.R Hawes. 1998. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae*: penetration and post penetration processes. *New Phytologist* 139: 579-609.
- Chilvers M.I. 2003. Epidemiology of *Botrytis* spp. associated with neck rot of onion in northern Tasmania, Australia. PhD, Univ. of Tasmania, Burnie, Australia.
- Chilvers M.I. and L.J. Du Toit. 2006. Detection and Identification of *Botrytis* Species Associated with Neck Rot, Scape Blight, and Umbel Blight of Onion. *Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/ PHP-2006-1127-01-D*
- Chilvers M.I., Du Toit L.J., Akamatsu H., and T.L. Peever. 2007. A real-time, quantitative PCR seed assay for *Botrytis* spp. that cause neck rot of onion. *Plant Disease*. 91:599-608.
- Cole L., Dewey F.M., and C.R. Hawes. 1998a. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae*: I. The fungal extracellular matrix in penetration and post penetration processes. *New Phytol.* 139: 597–609.
- Cole L., Dewey F.M., and C.R. Hawes. 1998b. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae*: II. Host cell wall breakdown. *New Phytol.* 139: 611–622.
- Coley-Smith J.R. 1980. Introduction. Coley-Smith JR, Verhoeff K and Jarvis WR (eds) *The Biology of Botrytis*. (pp. vii-ix) Academic Press, London, UK.

- Colmenares A.J., Aleu J., Duran-Patron R., Collado I.G. and R. Hernandez-Galan. 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 997-1005.
- Comménil P., Belingheri L. and B. Dehorter. 1998. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 1-14.
- Corbett J.R., Wright K. and A.C. Baillie. 1984. The Biochemical Mode of Action of Pesticides – 2nd Edition. Academic Press, London, UK.
- Correll J.C. and T.R. Gordon. 1999. Population structure of Ascomycetes and Deuteromycetes. In: Worrall J.J. Structure and Dynamics of Fungal Populations. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 225-250.
- Cotoras M. and E. Silva. 2005. Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *Mycologia* 97(2): 485–492.
- Creighton N.F., Bainbridge A. and B.D.L. Fitt. 1986. Effects of leaf age, inoculum dose and freezing on development of chocolate spot (*Botrytis fabae*) lesions on field bean (*Vicia faba*) on leaves. *Journal of Phytopathology* 115: 108-115.
- Cutler H.G., Jacyno J.M., Harwood J.S., Dulik D., Goodrich P.D. and R.G. Roberts. 1993. Botcinolide: a biologically active natural product from *Botrytis cinerea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:980-1982.
- Daboussi M.J. 1996. Fungal transposable elements: generators of diversity and genetic tools. *Journal of Genetics* 75: 325-339.
- Delp C.J. 1995. Benzimidazole and related fungicides. In: Lyr H (ed.) Modern Selective Fungicides. Gustav Fisher Verlag, Jena, Germany: 291-303.
- Derckel, J.P., Baillieul F., Manteau, S., Audran, J.C., Haye, B., Lambert, B. and L. Legendre. 1999. Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89:197-203.
- Dewey F.M. 1996. Development of immunoassays for the detection and quantification of fungi. In: Proceedings of the NORFA/OECD Funded Workshop, Monitoring Antagonistic Fungi. Deliberately Released into the Environment. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark. Kluwer Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands: 139-146.
- Dewey F.M. and U. Meyer. 2004. Rapid, quantitative tube-immunoassay for on site detection of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Penicillium* antigens in grape juice. *Analytica Chimica Acta* 513: 11-19.
- Diaz J., Ten Have A. and J.A.L. Van Kan. 2002. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 129: 1341-1351.
- Dik A.J. and J.P. Wubben. 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and N. Delen. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 317–31.
- Diolez A., Marches F., Fortini D. and Y. Brygoo. 1995. *Boty*, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 103-108.
- Dorsaf B.A and HAMADA W. 2005. Genetic diversity of some Tunisian *Botrytis cinerea* isolates using molecular markers. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 44, no. 3, p. 300-306.

- Doss R.P., Deisenhofer J., Von Nidda H.A.K., Soeldner A.H. and R.P. McGuire. 2003. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63: 687-691.
- Douillet-Breuil A.C., Jeandet P., Adrian M. and R. Bessis. 1999. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4456-4461.
- Droby S., Chalutz E. and L. Wilson. 1991. Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News and Information* 2: 169-173.
- Edwards S.G. and B. Seddon. 1992. *Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage. In: Verhoeff K., Malathrakis N.E. and B. Williamson. Recent Advances in *Botrytis* Research. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands : 267-271.
- El-Hawa M.A. 1998. Induction of fungal disease resistance in Leguminosae. *Egyptian Journal of Microbiology* 33: 147-154.
- Elad Y., Shabi E. and T. Katan. 1988. Negative cross resistance between benzimidazoles and N-phenylcarbamate fungicides and control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Plant Pathology*. 37: 141-147.
- Elad Y. and H. Yunis. 1993. Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* 21: 257-268.
- Elad Y. 1995. Physiological factors involved in susceptibility of plants to pathogens and possibilities for disease control - The *Botrytis cinerea* example. In: Lyr D. Modern Fungicides and Antifungal Compounds. Intercept Ltd, Andover, Hampshire, UK : 217-233.
- Elad Y. 1997. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biological Reviews* 72: 381-422.
- Elad Y. and S. Freeman. 2002. Biological control of fungal plant pathogens. In: Kempken F. The Mycota, A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Vol. XI. Agricultural Applications. Springer, Heidelberg, Germany: 93-109.
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and N. Delen. 2004. *Botrytis*: Biology, Pathology and Control Dordrecht: Kluwer Academic Press : 29-52.
- Ellis M.B. and J.M. Waller. 1974a. *Sclerotinia fuckeliana* (conidial state: *Botrytis cinerea*). C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 431
- Elmer P.A.G. and T. Reglinski. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* 5 : 155-177.
- Engelbrecht R. 2002. The role of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, in *Botrytis* bunch rot on grape. MSc Agric thesis, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa.
- Epton H.A.S. and D.V. Richmond. 1980. Formation, structure and germination of conidia. In: Coley-Smith J.R., Verhoeff K. and W.R. Jarvis. The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London: 41-83.
- Erskine W., Tufail M., Russell A., Tyagi M.C., Rahman M.M. and M.C. Saxena. 1994. Current and future strategies in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73: 127-135.
- Faretra F., Antonacci E. and S. Pollastro. 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 134: 2543-2550.
- Faretra F. and E. Antonacci. 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediterranea* 26: 29-35.
- Faretra F. and S. Pollastro. 1991. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* 95: 943-951.

