

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministre de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش- الجزائر

École Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach- Alger

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département: Botanique

Spécialité: Interaction plantes-pathogène et protection des plantes

Thème

Etude de *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise des cultures : variabilité phénotypique optimisation des méthodes d'extraction d'ADN et identification moléculaire

Présenté par : M. AZZOUG Obaid Allah

Soutenu le : 01/12/2019

Jury :

Présidente :	BOUREGHDA H.	Professeure – ENSA
Promotrice :	LOUANCHI M.	Professeure – ENSA
Examineurs :	LAALA S.	Maître de Conférences B – ENSA
	KHANFOUS-DJEBARI B.	Chargée de cours – ENSA
	TAOUTAOU A.	Maitre de Conférences A - ENSA

Promotion : 2016 – 2019

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	I
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES PLANCHES.....	VI
Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	3
1. <i>Botrytis cinerea</i> , agent causal de la pourriture grise.....	3
1.1. Systématique de <i>Botrytis cinerea</i> pers. Fr.....	3
1.2. Gamme hôte.....	4
1.3. Importance économique de la maladie	4
1.4. Cycle infectieux de <i>Botrytis cinerea</i>	4
1.5. Symptomatologie de la pourriture grise.....	5
1.6. Diversité phénotypique de <i>Botrytis cinerea</i>	7
1.7. Biodiversité génétique.....	8
2. Extraction de l'ADN.....	10
3. Marqueurs moléculaire :	11
3.1. Marqueurs spécifique à <i>Botrytis cinerea</i>	11
3.2. Marqueurs pour la détection des éléments transposables	11
II. Matériels et méthodes	13
1. Matériel biologique.....	13
2. Isolement.....	13
3. Purification.....	14
4. Détermination des Morphotypes	15
5. Estimation de la croissance mycélienne.....	15
6. Sensibilité au fongicide Fenhexamide	15
7. Pouvoir pathogène sur pomme	16
8. Extraction de l'ADN :.....	17
8.1. Préparation du mycélium et sclérotés	17
9. Protocole d'extraction d'ADN	17
9.1. Protocole SDS - triton x 100.....	18
9.2. Protocole CTAB - Sorbitol.....	19
9.3. Protocole micro-ondes SDS - EDTA	20
10. Estimation de la qualité et de la concentration de ADN	21
11. Amplification par la PCR	22
11.1. Confirmation de l'identité de nos isolats	22
11.2. Détection des éléments transposables.....	23

12.	Visualisation l'extraction de la ADN et les produits de l'amplification	24
III.	Résultats et discussion	26
1.	Détermination des morphotypes	26
2.	Vitesse de croissance mycélienne	27
3.	Sensibilité au Fenhexamide	27
4.	Pouvoir pathogène.....	29
5.	Extraction d'ADN	30
6.	Identification PCR de <i>Botrytis cinerea</i>	33
7.	Eléments transposable	37
IV.	Discussion	41
V.	Conclusion	44
VI.	Références bibliographique	46
	ANNEXES	54

Summary

Botrytis cinerea (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana*) is a phytopathogenic, polyphagous and ubiquitous fungus, difficult to control, with high phenotypic and genetic variability. DNA integrity is a key tool for successful molecular identification procedures of this pathogen, many extraction protocols require mycelial grinding procedures using liquid nitrogen to obtain extracts of high quality and in enough quantity. Three DNA extraction protocols (SDS - triton x 100, sorbitol - CTAB Microwave - SDS-EDA) commonly used were used in this study.

We followed the same approach of genetic diversity studies by including three isolates from different host plants (strawberry, tomato and grapevine), with the aim of optimising genetic identification methods based on PCR for a group of primers (C729 ±, F300/F1550, BotyF4/BotyR4). In the first part, we carried out a morphological characterisation study of our isolates (T5, V9 and F3), which revealed a high variability. In the second part, the protocol described by Zelaya-Molina et al. (2011) who's the SDS - triton x 100 buffer extracted the DNA with the best yield, and is the most reproducible, we have also optimised the PCR protocol described by Mirzaei et al. (2007) for the detection of *B. cinerea*, in addition, we have found a tip in PCR consists in using the gradient of the hybridisation temperature to detect the *Boty* and *Flipper* transferable elements of 24 samples at the same time. The two transposable elements, *Flipper* and *Boty*, were detected in this study.

