

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



THÈSE

en vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences agronomiques

Spécialité : écophysiologie végétale

Par BOUMAAZA Boualem

Effets de la salinité et de *Botrytis cinerea* sur les comportements écophysiologique et biochimique de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller)

Devant le jury :

Cheriguène Abderrahim	Pr	Université de Mostaganem	Président
Benkhelifa Mohammed	Pr	Université de Mostaganem	Directeur de thèse
Belkhodja Moulay	Pr	Université Es-Sénia d'Oran	Co-directeur de thèse
Belahcene Miloud	Pr	Centre universitaire d'Aïn Témouchent	Examineur
Bekada Ahmed	Pr	Centre Universitaire de Tissemsilt	Examineur
Nemmiche Saïd	MCA	Université de Mostaganem	Examineur

ملخص

تعتبر الملوحة في المناطق الجافة وشبه الجافة عامل سلبي على تطور و نمو والنبات وتشكل تحديا كبيرا في تطور الإنتاج الزراعي. إن الظروف الزراعية والمناخية لهذه المناطق مواتية لتطور مختلف الأمراض الفطرية.

إن الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير الإجهاد الملحي و *Botrytis cinerea* الفطر المسبب لمرض العفن الرمادي عند نبات الطماطم على المؤشرات المرفولوجية الفيزيولوجية و البيوكيميائية لهذا النبات. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن الإجهاد الملحي يؤدي إلى تثبيط إنتاش بذور الطماطم، مما أدى إلى انخفاض كبير في نسبة الإنتاش النهائية. أوضحت النتائج أن نبات الطماطم يستجيب للإجهاد الملحي أو للإصابة ب *Botrytis cinerea* بانخفاض في الطول و في الوزن الجاف والطازج لهذا النبات. علاوة على ذلك، يستجيب نبات الطماطم تحت التأثير المشترك للملوحة و *Botrytis cinerea* بانخفاض شديد للوزن الجاف مقارنة بالشاهد. بالإضافة إلى ذلك، يتجلى تأثير الملوحة في تطور الفطر *in vitro* وتحفيز المحتوى المائي للنبات *in vivo*. التغيرات الفسيولوجية والمرفولوجية الناجمة عن هذين النوعين من الإجهاد تستلزم التبصر حول مباشرة التحليل البيوكيميائي لفهم فحوى هذه التغيرات.

تأثير الملوحة و / أو *Botrytis cinerea* ساهم في ارتفاع مستويات اليخضور. تحت تأثير كلوريد الصوديوم، لوحظ تأثير سلبي على نشاط البروتين الكلي ، في حين *Botrytis* لا يحدث أي تغيير في نشاط هذا الأخير. لا كلوريد الصوديوم ولا *Botrytis cinerea* غير محتوى السكريات الكلية الذائبة.

وبالإضافة إلى ذلك، لوحظ تراكم الأحماض الأمينية الحرة عند النباتات المعرضة ل *B. cinerea* عكس النباتات المعالجة تحت تأثير الملوحة ، لم يلاحظ أي تغييرات خلال فترة العلاج.

تم الحصول على الحماية البيولوجية ضد العفن الطماطم الرمادي باستخدام سلالة *T.harzianum* لتأكيد فعالية هذه الأحياء المضادة. أظهرت النتائج تأثير الملوحة على نشاط *T.harzianum* في المحتوى المائي والوزن الطازج لنباتات الطماطم مقارنة مع بالشاهد

كلمات البحث: الملوحة، الطماطم ، العفن الرمادي، التوتر *Botrytis cinerea*، المقاومة، السلوك

Abstract

In arid and semi arid regions, the soil salinization is a major constraint to growth and crop development and represents one of the major agronomic challenges. Agro-meteorological conditions in these regions are favorable to the development of crop diseases often caused by fungi..

The aim of this work is the study under physiological and biochemical plans, the tolerance of tomato to salt stress, to infection by *Botrytis cinerea* and to their combined actions. In this case, the salinity-Botrytis interaction is considered on the case of gray mold of tomato.

The results obtained show that the salt stress leads to an inhibition of the germination of the tomato, resulting in a considerable decrease in the percentage of germination. Tomatoes respond to salt stress or infection of *Botrytis cinerea* by a deficiency of growth in size and weight dry and cool. In this case, the effect of salinity is manifested by an acceleration of the in vitro development of *Botrytis cinerea* and for in vivo stimulation of the water content of the plant.

Physiological and morphological changes caused by the two types of stress: salinity and/or *Botrytis cinerea* are subjected to biochemical analysis. Indeed, their effects induce stimulation of chlorophyll pigments. Under NaCl, the activity of total protein seems to have a negative effect, while that of *Botrytis* has no effect on protein activation. In addition, the rate of total free amino acids revealed a specific accumulation exerted by the pathogen. Under these conditions, a bio-protector against to gray mold of tomato is advocated by an antagonistic strain of *Trichoderma harzianum*. The salinity stimulate the action of the latter against *Botrytis cinerea* observed on the water content and fresh weight of crop plants compared with the witness.

Key words: salinity, *Botrytis cinerea*, tomato grey mold, resistance, stress, behavior.

Résumé

Dans les régions arides et semi arides, le phénomène de salinisation des sols constitue une contrainte importante pour la croissance et le développement des cultures et représente l'un des défis agronomiques majeurs. Les conditions agro-météorologiques, dans ces régions, sont favorables au développement de maladies des cultures souvent causées par des champignons.

L'objectif du présent travail est l'étude sur les plans physiologique et biochimique de la tolérance de la tomate au stress salin, à l'infection par *Botrytis cinerea* et à leurs actions combinées. Dans ce cas, l'interaction salinité-*Botrytis* est abordée pour la pourriture grise de la tomate.

Les résultats obtenus montrent que le stress salin conduit à une inhibition de la germination de la tomate, se traduisant par une diminution considérable du pourcentage de germination. La tomate répond au stress salin ou à l'infection de *Botrytis cinerea* par un déficit de sa croissance en taille et en poids sec et frais. Dans ce cas, l'effet de la salinité se manifeste par une accélération du développement *in vitro* du de *Botrytis cinerea* et une stimulation *in vivo* de la teneur en eau de la plante.

Les modifications physiologiques et morphologiques provoquées par les deux types de stress : salinité et/ou *Botrytis cinerea* sont soumises à l'analyse biochimique. En effet, leurs effets induisent une stimulation des pigments chlorophylliens. Sous NaCl, l'activité des protéines totales semble avoir un effet négatif, alors que celle de *Botrytis* demeure sans effet sur l'activation protéique. En outre, le taux d'acides aminés libres total révèle une accumulation spécifique exercée par le pathogène. Dans ces conditions, une bio-protection des tomates contre la pourriture grise est préconisée par une souche antagoniste de *Trichoderma harzianum*. La salinité stimule l'action de ce dernier à l'encontre de *Botrytis cinerea* observée sur la teneur en eau et le poids frais des plants de culture par rapport au témoin.

Mots clés : salinité, *Botrytis cinerea*, tomate, pourriture grise, résistance, stress, comportement.

Sommaire

ملخص	2
Abstract	3
Résumé	4
Listes de figures.....	10
Liste des tableaux	13
Partie bibliographique.....	14
Introduction	15
Chapitre I- Plante Hôte : La tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller)	17
Introduction.....	17
Historique de la tomate	17
Diversité génétique	18
Classification culturelle	19
Cycle biologique de la tomate	21
Culture	22
Production nationale et mondiale de la tomate.....	23
Contraintes de la production de tomate	24
Chapitre II- Stress salin	29
Introduction.....	29
La répartition de la salinité dans le monde et en Algérie	30
Origines et causes de la salinité des sols	31
Effet de la salinité sur les plantes	31
Chapitre III- <i>Botrytis cinerea</i> , agent pathogène de la pourriture grise.....	39
Généralités sur le <i>B. cinerea</i>	39
Description de l'agent pathogène	40
Nomenclature et systématique.....	41
Cycle infectieux de <i>B. cinerea</i>	42
Symptôme et dégâts.....	43

Gamme d'hôte de <i>B. cinerea</i> et cycle épidémiologique.....	44
Pathologie	45
Les facteurs de développement.....	46
La lutte contre <i>Botrytis cinerea</i>	47
Partie expérimentale	52
Chapitre IV - Réponse de la germination de deux génotypes de tomate au stress salin	53
Introduction.....	53
Matériels et méthodes	53
Résultats.....	54
Discussion et conclusion.....	55
Chapitre V - Influence de la salinité du milieu sur le développement in vitro de <i>Botrytis cinerea</i>	57
Introduction.....	57
Article 1 (International Journal of Microbiology)	58
Chapitre VI - Effets de la salinité et de <i>Botrytis</i> sur la croissance végétative de deux variétés de tomate	66
Introduction.....	66
Matériels et méthodes	68
Matériel végétal	68
Le dispositif expérimental	69
Méthodes d'étude.....	69
Analyses morphologiques.....	69
Effet sur la taille de l'axe aérien et souterrain	69
Effet sur la biomasse des parties aériennes et racinaires	69
Résultats.....	69
Effet du stress salin sur la croissance végétative	69
Effet du <i>Botrytis cinerea</i> sur la croissance végétative.....	70
Effet de l'interaction salinité- <i>Botrytis</i> sur la croissance végétative	71

Effet du stress salin sur la biomasse de la plante.....	72
Effet de <i>Botrytis cinerea</i> sur la biomasse végétative.....	74
Effet de la combinaison salinité- <i>Botrytis cinerea</i> sur la biomasse végétative.....	76
Discussion.....	81
Conclusion.....	86
Chapitre VII - Effets de la salinité et <i>Botrytis cinerea</i> sur le comportement physiologique de la tomate.....	88
Introduction.....	88
Matériels et méthodes.....	89
Détermination de la teneur en eau par la méthode d'étuvage (Multon et al, 1991).....	89
Résultats.....	89
Effet du stress salin sur la teneur en eau des plantes.....	89
Effet de <i>Botrytis cinerea</i> sur la teneur en eau des plantes.....	90
Effet de la combinaison salinité- <i>Botrytis cinerea</i> sur la teneur en eau des plantes.....	90
Discussion.....	91
Conclusion.....	92
Chapitre VIII - Influence de la salinité sur l'antagonisme microbien <i>Trichoderma harzianum</i> vis-a-vis de <i>Botrytis cinerea</i> et sur la bioprotection des tomates contre la pourriture grise.....	93
Introduction.....	93
Article 2 (Asian Journal of Plant Pathology).....	95
Chapitre IX - Évaluation <i>in vivo</i> de l'effet de <i>Trichoderma harzianum</i> sur la protection de la tomate contre <i>Botrytis cinerea</i>	104
Introduction.....	104
Matériels et méthodes.....	104
Choix des microorganismes antagonistes.....	104
Préinoculation par le mélange de spores des deux champignons.....	104
Résultats.....	104
L'effet de <i>T.harzianum</i> sur la protection de la tomate contre <i>B. cinerea</i>	104

Impact de la salinité sur la bioprotection des tomates contre la pourriture grise par <i>Trichoderma harzianum</i>	107
Chapitre X - Conséquences biochimiques de l'interaction salinité- <i>Botrytis cinerea</i> chez la tomate	117
Introduction.....	117
Matériel et méthodes.....	117
Matériel végétal et fongique	117
Méthodes.....	117
Dosage des pigments chlorophylliens	118
Détermination de la teneur en acides aminés libres totaux.....	118
Détermination de la teneur des sucres solubles totaux	118
Teneur en protéines totales	118
Résultats.....	118
Les pigments chlorophylliens	118
Les pigments caroténoïdes (xanthophylles et carotènes).....	120
Sucres solubles totaux.....	122
Protéines totales	124
Acides aminés totaux libres	125
Discussion.....	127
Conclusion	131
Chapitre XI – Synthèse des discussions	133
Conclusion générale	141
Perspectives	142
Références bibliographiques	144
ANNEXE.....	174

Liste des Abréviations

Ca	Calcium
Cl	Chlore
CO ₂	Dioxyde de carbone
FAO	forme active de l'oxygene
H	Heure
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogene
HO ₂ •	Radical hydroperoxyde
HR	Hypersensitivity response" ou reponse hypersensible
O ₂ •-	Anion superoxyde
OH•	Radical hydroxyle
P	Phosphore (element)
PR	Pathogenesis-related
SAR	Systemic acquired resistance" ou resistance systemique acquise
Na ⁺	Sodium
K ⁺	Potassium
%	Pourcentage
CaCl ₂	Chlorure de calcium
NaCl	Chlorure sodium
TE	La teneur en eau.
MF	Poids frais juste apres recolte (en g)
MS	Poids sec apres sechage a l'etuve (en g)
ITMAS	Institut de technologie moyen agricole specialise
Cx + c	Concentration en carotenoïdes
ABA	Acide abscissique
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
ΨH	Potentiel hydrique
CAT	Catalase
APX	Ascorbate peroxydase
GST	Glutathion s-transferase
GPX	Glutathion peroxydase
SOD	Superoxyde dismutase
UV	Ultraviolets
PDA	Potato dextrose agar
μl	Microlitre
Chlo	Chlorophylle
PH	Potentiel hydrogene
MDA	Malonedialdéhyde
QTL	Quantitatives Trait Loci
meq.l ⁻¹	Milliéquivalent
PIP	Tonoplast intrinsic proteins

Listes de figures

Figure 1-Histoire hypothétique de la domestication de la tomate.Les fonds de carte proviennent du DEMIS World Map Server (In Nicolas, 2010).	18
Figure 2 Evolution de la tomate cultivée <i>Solanum. Lycopersicum</i> . Traduit de Rick (1976).	19
Figure 3- Coupe longitudinale d'une fleur de tomate	20
Figure 4 -Différentes formes de tomates utilisées pour décrire une variété (descripteur	21
Figure 5- Productions des 13 premiers pays producteurs de tomate en Million de tonnes (FAO, 2010).	23
Figure 6-Superficies et production de tomate de 1999 à 2009 en Algérie (FAOSTAT, 2010).	24
Figure 7-Les maladies cryptogamiques de la tomate. A: Brûlures alternariennes sur fruits de tomates ;B:Alternariose sur feuille de tomate; C: Mildiou sur feuilles;D:Mildiou sur fruits;E :Fusariose des racines et du collet; F:Oïdium sur feuille de tomate (Originale, 2011). G: Anthracnose sur fruits;H:Symptômes du Botrytis sur le fruit de tomate (Originale, 2011).	26
Figure 8- Schématisation du bilan de la circulation du sodium dans les plantes inclure ou exclure (Levigneron et <i>al.</i> , 1995).....	35
Figure 9- Homéostasie cellulaire établie après l'adaptation au sel (NaCl). Présentation des osmolytes et des ions compartimentés dans la vacuole, des tran canaux aqueux, et des potentiels électrochimiques à travers la membrane plasmique et le tonoplaste. Chloroplaste (cp), mitochondrie (mt) et peroxisome (perox), organites dans lesquels impliqué (Hasegawa et <i>al.</i> , 2000).	36
Figure 10-Conidies observés en utilisant un microscope électronique à balayage (A). Conidiphores observés en utilisant un microscope électronique (B). Apothécie produisant des ascospores sur une sclérote (C). <i>Botrytis cinerea</i> sur milieu de culture PDA à 25°C (D). Sclérote de <i>Botrytis cinerea</i> produites sur boîte de pétri après un mois de culture sur un milieu PDA à 21°C(E.) Observation de la germination des conidies sur milieu riche PDA au microscope optique (F).	40
Figure 11- Cycle de développement (production asexuée) de <i>Botrytis cinerea</i> sur différentes culture (d'après Agrios, 2005).	43
Figure 12-Symptomatologie et morphologie de <i>Botrytis cinerea</i> . A : Attaque en serre de tomate. La proximité des plantes et la litière infectée au sol favorisent les épidémies. B : Chancre sur tige de tomate. C : Tâches fantôme sur tomate, correspondant à des infections avortées. D : Surinfection sur tomate cerise infectée par le mildiou. <i>B. cinerea</i> est également un parasite de faiblesse. E : Jeune fruit de concombre infecté. F : Infection sur mûres cultivées. G et H : Mycélium sporulant sur grappe de raisin. I : Infection sur feuille de <i>Pelargonium</i> , après contact d'une fleur infectée. J.....	44

