

Mise en évidence d'une variation intra spécifique chez *Botrytis cinerea* et lutte biologique *in vitro* par l'extrait de compost

Mouria Btissam¹, Ouazzani-Touhami¹ Amina, Mouria Afifa¹⁻² et Douira Allal¹

¹ Laboratoire de Botanique, de Biotechnologie et de Protection des Plantes, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, B.P 133, Kénitra, Maroc.

² Présidence de l'Université Ibn Tofaïl, Kenitra, Maroc.

Auteur correspondant emails: mouriab@gmail.com. E-mail LBBPP : douiraallal@hotmail.com ; labobotanique@gmail.com ; Tél : +212624930738 ; +212671904142

Original submitted in on 21st December 2012. Published online at www.m.elewa.org on 25th April 2013.

<http://dx.doi.org/10.4314/jab.v64i1.88468>

RESUME

Objectifs : Le présent travail œuvre pour la mise en évidence de la variation intra spécifique chez *Botrytis cinerea* et de l'effet d'un extrait d'un compost de déchets urbains solides sur deux stades du cycle de vie de ce pathogène.

Methodologie et Résultats : Des feuilles de tomate ont été inoculées par 22 souches de *B. cinerea* pour sélectionner les plus virulentes. Celles-ci sont repiquées dans des boîtes contenant des milieux à base d'extrait de compost pour évaluer la croissance et la sporulation. Les souches de *B. cinerea* isolées à partir des plantes de tomate se sont révélées les plus virulentes. La croissance et la sporulation des 5 souches sélectionnées ont été inhibées par les milieux à base d'extraits jusqu'à 95,24% et 100% respectivement.

Conclusion et application de la recherche : L'étude du pouvoir pathogène de *B. cinerea* a montré l'existence d'une variation intra spécifique et l'efficacité des extraits de compost stérilisés sur *B. cinerea in vitro* prouve que des composés chimiques sont mis en jeu et suggère la possibilité d'utilisation de ces extraits et du compost *in vivo* sur la pourriture grise de la tomate.

Mots clés : *B. cinerea*, variation intra spécifique, extrait de compost, croissance, sporulation.

ABSTRACT

Detection of Intraspecific variation in *Botrytis cinerea* and *in vitro* biological control by compost extract.

Objectives: The present study was on intraspecific variation detection in *B. cinerea* and the effect of a municipal solid waste compost extract on two stages of its life cycle.

Methodology and results: tomato leaves were inoculated with 22 strains of *B. cinerea* to select the most virulent. They were transplanted into culture medium based on compost extract to assess the growth and sporulation. *B. cinerea* strains isolated from tomato plants proved to be more virulent. Growth and sporulation of five strains selected were inhibited by the extracts in the media by 95.24% and 100% respectively.

Conclusion and application of research: The study of pathogenicity of *B. cinerea* showed the existence of intraspecific variation. The sterilized compost extracts efficiency on *B. cinerea in vitro* proves that chemical compounds are involved and suggests the possibility of using these extracts and compost *in vivo* against tomato gray mold.

Keywords: *B. cinerea*, intraspecific variation, compost extract, growth, sporulation

INTRODUCTION

B. cinerea est un champignon pathogène ubiquiste et polyphage, capable d'infecter plus de 200 espèces de plantes dicotylédones et monocotylédones, causant des pertes économiques importantes sur les cultures avant et après récolte (Rosslenbroich et Stuebler, 2000 ; Gudelj et al., 2004 ; Hubert et al., 2005). Sur la tomate, *B. cinerea* cause la pourriture grise des feuilles, des pétioles, des tiges et des fruits sous serre et en plein champ (Dik et Elad, 1999), mais elle est particulièrement sévère dans les conditions de lumière faible et d'humidité élevée des serres (Jarvis, 1980). L'apparition de résistance dans les populations de champignons (Hmouni et al., 2003), le coût élevé des fongicides, leurs effets sur l'environnement (Mills et al., 2002) et leur incompatibilité avec l'agriculture durable ont fait que leur utilisation est devenue de plus en plus interdite et l'intérêt pour d'autres alternatives a ainsi augmenté (Blok et al., 2000). Durant la dernière décennie, l'intérêt accordé à l'utilisation des extraits aqueux de compost en agriculture et en horticulture a augmenté rapidement (Al-Mughrabi, 2007). Ces extraits sont utilisés pour supprimer les maladies des plantes (Curlango-Rivera et al.,

2013) ainsi que pour stimuler la croissance de ces dernières (Riahi et al., 2009). Les résultats obtenus par plusieurs auteurs dans la lutte contre les maladies bactériennes et fongiques par ces extraits sont très positifs (Copeman et al., 2000 ; Znaïdi, 2002 ; Al-Dahmani et al., 2003 ; Scheuerell et Mahaffee, 2004 ; Hibar et al., 2006 ; Larkin, 2008). Cependant, l'efficacité des extraits de compost varie considérablement en raison de la différence des procédures de préparation de ces extraits, la source, la composition, la qualité, la maturité du compost et la durée de compostage (Hibar et al., 2006). En plus, différents groupes de pathogènes peuvent avoir des comportements différents vis-à-vis des extraits de compost (Weltzien, 1992). Ainsi, l'objectif de ce travail est d'abord de (i) sélectionner parmi une collection de souches de *B. cinerea* isolées à partir de différentes cultures, celles qui sont les plus virulentes sur les feuilles de tomate, et ensuite (ii) d'étudier l'effet *in vitro* des extraits d'un compost de déchets urbains solides sur deux stades principaux du cycle de vie des souches sélectionnées sur la base de leur pouvoir pathogène.

MATERIEL ET METHODES

Isolement et identification des agents pathogènes :

Les isolats de *Botrytis cinerea* ont été isolés à partir de feuilles, de tiges et de fruits infectés de tomate, ou encore à partir de fruits de concombre. Les fragments de feuilles et de tiges sont déposés dans des boîtes de Petri stériles contenant trois rondelles de papier filtre imbibées d'eau distillée stérile. Ces chambres humides sont incubées pendant 24 heures à température ambiante et sous lumière continue afin de favoriser davantage la sporulation. Alors qu'à partir des fruits, les prélèvements se font le même jour directement au niveau du pédoncule floral ou, éventuellement, de la blessure. Le prélèvement du champignon se fait aseptiquement à l'aide d'une aiguille stérile sans racler la surface des tissus et le mycélium portant les organes fructifiés est repiqué dans des boîtes de Petri contenant le milieu PSA. Les boîtes sont incubées à l'obscurité à 20°C et chaque isolat subit des repiquages successifs à partir des bordures de jeunes colonies jusqu'à purification totale des cultures. L'identification des isolats de *B. cinerea* est effectuée en se basant sur leurs caractéristiques morphologiques, macroscopiques

et microscopiques et en se référant à différentes clés de détermination : Gilman (1957) ; Barnett (1960) et Ellis (1971).

Pouvoir pathogène des souches

Matériel végétal : Des graines de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) appartenant à la variété Campbell 33 sont désinfectées superficiellement à l'hypochlorite de sodium dilué à 1% pendant 10 minutes, rincées abondamment sous un courant d'eau puis séchées et mises à prégermer dans la tourbe. Après 3 semaines, les plantules sont repiquées dans le sol de Mamora sous une serre en plastique. Des feuilles d'apparence saine, issues des plantes de tomate âgées ainsi de deux mois, sont récupérées pour servir à évaluer le pouvoir pathogène des souches de *B. cinerea* isolées. Ces feuilles sont désinfectées superficiellement à l'aide d'un coton imbibé d'alcool 90°, découpées en disques de 2 cm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Par souci d'homogénéité, toutes les feuilles ont été choisies jeunes en pleine émergence.

