

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL HARRACH ALGER
Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en Science Agronomiques
Département : Botanique
Spécialité : Phytopathologie Option : Biotechnologie

***Contribution à l'étude de Botrytis cinerea
Pers agent de la pourriture grise***
**variabilité biologique et essais de lutte chimique et
biologique**

Réalisé par MAHMOUDI Mohamed Elhadi

Directeur de thèse : Mme LOUANCHI M.

2012/03/18

Président : Mr BOUZNAD Z. Examineurs : Melle BOUREGHDA H. Mr GUEZLANE A.

Table des matières

Dédicace . . .	5
Remerciements . . .	6
Liste des Abréviations . . .	7
RESUME . . .	8
SUMMARY . . .	9
ص — علم . . .	10
Chapitre II : Partie bibliographique . . .	11
II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE . . .	11
II.1. <i>Botrytis cinerea</i> , agent de la pourriture grise . . .	11
II.2. Stratégies de protection des cultures contre <i>B. cinerea</i> . . .	18
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES . . .	25
III.1. choix du milieu de culture . . .	25
III.2. MATÉRIEL BIOLOGIQUE . . .	25
III.2.1 Collection d'isolats de <i>Botrytis sp</i> . . .	25
III.2.2 Agent antagoniste . . .	27
III.3 CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE ET CULTURAL DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> . . .	28
III.3.1 Analyses des colonies . . .	28
III.3.2 Estimation de la croissance mycélienne . . .	28
III.3.3 Analyse des spores . . .	28
III.3.4 Analyse des sclérotés . . .	29
III.4 ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTAGONISTE <i>IN VITRO</i> DE <i>TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM</i> ET <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> VIS-A-VIS <i>BOTRYTIS CINEREA</i> . . .	30
III.4.1 Effet de <i>Trichoderma sp</i> sur la croissance mycélienne du <i>Botrytis sp</i> . . .	30
III.4.2 Effet de <i>Trichoderma sp</i> sur la sporulation du <i>Botrytis</i> . . .	31
III.5. ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ <i>IN VITRO</i> DES FONGICIDES SUR LES ISOLATS DE <i>BOTRYTIS CINEREA</i> . . .	31
III.5.1. Fongicides utilisés . . .	31
III.5.2 Milieu de culture utilisé . . .	31
III.5.3 Préparation de l'inoculum . . .	32
III.6 Etude de l'efficacité des fongicides sur la croissance mycélienne . . .	32
III.6.1 Préparation des concentrations des fongicides . . .	32
III.6.2 Mode opératoire . . .	33
III.6.3 Mesure de croissance mycélienne . . .	33
III.6.4 Lecture des boîtes . . .	34
III.7 ANALYSE DES RÉSULTATS . . .	34
IV. Résultats . . .	35
IV.1 caractérisation morphologique et culturelle de <i>Botrytis cinerea</i> . . .	35
IV.1.1 Analyse des colonies . . .	35
IV.1.2 Analyse des spores . . .	39

IV.1.3 Analyse des sclérotés . . .	41
IV.1.4. Analyse en composantes principales de l'ensemble des caractères biologiques . . .	46
IV.1.5. Discussion . . .	50
IV.2. Effet de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> et <i>Trichoderma harzianum</i> sur <i>Botrytis cinerea</i> in vitro . . .	52
IV.2.1 Effet de <i>Trichoderma</i> spp sur la croissance mycélienne de <i>Botrytis</i> sp . . .	52
IV.2.2. Effet des souches des <i>Trichoderma</i> sp. Sur la sporulation des isolats de <i>Botrytis</i> . . .	56
IV.2.3. Discussion . . .	57
IV.3. Etude de l'efficacité des fongicides in vitro sur la croissance mycélienne de <i>Botrytis cinerea</i> . . .	60
IV.3.1. Discussion . . .	64
IV.4. CONCLUSION . . .	64
Références bibliographiques . . .	67
Annexes . . .	81
ANNEXE 01. Milieu de culture MALT : . . .	81
ANNEXE 02. Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) : . . .	81
ANNEXE 03. Milieu gélosé : . . .	81
ANNEXE 04 : Propriétés des fongicides utilisés : . . .	81
Annexe 05 : Calcul des concentrations des fongicides pour le test sur la croissance mycélienne de <i>Botrytis</i> sp SWITCH : (Cyprodinil 37.5%, fludioxonil 25%) . . .	84
Annexe 06 : Calcul des concentrations des fongicides pour le test sur la croissance mycélienne de <i>Botrytis</i> sp Chorus : (50% cyprodinil) . . .	85
Annexe 07 : Analyses de la variance de la taille des spores des isolats de <i>Botrytis cinerea</i> . . .	85
Annexe 08 : Analyse de la variance de l'effet des souches de <i>Trichoderma</i> T13 et T09 sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Botrytis</i> sp en confrontation directe . . .	86
Annexe 09 : Analyse de la variance de l'effet des souches de <i>Trichoderma</i> T13 et T09 sur la croissance mycélienne des isolats de <i>Botrytis</i> sp en confrontation a distance . . .	87
Annexe 10 : Analyse de la variance de la croissance mycélienne des isolats de <i>Botrytis</i> sp traités par des différentes doses de deux fongicides . . .	88

Dédicace

*C'est a ma maman, mon papa, Mes sœurs et mes frères Ainsi qu'a mes amis Que je dédie ce
modeste travail*

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de mycologie du département de botanique de l'école nationale supérieure agronomique d'El Harrach, Alger

Je remercie sincèrement tous ceux qui ont, de près ou de loin contribué à la réalisation de ce mémoire, fruit de mes premiers pas dans l'univers de la recherche.

Toutefois, des remerciements particuliers sont formulés à

Mes parents qui m'ont toujours soutenu et tout particulièrement cette année.

Tous mes enseignants de l'école nationale supérieure agronomique E.N.S.A plus particulièrement :

Madame LOUANCHI M., Maître de conférences à l'école supérieure National Agronomique d'El Harrach (Alger) d'avoir accepté de diriger mon travail malgré ses multiples occupations et m'a toujours ménagé une attention particulière en orientant mes recherches.

Mes vifs remerciements et ma profonde gratitude vont également à :

À Monsieur BOUZNAD .Z . professeur à l'école supérieure National Agronomique d'El Harrach (Alger),

- A Mademoiselle BOUREGHDA. H. chargé de cours à l'école supérieure National Agronomique d'El Harrach (Alger),
- Monsieur GUEZLANE.A. chargé de cours à l'école supérieure National Agronomique d'El Harrach (Alger), pour leur aide précieuse dans le traitement statistique des résultats.

Liste des Abréviations

- ACTA : Association de Coordination Technique Agricole
- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- ArMV : Arabis Mosaic Virus
- BC : *Botrytis cinerea*
- CG : Cytosine et Guanine
- FBLA : Faba Bean Leaf Agar
- GFLV : Grapevine Fanleaf Virus.
- GLRaV : Grapevine Leaf Roll associated Virus
- Ha : Hectare
- HI : Hectolitre
- IAM : Indice d'Attaque Moyen
- INA : Institut National Agronomique.
- ITAF : Institut Technique des Arbres Fruitiers et de la Vigne.
- L : Linné
- LSD : least significant difference (la plus petite différence significative)
- MADR : Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural.
- Mb : M beses
- PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
- PDA : Potato Dextrose Agar.
- PG : Polygalacturonases
- PNDA : Plan National de Développement de l'Agriculture.
- Qx : Quintaux
- RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme des longueurs de fragments de restriction)
- USA : United States of America
- μm : Micromètre.
- %AM : Pourcentage d'attaque moyen

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 inefficace en raison de la variabilité phénotypique et génétique du pathogène. 3 axes sont développés dans ce travail :

Le premier vise les espèces d'une collection de *Botrytis spp.* Provenant de différentes plantes hôtes. L'étude des critères morphologiques a travers l'aspect des colonies, la taille des spores et leurs concentrations, les sclérotés et leurs densités a permis d'identifier les isolats appartenant à l'espèce polyphage *Botrytis cinerea*.

Le second axe concerne l'évaluation et la comparaison de l'efficacité de l'activité antagoniste *in vitro* de deux souches appartenant à deux espèces *Trichoderma atroviride* T13 et *Trichoderma longibrachiatum* T9. Cet axe a montré l'existence d'une variabilité de l'activité antagoniste à l'égard des isolats de *Botrytis* qui s'est manifesté au niveau de la réduction de la croissance mycélienne et la sporulation.

Le troisième axe vise à l'étude de l'évaluation de l'efficacité deux fongicides à différentes doses sur la croissance mycélienne et la sporulation des souches de *Botrytis* de notre collection. Les résultats obtenus font ressortir l'efficacité remarquable de nos deux fongicides, le CHORUS et le SWITCH.

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. To archive 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 concentration of spores, sclerotia and their densities identified all isolates belonging to the polyphagous species *Botrytis cinerea*.

The second axis and in this study we have evaluated and compared the antagonistic efficiency of some isolate of two species of *Trichoderma longibrachiatum* T13 and *Trichoderma atroviride* T9 . The antagonistic efficiency was studied *in vitro* . The results obtained have shown the existence of considerable differences in the capacity of *Trichoderma* isolates on decrease of growth and conidia production of the *Botrytis*.

The third axis consists in valuing the efficiency to several doses on growth mycelial of all isolates of our collection of *Botrytis*. The obtained results have the efficiency remarkable of fungicides the CHORUS and the SWITCH.

ص — خ ل م

يختلف جنس بوتريتييس من أنواع فطرية مسببة أمراض لينة محاصيل في جميع أنحاء العالم . النوع المتعدد الهائل له مجموعة واسعة من النباتات المضيفة ويعوق عددها 235 نبتة . بالرغم من وجود مبيدات كيميائية لمكافحة الفطر ، لوحظ فشل كثير منها بسبب التباين الشكلي والجنسي للفطر . هناك ثلاثة محاور وضعت لهذا العمل الدراسي .

المحور الاول : تحديد الانواع المكونة لمجموعة بوتريتييس فئلات ضييفة مختلفة .

دراسة السمات الشكلية من خلال شكل المستعمرات ، حجم وتركيز الانواع ، حجم وكثافة الاجسام الحجرية . بينت أن كل الزوايا تنتمي لنوع

Botrytis Cinerea

المحور الثاني : دراسة مقارنة فعالية القدرة الضيافية لمزيجين إثنين تنتميان إلى

Trichoderma Longibnachiatum

Tricoderma A.trovide

تجاه الفطر المسبب للامرض وذلك بدراسة فعالية المزج من خلال تقليل نمو وإنتاج الانواع في المخبر .

المحور الثالث : هو دراسة مخبرية تمثل في تقدير فعالية عدة درجات من المبيدات المستعملة للحد من تطور نمو الفطر وإنتاج الانواع

(*CHORUS* و *SWITCH*)

Chapitre II : Partie bibliographique

II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise

II.1.1. Position taxonomique

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

- La forme parfaite (téléomorphe), *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Wetzl : Ascomycète, classe des Discomycètes, ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.
- La forme imparfaite (anamorphe), *Botrytis cinerea* Pers. : Deutéromycète, classe des Hyphomycètes, ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae.

B. cinerea est considéré comme un complexe d'espèces sympatriques où 2 groupes coexistent. Le Groupe I regroupe des isolats présentant une compatibilité végétative entre eux (Fournier *et al.*, 2005), et une sensibilité réduite au fongicide fenhexamid (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003). Le Groupe II est divisé en 2 types, *transposa* et *vacuma* (Giraud *et al.*, 1997). Le premier type présente 2 éléments transposables *Boty* et *Flipper* (Diolez *et al.*, 1995 ; Levis *et al.*, 1997). Les isolats *transposa* ont des petites macroconidies, sont résistants à la vinclozoline et au diethofencarbe (Giraud *et al.*, 1999) et présentent un développement mycélien plus lent lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu riche en nutriments (Martinez *et al.*, 2003).

II.1.2. Importance économique de la maladie

Botrytis cinerea est un champignon polyphage capable d'attaquer plus de 230 espèces de plantes (Jarvis, 1980). Il affecte de nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ (Gullino, 1992). Il peut entraîner la destruction partielle ou totale de la plante hôte, et dans certains cas de la récolte. Sur le plan économique, ce champignon est considéré comme un problème phytosanitaire majeur en viticulture dans le monde (Martinez *et al.*, 2005). Les pertes mondiales sont estimées à 2 milliards \$ par an (Elmer and Michailides, 2004). En cultures sous abris, les risques d'attaque par ce champignon pathogène sont permanents sur tomate, poivron, laitue ou fraise (Jarvis, 1992). Pour lutter contre la maladie, l'utilisation de fongicides entraîne des coûts financiers importants qui s'élèvent à 15-25 millions de dollars par an (Elad and Stewart, 2004).

II.1.3. Cycle de développement de la pourriture grise

B. cinerea peut produire du mycélium, des spores asexuées ou conidies, des spores sexuées ainsi que des sclérotés. Le mycélium de *B. cinerea* comprend des filaments

articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelquefois vésiculeux. Lorsque le mycélium est au stade de fructification, il produit des touffes de conidiophores grisâtres (Viennot-Bourgin, 1967). Le mycélium peut se conserver dans les débris de plantes de la culture précédente (figure 1).

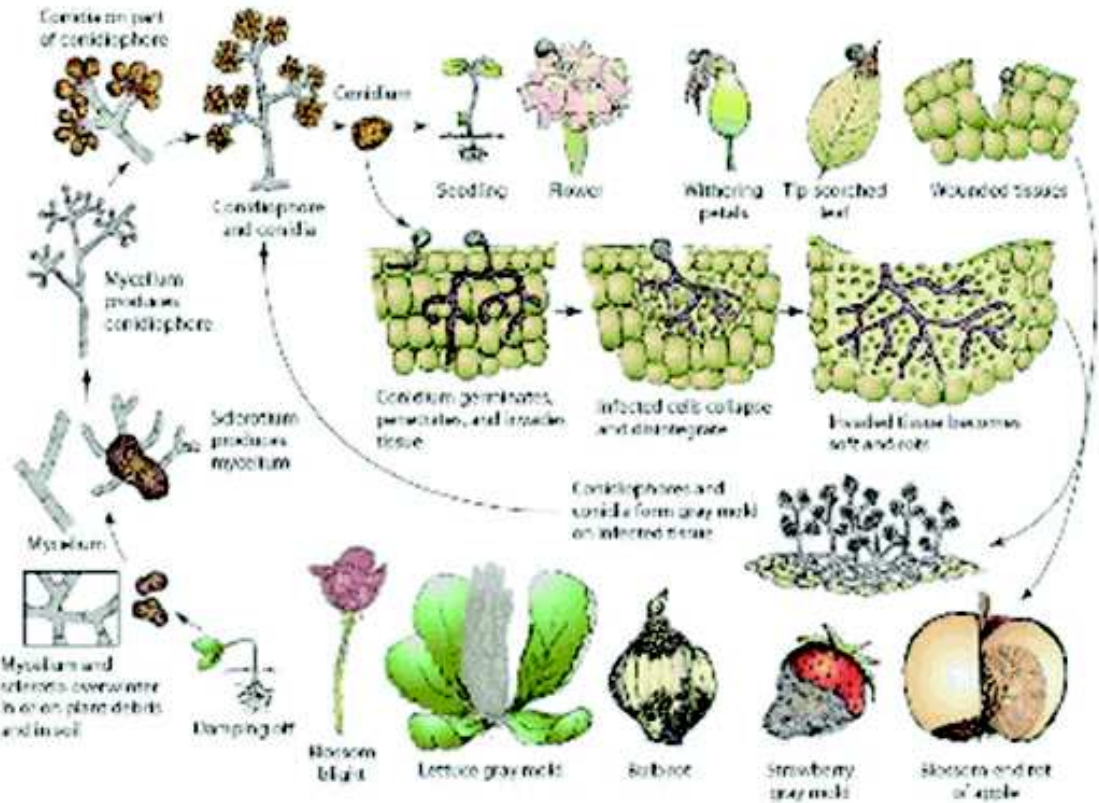
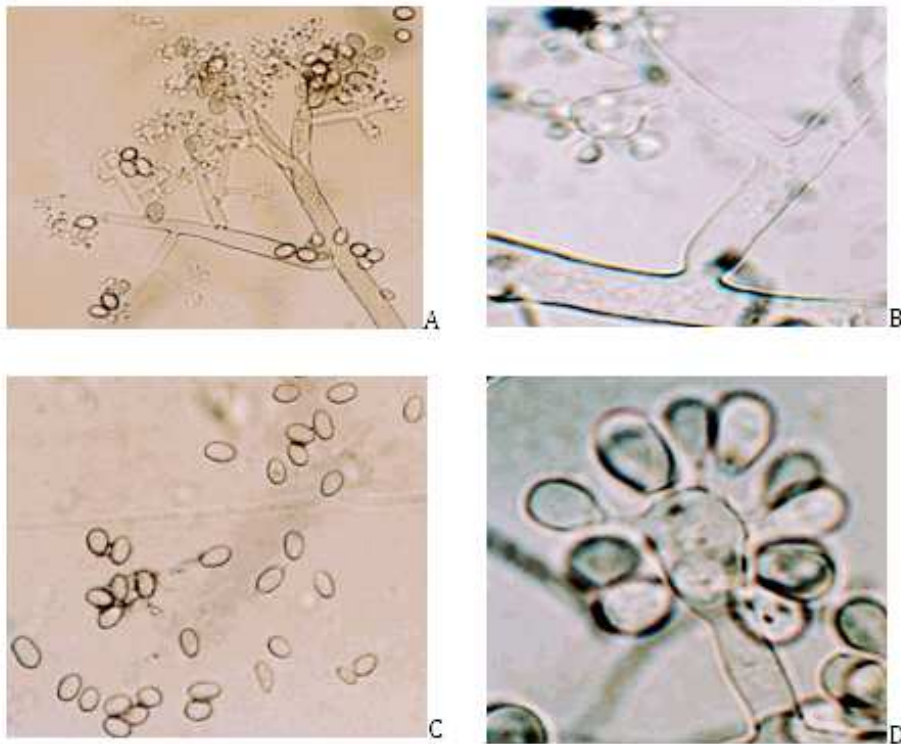


Figure 1. Cycle de développement de *Botrytis cinerea* sur différentes culture (Agrios, 2005).

Lorsque les conditions deviennent favorables, les conidies apparaissent (figure 2). Leur développement se manifeste par la production de conidiophores dressés en touffes, constituant un feutrage intense gris (figure 2). Elles ont une part importante dans la dissémination du champignon. Elles sont produites dès le printemps dans le cas de culture en plein champ et peuvent être produites continuellement dans le cas de cultures sous abris. Leur libération est favorisée par un climat humide, puis elles sont transportées par le vent, la pluie et les insectes (Holz *et al.*, 2003).



A) **Conidiophore ramifié**, Conidies aux différents stades de Développement (25X3.2). B) **Conidies sur un conidiophore**, Rétrécissement des cellules conidiogènes (100X3.2). C) Conidies de *Botrytis cinerea* (25X3.2). D) conidies sur un conidiophore (100X3.2).

Figure 2. Observations de Botrytis cinerea (forme asexuée) au microscope optique

Lorsque les conditions sont défavorables, des sclérotes se forment et sont constitués par du mycélium agrégé blanchâtre. En vieillissant, ils durcissent et deviennent noirâtres (figure 3). Au printemps, les sclérotes peuvent produire du mycélium ou des conidies (Coley-Smith and Cooke, 1971).

Les sclérotes peuvent germer pour produire des apothécies. Les apothécies sont obtenues par le croisement d'isolats sexuellement compatibles, MAT1-1 et MAT1-2 (Faretra *et al.*, 1988). Elles contiennent des asques linéaires contenant des ascospores (Beever and Weeds, 2004). Chaque asque contient quatre paires d'ascospores. Bien que les apothécies soient rarement observées au champ (Faretra *et al.*, 1988), certaines études montrent que les ascospores peuvent avoir une importance épidémiologique en servant de source d'inoculum primaire (Figure 4) (Lorbeer *et al.*, 2004).

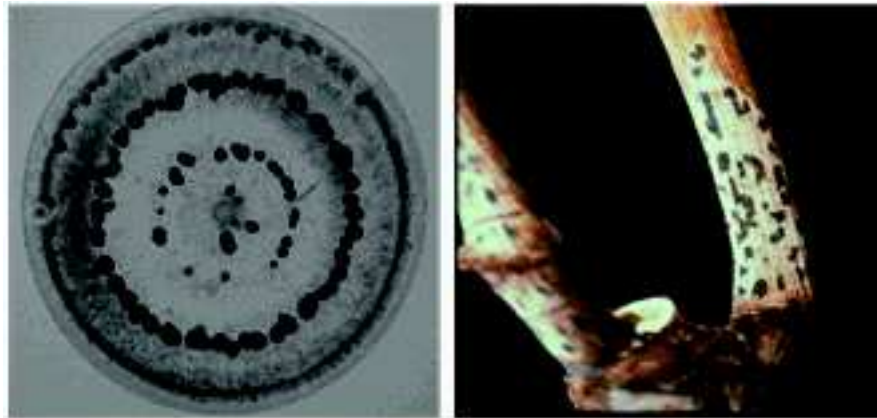
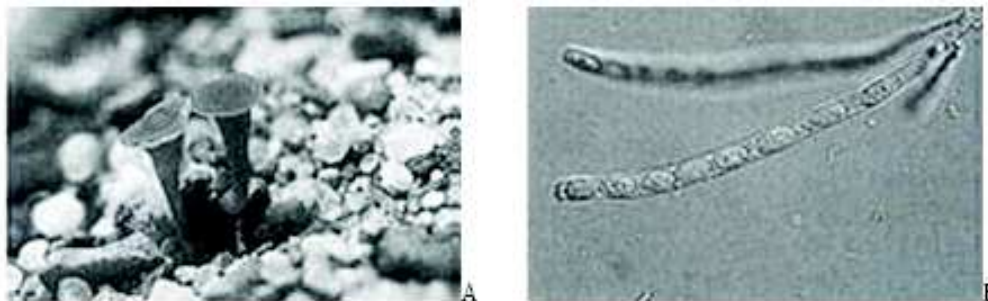


Figure 3. Formation *in vitro* (à gauche) et *in vivo* (à droite) de sclérotes de *Botrytis cinerea*

(Source INRA)



A. apothécies de *Botryotinia fuckeliana* portant un grand nombre d'asques. B. Asque de *Botryotinia fuckeliana* contenant huit ascospores vue au microscope optique (400 x).

Figure 4. Forme sexuée de *Botrytis cinerea*

(Viret et al, 1995).

II.1.4. Symptomatologie

II.1.4.1. Symptômes sur vigne

Dans les vignobles où le printemps est pluvieux, on peut parfois observer des attaques de jeunes rameaux qui se manifestent par une nécrose brune, qui peut se recouvrir par des fructifications du champignon. La partie du rameau située au-dessus de la nécrose flétrit généralement et se dessèche. On observe des taches importantes brun-rouge, situées au bord du limbe, en forme de coin qui suivent ou chevauchent les nervures.

Avant la floraison, les inflorescences peuvent être atteintes sur le rachis ou sur les bouquets de boutons floraux et se dessécher. Ces attaques précoces sont relativement rares et dénommées " pourriture pédonculaire ". A la fin de la floraison, les pièces florales et les jeunes baies avortées peuvent être colonisées par le champignon et rester emprisonnées dans la grappe. Elles servent de relais pour une attaque ultérieure. Les attaques sur la rafle se traduisent par des petites taches brunes et sur les baies par un dessèchement.