- Ferroud M. and R. Le Menn. 1989. Association of *Botrytis cinerea* with grape berry moth larvae. *Phytopathology* 79: 651-656.
- Ferroud M., Pieri P. and J.M. Liminana. 2001. *Botrytis* and micro-climates: propagation of *Botrytis cinerea* in grapes in controlled climatic conditions. *Phytoma* 543: 40-43.
- Friesen N., Fritsch R.M., Pollner S. and F.R. Blattner. 2001. Molecular markers in *Allium*: range of application, reliability and taxonomic implications. *Acta Horticulturae* 546: 159-163.
- Friesen N., Fritsch R.M., F.R. Blattner. 2006. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* L. (*Alliaceae*) based on nuclear rDNA ITS sequences. *Aliso* 22: 372-395.
- Fukumori Y., Nakajima M. and K. Akutsu. 2004. Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology* 70 (5): 256-260.
- Galet P. 1977. Les maladies et les parasites de la vigne. *Paysan du Midi* 2: 382-341.
- Giraud T., Fortini D., Levis C., Leroux P. and Y. Brygoo. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular and Biological Evolution* 14: 1177-1185.
- Glass N.L., Jacobson D.J. and P.K.T. Shiu. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* 34: 165-186.
- Goûrgûes M., Brunet-Simon A., Lebrun M.H. and C. Levis. 2004. The tetraspanin BcPls1p is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology* 51: 619-629.
- Govrin E.M. and A. Levine. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10: 751-757.
- Gregory P.H. 1949. Studies on *Sclerotinia* and *Botrytis* II. De Bary's description and specimens of *Peziza fuckeliana*. *Transactions British Mycological Society* 30: 1-13.
- Groves J.W. and Loveland C.A. 1953. Connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia* 45: 415-425.
- Guarro J., Gene J. and A. M. Stchigel. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (3): 454-500.
- Hanounik S.B. and L.D. Robertson. 1988. New sources of resistance in *Vicia faba* to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Plant Disease* 72: 696-698
- Hanounik, S.B. 1986. Screening techniques for disease resistance in faba bean. International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo, Syria. 59 pp.
- Hansen H.N. 1938. The dual phenomenon in imperfect fungi. *Mycologia* 30: 442-455.
- Harrison J.G. 1976. Biology of root diseases in field pea and bean. Scottish Horticultural Research Institute Annual Report for 1975. p52.
- Harrison J.C. 1988. The biology of *Botrytis* spp. on *Vicia* beans and chocolate spot disease. *Plant Pathology* 37: 168-201.
- Harrison J.G. 1983. Distinguishing between lesions caused by *Botrytis fabae* and *B. cinerea* on field bean leaves. *Transactions of the British Mycological Society*. 81:663-664.
- Hausbeck, M.K. and G.W. Moorman. 1996. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. *Plant Disease* 80: 1212-1219.

- Hennebert G.L. 1973. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* 7: 183-204.
- Hennebert G.L. and J.W. Groves. 1963. Three new species of *Botryotinia* on *Ranunculaceae*. *Canadian Journal of Botany* 41: 341-373.
- Hmouni A., Oihabi L., Badoc A. et A. Douira. 2003. Etude de la résistance de *Botrytis cinerea* aux Benzimidazoles, dicarboximides et Dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate de la région du gharb (Maroc). *Bull. Soc. Pharm* 142: 79-100.
- Holguín- Peña R. J. and F. G. Arcos. 2005. First report of gray mold in tomato caused by *Botrytis cinerea* in Baja California. Mexico. *Plant disease* 89 (5): pp 528.
- Holst-Jensen A., Vaage M. and T. Schumacher. 1998. An approximation to the phylogeny of *Sclerotinia* and related genera. *Nordic Journal of Botany* 18: 705-719.
- Holz G., Gütschow M., Coertze S. and F.J. Calitz. 2003. Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. *Plant Disease* 87: 351-358.
- Hammer P.E., Yang S.F., Reid M.S. and J.J. Marois. 1990. Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115:102-107.
- Islam S.Z., Honda Y. and M. Sonhaji. 1998. Phototropism of conidial germ tubes of *Botrytis cinerea* and its implication in plant infection processes. *Plant Disease* 82: 850-856.
- Janisiewicz W.J., Peterson D.L. and R. Bors. 1994. Control of apple storage decay with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Disease* 78: 466-470.
- Jarvis W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* Species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
- Jarvis W.R. 1980. Epidemiology. In: Coley-Smith J.R., Verhoeff K. and Jarvis, W.R. (eds) *The Biology of Botrytis*. (pp. 219-250) Academic Press, London, UK.
- Jellis G.J., Bond D.A. and R.E. Boulton. 1998. Diseases of faba bean. In: Allen DJ and Lenné JM (eds) *The Pathology of Food and Pasture Legumes*. (pp. 371-422) CAB International, Wallingford, UK.
- Karki P.B. 1993. Plant protection of lentil in Nepal. In: Erskine W and Saxena MC (eds) *Lentil in South Asia*. (pp. 187-193) ICARDA, Aleppo, Syria.
- Kenaoui A., et S. Lounis. 1998. Etude de la maladie «tache chocolat» sur fève : Implication des deux espèces *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea* dans l'expression de la maladie et comparaison du pouvoir pathogène des deux espèces sur fève. *Mém. Ing, I.N.A., EL- Harrach*. 69pp.
- Kerssies A., Bosker-Van Zessen A.I., Wagemakers C.A.M. and J.A.L. Van Kan. 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Disease* 81: 781-786.
- Kim W.G. and W.D. Cho. 1996. Developmental characteristics of gray mold in pepper. *J. Agric Sc. Crop Protection*. 38:466-472.
- Kowalski S.P., Domek J.M., Sanford L.L. and K.L. Deahl. 2000. Effect of alpha-tomatine and tomatidine on the growth and development of the Colorado potato beetle (Coleoptera: *Chrysomelidae*): studies using synthetic diets. *Journal of Entomological Science* 35: 290-300.
- Kucharek T. 2006. *Botrytis* Leaf Blight and Purple Blotch of Onions in Florida. *Plant Pathology Fact Sheet*. Pp-124.
- Labudova I. and L. Gogorova. 1988. Biological control of phytopathogenic fungi through lytic action of *Trichoderma* species. *FEMS Microbiology Letters* 52: 193-198.