Figure 13-Effets de la salinité sur le pourcentage final de germination (%) de deux génotypes de la tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	54
Figure 14-Effets de la salinité sur la durée de germination (jours) de deux génotypes de la tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).	55
Figure 15-vue générale de la serre de la pépinière <i>Amor Benamor</i> (Fdjoudj W Guelma).....	68
Figure 16-Effet de la salinité sur la croissance des plantes de tomate.....	70
Figure 17-Effet de <i>Botrytis cinerea</i> sur la croissance des plantes de tomate.....	70
Figure 18-Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la croissance des plantes de tomate.	71
Figure 19-Effet de la salinité sur la biomasse fraîche des plantes de tomate.....	72
Figure 20-Effet de la salinité sur biomasse sèche des plantes de tomate.....	74
Figure 21- Effet de <i>Botrytis cinerea</i> sur la biomasse fraîche des plantes de tomate.	75
Figure 22-Effet de <i>Botrytis cinerea</i> sur la biomasse sèche des plantes de tomate.....	75
Figure 23-Effet de <i>B.cinerea</i> sur la biomasse fraîche des plantes de tomate.....	77
Figure 24-Effet de <i>B.cinerea</i> sur la biomasse sèche des plantes de tomate.....	80
Figure 25-Effet de la salinité sur la teneur en eau des plantes de tomate.	89
Figure 26-Effet de <i>B.cinerea</i> sur la teneur en eau des plantes de tomate.	90
Figure 27-Effet de <i>B.cinerea</i> sur la teneur en eau des plantes de tomate.	91
Figure 28- Influence de l'antagoniste <i>T. harzianum</i> vis-à-vis de <i>B.cinerea</i> sur la croissance végétative.....	104
Figure 29-Influence de l'antagoniste <i>T. harzianum</i> vis-à-vis de <i>B.cinerea</i> sur la biomasse fraîche des tomates.....	105
Figure 30- Influence de l'antagoniste <i>T. harzianum</i> vis-à-vis de <i>B.cinerea</i> sur la biomasse sèche des tomates.	106
Figure 31- Influence de l'antagoniste <i>T. harzianum</i> vis-à-vis de <i>B.cinerea</i> sur la teneur en eau des tomates.	106
Figure 32-Effet de la salinité sur l'interaction Trichoderma-Botrytis sur la croissance végétative des tomates.	108
Figure 33- Effet de la salinité sur l'interaction Trichoderma-Botrytis sur la biomasse fraîche des tomates.	110
Figure 34- Effet de la salinité sur l'interaction Trichoderma-Botrytis sur la biomasse sèche des tomates.	112
Figure 35- Effet de la salinité sur l'interaction Trichoderma-Botrytis mesuré sur la teneur en eau de la tomate, (a) : variété CX206 et (b) : variété Guelma.....	113
Figure 36- Effet de la salinité sur la teneur en chlorophylle de tomate	119
Figure 37- Effet de <i>B.cinerea</i> sur la chlorophylle de tomate.....	119

Figure 38- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en chlorophylle de tomate.	120
Figure 39- Effet de la salinité sur la teneur en pigments caroténoïdes de la tomate.....	121
Figure 40- Effet de <i>B.cinerea</i> sur la teneur en pigments caroténoïdes de tomate.....	121
Figure 41- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en pigments caroténoïdes de tomate	121
Figure 42- Effet de la salinité sur la teneur en sucres solubles totaux de tomate.	122
Figure 43- Effet de <i>B.cinerea</i> sur la teneur en en sucres solubles totaux de tomate.....	123
Figure 44- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en en sucres solubles totaux de tomate.....	123
Figure 45- Effet de la salinité sur la teneur en protéines totales de tomate.	124
Figure 46- Effet de <i>B.cinerea</i> sur la teneur en protéines totales de tomate.	124
Figure 47- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en protéines totales de tomate.	125
Figure 48- Effet de la salinité sur la teneur en acides aminés totaux libres de tomate.....	126
Figure 49- Effet de <i>B.cinerea</i> sur la teneur en acides aminés totaux libres de la tomate.....	126
Figure 50- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en acides aminés totaux libres de tomate	127

Liste des tableaux

Tableau 1- Les maladies cryptogamiques de la tomate (Snoussi, 2010).	25
Tableau 2- Les maladies bactériennes de la tomate (Snoussi, 2010).....	27
Tableau 3- Les maladies virales de la tomate (Idrenmouche, 2011).	28
Tableau 4-Superficie affectée par la salinité dans le monde(Lasram, 1995).....	30
Tableau 5- Exemple de produits de lutte biologique commercialisés dans le monde pour la lutte contre <i>Botrytis cinerea</i> (d'après Elad and Stewart, 2004 ; Fravel, 2005).....	50
Tableau-6 parts des variations de la salinité et de l'infection par <i>Botrytis</i> sur les variations globales de la teneur en chlorophyllea, b et ab.....	120
Tableau7-Analyse de la variance des carrés moyens des résultats du contenu foliaire en pigments caroténoïdes (xanthophylles et carotènes)	122
Tableau 8-Analyse de la variance des résultats de la teneur en sucres solubles totaux	123
Tableau 9-Analyse de la variance des carrés moyens des résultats du contenu foliaire en protéines totales	125
Tableau 10-Analyse de la variance des carrés moyens des résultats du contenu foliaire en acides aminés totaux libres	127

Partie bibliographique

Introduction

La tomate compte parmi les cultures maraîchères les plus cultivées au monde après la pomme de terre. Elle occupe le deuxième rang parmi les productions légumières sur les plans de la production et de l'importance économique. Elle est très appréciée et occupe une grande place dans les habitudes alimentaires au point d'enregistrer une demande de plus en plus forte de la part des ménagères.

En Algérie, la culture de la tomate occupe une place importante dans l'économie nationale. En moyenne, la superficie consacrée à cette culture est de l'ordre de 33 000 ha et sa production annuelle est estimée à 11 millions de quintaux, ce qui représente l'équivalent de 311 Qx/ha (MADR, 2009).

Cette culture est confrontée depuis quelques années à des contraintes phytosanitaires majeures liées aux conditions environnantes, notamment la température et la salinité. En effet, le développement de maladies tels que la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*, le mildiou causé par *Phytophthora infestans* ou encore l'alternariose provoquée par *Alternaria solani*, conduit non seulement à une diminution de rendement mais aussi à d'importantes altérations qualitatives du produit.

Botrytis cinerea, agent causal de la pourriture grise, possède la particularité d'être pathogène et saprophyte et capable d'infecter plus de 200 plantes hôtes, aussi bien monocotylédones que dicotylédones (Williamson et al., 2007). La maladie causée par cet agent pathogène est économiquement importante car elle détruit chaque année une partie des récoltes. Sur les cultures maraîchères, viticoles et horticoles cette maladie conduit à des pertes considérables des rendements aussi bien en pré- qu'en post-récolte.

Pour *Botrytis cinerea*, différents facteurs d'origines extérieures ou dépendants de la plante elle-même, interviennent durant les premiers stades d'infection, mais aussi durant le développement de la maladie et au cours de la sporulation du champignon (Elad and Yunis, 1993). La salinité semble avoir une action néfaste qui peut augmenter les symptômes des maladies par un effet direct sur la plante ou sur le pathogène principalement du genre *Verticillium* (Regragui, 2005 ; Besri et Afaïlal, 1993 et Standaert, 1975). Ayres (1984), rapporte que les stress abiotiques comme la sécheresse, la pollution, la chaleur et la salinité peuvent augmenter les symptômes des maladies par un effet direct sur la plante ou sur le pathogène.

Dans leur environnement, les plantes sont exposées à des modifications de leur comportement morpho-physiologique et biochimique. Dans ces conditions, les plantes développent, au cours de leur évolution, des mécanismes efficaces de réponse aux stress biotiques et abiotiques (Denden et *al.*, 2005). Dans ce cas, l'accumulation de différents solutés protège les plantes contre le stress en contribuant à l'ajustement osmotique (Mansour 1998), la protection de l'intégrité de la membrane, la stabilisation des enzymes (Timasheff et *al.*, 1989) et à la détoxification des dérivés réactifs de l'oxygène (Karuppanapandian et *al.*, 2011). Certains solutés remplissent une fonction supplémentaire afin de protéger les composants cellulaires de la déshydratation (Rasool et *al.*, 2013).

Chez la tomate, différentes réactions de défense ont été mises en évidence au cours de son interaction avec des pathogènes fongiques (Robert et *al.*, 2002), ou soumis à un stress salin (Tavakkoli et *al.*, 2011). Ces réactions concernent en particulier l'accumulation de composés organiques appelés osmoticum et osmoprotecteurs, tels que les sucres solubles (Boriboonkaset et *al.*, 2013), les acides aminés (Slama et *al.*, 2014), les composés d'ammonium quaternaire (Rasool et *al.*, 2013), les hormones (Amjad et *al.*, 2014), polyamines (Todorova et *al.*, 2013), de phytoalexines stilbéniques et de différentes protéines PR comme les chitinases et les β -1,3-glucanases (Bézier et *al.*, 2002).

Le présent travail se présente comme une contribution à l'étude du comportement écophysiological de la tomate face à la contrainte de salinité du milieu mais aussi quand elle est soumise à une infection par *B. cinerea*. Cette approche est importante à la compréhension des processus d'autodéfense de la tomate soumise à des contraintes biotiques et abiotiques. Elle est également en mesure d'aboutir aux voies susceptibles d'améliorer les performances agronomiques de cette culture.

Chapitre I- Plante Hôte : La tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller)

Introduction

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) est après la pomme de terre, le légume le plus consommé dans le monde, avec une production mondiale de 159 millions de tonnes en 2011 (FAOSTAT, 2013). Elle constitue une source non négligeable de minéraux, vitamines et certains composés naturels secondaires ayant un potentiel antioxydant important (Zidani, 2009).

Historique de la tomate

La tomate est originaire des Andes d'Amérique de Sud. Elle a été découverte en 1519 par Hermann Cortès dans le Golfe du Mexique (Harlan, 1987). La première évocation de la tomate en Europe est celle du botaniste italien Pietro Andreas Matthioli en 1544. Ce dernier la présente comme une espèce portant « des fruits aplatis et côtelés, qui de vert deviennent jaune d'or ». Une décennie plus tard, il indique qu'il existe des tomates jaunes et des tomates rouges. Dans le vieux monde, les premières représentations graphiques de la tomate sont celles de Rembertus Dodonaeus (Anvers, 1553), Georg Oelinger (Nuremberg, 1553) et Castore Durante (Blancard, 2009). De là, sa culture s'est propagée en Asie du Sud et de l'Est et en Moyen Orient. L'apparition de la tomate en Afrique du Nord a lieu au XVIII^{ème} siècle au Maroc d'abord puis en Algérie et en Tunisie. On suppose que l'origine de son introduction est due aux morisques chassés d'Espagne lors de la Reconquista. (Boumendjel et *al.*, 2001).

En Algérie, ce sont les cultivateurs du Sud de l'Espagne (Tomateros), qui l'ont introduite étant donné les conditions qui lui sont propices. Sa consommation a commencé dans la région d'Oran en 1905 puis, elle s'étendit vers le centre, notamment au littoral Algérois (Latigui, 1984).

Classification botanique de la tomate

La tomate, *Lycopersicon esculentum* Miller, est une plante herbacée annuelle à port buissonnant. Elle appartient à la famille des solanacées, incluant également l'aubergine, le poivron et la pomme de terre. Cette famille comprend 2300 espèces tropicales et subtropicales originaires de l'Amérique centrale et de l'Amérique du Sud (D'arcy, 1991 cité par Doganlar, 2002a). Elle est classée selon des critères différents liés à l'aspect botanique, la composition génétique et le type de croissance (Gallais et Bannerot, 1992).

Tournefort est le premier à distinguer la tomate cultivée et à créer un nouveau genre pour classer cette espèce : le genre *Lycopersicum*, (Peralta And Spooner 2007). Linné, en 1753, revoie la taxonomie de la tomate et l'intègre à nouveau dans le genre *Solanum* sous le nom spécifique de *Solanum lycopersicum*. Un an après, Miller reconsidère la classification évoquée par Tournefort et réactualise le genre *Lycopersicon* dans la quatrième édition de *The Gardener's Dictionary*.

Diversité génétique

La domestication de la tomate s'est réalisée à partir d'accessions sauvages *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (*S. l. cerasiforme*), qui aurait évolué directement à partir des espèces sauvages auto-incompatibles RICK (1976) (**Figure 1**).

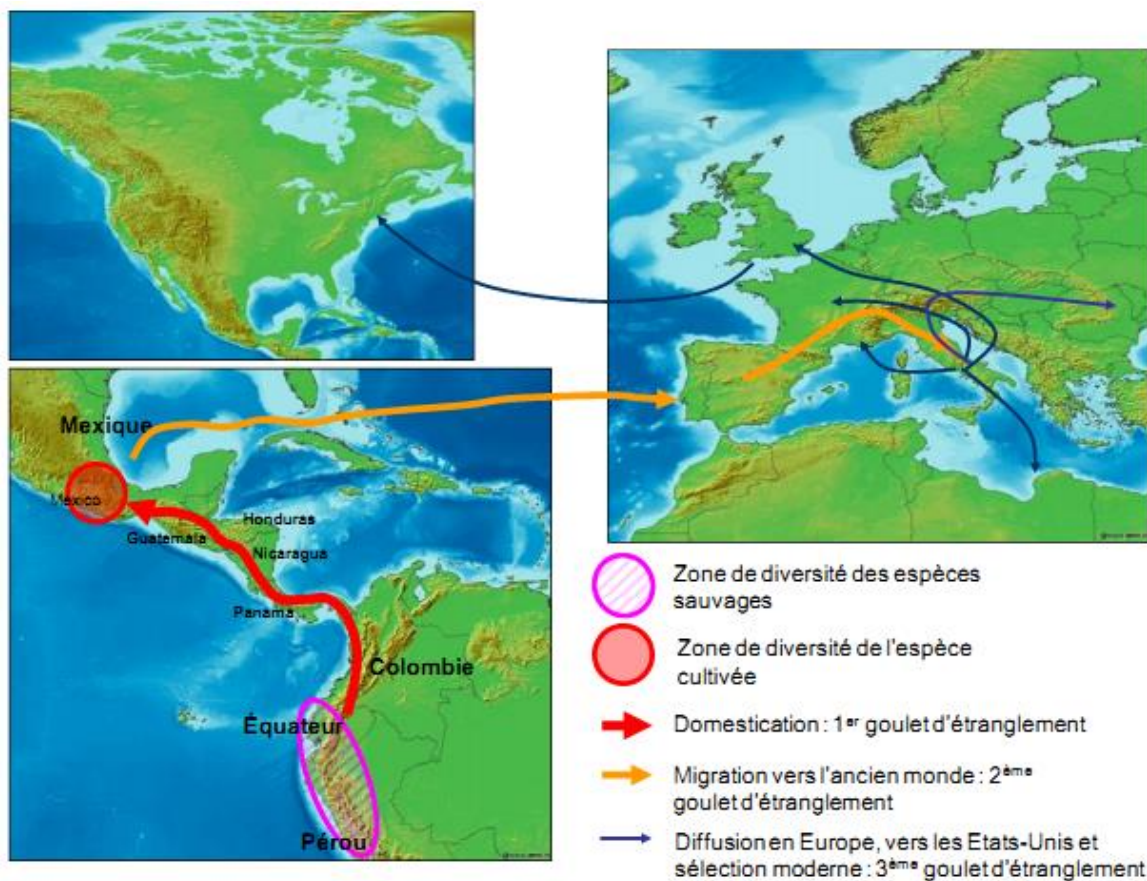


Figure 1-Histoire hypothétique de la domestication de la tomate. Les fonds de carte proviennent du DEMIS World Map Server (In Nicolas, 2010).