Procédé d'inoculation : Le protocole suivi est celui de Hmouni (2000) et consiste à déposer aseptiquement des disques foliaires de tomate dans des boîtes stériles contenant deux rondelles de papier buvard imbibées d'eau distillée stérile. Pour chaque souche de *B. cinerea*, des implants mycéliens de 5 mm de diamètre sont prélevés en bordure de colonies sur milieu PSA âgées de 4 jours et déposés aseptiquement, tout en provoquant une incision, au centre des rondelles de tomate. Quatre rondelles sont déposées par chambre humide et chaque souche a fait l'objet de 6 répétitions réparties en deux lots de 3 boîtes chacun, soit 24 rondelles de tomate par souche. Le premier lot est utilisé pour mesurer le diamètre des lésions et le deuxième est destiné à évaluer la sporulation des souches pathogènes. Six boîtes contenant des rondelles de feuilles de tomate inoculées par des disques d'eau gélosée ont servi de témoins. Les chambres humides sont placées pendant une nuit dans une chambre de culture sous lumière blanche, puis incubées à l'obscurité à 20°C pendant 7 jours pour le premier lot et pendant 14 jours pour le deuxième. Ces boîtes sont maintenues constamment humides en les arrosant régulièrement et aseptiquement avec de l'eau distillée stérile sans pour autant les noyer afin d'éviter la détérioration des tissus, ce qui entrave l'opération d'estimation de la sporulation.

Lecture des résultats : La détermination du **potentiel d'infection (PI)**, sur le premier lot, est réalisée en mesurant les deux diamètres orthogonaux des lésions autour des implants mycéliens à l'aide d'un double-décimètre et en calculant ainsi la moyenne. Le **potentiel de sporulation (PS)** est estimé sur le deuxième lot en introduisant chacun des disques foliaires dans un tube à essai contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Après agitation mécanique pendant 1

minute, le comptage des conidies est assuré à l'aide d'une cellule de Malassez. Seules les souches induisant des lésions de diamètre supérieur ou égal à 1 cm sont considérées pathogènes. Les autres souches sont rejetées et leur potentiel de sporulation ne sera pas examiné.

Effet des extraits de compost sur *B. cinerea*

Matériel fongique : Cinq souches de *B. cinerea* choisies après sélection comme étant les plus virulentes sont repiquées sur le milieu PDA et incubées à l'obscurité à 20°C pendant quatre jours.

Milieux de culture : Afin d'évaluer *in vitro* l'effet des toxines ou d'autres facteurs chimiques contenus dans le compost sur *B. cinerea*, des milieux de culture à base d'extrait d'un compost (MEC), produit par un Centre de Co-Traitement des déchets urbains solides, sont préparés et dont la composition figure dans le tableau 1. Les extraits de compost sont préparés selon la méthode de Weltzien (1992) à un taux de 1 : 5 (V/V) et laissés macérer pendant 2 jours à la température ambiante du laboratoire. Après filtration, les extraits sont répartis en deux lots de deux erlenmeyers chacun contenant l'Agar-agar, l'un additionné de glucose et l'autre sans glucose. Le premier lot est autoclavé à 120°C et le second à 80°C. Trois milieux de culture sont utilisés à titre comparatif, il s'agit du milieu PDA, du milieu à base de feuilles de tomate (MFt) (Hmouni, 2000) et du milieu de Clark et Lorbeer (C&L) (1977). La composition de ces milieux est détaillée dans le tableau 1. Ces milieux sont autoclavés à 120°C, additionnés de chloramphénicol à raison de 100 mg / litre et coulés dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre. Pour chaque milieu de culture, trois boîtes sont coulées et l'essai a fait l'objet de trois répétitions.

Tableau 1 : Composition des milieux de culture utilisés pour *B. cinerea*.

Milieux de culture	Composition
Milieux MEC * Sans sucre * Avec sucre	*15 g d'Agar-agar, 1000 ml d'extrait de compost *15 g d'Agar-agar, 20 g de glucose, 1000 ml d'extrait de compost.
Milieu PDA	200 g de pomme de terre, 20 g de glucose, 15 g d'Agar-agar, 1000 ml d'eau distillée.
Milieu MFt (Hmouni, 2000)	100 g de feuilles de tomate, 15 g d'Agar-agar, 1000 ml d'eau distillée
Milieu C&L (Clark et Lorbeer, 1977 <i>In</i> Dhingra et Sinclair, 1987)	2,5 g d'extrait de levure, 7,5 g d'extrait de malt, 0,25 g d'hydrolysate de caséine, 0,1 g de nucléate de sodium, 1 ml de solution de microéléments, 15 g d'Agar-agar, 1000 ml de bouillon de Czapeck-Dox.

Effet sur la croissance mycélienne : Un implant mycélien de 5 mm de diamètre, prélevé en bordure d'une jeune colonie de *B. cinerea*, est déposé au centre de chaque boîte de Petri contenant l'un des sept

milieux de culture. Après 4 jours d'incubation à l'obscurité et à 25°C, la croissance mycélienne est évaluée par mesure des deux diamètres orthogonaux de chaque colonie.

Effet sur la sporulation : Après dix jours d'incubation, 4 disques mycéliens de 5 mm de diamètre sont prélevés sur la même ligne de chaque boîte et introduits dans un tube à essai contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Après agitation mécanique, le comptage des conidies s'effectue à l'aide d'une cellule de Malassez. Chaque boîte a fait l'objet de trois répétitions à raison de dix lectures par répétition. Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne

et de la sporulation des souches de *B. cinerea* sont calculés par rapport aux milieux qui ont induit la croissance ou la sporulation les plus élevées.

Analyse statistique : Les analyses de variance sont effectuées après transformation des moyennes et des pourcentages en Arc sin \sqrt{P} et les moyennes sont comparées par le test de Newman & Keuls au seuil de 5%.

RESULTATS

Isolement et identification : Vingt deux souches de *B. cinerea* ont été isolées à partir de différents organes de

tomate et des fruits de concombre. Le tableau 2 illustre l'origine de prélèvement de chaque souche.

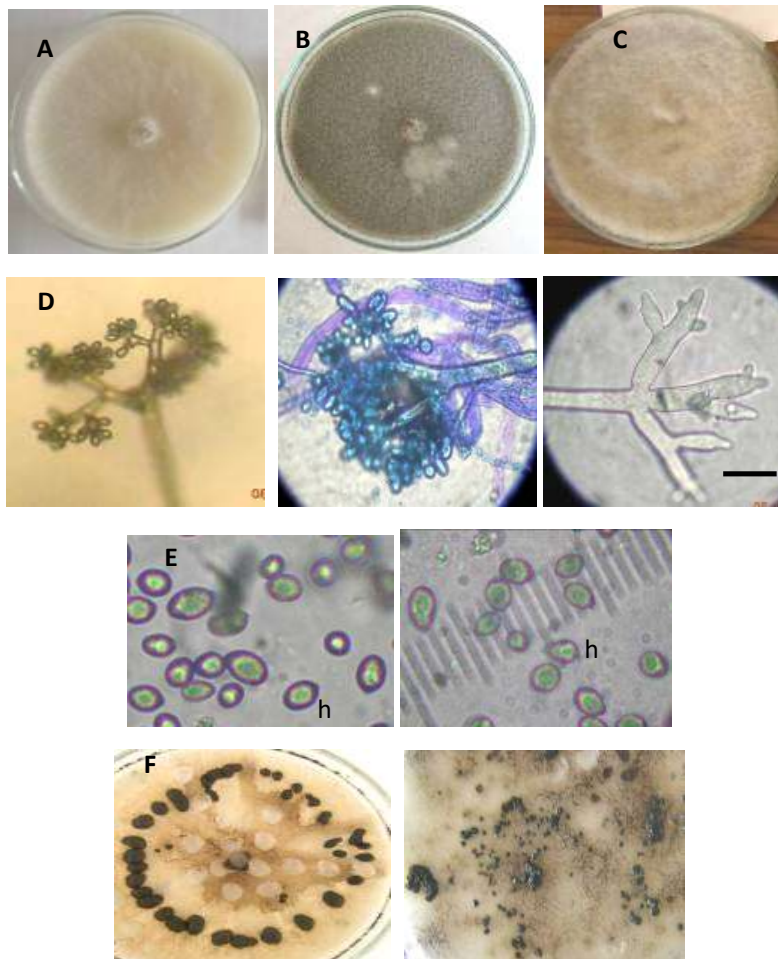


Figure 1 : Caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques de *Botrytis cinerea*.