- Lacy M. L. and J. W. Lorbeer. 1995. *Botrytis* neck rot. Pages 18-19 in: Compendium of Onion and Garlic Diseases. H. F. Schwartz and S.K. Mohan, editors. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Langcake P. and W.V. McCarthy. 1979. The relationship between resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18: 244-253.
- Legard D.E., Xiao C.L., Mertely J.C. and C.K. Chandler. 2000. Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant Disease* 84: 531-538.
- Leoux, P., Chapeland F., Desbrosses D. and M. Gredt. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18, 687–697.
- Leroux P., Debieu, D., Albertini C., Arnold A., Bach J., Chapeland F., Fournier E., Fritz R., Gredt M., Hugon M., Lanen C., Malosse C. and G. Thebaud. 2002a. The hydroxyanilide botryticide fenhexamid: mode of action and mechanisms of resistance. In: Dehne H.W., Gisi U., Juck K.H., Russel P.E. and Lyr H. (eds). *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III* (pp. 29-40) Agro Concept GmbH, Bonn, Germany.
- Leroux P., Fournier E., Brygoo Y. and Panon M. 2002b. Biodiversité et variabilité chez *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture gris. Nouveaux résultats sur les espèces et les résistances. *Phytoma* 554: 38-43.
- Leroux P., Chapeland F., Desbrosses D. and M. Gredt. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18: 687-697.
- Leroux P. and D. Moncomble. 1993. Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne. passé, présent, futur (1ère partie). *Phytoma* 450 : 27-30.
- Leroux P. 1984. La résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides : conséquences de l'intensification de la lutte chimique ? *Déf. Vég.* 38 (227), 135-145.
- Lesley C. and R. B. Maude 1984. Laboratory tests for leaf resistance to *Botrytis squamosa* in onions. *Annals of Applied Biology*. 105 (2): 277 – 283.
- Levis C., Fortini D. and Y. Brygoo. 1997. Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Current Genetics* 32:157-162.
- Lindbeck K.D., Bretag T.W. and M.A. Materne. 2003. Breeding for resistance to *Botrytis fabae* in Australian lentils. Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, p. 29
- Lorbeer J.W, Seyb A.M., de Boer M. and J.E. Van Den Ende. 2004. *Botrytis* Species on Bulb Crops. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds), pp. 273–289. Dordrecht: Kluwer Academic Press.
- Lorbeer J.W. and J. Andaloro. 1983. Diseases of onion. *Botrytis* leaf blight, Vegetable Crops (pp. 737.10) New York State Agricultural Experimental Station, NY, USA.
- Lorbeer J.W. 1980. Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Coley-Smith JR, Verhoeff K and Jarvis WR (eds) *The Biology of Botrytis* (pp. 19-40) Academic Press, London, UK.
- Louanchi M., Bouznad Z., Allala L., Merabti N., Maatougui M.E.H., Labdi M. et A. Ouffrouk. 2001. Caractérisation biologique, biochimique et moléculaire de *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea*, agents de la maladie « tache chocolat » de la fève (*Vicia faba*) en Algérie. In : Book of poster Legumed. Grain Legumes in the Mediterranean Agriculture 25, 26 et 27 Octobre, IAV Hassan II, Rabbat, Morocco.
- Louis C., Girard M., Kuhl G.. and M. Lopez-Ferber. 1996. Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology* 86: 934-939.
- Lurie S., Powell A.L.T., Dewey F.M., Martin R., Labavitch J.M. and A.B. Bennett. 2003. Endogenous expression of cell wall enzymes in tomato fruit affects decay development. Abstracts of the XI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions July 18-27, 2003, St Petersburg, Russia, p. 256.

- Lyon G.D., Goodman B.A., B. Williamson. 2004. *Botrytis cinerea* perturbs redox processes as an attack strategy in plants. In Y Elad, B Williamson, P Tudzynski, N Delen, eds, *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 119–141.
- Mabsoute L., et E.M. Sadaoui. 1996. Maladies cryptogamiques de la fève au Maghreb. In : Proceedings rehabilitation of faba bean. Ed. By Bertenbreiter WF et Sadiki M. Actes Ed. Rabat (Marocco). 17-32.
- Madden, L.V., G. Hughes and F. van den Bosch, 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. *American Phytopathology Society*, Minnesota, USA., pp: 107.
- Manfredini C., Sicilia F., Ferrari S., Pontiggia D., Salvi G., Caprari C., Lorito M. and G. De Lorenzo. 2005. Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. *Physiol Mol Plant Pathol* (in press).
- Mansfield J.W. and B.J. Deverall. 1974. The rates of fungal development and lesion formation in leaves of *Vicia faba* during infection by *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Annals of Applied Biology* 76: 77-89.
- Mansfield JW and Richardson A. 1981. The ultrastructure of interactions between *Botrytis* species and broad bean leaves. *Physiological Plant Pathology* 19: 41-48.
- Mansfield J.W. 1980. Mechanism of disease resistance in *Botrytis*. In: Coley-Smith JR, Verhoeff K and Jarvis WR (eds) *The Biology of Botrytis*. (pp. 181-218) Academic Press, London, UK.
- Mansfield J.W. 1982. The role of phytoalexins in disease resistance. In: Bailey JA and Mansfield JW (eds) *Phytoalexins*. (pp. 253-288) Blackie and Sons, Glasgow, UK.
- Manteau S., Abouna S., Lambert B. and L. Legendre. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 359-366.
- Martinez J.P., Blancard D., Lecomte P. and C. Levis. 2003. Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 479-488.
- Martinez F., Dubos B. and M. Fermaud. 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* 95 : 692-700.
- Mastebroek H. D. and Balkema-Boomstra A. G. 1991. Inheritance of resistance to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) in eleven primitive barley varieties. *Euphytica* 57: 125- 131.
- Mathur S. and Utkhede R. 2002. Development of a dot blot technique for rapid identification of *Botrytis cinerea*, the causal organism of grey mould in greenhouse tomatoes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 604-608.
- Meyer U. M., Spotts R. A. and F. M. Dewey. 2000. Detection and quantification of *Botrytis cinerea* by ELISA in pear stems during cold storage. *Plant Dis.* 84:1099-1103.
- Meyer U. and F.M. Dewey. 2000. Efficacy of different immunogens for raising monoclonal antibodies to *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 104: 979-987.
- MacFarlane H.H. 1968. Plant Host-pathogene index to volumes 1-40 (1922-1961), *Review of Applied Mycology*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 820p.
- McLaughlin R.J., Wisniewski M.E., Wilson C.L. and E. Chalutz. 1990. Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathology* 80:456-461.
- Menzinger W. 1966. Zur Variabilität und Taxonomie von Arten und Formen der Gattung *Botrytis* Mich. II. Untersuchungen zur Variabilität des Kulturtyps unter konstanten Kulturbedingungen. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene* 120: 179-196.

- Merabti N. 2003. Utilisation du marqueur moléculaire RAPD pour l'identification et la caractérisation de *Botrytis cinerea* et *Botrytis fabae* agents de la tache chocolat de la fève. Mem. Magister, I.N.A., El-Harrach. 85pp.
- Merad S.F. et N. Merdjani. 1997. Contribution à l'étude des maladies fongiques de la fève (*Vicia faba* L.) : Analyse de la mycoflore des semences et caractérisation biologique des *Botrytis* spp agents des «taches chocolat». Mém. Ing., I.N.A., EL-Harrach. 40pp.
- Mercier J. C.L. and Wilson. 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control* 4: 138-144.
- Messgou S. 2000. Le *Botrytis* de la fève (*Vicia faba* L.) en Algérie: Variabilité culturelle et pathologique de quelques isolates de *Botrytis cinerea* Pers ex Pers., agent responsable de la maladie « taches chocolat ». Thèse Magister. Pp 73.
- Mirzaei S., Goltapeh E.M., and M. Shams-bakhsh. 2007. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology* 3(1): 65-76.
- Mlikota Gabler F., Smilanick J.L., Mansour M., Ramming D.W. and B.E. Mackey. 2003. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 93: 1263.
- Morgan, D. J. 1971. Numerical taxonomic studies of the genus *Botrytis* II. Other *Botrytis* taxa. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 56:327-335.
- Muckenschnabel I., Williamson B., Goodman B.A., Lyon G.D., N Deighton. 2001. Markers for oxidative stress associated with soft rots in fresh bean (*Phaseolus vulgaris*) infected by *Botrytis cinerea*. *Planta* 212, 376-381.
- Muñoz G., Hinrichsen P., Brygoo Y. and T. Giraud. 2002. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* 106: 594-601.
- Nair N.G. and G.K. Hill. 1992. Bunch rot of grapes caused by *Botrytis cinerea*. In: Kumar J., Chaube H.S., Singh US and Mukhopadhyay AN (eds) *Plant Diseases of International Importance: Diseases of Fruit Crops*. pp. 147-169. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Nelson M.E., and Powelson M.L. 1988. Biological control of gray mold of snap beans by *Trichoderma hamatum*. *Plant Disease* 72: 727-729.
- Nielsen K., Justesen A.F., Jensen D.F. and D.S. Yohalem. 2001. Universally primed polymerase chain reaction alleles and internal transcribed spacer restriction fragment length polymorphisms distinguish two subgroups in *Botrytis aclada* distinct from *B. byssoidea*. *Phytopathology* 91: 527-533.
- Nielsen K., and D.S. Yohalem. 2001. Origin of a polyploid *Botrytis* pathogen through interspecific hybridization between *Botrytis aclada* and *B. byssoidea*. *Mycologia* 93: 1064-1071.
- Nielsen K., Yohalem D.S., and D.F. Jensen. 2002. PCR detection and RFLP differentiation of *Botrytis* species associated with neck rot of onion. *Plant Disease* 86: 682-686.
- Ondrej M. 1973. The results of the study of the occurrence of the biotypes (races) of the fungus *Mycosphaerella pinodes* (Berk and Blox) Stone. *Ochr Rost* 9:49-56.
- Pande S., Singh G., Rao J.N., Bakr M.A., Chaurasia P.C.P., Joshi S., Johansen C., Singh S.D., Kumar J., Rahman M.M. and C.L.L. Gowda. 2002. Integrated management of *Botrytis* gray mold of chickpea. *Information Bulletin no. 61*. ICRISAT Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- Parlevliet J.E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* 17, 203-222.