L'auteur suggère même que l'espèce *S. pimpinellifolium* serait issue d'une branche parallèle lors de l'évolution de la tomate. Cependant, les travaux de phylogénie sur des caractères morphologiques et sur les marqueurs moléculaires montrent une affiliation directe entre *S. pimpinellifolium*, et *L. esculentum*. Aujourd'hui, l'espèce *L. cerasiforme* est considérée comme

un type primitif de tomate cultivée ou comme une forme transitoire entre *L. cerasiforme* sauvage et *L. esculentum* cultivé. Il semblerait aussi que de nombreuses accessions soient d'origine férale (Peralta And Spooner 2007).

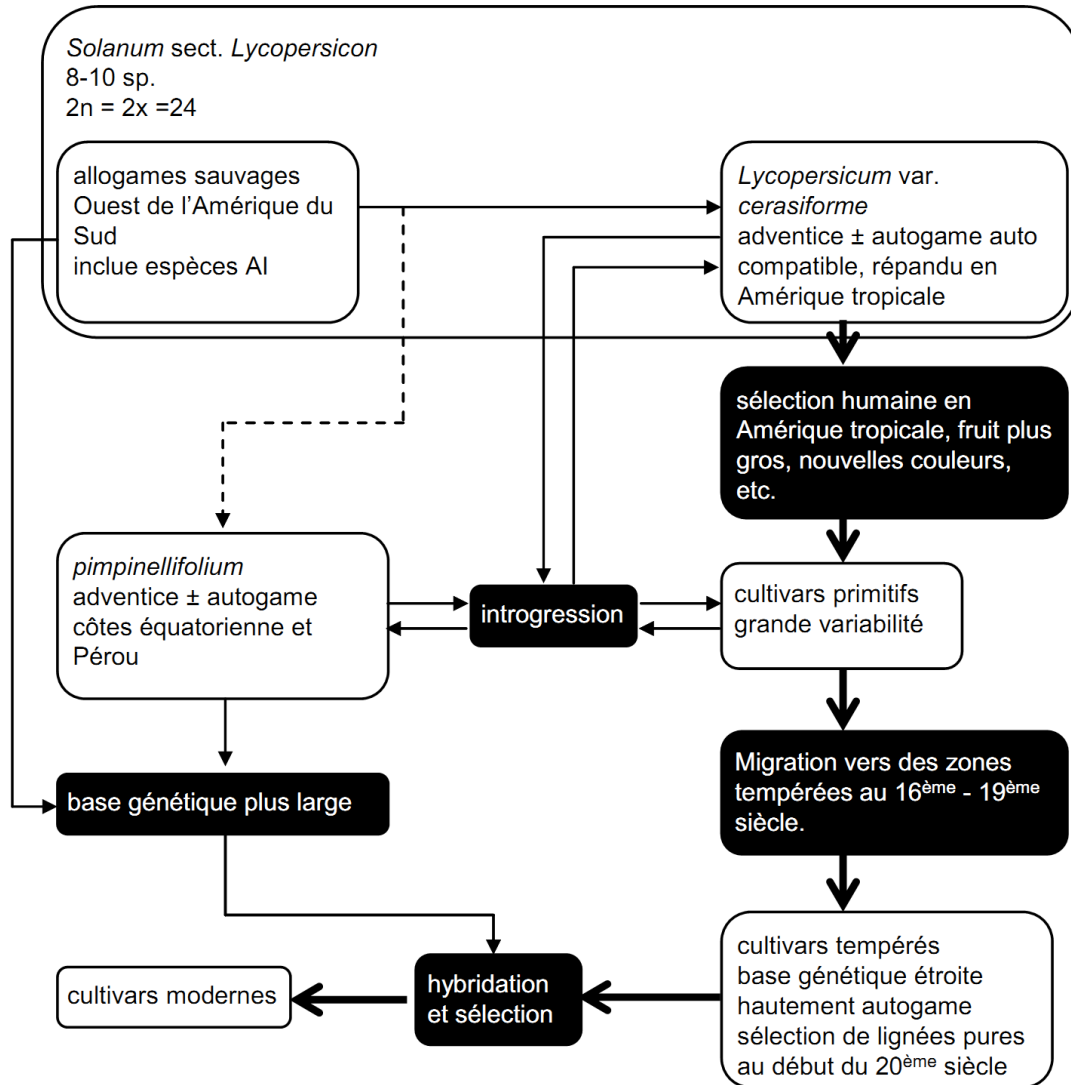


Figure 2 Evolution de la tomate cultivée *Solanum. Lycopersicum*. Traduit de Rick (1976).

Classification culturelle

Il existe deux types de croissance chez la tomate :

Croissance indéterminée

La plante produit 7 à 10 feuilles et une inflorescence, puis 3 feuilles et une seconde inflorescence et ceci indéfiniment. En générale, les tomates à croissance indéterminée ont un feuillage plus important. Il en découle que la température au sein de la culture est relativement

basse. Les fruits ne souffrent pas du soleil et mûrissent plus lentement. Les variétés à croissance indéterminée nécessitent des tuteurs, des cages ou des treillis pour les appuyer.

Croissance déterminée

Les variétés à croissance déterminée se supportent elles-mêmes et n'ont généralement pas besoin de tuteur. La tige émet un nombre donné de bouquets de fleurs. Les feuilles sont alternes, composées, imparipennées (nombre impair de foliole) et comprennent 5 à 7 folioles aux lobes découpés. L'appareil reproducteur est formé par des inflorescences de type déterminé. Les plantes arrêtent leur croissance après la floraison. (Blancard, 2009). Le type de croissance déterminée a permis le développement de la récolte mécanisée, impossible sur les autres variétés qui doivent être tuteurées.

Description botanique du plant de la tomate

La tomate est une plante annuelle buissonnante, poilue et aux tiges plutôt grimpantes. Elle est aromatique lorsqu'on la froisse. Cette plante potagère herbacée voit sa taille varier de 40 cm à plus 5 mètres selon les variétés et le mode de culture (Dumortier et *al*, 2010). La racine de la tomate pivotante, pousse jusqu'à une profondeur de 50 cm ou plus. La racine principale produit une haute densité de racines latérales et adventices. La tige présente un port de croissance entre érigé et prostré, elle pousse jusqu'à une longueur de 2 à 4 m, elle est pleine, fortement poilue et glandulaire. Des feuilles sont disposées en spirale, 15 à 50 cm de long et 10 à 30 cm de large. Les folioles sont ovées à oblongues, couvertes de poils glandulaires. L'inflorescence est une cyme formée de 6 à 12 fleurs. Le pétiole mesure entre 3 et 6 cm. Les fleurs sont bisexuées, régulières et entre 1,5 et 2 cm de diamètre, elles poussent opposées aux - ou entre les feuilles. Le tube du calice est court et velu, les sépales sont persistants, jaunes et courbés lorsqu'elles sont mûres. Il y a 6 étamines et les anthères ont une couleur jaune vif et entourent le style qui a une extrémité stérile allongée. L'ovaire est supère avec entre 2 et 9 carpelles. En général la plante est autogame, mais la fécondation croisée peut avoir lieu (Fig. 3).

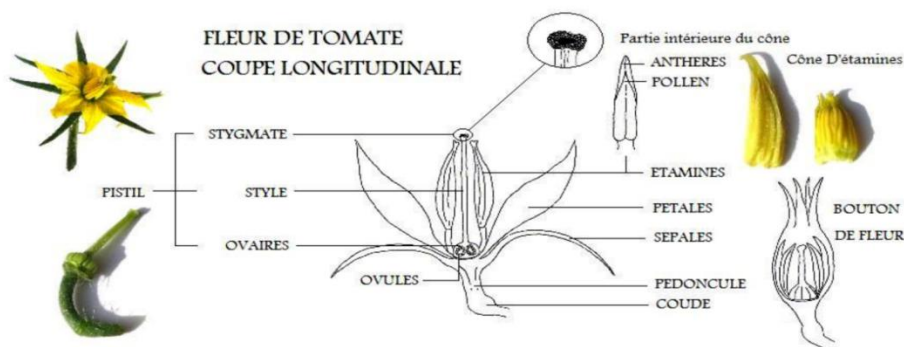


Figure 3- Coupe longitudinale d'une fleur de tomate

Le fruit est une baie charnue, de forme globulaire ou aplatie avec un diamètre de 2 à 15 cm. Lorsqu'il n'est pas encore mûr, le fruit est vert et poilu. La couleur des fruits mûrs varie du jaune au rouge en passant par l'orange (Fig. 04). En général les fruits sont ronds et réguliers ou côtelés. Les graines sont nombreuses, 21 en forme de rein ou de poire. Elles sont poilues, beiges, 3 à 5 mm de long et 2 à 4 mm de large. L'embryon est enroulé dans l'albumen. 1000 graines pèsent approximativement 2,5 à 3,5 g (Naika *et al.*, 2005).

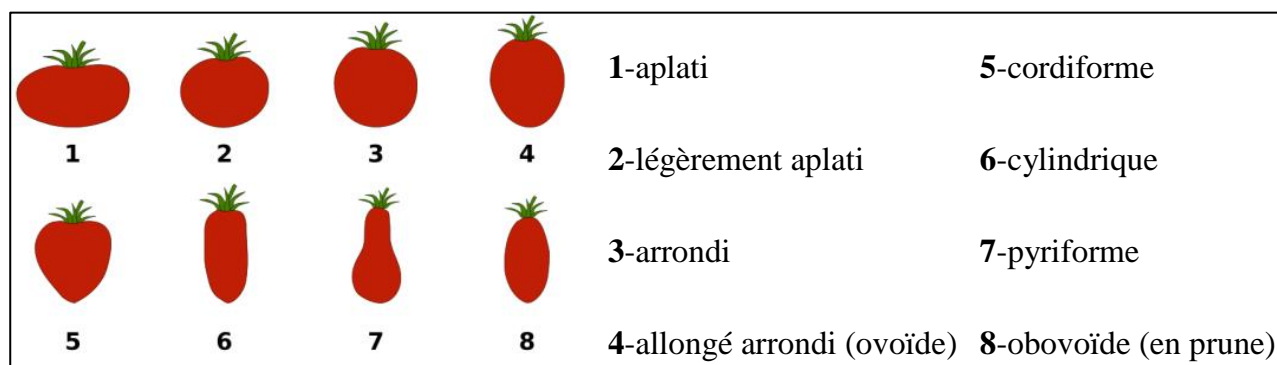


Figure 4 -Différentes formes de tomates utilisées pour décrire une variété (descripteur IPGRI) (In Nicolas, 2010).

Cycle biologique de la tomate

D'après Gallais et Bannerot (1992), Le cycle végétatif complet de la graine à la graine de tomate varie selon les variétés, et les conditions de culture; il s'étend généralement en moyenne de 3,5 à 4 mois du semis, jusqu'à la dernière récolte (7 à 8 semaines de la graine à la fleur et 7 à 9 semaines de la fleur au fruit).

Le cycle de développement d'un plant de tomate peut être décrit par trois grandes phases biologiques :

1. la « phase végétative » qui correspond à la production phénologique exclusive d'organes végétatifs (feuilles et tiges) et comprise entre la levée et l'apparition de la première inflorescence ;
2. la « phase reproductive » qui correspond à la période de production des fleurs et des fruits et qui démarre à la floraison pour s'achever en fin de culture
3. la « phase de maturation » des fruits qui démarre sept à dix jours avant la récolte des premiers fruits et se termine à la récolte (Dumas, 1992).

Culture

La tomate est une plante de climat tempéré chaud. Sa température idéale de croissance se situe entre 15 C la nuit et 25 C le jour. Elle craint le gel et ne supporte pas les températures inférieures à + 2 °C, elle demande une hygrométrie moyenne. Sa période de végétation est assez longue : il faut compter jusqu'à cinq à six mois entre le semis et la première récolte. La multiplication se fait par semis, opération qu'il faut faire assez tôt, vers février-mars, et donc sous abri en climat tempéré (en serre ou sous châssis vitré). Les jeunes plants obtenus sont à repiquer entre le 15 avril et le 15 mai, sitôt que la période des gelées est passée. Il est nécessaire de les tuteurer, sauf pour les variétés à croissance déterminée pour lesquelles on prévoit seulement un paillage. C'est une culture très exigeante, qui demande un sol profond et bien fumé, et la possibilité d'irrigation (ITCMI, 1994).

Cultures de plein champ tuteurées

Les plantes sont conduites sur une seule tige ; elles sont arrêtées à des hauteurs variables après 4 à 6 bouquets de fruits. Il en est de même pour les plantes menées sur 2 ou 3 tiges palissées généralement sur des fils horizontaux en tenant les tiges à la verticale, ou l'égerment inclinées, et en les limitant chacune à un maximum de 1.5m.

Cultures de plein champ sur grilles

Les plantes sont conduites en conservant toutes les ramifications des plantes à croissance déterminée. Celles-ci retombent sur un grillage à large maille formant un mini tunnel haut de 0.40m et de 0.60m. Les tiges de plantes non taillées traversent le grillage et s'appuient dessus ; leur fruits sont maintenus au dessus du sol et ne sont pas en contact avec celui-ci, ce qui permet de limiter de bon nombre de pourritures.

Cultures de plein champ d'industrie

Les plantes sont cultivées à plat sans aucun soutien, quelque fois sur des buttes. La culture de la tomate industrielle dans le monde a dépassé les 3 millions d'hectares, pour la campagne Agricole 2004-2005 avec une production de plus de 115 millions de tonnes (F.A.O (a), 2005).

En Algérie, la culture de la tomate industrielle constitue l'espèce la plus importante parmi celles cultivées comme le tabac, l'arachide et autres. Elle présente une superficie de 12173Ha représentée par 57,36% par rapport à la superficie globale réservée aux cultures industrielles .Sa production est de 3.822731Qx équivalent à 95,57% de la production totale des cultures

industrielles. Elle représente un intérêt indéniable pour l'économie nationale agricole par son poids dans la PIB du pays.

Cultures sous abris

Les tomates cultivées sous tunnels à couverture plastique, sont plantées en sol. Elles sont conduites en rangs simples ou jumelées, avec une tige par plante érigée verticalement par une ficelle. Les serre est une enceinte destinée à la culture ou a la protection des plantes en exploitant le rayonnement solaire. Elle consiste un abri efficace contre les intempéries (vent, pluie, neige,...) et réduit l'introduction des divers agents nuisible. Elle crée à l'intérieur un microclimat particulier qui peut être facilement amélioré à l'aide de divers équipements. Elles permettent en premier lieu de pallier les difficultés liées aux fluctuations de température, de lumière et des conditions d'humidité de plein champ, ce qui a pour avantage d'étendre considérablement la période de production (près de 11 mois de cycle) (Pilkington et *al.*, 2009 : in Ferrero, 2009).