Avant la véraison, les symptômes sont rares sur les baies. C'est généralement à partir de la véraison que la maladie devient visible dans les vignes. Les premiers foyers se développent très souvent à partir d'un fragment de végétal (feuille ou débris floraux). Lorsque la baie est complètement envahie, on dit qu'elle est " au stade pourri-plein ". Ensuite, on voit apparaître les conidiophores à la surface de la baie. Puis, selon les conditions climatiques, la baie se ride et se ratatine, c'est le stade " pourri-flétri ".

II.1.4.2.Symptômes sur fève

Les diverses altérations déterminées par cette maladie se manifestent sur toute la partie épigée de la plante et notamment sur le feuillage où elles sont bien caractérisées (Berger, 1936). Les tissus foliaires ainsi que l'endocarpe des gousses de *Vicia faba* L. sont sensibles à *Botrytis fabae* Sard ; mais résistants à *Botrytis cinerea* Pers. Cette résistance est typiquement exprimée par la production de lésions réduites lorsque ces tissus sont infectés par *B. cinerea* (Prins, 2001), contrairement aux lésions étendues produites par *B. fabae*. Cependant, les cotylédons sont résistants aux deux champignons grâce à une production plus importante de phytoalexines (Hargreaves, Mansfield & Rossall, 1977).

Sur feuilles, les premiers symptômes apparaissent l'hiver et au printemps, le parasite provoque sur les feuilles du bas de la tige une multitude de taches ponctiformes de couleur brun rougeâtre de 0.1 à 2mm. Les petites taches, légèrement déprimées évoluent assez rapidement, s'étendent circulairement et atteignent en moyenne 3 à 5mm de diamètre (Berger, 1936 ; Maufra, 1985). A cause de leur couleur, ces nécroses sont appelées « taches chocolat », chacune d'entre elle correspond à la pénétration des tubes germinatifs issus d'une ou de plusieurs spores. Cette forme d'attaque est qualifiée de « non agressive », c'est-à-dire qu'elle se manifeste lorsque les conditions de température et d'humidité sont peu favorables au développement de la maladie (Maufra, 1985 ; Trivoli & Gondran 1988).

Sur tiges, les symptômes forment des stries longitudinales de couleur chocolat qui évoluent en nécroses brunâtres comme sur les feuilles (Maufra, 1985). Une tacheture de teinte rouge plus au moins vive caractérise également l'apparition de la maladie sur tiges. Elle paraît arriver à son maximum d'intensité lors du dessèchement complet du feuillage. Les tiges très attaquées prennent une teinte brun rougeâtre marbrée de rouge vif et se dessèchent. Sur fleurs, l'une des répercussions les plus sensibles du développement du champignon est la coulure. Les pièces du périanthe portent de petites taches brunâtres, circulaires qui s'étendent rapidement et provoquent la pourriture ou le dessèchement de ces organes. Sur gousses, la maladie se manifeste par l'apparition d'une multitude de petites taches ponctiformes, ensuite par une pourriture brune suivie d'un dessèchement partiel et parfois total (Berger, 1936).

II.1.4.3. Symptômes sur courgette

Les symptômes se manifestent par l'apparition de taches beiges avec un halo jaune en bordure de la feuille. Sur le pétiole, on observe une moisissure grise qui gagne ultérieurement la tige et le fruit.

Le champignon se conserve sous forme de sclérotés sur les débris végétaux et sur le sol. Une forte humidité favorise son développement. En culture de plein champ, les conidies sont disséminées par la pluie et le vent, et sous- serres par les courants d'air et l'eau de condensation.

II.1.4.4. Symptômes sur tomate





La maladie de la tache spectrale est causée par *Botrytis cinerea*, sur les tomates cultivées à l'extérieur, ou en serre, quand l'humidité est élevée. Elle apparaît sur le fruit sous forme d'une marque annulaire pâle superficielle ayant en son centre un petit point brunâtre. Sur les fruits verts, le cercle peut être vert pâle ou argenté et, à l'intérieur de l'anneau, la peau est d'un vert plus pâle. Sur les fruits mûrs, l'anneau est d'habitude jaune pâle. La maladie ne se développe pas plus mais déprécie les fruits.




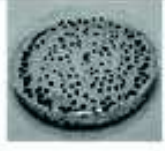
B. cinerea peut aussi causer la pourriture grise des feuilles, des pétioles, des tiges et des fruits, en particulier en serre. Sur les fruits, l'infection commence à la pointe florale ou au bout du pédoncule. Quand l'humidité est forte, une couche de champignon grisâtre se forme rapidement, et une pourriture molle aqueuse gâte le fruit. Sur les tiges, l'infection commence d'habitude par la prise du champignon sur le tissu malade à la base des pétioles de la feuille ou à la souche des pétioles après la chute des feuilles. Une fois implanté sur le tissu atteint, le champignon envahit la tige, la cerne souvent complètement et fait mourir le plant. Le champignon cause fréquemment des lésions à divers nœuds sur la tige du plant. Le ceinturage concentrique de la lésion constitue un symptôme courant.

II.1.5. Diversité phénotypique et génétique de *B. cinerea*

II.1.5.1. Les différents morphotypes

Une étude de la diversité morphologique sur milieu gélosé Malt-Agar de *B. cinerea* a été réalisée sur 111 isolats ont permis de montrer 8 types morphologiques : quatre mycéliens caractérisés par une quasi-absence de sclérotés et quatre sclérotiens (tableau 1) (Martinez *et al.*, 2003).

Type Mycélien "M"				
Representation				
Phenotype	M 1	M2	M3	M4
Mycélium	rasant	aérien	masses mycéliennes	épais et dense
Sporulation ⁽¹⁾	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotés ⁽²⁾	0	0	0	0

Type Sclérotien "S"				
Representation				
Phenotype	S1	S2	S3	S4
Mycélium	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant	plutôt rasant
Sporulation ⁽¹⁾	1	1	1	0
Sclérotés ⁽²⁾	En bordure des boîtes de Pétri	Plutôt de grande taille formant un ou des cercles	Plutôt de grandes tailles, éparpillés	Nombreux, petits et éparpillés

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

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

Tableau 1. Morphotypes de *Botrytis cinerea* sur milieu Malt-Agar (Martinez et al. 2003)

Botrytis cinerea possède des conidies ovoïdes hyalines à marron pâle, unicellulaires et hydrophobes, d'une taille de 8 – 14 X 6 – 9 µm. Elles sont libérées par le mouvement hygroscopique du rétrécissement des cellules conidiogènes qui sont renflées et ornées de courts stigmates simples, sur lesquels se déposent les Conidies (Katamoto et al, 1974 ; Onfroy, 1997). Des micro-conidies d'une taille de 2,5 à 3 µm de diamètre peuvent être retrouvées, comme chez toutes les espèces de sclérotiniacées (Willetts, 1969). Les sclérotés sont toujours petits, arrondis ou ovoïdes, aplatis à la surface de l'organe qui les porte. Ils mesurent 2 à 4 mm de longueur et 1 à 3 mm de largeur.

Des travaux menés en Algérie ont montré une variabilité intraspécifique importante des caractères morphologiques et bien qu'ils permettent d'identifier *B. cinerea*, il existe quelques problèmes de différenciation entre espèces proches notamment *Botrytis fabae* (Salhi, 2004 ; Meamiche, 2010).

II.1.5.2. Agressivité sur plante

En Algérie, les différentes prospections ont montrés l'existence de *Botrytis cinerea* sur culture de vigne dans pratiquement tous les vignobles visités. L'analyse du pouvoir pathogène a montré que l'espèce cause des symptômes typiques de la maladie pourriture grise. Ainsi, la comparaison du pouvoir pathogène des isolats a permis de montrer clairement une différence d'agressivité sur les différentes variétés (Rami, 2007 ; Adjou, 2008). Les isolats de *B. cinerea* ne présentent pas le même niveau d'agressivité sur une même plante hôte. Des différences d'agressivité ont été rapportées sur haricot vert (Tiedemann, 1997), tomate (Decognet *et al.*, 2009) et sur vigne (Mirzaei *et al.*, 2007).

Une étude comparative entre des mutants non agressifs et des souches agressives de *Botrytinia fuckeliana* (forme parfaite de *Botrytis cinerea*) a permis d'isoler le gène Pat 1 responsable de la non agressivité. Ce gène n'est pas corrélé avec les gènes Mbc (Résistance au dicarboximide), Nit 1 (non utilisation des nitrates) et Selt 1 (Résistance au sodium sélérate) Une faible production en acides organiques et une altération de l'activité des polyglacturonases a été décrite pour ces mutants. Ces deux facteurs ont un rôle important dans la pathogénicité de *Botrytinia fuckeliana* (Weeds *et al.*, 1999).

II.1.5.3. Diversité génétique

Différents types de marqueurs moléculaires ont été développés chez *B. cinerea* tels que les RAPDs, les RFLPs, les AFLPs et les marqueurs microsatellites (Brygoo *et al.*, 1998; Fournier *et al.*, 2002; Giraud *et al.*, 1997; McDonald, 1997). Une forte diversité génétique a été observée au Chili sur des isolats de différentes plantes hôtes (Thompson et Latorre, 1999). L'utilisation de 16 marqueurs RFLP, ont permis d'identifier 134 haplotypes dans un échantillon de 259 isolats provenant de raisins en France (Giraud *et al.*, 1997). En Tunisie, une grande diversité a été observée à l'aide de 9 microsatellites, et semble être corrélée à la plante hôte et l'origine géographique des isolats (Karchani-Balma *et al.*, 2008).

La présence de deux éléments transposables *Boty* et *Flipper*, et l'étude des recombinaisons génétiques ont permis de distinguer deux sous-populations nommées *Transposa* (possédant *Boty* et *Flipper*) et *vaccuma* qui sont sympatriques sur la vigne (Diolez *et al.*, 1995 ; Levis *et al.*, 1997 ; Keressies *et al.*, 1997 ; Giraud *et al.*, 1997 ; Giraud *et al.*, 1999). Un groupe d'isolats a été mis en évidence et ne possède que le transposon *Boty* au Chili ce qui suggère que ce groupe pourrait être le croisement entre *transposa* et *vaccuma* dont seul *boty* a pu envahir *vaccuma*. Cependant, la possibilité qu'il puisse aussi constituer un troisième groupe génétiquement isolé n'a pas été écartée (Munoz *et al.*, 2002). Des travaux similaires réalisés en Californie sur différentes cultures confirment la prédominance de *transposa* et la présence d'isolats ne possédant que *Boty*. Mais, un seul isolat *vaccuma* a été observé sur une collection de 234 (Zhonghwa *et al.*, 2005).

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

II.2. Stratégies de protection des cultures contre *B. cinerea*

II.2.1. Méthodes prophylactiques

Pour lutter contre *B. cinerea*, certaines mesures prophylactiques sont préconisées :

- Retirer de la parcelle ou de la serre les feuilles sénescentes et les organes infectés afin de réduire les sources d'inoculum (Richard and Boivin, 1994).

- Dans les serres, effeuiller afin de permettre une circulation d'air optimale et réduire ainsi l'hygrométrie (Decognet *et al.*, 2009).
- Réduire la densité de plantes afin de limiter les zones de confinement entraînant l'accroissement de l'humidité relative et de la condensation dans les serres (Daugaard *et al.*, 2003; Jarvis, 1992).
- Raisonner la fertilisation pour limiter le développement de *B. cinerea* (Elad *et al.*, 1992).

II.2.2. Lutte génétique et transgénèse

Actuellement, il n'existe aucune variété résistante à la pourriture grise pour l'ensemble des cultures attaquées par le champignon (Dik and Wubben, 2004). Cependant, il existe d'importantes différences dans la sensibilité à la pourriture grise pour des cultivars de certaines plantes comme chez la fraise (Legard *et al.*, 2000), le concombre (Dik and Wubben, 2004) ou le rosier (Uchneat *et al.*, 1999). Certaines différences dans la sensibilité sont attribuées aux différences d'architecture de la plante et à la densité de feuillage (Dik and Wubben, 2004). Toutefois, certaines résistances décrites sont d'origine génétique. Sur tomate, la résistance à *B. cinerea* est quantitative et liée à différents gènes de résistance chez l'hôte (Dik and Wubben, 2004; Finkers *et al.*, 2008). Une résistance partielle liée à trois QTL a été identifiée chez une variété sauvage de la tomate *Solanum habrochaites* LYC4 (Finkers *et al.*, 2008).

Des essais de transgénèse ont montré une réduction du développement de *B. cinerea* sur les fruits mûrs de tomates transgéniques (Powell *et al.*, 2000). La transformation génétique est bien maîtrisée chez la vigne. Elle est réalisée aussi bien par co-culture avec des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* que par biolistique (Colova-Tsolova *et al.*, 2001 ; Kikkert *et al.*, 1997). Dans la lutte contre *B. cinerea*, les stratégies visent à surexprimer des gènes codant des molécules à fonction antimicrobienne. Ainsi, l'intégration d'un gène codant une stilbène synthase a permis une production plus importante de resvératrol dans les plantes transgéniques (Fan *et al.*, 2008) et une meilleure tolérance *in-vitro* vis-à-vis de *B. cinerea* (Mauro *et al.*, 1995). De la même manière, des vignes transgéniques exprimant un gène codant une protéine inhibitrice de polygalacturonases (PGIP : polygalacturonase-inhibiting protein) présentent une tolérance plus importante à *B. cinerea* (Agüero *et al.*, 2005). Le rôle des PGIP est de prévenir la dégradation de la paroi végétale en inhibant les polygalacturonases fongiques, enzymes souvent considérées comme étant des facteurs de virulence (Ten Have *et al.*, 1998 ; Ten Have *et al.*, 2002).

II.2.3. Lutte chimique

II.2.3.1. Les principales matières actives utilisées

Les fongicides anti-*Botrytis* utilisés en végétation ont largement évolué depuis le début des années 1970, où les premières matières actives apparues sont le folpel, le captafol, l'euparène (dichlofluanide) et le thirame. A partir de 1976, de nouvelles matières actives ont été mises au point comme les benzimidazoles, thiophanates, et dicarboximides (Leroux *et al.*, 1999). Actuellement, les fongicides restent des outils indispensables pour lutter contre *B. cinerea* en pré- et post-récolte (Leroux, 2007). Une liste de produits phytopharmaceutiques homologués en France contre *B. cinerea* est présentée dans le tableau 2 (ACTA, 2008).

Dans la lutte contre *B. cinerea* chez la vigne, les fongicides sont appliqués, selon une méthode conventionnelle, aux stades phénologiques du développement de la plante reconnus pour être très sensibles aux attaques du champignon (stade A : fin floraison-début

de la nouaison ; stade B : fermeture de la grappe ; stade C : véraison ; stade D : 3 à 4 semaines avant les vendages) (Anonyme, 2010).

La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire (Leroux, 2007). Les substances actives comme le folpel, le thirame, le fluazinam et le dichlofluamide inhibent la respiration mitochondriale. En altérant la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ou ADN), l'iprodione, le procymidone, le vinchlozoline et le fludioxonil entraînent une stabilité mitotique qui conduit à une perturbation de la croissance des hyphes mycéliens. Le carbendazime, le bénomyl et le thiophanate de méthyle sont également capables d'inhiber la synthèse de l'ADN et perturbent la réplication et la formation de microtubules. La biosynthèse des stérols est affectée chez le champignon soumis au fenhexamide. Celle de méthionine est perturbée suite à l'application du pyriméthanyl et du cyprodinil (Elad *et al.*, 2007).

Famille de fongicides	Matière(s) active(s)	Effet	Cible	Exemple de plantes traitées	Exemples de spécialités commerciales
Sulfamides	Dichlofluamide	Contact	multi-sites	Vigne, Fraise	Euparène
Phénylpyrroles	Fludioxonil	Contact	Polyols et osmorégulation: histidine, protéine kinase	Vigne	Sekoya, Shirlan
Anilino-pyrimidines	Pyrimethanil, Cyprodinil	Contact + Vapeur + Activité translaminaire	Biosynthèse des acides aminés ou des protéines	Vigne, Tomate	Scala, Sari TF, Toucan
Hydroxyanilides	Fenhexamid	Contact	Biosynthèse de stérole, inhibition de la 3-céta-réductase (C4-déméthylaon)	Tomate, Fraise	Lazulie, Teldor
Dicarboximides	Iprodione	Contact	Polyols et osmorégulation: histidine, protéine kinase	Vigne e, Tomate	Rovral, Rovral Aqua flo, Chipco Green
Carboxamides	Boscalide	Contact et Systématique	Inhibition la succinate ubiquinone réductase, arrêt de la respiration et la production d'énergie	Vigne, Haricot	Cantus, Pictor pro
Strobilurines	Azoxystrobine	Contact et Systématique	Blocage de la respiration + arrêt de la production d'énergie	Fraise	Amistar, Ortiva, Heritage
Chlorothalonil	Chloronitriles	Contact	Réactions enzymatiques chez les spores	Vigne	Dorimat, Fungistop DF, Fungistop FL
Cyproconazole + Chlorothalonil	Triazoles+ Chloronitriles	Contact	Réactions enzymatiques chez les spores	Vigne	Citadelle, Marathon, Milfal

Tableau 2. Principaux produits phytopharmaceutiques homologués en France contre *B. cinerea* (ACTA 2008 ; <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>)

II.2.3.2. Sensibilité aux fongicides

L'utilisation de fongicides peut entraîner le développement de souches résistantes (Latorre *et al.*, 1997; Leroux, 2004). Une grande résistance est observée avec le bénomyl (Bollen et Scholten, 1971 ; Faretra *et al.*, 1991; Katan *et al.*, 1989).

De même, des applications fréquentes sur vigne de benzimidazoles et de thiophanates (bénomyl, carbendazime, thiophanate-méthyl par exemple) ont provoqué très vite l'apparition de souches résistantes à ces molécules (Georgopoulos, 1977). Des souches résistantes aux fongicides de la famille des dicarboximides, tels que l'iprodione, le vinchlozoline et la procymidone, sont apparues pour la première fois en 1977 (Pappas *et al.*, 1979) et sont encore observées (Myresiotis *et al.*, 2007). Une double résistance aux dicarboximides et aux benzimidazoles a été signalée en 1979 pour la première fois (Pappas *et al.*, 1979). En 1987, l'association du diéthofencarbe et du carbendazime (Sumico L) démontre son efficacité sur les souches résistantes à plusieurs familles de fongicides (Elad *et al.*, 1992). Cependant, de nouvelles résistances sont apparues mais sont de type non-

persistant (Leroux and Moncomble, 1993). Actuellement, on observe des résistances à la majorité des familles de fongicides utilisées contre *B. cinerea* (Coudrchet, 2003; Leroux, 2004). Cependant, aucun isolat n'est résistant aux phenylpyrroles, et un seul isolat est résistant au fenhexamide, botryticide utilisé au milieu des années 1990 (Myresiotis *et al.*, 2007).

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

II.2.4. Lutte biologique

II.2.4.1. Les biopesticides et leur utilisation en lutte biologique

La définition officielle par l'OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) stipule que la protection biologique est « *l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs* ». Le principe de la lutte biologique est basée sur l'exploitation par l'homme et à son profit d'une relation naturelle entre deux êtres vivants :

- la **cible** : organisme indésirable, pathogène ou ravageur d'une plante cultivée, mauvaise herbe, etc.
- l'**agent** de protection (ou auxiliaire pour les ravageurs) : organisme différent, le plus souvent parasite (ou parasitoïde), prédateur ou agent pathogène du premier, qui le tue à plus ou moins brève échéance, éventuellement en s'en nourrissant, ou tout au moins qui limite son développement.

Les biopesticides sont des préparations contenant les agents de lutte biologique, agissent en réduisant l'inoculum et/ou en interférant avec un ou plusieurs étapes du cycle infectieux du phytopathogène (Jijakli, 2003). En sa qualité de parasite facultatif, *Botrytis cinerea* s'avère très 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 produits commerciaux à base d'agent de contrôle biologique occupent une part infime du marché des pesticides. Néanmoins, leur commercialisation s'accroît au fil des années. Les produits enregistrés et homologués sont le Binab a base de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma polysporum*, destiné aux sols infectés des cultures sous serres (Tomate, concombre, plante ornementales), le Mycostop contenant la souche K61 de *Streptomyces griseoviridis* et prévient les fontes de semis et les pourritures de tige sur tomate, concombre, laitue et poivron (White *et al.*, 1990), le Botry-Zen a 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 (tableau 3) (Droby *et al.*, 1991).

Tableau 3 . Exemple de produits de lutte biologique commercialisés dans le monde pour la lutte contre *Botrytis cinerea* (Elad *et al.*, 2004)

Espèce antagoniste	Utilisation	Nom de produit	Fabricant/Pays
<i>Trichoderma Harzianum</i> (T39)	En vignes et en cultures sous serre	Trichodex	Makhteshim, Israël
<i>Ulocladium oudemansii</i>	Vignes	Botry-Zen	Botry-Zen Ltd, NouvelleZélande
<i>Candida oleophila</i>	Fruits après récolte	Aspire	Ecogen, Etats-Unis
<i>Cryptococcus albidus</i>	Fruits après récolte	Yield Plus	Anchor Yeast, Cape Town, Afrique du Sud
<i>Pseudomonas syringae</i>	Fruits après récolte	Bio-save	Eco Science Corp, Etats-Unis
<i>Bacillus subtilis</i> (QST 713)	Cultures sous serre et de plein champ	Serenade	Agra Quest, Etats- Unis

II.2.4.2. Utilisation de *Trichoderma* spp. Dans la lutte biologique

II.2.4.2.1. Description et position systématique

Le genre *Trichoderma* pers. est caractérisé par une vitesse de croissance rapide et une sporulation abondante sur milieu de culture (Gams et Bissett, 1998). Il est facilement reconnaissable en culture grâce à leur couleur généralement verte de ses spores (Dubos, 1986). Les conidies se forment typiquement dans un délai d'une semaine en touffes compactes ou lâches des couleurs verdâtres, blanchâtres et parfois jaunâtres. Les conidiophores sont fortement ramifiés suivant une structure pyramidale et se terminent par une ou plusieurs phialides. Ces phialides peuvent être cylindriques ou sub-globuleuses, regroupés en masse ou solitaires. Les conidies sont hyalines, ellipsoïdes et lisses chez la plupart des espèces, les conidies globuleuses sont rares.

Certaines espèces peuvent produire des chlamydo-spores globuleuses, qui sont intercalaires ou terminales. Ces chlamydo-spores sont en générale unicellulaires mais peuvent être pluricellulaires chez certaines espèces telles que *Trichoderma stromaticum* (Samuels *et al.*, 2006).

Trichoderma pers. Fr. est un genre qui appartient au *Deutéromycètes* (*hyphomycetes, moniliales, moniliaceae*). La plupart des espèces de *Trichoderma* n'ont aucune forme parfaite connue. Cependant, les seuls téléomorphes connues se rattachent au genre *Hypocrea* qui appartient au phylum *Ascomycota* (*pyrénomycetes, hypocreales, hypocreaceae*) (Samuels, 1996).

Le genre *Trichoderma* avait été introduit à l'origine par Persoon en 1794. Au départ la taxonomie de ce genre a été basée sur les caractères morphologiques (Rifai, 1969 ; Bissett, 1984 ; 1991a ; 1991b ; 1991c).

