

République Algérienne Démocratique et Populaire.
Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique

Université de Jijel
Faculté des sciences
Département de Biochimie- Microbiologie.

MB.03.04
03/09

Mémoire

de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme
des études supérieures (D.E.S) en biologie
Option : Microbiologie.

Thème

*Essai d'isolement et de purification de Botrytis cinerea
et évaluation de l'efficacité de quelques fongicides
sur ce champignon.*

Membres de jury :

- *Président:* M^r BOULDJEDRI MOHAMED.
- *Examinatrice :* M^{lle} KHENNOUF HANANE.
- *Promoteur :* M^r ROUBAH MOUAD

Réalisé par :

- ∞ CHERIET MOUNIR.
- ∞ MESSELOUH FATIMA.
- ∞ ZENTOUT NABIHA.



Promotion : 2003/2004

République Algérienne Démocratique et Populaire.
Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique

Université de Jijel
Faculté des sciences
Département de Biochimie- Microbiologie.

Mémoire

de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme
des études supérieures (D.E.S) en biologie
Option : Microbiologie.

Thème



*Essai d'isolement et de purification de Botrytis cinerea
et évaluation de l'efficacité de quelques fongicides
sur ce champignon.*

Membres de jury :

- *Président:* M^r BOULDJEDRI MOHAMED.
- *Examinatrice :* M^{lle} KHENNOUF HANANE.
- *Promoteur :* M^r ROUIBAH MOUAD

Réalisé par :

- ∞ CHERIET MOUNIR.
- ∞ MESSELOUH FATIMA.
- ∞ ZENTOUT NABIHA.

Promotion : 2003/2004

Sommaire

Introduction :	1
-----------------------------	---

Partie théorique.

Chapitre I : Plantes attaquées par *Botrytis cinerea* et nature des dégâts

1- La fraise :	4
1-1 Conditions de développement :	4
1-2 Nature des dégâts :	4
2- La tomate :	7
2-1 Conditions de développement :	7
2-2 Nature des dégâts :	7
3- La vigne :	9
3-1 Conditions de développement :	9
3-2 Nature des dégâts :	9
4- La courgette :	12

Chapitre II: La pourriture grise

1- Agent causal :	14
1-1 Position systématique :	14
1-2 Caractères morphologiques :	15
1-2-1 Le mycélium :	15
1-2-2 Les conidies :	16
1-2-3 Les sclérotés :	17
1-3 Caractères biologiques :	18
1-3-1 L'épidémiologie :	18
1-3-1-1 La température :	18
1-3-1-2 L'humidité relative:	19
1-3-1-3 Les rayons ultra violet :	20
1-3-1-4 Le vent :	20
1-3-2 Cycle de développement :	20
2- Symptomatologie :	22
3- La lutte contre la pourriture grise :	22
3-1 La lutte culturale :	22
3-2 Emploi de variétés résistantes :	23
3-3 La lutte biologique :	23
3-4 La lutte chimique :	23

Chapitre III: Principales techniques d'isolement et de purification employées en phytopathologie.

1- L'isolement à partir d'une plante :	27
1-1 Technique de désinfection :	27
1-2 Mise sur milieu de culture :	28
2- L'isolement à partir du sol :	28
2-1 Méthode de plantation directe :	29
2-2 Méthodes de dilution :	29
3- Repiquage des souches :	30
4- Techniques d'inoculation :	30
5- Conditions de culture :	30

5- Conditions de culture :	30
----------------------------------	----

Partie pratique

Chapitre I: Matériel et méthodes

I- Matériel et méthodes :	31
1- Description des stations :	31
2- Matériel utilisé sur terrain :	31
3- Matériel utilisé au laboratoire :	32
4- Méthodes employées :	32
4-1 Isolement :	32
4-2 Purification :	33
4-3 Identification :	33
4-4 Test-fongicide :	34

Chapitre II: Résultats et discussion

II- Résultats et discussion :	36
1- Sur terrain :	36
1-1- Résultats :	36
1-2 Discussion :	39
1-3 Conclusion :	41
2- Au laboratoire :	42
2-1 Identification de <i>Botrytis cinerea</i> :	42
2-1-1 Résultats :	42
2-1-2 Discussion :	43
2-1-3 Conclusion :	44
2-2 Test fongicides :	44
2-2-1 Résultats :	44
2-2-2 Discussion :	46
2-2-3 Conclusion :	48

Conclusion générale :	50
-----------------------------	----

Résumé:

Français :	52
Anglais:	53
Arabe :	54

Références bibliographiques.....	55
----------------------------------	----

Liste des tableaux

Tableau n° 1 : les attaques de <i>Botrytis</i> en fonction des pourcentages d'humidité.	19
Tableau n° 2 : Les principaux fongicides employés contre la pourriture grise.	26
Tableau n° 3 : principaux critères de détermination de <i>Botrytis cinerea</i> :	34
Tableau n° 4 : Différents fongicides testés et leurs doses correspondantes.....	34
Tableau n°5 : pourcentage d'infection de la tomate et la fraise dans chaque station.....	36
Tableau n° 6 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la première station : Achouat.....	37
Tableau n°7 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la deuxième station : Kissir	37
Tableau n°8: fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la troisième station : Kaous.....	37
Tableau n°9 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la quatrième station : Tassoust.....	38
Tableau n°10 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la cinquième station : Adouane Ali	38
Tableau n°11 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans toutes les stations	38
Tableau n°12 : caractères morphologiques des colonies d'isolats obtenu à partir de différents agents pathogène	43
Tableau n°13 : les principaux critères utilisés pour l'identification de <i>Botrytis cinerea</i>	44
Tableau n° 14 : Efficacité des fongicides employés sur <i>Botrytis cinerea</i> après 5, 10 et 15 jours d'incubation à 25°c	46

Liste des figures

Figure n°1 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les feuilles de fraise	6
Figure n°2 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de fraise	6
Figure n°3 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les fleurs de fraise	6
Figure n°4 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les feuilles de tomate	8
Figure n° 5 : dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les rameaux de tomate	8
Figure n°6 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les feuilles de la vigne	11
Figure n°7 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les rameaux de la vigne	11
Figure n°8 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de la vigne avant la maturation..	11
Figure n°9 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de la vigne après la maturation ...	11
Figure n°10 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de la courgette (A)	13
Figure n°11 : Dégâts de <i>Botrytis cinerea</i> sur les fruits de la courgette (B)	13
Figure n° 12:mycelium du <i>Botrytis cinerea</i>	16
Figure n° 13 : conidiophore de <i>Botrytis cinerea</i> produisant des conidies	17
Figure n° 14 : les sclérotés de <i>Botrytis cinerea</i>	18
Figure 15 : cycle de développement du <i>Botrytis cinerea</i>	21
Figure n°16 : Taux d'attaque par les maladies rencontrées dans la première station : Achouat	39
Figure n°17 : Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans la deuxième station : Kissir	40
Figure n°18 : Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans la troisième station : Kaous	40
Figure n°19 : Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans la quatrième station : Tassoust	41
Figure n°20: Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans la cinquième station : Adouane Ali.....	41
Figure n°21: Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans l'ensemble des stations.....	42
Figure n° 22 : <i>Botrytis cinerea</i>	45
Figure n° 23 : <i>Botrytis fabae</i>	45

Figure n° 24 : influence du bénomyl sur la croissance de <i>Botrytis conerea</i>	47
Figure n° 25 : influence du rhodiason sur la croissance <i>Botrytis cinerea</i>	47
Figure n° 26 : influence de l'armétii sur la croissance <i>Botrytis cinerea</i>	48
Figure n° 27 : influence du vectra sur <i>Botrytis cinerea</i>	48
Figure n° 28 : influence des différents fongicides utilisés sur la croissance de <i>Botrytis cinerea</i>	49

Introduction

Introduction :

Il était décrit en 1970, un cas de pourriture sur des grappes compactes de vigne et sur d'autres plantes telles que la fraise, la courgette et la tomate. Les fruits ont pris une couleur marron foncée. Les pellicules plus ou moins désagrégées ne forment avec la pulpe et les pépins qu'une masse informe mouillée présentant des filaments qui sont ceux du *Botrytis*, installés sur les fruits dès les premiers dégâts (Gallet, 1977).

La pourriture grise est une des maladies les plus importantes des légumes et fruits. Elle est générée par le champignon pathogène : *Botrytis cinerea*. Son développement rapide, insidieux, engendre chaque année la destruction de centaines d'hectares de cultures viticoles surtout.

Aussi, parmi les principaux facteurs limitants le développement des légumes en Algérie, ceux ayant trait au problème phytosanitaire sont de loin les plus importants. C'est ainsi que ces plantes peuvent être affectées par de nombreuses maladies virales, bactériennes et surtout fongiques dont l'incidence varie largement selon l'époque de la culture, le type et la destination de la production (Hervé, 1994).

Les différentes recherches menées en Algérie durant ces dix dernières années par différents auteurs, ont permis de mettre en évidence sur cette culture l'existence d'un grand nombre de maladies ravageurs, parmi lesquelles la pourriture grise est largement prépondérante avec des actions incidentes très souvent importantes sur les rendements quand les conditions sont favorables. Ainsi, les attaques causées par les champignons ont gagné de l'importance ces dernières années grâce à leur nature souvent épidémique, caractérisée par leur rapidité de dissémination, de contamination ainsi que leur impacte sur les rendements. Elles provoquent des dégâts importants, et la plupart d'entre elles semblent être favorisées par l'humidité ainsi que par une spécificité de la sensibilité de l'hôte.

Par ailleurs, dans la nature, le champignon peut se manifester sous trois formes :

- Une forme mycélienne stérile, qui provoque la « maladie de la toile » bien connue des pépiniéristes car on l'observe dans les chambres chaudes.
- Une forme conidienne appelée : *Botrytis cinerea*, la plus répandue sur les grappes de vigne et même la courgette, les fraises et la tomate.
- Une forme de résistance (sclérote) sur les sarments de la vigne à l'Automne (**Anonyme, 2000**).

La pourriture grise qui nous intéresse dans le cadre de ce travail et dont certains aspects ont été déjà abordés par **Gallet (1980)**, **Masson et al (1949)** ainsi que **Charles et al (1986)**, prend de plus en plus d'ampleur sur le terrain, d'autant plus qu'elle peut être hébergée par de nombreuses plantes hôtes.

Aussi, l'étude que nous nous proposons d'aborder dans le cadre de ce mémoire est une contribution à la connaissance de cette maladie qui entre dans une logique de continuation des travaux déjà réalisés dans ce domaine par nos prédécesseurs d'une part, et d'autre part, elle constitue une modeste contribution à la connaissance de la maladie et notamment son agent pathogène afin de pouvoir lutter efficacement contre ce fléau.

Dans le premier chapitre, nous allons décrire la maladie, son agent pathogène et même les plantes attaquées par ce champignon avec la nature des dégâts chez certaines d'entre elles. On va présenter dans le deuxième chapitre la position systématique, les caractères morphologiques et biologiques ainsi que la lutte contre la pourriture grise.

Enfin on va terminer notre étude théorique avec le troisième chapitre où on va expliquer les principales techniques d'isolement et de purification utilisées en phytopathologie.