A : Culture sur milieu PSA âgée de 4 jours ;

B : Culture sur milieu PSA âgée de 10 jours à sporulation abondante ;

C : Culture sur milieu PSA âgée de 10 jours à mycélium abondant.

D : Conidiophores de *B. cinerea* vus au microscope photonique. G \times 400. Barre = 50 μ m.

E : Conidies de *B. cinerea*, (h) Hile. G. \times 400. Liquide de montage : Bleu coton

F : Sclérotés de *B. cinerea* de différentes tailles.

Les 22 souches ont été identifiées à *B. cinerea* par observation de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques (Fig. 1). Certaines souches ne

produisent pas des sclérotés (exemple B1, B2), chez d'autres ils sont très abondants (exemple Bt3).

Potentiel d'infection (PI) : Toutes les souches de *B. cinerea* ont induit, à partir du 4^{ème} jour d'incubation, l'apparition de lésions foliaires dont le diamètre varie d'une souche à l'autre et en fonction de l'organe d'origine. Le tableau 3 rapporte les diamètres moyens des lésions, calculés à partir des deux diamètres orthogonaux de chaque lésion, pour toutes les souches de *B. cinerea*. Trois groupes de souches peuvent être distingués en fonction de leur PI. Le premier est constitué de souches dont le diamètre moyen des lésions provoquées est supérieur à 1,9 cm, dont neuf sont isolées à partir de différents organes de la culture de tomate sous serre et deux souches sont issues des fruits de tomate commercialisés. Le deuxième groupe, à PI inclus entre 1 et 1,9 cm, comprend six souches provenant de la culture de tomate de la variété Gabriella, deux souches isolées à partir des fruits de concombre et une souche isolée sur des fruits de tomate commercialisés. Le troisième groupe est représenté par trois souches à faible PI (diamètre < 1 cm). Les lésions provoquées par les différentes souches de *B. cinerea* présentent le même aspect (Fig. 2), elles sont brunes et deviennent marrons et molles avec le temps induisant la pourriture du tissu foliaire. Un mycélium blanc apparaît progressivement à partir

du centre de la lésion, couvre les feuilles et évolue, éventuellement, en devenant fructifère par production de bouquets de conidiophores, formant une couche grise qui couvre les disques foliaires.

Potentiel de sporulation (PS) : Toutes les souches de *B. cinerea* isolées ne forment pas un duvet gris apparent après quatorze jours d'incubation à 20°C. Le tableau 3 illustre la comparaison entre l'aptitude des différentes souches à sporuler sur les feuilles de tomate. De même que pour le potentiel d'infection, trois groupes ont été distingués en fonction de leur aptitude à la sporulation. Le premier comprend les souches à sporulation élevée, $PS > 10^6$ conidies / ml. Le deuxième est représenté par les souches à sporulation moyenne, $5.10^5 < PS < 10^6$ conidies / ml et le troisième groupe englobe les souches à faible aptitude à la sporulation, $10^5 < PS < 5.10^5$ conidies / ml. Il ressort de ce tableau que les PI et les PS les plus faibles sont rencontrés chez les souches de *B. cinerea* isolées à partir des fruits de concombre notamment la souche Bc1 pour le PI et la souche Bc3 pour le PS. La formation de sclérotés sur les disques foliaires de tomate est observée chez les souches Bf2 et Bt3 vers le 10^{ème} jour d'incubation (Fig. 2).

Tableau 3 : Potentiels d'infection (diamètre des lésions) et de sporulation moyens des différentes souches de *B. cinerea*.

Souches de <i>B. cinerea</i>	PI (cm)	PS	
		(10 ⁵ conidies / ml)	(10 ⁵ conidies / cm ²)
B1	2,000 a	8,222 de	2,617
B2	2,000 a	13,222 abc	4,208
B3	1,910 a	6,855 e	2,182
B4	1,193 cde	4,377 f	1,393
B5	1,030 def	3,422 fg	1,089
B6	0,760 ef	0	0
Bf1	1,640 abc	3,566 fg	1,135
Bf2	1,940 a	4,677 f	1,488
Bf3	1,986 a	14,722 ab	4,686
Bf4	1,760 ab	5,311 f	1,690
Bf5	1,966 a	9,111 d	2,900
Bf6	1,923 a	4,077 f	1,297
Bt1	1,816 a	8,511 de	2,709
Bt2	1,962 a	12,200 bc	3,883
Bt3	1,626 abc	2,666 gh	0,848
Bt4	0,916 def	0	0
Bc1	0,562 f	0	0
Bc2	1,306 bcd	2,966 fgh	0,944
Bc3	1,112 def	1,900 h	0,604
Bp1	1,979 a	15,488 a	4,929
Bp2	1,950 a	12,000 c	3,819
Bp3	1,063 def	9,550 d	3,039

Deux valeurs de la même colonne affectée de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5%, selon le test de Newman & Keuls.

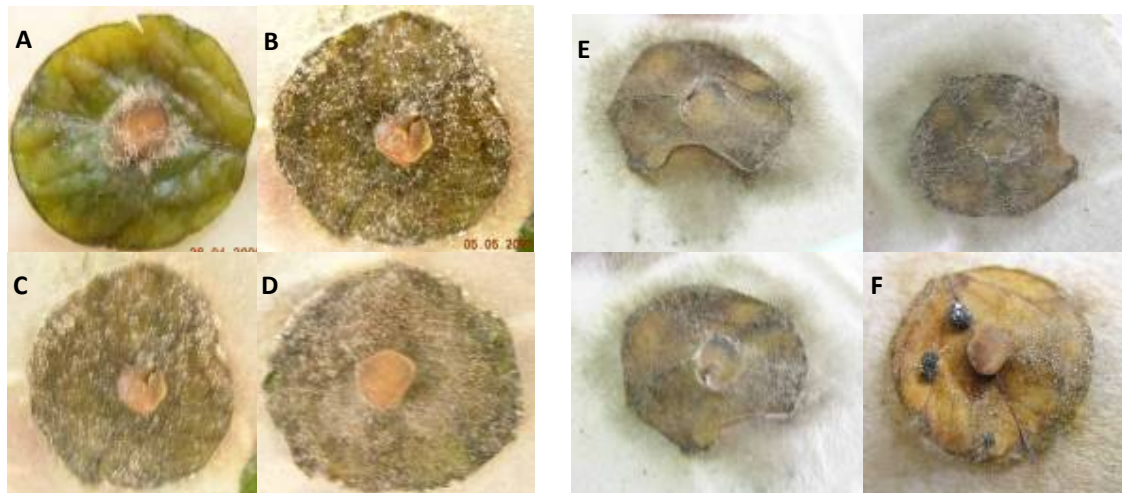
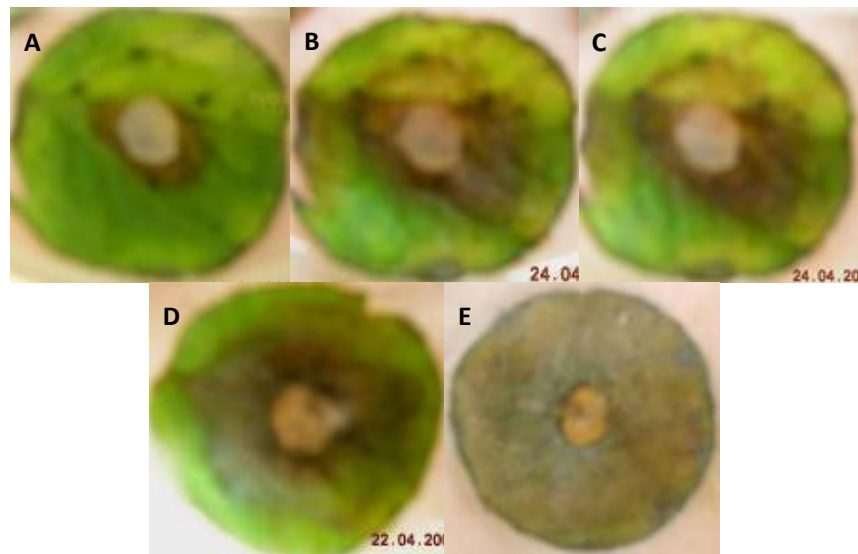