En 1969, Rifai a subdivisé le genre en 9 espèces agrégats qui sont : *Trichoderma piluliferum* Webster & Rifai, *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.)Rifai., *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain, *Trichoderma koningii* Oud., *Trichoderma atroviride* Rifai, *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Trichoderma pseudokoningii* Rifai, *Trichoderma viride* Pers. Ex S.F.Gray

II.2.4.2.2. Ecologie

Trichoderma est le genre le plus répandu dans le sol, retrouvé dans des habitats très variés. Ceci peut être attribuable à la nature concurrentielle agressive des espèces de *Trichoderma*

et à la possibilité de production de divers métabolites (Gams et Bissett, 1998). Presque tous les sols tempérés et tropicaux contiennent $10^1 - 10^3$ propagules de *Trichoderma* /gr du sol (Harman et al., 2004a). Il se retrouve couramment dans le sol, sur le bois et sur les débris de végétaux (Dubos, 1986). Les espèces de *Trichoderma* sont favorisées par la présence d'un grand nombre de racines, qu'elles colonisent aisément.

La dynamique des populations de *Trichoderma* est liée aux conditions du milieu, une forte dessiccation du sol pendant une longue période conduit à une baisse des populations (Papavizas, 1985). Davet (1983) a trouvé que le taux de propagules le plus faible est observé dans le cas des teneurs en eau les plus basses. Mais ce phénomène est réversible, si le sol est ré humidifié, le taux de propagules revient à sa valeur d'origine. Cependant, la température n'a aucun effet sur les populations du *Trichoderma* dans le sol, si la teneur en eau est maintenue constante.

II.2.4.2.3. Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action utilisés par les agents de lutte biologique pour affecter les pathogènes sont abondamment étudiés par es spécialistes en lutte biologiques (Howell, 2003).

En effet, *Trichoderma* est l'agent de lutte le plus étudié concernant ces mécanismes (Whipps, 2001). Ainsi, le recherches entamées ont montré l'existence de plusieurs mécanismes déployés par *Trichoderma* notamment la compétition, le mycoparasitisme, l'antibiose, l'introduction de la résistance chez la plante hôte et la stimulation de la croissance des plantes (Howell, 2003). Ces mécanismes d'action peuvent intervenir seuls, en association ou séquentiellement.

Le tableau 4 présente certaines formules commercialisées à base de *Trichoderma sp.*

Antagonistes	Espèces ciblées	Nom commerciaux
<u><i>Trichoderma harzianum</i></u>	<i>Sclerotinia Phytophthora, Rhizoctonia solani, Pythium spp., Fusarium spp., Verticillium spp.</i> Les agents de pourriture du bois et des produits du bois. <i>Botrytis cinerea</i> et autres maladies foliaires.	Bio-Fungus, Binab T.Root Pro, RootShield (ou bio-Trek, T-22G, T-22Planter Box), Supresivit, Trichopel (ou Trichojet, Trichodowels, Trichoseal), Trichoderma 2000, Trichodex, Trichoseal.
<u><i>Trichoderma viride</i></u>	<i>Rhizoctonia spp., Pythium spp. , Fusarium spp.</i>	Trie-co
<u><i>Trichoderma virens</i></u>	<i>Rhizoctonia solani</i>	G-6, G-6-5, G-11
<u><i>Trichoderma atroviride</i></u>	<i>Botrytis cinerea et Xanthomonas campestris pv. Phaseoli.</i>	P1
<u><i>Trichoderma asperellum</i></u>	<i>Pseudomonas syringae pv. Lachrymans</i>	T-203

Tableau 4. Exemple de bio fongicides commercialisés à base de *Trichoderma sp.*

Source : Jijalki, 2003

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. choix du milieu de culture

Le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) est utilisé tout au long de l'étude pour l'obtention de cultures en boîtes de pétri. Ce milieu dont la composition est décrite en annexe 1 a été utilisé pour la conservation et la production de spores, pour l'étude de la croissance mycélienne. Il a été préalablement autoclavé à 120°C pendant 20 minutes, puis coulé dans des boîtes pétri stériles.

III.2. MATERIEL BIOLOGIQUE

III.2.1 Collection d'isolats de *Botrytis sp*

La majorité des isolats étudiés de *Botrytis sp* ont été isolés à partir des échantillons frais de vigne ; de fève et d'autres cultures récoltés durant l'année (2007- 2008) ,ou provenant de la collection du laboratoire de mycologie de l'INA (Tableau 05).

Les collectes des échantillons ont été réalisées à différents endroits (Alger, Brouira, Tipaza, Boumerdess , staouali, cheraga, Tizi ouzou et Lakhdaria) au niveau des vergers, des vignobles et des serres.

Les fragments analysés ont été prélevés à partir des feuilles, fruits, tiges et graines présentant des symptômes de la maladie « pourriture grise » sur vigne.

Tableau 5. Liste des échantillons utilisés pour la recherche de *Botrytis cinerea*.

Code	Culture	Lieu d'isolement	Wilaya	Année isolement
BFA04	Fève	Ain Taya (Hay Zaytoun)	Alger	2007
BFA05	Fève	Chéraga	Alger	2007
BFA08	Fève	Staoueli	Alger	2007
BFA09	Fève	Staoueli (El hadj)	Alger	2007
BFA10	Fève	Staoueli	Alger	2007
BFA14	Fève	Bouchaoui	Alger	2007
BFA16	Fève	Saoula	Alger	2007
BFT02	Fève	Berrar	Tipaza	2007
BFT04	Fève	C.E.T	Tipaza	2007
BFT05	Fève	Tipaza	Tipaza	2007
BFB02	Fève	El Afroun	Blida	2007
BFB03	Fève	Hamr El Ain	Blida	2007
BFZ02	Fève	Tizi ousou	Tizi Ouzou	2007
BPA02	Pois	INA-El Harrach	Alger	2007
BIA01	Poivron	Cheraga	Alger	2007
BIA02	Poivron	Ain Benian (EAC)	Alger	2007
BCA01	Courgette	Staoueli (El hadj)	Alger	2007
BOA01	Oignon	Ain Benian (EAC)	Alger	2007
BKA01	Concombre	Staoueli (ITCMI)	Alger	2007
BRA01	Rose	Inconnu	Alger(2007
BNA01	Nefles	El-Harrach	Alger	2007
BGA01	Geranium	El Harrach	Alger	2007
BUI01	Saint fouin	Collection ENSA	Inconnu	2007
BEI01	Citronier	Collection ENSA	Inconnu	2008
BVM01	Vigne	Boudouaou	Boumerdes	2007
BVR01	Vigne	Lakhdaria	Bouira	2007
Code	Culture	Lieu d'isolement	wilaya	Année d'isolement
BVA01	Vigne	Reghaia	Alger	2007
BVA02	Vigne	Bouira	Alger	2007
BVA03	Vigne	boumerdesse	Alger	2007
BVA04	Vigne	Tipaza	Alger	2007

III.2.1.1 Isolement et purification des isolats

III.2.1.2 Isolement

Afin d'obtenir des isolats de *Botrytis sp*, nous avons choisi des feuilles présentant des symptômes typiques de la maladie « pourriture grise ». La feuille subit un prétraitement, en faisant passer sur les deux faces un coton imbibé d'hypochlorite de sodium (titré à 2%) pendant 5 à 10 mn; afin d'éliminer les saprophytes. Après rinçage à l'eau distillée stérile dans 3 bains successifs pendant 5mn, elle est déposée dans une boîte de pétri sur un papier filtre stérile imbibé d'eau distillée stérile. Le temps d'incubation est de 3 à 4 jours, sous une lumière continue à température ambiante. Durant cette période une humidification régulière du support en papier est assurée.

Les fragments de mycélium émis seront repiqués dans des boîtes de pétri contenant du milieu PDA (Potato Dextrose Agar), et mis à incuber sous une lumière continue à température ambiante.

Des repiquages de colonies sont effectués ; afin de purifier les cultures de *Botrytis sp* en mélange avec d'autres champignons.

III.2.1.3 Purification et conservation des isolats par culture monospore

Pour s'assurer que les isolats utilisés dans notre étude sont indemnes de toute contamination, nous avons procédé à une purification monospore .

Sur le plan pratique, plusieurs techniques de culture monosporees sont décrites, soit à partir d'un jeune hyphe, quand la souche ne sporule pas ; soit à partir d'une seule spore. (Rapilly, 1968). C'est cette dernière technique que nous avons retenue.

Des suspensions de spores de 10^1 à 10^2 spores/ml sont préparées à partir de cultures âgées de 10 jours. Un volume d'environ 500ml prélevé de chaque suspension, est étalé sur des boîtes de pétri contenant de l'eau gélosée à 2% dont la composition est décrite dans l'annexe 01.

Les boîtes sont ensuite mises à incuber sous une lumière blanche continue à une température du laboratoire comprise entre 20 et 23°C. Après 48 heures, lorsque les spores commencent à émettre des tubes germinatifs, un prélèvement monospore est rapidement effectué sous une loupe binoculaire à l'aide d'une pipette pasteur étirée. Ainsi 3 à 4 spores sont prélevées séparément, repiquées en boîte de pétri contenant du milieu PDA.

La conservation des isolats est réalisée dans des tubes inclinés contenant le milieu PDA, à 4°C.

III.2.2 Agent antagoniste

Deux souches de *Trichoderma sp* appartenant à 2 espèces différentes sont utilisées , la souche T13 appartient à l'espèce *Trichoderma atroviride*, et la souche T9 appartient à l'espèce *Trichoderma longibrachiatum*. L'origine et l'année d'isolement des souches de *Trichoderma* sont indiquées au niveau du (tableau 06).

Tableau 6. Origine des souches de *Trichoderma spp*

Souches	Espèces	Origine	Année d'isolement
T9	<i>T. longibrachiatum</i>	Rhizosphère de pois chiche (ITGC Oued Smar)	2006
T13	<i>T. atroviride</i>	Semence de blé dur (Sahel 17)	2006

Les souches antagonistes sont cultivées sur milieu PDA à 22°C pour leur utilisation dans les tests d'antagonisme in vitro. Les souches sont conservées dans des tubes inclinés contenant du PDA à 4°C, et sont repiquées tous les 6 mois.

III.3 CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET CULTURAL DE *BOTRYTIS CINEREA*

La caractérisation des isolats obtenus, s'est basée sur les caractères morphologiques du champignon et l'aspect cultural.

III.3.1 Analyses des colonies

III.3.1. 1 Aspect des colonies

Cette étude porte sur la couleur et la forme des colonies ainsi que sur l'aspect du mycélium des isolats de *Botrytis cinerea*, issus de la culture monospore et cultivés sur milieu PDA.

III.3.2 Estimation de la croissance mycélienne

Généralement la croissance mycélienne chez les champignons est évaluée par deux méthodes, soit par la mesure de la croissance linéaire et diamétrale des colonies, soit par la mesure du poids sec.

Dans notre cas, nous avons retenu la première, utilisée par Kaiser (1973). Cette étude consiste à prélever un explant de 4mm de diamètre à partir d'une culture âgée de 7 jours et le déposer sur une boîte de pétri à raison de trois répétitions par isolat. Les boîtes sont mises à incuber pendant 6 jours à une température du laboratoire comprise entre 20 et 23°C. Les mesures du diamètre des colonies se font quotidiennement.

On peut ainsi déterminer la croissance linéaire de chaque isolat selon la formule proposée par Rapilly (1968).

$$L = (D - d)/2$$

L : Croissance linéaire

D : Diamètre de la colonie

d : Diamètre de l'explant

De plus la vitesse moyenne de croissance mycélienne au bout de 6 jours peut être estimée selon la formule suivante :

$$V_m = (V_1 + V_2 + V_3 + V_4 + V_5 + V_6)/6$$

V_m : Vitesse moyenne

V₁, V₂ à V₆ : Croissance mycélienne journalière

III.3.3 Analyse des spores

III.3.2.1 Etude de la taille des spores (Mesure- in vitro- des conidies des isolats de *Botrytis cinerea*)

La mensuration des conidies est réalisée sur des cultures âgées de 10 jours, obtenues sur milieu PDA, à une température comprise entre 20±3°C, sous lumière continue.

Pour chaque isolat, on prépare une suspension de spores dans de l'eau distillée stérile, puis on en dépose une goutte entre lame et lamelle. Les spores sont ensuite observées à

l'aide d'un microscope photonique préalablement étalonné et muni d'un oculaire possédant un micromètre. Les mesures sont réalisées au grossissement 40 portant sur la longueur et la largeur de 100 spores par isolat. Les résultats obtenus sont multipliés par 2.6 afin d'obtenir la taille des spores en micromètre. Pour chaque isolat on calcule les moyennes des longueurs, des largeurs et des ratios. Les limites supérieures et inférieures sont calculées pour chaque isolat.

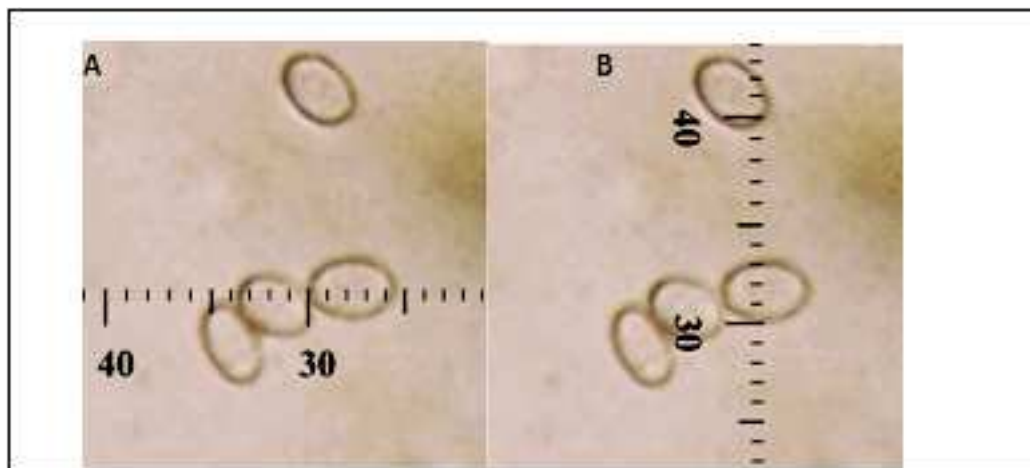


Figure 05. Mesure de la longueur (A), et de la largeur (B) d'une spore de *Botrytis cinerea* à l'aide d'un microscope photonique muni d'un micromètre.

III.3.4 Analyse des sclérotés

III.3.4.1 Estimation du temps nécessaire à l'apparition des sclérotés

L'étude est réalisée sur tous les isolats cultivés sur milieu PDA. Cette technique consiste à estimer la présence ou l'absence de sclérotés pour chaque isolat, ainsi que le temps (nombre de jours) nécessaire pour l'apparition du premier sclérote à partir du premier jour d'ensemencement de la boîte.

III.3.4.2 Détermination 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 indélébile en carreaux de 1 cm². Pour chaque isolat, le nombre des sclérotés à la surface de chaque carreau est comptabilisé à raison de 3 répétition par isolat. Le résultat est exprimé en nombre de sclérotés/cm²/isolat.

III.3.4.3 Mesure des dimensions des sclérotés

Pour cette étude, nous avons utilisé la méthode préconisée par Price et Koulhoun (1975), qui consiste à mesurer le grand et le petit diamètre des sclérotés murs, âgés de plus de 30 jours pour chaque isolat. Les mesures ont porté sur la totalité des sclérotés de la boîte et sont réalisées à l'aide d'un papier millimétré sous loupe binoculaire.

III.4 ETUDE DE L'ACTIVITE ANTAGONISTE IN VITRO DE TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM ET TRICHODERMA HARZIANUM VIS-A-VIS BOTRYTIS CINEREA

Pour étudier l'activité antagoniste in vitro de deux souches de *Trichoderma sp*, vis-à-vis de *Botrytis cinerea* plusieurs méthodes ont été utilisées.

III.4.1 Effet de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne du *Botrytis sp*

L'étude de l'action de deux souches de *Trichoderma sp*, sur la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis sp* a été réalisée selon deux méthodes : confrontation directe et confrontation indirecte (à distance).

III.4.1.1 Confrontation directe

La technique utilisée est celle décrite par Benhamou et al. (1996), elle consiste à mettre en confrontation dans une même boîte de pétri contenant le milieu PDA deux explants de 5 mm² de diamètre de l'agent antagonistes et l'agent pathogène *Botrytis sp*. Ces explants sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce stérile à partir de culture âgée de 7 jours. Les deux explants de l'agent pathogène et de l'agent antagonistes *Trichoderma sp* sont placés au même temps suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte.

Le nombre de répétitions est de quatre pour chaque combinaison souche de *Trichodermasp*/isolats de *Botrytis sp*. Un témoin contenant uniquement les isolats de *Botrytissp* utilisé à raison de quatre boîtes.

L'incubation est réalisée à 25°C à l'obscurité pendant 7 Jours. Des notations concernant l'inhibition de la croissance diamétrale des cultures des isolats du *Botrytis sp* et leur envahissement par les souches de *Trichoderma sp*, sont effectuées tous les deux jours. De plus, des observations microscopiques relatives à l'effet direct de l'agent antagoniste sur le mycélium de *Botrytissp* sont faites à partir de la zone de contact.

III.4.1.2 Confrontation à distance

Cette méthode décrite par Oliver et Germain (1983), consiste à repiquer l'antagoniste et l'agent pathogène dans deux boîtes séparées contenant le milieu PDA (explants de 5mm de diamètre âgés de 7 jour et déposé au centre de la boîte). Un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, le *Trichoderma sp* en bas et le *Botrytis sp* en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par du para film. Pour éviter les pertes en substance volatiles. Trois répétitions pour chaque confrontation sont réalisées.

Le témoin est formé par superposition de deux boîtes. Celle du haut contenant un explant milieu PDA, à raison de trois répétitions.

L'incubation est réalisée à 25°C à l'obscurité, La notation du diamètre moyen des colonies des isolats de *Botrytis sp* est réalisée après 6 Jours.

L'évaluation de l'inhibition exercée par *Trichoderma sp* vis-à-vis les isolats de *Botrytis cinerea* dans les deux méthodes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule citée par Hamouni et al. (1996).

$$I(\%) = (1 - C_n / C_0) \times 100$$

C_n : diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste (mm).

C₀: diamètre moyen des colonies témoins (mm).

III.4.2 Effet de *Trichoderma sp* sur la sporulation du *Botrytis*

Pour réaliser cet essai, on a opté pour la technique décrite par Ibrahim et al (1996), elle consiste à prendre des fragments de 5 mm² à partir des boîtes de pétri où sont réalisées les confrontations directes. Les prélèvements sont effectués au 7^{ème} jour, à une distance de 5mm du front de confrontations pour les colonies de *Botrytis sp* et de la périphérie pour les témoins. Les fragments sont mis dans des tubes contenant 5 ml d'eau distillée stérile, après agitations, les concentrations en spores sont déterminées par la cellule de Malassez.

III.5. ÉTUDE DE L'EFFICACITE *IN VITRO* DES FONGICIDES SUR LES ISOLATS DE BOTRYTIS CINEREA

III.5.1. Fongicides utilisés

Dans notre travail on a opté pour l'utilisation de deux produits fongicides et qui sont le Fludioxonil 37%(SWITCH) et le Cyprodinil 50%(CHORUS). Propriétés de ces fongicides sont détaillées en (Annexe 04)

Le choix de ces deux fongicides a été décidé en fonction de la disponibilité des produits et de leurs spectres d'action. Tableau 7 présente les fongicides utilisés.

Tableau 7. Présentation des fongicides utilisés

NOM commercial	Matière Active	Dose Préconisée (en plein champ)	Forme De Commercialisation
CHORUS	Cyprodinil : 50%	0.75 Kg par hectare	Granules mouillable
SWITCH	Cyprodinil : 37.5% Fludioxonil : 25%	0.8 Kg par hectare	Granules mouillable

III.5.2 Milieu de culture utilisé

Botrytis cinerea étant un champignon polyphage et peu exigeant, le milieu de culture utilisé pour l'isolement, la culture et la conservation du champignon ainsi que pour les tests sur la croissance mycélienne et sur la germination des spores est le PDA (potato dextrose agar).c'est un milieu organique de base dont la recette est détaillée (Annexe 01) (Rapilly, 1968) .

III.5.3 Préparation de l'inoculum

III.5.3.1 Isolement du champignon

Après prélèvement des échantillons, les rameaux de vigne sont conservés au réfrigérateur (4°C) pendant 15 jours. Au-delà de ce délai, ils sont découpés en morceaux de 10 cm de longueur, et mis en chambre humide à température ambiante et sous lumière blanche constante. Au bout de 4 jours, les fructifications du champignon sont visibles.

A l'aide d'une pipette pasteur bien effilée, quelques conidiospores avec conidies, sont prélevés sous la loupe binoculaire et ensemencés sur du PDA préalablement coulé en boîtes pétri stériles.

Les boîtes sont mises à incuber dans la chambre d'incubation du laboratoire de mycologie du département de botanique à une température de 18°C (+2°C) et sous lumière blanche continue.

III.5.3.2 Purification du champignon

Purification par repiquages successifs, dès l'apparition des jeunes colonies ayant les caractéristiques du champignon recherché, celles-ci sont repiquées plusieurs fois de suite et ce dans le but de se débarrasser des contaminations fongiques et bactériennes.

Purification par isolement à partir de sclérotites, selon Rappilly (1968), l'isolement à partir de sclérotites permet d'obtenir directement une culture pure. Dans ce but, les sclérotites formés à partir des cultures, désinfectés à l'hypochlorite de sodium et coupés transversalement, le mycélium est prélevé au centre de la sclérote (médulla) et repiqué.

III.5.3.3 Préparation des suspensions de spores

Pour les deux tests in-vitro, l'inoculum à utiliser est sous forme d'une suspension de spores dont la concentration est de 10^5 spores/ml. Pour cela, des explants mycéliens sont prélevés à partir de cultures en boîtes, âgées de 12 jours, et mis dans 10 ml d'eau distillée stérile contenant une gouttelette de Tween 20. La concentration de la suspension de spores est vérifiée à l'aide d'une cellule de Malassez.

III.6 Etude de l'efficacité des fongicides sur la croissance mycélienne

III.6.1 Préparation des concentrations des fongicides

La concentration des produits à utiliser a été déterminée à partir de la dose préconisée en plein champ que nous avons rapporté à la surface de la boîte de pétri (Do).

Les dilutions ont été réalisées selon une progression arithmétique de raison 2 (Annexe 05 et 06).

La préparation d'une concentration nécessite 100 ml d'eau distillée stérile, auxquels est ajoutée la quantité de produit nécessaire. Et pour cela nous avons utilisé 6 concentrations pour chaque produit testé (Tableau 7).

III.6.2 Mode opératoire

L'étude des concentrations par fongicide utilisé, est réalisé par la mesure de la croissance mycélienne de *B. cinerea* sur le milieu du PDA. Ces fongicides sont utilisée en les incorporant dans ce dernier milieu, Apres autoclavage, le milieu maintenu en surfusion a 50°C, est versé dans des boites en pétri de 90mm de diamètre. Les différents fongicides sont ensuite incorporés à l'aide d'une seringue stérile dans le milieu en surfusion a raison de 1ml pour chaque concentration sauf pour le témoin. Ces boites sont légèrement agitées, pour homogénéise la réparation du produit dans tout le milieu de culture.