Sur le plan pratique, on va essayer dans un premier temps de confirmer les travaux d'identification en utilisant la technique d'isolement et de

purification ainsi que l'observation microscopique. Enfin, une attention particulière sera accordée au test-fongicide afin de retrouver un éventuel produit chimique à même d'éradiquer complètement cette maladie ô combien néfaste pour nos cultures sous serres.

Chapitre

*Plantes attaquées par Botrytis
cinerea
et Nature des dégats.*

I

D'après **Mimaud et al (1969)**, *Botrytis cinerea* est redouté par de nombreuses plantes parmi les quelles on relève : les fraises, la tomate, la vigne, et la courgette.

1- La fraise :

Selon **Boyeldieus (1978)**, c'est une plante vivace ayant 20 cm de hauteur dont les feuilles poussent érigées et recouvertes de poils sur la tige. La lame est divisée en trois sections à bord découpé formant des dents profondes. De la rosette surgissent des tiges érigées avec une ou plusieurs fleurs blanches à l'extrémité. Au centre de chaque fleur, apparaît un groupe de petits grains verts où se formeront les semences. La surface sur laquelle sont localisés, grossit et devient charnue d'un rouge vif parfois légèrement teinté de bleu : c'est ce qu'on connaît sous le nom de fraises. Les petits grains contiennent la semence.

1-1 Conditions de développement :

Les plantes de fraises sont assez résistantes aux hivers rigoureux, bien que les fleurs souffrent du gel. Elles sont exigeantes pour le type du sol et n'aiment pas les excès de chaleur et d'eau. Il leur faut un terrain riche en matière organique bien décomposée et un drainage approprié. Il faut régler l'arrosage pour que la terre ait constamment une certaine humidité. Pour que la récolte soit bonne, la plante a besoin d'une période d'hibernation, où elle passe plusieurs semaines soumises à de basses températures (**Alonso et souza, 1998**).

1-2 Nature des dégâts :

Lorsque les feuilles ou toute partie du fraisier vieillissent, le champignon déjà présent à l'état de spore se développe en se servant des

tissus morts de la plante comme nourriture. Il peut par la suite coloniser les autres parties saines de la plante pour y laisser ses structures reproductrices pour infecter les fruits. Le champignon se nourrit de pétales vieillissantes ou mortes des fleurs du fraisier (**Anonyme, 1992**).

Comme la vigueur des plantes n'est pas en jeu, le seul fait qui menace la production et l'infection des fleurs qui entraîne l'infection des fruits. Une fois les pétales infectés, trois types de dommages peuvent survenir :

- le champignon peut entrer dans la fleur avant même que le fruit ne se développe. Il s'étend alors rapidement à la tige (pédoncule) des fruits ce qui provoque sa désintégration. A moins d'être bien observateur et de passer son temps à regarder sous les feuilles (fig.1), ce type de dommage est difficile à observer la plupart du temps, dans une année très mouilleuse. Les pertes de ce type, c'est-à-dire avant la mise à fruits peuvent faire perdre la moitié de la récolte.

- Le champignon pénètre à l'intérieur du calice et le rend sec, brun et friable (fig.2). Cela peut se produire à n'importe quel moment dans le développement du fruit.

- Le champignon s'étend des pétales morts à la base du calice où il devient passif mais toujours vivant. C'est ce type de dommage qui est le plus important car c'est ainsi que la pourriture grise se retrouve sur les fruits après la récolte (fig.3). Les dommages occasionnés sont donc avant tout la pourriture des fruits plus rapide, comme en témoigne l'apparition d'un duvet gris sur les fruits atteints (**Anonyme, 2002**).



Figure n°1 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur la feuille du fraise.



Figure n°2 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les fruits du fraise.



Figure n°3 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les fleurs du fraise.

2- La tomate :

Selon **Clement (1987)**, la tomate est une plante annuelle de la famille des *Solanacées*, cultivée pour ses fruits que l'on consomme au frais ou en conserves. La tomate est une plante buissonnante ayant une tige le plus souvent retombante nécessitant par conséquent un palissage. Ses feuilles sont odorantes, ses fleurs sont jaunes et groupées en bouquet de trois à huit fleurs, donnant naissance à des fruits verts puis rouges à maturité, charnus, à peau lisse et de formes variables selon les variétés (ronds, ovoïdes ou allongées).

2-1 Conditions de développement :

La croissance et le développement de la tomate sont favorisés si la culture a lieu dans un climat chaud. Le froid et l'humidité excessive ne lui conviennent pas, bien que suivant la variété choisie pour la planter dans le potager, on puisse obtenir des récoltes plus au moins bonnes. Dans les régions froides, l'époque de culture se réduit au Printemps et à l'Eté, hors des risques de gel. Une température moyenne de 18 à 20°C est parfaite. La plante n'est spécialement exigeante pour le sol et les possibilités sont nombreuses à cet égard. Toutefois on peut choisir de planter dans un sol profond bien aéré et riche en matière organique. La fumure de fond joue un rôle essentiel pour la tomate ainsi que l'arrosage qui est l'une des principales exigences pour la culture de la tomate (**Alonso et Souza, 1998**).

2-2 Nature des dégâts :

Les ^{attaques} directes sur feuilles seront surtout observées sous serre, en particulier sur la tomate, chez laquelle elles apparaissent sous forme de grandes taches largement zonées, se prolongeant le long des nervures avec une bordure livide (fig. 4) (**Charles et al, 1986**).

Les attaques sur tiges pourront aller de petits chancres latéraux à une nécrose les ceinturant complètement (fig. 5).

Les fruits pourront être atteints à partir des sépales ou de blessures diverses et dans ce dernier cas, il nè s'agit que de taches fantômes.



Figure n°4 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les feuilles de tomate
(Gallet, 1980)



Figure n° 5 : dégâts de *Botrytis cinerea* sur les rameaux de tomate
(Gallet, 1980)

3- La vigne :

3-1 Conditions de développement :

La germination des conidies est réalisée en présence d'eau de pluie, de rosée, de brouillard ou de jus de raisin avec une rapidité maximale à la température de 25°C. Une contamination est réalisée par humectation des organes contaminables pendant 15 heures à 15°C. Ce sont les faibles teneurs en sucre, les taux d'azote élevés dans les baies ainsi que les conditions climatiques qui favorisent sur les grains non blessés, l'évolution de la pourriture noble en pourriture grise. Les pluies orageuses, sans abaissement très sensible de la température, sont favorables à l'extension du parasite à partir de foyers. Les abaissements de température stoppent l'évolution du champignon (Arland et al, 1998).

Les sols des plaines, profond et humides, portant des vignes puissantes ainsi que les terrains argileux, peu perméable, sont plus favorables au développement de la maladie. La présence d'une masse importante d'herbe au sol entretient un état hygrométrique élevé.

Dans les parcelles traitées avec certains fongicides organiques sans cuivre en particulier le manèbe, on enregistre plus de pourriture que dans les parcelles traitées avec des sels de cuivre ou des fongicides organocupriques (Arland et al, 1998).

3-2 Nature des dégâts :

Le parasite peut se développer très tôt, au Printemps, en particulier à partir du mois de mai où il forme parfois, quand l'atmosphère est très humide, de larges taches caractéristiques sur les feuilles tendres (fig. 6). Plus tard, un certain nombre de feuilles placées à l'intérieur de la végétation entassée de souches touffues, et aussi privées de lumière, se décolorent, se dessèchent puis pourrissent par temps humide. On Automne, par suite de l'état

hygrométrique élevé à l'arrière saison dans les régions humides, les altérations du limbe (par les cicadelles, les brûlures...etc.) sont envahies fréquemment par la pourriture. Les rameaux, plus durs, sont plus rarement attaqués en Eté, mais ils sont envahis par la pourriture à l'arrière saison s'ils sont mal aoûtés (fig. 7).

Sur les grappes moins riches en sucre, la pourriture noble peut évoluer par temps chaud et humide en pourriture grise. Celle-ci a provoqué une altération profonde des baies (fig.8 et 9). *Botrytis* est alors souvent accompagné par d'autres champignons (*Aspergillus*, *Mucor*,...etc.). Le pédoncule des grappes et les rafles peuvent être atteints au cours de l'Eté et de l'Automne, mais aussi à la suite d'un flétrissement physiologique qui peut avoir un dessèchement et un échauffement excessif des tissus de la rafle provoquant ainsi des nécroses (Brygoo et al, 1998).



Figure n°6 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les feuilles de la vigne (Gallet, 1980).

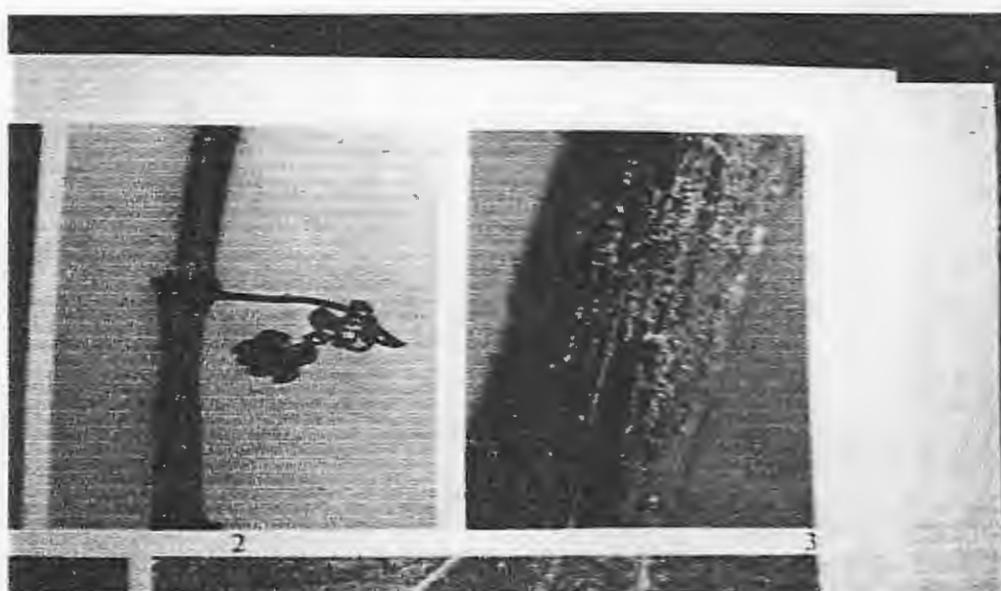


Figure n°7 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les rameaux de la vigne (Gallet, 1980).

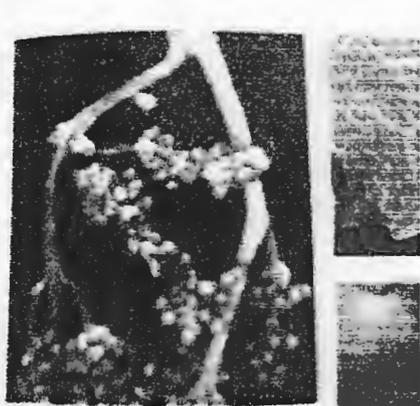


Figure n°8 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les fruits de la vigne avant la maturation (Gallet, 1980).



Figure n°9 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les fruits de la vigne après la maturation (Gallet, 1980).