Planche 2 : Potentiels d'infection et de sporulation de *B. cinerea* sur les disques foliaires de la tomate.

En haut : Potentiel d'infection de certaines souches de *B. cinerea* isolées.

(A) BC1, (B) Bf1, (C) Bt3, (D) Bt1, (E) B1.

En bas : Potentiel de sporulation de certaines souches de *B. cinerea* isolées.

(A) Bc3, (B) B3, (C) Bt1, (D) Bp3, (E) Bp1, (F) Bt3, avec formation de sclérotés.

Effet des extraits de compost sur la croissance mycélienne de *B. cinerea* : Les diamètres moyens des colonies ainsi que les pourcentages d'inhibition de la croissance diamétrale des souches de *B. cinerea* en fonction des différents milieux de culture sont consignés dans le tableau 4. Le milieu PDA est le plus favorable à la croissance de toutes les souches de *B. cinerea*, les diamètres des colonies étant les plus élevés dans ce milieu pour toutes les souches (Fig. 3). Le milieu à base de feuilles de tomate (Mft) a permis une croissance optimale de toutes les souches, à

l'exception de la souche Bp1. Comparé au milieu PDA, le milieu C&L a induit un pourcentage d'inhibition de la croissance variant entre 2,16 % enregistré pour la souche B2 et 51,66 % enregistré pour la souche Bp1. Généralement, tous les milieux MEC ont réduit la densité mycélienne de toutes les souches de *B. cinerea*. Les milieux MECsG ont permis une réduction de la croissance diamétrale de *B. cinerea* plus élevée que les milieux MECG (Fig. 3). Le milieu MECG stérilisé à 120°C a eu des effets sur la croissance diamétrale variant de non inhibiteur pour B2 et Bt2 (0 %

d'inhibition) à fortement inhibiteur pour Bp1 (68,08 % d'inhibition), alors que le milieu MECsG stérilisé à 120°C a induit un pourcentage d'inhibition fluctuant entre 14,93 % pour B2 et 75,88 % pour Bp2. Le milieu MECG stérilisé à 80°C a induit des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne plus élevés que ceux induits par les milieux MEC stérilisés à 120°C, ces pourcentages ont, en effet, fluctué entre 33,95 % pour B2 et 86,34 % pour Bp2. Tandis que le milieu MECsG stérilisé à 80°C a presque complètement inhibé la croissance des souches Bp1 et Bp2 alors que pour les autres souches, il a dépassé 70,43%.

Effet des extraits de compost sur la sporulation de *B. cinerea* : Les aptitudes des différentes souches de *B. cinerea* à produire des conidies en fonction des différents milieux de culture sont illustrées dans le tableau 5 et dans la figure 4. Contrairement à la croissance mycélienne pour laquelle le milieu PDA est le plus favorable, il n'y a pas un seul milieu favorable à la sporulation des cinq souches de *B. cinerea*, chacun des trois milieux de culture utilisés comme référence est meilleur pour une ou plusieurs souches. En effet, le

milieu PDA est le plus approprié à la sporulation de B2, Bt2 et Bp2. Celle-ci varie entre 8,95 et 51,16.10³ conidies / mm². Le milieu MFT induit la meilleure sporulation de la souche Bf3, qui est de l'ordre de 19,64.10³ conidies / mm². Alors que le milieu C&L est le plus favorable à la souche Bp1, induisant un potentiel de sporulation de 10,16.10³ conidies / mm². Les milieux MEC ont induit une réduction de l'aptitude des souches de *B. cinerea* à sporuler à des pourcentages variables en fonction des souches et de la température de stérilisation. Les plus fortes réductions sont obtenues pour les milieux MEC stérilisés à 80°C qui ont complètement inhibé la sporulation des souches Bt2 et Bp2 en absence de glucose et très fortement inhibé celle des autres souches. Alors que ces milieux, stérilisés à 120°C, ont entraîné des pourcentages d'inhibition de la sporulation fluctuant entre 57,54%, enregistré chez la souche Bf3, et 97,46 % chez la souche Bt2. Il est à noter qu'il n'existe pas de différences significatives entre les aptitudes de chaque souche à sporuler dans les milieux MECG et MECsG pour une température de stérilisation donnée.

Tableau 4 : Diamètres et pourcentages d'inhibition moyens de la croissance mycélienne des souches de *B. cinerea* en fonction des milieux de culture.

		PDA	Mft	Milieu C&L	MECG 120°	MECsG 120°	MECG 80°	MECsG 80°
B2	Diamètre	90	90	88,05	90	76,5	59,44	24,72
	Inhibition %	--	0 d	2,16 d	0 d	14,93 c	33,95 b	79,79 a
Bf3	Diamètre	90	90	74,38	87,83	60,77	35,77	26,60
	Inhibition %	--	0 f	17,34 d	2,40 e	32,47 c	60,24 b	70,43 a
Bt2	Diamètre	90	90	78,60	90	55,22	30,05	16,72
	Inhibition %	--	0 e	12,65 d	0 e	38,64 c	66,60 b	81,42 a
BP1	Diamètre	90	47,94	43,49	28,72	22,21	18,94	4,27
	Inhibition %	--	46,72 c	51,66 c	68,08 b	75,31 b	78,94 b	95,24 a
BP2	Diamètre	78,55	77,88	74,55	37,10	18,94	10,72	6,83
	Inhibition %	--	0,84 d	5,09 d	52,75 c	75,88 b	86,34 a	91,29 a

Deux valeurs de la même ligne, suivies de la même lettre, ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Newman & Keuls

Diamètres exprimés en mm

PDA : Potato-Dextrose-Agar ; Mft : Milieu à base de feuilles de tomate (Hmouni, 2000) ; C&L : Milieu de Clark & Lorbeer (1977) ;

MECG : Milieux à base d'extrait de compost additionnés de glucose et stérilisés à 120°C (MECG 120°) ou à 80°C (MECG 80°) ;

MECsG : Milieux à base d'extrait de compost sans glucose et stérilisés à 120°C (MECsG 120°) ou à 80°C (MECsG 80°).