Après solidification du milieu et a l'aide d'un emporte pièce stérile, des explants mycéliens de 7 mm de diamètre sont prélever a la périphérie des cultures âgées de 10 a 14 jours, cultivées sur milieu PDA.

L'ensemencement est effectuées, au centre des boites de pétri contenant les différent doses des fongicides. Trois répétitions réalisées pour chaque dose.

Les boites ainsi inoculées, sont incubées pendant 7 jours dans une étuve à une température de 20°C, exposées à 16 heures de lumière et à 8 heures d'obscurité. Au fur et a mesure, les diamètres des plages mycéliennes sont mesurées tous les jours pendant les sept jours d'incubation, ces notations réalisées sur 3 répétitions, permettent d'estimer la moyenne de croissance mycélienne Ces mesures nous permettront donc d'exprimer le pourcentage d'inhibition provoqué par le fongicide, en utilisant la formule suivante :

$$I\% = ((V_0 - V)/V) \times 100 \text{ (Cavelier ,1975)}$$

I :% d'inhibition

V₀ : vitesse linéaire du témoin

Les mensurations sont effectuées jusqu'a ce que le mycélium des témoins atteigne les extrémités des boites. Elles permettent également de déterminer la CL50 (Concentration capable d'inhiber 50% de la croissance mycélienne) et la CMI (Concentration minimale d'inhibition totale) en traçant la droite du de l'effet des fongicides a différentes dose sur le taux d'inhibition de la croissance mycélienne des isolats.

III.6.3 Mesure de croissance mycélienne

L'évaluation de la croissance mycélienne peut être estimée de deux manières :

- soit par la mesure de la croissance linéaire.
- soit par la mesure pondérale du mycélium.

Pour l'étude comparative de la croissance mycélienne de *Botrytis sp* dans différent doses de fongicides, nous avons opté pour la première méthode de mesure. Elle consiste en la mesure de l'accroissement mycélien en fonction du temps à partir d'un explant initial de 5mm de diamètre, selon la formule de

Rapilly (1968).

L : croissance linéaire. (mm)

D : diamètre de la colonie. (mm). $L = (D - d)/2$

d: diamètre initiale de l'explant (mm).

DOSES	CHORUS		SWITCH	
	Mg/boites	Mg/l	Mg/boites	Mg/l
Témoin	0,0000	0,000	0,0000	0,000
D(-2)	0,1063	5,3	0,1134	5,67
D(-1)	0,2126	10,6	0,2268	11,34
D(0)	0,4253	21,25	0,4537	22,685
D(1)	0,8507	42,5	0,9074	45,37
D(2)	1,7014	85,05	1,81492	90,746
D(3)	3,4029	170,1	3,6298	181,49

Tableau 8. Doses utilisés pour le test sur la croissance mycélienne.

III.6.4 Lecture des boîtes

La mesure de la croissance mycélienne est arrêtée lorsque le champignon occupe la totalité de la boîte du témoin. Les mesures des diamètres des colonies (D), ont été réalisées à l'aide d'une règle

III.7 ANALYSE DES RESULTATS

- Analyse statistiques descriptive

Les analyses descriptives ont été réalisées par le logiciel SPSS version 8.0. Elles sont portées sur le calcul de la moyenne des isolats pour chaque test, les effectifs de chaque classe moyenne ainsi que la variance observée.

- Analyse de la variance

L'analyse de variance de la taille des spores et des sclérotas a été réalisée avec le logiciel STATGRAPHICS. Il a permis d'observer les différences entre les isolats et de les rassembler en groupes homogènes par le test de Newman et Keuls à 5%.

- Analyse multivariée par l'ACP (Analyse en composantes principales)

L'analyse en composantes principales a été effectuée par le logiciel XL-STAT version 7/1. Elle permet d'étudier les données multidimensionnelles afin de retrouver un lien entre les variables. Elle traite les tableaux en croisant les individus (ligne) et les variables numériques qui caractérisent ces individus (colonnes). Cette technique a été utilisée pour analyser l'ensemble des variables de la caractérisation biologique afin d'observer la variabilité des isolats d'une manière générale.

IV. Résultats

IV.1 caractérisation morphologique et culturelle de *Botrytis cinerea*

IV.1.1 Analyse des colonies

IV.1.1.1 Aspect des colonies

Les différentes observations sur le comportement cultural des isolats de *Botrytis cinerea* ont porté sur la couleur, la forme des colonies et l'aspect du mycélium. Les résultats présentés dans les tableaux (10 et 11) ont été obtenus après une croissance mycélienne de 12 jours sur milieu PDA, à température ambiante au laboratoire (20 et 23°C) et sous une lumière blanche continue.

Tableau 9. Aspect cultural des isolats de *Botrytis cinerea* sur milieu PDA

Contribution à l'étude de *Botrytis cinerea* Pers agent de la pourriture grise

Isolats	Aspect du mycélium	Couleur de colonie
BFA 04	C.D	M.B
BFA05	S.D	M.V
BFA08	A.P.D	M.B
BFA09	S.P.D	M
BFA10	S.P.D	M
BFA14	S.D	M
BFA16	S.D	G.M
BFB02	A.D	M.V
BFB03	S.D	G.V
BFT02	C.P.D	G.B
BFT04	A.D	G.V
ISOLAT	ASPECT DU MYCELIUM	COULEUR DE COLONIE
BFT05	C.A	G.B
BFZ02	S.D	G.V
BUI01	C.D	G.V
BEI01	S.D	G.V
BPA02	A.P.D	G.M
BIA01	S.P.D	M.B
BIA02	S.P.D	M.V
BCA01	S.D	M.B
BOA01	S.D	M
BKA01	A.D	G.V
BRA01	S.D	G.M
BNA01	C.P.D	G.V
BGA01	A.D	M
BVM01	C.A	M
BVR01	S.D	G.M
BVA01	S.D	G.B
BVA02	S.D	G.V
BVA03	A.P.D	G.M
BVA04	S.D	G.M

(CD) Cotonneux dense, (CA) Cotonneux aérien, (CPD) Cotonneux peu dense, (APD) Aérien peu dense

(AD) Aérien dense, (SD) Sub aérien dense, (SPD) Sub aérien peu dense .

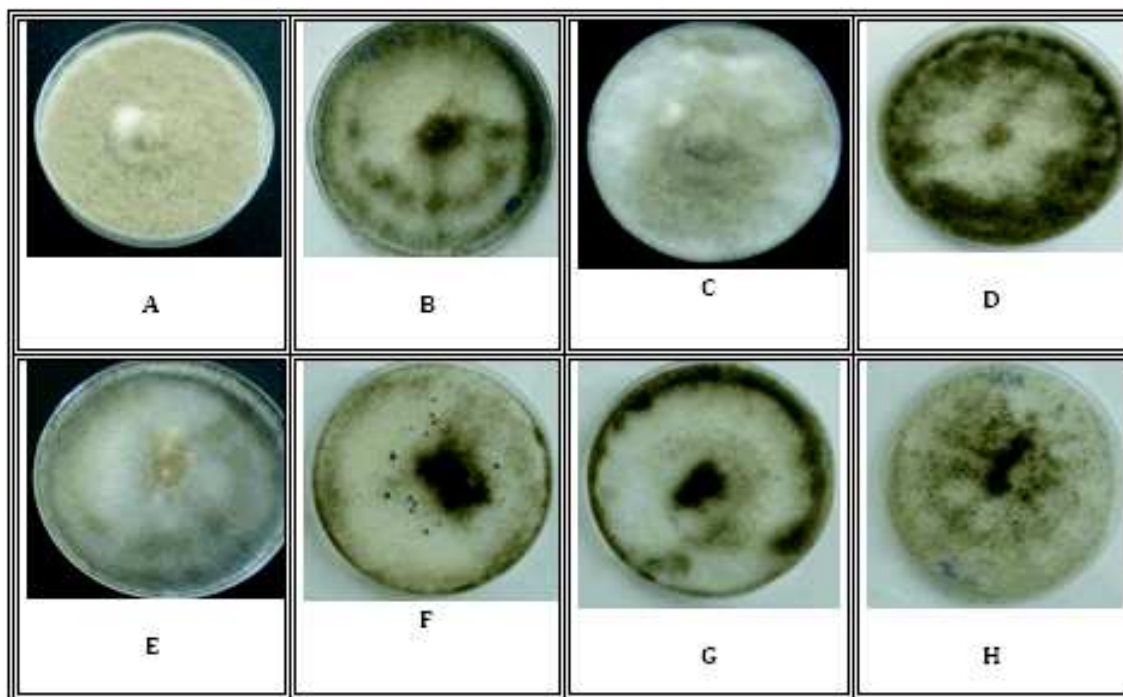
Tableau 10. Les différents Aspect culturels des isolats de *Botrytis cinerea* cultivés sur milieu de culture PDA

Mycélium	Isolats
Cotonneux dense (CD) Cotonneux aérien (CA) Cotonneux peu dense (CPD) Aérien peu dense (APD) Aérien dense (AD) Sub aérien dense (SD) Sub aérien peu dense (SPD)	BFA04 /BUI01 BVM01/BFT05 BFT02/BNA01 BVA03/BFA08/ BPA02 BGA01/BKA01/BFT04/BFB02 BFA05/BFA14/BFA16/ BFB03/BFZ02/BEI01/BCA01/BOA01 BRA01/BVR01/BVA01/ BVA02/BVA04 BFA09/BFA10/BIA01/BIA02

Tableau 11 . Couleur des colonies de *Botrytis cinerea* cultivés sur milieu de culture PDA

Couleur	Isolats
Gris verdâtre (GV) Marron	BFB03/BFT04/BFZ02/BUI01/BEI01/BKA01/BNA01/
verdâtre (MV) Marron	BVA02 BFA05/BFB02/BIA02 BFA04/BFA08/BIA01/
blanchâtre (MB) Gris marron	BCA01 BFA16/BPA02/BRA01/BVA03/BVA04 BFT02/BFT05/
(GM) Gris Blanchâtre	BVA01 BFA09/BFA10/BFA14/BOA01/BGA01/BVM01
(GB) Marron (M)	

La majorité des colonies étudiées présente un aspect circulaire à contour régulier. La coloration et l'aspect du mycélium sont très variés. Parfois la progression se fait en cercle concentrique (Figure06), le mycélium produit est compact, cotonneux, poudreux, verruqueux ou ras. Plus de 56% des isolats ont produit un mycélium sub- aérien avec une concentration plus au moins forte en conidiophores a la périphérie des boites de Pétri. Les isolats BGA01/BKA01/BFT04/BFB02 se sont caractérisés par la production d'un mycelium dense couvrant la totalité des boites à l'opposé des isolate BVA03,BFA08 et BPA02 qui se sont démarqué du reste des isolats par la production d'un mycelium ras et peu dense donnant naissance à des conidiophores courts et rabougris. Cependant et concernant la coloration, la plupart des isolat ont formait un mycelium gris verdâtre , marron a marron gris.



A : Mycélium cotonneux .B : Mycélium compact , C : mycélium aérien dense , D :Mycélium dense.

E: Mycélium cotonneux peu dense, F :Mycélium poudreux. G :Mycélium sub aérien peu dense.

H : Mycélium sub aérien dense

Figure 06. Différents Aspect des colonies de *Botrytis cinerea* âgées 10 jours cultivées sur milieu PDA.

IV.1.1.2 Estimation de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne des isolats de *Botrytis cinerea* étudiés est estimée au bout de 6 Jours d'incubation à 20C°, correspondant au temps nécessaire pour que la majorité des boîtes soient envahies par les colonies mycéliennes. Les vitesses de croissance mycélienne calculées pour chaque isolat sont rapportées dans le (Tableau 12).

ISOLATS	VITESSE DE CROISSANCE MYCELIENNE (mm/j)
BFA04	19,8
BFA05	19
BFA08	23,2
BFA09	20,7
BFA10	23,1
BFA14	17,68
BFA16	16,62
BFB02	18
BFB03	18
BFT02	17,4
BFT04	9,40
BFT05	14,43
BFZ02	18,5
ISOLATS	VITESSE DE CROISSANCE MYCELIENNE (mm/j)
BUI01	16,62
BEI01	15,06
BFA02	23,2

Tableau 12. vitesse de la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis sp* (mm/J)

Tableau 13. Classe de moyenne de vitesse de croissance mycélienne.

Vitesse de croissance (mm/j)	Effective	Pourcentage	Isolats
<15	7	23,33%	BVM01/BGA01/BRA01/BKA01/BCAO1/ BFT05/BFT04
15,1- 20	17	56,66%	BFA04/BFA05/BFA14/BFA16/BFZ02/BUI01/BEI01/ BIA01/ BIA02/BOA01/BNA01/BVR01/BVA01/BVA02
>20	6	20,00%	BVA04/BVA03/BPA02/BFA10/ BFA09/BFA08

L'étude de la croissance linéaire journalière du mycélium de *Botrytis cinerea* sur milieu PDA montre une différence de comportement entre les différents isolats. Cette variation dans la croissance mycélienne est observée le deuxième jour après le dépôt des implants.

Le classement des isolats selon leur moyenne de vitesse a permis de distinguer différentes classes, 17 isolats parmi les 30 étudiés soit (56,66%) présentent une vitesse de croissance comprise entre 15,1 et 20mm/jour, dont la plus importante est celle de l'isolat BFA08, BPA02 et BVA03 et BFA08 avec 21,00. 23,2 et 23,2mm/j.

La deuxième classe qui représente 20,00% dont l'effectif est de 6 isolats ayant une croissance mycélienne qui dépasse 20mm/jour.

Les isolats BVM01/BGA01/BRA01/BKA01/BCA01/BFT05 et BFT04 se distinguent de l'ensemble des isolats par une vitesse de croissance très lente et inférieure à 15 mm/j. et qui représentent un effectif de 23,33% de l'ensemble des isolats de la collection.

IV.1.2 Analyse des spores

IV.1.2.1 Etude de la taille des spores (Mesure- in vitro- des conidies des isolats De *Botrytis cinerea*)

La mensuration des conidies est réalisée sur des cultures âgées de 10 jours, obtenues sur milieu PDA, à une température comprise entre 20 et 23°C, sous lumière continue.

Les mesures sont réalisées au grossissement 40 portant sur la longueur et la largeur de 100 spores par isolat. (Tableau 14) rapporte des valeurs qui ont permis de calculer les moyennes des longueurs et des largeurs ainsi que les valeurs minimales et maximales obtenues des deux paramètres pour tous les isolats. Tous les isolats de la collection produisent des conidies présentant diverses formes, ovoïdes, ellipsoïdales, pyriformes, rondes ou globulaires.

L'observation des conidies produites a indiqué une variabilité morphologique importante. Souvent, un même isolat peut produire des conidies très variables.

De manière générale, les spores des isolats de la collection ont présenté des tailles compromises dans l'intervalle de mesure 5-11.25 X 7.5-15. Les tailles les plus importantes ont été observées chez les isolats BFT02 et BRA01 alors que l'isolat BVR01 et l'isolat BUI01 s'est caractérisé par les spores les plus petites. Alors que d'autres tailles intermédiaires ont été notées pour le reste des isolats étudiés.

L'analyse de la variance de la taille des spores des isolats de *Botrytis sp.*, (Annexe 07). a montré une différence hautement significative concernant l'effet de la longueur, de la largeur et du ratio sur les isolats étudiés. Se qui a permis de classer les isolats en groupes homogènes qui indiquent une variabilité importante au sein des isolats de la collection étudiée.

Tableau 14. Longueurs et largeurs des conidies des isolats de *Botrytis cinerea* cultivés sur milieuPDA (µm).

Isolats	Longueur moyenne	Largeur Moyenne	Intervalle moyen
BFA 04	10,38	7,65	7,5 - 12,5 X 6,25 - 10,0
BFA05	10,40	7,63	8,75 - 12,5 X 5,0 - 8,75
BFA08	13,00	8,82	7,5 - 17,5 X 7,5 - 10,0
BFA09	10,88	7,63	10,0 - 12,5 X 6,25 - 8,75
BFA10	10,63	7,45	10,0 - 13,75 X 6,25 - 8,75
BFA14	11,48	8,13	10,0 - 15,0 X 5,0 - 11,25
BFA16	10,43	7,53	8,75 - 12,5 X 5,0 - 10,0
BFB02	10,57	7,43	7,5 - 12,5 X 5,0 - 10,0
BFB03	10,88	7,82	8,75 - 12,5 X 6,25 - 10,0
BFT02	13,48	8,95	11,25 - 15,0 X 7,5 - 10,0
BFT04	12,63	8,55	10,0-15,0X6,25-10,0
BFT05	11,65	8,45	8,75-13,75X7,5-11,25
Isolats	Longueur moyenne	Largeur moyenne	Intervalle moyen
BFZ02	10,38	7,65	7,5 - 12,5 X 6,25 - 10,0
BUI01	10,40	7,25	8,75 - 12,5 X 5,0 - 8,75
BEI01	13,00	8,82	7,5 - 17,5 X 7,5 - 10,0
BPA02	10,88	7,63	10,0 - 12,5 X 6,25 - 8,75
BIA01	10,63	7,45	10,0 - 13,75 X 6,25 - 8,75
BIA02	11,48	8,13	10,0 - 15,0 X 5,0 - 11,25
BCA01	10,43	7,53	8,75 - 12,5 X 5,0 - 10,0
BOA01	10,57	7,43	7,5 - 12,5 X 5,0 - 10,0
BKA01	10,88	7,82	8,75 - 12,5 X 6,25 - 10,0
BRA01	13,48	8,95	11,25 - 15,0 X 7,5 - 10,0
BNA01	12,63	8,55	10,0-15,0X6,25-10,0
BGA01	11,65	8,45	8,75-13,75X7,5-11,25
BVM01	10,38	7,65	7,5 - 12,5 X 6,25 - 10,0
BVR01	10,40	7,25	8,75 - 12,5 X 5,0 - 8,75
BVA01	13,00	8,82	7,5 - 17,5 X 7,5 - 10,0
BVA02	10,88	7,63	10,0 - 12,5 X 6,25 - 8,75
BVA03	10,63	7,45	10,0 - 13,75 X 6,25 - 8,75
BVA04	11,48	8,13	10,0 - 15,0 X 5,0 - 11,25

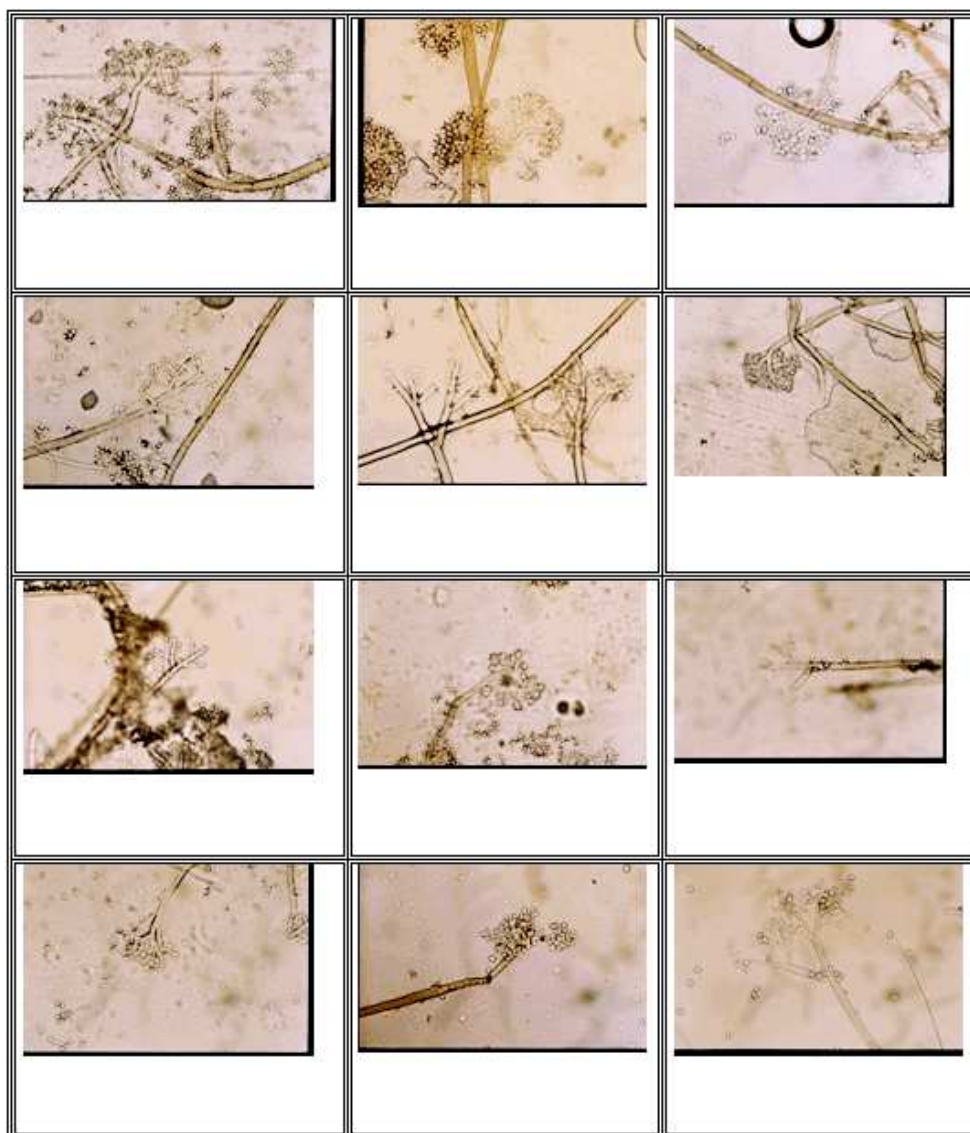


Figure 7. Conidiophores portants des conidies de *Botrytis cinerea* observés au microscope optique au grossissement 25x 3,2 .

IV.1.3 Analyse des sclérotés

Les sclérotés qui se sont au cours de l'étude des isolats de la collection de *Botrytis sp.*, varient de couleur et de forme. Au début de leur 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, Certains sont plats, d'autres sont convexoïdes, arrondis, circulaires ou encore aux contours irréguliers.

IV.1.3.1 Estimation du temps nécessaire à l'apparition des sclérotés

Les isolats de *Botrytis* cultivés sur un milieu PDA et incubé à 20°C ont été observés quotidiennement afin de déterminer le jour d'apparition des premiers sclérotés (Tableau 15).

Tous les isolats de *Botrytis cinerea* ont produits des sclérotés à l'exception de BVA02, BFB02 et BKA01. Le tableau suivant apporte le temps nécessaire pour l'apparition des premiers sclérotés.

Il apparaît que les isolats BFT03, BFT05, BFZ02, BRA01, BVM01, BVR01 et BVA03 ont été les premiers à produire des sclérotés (6 jours), suivi des isolats BGA01, BFA05, BFA09, BFT04, BEI01 et BIA01 (7 jours après le dépôt de l'implant).

Les isolats BCA01, BFT02, BFA14 et BNA01 sont les derniers isolats à produire des sclérotés allant de 16^{eme} jusqu' à 30^{eme} jours .

Tableau 15. Temps nécessaire pour l'apparition du premier sclérote à partir du premier jour d'ensemencement de la boîte et densité des sclérotés .