4- La courgette :

Botrytis peut provoquer des taches foliaires d'extension rapide, devenant grisées et sèches, sur lesquelles les conidiophores sont visibles. Il envahit facilement moignons de pétioles ou pédoncules de fruits et la tige à partir de ces « bases nutritives ».

Les lésions sur tiges s'agrandissent et s'approfondissent rapidement, conduisant à la mort des plantes. Les fruits peuvent être envahis à partir de la récolte jouant le rôle de « bases nutritives ». La pourriture grise de l'extrémité du fruit s'accompagne d'exudation et de gouttelettes transparentes (fig.10 et 11) (Charles et al, 1986).



Figure n°10 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les fruits de la courgette (A) (Gallet, 1980).



Figure n°11 : Dégâts de *Botrytis cinerea* sur les fruits de la courgette (B) (Gallet, 1980).

Chapitre

La pourriture grise.

III

C'est une maladie assez fréquente sous nos serres, aussi bien sur la tomate que sur la courgette ou les fraises.

1- Agent causal :

Botrytis cinerea est le plus connu d'une longue série de pourritures sèches ou humides, nécroses ou flétrissement qui peuvent attaquer nos végétaux.

D'après Gayan (1971), il semble que les attaques de pourriture grise soient plus importantes qu'autrefois. Par ailleurs, se fait n'est pas certain et les raisons invoquées pour expliquer cette recrudescence de la maladie sont assez variées.

1-1 Position systématique :

D'après Gallet (1977), le champignon responsable de la maladie appartient à la classe des *Ascomycètes*, à la sous classe des *Discomycètes* (champignons caractérisés par l'hyménium largement ouvert a maturité) et à l'ordre des *Pézizales* (ayant des apothécies en forme d'entonnoir et plus en moins longuement pédicellés). En trouve dans cet ordre la famille des *Hélotiacés* qui comprend le genre *Sclerotinia* ayant un mycélium de gros diamètre et nettement cloisonné.

Depuis les travaux de Bywetz en (1943-1945), *Sclerotinia* est le seul genre qui apparaît sous la forme parfaite de cette famille parce que *Botrytinia* possède un stade conidien. D'après Bourgin (1949) in Gallet (1977), la forme conidienne est mondialement connue sous le nom de *Botrytis cinerea*.

Ce dernier est sujet à des variations morphologiques, physiologiques ou anatomiques et a un cycle végétatif assez compliqué donnant lieu à des phénomènes d'hétérocaryoses.

Une conidie de type polynuclée, donc hétéro génétique peu donner trois types de spores, deux homotypes par suite d'une nouvelle division anormale et un troisième hétérotype semblable à la conidie mère (Mimaud et al, 1969).

1-2 Caractères morphologiques :

Botrytis cinerea est un champignon parasite ou saprophyte car il utilise les débris organiques comme base nutritive pour contaminer les tissus sains .le champignon est constitué de trois types d'organes :

Le mycélium, le sclérote et la conidie.

1-2-1 Le mycélium :

Viennot et Bourgin (1949) in Boyeldieus (1978), considèrent que normalement le mycélium de ce champignon (Fig.12) comprend des filaments articulés, brunâtres ou olivâtres, cylindriques quelques fois vésiculeux au niveau de la cloison médiane dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes

Lorsque le mycélium est au stade fructigène, il produit des touffes de conidiophores grisâtres. Parfois ce mode de multiplication peu disparaître et laisser place à une prolifération mycélienne blanchâtre qui correspond à l'élongation d'hyphes grêles, hyalines qui se répandent sous forme de « toile ». Cette toile est la maladie tellement redoutée par l'agriculteur.

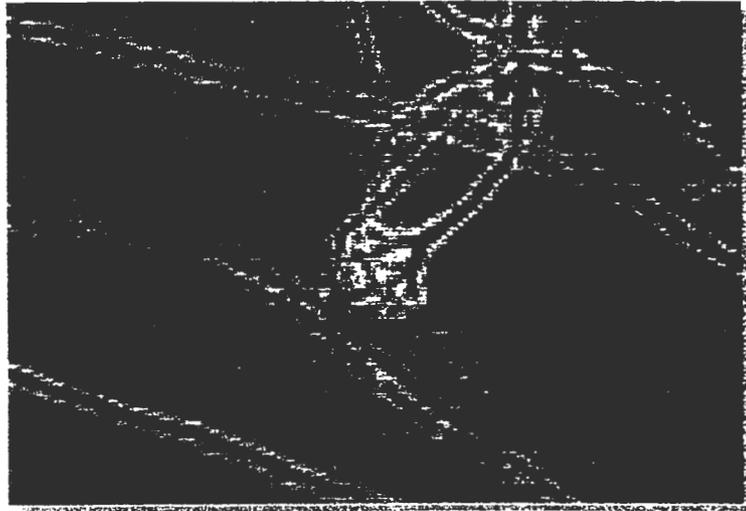


Figure n° 12: mycélium du *Botrytis cinerea*. $G_1 : 40 \times 100$
[Anonyme 2002]

1-2-2 Les conidies :

D'après Viennot et Bourgin (1949) in Boyeldieus (1978), *Botrytis cinerea* se développe sous la forme conidienne (fig.13) sur deux très nombreux végétaux.

Le développement se manifeste par la production de conidiophores dressés en touffes souvent étendues constituant un revêtement gris et un feutrage intense. Les conidiophores émettent également des prolongements latéraux disposés en croix ou de façon oblique et se terminant soit en pointe, soit souvent en une masse courte et peu colorée qui supporte les stérigmates (Anonyme, 2002).



Figure n° 13 : conidiophore de *Botrytis cinerea* produisant des conidies $\times 400$ [Anonyme 2002]

1-2-3 les sclérotés :

Les sclérotés sont des formes de résistance qui jouent un rôle important dans la survie du champignon. Ils sont composés de deux parties différentes : le cortex et la médula.

Les sclérotés sont toujours petits, arrondis ou de formes ovales (fig 14) aplatis à la surface de l'organe qui les porte, ils mesurent de 2 à 4 mm de longueur et 1 à 3 mm de largeur. D'abord blancs, ils brunissent puis noircissent par la suite. Leur surface est très brillante et marquée de fines ponctuations régulières (Anonyme, 2001).

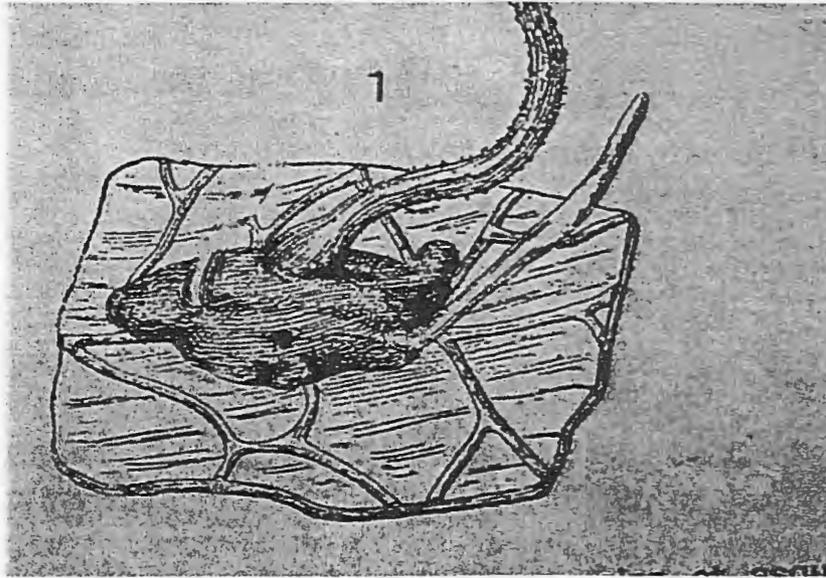


Figure n° 14 : les sclérotés de *Botrytis cinerea*. G : 40X100
[Anonyme 2002]

1-3 Caractères biologiques :

En plus des facteurs propres aux conditions de culture susceptibles de favoriser le développement du parasite, certaines conditions d'environnement sont déterminantes pour l'expression et l'extension de la maladie.

1-3-1 L'épidémiologie :

Selon Mimaud (1969), la pourriture grise est favorisée par l'humidité dans les serres où on l'observe plus fréquemment sur les plantes recevant des gouttes d'eau de condensation.

La pourriture grise est favorisée aussi par d'autres conditions telles que la nature du sol, les rayons ultra violet, la température et le vent.

1-3-1-1 la température :

D'après Gallet (1977), la germination des spores de *Botrytis* peut se produire dans une amplitude thermique assez large (entre 1 et 40°C).

Il nous faut plus de 40 heures pour atteindre 100% de germination. L'optimum se situe entre 18 et 19°C avec 20 heures seulement pour avoir la totalité des spores germées.

Au delà, la vitesse de germination diminue : 28 heures à 20°C et 45 heures à 25 °c. Les spores sont tuées à ~~45~~ 45 °c au bout de 48 heures (Boyedieu, 1978).

1-3-1-2 l'humidité relative :

Gayon et al (1971), a décrit que l'humidité relative est le facteur essentiel pour le développement de la pourriture grise car dans l'air sec, les spores de *Botrytis* perdent rapidement leur faculté germinative.

Par conséquent, tous les facteurs qui contribuent à maintenir de l'humidité au sein de la végétation des plantes seront favorable au développement du champignon ; La proximité de la mer, des fleuves , des rivières, des lacs, des eaux stagnantes en flaques, la situation topographique et les sols peu perméables . En plus, les gouttes d'eau permettront à l'humidité relative de se maintenir pendant un temps suffisamment long.

Le tableau n°1 suivant indique les pourcentages de concentrations sur les baies de vigne enfin de véraison, en fonction de l'humidité.

Tableau n° 1 : les attaques de *Botrytis* en fonction des pourcentages d'humidité.

Humidité %	Attaques %
100	41.6
80	16.5
60	6.5

D'après Killer (1969) in Gayon (1971)

1-3-1-3 Les rayons ultra-violet :

Les rayons UV exercent une influence aussi importante que les rayons Infra- rouge. D'après **Fermaud (1991)**, le développement du *Botrytis* sera favorisé par les rayons ultra-violet proches de 3000 à 4000 A° et inhibé par les rayons ultra-violet situés entre 2000 et 3000 A°.

1-3-1-4 Le vent :

Le vent favorise la dissémination des conidies de *Botrytis*. Il facilite par conséquent la contamination des plantes saines (**Moras et al, 1989**).

1-3-2 Cycle de développement :

Comme tout être vivant, le champignon naît, se développe et se reproduit (**Anonyme ,2002**).

La conidie (ou spore) est le point de départ de ce cycle (fig. 15). C'est une cellule unique multi-nuclée différenciée (qui atteint son stade final de développement) et en dormance (qui maintient un niveau de métabolisme limité à sa survie). Sa viabilité est d'autant plus longue que la température et l'hygrométrie sont basses. Dans de bonnes conditions d'humidité et de température, son métabolisme active et se différencie ; c'est à dire que sa dormance est élevée et que le processus de division cellulaire sont actifs.

Elle va produire une première cellule fille. A son tour, le tube germinatif va se diviser et former un filament multi cellulaire. L'hyphe de pénétration va former des hyphes latéraux qui vont s'entrecroiser en un réseau de plus en plus important de mycélium. Des facteurs principalement nutritionnels et climatiques vont progressivement arrêter la croissance hyphale et induire ainsi la formation d'organes

de pénétration va former des hyphes latéraux qui vont s'entrecroiser en un réseau de plus en plus important de mycélium.