Production nationale et mondiale de la tomate

Production mondiale

Selon la FAO stat (2010) (figure 05), la Chine se trouve au premier rang avec une production qui dépasse les 34 millions de tonnes en 2009 avec une superficie d'environ 1,5 millions d'hectares soit l'équivalent d'un rendement de 22,67 t/ha

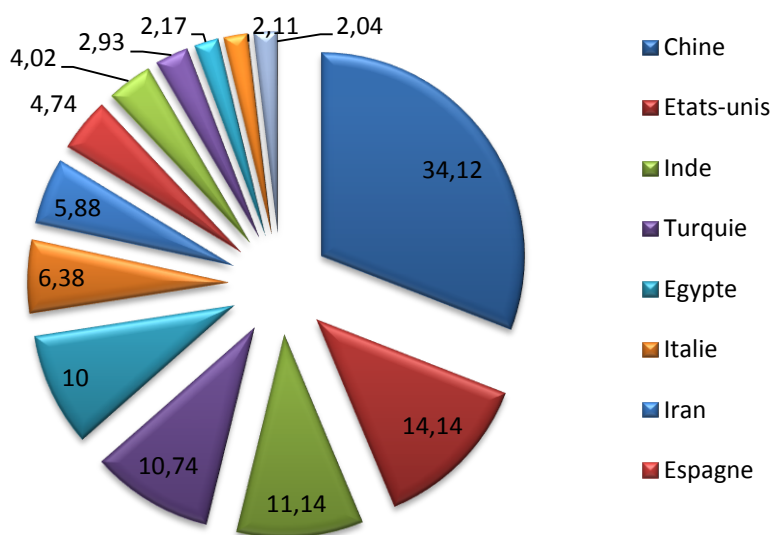


Figure 5- Productions des 13 premiers pays producteurs de tomate en Million de tonnes (FAO, 2010).

Production nationale

En Algérie, la superficie cultivée en tomate en 1999 était de 55 210 ha et la production de 954 804 tonnes soit un rendement de 17,29 t/ha. (Fig05). En 2009, près de 33 000 ha sont consacrés annuellement à la culture de tomate (maraîchère et industrielle), donnant une production moyenne de 11 millions de quintaux et des rendements moyens d'environ 311 Qx/ha (Madr, 2009).

Au cours de la dernière décennie l'extension de cette culture a été nettement remarquable. Les programmes de développement visaient non seulement à augmenter les surfaces cultivées mais surtout à améliorer les rendements. Les surfaces consacrées à la tomate d'industrie ont également augmenté, pour passer de 100 hectares en 1930 à 2 000 en 1960, pour arriver à 31 000 hectares ces dernières années. Les tomates d'industrie sont principalement cultivées au nord-est du pays: la région d'El Tarf, Annaba, Guelma, Skikda et Jijel représente 85 % de la superficie totale consacrée à cette culture. Le reste est réparti entre le centre du pays (7 %) et l'ouest (3 %). (CIHEAM, 2005).

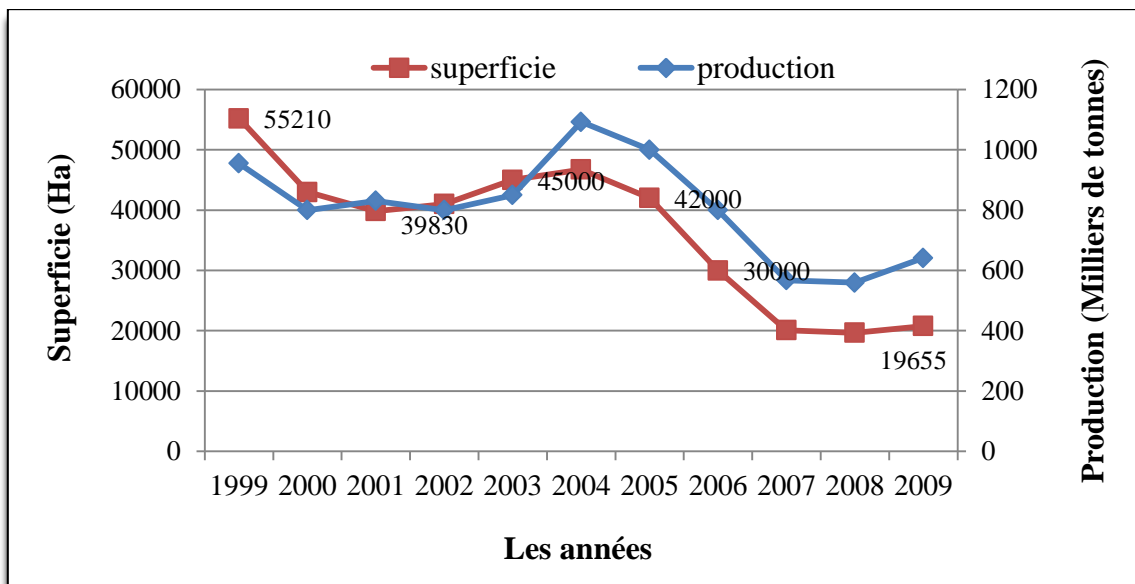


Figure 6-Superficies et production de tomate de 1999 à 2009 en Algérie (FAOSTAT, 2010).

Contraintes de la production de tomate

En Algérie, comme dans la plupart des pays méditerranéens, la culture de la tomate est soumise à plusieurs contraintes biotiques et abiotiques. Ces contraintes sont liées à des changements de l'environnement, notamment les mauvaises conditions de température, l'humidité de l'air ou du sol, les déséquilibres de la nutrition, la carence ou l'excès de substances minérales, l'acidité ou l'alcalinité du sol, un mauvais drainage et au développement des maladies.

Principales maladies de la tomate

Comme toutes les plantes, la tomate est soumise à l'attaque de nombreux agents pathogènes qui sont responsables de diverses maladies. Elle peut ainsi être attaquée par des virus : CMV, TMV, TSWV... (Tableau 4), des mycoplasmes transmis par des insectes vecteurs comme la cicadelle, des bactéries : *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas*. Spp, *Clavibacter michiganensis*... (Tableau 3) ou des champignons : *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *fusarium oxysporum* ... (Tableau 2).

Maladies cryptogamiques

La tomate est sujette à de nombreuses maladies cryptogamiques conduisant non seulement à une diminution du rendement mais aussi à d'importantes altérations de la qualité du fruit (Tableau 1 et Fig. 7)). En effet et contrairement aux cultures en plein champ, les cultures sous abri sont beaucoup plus propices au développement de pathogènes. Ainsi, de forts seuils de température et d'hygrométrie entraînent une prolifération des maladies, causant une baisse significative de la production et une détérioration de la qualité du fruit (Nechadi et al., 2002 ; Pohronezny et Volin, 1983).

Tableau 1- Les maladies cryptogamiques de la tomate (Snoussi, 2010).

Maladies	Agents causals	Symptôme et dégâts
Mildiou	<i>-Phytophthora infestans</i>	Grandes taches brunes sur les feuilles et les tiges.
Alternariose	<i>Alternaria solani</i>	Tâches noires de taille variables sur les feuilles.
Fusariose	<i>-fusarium oxysporum</i> <i>f.sp lycopersici.</i> <i>-fusarium oxysporum</i> <i>f.sp radidis lycopersici</i>	Flétrissement des feuilles avec brunissement des vaisseaux et pourriture des racines.
Verticilliose	<i>-Verticillium albo-atrum</i> <i>Verticillium dahliae</i>	Flétrissement des feuilles accompagné d'un jaunissement. Unilatéral suivi de dessèchement des feuilles de la base.
Anthraxnose	<i>-Collectotrichum</i> <i>coccodes</i>	Tâches circulaires de 05 à 10 mm sur les fruits rouges.
Oïdium	<i>-Oidium neolycopersici</i>	Feutrage blanc sur feuilles
Pourriture grise	<i>-Botrytis cinérea</i>	Feutrage gris sur les feuilles et sur les fruits.

Certains agents phytopathogènes sont responsables d'importantes pertes de récoltes en causant diverses maladies dont :

- 1) pourriture des semences (*Fusarium* spp., *Pythium* spp., etc.)
- 2) fonte des semis (*Pythium* spp., *Sclerotinia* spp., etc.)
- 3) pourriture racinaire (*Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., etc.)
- 4) flétrissement des plantes (*Fusarium* spp., *Verticillium* spp., etc.) (Agrios 1988).

Les pertes moyennes estimées par l'action de ces micro-organismes nuisibles sur les racines représentent environ 15 % de la production agricole (Agrios 1988) et, dans le cas de complexes d'agents pathogènes, des pertes allant jusqu'à 60 % ont été rapportées (Sippell et al. 1985). Néanmoins, la pourriture grise, causée par *B. cinerea*, elle occasionne des dégâts tant au niveau quantitatif (jusqu'à 40% de réduction du rendement) qu'au niveau qualitatif

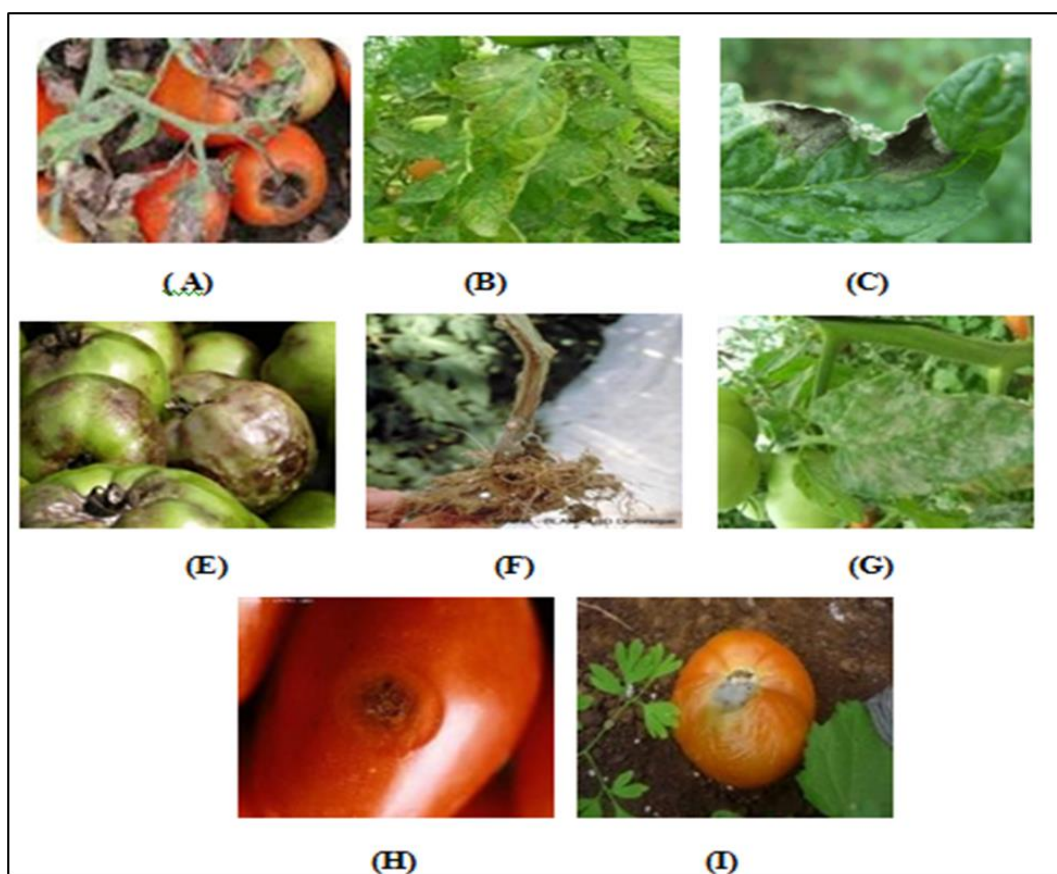


Figure 7-Les maladies cryptogamiques de la tomate. A: Brûlures alternariennes sur fruits de tomates ;B:Alternariose sur feuille de tomate; C: Mildiou sur feuilles;D:Mildiou sur fruits;E :Fusariose des racines et du collet; F:Oïdium sur feuille de tomate (Originale, 2011). G: Anthracnose sur fruits;H:Symptômes du Botrytis sur le fruit de tomate (Originale, 2011).

Maladies bactériennes

Dans les régions humides, nombreuses maladies s'attaquent la tomate. Parmi celles-ci, la moucheture bactérienne, le flétrissement bactérien, la gale bactérienne et le chancre bactérien, causent de sérieux problèmes aux cultures de tomates en champs. Ces maladies bactériennes peuvent affecter gravement le rendement des tomates et, par conséquent, entraîner des pertes importantes pour le producteur.

Tableau 2- Les maladies bactériennes de la tomate (Snoussi, 2010).

Maladies	Agents causals	Symptômes et dégâts
Moucheture bactérienne	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Petits points noirs habituellement inférieurs à 2 mm de diamètre, entourés d'une auréole jaune et par des taches noires rarement supérieures à 1mm de diamètre, entourées parfois d'un halo vert foncé, sur les fruits. (Blancard, 2009).
Gale bactérienne	<i>Xanthomonas</i> . Spp	Sur feuilles, tiges et pétioles de tomate, les lésions se présentent sous forme des zones circulaires (1-5 mm) saturées d'eau, d'abord vertes, puis brunes et nécrosées. Les fruits de tomate portent des taches subérisées de 2 à 10 mm de diamètre, circulaires et à marges saturées d'eau. (Blancard, 2009).
Chancre bactérien	<i>Clavibacter michiganensis</i> sub sp. <i>Michiganensis</i>	Petites tâches chancreuses sur les folioles de couleur blanc marron. Jaunissement de la moelle en bordure des vaisseaux sur les tiges. Présence de petites tâches blanches, brunes au centre sur les fruits.(Blancard, 2009).
Le flétrissement bactérien	<i>Ralstonia solanacearum</i>	flétrissement irréversible sur la partie aérien de la plante qui survient après blocage, par la bactérie de la circulation de l'eau dans la plante.

Maladies virales

Les maladies d'origine virale se traduisent chez les plantes malades des symptômes externes multiples et variés. La tomate est toujours exposée à l'attaque d'une grande variété de virus. Les symptômes se manifestent le plus souvent par des altérations de la pigmentation (panachures) mais aussi par des nécroses et des déformations.

Tableau 3- Les maladies virales de la tomate (Idrenmouche, 2011).

Maladies	Symptômes et dégâts
CMV: Cucumber Mosaic Virus	Lorsque l'infection est précoce, on peut observer une stérilité des plantes ou une mal formation des fruits.
TICV: Tomato Infectious Chlorosis Virus	une jaunisse généralisée et un retard du développement de la plante. Apparition de nécroses ce qui entraîne de grandes pertes de rendement.
TMV : Tobacco Mosaic Virus	Virus de la mosaïque du tabac Ce dernier est caractérisé par une mosaïque verte ou blanche, des folioles gaufrés devenant filiformes et ont tendance à s'enrouler, les fruits encore vert présentent une surface légèrement bosselée avec des plages nécrotiques brunes. Les fruits murs sont parsemés de plages vertes.
ToCV : Tomato Chlorosis Virus	virus de la jaunisse de la tomate. un jaunissement généralisé à l'ensemble des folioles d'une feuille et un retard du développement de la plante.
TSWV: Tomato Spotted Wilt Virus ou virus de la maladie bronzée de la tomate.	Il est à observer des mouchetures en mosaïque avec une décoloration des feuilles. Sur les tiges et pétioles, il y a apparition des tâches nécrotiques. Par contre sur les fleurs, on observe un nanisme, une déformation et une décoloration. la maladie peut entraîner un rabougrissement du plant.
TYLCV : Tomato Yellow Leaf Curl Virus ou maladie des feuilles jaunes en cuillères de la tomate.	La croissance des plantes atteintes est fortement perturbée. Les feuilles sont de tailles réduites et présentent un jaunissement et ou un enroulement en forme de cuillères. En cas d'infection précoce, les plantes sont naines et ne produisent plus de fruits.