Keywords: *Botrytis cinerea* - Genetic biodiversity - Optimization - Phenotypic diversity - Transposable elements *Flipper* and *Boty*

Résumé

Botrytis cinerea (téléomorphe : *Botryotinia fuckeliana*) est un champignon phytopathogène, polyphage et ubiquiste difficile à contrôler, présente une grande variabilité phénotypique et génétique. L'intégrité de l'ADN soit un outil clé pour réussir les procédures d'identification moléculaires de cet agent pathogène, plusieurs protocoles d'extractions exigent la procédure de broyage mycélienne en utilisant l'azote liquide pour obtenir des extraits de haute qualité et en quantité suffisante. Trois protocoles d'extractions d'ADN(SDS - triton x 100, Sorbitol - CTAB Microondes - SDS-EDTA) couramment utilisé ont été utilisés dans cette étude.

Nous avons suivi les mêmes démarches des études de la diversité génétique en incluant trois isolats provenant des différentes plantes hôtes (de la fraise, la tomate et la vigne), dans le but optimiser les méthodes identification génétique basée sur la PCR au moins pour un ensemble des amorces (C729 ±, F300/F1550, BotyF4/BotyR4). Dans la première partie nous avons procédé à une étude de caractérisation morphologique de nos isolats (T5, V9 et F3), qui ont révélé d'une grande variabilité. À la seconde partie , le protocole décrit par Zelaya-Molina et al. (2011) dont le tampon SDS - triton x 100 a extrait l'ADN avec le meilleur rendement, et est le plus reproductible, également nous avons optimisé le protocole PCR décrit par Mirzaei et al. (2007) pour la détection de *B. cinerea*, en outre, nous avons trouvé un truc dans la PCR consiste a utilisé les gradients de la température d'hybridation pour détecter les éléments transposables *Boty* et *Flipper* de 24 échantillons en même temps. Les deux éléments transposables, *Flipper* et *Boty* ont été détectés à cette étude.

Mots clés : *Botrytis cinerea* - Biodiversité génétique - Optimisation - Diversité phénotypique - Éléments transposable *Flipper* et *Boty*.

ملخص

Botrytis cinerea (téléomorphe: *Botryotinia fuckeliana*) عبارة عن فطر مُمرض للنباتات ، متعدد الأشكال وشائع الوجود ، يصعب التحكم فيه ويُظهر تنوعاً ظاهرياً وراثياً كبيراً. تُعد سلامة الحمض النووي أداة رئيسية لإجراءات تحديد الجزيئات الناجحة لهذا المُمرض. تتطلب عدة بروتوكولات استخراج الحمض النووي إجراء طحن mycélium باستخدام النيتروجين السائل للحصول على مستخرج ADN عالي الجودة وبكمية كافية. استخدمت ثلاث بروتوكولات استخراج الحمض النووي شائعة الاستخدام في هذه الدراسة (SDS - triton x 100, Sorbitol- CTAB, Microondes - SDS-EDTA)

اتبعتنا نفس نهج دراسات التنوع الجيني من خلال تضمين ثلاث عزلات من النباتات المضيفة المختلفة (الفراولة والطماطم والكرمة)، من أجل تحسين طرق تحديد الهوية الجينية القائمة على PCR على الأقل لمجموعة من (C729 ±, F300/F1550, (Amorces) BotyF4/BotyR4). في الجزء الأول قمنا بإجراء دراسة للتوصيف المورفولوجية لعزلتنا التي كشفت عن تنوع كبير. وفي الجزء الثاني، البروتوكول الذي وصفه (Zelaya-Molina et al. (2011) والذي استعمل فيه SDS-triton x 100 استخراج الحمض النووي بأفضل مردودية، وهو الأكثر استنساخاً، كما قمنا بتحسين بروتوكول PCR الذي وصفه Mirzaei (2007) et al. للكشف عن *B. cinerea*، علاوة على ذلك، وجدنا طريقة في PCR تسمح باستخدام التدرج درجة حرارة التهجين للكشف عن العناصر قابلية للانتقال *Flipper* و *Boty* في نفس الوقت. تم اكتشاف العنصرين القابلين للانتقال *Flipper* و *Boty* في هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية : *Botrytis cinerea* - التنوع الوراثي - التنوع الظاهري - العناصر القابلة للانتقال *Flipper* و *Boty*