- Pearson R. C. 1998. Powdery mildew. Pages 9–11 in R. C. Pearson and A. C. Goheen, eds. Compendium of grape diseases. APS Press, Saint Paul, MN.
- Pie K. and Y.J.C.M. Brouwer. 1993. Susceptibility of cut rose flower cultivars to infection by different isolates of *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* UAR 137: 233-244.
- Prins T.W., Tudzynski P., Von Tiedemann A., Tudzynski B., Ten Have A., Hansen M.E., Tenberge K. and J.A.L. Van Kan. 2000. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In:Kronstad JW (ed.) Fungal Pathology. (pp. 33-64) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Prins T. 2001. Identification and functional analysis of *Botrytis cinerea* genes induced during infection of tomato. Thèse. Doctorat, Université de Wageningen., The Netherlands. 113pp.
- Purkayastha R.P. and B.J.Deverall. 1965. The growth of *Botrytis fabae* and *B. cinerea* into leaves of bean (*Vicia faba* L.). *Annals of Applied Biology* 56: 139-147.
- Quidde T., Osbourn A.E. and P. Tudzynski. 1998. Detoxification of alpha-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 151-165.
- Rick C. and R. Chetelat. 1995. Utilization of related wild species for tomato improvement. *Acta Horticulturae*. 412: 21-38.
- Ricker R.W., Marois J.J., Dlott R.M. and J.C. Morrison. 1991. Immunodetection and quantification of *Botrytis cinerea* on harvested wine grapes. *Phytopathology* 81: 404-411.
- Rigotti S., Viret O. and K. Gindro. 2006. Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.*Phytopathol. Mediterr.* 45, 253–260.
- Roberts R.G. 1990. Postharvest biological control of grey mould of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80: 526-530.
- Roger L. 1955. Encycloped Mycologique XVIII: Phytopathologie des pays chauds. Tome 1. Ed Lechevalier, Paris, France, 1122 p.
- Rossall S. et J.W. Mansfield. 1984. Relationships between germ-tube growth by *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae* and their metabolism of the phytoalexins wyerone, Wyerone acid and wyerone epoxide. *Transaction British of Mycological Society*. 82 (3): 571-576.
- Rosslénbroich, H.J. and D.Stuebler. 2000. *Botrytis cinerea* : History of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19 : 557-561.
- Rotem J. and H.J. Aust. 1991. The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. *Journal of Phytopathology* 133: 76-84.
- Roumen E.C. and W.S. De Boef. 1993. Latent period to leaf blast in rice and its importance as a component of partial resistance. *Euphytica* 69, 185–90.
- Roumen E.C. 1992. Small differential interactions for partial resistance in rice cultivars to virulent isolates of the blast pathogen. *Euphytica* 1-2 (64): 143-148.
- Salhi N. 2004. Etude de la diversité génétique d'une collection de *Botrytis cinerea* Pers. et de *Botrytis fabae* Sard., agents de la maladie taches chocolat sur fève. Mem. Magister, INA, El Harrach. 186pp
- Salinas J., Glandorf D.C.M., Picavet F.D. and K. Verhoeff. 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95: 51-64.
- Sandrock R.W. and H.D. Van Etten. 1998. Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin - tomatine. *Phytopathology* 88: 137-143

Sayoud Ezzahiri B. et Z. Bouznad.1999. Les maladies de la fève. In : Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. 52-59 p.

Schönbeck F. and E. Schlösser. 1976. Preformed substances as potential protectants. In: Heitefuss R and Williams PH (eds.) *Physiological Plant Pathology*. (pp. 653-678) Springer-Verlag, Berlin.

Segmüller N., Ellendorf U., Tudzynski B. and Tudzynski P. (2007) BcSAK1, a stress-activated MAP kinase is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot Cell*. 6, 211–221.

Semal.1989. Traité de pathologie végétale. Ed les presses. Agronomiques de Gembloux. 621p.

Shaner G. and R.F. Finney.1977. The effect of nitrogen fertilization in the expression of the slow mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*. 70:1183-1186.

Shirane N., Masuko M. and Y. Hayashi. 1989. Light microscopic observation of nuclei and mitotic chromosomes of *Botrytis species*. *Phytopathology* 79: 728-730.

Shtienberg D. and Elad Y. 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87: 332-340.

Smith R.E. 1900. *Botrytis* and *Sclerotinia*; their relation to certain plant diseases and to each other. *Botanical Gazette* 29: 369-407.

Staats M., P. Van Baarlen and J.A. L. Van Kann. 2005. *Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus Botrytis and the Evolution of Host Specificity*. *Molecular Biology and Evolution*. 22(2):333-346.

Staats M. 2007. *Botrytis* species on flower bulb crops: Phylogeny, genetic variation and host specificity. Thesis. PhD. Wageningen University, The Netherlands. pp 167.

Staples R.C. and A.M. Mayer 1995. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 134: 1-7.

Steel C.C. 2001. Effects of altered UV light and climate change on the susceptibility of grapevines to fungal diseases. *The Australian Grapegrower and Winemaker June*: 13-15.

Sundheim L. 1973. *Botrytis fabae*, *Botrytis cinerea* and *Ascochyta fabae* on broad bean (*Vicia faba* L.) in Norway. Agricultural University of Norway, ACTA. *Plant pathology*. 44-51 p.

Sutton J.C., Dale A. and Luby J.J. 1991. Alternative methods for managing gray mold of strawberry. The strawberry into the 21st century: Proceedings of the Third North American Strawberry Conference, Texas, pp183-190.

Sutton J.C., Rowell P.M. and T.D.W James.1984. Effects of leaf wax, wetness duration and temperature on infection of onion leaves by *Botrytis squamosa*. *Phytoprotection* 65: 65-68.

Sutton J.C. 1990. Epidemiology and management of *Botrytis* leaf blight of onion and *Botrytis* blight of strawberry: a comparative analysis. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12:100-110.

Ten Have A., Mulder W., Visser J. and J.A.L. Van Kan. 1998. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1009-1016.

Ten Have A. 2000. The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family. Thèse Doctorat. Wageningen University. The Netherlands. 119 pp.