Isolats	Nombre de Jours	Isolats	Densité des sclérotés (Sclérotés/ cm ²)
BFA 04	16 jours	BFA 04	1,20
BFA05	7 jours	BFA05	9,99
BFA08	12 jours	BFA08	2,60
BFA09	7 jours	BFA09	0,77
BFA10	16 jours	BFA10	1,90
BFA14	30 jours	BFA14	0,72
BFA16	13 jours	BFA16	7,99
BFB02	-	BFB02	0
BFB03	6 jours	BFB03	4,15
BFT02	30 jours	BFT02	1,00
BFT04	7 jours	BFT04	3,70
BFT05	6 jours	BFT05	2,72
BFZ02	6 jours	BFZ02	5,74
BUI01	16 jours	BUI01	1,20
BEI01	7 jours	BEI01	9,99
isolats	Nombre De jours	isolats	Densité des sclérotés (Sclérotés/ cm ²)
BPA02	12 jours	BPA02	2,60
BIA01	7 jours	BIA01	0,77
BIA02	16 jours	BIA02	1,90
BCA01	30 jours	BCA01	0,72
BOA01	13 jours	BOA01	7,99
BKA01	-	BKA01	0
BRA01	6 jours	BRA01	4,15
BNA01	30 jours	BNA01	1,00
BGA01	7 jours	BGA01	3,70
BVM01	6 jours	BVM01	2,72
BVR01	6 jours	BVR01	5,74
BVA01	13 jours	BVA01	7.99
BVA02	-	BVA02	0
BVA03	6 jours	BVA03	2,60
BVA04	30 jours	BVA04	0,77

IV.1.3.2 Détermination de la densité des sclérotés

Le nombre des sclérotés a été estimé sur un centimètre carré, pour tous les isolats qui les produisent. Les résultats obtenus sont présentés au (Tableau 15).

On note une grande variation dans la densité selon les isolats. L'analyse des fréquences, selon différentes classes montre que la plupart des isolats testés (74 .07%) ; soit un effectif de 20 isolat possèdent une densité de sclérotés inférieure à 5 sclérotés/ cm². Et qui sont BFA04/ BFA08/ BFA09/ BFA10/ BFA14/ FB03/ BFT02/ BFT04/ BFT05/ BUI01/ BPA02/ BIA01/ BIA02/ BCA01/ BRA01/ BNA01/ BGA01/ BVM01/ BVA03/ BVA04

Alors que le reste (25.92%) qui regroupe 7 isolats : BFA05/ BFA16/ BFZ02/ BEI01/ BOA01/ BVR01/ BVA01Présentant une densité de sclérotés va de 5 à 10 sclérotés/cm². (Tableau 16).

Des résultats similaires montrant l'absence de sclérotas pour *Botrytis cinerea* ont été rapportés par Abou-Zeid et al (1996) et Chérif et al (1998).

Tableau 16. Effectif et pourcentage de chaque classe de densité de sclérotas/cm²

Nombre de sclérotas/cm ²	Effectif	Pourcentage	Isolats
0.1- 5	20	66,66	BFA04/BFA08/BFA09/BFA10/BFA14/BFB03/BFT02/BFT04/BFT05/BUI01/BPA02/BIA01/BIA02/BCA01/BRA01/BNA01/BGA01/BVM01/BVA03/BVA04
5.1- 10	7	23,33	BFA05/BFA16/BFZ02/BEI01/BOA01/BVR01/BVA01
0	3	10,00	BFB 02/BKA 01/BVA 02

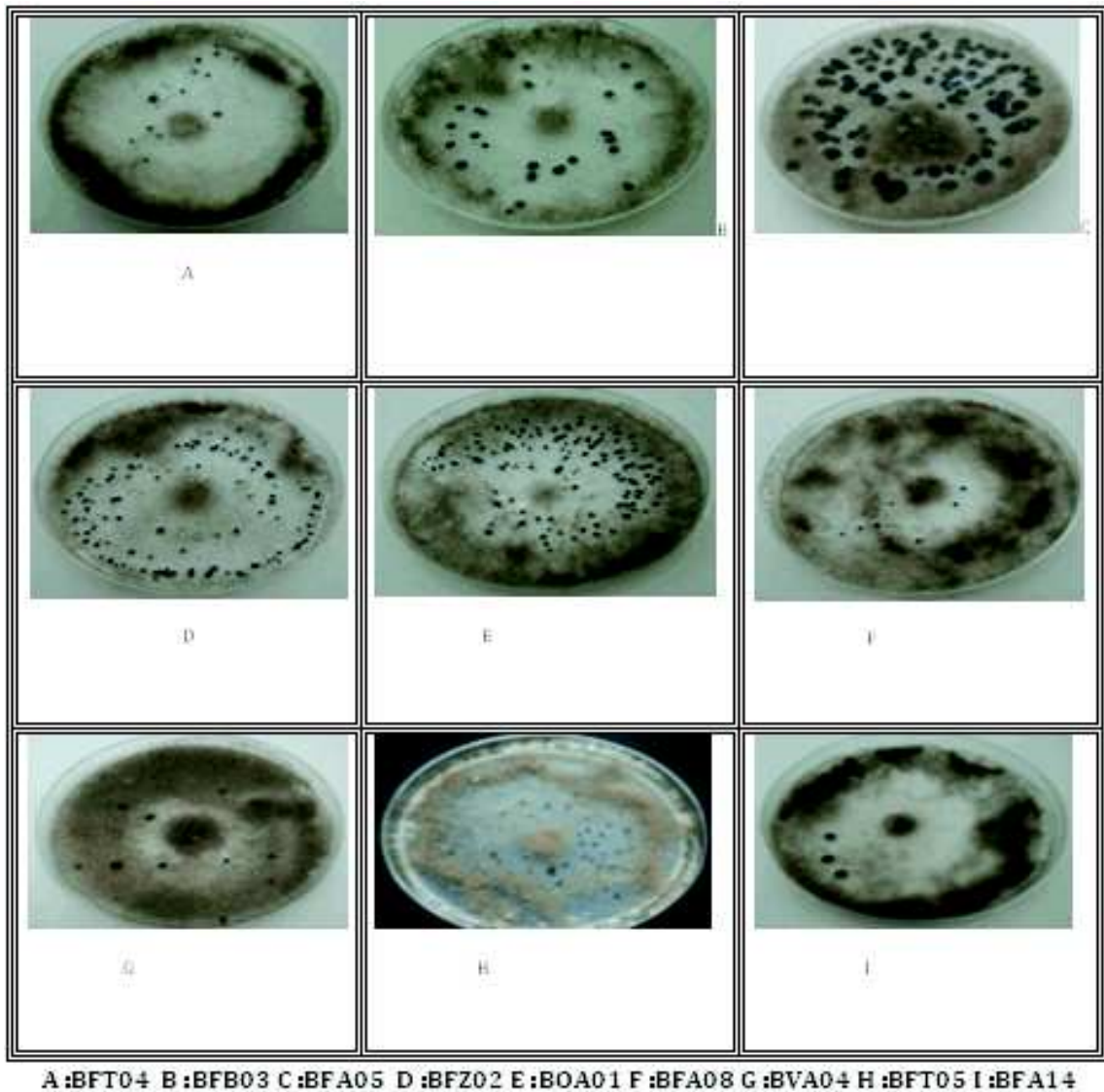
IV.1.3.3 Mesure des dimensions des sclérotas

Comme pour les conidies de *Botrytis cinerea*, la mensuration de la taille des sclérotas a porté sur la mesure du grand et du petit diamètre des sclérotas murs, âgés de plus de 30 jours pour chaque isolat. Les limites supérieures et inférieures et la moyenne de chaque paramètre ont été évaluées, et sont représentées dans le tableau suivant (Tableau 17).

Tableau 17. Mensuration des sclérotas des isolats de *Botrytis cinerea* cultivés sur milieu PDA (mm).

Isolats	Grand diamètre	Petit diamètre	Intervalles de mesure
BFA 04	1,75	1,54	0,7 – 3,0 X 0,7 - 3,0
BFA05	2,41	1,54	1,7 – 3,5 X 1,0 - 2,2
BFA08	1,59	1,24	0,5 – 3,0 X 0,5 - 2,0
BFA09	1,38	1,05	0,7 – 2,5 X 0,7 - 2,0
BFA10	1,55	1,16	0,5 – 2,0 X 0,5 - 1,7
BFA14	2,87	2,28	2,0 – 3,7 X 1,5 - 3,0
BFA16	1,69	1,35	0,7 – 4,0 X 0,5 - 2,0
BFB02	/	/	/
BFB03	1,31	1,16	0,5 – 2,5 X 0,5 - 1,5
BFT02	1,62	1,19	1,0 – 3,5 X 1,0 - 1,5
BFT04	2,86	2,15	1,5 – 4,5 X 1,0 - 3,2
BFT05	3,32	2,33	1,0 – 6,5 X 1,0 - 3,7
isolats	Grand diamètre	Petit diamètre	Intervalle de mesure
BFZ02	1,75	1,54	0,7 – 3,0 X 0,7 - 3,0
BUI01	2,41	1,54	1,7 – 3,5 X 1,0 - 2,2
BEI01	1,59	1,24	0,5 – 3,0 X 0,5 - 2,0
BPA02	1,38	1,05	0,7 – 2,5 X 0,7 - 2,0
BIA01	1,55	1,16	0,5 – 2,0 X 0,5 - 1,7
BIA02	2,87	2,28	2,0 – 3,7 X 1,5 - 3,0
BCA01	1,69	1,35	0,7 – 4,0 X 0,5 - 2,0
BOA01	1,7	1,50	1,5 – 2,2 X 1,2 - 2,0
BKA01	/	/	/
BRA01	1,62	1,19	1,0 – 3,5 X 1,0 - 1,5
BNA01	2,86	2,15	1,5 – 4,5 X 1,0 - 3,2
BGA01	3,32	2,33	1,0 – 6,5 X 1,0 - 3,7
BVM01	1,75	1,54	0,7 – 3,0 X 0,7 - 3,0
BVR01	2,41	1,54	1,7 – 3,5 X 1,0 - 2,2
BVA01	1,59	1,24	0,5 – 3,0 X 0,5 - 2,0
BVA02	/	/	/
BVA03	1,55	1,16	0,5 – 2,0 X 0,5 - 1,7
BVA04	2,41	1,54	1,7 – 3,5 X 1,0 - 2,2

Les résultats obtenus montrent que les sclérotés des isolats de *Botrytis sp* présentent des tailles variables, les plus importantes ont été observées chez les isolats : BFT05 et BGA01 avec des tailles de 3,32 X 2,33 alors que les moins importantes sont celles des isolats BFA09 et BPA 02 avec des tailles de 1,38X 1,05 , et le reste des isolats présentent des valeurs intermédiaires. Mais dans l'ensemble, tous les isolats ont produit des sclérotés dont l'intervalle de mesure se situe aux alentours de 0,5-9 X 0,4-6 mm.



A :BFT04 B :BFB03 C :BFA05 D :BFZ02 E :BOA01 F :BFA08 G :BVA04 H :BFT05 I :BFA14

Figure 8. Sclérotes de *Botrytis cinerea* cultivées sur milieu PDA.

IV.1.4. Analyse en composantes principales de l'ensemble des caractères biologique

Nous avons utilisé l'analyse en composantes principales (ACP) pour comprendre :

La structure des variables étudiées :

Quelles sont celles qui sont associées ? Celles qui ne le sont pas ? Quelles sont celles qui vont dans le même sens et celles qui s'opposent ?

La répartition des isolats :

Quels sont ceux qui ressemblent et ceux qui sont dissemblable

Les pourcentages de variations sont expliqués par trois principaux axes (facteurs), qui doivent avoir des valeurs propres supérieures à 1 (Figure 12).

La part de l'information expliquée par deux axes donnés est égale à l'addition des parts de variations expliquées par chacun des axes du plan considéré, nous avons :

Plan 1 : déterminé par les axes 1 et 2 (70,79% de la variation total).

Plan 2 : déterminé par les axes 1 et 3 (62,09% de la variation total).

Plan 3 : déterminé par les axes 1 et 4 (54,78% de la variation total).

L'analyse de la variance du variable (Tableau18) nous montre l'existence d'une corrélation négative entre la vitesse de croissance mycélienne sur milieu PDA et la production des sclérotés par centimètre carré à un seuil de 5%. Cela reviendrait à dire, que, plus la vitesse de croissance mycélienne des isolats est importante, moins il produit des sclérotés. Cependant, des corrélations positives ont été observées pour les variables longueur moyenne et largeur moyenne des spores et des sclérotés.

	PDA	spores Moyenne Longueur	spores Moyenne Largeur	sclérotés Moyenne Longueur	sclérotés Moyenne Largeur	sclérotés / Cm2
PDA	1	-0,391	-0,354	-0,150	-0,140	0,161
spores M. longueur	-0,391	1	0,963	0,287	0,295	0,130
spores M. Largeur	-0,354	0,963	1	0,198	0,192	0,101
sclérotés M. longueur	-0,150	0,287	0,198	1	0,974	0,182
sclérotés M. Largeur	-0,140	0,295	0,192	0,974	1	0,192
sclérotés / Cm2	0,161	0,130	0,101	0,182	0,192	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil $\alpha=0,050$

(testbilatéral)

Tableau 18. Matrice de corrélation entre les différentes variables utilisées pour la caractérisation morphologique

Le facteur 1 est expliqué en grande partie par les variables longueur et largeur moyenne des spores et des sclérotés, ainsi que par la production de sclérotés par centimètre carré, alors que le facteur 2 est expliqué par la vitesse de croissance mycélienne sur milieu PDA.

Etant donné que les tailles des spores et des sclérotés sont considérées comme des critères important d'identification, nous retiendrons pour cette étude, le plan 1 qui comprend les deux premiers facteurs et permet d'expliquer 70.79% de l'information totale.

Plan 1 et 2

Les variables

L'axe 1 est déterminé négativement par la vitesse de croissance mycélienne et positivement par l'ensemble des autres variables qui sont (Figure)

Longueur moyenne des spores

Largeur moyenne des spores

Longueur moyenne des sclérotés

Largeur moyenne des sclérotés

Concentration des sclérotés en centimètre carré

Les isolats

L'étude du plan 1 (Figure 9) montre clairement que les isolats de *Botrytis cinerea* sont totalement différents entre eux. Ils possèdent des caractéristiques morphologiques très différents et très variables. Ces résultats confirment ceux obtenus par l'analyse de chacune des variables.

Afin de mieux observer la dispersion et de mieux étudier les variations au niveau des autres isolats, une seconde analyse est réalisée.

Cette analyse nous a permis de définir 4 principaux axes ayant des valeurs propres supérieures à un. Le premier est déterminé par les variables longueur et largeur moyenne des sclérotés et de leurs concentrations par centimètre carré. Le second est expliqué par la vitesse de croissance mycélienne sur milieu PDA. Le troisième représente la taille des spores leurs largeurs et longueurs. Et dans ce cas il apparaît que les principaux facteurs sont représentés dans le plan 1 (facteur 1 et 2). Ce plan représente près de 70% de la variation totale et sera retenu pour la suite de l'étude.

L'observation du plan 1 permet de distinguer 4 groupes d'isolats selon les pourcentages de variation expliquée par chaque facteur

Le groupe 1 :

Ce groupe se compose de trois isolats (BVA 02, BFB 02, BKA01, BFB03 et BFA09), qui est déterminé négativement par la taille des spores et aussi la taille et la concentration des sclérotés, nous constatons que les isolats BVA 02, BFB 02, BKA01, BFB03 ne produisent pas de sclérote et la taille de leurs spores est petite. Alors que les isolats BFB03 et BFA09 produisent des sclérotés à des concentrations faibles.

Groupe 2 :

Le groupe 2 réunit les isolats (BFT02, BRA01, BFA08, BVA01, BEI01, BFT04 et BNA01). Il est déterminé positivement par l'axe des tailles des spores. Il apparaît que les isolats de ce groupe possèdent en majorité des spores de diamètre grand, ce qui confirme les résultats cités dans l'analyse de la variance effectuées sur les longueurs et les largeurs moyennes des spores.

Groupe 3 :

Il se compose des isolats BVA04, BGA01, BFA14, BIA02 et BFT05. Il est déterminé positivement par l'axe de taille et de concentration des sclérotés au centimètre carré. Il possède d'une part des sclérotés de concentration élevée, et d'autre part leurs sclérotés ont des tailles grandes.

Groupe 4 :

C'est le groupe qui contient le reste des isolats, et qui est déterminé positivement à l'axe de la vitesse de la croissance mycélienne

De cette analyse, quatre groupes représentatifs se distinguent. Ces résultats prouvent que les méthodes de caractérisation morphologique, même si elles sont utiles, ne sont pas assez puissantes pour différencier clairement les isolats entre eux ou différencier de deux espèces du fait de la grande variabilité exhibée par les agents pathogènes.

En effet les regroupements obtenus selon les différentes variables reflètent la dispersion géographique et les différents isolements des plantes hôtes.

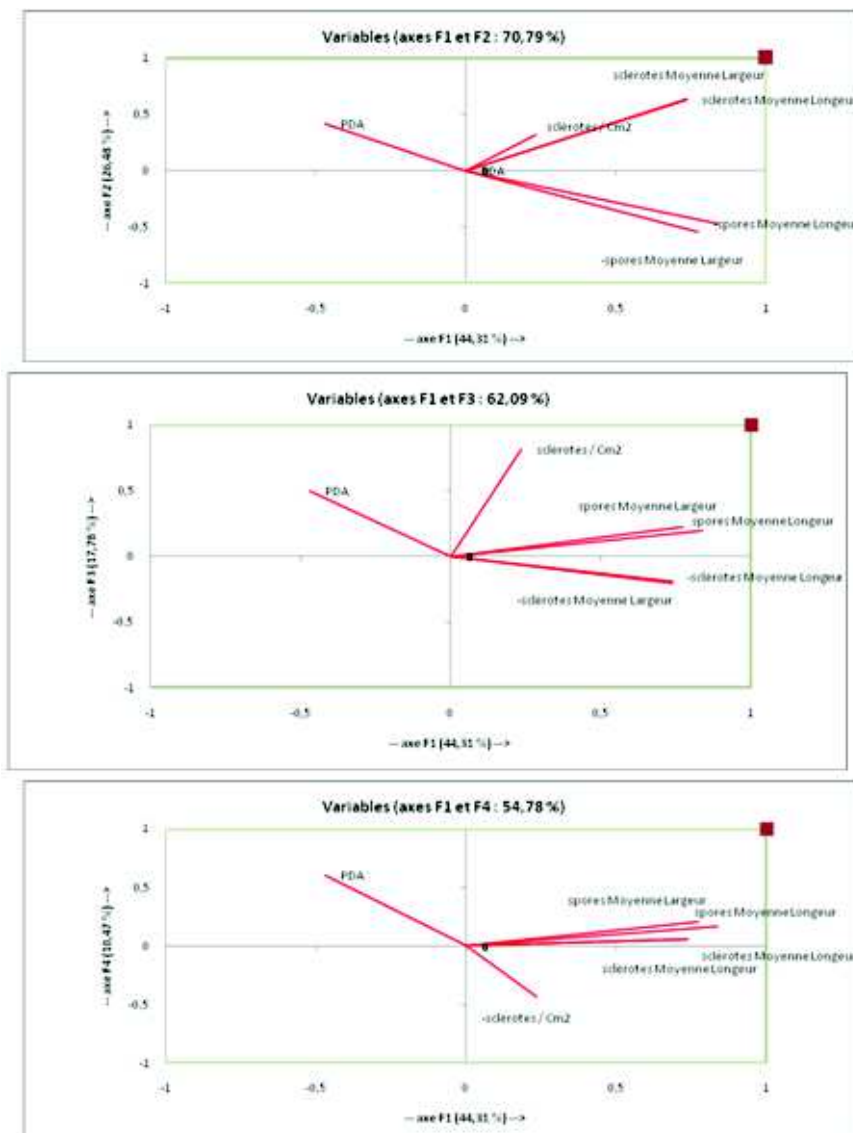


Figure 9. Représentation graphique des caractéristiques morphologiques des isolats de *Botrytis sp* en composantes principales

outils statistiques. De plus, leur obtention est basée sur des observations visuelles sujettes à la subjectivité de l'observateur.

L'aspect des cultures de la plus part des isolats se montre par une caractérisation mycélienne a dominance gris verdâtre, marron a marron blanchâtre, 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 Algeriens de *Botrytis* sp. D'autres couleurs ont été observées, Ce qui reflète une variabilité importante au sein des isolats étudiés.

Une 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 ; Abu Zeid et al., 1998 ; Cherif et al 1998). Leurs résultats ont indiqué que la croissance mycélienne est rapide chez *Botrytis cinerea* . Les résultats obtenus au cours de notre étude se rapprochent de ceux obtenus par Abou Zeid et al. (1998) pour l'ensemble des isolats. Nous avons noté que les isolats de fève ont présentés une croissance régulière similaire à celle des isolats des autres cultures supposés appartenir à l'espèce *Botrytis cinerea*.

La taille des conidies est considérée comme un critère de discrimination entre les espèces de *Botrytis*. En raison de l'origine des isolats de la collection, les hypothèses émises concernaient l'identification des 4 espèces, *Botrytis cinerea*, *Botrytis fabae*, *Botrytis allii* et *Botrytis alcada* .Hrisson(1983) a rapporté que l'aspect des colonies étant similaire, la taille des conidies demeurerait le trait le plus significatif quand a la discrimination entre les espèces *Botrytis* sp.

La bibliographie indique que les conidies de *Botrytis cinerea* sont généralement subglobuleuses ou elliptiques, unicellulaire et a double membrane avec une taille de 9-12X7-10 µm(Jarvis, 1980) .Se qui a été trouvé et observé au cour de notre analyse sur notre collection d'isolats a propos des mensurations des conidies qui sont plus au moins similaires a ces intervalles.

Les sclérotés produits par les espèces du genre *Botrytis* sont souvent retenus comme un critère d'identification. Les sclérotés apparaissent aux premiers jours de leur formation comme des structures dures a la couleur blanche et aux formes arrondies, ils deviennent marrons au fur et a mesure du temps, plus ils prennent de l'âge plus ils noircissent. Willetts(1972) a étudié la formation des sclérotés chez *Botrytis cinerea* et a décrit trois stades successifs par trois couleurs : le blanc, le marron et le noir.

Botrytis cinerea est connu pour faire apparaitre une grande variabilité morphologique, les sclérotés qu'il produit peuvent être aussi bien volumineux et peu nombreux que petits et abondant. Leur disposition sur le milieu de culture est variable. Roussel er Bouard (1971) ont décrit les sclérotés de *Botrytis cinerea* comme des structures polymorphes avec des tailles allant de 1a 2mm, parfois 2a3 sclérotés peuvent confluer.

Jarvis(1977) a souligné que les isolats de *Botrytis cinerea* montrent une variabilité non négligeable et importante en nombre et en taille des sclérotés. Les même observations ont été rapportées dans des études précédentes (Messgo, 2000 ; Salhi2004 ; Meamiche 2010).

La variabilité morphologique de *Botrytis cinerea* est largement été décrite dans des nombreux travaux auparavant (Morgan et al., 1971 ; Harrison, 1976 ;Jaris ,1977) puis, approfondies durant les dernières décennies (Van der Vlugt-Bergmans et al., 1993 ;Diolez et al. ;1995 ; Giraud et al. ; 1998).