Des facteurs, principalement nutritionnels et climatiques vont progressivement arrêter la croissance hyphale et induire ainsi la formation d'organes reproducteurs.

Les conidiophores, sur lesquels un grand nombre de conidies va apparaître ce mycélium, donnent également naissance à des amas mycéliens très denses.

Les sclérotés donnent naissance au printemps à de nombreux conidiophores produisant des conidies.

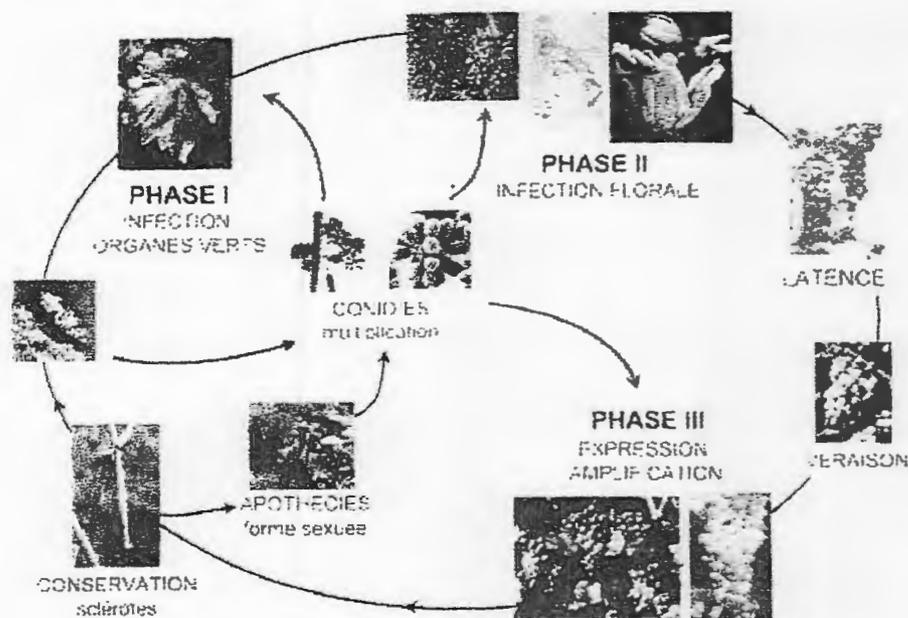
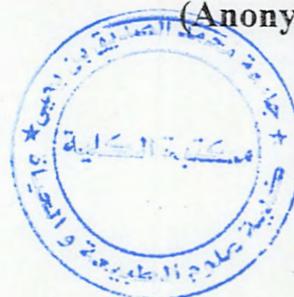


Figure 15 : cycle de développement du *Botrytis cinerea*

(Anonyme 2001).



2- Symptomatologie :

La pourriture grise débute par des nécroses brunes sur les feuilles qui se développent de façon concentrique autour de la tache originale. Les nécroses peuvent apparaître au centre du limbe après un choc ou à la périphérie en cas de dessèchement.

Si l'attaque se prolonge, un feutrage grisâtre apparaît donnant aux organes atteints l'aspect de poussière grise. Au moindre contact, un nuage se soulève emporté par le plus léger souffle de vent. A ce moment là, la maladie est en train de se transmettre aux plantes voisines sur les boutures florales et les fleurs. Après la naissance d'une petite tache brune sur un ou plusieurs pétales, le champignon provoque la chute des fleurs en quelques jours. Ce champignon peut attaquer tous les organes des plantes hôtes, mais surtout les grappes et les fruits à l'approche de la maturité.

3- La lutte contre la pourriture grise :

La lutte contre les parasites des plantes cultivées surtout contre *Botrytis cinerea* est basée sur le respect de quelques règles du jeu, comme l'empêchement de la conservation des agents pathogènes, l'empêchement du transport des germes infectieux et l'emploi de variétés résistantes ou tolérantes (Anonyme, 1986).

3-1 La lutte culturale :

En ce qui concerne la lutte culturale, nous pouvons envisager certaines techniques culturales appropriées comme :

- Un désherbage correct permettant d'éliminer l'humidité entretenue par les mauvaises herbes ainsi que celles qui présentent une source d'inoculum.

- L'utilisation des semences saines provenant de plantes saines et recommandées.
- L'enfouissement profond et incinération des résidus de récolte.

3-2 Emploi de variétés résistantes :

D'après Gridley (1985), L'autre méthode de lutte envisagée est celle dite génétique. Les niveaux de rendements et leur stabilité sont régulièrement affectés par un complexe de maladies. La sélection des génotypes pour leur potentiel productif élevé n'est pas suffisante, s'il ne possède pas une résistance adéquate contre certaines maladies. De ce fait, il est nécessaire de développer des méthodes pour introduire du matériel génétique afin d'améliorer la résistance.

3-3 La lutte biologique :

La lutte biologique reste possible, mais elle est encore à l'échelle expérimentale. D'après des essais menés, par Hanounik (1988), utilisant 2 champignons antagonistes et pathogènes à *Botrytis cinerea* et qui sont *Penicillium citrinum* et *p.cyclopium*, il s'est avéré que ces deux champignons agissent sur *Botrytis cinerea* en réduisant le nombre de lésions causées par ce dernier sur les différentes plantes. Ce phénomène est dû apparemment à leur effet inhibiteur sur la germination des conidies de *Botrytis cinerea*.

3-4 La lutte chimique :

D'après Hanounik (1981), la méthode de lutte la plus couramment utilisée reste la lutte chimique.

Sans être totalement efficace, en cas d'attaque grave, elle permet cependant de protéger partiellement les cultures. Une parcelle traitée

chimiquement contre la maladie de la pourriture grise voit son rendement augmenter de 70% par rapport au témoin non traité.

La méthode de lutte chimique est basée essentiellement sur les fongicides. Ils représentent l'ensemble des substances actives contre les champignons.

Certains auteurs classent également dans cette catégorie les produits ayant une action contre les bactéries, virus ou mycoplasmes. C'est le groupe de pesticides le plus utilisé de part le monde. Ils constituent moins de 90 % des pesticides utilisés aux USA de même, ils représentent un marché très important dans les pays de la communauté européenne.

D'après **Adrian et al (1996)**, le désherbage et la lutte contre les ravageurs animaux sont rentrés dans les mœurs depuis longtemps sur de nombreuses cultures. Il faut attendre le début des années 70 pour observer le début du développement de ce type de produit sur les céréales. Synonyme d'intensification sur cette culture, l'utilisation de ces pesticides risque cependant de se réduire avec la diminution du prix payé au producteur.

Beaucoup moins toxique pour l'utilisateur ou l'environnement, la plupart ont des doses létales (DL 50) très élevés. Plusieurs types de traitements peuvent être distingués selon le positionnement du produit. S'il est placé avant la germination du champignon on parle de traitement préventif s'il survient par contre après l'apparition des symptômes, il s'agit alors d'un traitement éradiquant ou encore curatif après le développement du champignon dans la plante. Selon **Gayon (1971)**, la lutte curative n'est pas appliquée car on ne connaît actuellement aucun produit chimique susceptible d'éradiquer complètement la maladie comme pour les autres pesticides. On parle de produits systémiques si le

produits systémiques si le fongicide pénètre dans la plante et agit après transport par la sève. A l'opposé, s'il pénètre à l'intérieur de la plante sans transport ultérieur, il s'agit alors de fongicide pénétrant. S'il ne peut pas franchir la barrière de la cuticule, restant à la surface du végétale, se sont alors des fongicides de contact.

Divers classements des matières actives sont possibles. On peut les classer soit par maladie (anti-pourriture, anti-oïdium), Soit par famille chimique (carbamates, triazoles) (tab. 2), soit par activité biologique vis-à-vis du stade de développement du champignon (préventif, curatif). Enfin, selon le mode d'action biochimique ; c'est à dire la façon dont le fongicide perturbe le fonctionnement des cellules du champignon (Gayon, 1978).

Pour croître et se développer, un champignon a besoin de réaliser un certain nombre de fonctions, en particulier, il doit produire de l'énergie (la fonction de respiration fournit des molécules riches en énergie), avoir les échanges avec l'extérieur (le phénomène de perméabilité contrôle l'entrée et la sortie de l'eau et des substances nutritives à travers les membranes cellulaires).

Le champignon doit pouvoir se diviser (mitose et méiose) permettant ainsi la croissance et la reproduction de l'organisme. Il doit également produire certaines molécules indispensables à sa survie.

Tableau n° 2 : Les principaux fongicides employés contre la pourriture grise.

Famille chimique	Matière active	Nom commercial	Résistance	Stade d'application possible
Dithiocarbamate	Thirame	Rhodiason M	non	A et B
Sulfamide	Dichlofluanide	Euparen 50	non	A et B
Phénylcarbamate+ Benzimidazole	Diéthofencarbe+ Carbendazime	Occidor 50 Sc	oui	A
Imides cycliques	Iprodione ou Procymidone ou Vinchloziline	Sumixlex 50 WP	oui	B, C et D
Anilino-pyrimidine	pyrimétanil	Pyrus 400 SC	non	A, B ou C
Phénylpyrrol	Fludioxonil	Celest 100 FS	non	A et B
Anilino- Pyrimidine+phénylperrol	Cyprodinil+ Fludioxonil	Switch	non	A et B

(Anonyme, 2002)

A- stade de chute des capuchons floraux, fin florissant

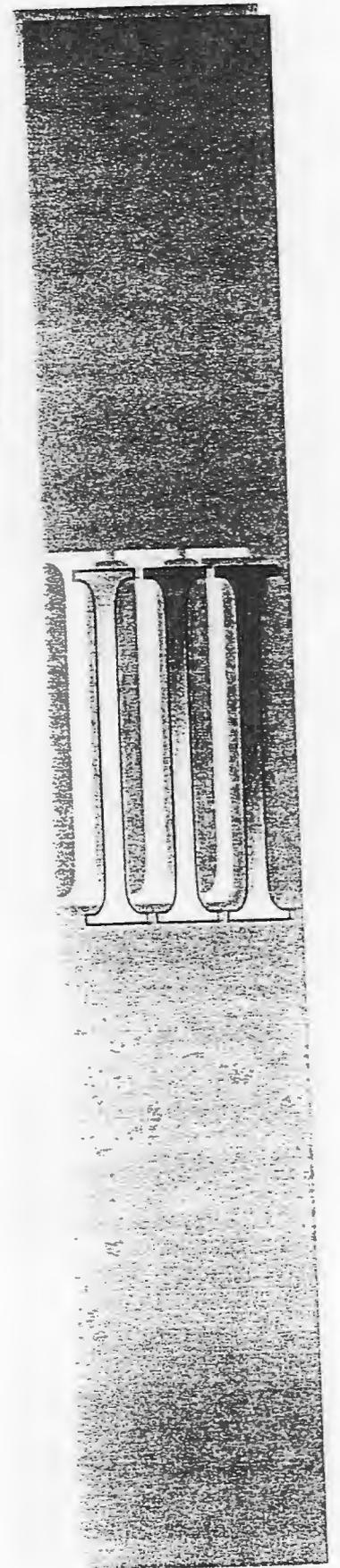
B- fermeture de la grappe

C- véraison

D- 3 à 4 semaines avant la date des vendanges.