Ten Have A., Tenberge K.B., Benen J.A.E., Tudzynski P., Visser J. and J.A.L. Van Kan. 2002. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. In: Kempken F (ed.) *The Mycota XI, Agricultural Applications*. (pp. 341-358) Springer-Verlag, Berlin, Germany.

- Tenberge K.B. 2004. Morphology cellular organization in *Botrytis* interaction with plants. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P and Delen N (eds.) *Botrytis: Biology, Pathology, and Control* (pp. 67-82) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Thomma B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4: 225-236.
- Tichelaar G. 1967. Studies on the biology of *Botrytis allii* on *Allium cepa*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 73: 157-160
- Turgeon B.G.2000. Evolution of host specific virulence in *Cochliobolus heterostrophus*. In: Kronstad JW (ed.) *Fungal Pathology*. pp. 93-126. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Urbasch I.1985. Ultrastructural studies on the microconidia of *Botrytis cinerea* Pers. and their phialoconidial development. *Phytopathologische Zeitschrift* 112: 229-237.
- Urbasch I. 1986. In vivo-Untersuchungen zur Entstehung und Funktion der Chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. am Wirt-Parasit-System *Fuchsia hybrida*-*B. cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift* 117: 276-282.
- Van Baarlen P., Staats M. and J.A.L. Van Kan 2004. Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology* 5: 559-574.
- Van den Heuvel J. and D. Grootveld. 1980. Formation of phytoalexins within and outside lesions of *Botrytis cinerea* in French bean leaves. *European Journal of Plant Pathology*. 86 (1): 25-37.
- Van der Vlugt-Bergmans C.J.B., Brandwagt B.F., Van't Klooster J.W., Wagemakers C.A.M. and J.A.L. Van Kan. 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 97: 1193-1200.
- Van Der Vlugt-Bergmans C.J.B., Wagemakers C.A.M. and Van Kan J.A.L.1997. Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 21-29.
- Van Kan Jan A.L. 2006. Licenced to kill: The lifestyle of necrotrophic plant pathogen. *TRENDS in Plant Science* 11 (5): 247-251.
- Verhoeff K. and Liem J.I.1975. Toxicity of tomatine to *Botrytis cinerea*, in relation to latency. *Phytopathologische Zeitschrift* 82: 333-338.
- Verhoeff K.1968. Studies on *Botrytis cinerea* in tomatoes: Effect of soil nitrogen level and of methods of deleafing upon occurrence of *B. cinerea* under commercial conditions. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 74: 184-192.
- Viennot-Bourgin G.1967. Les champignons parasites des plantes cultivées. Edition Masson, Paris. France. 1431 p.
- Werlemark G., Carlson-Nilson B.U. and C.G. Davidson. 2006. Genetic variation in the rose pathogen *Marssonina rosae*. *International Journal of Horticultural Science*. 12 (1): 63–67.
- Whetzel H.H.1945. A synopsis of the genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate Discomycetes. *Mycologia* 37: 648-714.
- White J.G., Linfield C.A., Lahdenpera M.L. and J. Voti. 1990. Mycostop a novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases pp. 221-226.
- Willetts H.J. 1969. Structure of the outer surfaces of sclerotia of certain fungi. Pp. 48-53 In: Compendium of soil fungi. *Arch. Mikrobiol.* 69, Ed. Academic press, London.
- Willetts H.J.1997. Morphology, development and evolution of stromata/sclerotia and macroconidia of the *Sclerotiniaceae*. *Mycological Research* 101 (8): 939-952.
- Wolpert T.J., Dunkle L.D. and L.M. Ciuffetti. 2002. Host-Selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annual Review of Phytopathology* 40: 251-285.

Xiao C.L., Chandler C.K., Price J.F., Duval J.R., Mertely J.C. and D.E. Legard. 2001. Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Disease* 85: 901-909.

Yohalem D.S., Nielsen K. and M. Nicolaisen. 2003. Taxonomic and nomenclatural clarification of the onion neck rotting *Botrytis* species. *Mycotaxon* 85: 175-182.

Yohalem D.S., Nielsen K., Green H. and D. Funk Jensen. 2004. Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. *FEMS Microbiology and Ecology* 47: 297-303.

Yunis H., Shtienberg D., Elad Y and Y. Mahrer. 1994. Qualitative approach for modelling outbreaks of grey mould epidemics in non-heated cucumber greenhouse. *Crop Protection* 13: 99-104.

Yunis H. and Y. Elad. 1989. Survival of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica* 17: 13-21.

Zriba A. 1993. Etude de la variabilité chez *Helminthosporium gramineum* Rab. et recherche de la résistance à la strie foliaire de l'orge. Mémoire de fin d'étude du cycle de spécialisation de l'Institut National Agronomique de Tunisie : Pp 122.

Annexe 1. Protocole d'extraction à base de SDS 20% selon la méthode de Blaiseau *et al.* (1992).

- 1- Récupérer les microtubes contenant le mycélium frais et ajouter 1ml de tampon EDTA 50mM, SDS 20%, pH8. mélanger énergiquement avec une tige en bois et vortexer chaque tube durant une trentaine de secondes.
- 2- Incuber à une température de 70)C pendant 15 minutes au bain mari qu'on aura préchauffé par avance.
- 3- Centrifuger à 13000 tours/minute et récupérer le surnageant.
- 4- Ajouter au surnageant 100 µl d'acétate de potassium (sodium) 5M pour assurer la précipitation des protéines. Vortexer et laisser reposer à une température de 4°C durant 1 heure.
- 5- Sortir les tubes du réfrigérateur, centrifuger à 13000 tours/minute durant 15 minutes et récupérer le surnageant.
- 6- Ajouter au surnageant 800 µl du mélange Phénol-Chloroforme-alcool isoamélique. Vortexer et centrifuger à 13000 tours/minute durant 10 minutes. Refaire l'étape 3 à 4 fois jusqu'à ce que les deux phases soient bien distinctes.
- 7- Récupérer la phase supérieure et y ajouter 800 µl de Chloroforme pour éliminer le reste de phénol, puis centrifuger à 13000 tours/minute durant 20 minutes.
- 8- Prélever la phase supérieur et ajouter 1 ml d'éthanol. Remuer doucement le tube en le renversant lentement de haut en bas. La présence d'ADN se traduira par la formation d'une pelote blanchâtre et filamenteuse. Agiter et centrifuger à 13000 tours/minute durant 20 minutes.
- 9- Récupérer le culot, laisser évaporer l'éthanol durant 10 minutes et suspendre dans 400 %l de TE (Tris 10mM-EDTA 1mM). Laisser se dissoudre doucement à une température de 4°C.

Annexe 2. Protocole de purification des échantillons d'ADN.

- 1- Prendre les échantillons d'ADN bien dissous dans le TE (Tris- EDTA).
- 2- Ajouter 100 µl de TE.
- 3- Ajouter 1 volume de phénol et centrifuger 5 mn à 13000 tours/mn.
- 4- Prélever le surnageant.
- 5- Ajouter un autre volume de phénol comme à l'étape 3 et centrifuger 5 mn à 13000 tours/mn.
- 6- Prélever le surnageant.
- 7- Ajouter 1 volume de chloroforme pour éliminer toute trace de phénol et centrifuger 5 mn à 13000 tours/mn.
- 8- Prélever le surnageant.
- 9- Ajouter 500 µl d'acétate d'ammonium et Centrifuger 10 mn à 13000 tours/mn.
- 10- Prélever délicatement la phase supérieure aqueuse, et lui ajouter 0,6 volumes d'isopropanol glacé
- 11- Mélanger doucement jusqu'à l'apparition de la pelote d'ADN.
- 12- Récupérer la pelote dans un nouveau microtube, et la laver avec 1 ml d'éthanol 70%.
- 13- Sécher l'ADN et le resuspendre dans 50 µl de TE (Tris 10mM- EDTA 1mM) ou de l'eau distillée stérile.