Compte tenu de ce qui précède et au regard des origines des isolats de notre collection et aussi les différentes plantes hôtes ou on a procédé à l'isolement, les résultats obtenus sur la base de l'étude des caractéristiques morphologique et culturales nous laissent supposer que toute notre collection appartient à l'espèce *Botrytis cinerea*. Même celles qui ont été prélevées sur les 13 hôtes de la fève.

IV.2. Effet de *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma harzianum* sur *Botrytis cinerea* in vitro

IV.2.1 Effet de *Trichoderma* spp sur la croissance mycélienne de *Botrytis* sp

IV.2.1.1. Confrontation directe

Les notations réalisées montrent que les souches de *Trichoderma* sp. Sont douées d'une vitesse de croissance plus rapide que celles de *Botrytis*. Ainsi qu'une occupation presque totale des boîtes de pétri par l'agent antagoniste est notée avec toutes les souches alors que les souches de *Botrytis* n'occupe qu'une petite surface. Cependant on note une différence dans le degré d'envahissement des colonies de *Botrytis* par *Trichoderma*. Ainsi au 7^{ème} jour la souche T13 appartenant à l'espèce *Trichoderma atrovirens* a envahi totalement les colonies de *Botrytis* avec une sporulation intense, alors que pour la souche T9 qui appartient à l'espèce *Trichoderma longibrachiatum* un envahissement partiel est observé. Cet envahissement est accompagné d'une faible sporulation autour de la zone de contact. De plus ; il est à noter que le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des différentes souches de *Botrytis* sp est variable selon les souches antagonistes de *Trichoderma* sp.

Isolats	Diamètre moyen des colonies (mm)		TEMOIN	Taux de réduction de la croissance mycélienne par la T13	Taux de réduction de la croissance mycélienne par la T9
	Traitement par T9	Traitement par T13			
BFA04	30	20	71	71,83	57,74
BFA05	29	19	68	72,05	57,35
BFA08	29	20	69	71,01	57,97
BFA09	29	20	68	70,58	57,35
BFA10	31	21	74	71,62	58,10
BFA14	31	21	73	71,23	57,53
BFA16	30	20	71	71,83	57,74
BFB02	31	21	72	70,83	56,94
BFB03	29	19	68	72,05	57,35
BFT02	30	21	72	70,83	58,33
BFT04	28	19	68	72,05	58,82
BFT05	29	20	69	71,01	57,97
BFZ02	27	18	63	71,42	57,14
BUI01	29	20	69	71,01	57,97
BEI01	28	19	67	71,64	58,20
BPA02	28	19	67	71,64	58,20
BIA01	31	21	74	71,62	58,10
BIA02	34	23	81	71,60	58,02
BCA01	30	21	72	70,83	58,33
BOA01	30	20	71	71,83	57,74
BKA01	23	15	54	72,22	57,40
BRA01	31	21	73	71,23	57,53
BNA01	32	21	75	72	57,33
BGA01	31	21	74	71,62	58,10
BVM01	36	24	85	71,76	57,64
BVR01	31	21	74	71,62	58,10
BVA01	34	23	81	71,60	58,02
BVA02	29	19	68	72,05	57,35
BVA03	31	21	74	71,62	58,10
BVA04	30	21	72	70,83	58,33

Tableau 19. Effet dessouches de *Trichoderma* sp sur la croissance mycélienne du *Botrytis cinerea* après 7 jours de confrontation directe

Les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus (Tableau 19), montrent l'existence d'une nette réduction du diamètre moyen des colonies du *Botrytis* sp en présence des souches de *Trichoderma* sp par rapport au témoin

L'analyse de la variance du diamètre moyen des colonies de *Botrytis* sp (Annexe 08), a montré

L'existence d'une différence très hautement significative entre les différents traitements et le témoin. Ainsi, le test LSD au seuil de 5% a permis d'identifier les groupes homogènes.

Les observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les différentes souches de *Trichoderma* sp. Et les souches pathogènes montrent l'existence de modifications cytologiques au niveau du mycélium du pathogène, se traduisant par une lyse et dégradation du mycélium (phénomène observé avec la souche T13) et un enroulement du mycélium des souches de *Trichoderma* sp autour de celui du pathogène (observé avec la souche T9).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	89647,6	89	1007,28	1927,90	0,0000
Within groups	46,5	89	0,522472		
Total (Corr.)	89694,1	178			

Tableau 20. Analyse de la variance de l'effet des souches de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis sp* en confrontation directe selon le test LSD

IV.2.1.2. Confrontation indirecte (a distance)

Cette technique est utilisée pour la mise en évidence des substances antifongiques volatiles chez les souches de *Trichoderma spp.* Ainsi ; et après 6 jours de confrontation. Les résultats obtenus montrent l'existence d'une nette réduction de diamètre moyen des colonies de *Botrytis* par rapport au témoin. Cette réduction est variable selon les souches ou on observe un pourcentage de réduction de la croissance mycélienne qui varie entre 38% et 73% pour ceux qui sont mis en confrontation avec la souche de *Trichoderma* T13 , et de 5% et 46% concernant la T9 (Tableau 21).

Isolats	Diamètre moyen des colonies		TEMOIN	Taux de réduction de la croissance mycélienne par T13	Taux de réduction de la croissance mycélienne par T9
	Traitement par T9	Traitement par T13			
BFA 04	43	39	71	45,07	39,43
BFA05	42	28	68	58,82394	38,23
BFA08	45	43	69	37,68	34,78
BFA09	44	42	68	38,23	35,29
BFA10	52	47	74	36,48	29,72
BFA14	62	42	73	42,46	15,06
BFA16	49	44	71	38,02	30,98
BFB02	54	35	72	51,38	25
BFB03	50	46	68	32,35	26,47
BFT02	41	33	72	54,16	43,05
BFT04	54	41	68	39,70	20,58
BFT05	43	41	69	40,57	37,68
BFZ02	52	39	63	38,09	17,46
BU101	49	44	69	36,23	28,98
BE101	44	39	67	41,79	34,32
BPA02	45	32	67	52,23	32,83
BIA01	42	40	74	45,945	43,24
BIA02	56	32	81	60,49	30,86
BCA01	55	43	72	40,27	23,61
BOA01	38	21	71	70,42	46,47
BKA01	51	20	54	62,96	5,55
BRA01	64	33	73	54,79	12,32
BNA01	71	26	75	65,33	5,33
BGA01	62	21	74	71,62	16,21
BVM01	38	20	85	76,47	55,29
BVR01	59	35	74	52,70	20,27
BVA01	57	34	81	58,02	29,62
BVA02	54	34	68	50	20,58
BVA03	59	34	74	54,05	20,27
BVA04	55	31	72	56,94	23,61

Tableau 21. Effet des souches de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne du *Botrytis cinerea* après 7 jours de confrontation indirecte (à distance)

L'analyse de la variance du diamètre moyen des colonies des souches de *Botrytis sp* .Montre l'existence d'une différence très hautement significative entre les différents traitements et le Témoin.

Le test LSD au seuil de 5% a aussi permis de distinguer différents groupes homogènes. (Annexe 09).

Les observations réalisées aux périphéries des colonies des souches de *Botrytis sp* montrent l'existence des modifications cytologique au niveau du mycélium se traduisant par la présence des filaments stériles et un arrêt de la croissance mycélienne (ce phénomène est observé surtout avec la souche T13).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	48321,0	89	542,932	10 85,86	0,0000
Within groups	45,0	90	0,5		
Total (Corr.)	48366,0	179			

Tableau 22. Analyse de la variance de l'effet des souches de *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis sp* en confrontation indirecte selon le test LSD

IV.2.2. Effet des souches des *Trichoderma sp*. Sur la sporulation des isolats de *Botrytis*

Le calcul de nombre de spores du *Botrytis sp* après jours de confrontation directe montre une nette réduction de sa sporulation en présence de souches de *Trichoderma spp* par rapport au témoin.

Cette réduction est variable selon les souches alors que le pourcentage de réduction de nombre des spores par boîte le plus élevé est enregistré chez la souche T13 en confrontation avec la souche BVA02. (77%). et le plus faible est enregistré chez la souche T9 en confrontation avec la souche BFT02 (40%). (Tableau 23).

Isolats	Moyennes des concentrations (spores par boîte)		TEMOIN	Taux de réduction de la sporulation par traitement T13	Taux de réduction de la sporulation par traitement T9
	Traitement par T9	Traitement par T13			
BFA04	162000	105000	300000	65	46
BFA05	224000	148000	400000	63	44
BFA08	10600	6800	20000	66	47
BFA09	5200	3300	10000	67	48
BFA10	204000	116000	400000	71	49
BFA14	159000	81000	300000	73	47
BFA16	5600	3300	10000	67	44
BFB02	5700	3100	10000	69	43
BFB03	11800	6400	20000	68	41
BFT02	240000	124000	400000	69	40
BFT04	54000	37000	100000	63	46
BFT05	224000	108000	400000	73	44
BFZ02	408000	256000	800000	68	49
BUI01	5000	3600	10000	64	50
BEI01	318000	204000	600000	66	47
BPA02	140000	80000	250000	68	44
BIA01	171000	117000	300000	61	43
BIA02	5800	3300	10000	67	42
BCA01	174000	93000	300000	69	42
BGA01	220000	148000	400000	63	45
BKA01	122500	92500	250000	63	51
BRA01	61600	38500	110000	65	44
BNA01	56100	38500	110000	65	49
BGA01	145000	92500	250000	63	42
BVM01	21600	13200	40000	67	46
BVR01	127500	80000	250000	68	49
BVA01	130000	80000	250000	68	48
BVA02	5300	2300	10000	77	47
BVA03	243000	135000	450000	70	46
BVA04	5600	3500	10000	65	44

Tableau 23. Effet des souches de *Trichoderma* sur la concentration en spores des isolats de *Botrytis* cultivés sur milieu de culture PDA en spores/boîte

IV.2.3. Discussion

Les résultats des tests *in vitro* obtenus dans cette étude montrent que les deux souches de *Trichoderma sp* utilisées sont efficaces contre la collection des isolats de *Botrytis cinerea*. Cette efficacité est variable, d'une part entre les différentes espèces antagonistes et d'autre part entre les différentes espèces d'agents pathogènes.

Dans le cas de la confrontation directe, au 4^{ème} jour un envahissement presque total des boîtes de Pétri par la de *Trichoderma* est observé entraînant ainsi une nette réduction de la croissance mycélienne de la plus part des souches de *Botrytis*, le meilleur pourcentage de réduction de la croissance mycélienne est obtenu avec la souche T13 en confrontation avec la souche BKA01 (72,22%) ou un envahissement total est une sporulation sur les colonies de l'isolat sont enregistrés. Il est à noter que ce phénomène reflète ainsi le pouvoir hautement mycoparasitaire de ces souches.

En effet, plusieurs travaux ont montré la capacité des espèces de *Trichoderma* à inhiber le développement des agents pathogènes dans les tests de confrontation directe. Des résultats similaires ont été rapportés par Kaci et Ousaid (1999) qui ont obtenu une réduction de la croissance mycélienne qui varient entre 55.70% et 88.76% selon les souches de *Trichoderma* utilisées.

De même Sidhoumi (2001) a trouvé que des souches appartenant aux espèces *T. longibrachiatum* et *T. atroviride* ont une capacité de réduction de la croissance mycélienne comprise entre 52% et 69 pour *Fusarium culmorum* agent de flétrissement racinaire.

Dans ce même sens, Hassanein et al (1996) ont montré que *T. harzianum* et *T. viride* inhibent la croissance de *Rhizoctonia solani* avec des pourcentages de réduction de 52.20% et 55.83% respectivement, et celle du *Fusarium oxysporum* avec un pourcentage de 57.20% et de *Fusarium lentis* avec 50.60%.

Hibar et al (2005) ont rapporté une inhibition supérieure à 65% de la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* et *Fusarium radialis-lycopersici* (Agent du flétrissement vasculaire de la tomate) en présence de *Trichoderma harzianum*.

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact ont révélé l'existence des modifications au niveau du mycélium des isolats de *Botrytis* se traduisant par une lyse, une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium du *Trichoderma* sur celui de *Botrytis sp*. Un résultat similaire est observé par Hibar et al. (2005) avec *Fusarium sp* ou *Trichoderma harzianum* est capable de s'enrouler sur le mycélium du pathogène, de provoquer une lyse importante du mycélium, et une transformation des filaments mycéliens en cordon.

Benhanou et Chet (1993) ont observé une altération du mycélium de *R. solani* causé par *T. harzianum*, se traduisant par des enroulements des hyphes de l'agent antagoniste sur celles de l'agent pathogène suivi d'une perte du contenu du mycélium, et une dégradation de ce dernier. Ces deux auteurs en 1996, ont cité une altération du mycélium de *Sclerotium rolfsii* en présence de *T. harzianum*, cette altération se traduit par une agrégation, une rétraction et une vacuolisation du cytoplasme.

Des résultats similaires sont obtenus par Cherif et al. (1996) avec *Fusarium oxysporum* en présence de *Trichoderma spp*, ou des zones de lyse et de dégradation des conidies et du mycélium du pathogène avec des enroulements hyphaux sont observés. Ils ont également observé que des hyphes perdent leurs turgescences et deviennent transparents indiquant une perte du contenu cellulaire.

Gupta et al. (1999) ont observé des enroulements des hyphes de *T. viride* (TV1 et TV2), *T. harzianum* (TH1 et TH2), *T. longibrachiatum* et *Laetisaria arvalis* sur celles de *Botryodiplodia theobromae*. Ils ont également observé une dégradation du mycélium de ce dernier en présence de *T. koningii* et *Gliocladium virens* qui peut être due à la production d'enzymes lytiques ou de substances antifongiques.

Les souches de *Trichoderma* (T13 et T9) sont capables d'inhiber la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis sp* même à distance. Le meilleur pourcentage de réduction est obtenu avec la souche T13 *Trichoderma atroviride* BVM01 (76.47%). Il ressort que, malgré l'absence de contact direct entre l'agent pathogène et l'agent antagoniste, il y a inhibition de la croissance mycélienne du pathogène. Dans ce même sens, Hibar et al. (2005) ont obtenu une inhibition de la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* de l'ordre de 63% en présence de *T. harzianum*.

Ce ci ne peut être expliqué que par l'aptitude des souches de *Trichoderma spp.* À produire des substances antifongiques volatiles qui peuvent inhiber et même stopper le développement des isolats de *Botrytis sp.*

Ainsi et avec les souches utilisées dans notre étude l'inhibition a distance s'est avérée plus importante chez les souches appartenant à l'espèce *Trichoderma atroviride* T13 que celle de *Trichoderma longibrachiatum* T9.

En effet, selon Dodd et al. (2003) un antibiotique volatil caractérisé par une odeur de noix de coco (le 6-pentyl- α -pyrone) a été mis en évidence et caractérisé chez cette espèce ; et il est à noter que cette odeur est présente en boîtes de cultures de isolats de *Trichoderma* utilisées dans notre essai.

Les observations microscopiques réalisées à la périphérie des colonies du *Botrytis sp* sous l'effet de *Trichoderma sp* montre l'existence de filaments stériles qui est probablement due à l'effet direct des substances volatiles émises par *Trichoderma* sur la croissance de *Botrytis*.

En plus de la capacité des souches de *Trichoderma spa* inhibé la croissance mycélienne du *Botrytis sp*, elles sont aussi aptes à réduire la sporulation de ce dernier. En effet, une nette réduction de la sporulation du pathogène en présence de *Trichoderma* par rapport au témoin est observée ou la meilleure réduction est enregistrée chez la souche T13 en confrontation avec l'isolat BVA02 à un taux de 77%.

Dans ce même sens, Sidhoumi (2001) avait obtenu une réduction de la sporulation de *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* en présence des souches de *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma atroviride* utilisées. Cette réduction varie entre 81.80% et 86.46% pour *Fusarium culmorum* et entre 60.60% et 90.90% pour *Fusarium graminearum*.

Des résultats similaires ont été obtenus par Biles et Hill (1988) avec *Cochliobolus sativus* agent de la pourriture racinaire des céréales en présence de *Trichoderma harzianum* ou ils ont trouvé une réduction de la sporulation qui varie entre 47% et 83%.

Concernant la protection des plants de pois chiche contre la maladie, l'apport de l'agent antagoniste par traitement du sol est apparu efficace contre le *Fusarium*. En effet, une nette réduction de l'indice de la maladie des plants traités par rapport au témoin positif est observée.

Ainsi, la souche T » offre la meilleure protection avec un pourcentage de réduction de l'indice de maladie de 84.48%.

Des résultats similaires ont été obtenus par Zrkhouni (2005) qui a montré l'efficacité de la souche de *Trichoderma* appartenant aux espèces *Trichoderma longibrachiatum* *Trichoderma harzianum* par traitement du sol contre le *Fusarium sp*. Un pourcentage de réduction de l'indice de maladie qui varie entre 35.69-63.48% avait été obtenu.

D'une manière générale, et concernant l'activité antagoniste des souches *Trichoderma*, une corrélation avait été notée ou la souche T13 est apparue la plus efficace dans l'inhibition de la croissance mycélienne, la réduction de la sporulation, mais une variabilité avait été notée dans cette activité antagoniste au sein de la collection des isolats de *Botrytis sp* à savoir les deux techniques utilisées (Confrontation directe et confrontation à distance).

IV.3. Etude de l'efficacité des fongicides in vitro sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*

Les boîtes de pétri sont observées d'une manière journalière ; et c'est au bout des septième jours que le champignon occupe la totalité des boîtes témoins.

L'effet d'inhibition des deux fongicides le Fludioxonil 25% (SWITCH) et le Cyprodinil 50% (CHORUS) sur la croissance mycélienne a été testé a différentes concentration. Bien évidemment qu'un test préliminaire a été réalise en utilisant des doses très élevée des deux fongicides. Celles-ci ont provoqué une inhibition totale de la croissance des agents pathogène. Ce n'est qu'à la dose D2 pour chacun des deux fongicides que l'inhibition n'était pas complète et totale.

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les deux fongicides reflètent leurs efficacités vis-à-vis les trois souches de *Botrytis sp* sélectionnées de la collection .La totalité des résultats obtenus pour chacun des produits est retrouvée dans les tableaux 24 et 25.

Les résultats obtenus nous permettent :

- D'abord de tracer les courbes de dose/ repense des fongicides (Figure 11 et 12).
- De déterminer la CMI, Concentration Minimale pour laquelle le champignon est totalementInhibé (Tableau 26)
- De déterminer la CL50 Concentration inhibant 50% de la croissance mycélienne des isolats (Tableau 26).
- Et en fin comparer l'efficacité des deux fongicides.

DOSES	Concentration des fongicides			SOUCHE BVM01		SOUCHE BFA04		SOUCHE BFA08 BKA01	
	(mg/boite)	(mg/l)	(g/ha)	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	Pourcentage d inhibition	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	Pourcentage d inhibition	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	Pourcentage d inhibition
D-2	0.106	5.3	187.5	56	76.67%	57	77.33%	59	79.33%
D-1	0.212	10.6	375	59	79.67%	60	80.67%	62	82.67%
D0	0.425	21.25	750	66	89.33%	67	90.33%	69	92.33%
D1	0.85	42.5	1500	68	91.67%	69	93.00%	71	95.67%
D2	1.701	85.05	3000	72	96.33%	72	97.67%	73.5	98.33%
D3	3.402	170.1	6000	75	100%	75	100%	75	100%

Tableau 24. Test d'inhibition sur la croissance mycélienne des souches de *Botrytis* sp Par le CHORUS

DOSES	Concentration des fongicides			SOUCHE BVM01		SOUCHE BFA04		SOUCHE BFA08 BKA01	
	(mg/boite)	(mg/l)	(g/ha)	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	Pourcentage d inhibition	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	Pourcentage d inhibition	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	Pourcentage d inhibition
D-2	0.1134	5.67	200	61.5	82.67%	67	90.67%	66	89.33
D-1	0.2268	11.34	400	66	89.67%	68	91.67%	69	93.33%
D0	0.4537	22.685	800	69	93.33%	70	94.33%	72	96.00%
D1	0.9074	45.37	1600	71	95.67%	71.5	96.67%	73	98.67%
D2	1.8149	90.746	3200	73	96.76%	72	97.33%	75	100%
D3	3.6298	181.49	6400	75	100%	75	100%	75	100%

Tableau 25. Test d inhibition sur la croissance mycélienne des souches de Botrytis sp Par le SWITCH

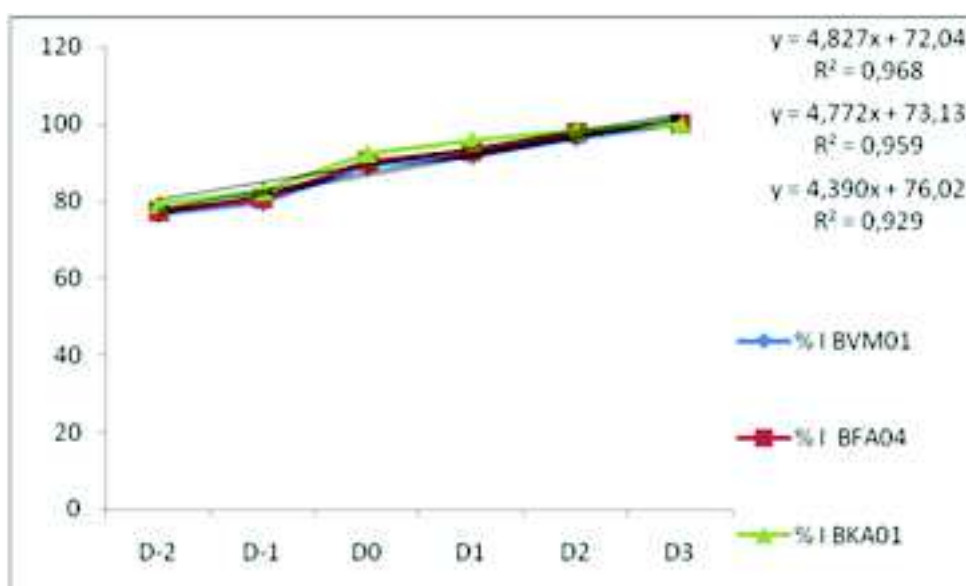


Figure 11. Effet de CHORUS sur le diamètre de la zone d'inhibition

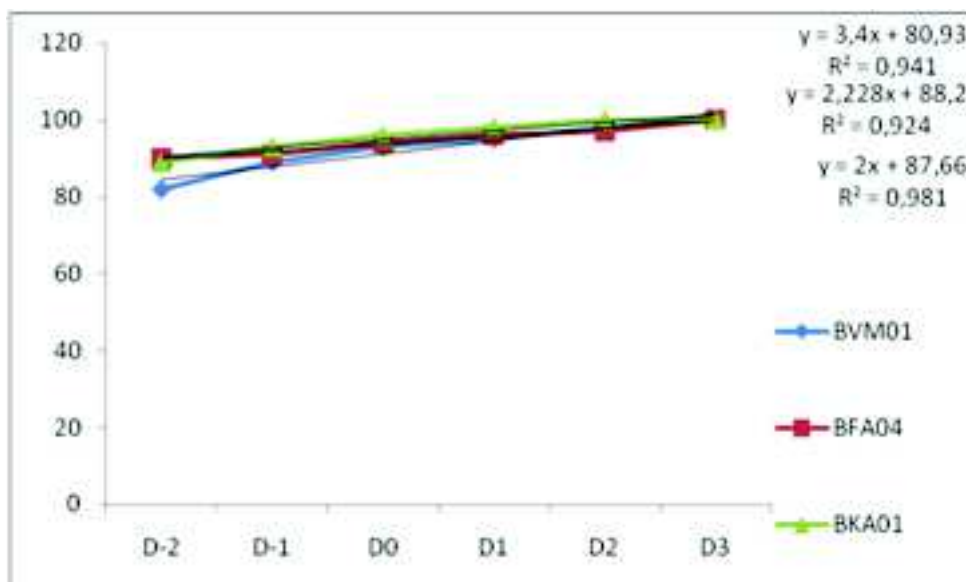


Figure 12. Effet de SWITCH sur le diamètre de la zone d'inhibition

Les tableaux précédents (24 et 25) ainsi que les graphes (14 et 15), montrent une corrélation entre les doses des fongicides et les diamètres des zones d'inhibition.