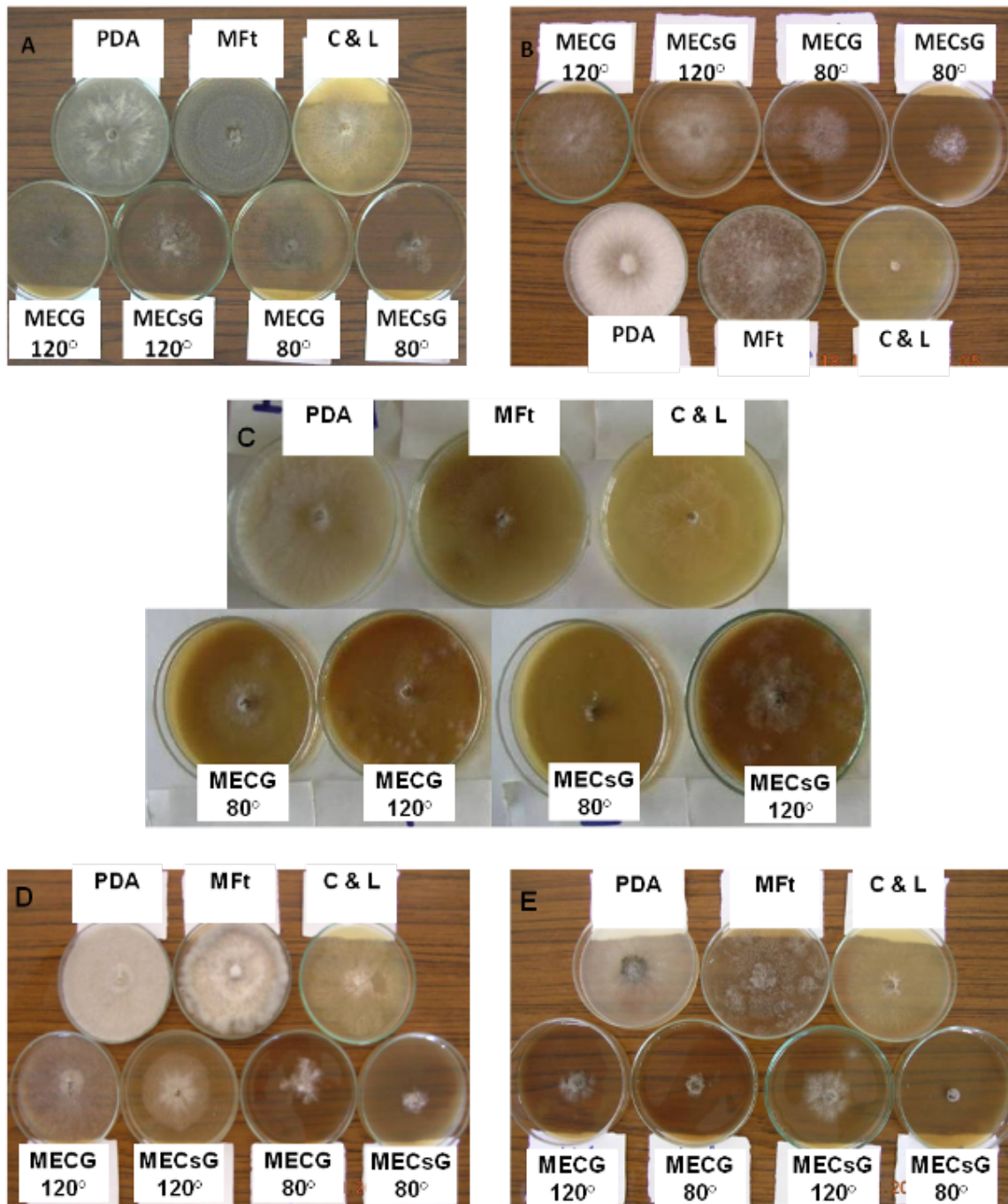


Figure 2 : Croissance mycélienne des différentes souches de *B. cinerea*, 6 jours après repiquage, dans les différents milieux de culture.

- A: B2,
- B: Bf3,
- C: Bt2,
- D: Bp1,
- E : Bp2

Tableau 5 : Sporulation et pourcentages d'inhibition moyens des souches de *B. cinerea* en fonction des différents milieux de culture.

		PDA	MFt	Milieu C&L	MECG 120°	MECsG 120°	MECG 80°	MECsG 80°
B2	Sporulation	51,16	32,01	38,70	14,21	14,05	6,43	2,82
	Inhibition %	--	37,41 d	24,32 e	72,20 c	72,52 c	87,41 b	94,45 a
Bf3	Sporulation	18,04	19,64	10,60	8,34	7,91	1,14	0,16
	Inhibition %	8,14 c	--	45,98 b	57,54 b	59,68 b	94,14 a	99,11 a
Bt2	Sporulation	42,69	19,87	34,55	1,45	1,08	0,43	0
	Inhibition %	--	53,41 c	19,02 d	96,59 b	97,46 b	98,97 b	100 a
BP1	Sporulation	9,85	7,14	10,16	3,05	1,42	0,25	0,11
	Inhibition %	3,00 c	29,65 c	--	69,87 b	85,87 ab	97,49 ab	98,83 a
BP2	Sporulation	8,95	3,55	6,71	1,69	0,91	0,08	0
	Inhibition %	--	60,26 c	24,98 d	80,98 b	89,66 b	99 a	100 a

Deux valeurs de la même ligne, suivies de la même lettre, ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Newman & Keuls

Sporulation exprimée en 10³ conidies / mm².

PDA : Potato-Dextrose-Agar ; MFt : Milieu à base de feuilles de tomate (Hmouni, 2000) ; C&L : Milieu de Clark et Lorbeer (1977) ;

MECG : Milieux à base d'extrait de compost additionnés de glucose et stérilisés à 120°C (MECG 120°) ou à 80°C (MECG 80°)

MECsG : Milieux à base d'extrait de compost sans glucose et stérilisés à 120°C (MECsG 120°) ou à 80°C (MECsG 80°).