Annexe 3. Composition des solutions et tampons pour l'extraction et la purification de l'ADN.

SDS 20% (Sodium dodecyl sulfate)

SDS 1g

Ajuster a PH7,2 par l'HCl dilué.

Tris HCL 1M PH8

Tris 121,1g

HCL 12N 42 ml

Ajuster a PH8 avant de compléter le volume à 1000ml. Stériliser par filtration et conserver a 4°C.

Acétate de sodium 3M PH5,2

Acétate de sodium 408,1 g

Ajuster a PH5,2 par de l'acide acétique glacial avant de compléter le volume à 1000ml. Stériliser par filtration sur un filtre 0,2 µm et conserver à 4°C.

Phénol/Chloroforme/ Alcool isoamélique (48/2)

Phénol 50 ml

Le mélange est gardé à 4°C.

EDTA 0,5M PH8

EDTA di-sodique 186,1g

TE = Tris EDTA (Tris 10mM, EDTA 1mM)

Chlorophorme.

Ethanol 70% (-20°C).

Annexe 4. Préparation du gel pour l'électrophorèse.

- 1- Mélanger 0,48 g d'agarose avec 60 ml de TBE 1X (composition décrite de annexe).
- 2- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes durant 3 minutes environ, jusqu'à dissolution complète de l'agarose.
- 3- Retirer le flacon et laisser refroidir jusqu'à ce qu'il soit possible de le saisir à main nue (environ 60°C).
- 4- Ajouter délicatement 2 μ l de BET (0,5 μ g/ml).
- 5- Etanchéfier le support de gel fourni avec la cuve à l'aide d'un ruban adhésif et placer le dispositif à plat sur la paillasse en vérifiant le niveau.
- 6- S'assurer que le mélange ait bien refroidi pour éviter l'inhalation des vapeurs de bromure d'éthidium (cancérogène) avant de couler le gel délicatement dans le support. Placer ensuite le peigne à l'une des extrémités et laisser polymériser à température ambiante (30 à 60 minutes).
- 7- Retirer le peigne et positionner les puits du côté de la cathode, électrode négative (la charge de l'ADN) et positionner correctement le gel dans la cuve précédemment remplie avec du tampon TBE 1X (350 ml).
- 8- Préparer le tampon de charge (loading buffer), dans notre cas, il s'agit du bleu de bromophénol qui va permettre de vérifier le front de migration. Pipeter 3 μ l de tampon de charge et mélanger avec 7 μ l d'ADN
- 9- Le chargement du gel (spotting) se fait délicatement en évitant de piquer le fond du gel avec la pipette. Le premier puit correspond à l'ADN marqueur (ADN ladder, 200-10000bp) qui servira de repère et indiquera la taille des bandes qui vont migrer. Le reste des puits correspond aux échantillons d'ADN à étudier (8 μ l).
- 10- Fermer la cuve et brancher la source de tension sur 120 volts durant 30 minutes.

Annexe 5. Composition des solutions et tampons pour l'électrophorèse.

TBE 10X (Tris Borate EDTA)

Tris base	108g
Acide Borique	55 g
EDTA 0,5M PH8	40 ml
Eau distillée	

BET (Bromure d'éthidium)

2 pastilles	0,2 g
Eau distillée	20 ml

Tampon de charge

Bleu de bromophénol	50 mg
Glycerol	48 ml
EDTA 0,5M PH8	2,4 ml
Eau distillée	9,6 ml

Annexe 6 : Analyse de variance de l'effet de la taille des spores sur les isolats de *Botrytis* spp.

I1 : BVA01	I6 : BVZ01	I11 : BFT01	I16 : BTA02
I2 : BVA02	I7 : BVZ02	I12 : BFA01	I17 : BOA01
I3 : BVB01	I8 : BVZ03	I13 : BFA02	I18 : BOA02
I4 : BVB02	I9 : BFZ01	I14 : BFA03	I19 : BHB01
I5 : BVT01	I10 : BFB01	I15 : BTA01	I20 : BHA01

	S.C.E	DDL	CARRE MOY	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	7086,93	1999	3,55				
VAR.FACTEUR1	3771,79	19	198,52	118,57	0,0000		
VAR.RESIDUELLE	3315,14	1980	1,76			1,29	11,2%

Test de Newman et Keuls au seuil de 5% de l'effet de la taille des spores sur les isolats de *Botrytis* spp.

LIBELLES MOYENNES GROUPES HOMOGENES

I2	150,1	A
I8	138,6	B
I4	126,9	C
I1	125,0	C
I3	124,3	C
I13	118,9	C
I7	117,3	D
I5	116,9	D E
I12	116,9	D E
I18	116,8	D E
I10	116,0	D E
I14	115,2	D E
I17	114,6	D E
I20	112,3	E
I11	100,4	F
I16	98,6	F
I9	98,2	F
I15	98,1	F
I19	92,1	G

Annexe 7. Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles de vigne.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	14	25,600	1,829	7,619	< 0,0001
Résidus	60	14,400	0,240		
Total	74	40,000			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupements					
B16	2,800	A					
B1	2,600	A	B				
B18	2,600	A	B				
B5	2,400	A	B	C			
B12	2,000		B	C	D		
B13	2,000		B	C	D		
B19	1,800			C	D	E	
B2	1,800			C	D	E	
B15	1,600				D	E	F
B14	1,600				D	E	F
B9	1,600				D	E	F
B8	1,200					E	F
B11	1,000						F
B7	1,000						F
B4	1,000						F

Annexe 8. Analyse de variance de l'effet de la période de latence sur les isolats inoculés sur les feuilles de vigne.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	14	98,187	7,013	12,233	< 0,0001
Résidus	60	34,400	0,573		
Total	74	132,587			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupements					
B5	8,400	A					
B14	8,000	A	B				
B16	7,800	A	B				
B2	7,800	A	B				
B8	7,400		B	C			
B15	6,600			C	D		
B13	6,600			C	D		
B19	6,400			D	E		
B1	5,800			D	E	F	
B9	5,800			D	E	F	
B18	5,600				E	F	G
B12	5,600				E	F	G
B7	5,400					F	G
B11	4,800						G
B4	4,800						G

Annexe 9. Analyse de variance de l'effet du nombre de spores sur les isolats inoculés sur les feuilles de vigne.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	14	3566,978	254,784	1,341	0,242
Résidus	30	5698,000	189,933		
Total	44	9264,978			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

	Moyenne	Regroupements		
B15	46,667	A		
B14	43,667	A		
B1	42,000	A	B	
B19	41,000	A	B	
B13	40,667	A	B	
B4	38,667	A	B	C
B5	36,667	A	B	C
B8	35,000	A	B	C
B9	33,000	A	B	C
B11	30,000	A	B	C
B7	29,333	A	B	C
B12	27,000	A	B	C
B2	20,667		B	C
B16	20,333		B	C
B18	16,667			C