Chapitre II- Stress salin

Introduction

Le stress abiotique est défini comme une contrainte qui limite la vitesse de production de la matière sèche sans provoquer la destruction de biomasse. Les stress tels que le déficit hydrique, les hautes températures ou salinité ont un impact négatif sur la croissance et le développement végétal et constituent un défi agronomique majeur. Selon Grime (1979), le stress correspond aux « mécanismes qui limitent la biomasse végétale en causant sa destruction partielle ou totale ». Ces stress abiotiques entraînent une diminution de 70% du rendement des plantes de grandes cultures via des altérations morphologiques et physiologiques (Boyer 1982). Selon Dutuit et al (1994), le stress est le dysfonctionnement (rupture d'un équilibre fonctionnel) produit dans un organisme ou dans un système vivant, par exemple par une carence.

La salinité constitue l'un des facteurs abiotiques les plus répandus au monde qui limite fortement les rendements agricoles, notamment dans les régions arides et semi arides où les précipitations sont rares et irrégulières et donc insuffisantes pour lessiver les sels accumulés en dehors de la zone racinaire des plantes (Khales et Baaziz , 2006). En Algérie, près de 95 % du territoire est concerné par les zones arides et semi arides. De ce fait, 25% des terres irriguées sont confrontées au problème de salinisation (Levigneron et *al.*,1995).

Le stress salin.

La salinité peut être définie comme un processus d'accumulation des sels solubles, qui sont représentés en grande partie par des cations (Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , et le K^+), et des anions (Cl^- , SO_4^{-2} , CO_3^{-2} et NO_3^-). D'autres sels moins courants et plus toxiques à faibles concentrations sont également à considérer ; ces éléments traces sont le bore, le sélénium, l'arsenic et le molybdène (Kenfaoui, 1997 ; Gregory, 2005). La définition la plus courante, adoptée par la FAO (1997), considère qu'un sol salin est un sol dont l'activité électrique de la pâte du sol (ECe) est de 4 dS/m ou plus, cependant le Na^+ et Cl^- sont considérés les plus importants : le Na^+ a comme effet la détérioration de la structure physique des sols et le Cl^- et Na^+ entraînent la toxicité des végétaux (Omami, 2005).

La répartition de la salinité dans le monde et en Algérie

La salinité est un problème écologique majeur qui touche un nombre important de région à l'échelle mondiale (Livegeron et *al*, 1995). Un problème mondial que l'on rencontre dans les régions arides et semi-arides (Omrani, 1993) par contre, dans les régions humides la présence des sels n'atteint pas des proportions élevées car ils sont vite lessivés par les eaux de pluies et de ruissellements (Amokrane, 2004).

Les sols salés occupent une superficie de 950 millions d'hectares (Zid et Grignon., 1991). Il a été estimé que 20 % des 275 millions d'hectares des terres irriguées (Flowers, 2005) et 15% (227 millions d'hectares) des terres cultivables sont affectés par la salinité (Munns., 2002). En Afrique du nord et au Moyen-Orient, elle couvre près de 15 millions d'hectares, dont 15% sont dépourvus de toute végétation (Le Houerou., 1986).

Tableau 4-Superficie affectée par la salinité dans le monde(Lasram, 1995).

Régions	Superficie en million d'hectares
Afrique	80.5
Europe	50.8
Amérique du Nord	15.7
Amérique du Sud	129.2
Asie du Sud	87.6
Australie	357.5
Mexique et Amérique centrale	2
Asie centrale et du Nord	211.7
Asie du Sud .Est	20
Total	955

Dans les régions arides et semi arides, près de 25% des terres sont confrontées au problème du sel (Levigneron et *al*.,1995). En région méditerranéenne, la superficie des sols salés est estimée à 16 millions d'hectares (Hamdy, 1999). En Algérie, les sols salés sont très répandus dans les régions arides, représentant environ 25% de la surface (Halitim., 1988) soit 3,2 millions d'hectares (Hamdy., 1999). D'après Omrani (1993), les sols salins se situent dans des régions différentes en Algérie au Nord et au Sud parallèlement à la cote de manière discontinue. Au Sud ils se situent dans les chotts Echergui et EL Gharbi ainsi qu'au niveau de la steppe et à Biskra et Oum

Bouaghi. Au Nord, les régions Oranaises (Messerghine, Sig, Mohammedia, Relizane et Oued Rhiou) ainsi qu'à l'Est, Sétif, Constantine et Annaba.

Origines et causes de la salinité des sols

Origine primaire

La salinisation primaire se produit naturellement là où la roche mère du sol est riche en sels solubles ou bien en présence d'une nappe phréatique proche de la surface. 80% des terres salinisées ont une origine naturelle, on qualifie alors la salinisation de « primaire ». Dans ce cas, elle est entraînée par la formation des sels pendant l'altération des roches ou par des apports naturels externes (Mashali et *al.*, 2005). Dans les régions arides et semi arides, l'évapotranspiration joue un rôle important dans la pédogenèse des sols salins ; ce processus dépend essentiellement du régime hydrique du sol et des sources de sel. Lorsque le climat est chaud et sec, entraînés par les eaux capillaires suivant le flux d'évaporation, les sels sont accumulés en surface (Omami, 2005).

Origine secondaire

La salinisation secondaire se produit lorsque des quantités significatives d'eau chargée de sels sont apportées par irrigation. Elles sont dues, à l'absence de drainage qui mène à l'accumulation des sels en surface et à la recharge des nappes phréatiques par une eau salée, ainsi que la déforestation qui induit la remontée des nappes phréatiques engendrant des affleurements salés dans les points bas du paysage (ex : Thaïlande) (Schwartz, 2007). De même, l'accumulation des sels portés par l'air, ou par l'eau à la surface des sols et la contamination de ces surfaces et leurs nappes phréatiques par des produits chimiques, notamment les engrais utilisés dans l'agriculture et un pâturage intense qui mène à une diminution progressive des végétaux qui se termine par une désertification, sont parmi les causes de la salinisation des sols (Omami, 2005).

Effet de la salinité sur les plantes

La salinité est un facteur environnemental très important qui limite la croissance et la productivité (Allakhverdiev et *al.*, 2000b in Parida et Das, 2005). Les effets néfastes de la salinité sur la croissance des plantes sont généralement associés au faible potentiel osmotique de la solution du sol et au niveau élevé de toxicité du sodium (et du chlore pour certaines espèces) qui provoquent des perturbations multiples sur le métabolisme, la croissance et le développement des plantes aux niveaux moléculaire, biochimique et physiologique (Tester et Davenport 2003).

Effet de la salinité sur la croissance et le développement

La salinité est un facteur environnemental très important qui limite la croissance et la productivité (Allakhverdiev et al., 2000b in Parida et Das, 2005). Le stress salin entraîne des modifications morphologiques, mais c'est le poids de la matière végétale sèche et la longueur des tiges qui rendent compte du milieu de la tolérance ou de sensibilité des plantes au sel (Bekhouche, 1992). Le stress salin résulte aussi dans la diminution de la biomasse sèche et fraîche des feuilles, tiges et racines (Chartzoulakis et Klapakii, 2000). La salinité influence également la croissance et la qualité des fruits dont l'aspect et la qualité organoleptique sont modifiés, et dont la valeur marchande devient médiocre (Levigneron et al, 1995), c'est le cas du riz (Khan et al, 1997) et de la pomme de terre (Bouaziz, 1980). Selon Mohammad et al, (1998), la salinité accrue est accompagnée par une réduction significative dans la biomasse racinaire, la hauteur de la plante, le nombre de feuilles par plante, la longueur des racines et la surface racinaire chez la tomate. Des expériences faites sur la variété de piment ont montré qu'une concentration de 30 mM de NaCl diminue la production de la matière sèche de 23% par rapport aux plantes non traitées (Rubio et al, 2009). En effet, des études qui ont intéressé l'effet du sel sur le comportement de certaines espèces (blé, orge, triticale, maïs, tournesol), ont bien montré l'effet négatif du sel sur la croissance des plantes et en particulier sur la taille, la surface foliaire et la production de la biomasse sèche (El Midaoui et al., 1999a).

Effet de la salinité sur la germination et la levée

Selon Maillard (2001), et Abdelly (2006), la plupart des plantes sont plus sensibles à la salinité durant leurs phases de germination et de levée dont l'effet nocif est de nature osmotique ou bien toxique. Berstein, (1975) et Bozouk, (1981) qui ont montré que chez la tomate cultivée (*Lycopersicon esculentum*), la germination est inhibée par les conditions salines. Selon Karmous (2007), elle agit également sur la germination en ralentissant sa vitesse, ce qui expose plus les semences aux risques. Il a été démontré que la salinité inhibe la germination par son effet osmotique où elle affecte tous les processus de germination suite à la baisse du potentiel hydrique autour des graines, ce qui rend l'eau inaccessible à cette dernière pour la réhydratation et la reprise de la vie active de l'embryon (Maas et Poss, 1989).

La réduction du potentiel osmotique de la solution du sol empêche l'imbibition de la graine suite à une diminution des activités enzymatiques et une forte absorption de Na^+ par rapport à K^+ , ce qui conduit à une toxicité embryonnaire et un retard dans les processus métaboliques (Hsiao et

al., 1976) (in Adel et Bader, 2002). Cet effet toxique peut conduire à l'altération des processus métaboliques de la germination et dans le cas extrême à la mort de l'embryon par excès d'ions.

L'effet de la salinité sur les pigments photosynthétiques

Le stress salin induit pour la très grande majorité des plantes une réduction de la production de biomasse correspondant essentiellement à une baisse des processus non-mésophylliens de la photosynthèse (Sudhir et Murthy 2004). A l'échelle du chloroplaste, Sudhir et Murthy (2004), montrent que ce sont les processus de carboxylation, et non ceux de la photophosphorylation qui sont les plus affectés par le stress salin. Les stress prolongés provoquent une diminution de la régénération du RuBP (Lawlor et Cornic 2002), et les ions Na⁺ et Cl⁻ en excès induisent une altération du mécanisme photosynthétique (Munns et *al.*, 2006). Selon Munns (2008), la réduction de la photosynthèse est liée à la diminution du potentiel hydrique foliaire, qui est lui-même à l'origine de la fermeture des stomates (Allen, 1995), qui cause la réduction de la conductance stomatique (Orcutt et Nilsen, 2000). La diffusion du CO₂ à l'intérieur des stomates devient alors limitée et sa fixation au niveau des chloroplastes diminue par conséquent la régénération du RuBP (Ribulose Biphosphate) devient limitée (Hu et *al.*, 2005). En effet, chez *Bruguiera parviflora*, le taux de photosynthèse augmente pour des faibles niveaux de salinité et décroît pour des teneurs élevées, sans modification sur la conductance stomatique (Parida *al.*, 2004). Ainsi, chez *Oryza sativa* des concentrations de 200 mM de NaCl induisent une diminution de la Chlb et dans une moindre mesure de la Chla (Amirjani, 2011).

L'effet de la salinité sur le taux des ions

Les effets toxiques des ions Na⁺, son absorption massive peut induire des carences potassiques. Le K⁺ est un ion essentiel, activement transporté dans les cellules. En raison de la similarité chimique (degré de solvation, 32 et rayon ionique) des cations K⁺ et Na⁺, les transporteurs du K⁺ comme les NHXs et le NSCCs ne font pas la différence entre les 2 cations et les transportent indifféremment, ce qui entraîne une accumulation de Na⁺ au dépend du K⁺ (Pardo et Quintero, 2002). Le Cl⁻, présent en excès dans les milieux hypersalins, est toxique pour les cellules. La toxicité au chlore se traduit par une dégradation de la chlorophylle et l'apparition de chlorose à la périphérie des feuilles. Cette toxicité foliaire est différente de celle du Na⁺ qui, par la réduction des taux de K⁺ et Ca²⁺ induit une diminution de la photosynthèse via la réduction de la conductance stomatique. Cependant, les effets du Na⁺ et du Cl⁻ sont additifs (Tavakkoli et *al.*, 2011). De plus, et comme pour Na⁺, la teneur en Cl⁻ augmente avec l'âge des feuilles chez les glycophytes par comparaison aux halophytes où la concentration de ces 2 ions est la même quelque soit l'âge des feuilles (Teakle et Tyerman, 2010).

L'effet de la salinité sur l'anatomie de la feuille

La salinité cause une modification de l'épaisseur épidermique, l'épaisseur du mésophylle, la longueur et le diamètre des cellules palissadiques. C'est ce qui a été observé sur les feuilles de l'haricot, du coton et de l'Atriplex soumis au stress salin (Longstreth et Nobel, 1979 in Parida et DAS, 2005). La salinité réduit aussi l'espace intercellulaire dans les feuilles (Delphine et *al.*, 1998 in Parida and Das, 2005). La réaction de la plante à la salinité se fait initialement au niveau des racines qui synthétisent une hormone appelée acide abscissique (ABA), qu'elles véhiculent vers les parties aériennes où se déclenche le mécanisme de fermeture des stomates (Schroeder et *al.*, 2001).

Stratégies d'adaptation et mécanismes de tolérance au stress salin

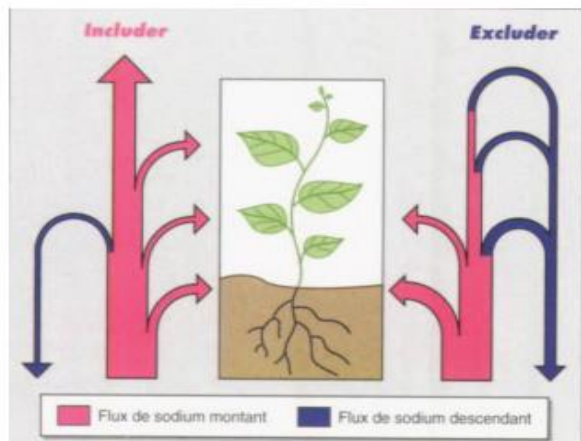
Homéostasie ionique

La compartimentation vacuolaire

Celle-ci consiste à évacuer du cytoplasme les ions Na^+ en excès vers la vacuole afin d'éviter leur effet toxique et inhibiteur à l'encontre des processus enzymatiques (Flowers et *al.* 1977). Ce mécanisme de compartimentation vacuolaire est assuré par l'action d'un antiport vacuolaire sodium/proton (Na^+/H^+) dont l'énergie est fournie par les pompes à protons ATPases (H^+ -adénosine triphosphatases) et PPases (H^+ -pyrophosphatases) vacuolaires (Horie et Schroeder 2004). Ainsi, grâce à ce processus de compartimentation de sodium au sein de la vacuole, la cellule parvient à maintenir une faible concentration de sodium dans le cytoplasme, minimisant ainsi son effet toxique; et d'autre part, l'augmentation concomitante de la concentration de sodium dans la vacuole va engendrer une forte pression osmotique qui va favoriser l'absorption d'eau et donc améliorer la turgescence des cellules (Apse et Blumwald 2007). La compartimentation du NaCl dans les vacuoles représente le mécanisme principal de détoxification du sel chez les halophytes (Borsani et *al.* 2003), tandis que les glycophytes ont recours au mécanisme d'exclusion du sodium des cellules (au niveau de la membrane plasmique) des parties aériennes vers les racines (Blumwald et *al.* 2004). Chez les halophytes, l'activité de l'antiport vacuolaire Na^+/H^+ est généralement induite par les concentrations élevées de NaCl (Barkla et *al.* 1995). Ainsi, l'accumulation du sodium dans le compartiment vacuolaire semble avoir un double rôle, celui de la protection du cytoplasme contre la toxicité du sodium et celui de son utilisation en tant qu'osmoticum dans la vacuole (Bartels et Sunkar 2005).