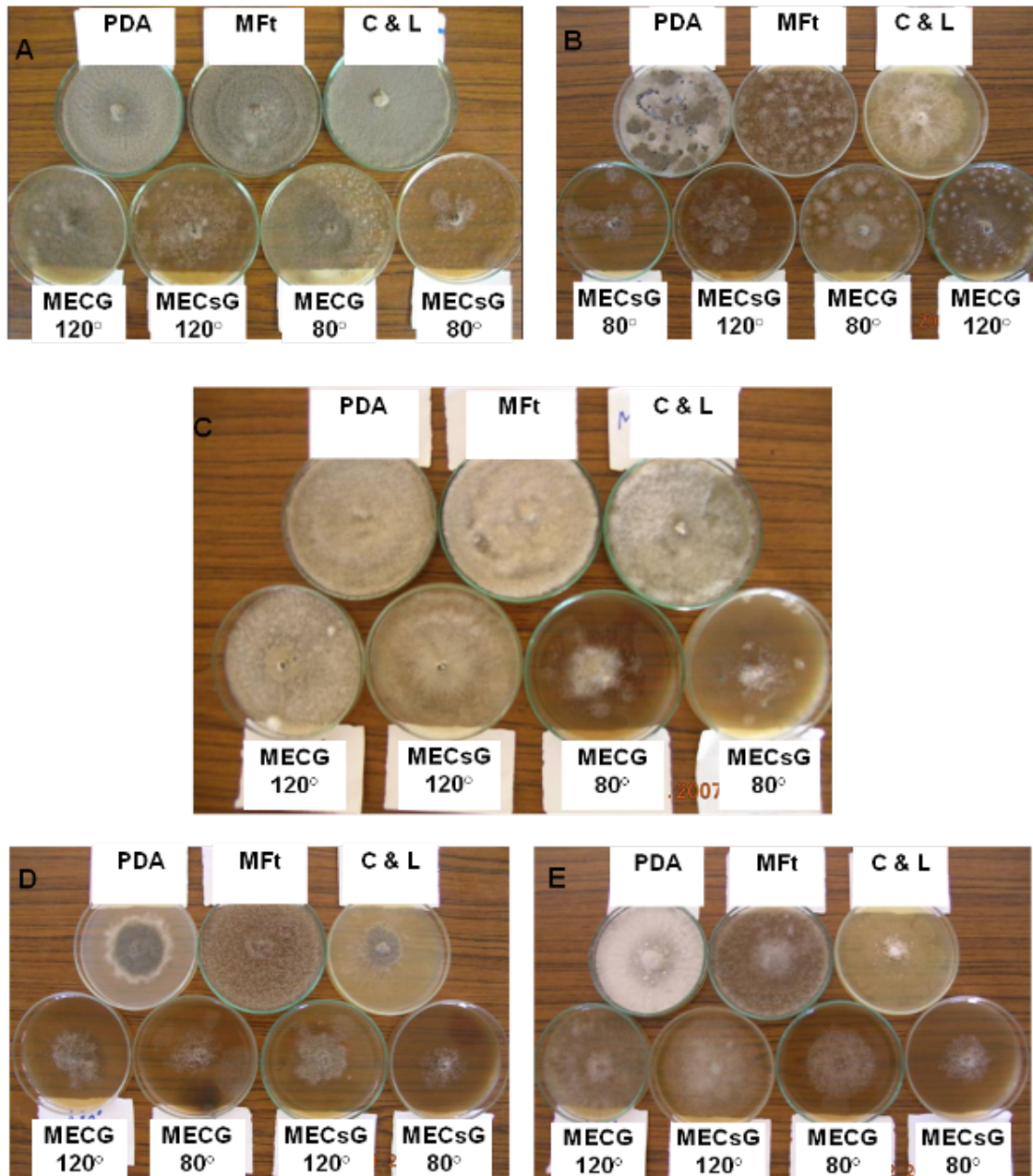


Figure 4 : Colonies des souches de *B. cinerea*, 10 jours après repiquage, dans les différents milieux de culture.

A: B2,
 B: Bf3,
 C: Bt2,
 D: Bp1,
 E : Bp2.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Vingt deux souches ont été isolées et identifiées à *Botrytis cinerea* Pers en se basant sur leurs caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques et en les comparant avec les descriptions rapportées par Gilman (1957), Barnett (1960) et Ellis (1971). Les résultats montrent que toutes les souches de *B. cinerea* testées ont induit l'apparition de lésions foliaires ayant

le même aspect nécrosé au départ, devenant moisi et pourri avec le temps. Cependant, il existe une variabilité élevée dans les potentiels d'infection et de sporulation de ces souches. Les souches isolées à partir des fruits de concombre se sont montrées les moins virulentes sur les feuilles de tomate. Alors que les souches isolées à partir des fruits de tomate de la

variété Gabriella ont induit des potentiels d'infection et de sporulation différents de ceux induits par les souches prélevées sur les fruits de tomate de la variété commercialisée. Ceci pourrait s'expliquer par la variation intra spécifique des souches de *B. cinerea* due au phénomène d'hétérocaryose très fréquent chez ce champignon, mais aussi à une spécialisation des interactions isolats – plante hôte et isolats – variétés (R'houma, 1995). En effet, diverses souches de *B. cinerea* diffèrent dans leur agressivité envers une plante donnée (Zalewska-Sobczak *et al.*, 1981) et pour la même plante, il existe une spécificité variétale. Ainsi, l'incidence de *B. cinerea* sur les fruits d'une variété de fraiser Sweet Charlie a été moins de 44%, alors qu'elle a dépassé 64% sur la variété Caramosa (MacKenzie *et al.*, 2003). Cette spécificité variétale a été attribuée à des différences histologiques (présence ou absence de pores, structure et épaisseur de l'épiderme et de la cuticule) et biochimiques (synthèse de phytoalexines, proanthocyanidines ...) (Gabler *et al.*, 2003). Elle pourrait être également due aux différences dans les potentiels des variétés à produire les protéines PR, notamment les chitinases et β -1,3-glucanases (Daulaga et Allan, 2003). De même, cette différence est remarquée entre les souches isolées à partir de différentes parties végétales de la même variété de tomate, ce qui serait dû à une adaptation de chaque pathotype, par amélioration de ses moyens d'infection, à un type d'organe déterminé. *B. cinerea* est un pathogène nécrotrophe qui infecte les tissus de l'hôte à travers les stigmates, les pédicelles, les blessures ou encore par les ouvertures naturelles et la pénétration directe de la cuticule. Cependant, la pénétration à travers les blessures et les tissus sénescents paraît être la plus préférée par ce pathogène (Keller *et al.*, 2003). De ce fait, les rondelles des feuilles de tomate ont été blessées au site d'inoculation afin de favoriser la pénétration des hyphes de *B. cinerea* qui se propagent à partir des tissus morts colonisés vers les tissus sains causant la nécrose (Cristescu *et al.*, 2002 ; Keller *et al.*, 2003). Les résultats montrent que l'apparition des lésions foliaires n'a été observée que vers le quatrième jour d'incubation. En effet, *B. cinerea* infecte les feuilles vertes mais reste quiescent dans les cellules épidermiques jusqu'à ce que les tissus deviennent sénescents (Sutton, 1990) sous l'effet de la blessure et de l'absence d'apport nutritif. Les résultats montrent qu'il existe une certaine corrélation entre les potentiels d'infection et de sporulation des diverses souches de *B. cinerea*. En effet, les souches qui ont mieux fructifié et qui constituent le groupe 1 en fonction de leur potentiel de sporulation, ont toutes induit des lésions de diamètre moyen supérieur à 1,9 cm. Ceci peut être expliqué par le nombre initial de conidies ayant infecté les feuilles de tomate et qui constituent la

source primaire de l'inoculum chez *B. cinerea* (Holz *et al.*, 2003). Des études de microscopie photonique et de microscopie électronique de la relation *B. cinerea* – plante hôte ont montré que la cuticule est dissoute enzymatiquement plutôt que brisée mécaniquement (Williamson *et al.*, 1995). En effet, de par son aptitude à infecter des espèces différentes de plantes, *B. cinerea* doit employer de nombreux mécanismes de pathogénicité afin de pouvoir surpasser les systèmes de défense de l'hôte et établir l'infection (Staples et Mayer, 1995).

Certains de ces mécanismes ont été étudiés tels que la production d'enzymes hydrolytiques sécrétées durant la germination et dégradant la paroi cellulaire comme les polygalacturonases (Cantu *et al.*, 2008), l'hexokinase et la MAP kinase (Rui et Hahn, 2007), la pectine méthylesterase (Lionetti *et al.*, 2007), l'expansine (Cantu *et al.*, 2008), la cutinase et l'esterase (Reis *et al.*, 2005). Il a été montré que *B. cinerea* produit aussi des métabolites phytotoxiques qui servent à supprimer les réponses de défense des plantes ou à provoquer la mort des cellules aux sites d'infection (Van Kan, 2006) et l'éthylène, phytohormone gazeuse, qui encourage l'infection et la sénescence des tissus en induisant la perte de la chlorophylle et la diminution du taux de photosynthèse (Chague *et al.*, 2002 ; Cristescu *et al.*, 2002 ; Hardan *et al.*, 2005).