Ces représentations graphiques font apparaître un comportement homothétique des trois isolats de *Botrytis* sp vis-à-vis de ces fongicides.

En effet plus les doses sont élevées plus le diamètre d'inhibition est grand. L'évolution des pourcentages d'inhibition des doses de CHORUS sont plus importants par rapport aux pourcentages inhibitions de SWITCH se qui explique nettement l'efficacité de CHORUS

Ces résultats montrent une efficacité moyenne du CHORUS, qui ne provoque une inhibition totale qu'à partir de 3.403 mg /boite, soit une dose correspondant a 6400g/ha de produit pour l'ensemble des isolats de *Botrytis*.

Le SWITCH quant a lui, ne provoque une inhibition totale qu'a partir de 1.8149g/boite, soit 3200g/ha et ca que pour la souche BFA08, alors que pour les souches BFA04 et BVM01 c'est qu'a partir d'autre doses plus importantes .Ainsi, que nous avons observé également qu'à la concentration préconisée en plein champ, le CHORUS provoque des taux d'inhibition aux isolats de *Botrytis sp* inférieurs à celles provoqués par le SWITCH.

A travers ces résultats, nous pouvons déduire que l'ensemble des isolats utilisés sont sensibles aux deux fongicides et qui est plus importante pour le SWITCH que le CHORUS.

Mais toutefois, cette sensibilité est aussi variable en fonction de la résistance prouvée par l'isolat qu'on la remarque plus importante pour la souche BfA04 et faible pour l'isolat BVM01. Le même résultat a été obtenu lors des travaux qui suivaient le même cadre d'étude en utilisant les deux fongicides utilisée par Alem, 2008. La CL 50 et les CMI sont estimées à partir des formules des droites de régression (Tableau25).

Tableau 26. Concentration d'inhibition et Concentration minimal d'inhibition total de CHORUS et de SWITCH

	CHORUS	SWITCH
CL 50 BVM 01	2.98	0.091
CMI BVM 01	95.6	98.9
CL 50 BFA 04	2.53	0.078
CMI BFA 04	94.4	97.3
CL 50 BFA 08	2.27	0.072
CMI BFA 08	91.8	87.8

IV.3.1. Discussion

Ces deux fongicides ont été classés dans le groupe des fongicides provoquant une faible résistance selon l'échelle de Faretera et Pollastro(1991). Les résultats obtenus se rapprochent de ceux obtenus par de nombreux auteurs qui invoquent l'existence de différents phénotypes sur la base de la repense.

En plus de la pathogénicité, la sensibilité a l'égard des fongicides observée pour chaque isolats de l'espèce *Botrytis sp* pourrait être un critère important à prendre en considération pour la protection des cultures ou l'amélioration des productions par la lutte chimique (Salhi., 2004).

IV.4. CONCLUSION

Botrytis cinerea est un des champignons les plus polyphage, Il est l'agent pathogènes de la pourriture grise de la vigne et de certains autres espèces végétales .Il provoque des pertes considérable pouvant atteindre jusqu'a 20% des récoltes mondiales concernées.

Les espèces du genre *Botrytis* sont d'importants pathogènes qui s'attaquent a de nombreuses cultures (légumineuses, culture maraichère, plantes ornementales, vigne plantes a bulbes, essence forestière ...etc.). Les maladies qu'elles engendrent sont redoutées par les producteurs du monde entier en raison de l'importance des dégâts occasionnées 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 morphologique et symptomatologiques. En effet, la majorité des études menées sur *Botrytis cinerea* indiquent une difficulté certaine à identifier cette espèce de manière tranchée. 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.

La caractérisation biologique est basée sur l'étude des critères morphologiques et culturaux 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 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,

L'étude morphologique et culturale réalisée sur la collection de *Botrytis sp.* a montré que les isolats de la collection exhibaient une grande diversité phénotypique indépendamment de l'origine géographique et de la plante hôte. Les résultats obtenus permettent de suggérer que les isolats de toute la collection appartiennent à l'espèce *Botrytis cinerea* y compris les isolats issus de la fève et des 6 autres cultures dans notre étude, et dont les caractéristiques morphologiques ne correspondaient pas à ceux d'une autre espèce *Botrytis sp.*

L'étude des caractères biologiques des champignons pathogènes est une étape cruciale en pathologie, 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.

La lutte contre les maladies causées par *Botrytis* nécessite, entre autre, l'emploi des agents antagonistes (bio-fongicides) et des produits fongicides.

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'observation de l'efficacité ou non, de deux agents antagonistes appartenant à l'espèce *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma atrovirens* ainsi que l'efficacité de deux produits fongicides à savoir le CHORUS et le SWITCH, vis-à-vis notre collection de souches de *Botrytis cinerea*.

Les résultats relatifs à l'étude de l'activité antagoniste provoquée par les souches de *Trichoderma sp.* ont montré leur efficacité à l'égard des agents pathogènes de *Botrytis sp.* aussi bien par la nette réduction de la croissance mycélienne, ainsi que sur la sporulation. Cependant, cette efficacité est variable selon les souches des espèces utilisées ainsi que le protocole expérimental ou les meilleurs résultats sont obtenus avec la souche T13 appartenant à l'espèce *Trichoderma atrovirens* par rapport à la souche T9 de l'espèce *Trichoderma longibrachiatum*.

Notant aussi que cette efficacité est nettement plus importante lors de la confrontation directe que celle à distance.

Pour ce qui est de l'activité antagoniste des fongicides, les résultats obtenus lors de nos essais ont montré une bonne efficacité de nos deux produits, avec un effet plus important pour le SWITCH.

D'un point de vue pratique nous pouvons considérer que ces deux produits sont très efficaces, (plus de 90% d'inhibitions) tout en se basant sur l'effet que la maladie de la pourriture grise n'est pas une maladie de quarantaine dont on peut admettre un seuil de tolérance.

Selon Corbaz (1991), les résultats obtenus au laboratoire ne reflètent pas toujours ce qui se passe en plein champ. Pour lutter mieux contre le *Botrytis*, il est nécessaire de mener des

travaux complémentaires, et en soumettant un grand nombre d isolats a plusieurs matière actifs et a une gamme plus large d'agents antagonistes. Ou il sera possible d étudier tous ces effet sur différents aspects (Cultural, Sporulation, Enzymologie, Résistance et autre).

En se basant sur les résultats obtenus encourageants, il est d'intérêt donc d approfondir les études dans ce domaine, afin de sélectionner les meilleures souches antagonistes pour les utiliser dans des programmes de lutte intégrée ont les combinant avec des produits Fongicides a fin d'avoir une meilleure production, tenant compte bien sur de développement des résistances, de la pollution provoquée et de la toxicité envers la faune et les auxiliaires.

Références bibliographiques

- AGGAD H. 1988. Matériels, méthodes et techniques de détection des maladies à virus sur vigne. Course on « Sanitation and protection of fruit academic ». Rapport de stage pratique, Bari (Italie). 22pp.
- AGRIOS G.N. 1997. Plant pathology, 4ème Edition. Ed. Academic press, New York. 619pp.
- AGULHON R. 1966. Protocole d'essai de lutte contre la pourriture grise pour 1966. Vignes et vins 153 : 23- 25.
- ALLALA L. 2001. Variation in protein patterns of *Botrytis fabae* et *Botrytis cinerea*, causal agents of « chocolate spot » on faba bean (*Vicia faba*) in Algeria. 4th European Conference on Grain Legume, Cracow (Poland). Ed. A.E.P., Paris (France).
- ANONYME. http://www.charriere-distribution.com/fr/maladies/vigne/66_maladie-bacterienne.htm
- ANONYME. 1986 a. Larousse agricole, Ed. Larousse.1161pp.- ANONYME. 1986 b.
- ANONYME. 1986 b. Association de Coordination Technique Agricole. Fiche technique n °78, 4ème édition, Paris (France).
- ANONYME. 1988. Association de Coordination Technique Agricole. Fiche technique n °153, 3ème édition, Paris (France).
- ANONYME. 1996 .Pesticides. H.M.S.O. Publications, Londres (GBR). (In : Protection de plantes par "Immunsation Génétique" : Obtention et caractérisation de tabacs transgéniques exprimant un gène d'élicitine sous contrôle d'un promoteur inductible. KELLER H., N. PAMBOUKDJIAN, M. PONCHET, A. POUPET, B. CAILLETEAU, R. DELON, J.L. VERRIER, D. ROBY et P. RICCI. 1998) Bulletin. A.R.N.1998, pp. 56-69.
- ANONYME.2000. Guide variétal de la vigne. Institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne. I.T.A.F.V, Tessala- El- Merdja (Algérie). 29p.
- ANONYME.2001. Dictionary of the Fungi, 9th ed. (<http://www.indexfungorum.org/Names/fungic.asp>)
- ANONYME. 2002. Bulletin O.E.P.P/ E.P.P.O. 32, pp. 371-392.
- ANONYME. 2005. Avertissements agricoles pour de bonnes pratiques agricoles. Fiche technique n° 10. Service Régional de la Protection des Végétaux. Région centres (France).
- ANONYME. 2008. Note nationale Botrytis de la vigne. Institut National de la Recherche Agronomique I.N.R.A.France.2pp.
- ALLY P., L. GOUT, C. LEVIS, A. GAUTIER, C. GIRAUD-DELVILLE et E. FOURNIER. 2008. Evolution entre espèces du genre *Botrytis* de gènes impliqués dans les interactions plantes- champignons phytopathogènes. In : Réunion annuelle du Réseau Ecologie des Interactions Durables 10 et 11 janvier 2008. Tours.

- BARRY A.D. 1886. Uber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten. Bot. Zeit.
- BERNIER C.C., S.B. HANOUNIK, M.M. HUSSEIN et H.A. MOHAMED. 1984. Field manual of common faba bean diseases. In : Rapport .I.C.A.R.D.A. the nil valley. 40pp.
- BOUDON- PADIEU E., M. RIDE, B. WALTER. 2000. Maladies à virus bactéries et phytoplasmes de la vigne, FERET- Bordeaux.
- BOUQUET A., L. TORREGROSA, P. CHATELET. 2004. Combinaison des approches biotechnologiques et conventionnelles dans la sélection de porte-greffes présentant une résistance durable à la transmission de la maladie du court- noué. In : Bulletin de l'O.I.V. Vol. 77 : 879-880.
- BOVEY P. 1972. La défense des plantes cultivées. Traité pratique de phytopathologie et zoologie agricole. 6ème édition. Ed. Payot, Lausanne. 864 pp.
- BOVET R., W. GÄRTEL, W.B. HEWITT, G.P. MARTELLI et A. VUITTENEZ. 1980. Maladies à virus et affections similaires de la vigne. Ed. Payot, Lausanne. pp10- 17.
- BOVET R., G.P. MARTELLI. 1992. Directory of major virus and virus like diseases of grapevines «description, historical, review and bibliography ».Ed. Medit. Fr. Crop. 111 pp.
- BRUNT A.A., K. CRABTREE, M.J. DALLWITZ, A.J. GIBBS et L. WATSON. 1997. Viruses of plants, Ed. CAB international, London (UK). 1484pp.
- BURR T.J., A.L. BISHOP, B.H. KATZ, L.M. BLANCHARD et C. BAZZI. 1987. A root specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium radiobacter* biovar 3. Pytopathology. 77 : 1427-1427.
- CASTELLUCCI F. 2008. OIV Raport on the state of the vitiviculture world marked. In : 6th general assembly of the O.I.V 16/06/2008, Verone (Italie). (www.oiv.int).
- CARISSE.O., R. BACON, J. LASNIER, W. MCFADDEN-SMITH. 2006.- Guide d'identification des principales maladies de la vigne. Agriculture et Agroalimentaire. Canada.31p.
- CHANCRIN E. 1952. Viticulture moderne Ed. Hachette, Paris 334pp.
- CHAUVET M. 1979. Manuel de viticulture, Ed. J.B. Bailliere. 319pp.
- CHETOUH C. 2005. Les variétés de raisins en Algérie, situation actuelle et perspectives de développement, In : journées scientifiques et techniques sur la viticulture les 7-8 et 9 Mars. I.T.A.F., Tassala El Merdja.
- CHÉRIF M., I. AMARI et 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.
- COLEY- SMITH J.R., K. VERHOEFF et W.R. JARVIS. 1980. The Biology of *Botrytis*, Ed. Academic Press, London.
- CARDONNIER R. 1987. Les effets de *Botrytis cinerea* sur la couleur et l'arome. R.F.Æno 108 : 21-29
- CARDONNIER R., J. HURTREL et C. BIRON. 1980. Relation entre le taux de pourriture de la vendange, l'activité laccase et l'aptitude à la casse oxydasique des moûts et des vins. Connaissance vigne 14(1) : 19-28

- 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.
- COUTEUX A. et V. LEJEUNE. 2007. *Index phytosanitaire*. 43ème édition. Ed. A.C.T.A. 832pp.
- CRESPY A. 1992. *Viticulture d'aujourd'hui*, 2ème édition. Ed. Lavoisier tec&doc, Paris. 240 pp.
- DALMASSO A. 1971. La désinfection nématicide du sol dans la prévention de la dégénérescence infectieuse de la vigne. *Uni. Agriculture* 315 (1) : 55- 66.
- DECAL A. et P. MELGAREJO. 1992. Interaction of pesticides and mycoflora of peach twigs. *Mycol Res* 96 : 1105–1113
- DECAL. A, M. SAGASTA, P. MELGAREJO. 1988. Antifungal substances produced by *Penicillium frequentans* and their relationship to the biocontrol of *Monilinia laxa*. *Phytopathology* 78: 888–893.
- DERCKEL J.P., F. BAILLIEUL MONTEAU, J.C. AUDRAN, B. HAYE, B. LAMBERT et L. LEGENDE. 1999. Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *The American Phytopathological Society*. Vol 89(3).
- DI LINNA P., P. MARCIANO et P. MARGO. 1981. Comparative investigation on morphological and physiological features of three isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopath.Z* 100 : 203-211.
- DIOLEZ A., F. MARCHES, D. FORTINI et Y. BRYGOO. 1995. Boty, a long- Terminal-Repeat Retro element in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(1) : 103- 108.
- 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.
- DUBOS B. 1999. Maladies cryptogamiques de la vigne, champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Ed. Féret, Bordeaux. 174pp
- DUBOS B. 2002. Maladies cryptogamiques de la vigne, Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Ed. Féret, Bordeaux. 207pp.
- DUBOURDIEU D. 1995. Incidences de la pourriture grise sur la composition des moûts et la qualité des vins. In : Conférence faite à la réunion de lancement du pyriméthanol.
- EL BIARI A. 1995. Etude de l'antracnose du pois chiche due à l'*Ascochyta rabiei* (Pass) Lab. : Polymorphisme des populations et diagnostic immunoenzymatique. Thèse de doctorat en sciences de l'université Paris XI, Orsay. 100pp
- EL- HEIT K. 2005. Le retour des maladies du bois et des ravageurs phytophages de la vigne. In : journées scientifiques et techniques sur la viticulture les 7-8 et 9 Mars. I.T.A.F., Tassala El Merdja.
- 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, *Ceratitis 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.
- FITT B.D., N.F. CREIGHTON et A. BAINBRIDGE. 1985. Role of wind and drain in dispersal of *Botrytis fabae* conidia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85(2) : 307-312.
- FODIL. O. 1989. Les cépages autochtones en Algérie. *Ann. Inst. Nat. Agron. El Harrach*, Vol. 13(1) : 135- 240.
- FOURNIER E., C. LEVIS, D. FORTINI, P. LEROUX, T. GIRAUD et Y. BRYGOO. 2003. Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia*. 95 (2): 251-261. In : *Epidémiologie moléculaire des populations du champignon phytopathogène Botrytis cinerea soumis à des pressions de sélection anthropiques.* NEEMA. C. PR., 2008. Thèse École doctorale « Science du végétal du gène à l'écosystème SDV 145». Université Paris Sud 11 -Institut de Biotechnologie des Plantes.
- FOURNIER E, T. GIRAUD, C. ALBERTINI, Y. BRYGOO. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*. 97(6):1251-1267. . In : *Epidémiologie moléculaire des populations du champignon phytopathogène Botrytis cinerea soumis à des pressions de sélection anthropiques.* NEEMA. C. PR., 2008. Thèse École doctorale « Science du végétal du gène à l'écosystème SDV 145». Université Paris Sud 11 -Institut de Biotechnologie des Plantes.
- FOURNIER E, T. GIRAUD. 2008. Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J. Evol. Biol.*; 21(1):122-32. . In : *Epidémiologie moléculaire des populations*

- du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* soumis à des pressions de sélection anthropiques. NEEMA. C. PR., 2008. Thèse École doctorale « Science du végétal du gène à l'écosystème SDV 145 ». Université Paris Sud 11 -Institut de Biotechnologie des Plantes.
- GALET P. 1988. Précis de viticulture. 5ème édition. Ed. Déhaan parc euromédecine, Montpellier. 612p.
- GALET P. 1993. Précis de viticulture. 6ème édition. Ed. Lavoisier tec&doc, Paris. 582pp.
- GALET P. 1995. Précis de pathologie viticole. 2ème édition. Ed. rev. et corr. 264pp
- GALET P. 1998. Précis d'ampélographie pratique. 7ème édition, Ed. Pierre galet, Montpellier. 256pp.
- GAUTIER M. 1987. La culture fruitière, Vol 1 : L'arbre fruitier. Ed. J.B.Baillièrre, Paris. 492pp.
- GIRAUD T., C. LEVIS, D. FORTINI, P. LEROUX et Y. BRYGOO. 1997. RFLP Markers Show Genetic Recombination in *botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and Transposable Elements Reveal Two Smpatric Species. *Mol. Biol. Evol.* 14: 1177-1185.
- GIRAUD T., C. LEVIS, D. FORTINI, P. LEROUX et Y. BRYGOO. 1998. Plusieurs espèces sous le nom de *Botrytis cinerea*. *Phytoma*. 504 : 56-60.
- GIRAUD T., D. FORTINI, C. LEVIS, C. LAMARQUE, C., P. LEROUX, K. LOBUGLIO et Y. BRYGOO. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology*. 89: 967-973. In : Epidémiologie moléculaire des populations du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* soumis à des pressions de sélection anthropiques. NEEMA. C. PR., 2008. Thèse École doctorale « Science du végétal du gène à l'écosystème SDV 145 ». Université Paris Sud 11 -Institut de Biotechnologie des Plantes.
- GORLENKO M.V., et N.V. MANTUROVSKAYA. 1971. Interstrain differentiation of *Botrytis cinerea*. *Rev. Plant Pathol.* 51 : 3211. In : Differential Induction of Grapevine Defenses by Two Strains of *Botrytis cinerea*. The American Phytopathological Society, Vol. 89 (3). 1999.
- GRINDLE M. 1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*. 111 : 109- 120.
- GROVES J.W. et C.A LOVELAND. 1953. The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia* 45 : 415-425.
- GUGERLI P., J-J. BRUGGER et P.BASLER. 1990.a. Les maladies de l'enroulement, du bois strié et de l'écorce liégeuse de la vigne. Fiche technique n° 029. Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil. Département EVD, Suisse.
- GUGERLI P., J-J. BRUGGER et P.BASLER. 1990.b. Dégénérescence infectieuse ou court noué de la vigne. Fiche technique n° 033. Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil. Département EVD, Suisse.
- HADBI H. 1985. Essai de taille sur la fructification du deux cépages de tables. Thèse. d'ing. I.N.A., El-Harrach. 105pp.

- HANOUNIK S.B. et N. MALIHA. 1986. Horizontal and vertical resistance in *Vicia faba* to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Plant disease* 70 (8) : 770- 773.
- HANOUNIK S.B. et L.D.ROBERTSON.1988. New sources of resistance in *Vicia faba* to chocolate spot caused by *Botrytis fabae*. *Plant disease* 78(2) : 696-698.
- HANSEN H. N., R.E. SMITH.1932. An analysis of variation in *Botrytis cinerea* by single-spore culture. *Phytopathology* .22(11). In : Differential Induction of Grapevine Defenses by Two Strains of *Botrytis cinerea*. The American Phytopathological Society. Vol. 89 (3). 1999.
- HARRISON J.G. 1976.
- HARRISON J.G. et A.J. HARGREAVES.1977. Production and germination in vitro of *Botrytis fabae* microconidia. *Trans. Br. Myco. Soc.*69 (2): 332-335.
- HARRISON J.G. 1980. The production of toxin by *Botrytis fabae* in relation to growth of lesions on field bean leaves at different humidities. *Ann. Appl. Biol.* 95 : 63-71.
- HARRISON J.G. 1983. Survival of *Botrytis fabae* in air. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80(2): 263- 269.
- HARRISON J.G. et LOW. 1987. Wind dispersal of conidia of *Botrytis* spp, pathogenic to *Vicia fabae*. *Plant Pathology* 37(2): 168-201
- HUGLIN P. et C. SCHNEIDER. 1998. *Biologie et écologie de la vigne*. 2ème édition. Ed. Lavoisier, Paris.370pp.
- JACKSON A.J., D.R. WALTERS et G. MARSHALL. 1994. Evaluation of *Penicillium chrysogenum* and its antifungal extracts as potential biological control agents against *Botrytis fabae* on faba bean. *Mycological reserch.* 98 (10): 1117-1126.
- JARUGULA S., M.J. SOULE. 2008. First Report of Grapevine leafroll-associated virus-9 in Washington State Vineyards. *plant disease.* 92(3)
- JARVIS W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species. Taxonomy, physiology and pathogenicity. *Res.Stn.Can.Dep.Agric., Harrow, Monogr.* 15 : 195- 196.
- JOHNSTON D.J. et B. WILLIAMSON. 1992. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 5: 343- 349.
- KAISER W.J. 1973. Factors affecting growth sporulation, pathogenicity and survival of *ascochyta rabei*. *Mycology.* 65(2): 444- 445.
- KAMOEN O. 1992. *Botrytis cinerea* host- pathogen interactions. Recent advances in *Botrytis* research. In: Proceedings of 10th international *Botrytis* Symposium, Heraklion, Crete, Greece, Pudoc, Wageningen, The Netherlands. Pp 39- 47.
- KATUMOTO K., H. LZUMI et Y. YUKAWA. 1974. Scanning électron microscopy of morphological aspects of the gray mold, *Botrytis cinerea*. *Bull. Fac. Agri. Yamaguti. univ.*25 : 965-978.
- KHELIL A. 1978. Etude de la fertilité des bourgeons latents de deux variétés de *Vitis vinifera* L : Dattier de Beyrouth et Ahmeur Bou Ameur. *Ann. Inst. Nat. Agron. El Harrach* Vol.8(5) : 2-23.
- LAGHA M. 1992. Caractérisation sérologiques de trois souches du virus du court- noué de la vigne (GFLV). Thèse. "Master of science". *Virolog. Végét. I.A.M., Bari (Italie).* 54pp.