Chapitre

*Principales techniques
d'isolement et de purification
employées
en phytopathologie.*



Les zones altérées des organes attaquées contiennent non seulement l'agent parasite primaire, mais également des saprophytes qui peuvent compliquer l'isolement du parasite en cause et donc le diagnostic. On distingue deux types d'isolement : à partir d'une plante et à partir du sol.

1- L'isolement à partir d'une plante :

Selon **Hanounik (1986)**, les isolements sont effectués à partir d'échantillons de feuilles, de tiges, de racines et de fruit, sur un milieu gélosé. Selon la technique classique, des fragments d'organes de 0.5 à 1 cm sont prélevés à l'aide d'un scalpel préalablement flambé puis plongé dans une solution alcoolique. Ces fragments sont ensuite stérilisés pendant 5 minutes à l'hypochlorite de sodium, titrant 2 %, rincés à l'eau distillée puis séchés sur du papier buvard stérile, et sont ensuite déposés dans des boîtes de Petrie contenant un milieu gélosé.

L'incubation est faite dans une étuve à la température de 23°C et sous une lumière blanche continue pendant 7 jours. Les cultures sont ensuite examinées régulièrement.

1-1 Technique de désinfection :

D'après **Fermaud (1991)**, après la mort des tissus colonisés par les pathogènes, de nombreuses autres micro-organismes parfois non pathogènes viennent envahir les tissus. Il importe donc de faire une distinction entre les deux types de micro-organismes. Les isolements ne doivent pas se faire sur des tissus morts. On prélève donc les zones marginales de l'infection. Pour cela, de nombreuses solutions désinfectantes peuvent être utilisées. Nous pouvons citer entre autre l'alcool à 70% d'éthanol, le chlorure de mercure ($MgCl_2$) à 1%, l'hypochlorite de sodium ($NaCl$) à 10 % et enfin le nitrate

d'argent (AgNO_3) à 4% considéré comme le désinfectant le plus employé avec 3 temps de stérilisation en l'occurrence 10, 15, et 20s.

Quelques fragments de végétaux infectés sont prélevés avec soin et placés dans des boites de Petrie. Ceux-ci sont plongés dans un bûcher contenant de l' AgNO_3 à 4 %.

Les fragments sont par la suite rincés successivement dans 3 verres à montre contenant de l'eau distillée stérile afin d'enlever le désinfectant, car si ce dernier se trouve en excès, il peut diffuser ultérieurement dans le milieu de culture et empêcher par la suite la croissance du pathogène.

1-2 Mise sur milieu de culture :

Selon **Louahem (2002)**, à l'aide d'une pincette et d'un bistouri stérilisé, le fragment du végétal, préalablement désinfecté et rincé à l'eau stérile, est sectionné en plusieurs rondelles (3 à 4 cm). Ces dernières sont placées directement sur milieu de culture. La boite sera ensuite sellée pour empêcher la dessiccation trop rapide et la pénétration d'autre micro-organismes (champignon saprophyte, acariens, bactéries,...), qui saliraient la culture. Sur le bord de chaque boite, on note le numéro de la station, le type du fragment et la date de prospection. Enfin les boites sont placées dans la chambre de culture en incubation.

2- l'isolement à partir du sol :

Selon **Daniel (1984) in Djamel eddine et al (1992)**, il y a différentes méthodes qui sont suivies pour l'isolement du pathogène à partir du sol. Nous pouvons citer entre autre la méthode de plantation directe et la méthode de dilution :

2-1 méthode de plantation directe :

Selon **Daniel (1984) in Djamel Eddine et al (1992)** et **Anonyme (1996)**, on coule le milieu de culture dans des boîtes de Petrie stérilisées au préalable. On dépose sur le milieu de culture certaines quantités de sol supposé être contaminé et ce à l'aide d'une cuillère ou pincette stérilisée en immergeant celle-ci dans l'alcool et l'exposer au feu.

Par la suite, il faut incuber les boîtes et les observer par intervalle de temps. Après le développement des colonies, on purifie les boîtes afin d'obtenir des colonies pures et homogènes. Après quoi, on prélève un explantât qu'on dépose entre lame et lamelle puis on passe à l'observation microscopique. Dans le but d'identifier les champignons responsables des maladies, il est préférable parfois d'utiliser des milieux de culture non nutritives comme le « Water agar » et ce pour réduire les quantités d'hyphes qui se multiplient plus rapidement sur les milieux nutritives comme le milieu PDA pour faciliter le transfert des colonies individuellement.

2-2 Méthodes de dilution :

Selon **Daniel (1984) in Djamel eddine et al (1992)**, le sol supposé être contaminé est mélangé avec de l'eau distillée puis laissé jusqu'à sédimentation. Un volume de sol est mélangé avec 9 volumes d'eau distillée stérile pour conduire à une dilution de 1/10, et après cela plusieurs dilutions doivent être effectuées et de petits volumes de chaque dilution s'ajoute à une boîte de Petrie stérilisée. On ajoute dans les boîtes le milieu d'agar fusionné et refroidi à environ 37°C. Enfin, après un ou deux jours d'incubation, les colonies sont sélectionnées individuellement.

3- repiquage des souches :

D'après **Anonyme (1997)**, le repiquage des souches se fait soit à partir de la culture où il faut d'abord manipuler sous une hotte stérile ou près d'une flamme puis prélever en fond de croissance active de la colonie, soit à partir des isolements. Dans ce cas là, on effectue l'observation régulière du développement puis on passe au repiquage des colonies avant qu'elles ne se rejoignent et il faut que le prélèvement ne soit pas à proximité du fragment végétal.

4- techniques d'inoculation :

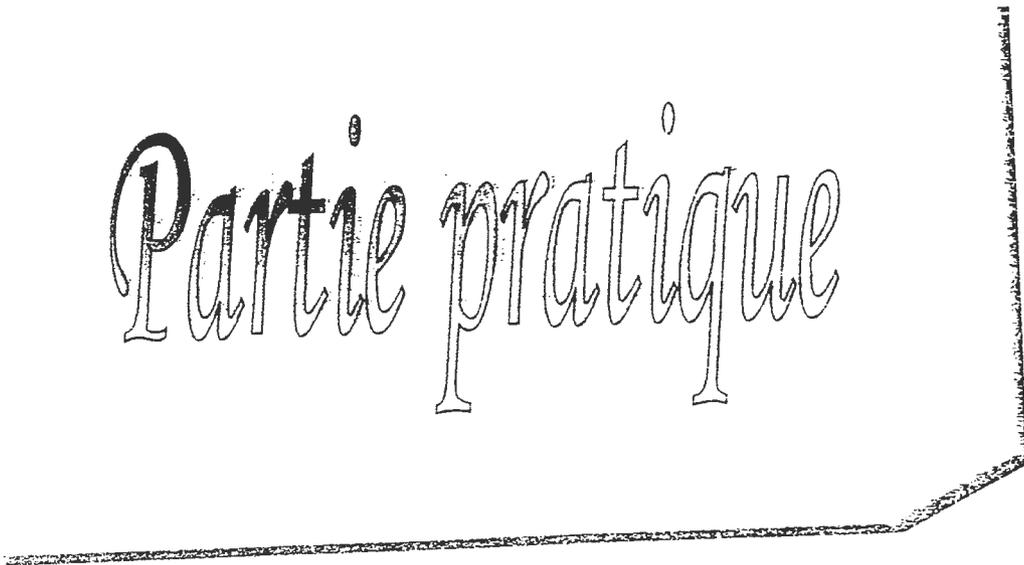
D'après **Anonyme (1997)**, on fait le choix des cultures selon leurs âges (qui doit être de 10 à 14 jours). Le grattage de la colonie se fait dans une eau stérile puis à l'aide d'un hématimètre (cellule de malassez) on détermine la concentration exacte. En effectuant cette opération, il faut que l'ajustement corresponde à la concentration voulue.

Le volume pulvérisé doit être constant d'une répétition à l'autre en prenant soin de maintenir les conditions d'humidité pendant l'incubation.

5- conditions de culture :

Selon **Anonyme (1994)**, la culture exige comme conditions : la lumière qui est un facteur important pour la pigmentation et la sporulation, la température (20- 23°C) en évitant celles qui sont trop élevées car celles-ci défavorisent et empêchent une bonne croissance du champignon, l'oxygénation du milieu (les champignons doivent respirer), la propreté de l'environnement pendant la manipulation (poussière, passage d'un courant d'air).

Partie pratique



Chapitre

Matériel et méthodes.

I

I- Matériel et méthodes :

Dans le but de réaliser notre étude sur la technique d'isolement et de purification de *Botrytis cinerea*, nous avons effectué des sorties au niveau de certaines fermes de la wilaya de Jijel où malheureusement la lutte chimique était déjà appliquée.

1- Description des stations :

La première station visitée est une ferme privée des frères Derradji, située à Achouat (Est de la wilaya de Jijel). Les principales variétés de plantes cultivées sont la tomate (17 serres) et les fraises (50 mini serres).

La deuxième station visitée est représentée par la ferme Boukelia, localisée à Tassoust (7 km à l'Est de Jijel). Cette ferme contient seulement une seule serre de tomate.

Pour la troisième station, il s'agit de la ferme Pilote Adouane Ali composée entre autre de 19 serres de tomate et 15 serres de fraise.

La quatrième station visitée est une ferme privée appartenant aux frères Boutaleb. Elle est située à Kaous (8 km au Sud-Est de Jijel), cette ferme renferme 10 serres de tomate.

Enfin la cinquième et dernière station est une exploitation agricole individuelle EAI située à Kissir (8 km à l'Ouest de Jijel). Elle renferme 5 serres de tomate et 3 grandes serres de fraise.

Le prélèvement des échantillons a été effectué en fin d'avril jusqu'à la fin de mai.

2- Matériel utilisé sur terrain :

Le matériel ayant servi à la recherche des plantes infectées par la pourriture grise consiste en un véhicule pour le transport, un appareil pour les prises des photos, des sachets en papier pour ramasser les échantillons et un bloc note pour prendre quelques informations.

3- Matériel utilisé au laboratoire :

Pour réaliser notre étude, nous avons besoin d'un matériel composé de la verrerie : verre à montre, bêcher, flacon, et des tubes à essai pour la conservation des champignons.

L'autre matériel est formé d'un bec **Bunsen** pour la stérilisation, un scalpel pour découper les rondelles, des pinces stériles, une anse de platine, des boîtes de Petrie en plastique pour les milieux de culture et du papier stérile pour le dessèchement des fragments.

Comme réactifs, nous avons besoin d'eau de javel, de l'alcool à différentes concentrations pour la désinfection, de l'eau de robinet et de l'eau distillée stérile, sans oublier les différents fongicides achetés chez des particuliers. Enfin le gros matériel est composé d'un microscope électrique pour l'identification des champignons et d'une étuve pour l'incubation des colonies.

4- Méthodes employées :

Les expériences in vitro ont été réalisées dans le laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel.