A leur tour, les plantes de tomate développent des défenses naturelles suite à l'infection par *B. cinerea* comme l'hypersensibilité et la sécrétion de composés fongitoxiques tels que l' α -tomatine. Cependant, *B. cinerea* est résistant à ce glycoalkaloïde et peut utiliser les tissus morts (Govrin et Levin, 2000). Les résultats ont révélé que certaines souches de *B. cinerea* isolées ne produisent pas des sclérotés sur le milieu PDA, alors que d'autres en produisent abondamment et certaines d'entre elles ont en même produit sur les feuilles de tomate. La présence des sclérotés témoigne d'une modification des conditions de vie. La longévité des sclérotés de *B. cinerea*, organes de conservation qui se constituent aux dépens des hyphes, est remarquable et peut atteindre plusieurs années. Lorsque les conditions deviennent favorables, l'activité du sclérote se manifeste soit par la production d'apothécies de *Botryotinia fuckeliana* qui est peu fréquente et qui n'a qu'une importance limitée dans la propagation de la maladie, soit par réapparition de la forme *Botrytis*, dont les conidies très abondantes restent la principale forme de dissémination du champignon (Anonyme, 1994). Les souches de *B. cinerea* isolées à partir de différents organes de la tomate ont été presque toutes pathogènes sur les feuilles de tomate de la variété Campbell 33. Alors qu'aucune souche isolée à partir des fruits de concombre n'a montré des aptitudes pathogènes

élevées sur ces feuilles. Cinq souches de *B. cinerea* ont été retenues pour les essais de lutte biologique *in vitro* par les extraits de compost, comptes tenus de leurs potentiels d'infection et de sporulation très élevés et qui sont les représentants du Groupe 1. L'impact de l'extrait de compost sur la croissance et la sporulation des cinq souches de *B. cinerea in vitro* a été étudié après stérilisation afin d'éliminer l'effet direct des microorganismes qui l'habitent et dont le développement pourrait aussi fausser les résultats. En effet, l'utilisation d'un extrait de compost de fumier à l'état frais dans un milieu de culture a entravé l'estimation des diamètres des colonies des champignons pathogènes testés et en particulier ceux de *Phytophthora erythroseptica* (Znaïdi, 2002).

Les résultats montrent qu'à 80°C, les milieux à base d'extrait de compost ont fortement inhibé la croissance diamétrale des souches de *B. cinerea* ce qui montre la présence de substances inhibitrices de nature chimique et, probablement protéique puisque leur effet n'est plus marquant au-delà de 80°C. La sporulation des souches de *B. cinerea* a été fortement réduite par les milieux à base d'extrait de compost autoclavés à 120°C et complètement inhibée à 80°C pour 2 souches de *B. cinerea*. L'utilisation du glucose comme support nutritif a pour but d'éliminer l'éventualité d'attribution de l'effet suppressif des extraits à un manque de sources de carbone. En effet, l'apport de glucose dans les milieux à base d'extrait de compost a faiblement augmenté le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de la majorité des souches de *B. cinerea* quelle que soit la température de stérilisation, alors que cet apport n'a eu aucun effet sur la sporulation de ces souches. Hibar et al. (2006) ont montré que la croissance mycélienne de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* a été réduite de moitié suite à l'addition dans le milieu de culture d'un extrait de compost frais et de 70% par le même extrait lorsqu'il est amélioré. Ce même extrait a entraîné le pourcentage d'inhibition le plus important de la croissance mycélienne de *Phytophthora erythroseptica* et de 3 espèces de *Fusarium*, agents responsables de la pourriture des tubercules de pomme de terre (Znaïdi, 2002).

Toutefois, la faible température de stérilisation a généralement favorisé la réduction de la croissance mycélienne et de la sporulation des souches de *B. cinerea* par rapport à la température élevée par laquelle la densité du mycélium a été beaucoup plus affectée que la croissance diamétrale. En effet, certaines souches, en l'occurrence Bt2 et Bp2, ont subi une inhibition totale de la sporulation dans le milieu MECsG stérilisé à 80°C.

Elad et Shtienberg (1994) ont rapporté aussi que la croissance mycélienne et l'élongation des tubes germinatifs de *B. cinerea* ont été réduits

significativement à des taux de 24 et de 95% respectivement par un extrait de compost. Un effet similaire a été rapporté par Copeman et al. (2000) sur la croissance radiale de *B. cinerea* en présence de culots d'extraits de compost centrifugés, *in vitro*, en laissant une zone large entre les mycéliums du pathogène et des antagonistes. Tuitert et al. (1998) ont également montré que la croissance mycélienne de *Rhizoctonia solani* a été inhibée *in vitro* sur des disques gélosés de substrat amendé de compost par antagonisme microbien. La plupart des travaux attribuent l'effet suppressif des extraits de compost à leur microflore saprophytique puisque la filtration ou le traitement par la chaleur de ces produits, qui tue cette microflore, réduit à néant leurs effets suppressifs (Berner et al., 2004 ; Scheuerell et Mahaffee 2004). Cependant, certains auteurs ont observé, au contraire, que l'activité suppressive des extraits de compost est conservée même après stérilisation par autoclavage ou par filtration à travers une membrane de 0,2 µm (Al-Dahmani et al., 2003 ; Berner et al., 2004 ; Kavroulakis et al., 2005 ; Hmouni et al., 2006).

Bien que le mécanisme responsable de l'effet suppressif de ces extraits demeure largement un mystère, Cronin et al. (1996) ont démontré que des composés à faible poids moléculaires sont requis pour la lyse *in vitro* des conidies de *Venturia inaequalis*. En effet, des microorganismes anaérobies présentent une activité abondante dans les extraits de compost durant la phase d'extraction et excrètent des métabolites secondaires toxiques responsables de la protection contre les phytopathogènes. L'inhibition de la croissance et la sporulation de *B. cinerea* par les extraits stérilisés indique que des facteurs chimiques sont impliqués. Ces facteurs seraient responsables de l'induction de la résistance systémique acquise qui paraît se baser plus sur un renforcement des réactions de défense des plantes contre les infections que sur une activation d'organismes antagonistes (Berner et al., 2004). En effet, en plus des microorganismes antagonistes, la résistance systémique peut être aussi induite par des composés chimiques (Horst et al., 2005). Dans ce contexte, Berner et al. (2004) ont signalé que des substances nématocides, telles que l'ammonium, les aldéhydes et les phénols ainsi que les toxines produites par le compost seraient, entre autres, responsables de l'action antagoniste du compost sur les populations de nématodes. Ceci confirme que des métabolites secondaires excrétés par certains microorganismes durant l'extraction sont responsables de la suppression des pathogènes testés par l'extrait de compost. Finalement, la suppression ou l'inhibition de la croissance et de la sporulation de *B. cinerea in vitro*, suggère l'aptitude du compost et/ou de son extrait à supprimer la pourriture grise sur les plantes de

tomate. Cependant, des expériences doivent être effectuées, *in vivo*, afin de confirmer cet effet