Exclusion et inclusion des ions toxiques

La capacité d'une plante à compartimenter Na^+ au niveau cellulaire entraîne une différence de gestion du Na^+ au niveau de la plante entière. On peut distinguer deux comportements des plantes vis-à-vis de sel, les comportements dit « inclure et exclure ». Les plantes exclure sont généralement sensibles à la salinité et sont incapables de contrôler le niveau de Na^+ cytoplasmiques. Cet ion est transporté dans le xylème, véhiculé vers les feuilles par le courant de transpiration, puis en partie re-circulé par le phloème pour être ramené vers les racines. Ces espèces sensibles contiennent donc peu de Na^+ dans les feuilles et un excès dans les racines. L'exclusion du sodium est réalisée par l'action combinée d'une série de protéines de type SOS (« salt overly sensitive ») (Zhu 2003). SOS1, qui est également un antiport Na^+/H^+ mais localisé au niveau de la membrane plasmique, joue un rôle primordial dans ce mécanisme d'exclusion de sodium vers le milieu extérieur (Mahajan et al. 2008). SOS2 et SOS3 assurent conjointement la régulation de l'activité de SOS1 mais également celle de l'antiport vacuolaire NHX1 (Zhu 2002). Au contraire, les plantes « inclure » résistantes au NaCl , accumulent le Na dans les feuilles ou il séquestre (dans la vacuole, l'épiderme foliaire, les limbes âgés...)



Chez les plantes de types inclure, les flux de sodium sont essentiellement ascendants (en rose) et le sel est accumulé dans les parties aériennes. Chez celles de type exclure, la plus grande partie du sodium véhiculé vers les feuilles est réexporté vers les racines via le phloème (en bleu). Les intensités relatives des flux sont symbolisées par la largeur des traits.

Figure 8- Schématisation du bilan de la circulation du sodium dans les plantes inclure ou exclure (Levigneron et al., 1995).

Ajustement ionique

L'augmentation des concentrations vacuolaires de sodium induit la nécessité et le besoin d'élever la pression osmotique des autres compartiments cellulaires afin d'ajuster leur osmolarité intracellulaire afin de limiter les pertes de turgescence due à l'abaissement du potentiel hydrique (Ψ_H) de la solution du sol (Amtmann et Leigh 2010).

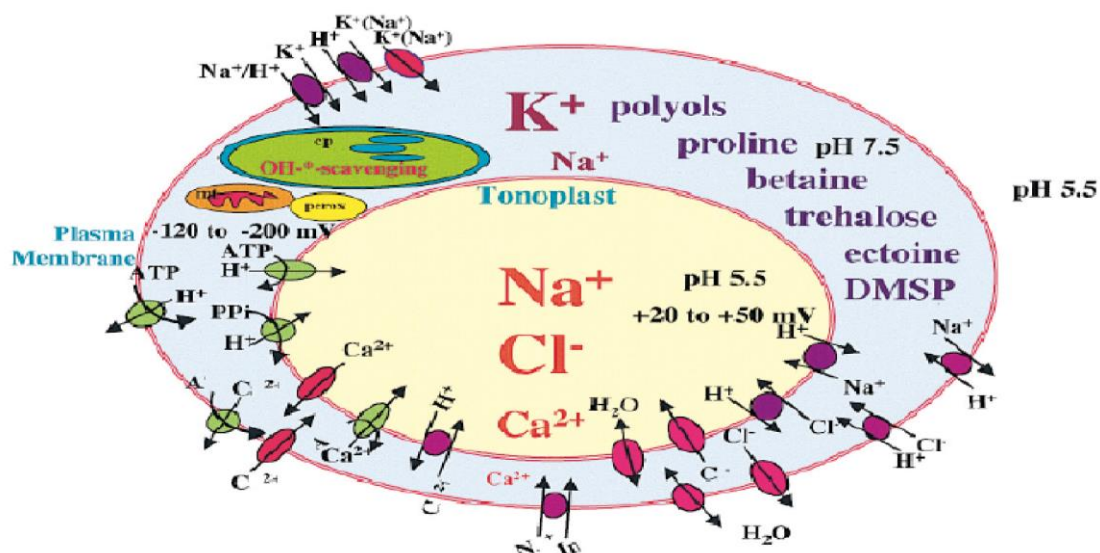


Figure 9- Homéostasie cellulaire établie après l'adaptation au sel (NaCl). Présentation des osmolytes et des ions compartimentés dans la vacuole, des canaux aqueux, et des potentiels électrochimiques à travers la membrane plasmique et le tonoplaste. Chloroplaste (cp), mitochondrie (mt) et peroxisome (perox), organites dans lesquels impliqué (Hasegawa *et al.*, 2000).

Ainsi, les végétaux vont accumuler des solutés compatibles (fig(09)) : le K^+ , les monosaccharides comme le fructose et le glucose, les alcools comme le glycérol, et les dérivés d'acides aminés quaternaires comme la proline, et la glycine-bétaïne pour contrebalancer les potentiels hydriques bas du cytosol (Yokoi *et al.*, 2002).

Stratégie osmotique

La proline

Les teneurs en proline s'accroissent rapidement chez de nombreuses mono- ou dicotylédones soumises à un stress salin (Rhodes *et al.* 2002). Cette augmentation de la concentration de proline cytoplasmique est consécutive à la stimulation de sa synthèse, résultant d'une élévation des quantités des messagers codant pour l'enzyme qui convertit le glutamate semi-aldéhyde en proline. Il existe deux voies de biosynthèse de la proline chez les plantes, celle de l'ornithine et celle du glutamate. Il semble que la stimulation de la synthèse de proline soit parallèle à une activation globale d'une voie métabolique partant du glutamate semi-aldéhyde et conduisant à la proline, mais aussi aux polyamines, via l'ornithine et l'arginine (Bartels et Sunkar 2005). La proline agit en tant que composé soluble compatible dans l'ajustement osmotique pouvant atteindre de fortes concentrations sans exercer d'effet toxique comme le cas des ions (Yancey *et al.* 1982).

Les sucres

Le stress salin induit chez plusieurs espèces de plantes des modifications dans les teneurs relatives des hydrates de carbone avec une accumulation plus ou moins importante des sucres solubles totaux (saccharose, glucose et fructose). Ces derniers semblent jouer un rôle important dans l'ajustement osmotique (Rhodes, 1987). Plusieurs études physiologiques ont démontré que l'accumulation des sucres et des polyols, principalement suite à l'hydrolyse de l'amidon (Phillips et al. 2002), était stimulée par un stress salin chez différentes espèces végétales (Majumder et al. 2010). En effet, pour ajuster le potentiel osmotique interne perturbé par l'absorption excessive des ions sodium, la plante accumule dans son cytoplasme des solutés organiques principalement les sucres solubles (Rhodes, 1987). Ces derniers protègent également les membranes contre la déshydratation (Schwab et GAFF, 1986). Leurs teneurs ont été utilisées comme indicateurs du degré de tolérance à la salinité chez plusieurs espèces (Rathert, 1984). L'augmentation des teneurs en sucres solubles en conditions de stress salin a été mise en évidence chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Perez-Alfocea et al., 1996).

Les anti-oxydants et protéines de détoxication

Les formes actives d'oxygène, telles que le peroxyde d'oxygène (H_2O_2), les radicaux superoxydes (O_2^-) et hydroxyl(OH), sont produites au cours des processus cellulaires aérobie et de façon plus accrue suite aux stress abiotiques, notamment la salinité (Logan 2005). Ces composés, lorsqu'ils sont accumulés en faible quantité, peuvent servir de signal pour induire l'expression de gènes de réponse et de défense cellulaires (Parent et al. 2008). Le radical hydroxyl, par exemple, risque d'endommager les structures chlorophylliennes, protéiques, nucléiques et lipidiques, et par conséquent entraver le métabolisme cellulaire, la physiologie de la plante et finalement la croissance et le rendement (Frankel 1984). Par conséquent, la plante doit constamment déployer ses mécanismes de défense pour pallier ces dommages. De ce fait, et afin d'éliminer ces formes actives d'oxygène, les plantes possèdent des antioxydants (de nature non enzymatique) de faible masse moléculaire, tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes, et l'acide ascorbique (Ashraf 2008), mais aussi, elles emploient une vaste panoplie d'enzymes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX), la glutathion S-transférase (GST) et la glutathion peroxydase (GPX) (Munns 2005; Türkan et Demiral 2009; Ksouri et al. 2010). Le superoxyde dismutase peut éliminer le radical superoxyde en catalysant la réaction de dismutation d' O_2^- en H_2O_2 qui, malgré tout, reste un intermédiaire toxique. La concentration de ce dernier peut être régulée par des enzymes, telles que l'APX, la CAT ou bien la GPX (Parent et al. 2008).

Induction des hormones

Les niveaux hormonaux de l'ABA augmentent en cas de stress salin, jouant ainsi plusieurs rôles. Il est responsable de l'activation des gènes qui jouent un rôle important dans les mécanismes de la tolérance au sel chez le riz, comme il a un rôle dominant dans les réactions réversibles de la phosphorylation des protéines. Il accroît le niveau du Ca^{2+} cytosolique et donc son pH, permettant ainsi de réguler l'absorption et le transport à travers les membranes ; contrairement, il réduit le niveau d'éthylène et l'abscission des feuilles, probablement par la décroissance de l'accumulation des ions toxiques de Cl^- dans les feuilles. En outre, c'est un inhibiteur du NaCl dans les réactions de la photosynthèse et la croissance (Omami, 2005). Une augmentation de l'ABA dans la partie aérienne ou une réduction des concentrations en cytokinine, donne naissance à une croissance et une transpiration réduites (Gregory, 2005). D'après Omami (2005), un haut niveau de jasmonate, médiateur de signalisation qui soutient les réactions de floraison et sénescence dans les conditions de stress salin.

Chapitre III- *Botrytis cinerea*, agent pathogène de la pourriture grise

Généralités sur le *B. cinerea*

À la frontière du saprophytisme et du parasitisme, *Botrytis cinerea* Pers., [forme imparfaite du *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel.] est le champignon Ascomycète responsable de la pourriture grise (moisissure grise, pourriture de la grappe) chez des centaines de plantes hôtes au niveau mondial.

L'étymologie de son nom fait référence directement à sa morphologie : « *Botrytis* » signifie « en forme de grappe », indiquant ainsi la morphologie des conidiophores, et « *cinerea* » renvoie à la couleur gris-cendrée de la sporulation. Le genre *Botrytis* a été décrit pour la première fois en 1729 par Pier Antonio Micheli qui la répertoria dans le « *Nova Plantarum Genera* » puis de manière définitive par Hennebert, comme la majorité des espèces du genre (Groves et *al.* 1953 ; Hennebert 1973). Le nom *Botrytis cinerea* a été proposé par Elias Magnus Fries, le botaniste suédois qui, à la suite de Linné, fut le fondateur de la systématique des champignons.

La maladie causée par cet agent pathogène provoque des pertes économiques importantes dans plusieurs types de culture (Veloukas et *al.*, 2011) , ce qui engendre des pertes pouvant atteindre 20% des récoltes mondiales (Elad et *al.*, 2004). Sur cultures maraîchères, viticoles et horticoles, en pré- ou en post-récolte, cette maladie conduit à des pertes importantes de rendement (Fernandez-Ortun et *al.* 2012). Il s'attaque aux fruits (ex. raisin, fraise) et aux légumes (ex. tomate, laitue) de diverses productions végétales, mais aussi aux plantes ornementales (ex. tournesol, rose) (Kim et Xiao, 2011; Veloukas et *al.*, 2011 ; Yin et *al.*, 2011). En plus d'être considéré comme un champignon nécrotrophe, *B. cinerea* se caractérise principalement par son cosmopolitisme, sa polyphagie, sa variabilité génétique et sa capacité de s'adapter facilement à son environnement (De Miccolis Angelini et *al.*, 2010 ; Kretschmer et Hahn, 2008 ; Martinez et *al.*, 2005). L'acquisition de cette résistance entraîne dans la pratique des pertes importantes de productivité et peut, ainsi, être à l'origine de difficultés économiques et sociales (Köller et Scheinpflug, 1987). Certains suggèrent que cette capacité d'adaptation, résulte entre autres d'un cycle de vie très court ainsi que d'une reproduction prolifique (Brent et Hollomon, 2007 ; Yin et *al.*, 2011).

Description de l'agent pathogène

Sur milieu PDA, ce champignon se présente sous forme de colonies blanches qui prennent ensuite une teinte grise. Les conidies sont ovoïdes ou rondes, hyalines et d'une taille comprise entre 11 et 15 μm . Elles sont produites dans des bouquets à l'extrémité de conidiophores ramifiés. Ce champignon peut produire également des sclérotes à contours irréguliers et noirs (1-5 mm de diamètre). Dans la nature, ces sclérotes apparaissent sur les fruits décrochés par le vent ou sur les sols des vergers. La sporulation est provoquée par l'exposition à la lumière (Rosenberger, 1990). Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* peut se présenter ou survivre sous différentes formes telles que le sclérote, le mycélium, les macroconidies, les microconidies et les ascospores.

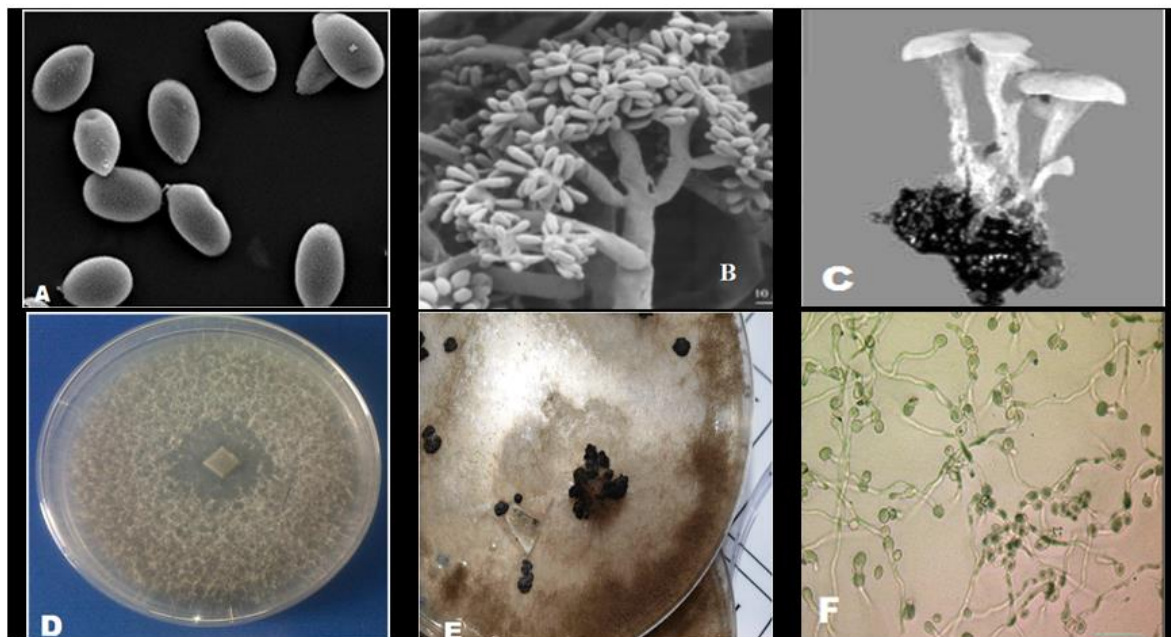


Figure 10-Conidies observés en utilisant un microscope électronique à balayage (A). Conidiophores observés en utilisant un microscope électronique (B). Apothécie produisant des ascospores sur une sclérote (C). *Botrytis cinerea* sur milieu de culture PDA à 25°C (D). Sclérote de *Botrytis cinerea* produites sur boîte de pétri après un mois de culture sur un milieu PDA à 21°C(E.) Observation de la germination des conidies sur milieu riche PDA au microscope optique (F).