4-1 Isolement :

Toutes les étapes constituant l'isolement doivent s'effectuer dans des conditions aseptiques. La verrerie utilisée a été préalablement stérilisée à la chaleur humide de l'autoclave (120°C pendant 20 minutes) ou simplement par la chaleur d'un four Pasteur (étuve) à 180°C pendant 2 heures.

Le matériel utilisé (scalpel, pincette,...etc) doit toujours être stérilisé à l'alcool (90°) et au feu (bec **Bunsen**) ; on ne doit faire sortir les boîtes de Petrie de leur emballage qu'au moment de leur utilisation. La réussite des opérations dépend de la quantité des soins apportés lors de leur réalisation.

Sur le plan pratique, les techniques utilisées sont celles décrites par **Jimenez et Trapero (1985) in Rouibah (1989)**.

L'isolement consiste à découper en rondelles de 3 à 4 mm de longueur des fragments à partir des feuilles et des fruits. Ces fragments sont d'abord lavés à l'eau de robinet pour les débarrasser de la terre puis désinfectés à l'hypochlorite de sodium pendant 2 minutes. Ils sont d'abord lavés à l'eau distillée stérile pendant 10 minutes puis desséchés avec du papier stérile, et sont par la suite déposés aseptiquement sur le milieu saboureux puis répartie entre les boîtes de Petrie stériles et ce à raison de trois fragments par boîte.

L'incubation s'effectue dans une étuve à 23- 25°C pendant 2- 3 jours puis à la lumière blanche (lampe à néon) à la température ambiante pendant 15 jours pour activer la sporulation.

4-2 Purification :

Les isolats obtenus sont purifiés et conservés. Dans ce cas là, nous devrions normalement utiliser les tubes à essai pour limiter les chances de contamination. Faute de quoi, nous avons conservé nos isolats dans des boîtes de Pétrie. La lecture des résultats s'effectue 5,10 et 15 jours après l'ensemencement.

4-3 Identification :

Pour identifier l'agent responsable de la maladie cryptogamique nous avons effectué une observation microscopique et ce en se basant sur la clé de détermination de **Rieuf (1993)**.

Les principaux critères de détermination retenus dans notre étude sont l'aspect de la culture, sa couleur, sa densité, le diamètre des colonies, le conidiophore, les conidies et enfin la forme de résistance (sclérote).

Le tableau n° 3 suivant résume les principaux critères de détermination de *Botrytis cinerae*.

Tableau n° 3 : principaux critères de détermination de *Botrytis cinerea* :

Champignon	Couleur	mycélium	Forme et aspect des conidies	Conidiophores
B. cinerea	Blanche	Mycélium dense aérien et envahissant	grain de blé disposé en petit chaînes dispersées	Septé
B. fabae	Grise	Mycélium dense et couvrant la boîte	arrondie	Septé

D'après (Louahem 2002).

4-4 Test-fongicide :

Pour les besoins de cette étude, nous avons préparé 4 flacons contenant chacun 100 ml de gélose (milieu saboureaud) et une certaine quantité de fongicide et ce en respectant la dose de chacun d'eux comme le montre le tableau n° 4 suivant, sans oublier de laisser un flacon comme témoin.

Tableau n° 4 : Différents fongicides testés et leurs doses correspondantes.

Nom du fongicide	Dose (g/ 100 ml)
Rhodiason	0.3
Armétil	0.25
Bénomyl	0.1
Vectra	0.05

Les flacons seront par la suite ramenés à l'autoclave pendant une demi-journée après quoi, la gélose sera répartie entre les boîtes de Petrie à raison de trois boîtes par flacon.

A la fin, chaque boîte seraensemencée par les différents isolats du champignon, en prenant soin de noter sur le bord de chacune d'elles, le nom du fongicide ainsi que la date d'ensemencement.

Chapitre

Résultats et discussion.



III

II- Résultats et discussion :

1- Sur terrain :

1-1- Résultats :

D'après l'enquête menée sur le terrain, nous avons pu calculé pour chaque station visitée le pourcentage d'infection par la pourriture grise maladie facilement reconnue par ces symptômes grâce à l'expérience de l'agriculteur. Les résultats sont mentionnés dans le tableau n° 5 suivant :

Tableau n°5 : pourcentage d'infection de la tomate et la fraise dans chaque station.

station	Plantes cultivées	Nombre total de serres prospectées	Fréquence des plantes infectées (en%) (1)	symptômes
Achouat	tomate	17	50,8	Feutrage gris sur feuilles et taches fantômes
	fraise	50	43	Mousse grise sur fruits
Adouane Ali	tomate	19	48	Feutrage gris sur fruits
	fraise	15	45	Mousse grise sur fruits
Kissir	tomate	05	34	Tache brune sur feuilles et tige
	fraise	03	40	Duvet gris sur fruits
Kaous	tomate	10	44	Feutrage gris sur feuilles
Tassoust	tomate	01	28	Feutrage gris sur feuilles

Au cours de nos sorties, nous avons enregistré le pourcentage d'infection des plantes par les maladies et ce pour pouvoir les comparer avec la pourriture grise. Les résultats sont enregistrés dans les tableaux n° :6, 7, 8,9 et 10 suivants.

Tableau n° 6 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la première station : Achouat

Paramètre Plantes cultivées	Fréquence en %(1)		
	Nombre de serres	Pourriture grise	Autres maladies
Tomate	17	10	90
Fraise	50	43	57

Tableau n°7 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la deuxième station : Kissir

Paramètre plantes cultivées	Fréquence en %(1)		
	Nombre de serres	Pourriture grise	Autres maladies
Tomate	5	30	70
Fraise	10	45	55

Tableau n°8: fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la troisième station :Kaoust

Paramètre Plantes cultivées	Fréquence en % (1)		
	Nombre de serres	Pourriture grise	Autres maladies
Tomate	10	50	50

Tableau n°9 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la quatrième station :Tassoust

Paramètre Plantes cultivées	Fréquence en %(1)		
	Nombre de serres	Pourriture grise	Autres maladies
Tomate	1	45	55

Tableau n°10 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans la cinquième station :Adouane Ali

Paramètre plantes cultivées	Fréquence en %(1)		
	Nombre de serres	Pourriture grise	Autres maladies
Tomate	19	55	45
Fraise	15	45	55

Concernant les résultats globaux, nous avons effectué le cumul des fréquences dans l'ensemble des stations visitées. Les résultats sont mentionnés dans le tableau n° 11 suivant :

Tableau n°11 : fréquence des maladies cryptogamiques rencontrées dans toutes les stations

Paramètre Plantes cultivées	Nombre de serres total dans toutes les stations	Fréquence en % (2)	
		Pourriture grise	Autres maladies
Tomate	52	38	62
Fraise	75	44,33	55,67

- (1) : Exprimés en pourcentage des plantes attaquées par les maladies cryptogamiques dans chaque station.
- (2) : Exprimés en pourcentage des plantes attaquées par les maladies cryptogamiques par rapport à l'ensemble des stations.

1-2 Discussion :

Au totale, 52serres de tomate et 75 serres de fraise ont été visitées parmi lesquelles une bonne partie d'entre elles sont attaquées par les différents agents pathogènes, où on constaté que la pourriture grise est presque la maladie la plus fréquent par apport aux autres. (10%pour la tomate et 43%pour la fraise),(fig.16).

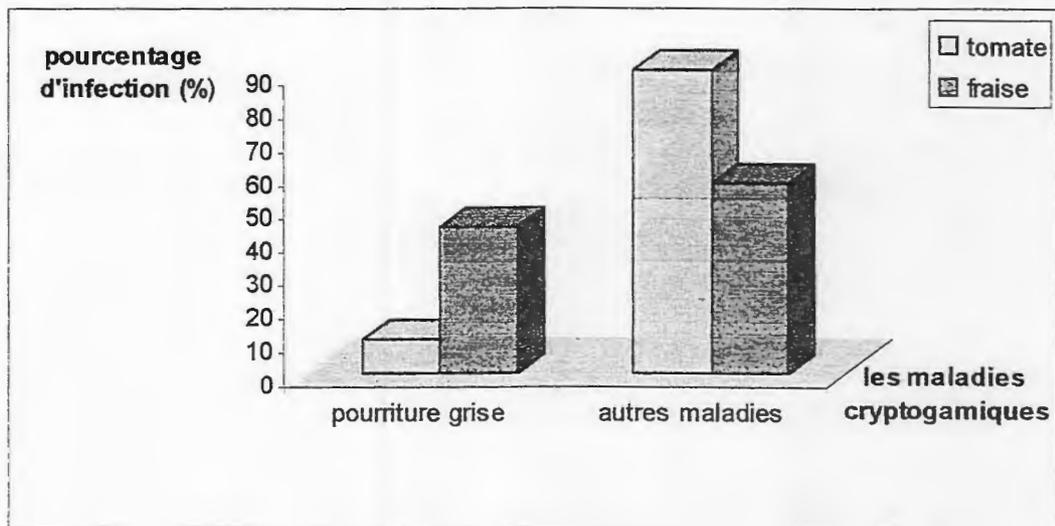
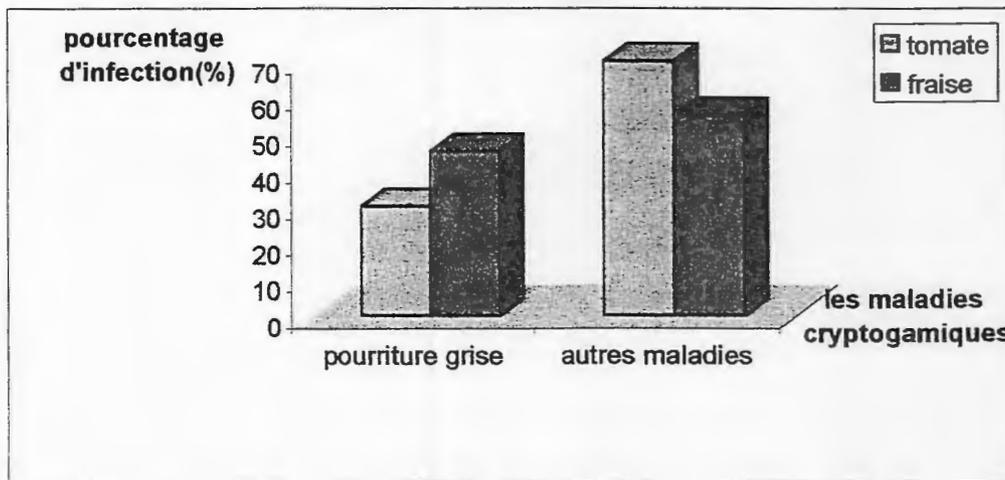


Figure n°16 : Taux d'attaque par les maladies rencontrées dans La première station :Achouat.

Dans la station n°2, nous avons noté la même remarque où le taux d'attaque de la pourriture grise a avoisine les 30% sur la tomate et 45% sur la fraise (fig.17).



Fi

Figure n°17 : Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans la deuxième station : Kissir

Dans la troisième station, sur 10 serres de tomate exploitées certaines d'entre elles sont contaminées la pourriture grise affectant la moitié des serres c'est-à-dire 50% des plantes attaquées par ayant été attaquées par cette maladie (fig. 18).