Annexe 10. Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats de la collection de *Botrytis* spp. inoculés sur les feuilles détachées de vigne.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	14	178,880	12,777	1,164	0,326
Résidus	60	658,800	10,980		
Total	74	837,680			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Moyenne		
B11	6,600	A		
B18	5,400	A	B	
B4	5,200	A	B	
B19	4,800	A	B	C
B7	4,800	A	B	C
B15	4,800	A	B	C
B9	4,600	A	B	C
B12	3,800	A	B	C
B13	3,600	A	B	C
B5	3,000	A	B	C
B8	2,800	A	B	C
B16	2,200		B	C
B14	2,200		B	C
B1	1,800		B	C
B2	0,800			C

Annexe 11. Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles de fève.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	10	36,436	70,436	4,715	0,000
Résidus	44	34,000	70,436		
Total	54	70,436			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupements					
B17	3,600	A					
B1	3,400	A	B				
B18	3,000	A	B	C			
B20	2,600	A	B	C			
B4	2,600	A	B	C			
B2	2,400		B	C	D		
B5	2,400		B	C	D		
B6	2,200			C	D	E	
B19	1,400				D	E	F
B3	1,200					E	F
B10	1,000						F

Annexe 12. Analyse de variance de l'effet de la période de latence sur les isolats inoculés sur les feuilles de fève.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	9,111	1,822	4,686	0,013
Résidus	12	4,667	0,389		
Total	17	13,778			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupement	
B19	7,000	A	
B3	6,667	A	
B1	6,333	A	B
B18	6,333	A	B

B6	5,333	B	C
B10	5,000		C

Annexe 13. Analyse de variance de l'effet du nombre de spores sur les isolats inoculés sur les feuilles de fève.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	18,791	3,758	21,206	< 0,0001
Résidus	12	2,127	0,177		
Total	17	20,918			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupement
B19	3,400	A
B1	1,633	B
B6	1,200	B C
B3	0,633	C D
B18	0,567	C D
B10	0,433	D

Annexe 14. Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles de fève.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	13	59935,861	4610,451	4,130	< 0,0001
Résidus	56	62507,100	1116,198		
Total	69	122442,961			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Regroupements					
B10	129,500	A					
B19	102,200	A	B				
B13	84,100		B	C			
B6	79,100		B	C	D		
B3	66,200		B	C	D	E	
B12	56,400			C	D	E	F
B2	46,600			C	D	E	F
B5	46,400			C	D	E	F
B20	42,300			C	D	E	F
B14	41,000				D	E	F
B18	37,500				D	E	F
B4	35,900					E	F
B17	29,300					E	F
B1	23,400						F

Annexe 15. Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats. inoculés sur les feuilles de haricot.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	9	3,372	0,375	1,359	0,240
Résidus	39	10,750	0,276		
Total	48	14,122			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Regroupement	
B3	3,000	A	
B13	2,750	A	B
B5	2,600	A	B
B10	2,600	A	B
B16	2,400	A	B
B4	2,400	A	B
B20	2,200		B
B19	2,200		B
B2	2,200		B
B1	2,200		B

Annexe 16. Analyse de variance de l'effet de la période de latence sur les isolats inoculés sur les feuilles de haricot

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	7	7,200	1,029	2,654	0,028
Résidus	32	12,400	0,388		
Total	39	19,600			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Regroupements
B20	8,200	A
B2	8,200	A
B1	8,200	A
B16	8,200	A
B18	8,000	A
B3	8,000	A
B19	7,400	A B
B4	7,000	B

Annexe 17. Analyse de variance de l'effet du nombre de spores sur les isolats inoculés sur les feuilles de haricot.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	7	305510,700	43644,386	12,968	< 0,0001
Résidus	32	107698,400	3365,575		
Total	39	413209,100			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents :

Modalités	Moyenne	Regroupement
B20	318,000	A
B18	220,000	B
B19	214,000	B
B16	168,000	B C
B4	134,400	C D
B2	107,000	C D
B1	92,000	D
B3	13,400	E

Annexe 18. Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles de haricot.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	9	25493,405	2832,601	0,839	0,585
Résidus	40	135075,400	3376,885		
Total	49	160568,805			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupement	
B20	91,700	A	
B19	76,600	A	B
B4	55,600	A	B
B1	50,100	A	B
B2	42,800	A	B
B16	42,500	A	B
B3	36,000	A	B
B5	32,900	A	B
B10	22,700	A	B

Annexe 19. Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles de tomate.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	10	0,982	0,098	0,600	0,805
Résidus	44	7,200	0,164		
Total	54	8,182			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupement
B6	3,400	A
B7	3,400	A
B8	3,200	A
B4	3,200	A
B14	3,200	A
B12	3,200	A
B10	3,200	A
B1	3,200	A
B11	3,000	A
B20	3,000	A
B16	3,000	A
B9	3,000	A

Annexe 20. Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles de tomate.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	11	5855,236	532,294	1,916	0,061
Résidus	48	13332,050	277,751		
Total	59	19187,286			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupements
B16	44,000	A
B9	33,000	A B
B10	31,500	A B
B8	29,900	A B C
B20	29,300	A B C
B4	20,600	B C
B12	18,300	B C
B6	16,950	B C
B11	16,000	B C

B14	14,300	B	C
B1	12,400	B	C
B7	10,000		C

Annexe 21. Analyse de variance de l'effet de la période d'incubation sur les isolats inoculés sur les feuilles d'oignon.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	10	22,300	0,224	6,608	< 0,0001
Résidus	54	12,300	0,112		
Total	63	43,100			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupements
BVZ01	4,800	A
BVA01	4,600	A
BVA02	4,400	A
BHA01	4,400	A
BHB01	4,300	A
BVZ02	4,200	A
BVB01	3,800	A B
BOA02	3,800	A B
BFB01	3,400	B
BFA01	3,400	B
BFA03	3,200	B C
BFA02	3,000	C
BVT01	1,600	C
BOA01	1,200	D

Annexe 22. Analyse de variance de l'effet de la période de latence sur les isolats inoculés sur les feuilles d'oignon.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	10	2,355	0,235	6,691	0,000
Résidus	22	0,774	0,035		
Total	32	3,129			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupements
B7	1,133	A
B2	0,917	A B
B10	0,620	B C
B9	0,523	C D
B1	0,523	C D
B17	0,457	C D
B12	0,433	C D
B5	0,337	C D
B13	0,310	C D
B18	0,267	D
B4	0,223	D

Annexe 23. Analyse de variance de l'effet du nombre de spores sur les isolats inoculés sur les feuilles d'oignon.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	10	2,355	0,235	6,691	0,000
Résidus	22	0,774	0,035		
Total	32	3,129			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupements
B7	1,133	A
B2	0,917	A B
B10	0,620	B C
B9	0,523	C D
B1	0,523	C D
B17	0,457	C D
B12	0,433	C D
B5	0,337	C D
B13	0,310	C D
B18	0,267	D
B4	0,223	D

Annexe 24. Analyse de variance de l'effet de l'AUDPC sur les isolats inoculés sur les feuilles d'oignon.