➤ Le mycélium

Il est aussi une structure qui peut survivre dans les tissus morts de son hôte et est constitué d'hyphes septés. Le mycélium se présente sous forme d'une toile blanchâtre et grisâtre ou olivâtre comprenant des filaments articulés, cylindriques vésiculeux au niveau de la cloison médiane, dont le diamètre varie en fonction des conditions de développement des hyphes. (Ajouz, 2009). Quand ce mycélium devient fructifère (au bout d'un certain temps d'incubation (>7j) sur milieu nutritif, il

développe des touffes de conidiophores dressés grisâtres (gris brunâtre ou gris cendré) et présentant des ramifications à leur sommet.

➤ Le sclérote

Il se développe dans les tissus morts de son hôte et est considéré comme la principale structure de survie du champignon durant l'hiver (Williamson et *al.*, 2007). Il est formé par une masse mycélienne dense plutôt arrondie (1-5 mm de diamètre), entouré d'un cortex rigide contenant des pigments de mélanine. Ces caractéristiques le protègent de la dessiccation, des rayons ultra-violet et des attaques de microorganismes sur de longues périodes (Williamson et *al.*, 2007). Dans la nature, ces sclérotés apparaissent sur les fruits décrochés par le vent ou sur les sols des vergers. La sporulation est provoquée par l'exposition à la lumière (Rosenberger, 1990).

➤ Les macroconidies

Les macroconidies sont ovoïdes contrairement aux microconidies (encore appelées spermaties) qui, elles, se présentent sous forme sphérique et de plus petite taille (2 à 4µm). Le fait que les macroconidies possèdent la caractéristique d'être hétérocaryotiques est très avantageux. Cette caractéristique confère au champignon *B. cinerea* une plus grande variabilité génétique et donc, la possibilité de s'adapter plus rapidement aux conditions du milieu, par exemple aux fongicides (Williamson et *al.*, 2007 ; Leroux, 2004).

➤ Les microconidies (spermaties)

Ce sont des gamètes mâles uninucléés jouant un rôle dans la reproduction sexuée du champignon.

➤ Les ascospores

Au nombre de huit par asque, elles sont oblongues à elliptiques. Un asque contient huit ascospores binucléées qui germeront pour produire un mycélium (Williamson *et al.* 2007). Les asques sont produits sur des apothécies, fructifications d'ascomycètes assurant la reproduction sexuée (Ajouz, 2009).

Nomenclature et systématique

Le nom *Botrytis cinerea* a été donné par Persoon en 1801 à un agent pathogène de la vigne. Ce champignon comme beaucoup d'autres connaît une double classification :

- Une forme parfaite (téléomorphe), *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Wetzl. C'est un Ascomycète, de la classe des Discomycètes, de l'ordre des Léotiales, famille des Sclerotiniaceae.

➤ Une forme imparfaite (anamorphe), *Botrytis cinerea* Pers. C'est un Deutéromycète de la classe des Hyphomycètes, de l'ordre des Moniliales, famille des Moniliaceae. C'est de Bary (1866) qui a établi une relation génétique entre *Botrytis cinerea* Pers., organisme asexué, et *Botryotinia fuckeliana* appelé au départ *Peziza fuckeliana*, organisme sexué.

B. cinerea possède un mycélium hyalin, cylindrique et cloisonné, grisâtres ou olivâtres, dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes 11-23µm.

Le genre *Botrytis* est très proche du genre *Sclerotinia* (83 % d'identité protéique moyenne entre les deux génomes) (Amselem *et al.* 2011). Il compte 22 espèces et un hybride. La classification ancienne, basée essentiellement sur des caractères morphologiques et les spectres d'hôtes a été révisée récemment par une approche de généalogie multiple (Staats *et al.* 2005).

Botrytis cinerea se classe comme suit :

Règne : Fungi
Division : Ascomycota
Classe : Leotiomycetes
Ordre : Helotiales
Famille : Sclerotiniaceae
Genre : Botrytis
Espèce : *Botrytis cinerea* (Hakim ALILOU, 2012).

Cycle infectieux de *B. cinerea*

Botrytis cinerea possède un cycle infectieux sexué et asexué. Il peut produire soit des spores asexuées (macroconidies) ou sexuées (microconidies), soit du mycélium ou des sclérotés (Ajouz, 2009). Durant l'hiver, *B. cinerea* se conserve principalement sous forme de sclérotés dans les débris morts de l'hôte, la plupart du temps les feuilles tombées au sol. Les sclérotés, dans des conditions particulières, développent des apothécies qui donnent des ascospores. Ces apothécies sont rarement observables mais constituent aussi une forme de dissémination du champignon. Les sclérotés germent et produisent un mycélium qui, grâce à ses appressoria, perforera la cuticule végétale. Il y aura par la suite, développement des conidiophores portant des macroconidies (spores asexuées) qui serviront d'inoculum primaire (Figure 1). Les macroconidies libérées seront principalement propagées à l'aide du vent et de la pluie, ce qui sera considéré d'inoculum secondaire. Le mycélium

de *B. cinerea* peut aussi se conserver dans les débris de l'hôte durant l'hiver pour par la suite produire des conidies et servir d'inoculum primaire (Williamson et al., 2007). Pour plusieurs fruits et légumes (ex. courgette, fraise, pomme), l'infection commence généralement sur les fleurs sénescentes puis se propage sur les fruits adjacents en développement (Williamson et al. 2007). L'infection par *B. cinerea* peut aussi être favorisée par des blessures sur les fruits ou les feuilles (Elmer et Michailides, 2004). De plus, *B. cinerea* peut, selon les conditions environnementales, effectuer plusieurs cycles de reproduction asexuée au cours d'une saison.

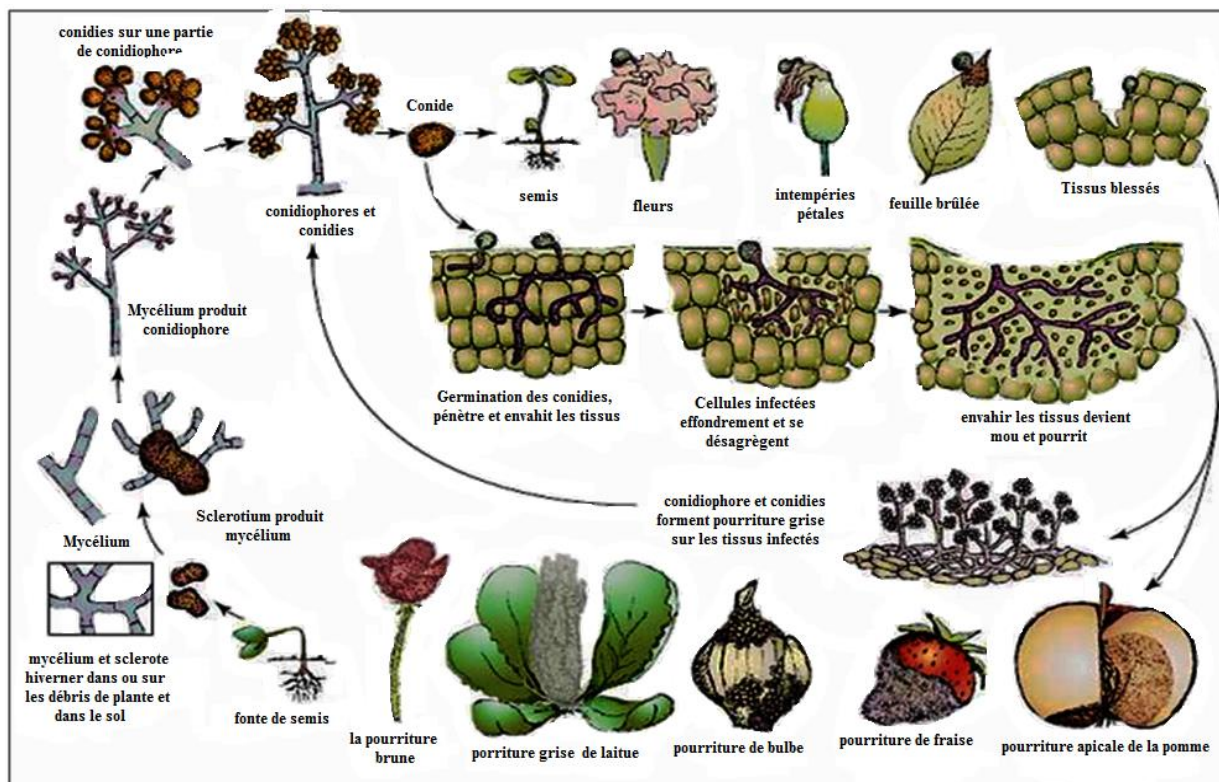


Figure 11- Cycle de développement (production asexuée) de *Botrytis cinerea* sur différentes cultures (d'après Agrios, 2005).

Symptôme et dégâts

Au niveau des blessures contaminées, *B. cinerea* a une évolution d'autant plus rapide que les fruits sont plus mûrs. Si l'atmosphère du local de conservation est très humide, un mycélium blanc et dense peut apparaître en surface et contaminer les fruits sains adjacents provoquant la formation de 'nids' de pourriture dans les caisses (Bondoux, 1992). Les symptômes qui sont les plus typiques pour les feuilles et les petits fruits sont l'apparition de taches brunes, suivies par l'apparition de feutrage grisâtre, qui sont en fait les conidies (Williamson et al., 2007).

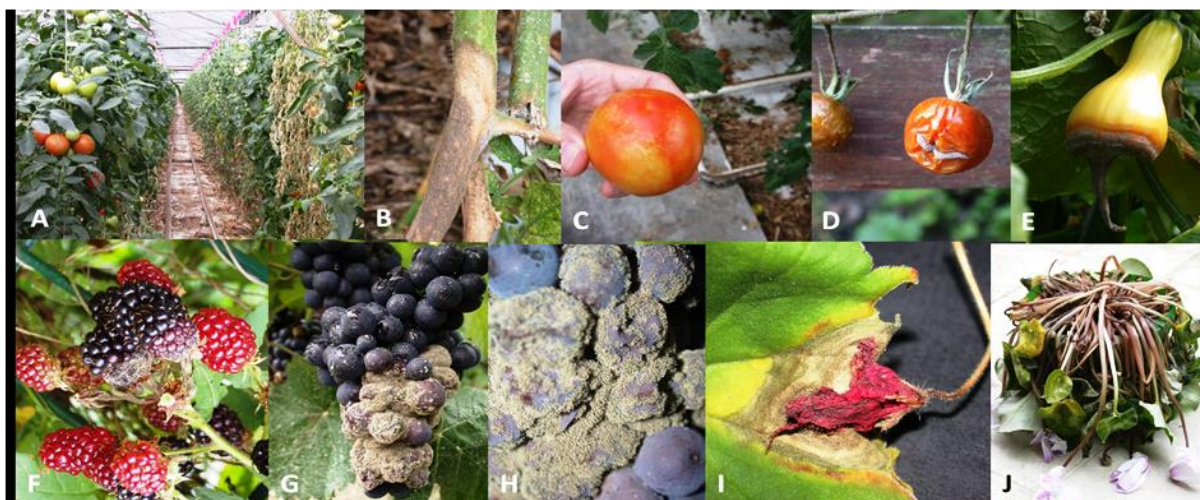


Figure 12-Symptomatology et morphologie de *Botrytis cinerea*. A : Attaque en serre de tomate. La proximité des plantes et la litière infectée au sol favorisent les épidémies. B : Chancre sur tige de tomate. C : Tâches fantôme sur tomate, correspondant à des infections avortées. D : Surinfection sur tomate cerise infectée par le mildiou. *B. cinerea* est également un parasite de faiblesse. E : Jeune fruit de concombre infecté. F : Infection sur mûres cultivées. G et H : Mycélium sporulant sur grappe de raisin. I : Infection sur feuille de *Pelargonium*, après contact d'une fleur infectée. J.

Gamme d'hôte de *B. cinerea* et cycle épidémiologique

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 (Rosslénbroich et Stuebler, 2000 ; Gudelj et al., 2004 ; Hubert et al., 2005). Il affecte de nombreuses productions végétales d'importance économique en culture sous serre ou en plein champ, comme par exemple : le raisin, la pomme, la poire, la cerise, la fraise et le kiwi en production fruitière, l'aubergine, la carotte, la laitue, le concombre, le poivron, la tomate, la courgette en production légumière ou des plantes ornementales comme la rose, le gerbera ou le cyclamen. 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). Les conidies de *B. cinerea* ont des origines très variées compte tenu de la polyphagie de cette espèce. Beaucoup de débris végétaux peuvent être le support des conidies, y compris sur les arbres : chancres, feuilles desséchées, fruits pourris. Les blessures infligées au moment de la cueillette peuvent être facilement contaminées. En effet, une fois l'agent pathogène installé, les conidies se dispersent facilement vers les fruits adjacents. Dans le cas où *B. cinerea* a besoin de lumière pour la sporulation, la dissémination peut se faire par des pédoncules infectés (Bondoux, 1992).

Pathologie

L'infection des structures végétales peut se faire de différentes façons. Les tubes de germination des conidies peuvent passer à travers la barrière cuticulaire par action enzymatique, par les stomates (ouverture microscopique dans l'épiderme d'une feuille, éventuellement d'une tige, assurant les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère) ou par les blessures provoquées par des piqûres d'insectes. L'infection par du mycelium provenant de tissus morts de parties végétales infectées est aussi fréquente (Coley-Smith et al., 1980; Jarvis 1977).

Infection par action enzymatique

Les dommages physiques ou la pénétration mécanique brutale de la cuticule par *B.cinerea* est généralement pas observée (Williamson et al, 1995; Cole et al, 1996) ce qui indique que l'activité enzymatique est impliqué dans la pénétration des surfaces de l'hôte (Salinas et Verhoeff, 1995). L'infection des plantes hôtes par *Botrytis* spp. est méfiée par de nombreuses enzymes extracellulaires et des métabolites. Chacun de ces composés peut jouer un rôle dans différentes étapes du processus d'infection. (Chitinases, polygalacturonases, laccases, xylanases, lipases...) sont des enzymes dégradant des parois cellulaires qui peuvent faciliter la pénétration à la surface de l'hôte, tandis que des toxines, oxalate et des espèces réactives de l'oxygène peuvent contribuer à la destruction des cellules hôtes.

Les conidies de *Botrytis cinerea* adhèrent à la plante par interactions hydrophobes entre leur paroi cellulaire et la cuticule du fruit (Bessis 1972). Lors de leur germination, une cutinase est sécrétée, dissolvant la barrière cuticulaire de la plante et leur permettant ainsi d'atteindre l'épiderme (Gindro 2000). A ce stade, *Botrytis cinerea* sécrète d'autres enzymes, les polygalacturonases (ou pectinases) dégradant la pectine (constituant du ciment cellulaire assurant la solidité des tissus).

Infection par les stomates

Certains mécanismes hôte-pathogène se font par la pénétration des tubes germinatifs par les stomates. *B. cinerea* est un opportuniste qui peut déclencher l'infection au niveau des sites de la plaie, ou sur des sites préalablement infectés par d'autres agents pathogènes. Néanmoins, *Botrytis* spp. sont parfaitement capables de pénétrer les surfaces d'accueil intactes.