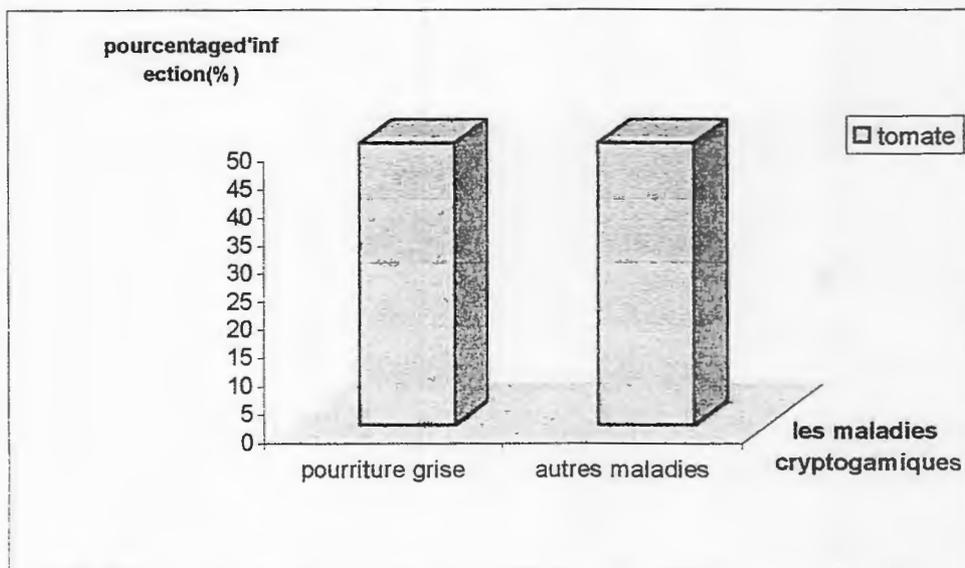


Figure n°18 : Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans troisième station : Kaous

Au niveau de la station n°4 nous n'avons rencontré qu'une seule serre attaquée par les différents agents pathogènes, où nous avons trouvé que la pourriture grise est assez répandue avec une fréquence de 45% par rapport aux autres maladies (55%), (fig. 19).

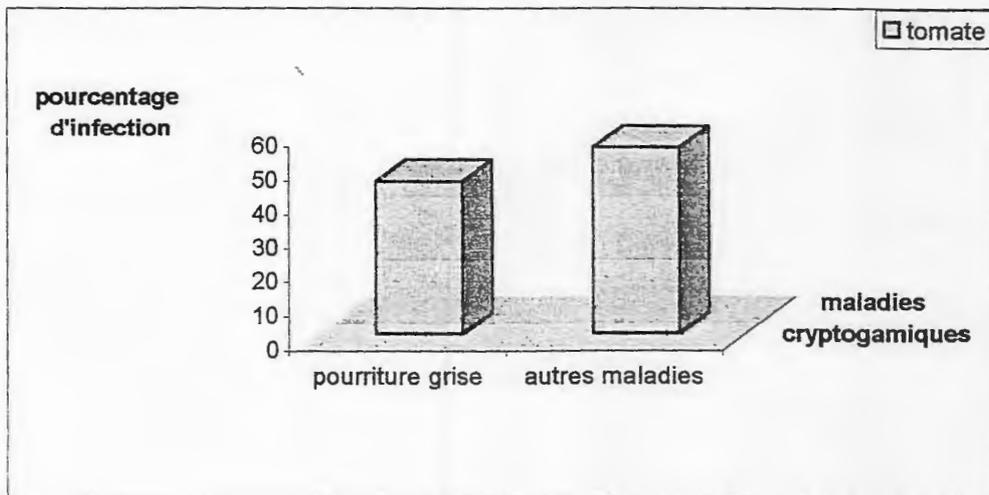


Figure n°19 : Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans quatrième station : Tassoust

De même, pour la cinquième et dernière station, nous avons remarqué que les plantes sont attaquées aussi par la même maladie fongique à savoir la pourriture grise avec un taux d'attaque de 55% pour la tomate et 45% pour la fraise (fig.20).

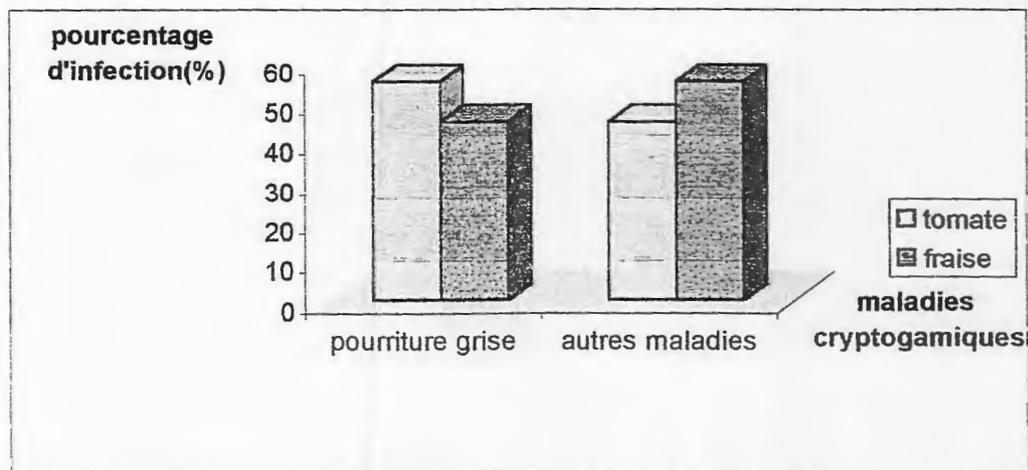


Figure n°20: Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques Rencontrées dans la cinquième station : Adouane Ali.

1-3 Conclusion :

En faisant le cumul de l'ensemble des stations prospectées, nous pouvons dire d'après le tableau n°11 et la figure n°21 que la pourriture grise est presque la maladie la plus couramment observée avec une fréquence totale de 38% sur la tomate et 44,33% sur la fraise et ce par

maladies avec des fréquences de 62% et 55,67% respectivement pour la tomate et la fraise (fig.21).

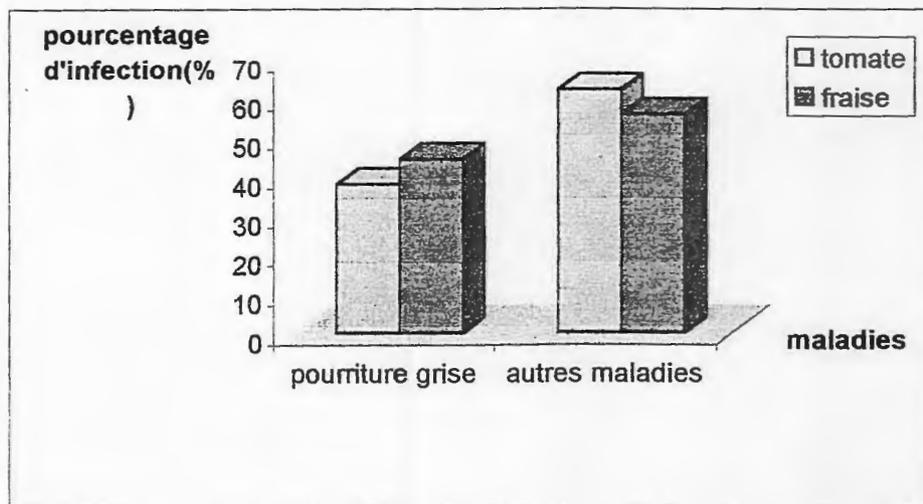


Figure n° 21 : Taux d'attaque par les maladies cryptogamiques rencontrées dans l'ensemble des stations.

2- Au laboratoire :

2-1 Identification de *Botrytis cinerea* :

Suite à nos observations macroscopiques réalisées sur terrain, nous avons effectué un isolement et une purification afin de déterminer l'agent pathogène responsable de la pourriture grise.

Les isolats ont été effectués à partir de différents organes de la tomate et de la fraise présentant bien sûr les symptômes de la pourriture grise (feuilles, fruits).

La détermination du champignon est basé essentiellement sur les caractères culturaux des colonies (couleur et diamètre, aspect du mycélium, nombre de sclérotés) ainsi que les caractères microscopiques (conidiophores, conidies,...).

2-1-1 Résultats :

Les résultats concernant l'identification des champignons phytopathogènes sont indiqués dans le tableau n°12 suivant.

**Tableau n°12 : caractères morphologiques des colonies
d'isolats obtenu à partir de différents agents
pathogènes**

Station	Plante cultivée	Organe infecté	Répétition	Couleur des colonies
Ahouat	Tomate	Feuille	1	Rose
			2	Blanche et grise
			3	Grise verdâtre
	Fraise	Feuille	1	Vert
			2	Rose et blanche
			3	Grise verdâtre
		Fruits	1	blanche
			2	Rose
			3	Grise verdâtre
Adouane Ali	Tomate	Fruits	1	Grise verdâtre
			2	Blanche et grise
			3	Noire et vert
	Fraise	Fruits	1	Grise et noire
			2	Grise verdâtre
			3	Blanche et noire
Kissir	Tomate	Fruits	1	Blanche
			2	Grise verdâtre
			3	Vert
	Fraise	Feuille	1	Vert et blanche
			2	Grise verdâtre
			3	Vert et blanche
Kaous	Tomate	Feuille	1	Grise verdâtre
			2	Blanche
			3	Grise verdâtre
Tassoust	Tomate	Feuille	1	Grise verdâtre
			2	Blanche et grise
			3	Grise verdâtre

2-1-2 Discussion :

Les isolements des différents agents phytopatogènes ont été effectués au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel. Les isolats ont été obtenus à partir des feuilles et fruits de la tomate et la fraise supposé être contaminées par la pourriture grise.

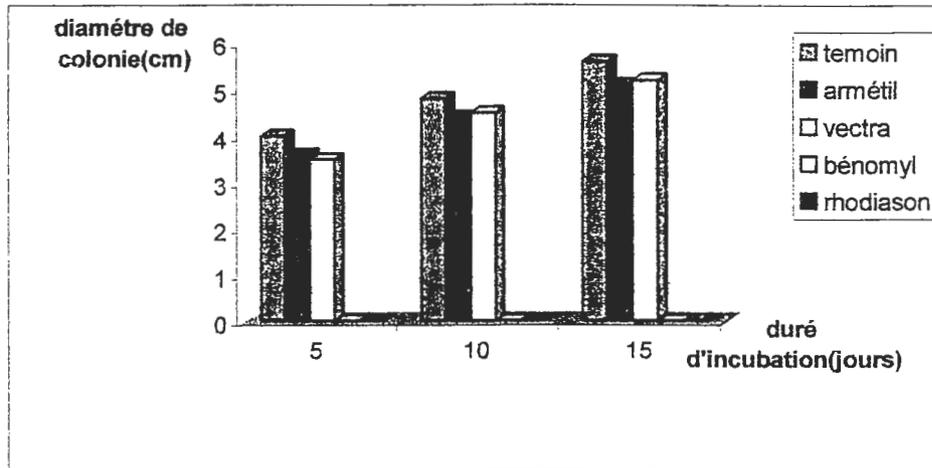


Figure n° 28 : influence des différents fongicides utilisés sur la croissance de *Botrytis cinerea*.