suppressif.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Dahmani J. H., Abbasi P. A., Miller S. A. et Hoitink H. A. J. 2003. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse and field conditions. *Plant Dis.*, 87, 913-919.
- Al-Mughrabi K. I. 2007. Suppression of *Phytophthora infestans* in potatoes by foliar application of food nutrients and compost tea. *Aus. J. Basic Appl. Sci.*, 1 (4), 785-792.
- Anonyme 1994. Le Botrytis. Fiches maladies du pois. ITCF. Perspectives Agricoles N° 196 / Novembre, 11-18.
- Barnett H. L. 1960. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing company. Second edition, 225 pp.
- Berner A., Bieri M., Galli U., Fuchs J. G., Mayer J. et Schleiss K. 2004. Influence des composts et des digestats sur l'environnement, la fertilité des sols et la santé des plantes. *Surv. de la bibliographie actuelle*. 17 pp.
- Blok W. J., Lamers J. G., Termorshuizen A. J. et Bollen G. J. 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathol.*, 90, 253-259.
- Cantu D., Vicente A. R., Greve L. C., Dewey F. M., Bennett A. B., Labavitch J. M., et Powell A. L. T. 2008. The intersection between cell wall disassembly, and fruit susceptibility ripening to *Botrytis cinerea*. *Appl. Biol. Sci.*, 105 (3), 859-864.
- Chague V., Elad Y., Barakat R., Tudzynski P. et Sharon A. 2002. Ethylene biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microb. Ecol.*, 40, 143-149.
- Copeman R. J., Holl F. B. et Chanway C. P. 2000. Evaluation of plant growth responses to IBR solid & liquid compost formulations. *Inter. Bio Recov. Corp.*, 23 pp.
- Cristescu S. M., De Martinis D., Hekkert S. T. L., Parker D. H. et Harren F. J. M. 2002. Ethylene production by *Botrytis cinerea in vitro* and in tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (1), 5342-5350.
- Cronin M. J., Yohalem D. S., Harris R. F. et Andrews J. H. 1996. Putative mechanism and dynamics of inhibition of the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* by compost extracts. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 1241-1249.
- Curlango-Rivera G., Pew T., VanEtten H. D., Zhongguo X., Yu N. et Hawes M. C. 2013. Measuring Root Disease Suppression in Response to a Compost Water Extract. *Phytopathology*, 3, 255-260.
- Daulagala P. W. H. K. P. et Allan E. J. 2003. L-form bacteria of *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* induce chitinases and enhance resistance to *Botrytis cinerea* infection in Chinese cabbage. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 62, 253-263.
- Dhingra O. D. et Sinclair J. B. 1987. Basic plant pathology methods. CRC Press. 355 pp.
- Dik A. J. et Elad Y. 1999. Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. *Eur. J. Plant Pathol.*, 105, 123-127.
- Elad Y. et Shtienberg D. 1994. Effect of compost water extracts on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Crop Prot.*, 13 (2), 109-114.
- Ellis M. B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 608 pp.
- Gabler M. F., Smilanick J. L., Mansour M., Ramming D. W. et Mackey B. E. 2003. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.* 93, 1263-1273.
- Gilman J. C. 1957. A manual of soil fungi. Press-Ames. Iowa USA. Second edition, 418 pp.
- Govrin E. M. et Levine A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.*, 10 (13), 751-757.
- Gudelj I., Fitt B. D. L. et van den Bosch F. 2004. Evolution of sibling fungal plant pathogens in relation to host specialization, *Phytopathol.*, 94, 789-795.
- Hardan K., Al-Masri M. I. et Barakat R. 2005. Ethylene production by *Botrytis cinerea* (causal organism of gray mold disease) and influence of the exogenously applied growth regulators and their inhibitor on disease development. *Hebron Univ. Res. J.*, 2 (1), 55-75.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Jabnoun-Khiareddine H., El Akram Znaïdi I. et El Mahjoub M. 2006. Effet des extraits de compost sur la croissance mycélienne et l'agressivité du *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 10 (2), 101-108.

- Hmouni A. 2000. Recherches sur *Botrytis cinerea*, Agent causal de la pourriture grise de la tomate: Résistance aux fongicides et alternatives de lutte biologique. Thèse de Doctorat Es-Sciences. Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc, 112 pp.
- Hmouni A., Oihabi A., Badoc A. et Douira A. 2003. Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles, aux dicaroximides et aux dithiocarbamates dans les cultures abritées de tomate dans la région du Gharb. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 142, 79-100.
- Hmouni A., Mouria A. et Douira A. 2006. Biological control of tomato grey mould with compost water extracts, *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. Phytopathol. Mediterr., 45, 110-116.
- Holz G., Gütschow M., Coertze S. et Calitz F. J. 2003. Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. Plant Dis., 87, 351-358.
- Horst L. E., Locke J., Krause C. R., McMahon R. W., Madden L. V. et Hoitink H. A. J. 2005. Suppression of Botrytis blight of Begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. Plant Dis., 89, 1195-1200.
- Hubert J., Stejskal V., Munzbergova Z., Kubatova A., Vanova M. et Zdarkova E. 2005. Mites and fungi in heavily infested stores in the Czech Republic, J. Econ. Entomol., 97, 2144-2153.
- Jarvis W. R. 1980. Epidemiology. Pages: 219-250 In: Coley-Smith J. R. et al. (eds.). The biology of *Botrytis*, Academic Press, New York.
- Kavroulakis N., Ehaliotis C., Ntougias S., Zervakis G. I. et Papadopoulou K. K. 2005. Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues. Physiol. Mol. Plant Pathol., 66, 163-174.
- Keller M., Viret O. et Cole F. M. 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defence reaction, latency, and disease expression. Phytopathol. 93, 316-322.
- Larkin R. P. 2008. Relative effects of biological amendments and crop rotations on soil microbial communities and soil-borne diseases of potato. Soil Biol. Biochem. 40, 1341-1351
- Lionetti V., Raiola A., Camardella L., Giovane A., Obel N., Pauly M., Favaron F., Cervone F. et Bellincampi D. 2007. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. Plant Physiol., 143 (4), 1871-1880.
- MacKenzie S. J., Xiao C. L., Mertely J. C., Chandler C. K., Martin F. G. et Legard D. E. 2003. Uniformity of strawberry yield and incidence of Botrytis fruit rot in an annual production system. Plant Dis., 87, 991-998.
- Mills, D. J., Coffman, C. B., Teasdale, J. R., Everts, K. L. et Anderson, J. D. 2002. Factors associated with foliar disease of staked fresh market tomatoes grown under differing bed strategies. Plant Dis., 86, 356-361.
- Reis H., Piffi S. et Hahn M. 2005. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. Mol. Plant Pathol., 6 (3), 1-11.
- Riahi A., Hdider C., Sanaa M., Tarchoun N., Ben Kheder M. et Guezel I. 2009. The Influence of Different Organic Fertilizers on Yield and Physico-Chemical Properties of Organically Grown Tomato. Journal of Sustainable Agriculture, 6, 658-673.
- R'houma A. 1995. Recherches sur Botrytis cinerea de la vigne (*Vitis vinifera*) : Biologie, Pathogénèse et mesures de lutte. Mémoire de 3ème cycle de l'INAT, Tunis, Tunisie, 131 pp.
- Rosslénbroich H. J. et Stuebler D. 2000. *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Prot., 19, 557-561.
- Rui O. et Hahn M. 2007. The *Botrytis cinerea* hexokinase, Hxk1, but not the glucokinase, Glk1, is required for normal growth and sugar metabolism, and for pathogenicity on fruits. Microbiol., 153, 2791-2802.
- Scheuerell S. J. et Mahaffee W. F. 2004. Compost tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*. Phytopathol., 94, 1156-1163.
- Staples R. C. et Mayer A. M. 1995. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. FEMS Microbiol. Lett., 134, 1-7.
- Sutton J. C. 1990. Epidemiology and management of Botrytis leaf blight of onion and gray mold of strawberry: a comparative analysis. Can. J. Plant Pathol., 12, 100-110.
- Tuitert G., Szczech M. et Bollen G. J. 1998. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made from organic household waste. Phytopathol., 88, 764-773.
- Van Kan J. A. L. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. Trends Plant Sci., 11, 247-253.

- Weltzien H. C. 1992. Biocontrol of foliar fungal diseases with compost extracts. *In*: Andrews J. H. and Hirano S. S. (eds.) Microbial Ecology of Leaves. Pages: 430-450. New York: Springer-Verlag,
- Williamson B., Duncan G. H., Harrison J. G., Harding L. A., Elad Y. et Zimand G. 1995. Effect of humidity on infection of rose petals by dry inoculated conidia of *B. cinerea*. *Mycol. Res.*, 99, 1303–1310.
- Zalewska-Sobczak J., Borecka H. et Urbanek H. 1981. Comparison of pectinase, xylanase and acid protease activities of virulent and less virulent isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.*, 101, 222-227.
- Znaïdi I. E. 2002. Etude et évaluation du compostage de différents types de matières organiques et des effets des jus de composts biologiques sur les maladies des plantes. Master of Science Degree N° 286, Méditerranéen Organic Agriculture, CIHEAM. Méditerranéen Agronomic Institute of Bari, 94 pp.