Evaluation de la valeur de l'information apportée par les variables ($H_0 = Y = \text{Moy}(Y)$) :

Source	DDL	Mme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	19	60560,710	3187,406	1,747	0,045
Résidus	80	145931,700	1824,146		
Total	99	206492,410			

Classement et regroupements des groupes non significativement différents, Fisher (LSD) à 95,00%:

Modalités	Moyenne	Regroupements
B9	82,800	A
B3	68,700	A B
B17	64,700	A B C
B5	62,500	A B C

B6	55,000	A	B	C	
B8	47,400	A	B	C	D
B10	46,800	A	B	C	D
B18	44,000	A	B	C	D
B19	40,800	A	B	C	D
B13	37,400	A	B	C	D
B20	37,100	A	B	C	D
B14	35,500	A	B	C	D
B7	21,700		B	C	D
B2	17,500		B	C	D
B1	15,700		B	C	D
B12	13,000			C	D

RESUME

Le genre *Botrytis* est composé d'espèces phytopathogènes redoutables qui s'attaquent à de nombreuses cultures dans le monde. L'espèce polyphage *Botrytis cinerea* présente une gamme d'hôtes de plus de 235 plantes. La lutte chimique est la plus utilisée, cela dit, de nombreuses classes de fongicides deviennent inefficaces en raison de la variabilité phénotypique et génétique du pathogène. L'identification des espèces de *Botrytis* et la connaissance des mécanismes régissant la spécialisation parasitaire et les interactions hôte-pathogène sont nécessaires pour améliorer les techniques de lutte. Afin d'y parvenir, 3 axes sont développés dans ce travail :

Le premier vise à identifier les espèces d'une collection de *Botrytis* spp. provenant de différentes plantes hôtes. L'étude des critères morphologiques à travers l'aspect des colonies, la taille des spores et leurs concentrations, les sclérotés et leurs densités a permis d'identifier 19 isolats appartenant à l'espèce polyphage *Botrytis cinerea* et 1 isolats supposé appartenir à une espèce spécialisée associée à *Allium* spp. Ces critères macroscopiques et microscopiques indiquent qu'il s'agit de l'espèce *Botrytis alcada*.

Le second axe concerne l'étude de la spécialisation parasitaire et du pouvoir pathogène de la collection de *Botrytis* spp. Une technique d'inoculation artificielle sur des feuilles détachées a été mise au point. Les mesures des périodes d'incubation, de latence, du nombre de spores et des valeurs AUDPC ont permis d'observer une variabilité importante du pouvoir pathogène des isolats ainsi que l'extrême polyphagie de l'espèce *Botrytis cinerea*. La spécialisation parasitaire de l'isolat BOA01 a été confirmée.

Le troisième axe vise l'étude de la diversité génétique de la collection de *Botrytis* spp. par l'analyse du polymorphisme des profils RAPD. L'étude a confirmé l'appartenance des 19 isolats à l'espèce *Botrytis cinerea* et a classé l'isolat BOA01 comme un isolat distinct des autres. L'analyse a révélé que les isolats peuvent présenter des profils similaires indépendamment de leurs origines géographiques et de la plante hôte. Les résultats obtenus soulignent l'intérêt d'utiliser d'avantage de marqueurs moléculaires pour estimer la diversité génétique des populations de *Botrytis* en Algérie.

Mots clés : *Botrytis* spp. , caractères morphologiques, hôte spécifique, diversité génétique, polymorphisme.

SUMMARY

Botrytis genus is composed of phytopathogenic species attacking many crops worldwide. The polyphagous species *Botrytis cinerea* has a wide host range to more than 235 plants. Although there are fungicides for its control, many classes of fungicides have failed due to its morphological variability and genetic plasticity. The identification of *Botrytis* species and knowledge of the mechanisms governing the parasite specialization and host-pathogen interactions are needed to improve control techniques. To achieve this, 3 axes are developed in this work:

The first is to identify the species of a collection of *Botrytis* spp. from different host plants. The study of morphological criteria through the colony morphology, size and concentrations of spores, sclerotia and their densities identified 19 isolates belonging to the polyphagous species *B. cinerea* and 1 isolate supposed to belong to a specialized species associated with *Allium* spp. Its microscopic and macroscopic criteria indicate that it belong to *Botrytis alcada*.

The second one concerns the study of parasitic specialization and pathogenic variability of the collection of *Botrytis* spp. A technique of artificial inoculation on detached leaves was applied. The measurement of incubation period, latency period, number of spores and AUDPC values has indicated significant variability in pathogenicity of isolates as well as the extreme polyphagia of *Botrytis cinerea*. The parasitic specialization of the isolate BOA01 of onion was confirmed.

The third axis is the study of the genetic diversity of the population of *Botrytis* spp. by analysis of RAPD profiles polymorphisme. The study confirmed that 19 isolates belong to the species *Botrytis cinerea* and classified the isolate BOA01 as a separate isolate. The analysis revealed that the isolates may have similar profiles regardless of their geographical origin and host plant. The results emphasize the value of using molecular markers to estimate the genetic population's diversity of *Botrytis* in Algeria.

Key words: *Botrytis* spp. , morphologic traits, specific host, genetic diversity, polymorphism.

ملخص

يتألف جنس بوتريتييس من أنواع فطرية مسببة للأمراض لعدة محاصيل في جميع انحاء العالم. النوع المتعدد العائل له مجموعة واسعة من النباتات المضيفة و يفوق عددها 235 نبتة. بالرغم من وجود مبيدات كيميائية لمكافحة الفطر، لوحظ فشل الكثير منها بسبب التباين الشكلي و لدونة الجينية للفطر. فهناك حاجة لتحديد أنواع الجنس لمعرفة الأليات التي تتحكم في التخصص الطفيلي و التفاعلات فطر/مضيف نباتي لتحسين تقنيات مكافحة. لتحقيق ذلك، 3 محاور وضعت في هذا العمل:

الأول هو تحديد الأنواع المكونة لمجموعة بوتريتييس لنباتات مضيفة مختلفة. دراسة المعايير الشكلية من خلال شكل المستعمرات، حجم و تركيز الأبواغ ، حجم وكثافة الأجسام الحجرية بينت أن 19 عزلة تنتمي لنوع *Botrytis cinerea* و أفترض أن العزلة BOA01 تنتمي لنوع *Botrytis alcada*

المحور الثاني أهتم بداسة التخصص الطفيلي و التباين في الخاصية المرضية. تم تطبيق تقنية التلقيح الإصطناعي على اوراق منفصلة و تم قياس فترة الحضانه و فترة الكمون. تبينت تقلبات واضحة عند العزلات. تم أيضا تأكيد تخصص عزلة واحدة على البصل و أتمناها للنوع *Botrytis alcada*

اما فيما يخص المحور الثالث، فقد خصص لدراسة التنوع الجيني للمجموعة من خلال تحليل الملامح الأرابيدية. أكدت الدراسة أن 19 عزلة تنتمي لنوع *Botrytis cinerea* و صنفت عزلة البصل منفصلة عن بقية العزل الأخرى في نفس الوقت، كشف التحليل أنه من الممكن للعزل أن تظهر ملامح متشابهه من غض النظر عن الأصل الجغرافي و النبات المضيف. أكدت النتائج على قيمة استخدام المؤشرات الجزئية لتقدير التنوع الجيني لأقوام *Botrytis* spp. في الجزائر

الكلمات المفتاحية: بوتريتييس، التشكل المورفولوجي، المضيف لمحدد، التنوع الجيني، تعدد الأشكال الجينية