2-2-3 Conclusion :

A la lumière des travaux effectués sur l'efficacité des 04 fongicides à savoir le bénomyl, le rhodiason, le vectra et l'armétil contre *Botrytis cinerea* agent causal de la pourriture grise particulièrement de la tomate et de la fraise, nous pouvons conclure que chaque fongicide possède une spécificité particulière vis-à-vis d'un agent pathogène donné. Cependant, nous avons constaté que le bénomyl et le rhodiason possèdent tous les deux une très grande efficacité contre *Botrytis cinerea*. Par contre, ce dernier a montré une grande résistance pour le vectra et à un degré moindre l'armétil comme le montre la figure n°28.

On recommander donc l'emploi du benomyl et du rhodiason pour la lutte contre la pourriture grise car il s'agit des deux fongicide anti-*Botrytis* les plus efficaces.

Conclusion générale :

La pourriture grise est une maladie dangereuse. Elle est caractérisée par la rapidité de dissémination. Elle provoque, chaque année, des dégâts considérables et des pertes énormes, ce qui influence négativement la production légumière en quantité et en qualité.

Afin de trouver une solution à ces problèmes, nous avons essayé de contribuer à l'étude de cette maladie particulièrement le test de quelques fongicides.

La pourriture grise est une maladie causée par *Botrytis cinerea*, ce dernier appartient à la classe des *Ascomycètes*, à l'ordre des *Pézizales* et à la famille des *Hélotiacées*.

Il est possible de différencier entre *Botrytis cinerea* et les autres champignons en se basant sur les caractères morphologiques tels que le diamètre des colonies, les dimensions des sclérotés et même les critères biologiques.

Ses symptômes peuvent être observés sur différentes parties de la plante (rameaux, feuilles et fruits) sous forme de mousse grise ou nécroses sur fruit.

Au cours de nos sorties au niveau des différentes stations : Achouat, Adouane Ali, Kissir, Tassoust et Kaous nous avons ramené au laboratoire des échantillons de plantes supposées être malades.

Dans la première partie de notre travail, nous avons effectué un isolement à partir des échantillons de feuilles et fruits et ce pour déterminer l'agent causal de la pourriture grise. En utilisant les caractères micro et macroscopiques des colonies, il s'est révélé que effectivement la pourriture grise est causée par *Botrytis cinerea*.

Dans la deuxième partie, nous avons essayé de rechercher parmi les quatre fongicides, le plus efficace d'entre eux à même d'éradiquer complètement cette maladie.

A la lumière de cette étude, et suite à ces performances, nous avons constaté que le bénomyl est le fongicide anti-Botrytis le plus efficace, vient ensuite le Rhodiason qui a montré une efficacité moyenne, par contre l'Armétil et le vectra ont montré une inefficacité presque totale qui s'est traduite par une croissance normale des colonies de *Botrytis* par rapport au témoin. Il est donc conseillé d'employer le bénomyl contre la pourriture grise à condition bien sûr de respecter les doses prescrites.

Enfin, il est souhaitable que ce travail puisse être approfondi par la recherche des races physiologiques pour retrouver d'éventuelles variétés résistantes à cette maladie.

*Références
bibliographiques*

Résumé :

Nous avons étudié la pourriture grise afin de proposer des solutions qui peuvent limiter la propagation de cette maladie.

Nous avons visité différentes stations pour ramener les échantillons au laboratoire, puis on a effectué un isolement et une purification pour déterminer l'agent causal de la maladie à savoir *Botrytis cinerea* (*Ascomycète, Helotiacees*).

Par ailleurs, on a effectué des tests fongicides pour choisir le pesticide le plus efficace contre la pourriture grise et nous sommes arrivés enfin à conclure que le bénomyl est le fongicide anti-*Botrytis* le plus efficace. Pour ce là, il est préférable de l'utiliser afin de minimiser le plus que possible les dégâts de la pourriture grise.

Mots clé : Pourriture grise, *Botrytis cinerea*, fraise, tomate, Bénomyl.

Summarized:

We studied the gray rot in order to propose the solutions that can limit the propagation of this illness.

We visited different stations to bring back the samples in the laboratory, then we did an isolation and a purification to determine the causal agent of the illness known *Botrytis cinerea* (*Ascomycet*, *Helotiacees*).

Otherwise, we did tests fungicides to choose the most efficient pesticide against the gray rot and we finally managed to conclude that the benomyl is the most efficient fungicide against Botrytis. For this, it is preferable to use it in order to minimize more that possible the damages of the gray rot.

Key words : gray rot, *Botrytis cinerea*, strawberry, tomato, Benomyl.

الملخص:

قمنا بدراسة التعفن الرمادي لطرح بعض المحلول التي قد تحد من انتشار هذا المرض .
قمنا بنزارة العديد من المحطات لأخذ العينات إلى المخبر، ثم قمنا بعملية العزل والتصنيف لتحديد العامل المسبب
للمرض: *Botrytis cinerea* (Ascomycet, Hélotiacées).
من جهة أخرى، قمنا باختبار المبيدات الفطرية لاختيار المبيد الأكثر فعالية ضد التعفن الرمادي.
وصننا في الأخير إلى أن Bénomyl هو المبيد الفطري الأكثر فعالية ضد هذا المرض، لهذا من المستحسن
استعماله للتخفيف من اضراره.
الكلمات المفتاح: التعفن الرمادي، *Botrytis cinerea*، الفراولة، الطماطم، Bénomyl.

Références bibliographiques

1-ADRIAN M., JEANDET P. et JOUBERT M., 1996.

Stimuler les défenses naturelles de la vigne, un complément à la lutte phytosanitaire

contre le Botrytis, phytoma n° 488. ppi. 33-36.

2- ALONSO J. et SOUZA V., 1998.

Les légumes et les fruits du jardin. ed. Agata, Madrid, Espagne, 255 p.

3- ANONYME, 1986.

Index des produits phytosanitaires, Institut National de la Protection des Végétaux, Alger, 110p.

4- ANONYME, 1992. Index phytosanitaire, INPV, Alger, 105 p.

5- ANONYME, 1997.

Maladies fongiques aériennes des légumineuses alimentaires, INRA, station de pathologie végétale, Tunisia, 150 p.

6- ARLAND A., CHAPELAND F., GREDET M. et LEROUX P., 1998.

Résistance de Botrytis cinerea aux fongicide du laboratoire au vinoble et vice versa. phytoma n°504, ppi.38-42.

7- BOYLDIEUS J., 1978.

Les cultures légumières, Institut National Agronomique, paris, 239 p.

8- BRYGOO T., LEWIS L., FORTINI L. et FORTINI D., 1998.

Données récentes sur le rôle de l'eudémis dans l'épidémiologie de la pourriture grise sur vigne, phytoma n° 431, ppi. 51-54.

9- CHARLES M. M., SMITH C. et HARRISSON J. G., 1986.

La maladie des plantes maraîchères, Agata, Paris, 552 p.

10- CLEMENT J. M., 1987.

Larousse agricole- 4^e-n° 51065, 1207p.

11- FERMAUD M., 1991.

Données récentes sur le rôle de l'eudémis dans l'épidémiologie de la pourriture grise sur vigne, phytoma n°341, ppi.50-53.

- 12- GALLET P., 1977.
Les maladies et les parasites de la vigne. ed. Grignon, Paris, 871 p.
- 13- GALLET P., 1980.
Précis de pathologie viticole. ed. Grignon, Paris, 264 p.
- 14-GAUNT R. E., ELMER C. et FERMAUD M., 1993.
External contamination of fruits of *Actinidia deliciosa* by *Botrytis cinerea*.
N.Z. J, Crop and Hort. Science, phytoma n°454, ppi. 54.
- 15- GAYON J. R., 1971.
Traité d'ampélogie science et techniques de la vigne, tome II. Culture,
pathologie, défense sanitaire de la vigne. edi. Dunod, Paris, 242p.
- 16- GRIDLEY, 1985.
Food légumes in Tunisia : amélioration des légumineuses alimentaires,
synthèse des travaux de stage de formation ICARDA, Tunisia, 145 p.
- 17- HANOUNIK, 1981.
Influence of ronilan on severity of chocolate spot and yield in faba bean.
ed. ICARDA Aleppo, Syria, 120 p.
- 18- HANOUNIK, 1986.
Screening technics for disease resistance in faba beans. ed. ICARDA.
Aleppo, Syria, 150p.
- 19- HANOUNIK, 1988.
New sources of resistance in *Vicia faba* to chocolate spot caused *Botrytis*
faba food. ed. Anual report, Syria, 1020p.
- 20- HERVÉ S., 1994.
La protection des cultures. ed. Le Chevalier, France, 351p.
- 21- LOUHEM W., 2002.
Contribution à l'étude des maladies des légumineuses. Etude
d'identification morphologique de la maladie des taches chocolat causée
par *Botrytis*, tentative de caractérisation biochimique, thèse ing. agro.
Constantine. 39 p.

- 22- MASSON G., ROGER L. et LAFON R., 1949.
Les champignons parasites des plantes cultivées tome II. ed. Dionéditeur,
Paris, 1092p.
- 23- MIMAUD J., PELOSSIER M. et RAMSEY M., 1969.
La protection des plantes horticoles contre leurs ennemies. Ed. Société
nationale d'horticulture de France, Paris, 379p.
- 24- MORAS P., BONY P. et ROTHAN C., 1993.
Conservation, influence de quelques facteurs de post-récolte et des
conditions d'entreposage sur la tenue du fruit, phytoman°454, ppi53.
- 25- RIEUF, 1993.
Clé d'identification des champignons rencontrés sur les plantes
maraîchère, station de pathologie végétale. ed. Montavet, Paris, 72 p.
- 26- ROUIBAH M., 1989.
Contribution à l'étude du flétrissement du pois-chiche en Algérie. Thèse
ing.agr. El-Harrach, 51 p.
- 27- جمال الدين ح.، أحمد زكي ح. و محمود سعيد م.، 1992.
أساسيات أمراض النبات. د. ن. الشهاب، القاهرة، 511 ص.

Sites internet :

- 28- ANONYME, 1994.
<http://www.vinsvignes.com/rubrique24.htm>-101k.
- 29- ANONYME, 1996.
<http://www.lescaves.qc.ca/glossaireframe1source1.htm>-31k.
- 30- ANONYME, 2000.
[http://www.gcuv.qc.ca/publications/forets/fimaq/broch-72 .pdf](http://www.gcuv.qc.ca/publications/forets/fimaq/broch-72.pdf).
resultatcomplementaire. 2000.

Résumé :

Nous avons étudié la pourriture grise afin de proposer des solutions qui peuvent limiter la propagation de cette maladie.

Nous avons visité différentes stations pour ramener les échantillons au laboratoire, puis on a effectué un isolement et une purification pour déterminer l'agent causal de la maladie à savoir *Botrytis cinerea* (*Ascomycète, Helotiacees*).

Par ailleurs, on a effectué des tests fongicides pour choisir le pesticide le plus efficace contre la pourriture grise et nous sommes arrivé enfin à conclure que le bénomyl est le fongicide anti-*Botrytis* le plus efficace. Pour ce là, il est préférable de l'utiliser afin de minimiser le plus que possible les dégâts de la pourriture grise.

Mots clé : Pourriture grise, *Botrytis cinerea*, fraise, tomate, Bénomyl.