- LASKIN A.I. et A.H. LECHEVALIER. 1973. Handbook of microbiology, Vol.2. Microbiol composition. Crc press, cleveland/ Ohio. In: Compendium of soil fungi. Academic press, London..
- LEMARCHAND E. et B. TIVOLI. 1999. Maladies fongiques aériennes des légumineuses alimentaires, In: Atelier F.R.Y.M.E.D., 5-15 Avril, Rabat.
- LEVADOUX L., A. BENABDERRABOU et B. DOUAOURI. 1971. Ampélographie algérienne, cépages de cuve et de table cultivés en Algérie. Société nationale d'édition et de diffusion, Alger. 119 pp.
- LEVIS C., T.GIRAUD, M. DUTERTRE, D.FORTINI et Y. BRYGOO. 1997. Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. F.E.M.S. Microbiology letters. 157 : 267- 272.
- LONG J. 1979. Vignes et vignobles. Ed. Hachettes, Paris. 251 pp.
- LOPEZ M.M., M. GARCIA et M. SAMPAYO. 1987. Current status of *Xanthomonas ampelina* in Spain. Bull. OEPP. 17 : 231- 236.
- LORBEER J. W. 1980. Variations in *Botrytis* and *Botryotinia*. Pp.19- 30. In : The Biology of *Botrytis*. Coley- Smith J.R., K. Verhoeff, and W. R. Jarvis. Ed. Academic Press, London. In: Differential Induction of Grapevine Defenses by Two Strains of *Botrytis cinerea*. The American Phytopathological Society, Vol. 89(3), 1999.
- LUI S., S. OELJEKLAUS, B. GERHARDT et B. TUDZYNSKI. 1998. Purification and characterization of glucose oxidase of *Botrytis cinerea*. Physiology and Molecular Plant Pathology. 53 : 123- 132.
- MAATOUGUI M.E.H. 1996. Situation de la culture de fève en Algérie et perspectives de relance. pp 17- 32. In : Proceeding rehabilitation of Faba been. Rabat (Marocco).
- MACARTNEY C.A., A.L.BRULE-BADEL et LAMARI. 2002. Inheritance of race specific resistance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Pytopathology. 92 : 138-144.
- MATHON C.C. 1984. Phytogéographie appliquée- l'origine des plantes cultivées. Ed. Masson. 182 pp.
- MARGARA J. 1984. Bases de multiplication végétative, la culture de méristèmes et l'organogénèse. Ed. I.N.R.A., Paris. 262pp.
- MARTELLI G.P. 1985. Virus and virus –like disease of the grapevine in Algéria. Rapport to the government of Algéria, Rome. 53 pp.
- MARTELLI G.P. 1986. Virus and virus –like disease of the grapevine. In: Bulletin phytosanitaire F.A.O. Vol 34: 25-42.
- MARTELLI G.P. 1987. Maladies à virus et semblables aux virus dans le bassin méditerranéen, Istituto agronomico Mediterraneo, Center for the production of virus-disease, free mediterranean fruit crops, 34 p.
- MARTELLI G.P. 1994. Inquadramento sistematico dei virus della vite. Atti giornale. Fito patologica. Pp.247- 248.
- MARTELLI G.P. et U. PROTA. 1985. Virosi della vite estratto da l'italia agricola. Ann. 122(2). Aprile. Giugno. Pp. 201- 228.
- MARTELLI G.P. et V. SAVINO. 1990. Fanleaf degeneration. Compendium of grape diseases. The american phytopathology. Calif. Society. 2ème édition. Pp. 48- 49. Ed. Pearson. R. C. and Goheen.A.

- MARTINEZ F., D. BLANCARD, P. LECOMTE, C. LEVIS, B. DUBOS et M. FERMAUD. 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *B. cinerea*. *European Journal Plant Pathology*. 109 (5) : 479-488, In : Assignation de différents modes de vie au vignoble à certaines entités génétiques du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*. Rapport d'activité 2004- 2005 .I.N.R.A., Bordeaux-Aquitaine. pp 56
- MARTINEZ F., B. DUBOS et M. FERMAUD. 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *B. cinerea* in vineyards. *Phytopathology*. 95 : 692-700. In : Assignation de différents modes de vie au vignoble à certaines entités génétiques du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*. Rapport d'activité 2004-2005 .I.N.R.A., Bordeaux- Aquitaine. pp 56
- MELGAREJO P. et E. M-SAGASTA. 1986. Destructive morphological changes induced in *Monilinia laxa* by *Penicillium purpurogenum*. *Trans.British Mycological Society* 82 : 343-346.
- MESSIAEN C.M., D. BLANCARD, F. ROUXEL et R. LAFON.1991. Les maladies des plantes maraîchères. 3ème édition. I.N.R.A. 546 p.
- MORSI F. 1989. Contribution à l'étude du forçage des raisins de table sous tunnel plastique. Thèse. d'ing. I.N.A., El-Harrach. 57 pp.
- MOUSQUES A., 1996, Mise en évidence d'une nouvelle substance antifongique produite par une souche de *Pseudomonas cepacia*, isolée du sol. Action sur « *Botrytis cinerea* ». Thèse. Doctorat (UB2), Œnologie-ampélogie, 12 décembre 1996, Université de Bordeaux 2.
- MUÑOZ. G., P. HINRICHSEN, Y. BRYGOO, T. GIRAUD. 2002. Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research* 106: 595-602.
- NACEF A. 2003. Essai de propagation in vitro de deux cépages autochtones. Thèse. d'ing. I.N.A., El- Harrach. 53 pp.
- NAUDIN R. 1989. Incidences économiques et qualitatives du *Botrytis cinerea* en viticulture et en œnologie. In : Conférence Technique « le Botrytis ». Groupement Régional des Techniciens Supérieurs en Viticulture Œnologie- Epernay, 5juin. pp 16-22.
- NEEMA C. PR. 2008. Epidémiologie moléculaire des populations du champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* soumis à des pressions de sélection anthropiques. Thèse École doctorale « Science du végétal du gène à l'écosystème SDV 145». Université Paris Sud 11 -Institut de Biotechnologie des Plantes.
- NEERGARD P. 1977. Seed pathology. Tome1 .Ed. Mac Millan Press, London. 839p
- NOBLE M. et M.J. RICHARDSON. 1968. An annotated list of seed- borne diseases. In: *Compendium of soil Fungi*. Ed. Academic press, London.
- 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* MichxII. Untersuchungen zur Variabilität des Kulturtyps unter konstanten Kulturbedingungen. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene* 120: 179-196.
- 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 (*Paseolus 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.
- OUALI M.. 2006. L'Algérie développe sa production de vin. Ed Maghrebica.
- ONFROY C. 1997. Maladies fongiques aériennes des légumineuses alimentaires, Rapport .I.N.R.A., 11p.
- PANAGOPOULOS C.G. 1969. The disease tsilik marasi of grapevine : its description and identification of the causal agent. *Pytopathology*.9 : 59- 81.
- PAUL W.R.C. 1929. A comparative morphological and physiological study of a number of strains of *Botrytis cinerea* Pers. With special reference of their virulence. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 14 : 118- 135. In : Differential Induction of Grapevine Defenses by Two Strains of *Botrytis cinerea*. The American Phytopathological Society. Vol. 89(3), 1999.
- PERRET C. 2001. Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers. Thèse, de Docteur en Sciences. Faculté des Sciences, Université de Neuchâtel.
- PEZET R., M. JERMINI, et W. SIEGFRIED, 1993. Le black-rot de la vigne. Fiche technique n° 613. Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil. Département EVD, Suisse.
- PIGEAT J.P. 2000. Les paysages de la vigne. Institut International des Paysages et Architectures Viticoles. Ed. Salon. 160p.
- POHANKA A., K. CAPLEAU, A. BROBRG, J. STENLID, E. STRANSTRON et L. KENNE. 2004. Enniations of *Fusarium* sp. Strain F31 and their inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination. *J. Nat. Prod.* 67(5) : 8518- 57.
- PRICE K. et J. COULHOUN. 1975. A study of variability of isolats of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary from différents hôtes. *Phytopathologische zeitschrift. Journal of phytopathology.* 83 : 159- 166.
- PUCHEU- PLANTÉ B. et M. MERCIER. 1983. Etude ultrastructurale de l'inter- relation hôte- parasite entre le raisin et le champignon *Botrytis cinerea* : exemple de la pourriture noble en sauternais. *Can. J. Bot.* 61 : 1785- 1797
- PURKAYASTHA R.P. et B. BHATTACHARYYA. 1982. Antagonism of micro- organisms from jute phyllosphere towards *colletotrichum corchori*. *Trans. British. Mycological society.* 78 : 509-513.
- RABHI M.L. 2005. L'organisation du segment de la transformation en Algérie. In : journées scientifiques et techniques sur la viticulture les 7-8 et 9 Mars. I.T.A.F., Tassala El Merdja.
- RAMI K. 2007. Contribution à l'étude de *Botrytis cinerea* sur la vigne. Thèse. d'ing .I.N.A. El- Harrach.
- RAPILLY F. 1968. Techniques de mycologie en pathologie végétale. Ed. I.N.R.A. 102p.
- RAVAZ L. 1895. La pourriture des raisins. *Rev. Vitic.* 4 : 156- 160 et 179- 184.

- REYNIER A. 1986. Manuel de viticulture. 4ème édition. Ed. J.B.Bailliere, Paris. 365p.
- REYNIER A. 2001. Manuel de viticulture, 8ème édition. Ed. J.B.Bailliere, Paris. 514p.
- RIEUF P., M. CLERJEAU et R. LAFON. 1980. La pourriture grise en cultures légumières : tomates, salades et autre productions. *Phytoma*. 320 : 19-21.
- ROBINSON J. 1988. Le livre des cépages. Ed. Hachette. 280 p.
- SANTORELLI S., G. CONCA et A. PORTA- PUGLIA. 1992. Comportamento di linee e varietà di Faba major, minore ed equina verso *Botrytis fabae*. *Informator fitopatologico*. 10 : 2- 3.
- SOKAL R.R et F.J.ROHLF. 1981. Biometry : The principles and practice of statistics in biological research. Ed.W. H. FREEMAN and Company. New York, 859pp.
- SOLER J. 1954. Les grands secteurs de l'agriculture algérienne. Ed. Gouvernement général. pp1953- 1954.
- SAVAGE S.D. et M.A. SALL. 1981. Radioimmunosorbent assay for *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 71(4) : 411-415.
- Roberts R.G. 1990. Postharvest biological control of grey mould of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80: 526-530.
- 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
- 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.
- 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.
- Viennot-Bourgin G.1967. Les champignons parasites des plantes cultivées. Edition Masson, Paris. France. 1431 p.
- 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.
- THOMAS et al. 1983.-
- TIVOLI B. et J. GONDRAN. 1984. Les taches chocolat de la féverole causées par *Botrytis fabae*. *Sard. Perspectives agricoles* 77 : 22-25.
- VANDER VLUGT- BERGMANS C.J.B. 1996. Genetic variation and pathogénéicity of *Botrytis cinerea*. Thèse. de doctorat. Université de Wageningen.
- VERDIE R. et M. LENORMAND.1984. Modulation de l'expression du pouvoir pathogène de *Botrytis fabae* Sard et *Botrytis cinerea* Pers, par des bactéries du phylloplant de *Vicia faba* L. *Agronomie* 4 (8) :721-728.
- VIDAUD J., S.CHARMONT, R. WAGNER. 1993. Les raisins de table. Ed. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Paris. 263p.
- VIRET O. et W. SIEGFRIED. 1995. Pourriture grise et pourriture Acétique. Fiche technique n° 041. Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil. Département EVD, Suisse.
- VIRET.O., W. SIEGFRIED, P. GUGERLI, et CH. LINDER. 2007. Le guide VITI d'ACW. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* Vol. 39 (1): 38-43.

- WALTER B. 1991. Sélection de la vigne : le dépistage des maladies de la vigne transmissibles par le bois et plants. Bulletin de l'O.I.V. 1991 : 727- 728.
- WEEDS P.L., R.E. BEEVER, K.R. SHARROCK et P.G. LONG. 1999. A major gene controlling pathogenicity in *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetz (*Botrytis cinerea* Pers). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 54 :13- 35.
- WILLETTS H.J. 1969. Structure of outer surfaces of sclerotia of certain fungi. Pp 48- 53. In : *Compendium of soil fungi*. Arch. Mikrobiol. 69. Ed. Academic press, London.
- YANG Y, SHAH J. & D.F. KLESSIG D. 1997. Signal perception and transduction in plant defense response. *Genes and Development*.(11) : 1621-1639. In : *Protection de plantes par "Immunisation Génétique" : Obtention et caractérisation de tabacs transgéniques exprimant un gène d'élicitrine sous contrôle d'un promoteur inducible*.
- KELLER H., N. PAMBOUKDJIAN, M. PONCHET, A. POUPET, B. CAILLETEAU, R. DELON, J.L. VERRIER, D. ROBY et P. RICCI. 1998) *Bulletin. A.R.N.*1998, pp. 56-69.
- ZITTER T.A. 1986. *Vegetable crops. Botrytis Gray Mold of Greenhouse & Field Tomato*, Cooperative Extension. Cornell University, New York State. (www.vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Tomato-Botrytis.html .)

Annexes

ANNEXE 01. Milieu de culture MALT :

Malt20g

Agar- agar.....20g

Eau distillée.....1000ml

Mettre l'agar, le Malt puis ajuster la quantité d'eau distillée pour atteindre 1L. Autoclaver 20mn à 120°C.

ANNEXE 02. Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) :

Pomme de terre.....200g

Glucose.....20g

Agar- agar.....20g

Eau distillée.....1000ml

Laver, couper en morceaux les pommes de terre, les faire cuire, filtrer, ajouter l'agar, le glucose puis ajuster la quantité d'eau. Autoclaver 20mn à 120°C.

ANNEXE 03. Milieu gélosé :

Glucose.....20g

Gélose.....20g

Eau distillée.....1000ml

Autoclaver 20mn à 120°C.

ANNEXE 04 : Propriétés des fongicides utilisés :

Le cyprodinil :

Le cyprodinil appartient à la famille des pyrimidinamines.

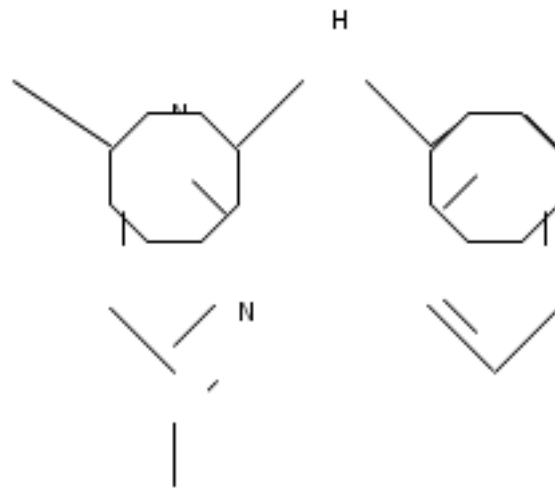
Le produit pur se présente sous forme de cristaux incolores, il est en partie absorbé par les feuilles puis transporté par systémie : mobilité translaminaire et acropétale. L'activité fongicide s'exerce par contact et par systémie de manière préventive et curative.

Propriétés physiques :

- _ Solubilité dans l'eau : 13 mg /l a PH ET 25°C.
- _ Température de fusion : 75,9°C.
- _ Durée de demi-vie : 25 jours.

Propriétés chimique :

- _ Formule brute C₁₄H₁₅N₃
- _ Formule semi étalée :
- _ Nom chimique :



N-phénylcyclopropyl 4-méthyle 6

Pyrimidine-amine2

- _ Masse molaire : 225.289g/mol.

Toxicologie :

- _ Pour le rat, la DL50 par ingestion :> 2000 mg /kg et par voie cutanée :>2000mg/kg.
- _ Pour l'homme, la dose journalière acceptable (DJA) est de l'ordre de : 0,03 mg/kg /jour ; agit sur la biosynthèse des acides aminés ou des protéines.

Propriétés biologiques :

- _ Le spectre d'action : assez large, il est efficace sur les ascomycètes avec une action Secondaire sur les Oomycètes.
- _ Le mode d'action : agit sur la biosynthèse des acides aminés ou des protéines.

principaux usages :

- _ Arbre fruitiers a pépins : tavelure du pommier et du poirier et l'alternariose : 15a22 ,5g/l.

- _ Arbre fruitiers a noyau : moniliose : 15a 22,5 g/hl.
- _ Vigne et cultures légumière : pourriture grise : 375a 500g/ha.
- _ Blé : oïdium, piétin –verse : 750g/ha.
- _ Orge: oïdium, rhynchosporiose: 600g/ha.

Le fludioxonil :

Cette matière active appartient à la famille des phénylpyrroles. il présente la particularité De ressembler à une substance naturelle : la pyrrolnitrine, synthétisée par les bactéries du sol.

Le produit pur se présente sous forme de cristaux incolores et inodores.

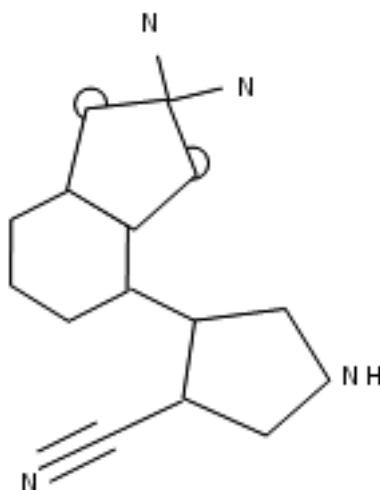
Le fludioxonil agit préventivement par contact et présente des propriétés légèrement pénétrantes.

Propriétés physique :

- _ Solubilité dans l'eau : 1,8mg/l a ph 7 et 25 °c.
- _ Température de fusion : 199,8°C.
- _ Durée de demi-vie :25 jours

Propriétés chimique :

- _ Formule brute : C 6 H12 F2 N2 O2.
- _ Formule semi étalée :
- _ Nom chimique : cyano-3 (difluorométhylénedioxy-2,3 phényle)-4 pyrrole.
- _ Masse molaire : 248,185 g/mol.

**Toxicologie :**

- _ Pour le rat, la DL50 par ingestion :> 2000 mg /kg et par voie cutanée :> 2000mg/kg
- _ Pour l'homme, la dose journalière acceptable (DJA) est de l'ordre de : 0,033mg/kg Par jour ; absence d'irritation oculaire et cutanée.

Propriétés biologiques:

Le spectre d'action : il est efficace contre un grand nombre de champignons

Parasite des plantes cultivées : les ascomycètes ainsi que les basidiomycètes avec une action secondaire sur les Oomycètes.

Le mode d'action : agit sur le métabolisme des glucides et des polyols et sur l'osmorégulation.

Principaux usages :

Fraise, vigne, cultures maraichères et légumineuse : pourriture grise :

0,8 à 1kg/ha.

Laitue : sclérotinoïse : 0,6kg/ha.

Légumineuses : 0,8 à 1 kg/ha.

Arbres fruitier à noyau : moniliose sur fleurs et rameaux : 20 à 30 g/hl.

Annexe 05 : Calcul des concentrations des fongicides pour le test sur la croissance mycélienne de *Botrytis sp* SWITCH : (Cyprodinil 37.5%, fludioxonil 25%)

Dose préconisés en plein champs : 800g/ha soit 800g/1000 m² .

Surface de la boîte de pétri :

Diamètre de la boîte : D=855 mm

D =0.885 m

Surface : $S = \pi D^2 \cdot \frac{1}{4}$

$S = \pi (0.885)^2 \cdot \frac{1}{4}$

$S = 0.00567 \text{ m}^2$

Dose correspondant à la boîte de Pétri (D°) :

800 g _____ 1000m²

X _____ 0.00567m²

X =0.0004537 g/boîte

D°=0.4537 mg/boîte

Annexe 06 : Calcul des concentrations des fongicides pour le test sur la croissance mycélienne de *Botrytis sp* Chorus : (50% cyprodinil)

Dose préconisés en plein champ : 750g/ha soit 750g/1000m²

Dose correspondant a la boite (D°) :

$$\begin{array}{r} 750 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000\text{m}^2 \\ X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 0.00567\text{m}^2 \end{array}$$

$$X=0.000425\text{g/boite} \quad D^\circ=0.425\text{mg/boite}$$

Annexe 07 : Analyses de la variance de la taille des spores des isolats de *Botrytis cinerea*

One-Way ANOVA – analyse de la variance

Analysis Summary

Dependent variable: T.SP

Factor: ISOL

Number of observations: 60

Number of levels: 30

ANOVA Table for T.SP by ISOL

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	343,753	29	11,8535	6,76	0,0000
Within groups	52,6	30	1,75333		
Total (Corr.)	396,353	59			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of T.SP into two components:

a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 6,76058, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean T.SP from one level of ISOL to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Annexe 08 : Analyse de la variance de l'effet des souches de *Trichoderma* T13 et T09 sur la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis sp* en confrontation directe

One-Way ANOVA – analyse de la variance de l'effet directe des souches de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne des souches de *botrytis*
 Analysis Summary
 Dependent variable: DIAM
 Factor: TRAIT

Number of observations: 179
 Number of levels: 90

ANOVA Table for DIAM by TRAIT
 Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	89647,6	89	1007,28	1927,90	0,0000
Within groups	46,5	89	0,522472		
Total (Corr.)	89694,1	178			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of DIAM into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 1927,9, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean DIAM from one level of TRAIT to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Annexe 09 : Analyse de la variance de l'effet des souches de *Trichoderma* T13 et T09 sur la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis sp* en confrontation a distance

One-Way ANOVA – ANALYSE DE LA VARIANCE DE L'EFFET INDIRECTE DES SOUCHES DE TRICHODERMA SUR LA CROISSANCE MYCELIENNE DES SOUCHES DE BOTRYTIS

Analysis Summary

Dependent variable: DIAM

Factor: TRAIT

Number of observations: 180

Number of levels: 90

ANOVA Table for DIAM by TRAIT

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	48321,0	89	542,932	1085,86	0,0000
Within groups	45,0	90	0,5		
Total (Corr.)	48366,0	179			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of DIAM into two

components: a between-group component and a within-group component.

The F-ratio, which in this case equals 1085,86, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean DIAM from one level of TRAIT to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Annexe 10 : Analyse de la variance de la croissance mycélienne des isolats de *Botrytis sp* traités par des différentes doses de deux fongicides

One-Way ANOVA – ANALYSE DE LA VARIANCE DE L'EFFET D'INHIBITION DES FONGICIDES SUR LES SOUCHES DE TRICHODERMA

Analysis Summary

Dependent variable: DIAM

Factor: TRAIT

Number of observations: 66

Number of levels: 33

ANOVA Table for DIAM by TRAIT

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1928,03	32	60,2509	152,94	0,0000
Within groups	13,0	33	0,393939		
Total (Corr.)	1941,03	65			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of DIAM into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 152,945, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean DIAM from one level of TRAIT to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.