Infections par le mycelium

Botrytis cinerea se développe de façon limitée à la base des étamines déhiscentes, permettant ainsi la contamination directe des fruits par le champignon. L'infection par le mycélium se produit de fruit à fruit. Ce mécanisme est dépendant du milieu environnemental de la plante. Le

développement du champignon est favorisé par certains facteurs externes comme : l'humidité, les tissus morts, la température, les lésions de la plante et la lumière.

Les facteurs de développement

La température

La température optimale pour la croissance mycélienne varie selon les souches de *B. cinerea* mais dans l'ensemble elle est comprise entre 18 et 23°C (Jarvis, 1977). Tandis que la germination des sclérotés de plusieurs souches est favorisée par les basses températures. La température optimale pour la germination des conidies était comprise entre 20 et 30°C. À des températures inférieures à 5°C et supérieures à 35°C, les spores de *B. cinerea* ne germent pas après 48 heures d'incubation. A 10°C la germination est très retardée avec seulement 60% de conidies germées 48 heures après l'inoculation. (Shiraishi et al., 1970a). Sirry (1957) ont constaté qu'à 21°C, les conidies de *B. cinerea* germent à 100%. Jarvis (1977) a rapporté que les conidies de *B. cinerea* germent à 100% à 20°C, 15°C et 5°C avec 100% d'humidité. Le mycélium aérien et la sporulation se développent d'une manière plus rapide à 21°C. (Thomas and Marois, 1986). Davidson et Krysinska-Kaczmarek (2007) ont définis les conditions optimales pour l'infection et la sporulation sur la lentille à 15-25°C. La sporulation est limitée à 10°C et stoppée à une température inférieure à 5°C ou supérieure à 30°C.

L'humidité

L'humidité relative et la disponibilité en eau à la surface des plantes ont toujours été considérées parmi les facteurs majeurs influençant le processus des infections dues au genre *Botrytis* (Blakman, 1980). Jarvis (1977) a rapporté que les conidies de *B. cinerea* germent à 100% à 20°C, 15°C et 5°C avec 100% d'humidité. Snow (1949), estime que les conidies de *B. cinerea* ont besoin de niveaux élevés d'humidité relative pour la germination. A 95% d'humidité relative, seulement 80% des conidies de *B. cinerea* germent à 15°C et 5°C, en revanche 100% des spores germent à 20°C (Jarvis, 1977). À 90% d'humidité relative, 85% des conidies germent à 20°C, et la germination s'arrête quand les conditions d'humidité relative et de température sont plus faibles (Jarvis, 1977). Dans des conditions d'humidité relative de l'ordre de 80 à 100%, l'incidence de la maladie sur concombre est plus grave qu'en condition sèche (Yunis et al., 1990). Le mycélium aérien et la sporulation se développent d'une manière plus rapide à 21°C et 94% d'humidité relative et en présence d'un vent limité (Thomas and Marois, 1986). Une surface d'eau libre ou une humidité relative élevée (95%) semblent même nécessaires à la germination des conidies et à la pénétration des filaments germinatifs, et au succès de l'infection (Williamson et al., 1995). D'après

O'Neill et *al.*, (1997), la phase de sporulation est favorisée par une forte humidité relative et l'interruption de ces conditions entraîne un retard de sporulation. Enfin, les apothécies sont généralement produites dans des conditions fraîches et humides (Kochenko, 1972). Dans des conditions contraires (en atmosphère sèche), les apothécies sèchent rapidement et cessent de former des ascospores (Jarvis, 1977).

La lumière

La germination des conidies de *B. cinerea* se produit aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, pourvu qu'il y ait de l'eau et des nutriments en quantité suffisante (Blakeman, 1980). La sporulation de *B. cinerea* est par contre dépendante de la qualité de la lumière reçue et surtout des UV (Elad, 1997; West et *al.*, 2000). La survie des conidies dans l'air est également influencée par la qualité de la lumière. D'après Rotem et Aust (1991), les rayons UV influencent fortement la mortalité des conidies ; la longévité sous UV a été réduite à 3 minutes contre 14 mois pour les conidies sèches incubées à température ambiante (Salinas et *al.*, 1989).

Exigences nutritives

De nombreuses expériences ont montré que la germination de *B. cinerea* dans l'eau était significativement plus faible que dans une solution nutritive (Kosuge and Hewitt, 1964). La germination des spores de *B. cinerea* dans l'eau (absence de nutriments) a cependant été observée pour certaines souches (Doehlemann et *al.*, 2006). La présence de nutriments tels que le glucose et le fructose favorise la germination et l'élongation du filament germinatif (Clark and Lorbeer, 1977; Kosuge and Hewitt, 1964) et permettent à des conidies âgées de retrouver leur pouvoir germinatif (Shiraishi et *al.*, 1970b).

La lutte contre *Botrytis cinerea*

Lutte culturaux

Choix du site et type de plantation

Le site et la méthode de plantation doivent faire en sorte d'assurer un séchage rapide du feuillage et des fleurs afin de limiter le développement du champignon. Ainsi, il faut choisir un site où l'air circule facilement, avec une bonne exposition au soleil, sur un sol qui se draine bien. Il est préférable d'orienter les rangs dans le sens des vents prédominants, toujours pour assurer un séchage rapide du feuillage Wilcox (1993).

Irrigation

Les conditions environnementales, en particulier l'humidité relative, jouent un rôle clef pour l'infection de la plante par *B. cinerea* et le développement de la maladie. L'idée générale encore une fois est d'éviter que le feuillage reste humide longtemps. Ainsi, le CPVQ (1985) recommande d'irriguer de préférence le jour et lorsque la température dépasse 20°C. Hofstetter (1990) recommande quant à lui d'irriguer tôt le matin par journée ensoleillée de façon à accélérer le séchage de la surface du sol et donc réduire la sporulation du champignon. L'irrigation goutte-à-goutte permet de réduire les risques de maladie en gardant le feuillage sec.

Rotation

Une façon simple d'éviter les problèmes de pourriture grise est de faire une rotation courte, c'est-à-dire de ne faire la récolte qu'une année.

Variétés résistantes

Pour l'ensemble des cultures attaquées par le champignon, il n'existe aucune variété commerciale résistante à la pourriture grise (Dik and Wubben, 2004). Cependant, il existe une différence importante dans la sensibilité à la pourriture grise pour certaines plantes. Sur tomate, la résistance à *B. cinerea* est quantitative et liée à différents gènes de résistance chez l'hôte (Dik and Wubben, 2004; Finkers et al., 2008). Une résistance partielle liée à trois QTL a été identifiée chez une variété sauvage de la tomate *Solanum habrochaites* LYC4 (Finkers et al., 2008).

Lutte chimique

Les fongicides anti-Botrytis utilisés en végétation ont largement évolué depuis le début des années 1970, où les premières matières actives apparues sur le marché français pour lutter contre la pourriture grise furent le folpel, le captafol, l'euparène (dichlofluanide) et le thirame. Des progrès ont été réalisés dans les années 1970 avec la commercialisation des benzimidazoles, des thiophanates, et des dicarboximides à partir de 1976 (Leroux et al., 1999). La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire (Leroux, 2004). La plupart des fongicides anti-Botrytis utilisés ont une action directe sur le champignon. Les substances actives comme le folpel, le thirame, le fluazinam et le dichlofluanide inhibent la respiration mitochondriale. En altérant la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ou ADN), l'iprodione, le procymidone, le vinchlozoline et le fludioxonil entraînent une instabilité mitotique qui conduit à une perturbation de la croissance des hyphes mycéliens. Le carbendazime, le bénomyl et le thiophanate de méthyle sont également capables d'inhiber la synthèse d'ADN et perturbent la réplication et la formation de microtubules. La

biosynthèse des stérols est affectée chez le champignon soumis au fenhexamide, quand celle de la méthionine est perturbée suite à l'application du pyriméthanil, du cyprodinil et du mépanipyrim (Elad *et al.*, 1992 ; Rosslenbroich et Stuebler, 2000).

Il a été suggéré que l'exposition continue des populations de *B. cinerea* à l'application chimique présente des difficultés liées à la résistance des souches aux principaux produits commercialisés. Plus récemment, des souches résistantes au dichlorofluanide, mais demeurant sensibles au chlorothalonil et au thirame, ont été décrites en Grande-Bretagne et en Grèce (Leroux *et al.* 1993a). Barak et Edgington (1984) ont rapporté une pathogénicité de souches de *B. cinerea* résistantes au captane similaire à celle des souches sauvages sur les fraises et les pommes. Des souches résistantes aux fongicides de la famille des dicarboximides, tels que l'iprodione, le vinchlozoline et la procymidone, sont apparues pour la première fois en 1977 (Pappas *et al.*, 1979). Ces résistances sont encore détectées aujourd'hui (Myresiotis *et al.*, 2007). De même, les applications fréquentes sur vigne de benzimidazoles et de thiophanates (bénomyl, carbendazime, thiophanate-méthyl par exemple) ont provoqué très vite l'apparition de souches résistantes à ces molécules (Georgopoulos, 1977). Le développement de souches fortement résistantes à l'ensemble des familles constitue un problème dans la lutte contre *B. cinerea*, justifiant ainsi à faire appel à d'autres méthodes alternatives à la lutte chimique contre ce champignon.

Lutte biologique

La lutte biologique a pour principe d'utiliser des micro-organismes antagonistes, champignons filamenteux, levures et bactéries, afin de réduire la densité de l'inoculum de l'agent pathogène ou d'altérer son activité pathogène. La protection conférée par un agent biologique peut être basée sur un ou plusieurs mécanismes d'action : la compétition pour les éléments nutritifs ou l'espace, le parasitisme, la production de substances toxiques pour le pathogène (antibiose) et/ou la stimulation des défenses de la plante (Thomashow & Weller, 1996 ; Yedida *et al.*, 1999 ; Haas *et al.*, 2000). Le champignon le plus largement étudié est le *Trichoderma* spp. Les travaux sur le biocontrôle de *B. cinerea* à l'aide de ce champignon ont débuté il y a 30 ans (Dubos *et al.*, 1978, 1982). Des produits à base de *T. harzianum* et *T. viride* ont été formulés afin d'être commercialisés en tant qu'anti-Botrytis (Tableaux 5). Wood (1951) estime que les activités saprophytes de deux antagonistes (*Fusarium* spp. et *Penicillium claviforme*) sur les tissus morts de laitue sont responsables du contrôle de l'agent pathogène *B. cinerea* en conditions naturelles.

Tableau 5- Exemple de produits de lutte biologique commercialisés dans le monde pour la lutte contre *Botrytis cinerea* (d'après Elad and Stewart, 2004 ; Fravel, 2005)

Nom de produit	Antagoniste	Utilisation
Trichodex	<i>Trichoderma harzianum</i>	En vignes et cultures sous serre
Binab	<i>Trichoderma harzianum</i> et <i>Trichoderma polysporum</i>	Culture de fraise
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	En serre sur concombre, tomate, poivron, laitue et plantes ornementales
Plantshield	<i>Trichoderma harzianum</i>	Culture sous serre
Botry-Zen	<i>Ulocladium oudemansii</i>	Vignes
Aspire	<i>Candida oleophila</i>	Fruits après récolte
Yield Plus	<i>Cryptococcus albidus</i>	Fruits après récolte
Bio-save	<i>Pseudomonas syringae</i>	Fruits après récolte
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i>	Cultures sous serre et de plein champ

De plus, des rhizobactéries appelées PGPR pour « plant growth-promoting rhizobacteria » ont montré une efficacité dans la lutte contre *B. cinerea*. Blakeman et Fraser (1971) et Blakeman (1972) ont signalé l'effet antagoniste de bactéries vis-à-vis de *B. cinerea* sur les feuilles de chrysanthèmes et de betteraves. Dans des tests *in vitro*, la croissance mycélienne de *B. cinerea* est réduite de 85% en présence de la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* (Gulati et al., 1999). L'application de la bactérie *Serratia plymuthica* sur les feuilles de concombre réduit l'incidence de *B. cinerea* de 76 % en conditions de serre (Kamensky et al., 2003). Un certain nombre de levures (dont *Pichia* et *Rhodotorula*) et de bactéries (dont *Bacillus* et *Pseudomonas*) ont également été signalées pour leur efficacité dans le contrôle de *B. cinerea* en traitement post-récolte (Buck and Jeffers, 2004; De Meyer and Hofte, 1997; Elad et al., 1994b; Guetsky et al., 2002).

Partie expérimentale

Chapitre IV - Réponse de la germination de deux génotypes de tomate

au stress salin

Introduction

La germination est le premier stade physiologique affecté par les stress environnementaux. La capacité germinative des graines dépend des conditions du milieu, en particulier, par la disponibilité de l'eau dans le sol (Gutterman, 1993 in Ndour et Danthu, 2000), et en teneur en sels (Slama, 2004). Selon Maillard (2001), et Abdelly (2006), la plupart des plantes sont sensibles à la salinité durant les stades de germination et de levée par rapport au reste du cycle. Dans ce cas, l'effet nocif du sel est de nature osmotique ou toxique. D'après Belkhodja et Bidai (2004), Lachiheb et *al.* (2004) et Mâalem et Rahmoune (2009), le ralentissement de la vitesse de germination, rend les semences plus exposées aux risques du milieu. Ce qui abaisse le taux de graines germées en fonction de la concentration en sels. La présence excessive de sels solubles peut empêcher l'imbibition de la graine suite à une diminution des activités enzymatiques et une forte absorption de Na⁺ par rapport à K⁺. Ce qui conduit à une toxicité embryonnaire et un retard dans les processus métaboliques (Munns, 2002). Parmi les causes de l'inhibition de la germination en présence de sel, on peut citer la variation de l'équilibre hormonal (Debez *et al.*, 2001). Pour étudier l'effet de la salinité sur la germination de la tomate, nous avons, dans un premier temps, effectué un essai pour caractériser deux génotypes. L'objectif étant de suivre la réponse de ces deux génotypes à différentes doses de salinité pour une meilleure compréhension de la sensibilité de la plante à la salinité au stade germinatif.

Matériels et méthodes

Le matériel végétal a été composé de deux génotypes de l'espèce *Lycopersicon esculentum* : Guelma et CX206. Le but de notre travail est de connaître l'influence des différentes concentrations salines sur la germination de la tomate. La première partie dans notre travail consiste à tester le pouvoir germinatif des graines de la tomate sous stress salin à la température ambiante.

Les graines de deux variétés de tomate sont stérilisées par hypochlorite de sodium, puis séchées sur papier filtre stérile avant d'être déposées dans des boîtes de Pétri. Ces dernières contiennent deux couches de papier filtre stérile imbibé d'une solution d'NaCl aux concentrations : 50, 100, 150 et 300 meq.l⁻¹. Les lots témoins sont placés sur papier filtre imbibé d'eau distillée stérile. Les boîtes de Pétri, contenant chacune 20 graines, sont placées à l'obscurité. Cinq répétitions sont prévues pour chaque traitement et pour chaque variété. Les observations sont

menées quotidiennement pour évaluer les premières germinations enregistrées dès que la radicule apparaît. Au cours des tests de germination, nous avons estimé: le taux de germination cumulée, la durée de la germination et la vitesse de la germination.

Résultats

La figure 13 montre la variation du pourcentage germinatif des semences des deux génotypes de la tomate en fonction des doses croissantes de NaCl. En absence de sel, la variété CX206 se distingue par sa faculté germinative plus élevée (85%) que celle du génotype Guelma (65%). Cette tendance est retrouvée pour les deux autres concentrations en sels de 50 et 100 meq.l-1. Pour les deux dernières concentrations (150 et 300 meq.l-1), la germination est nulle. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'un comportement spécifique des deux génotypes étudiés en termes de germination. Dans ce cas, la variété CX206 est plus tolérante que la variété Guelma.

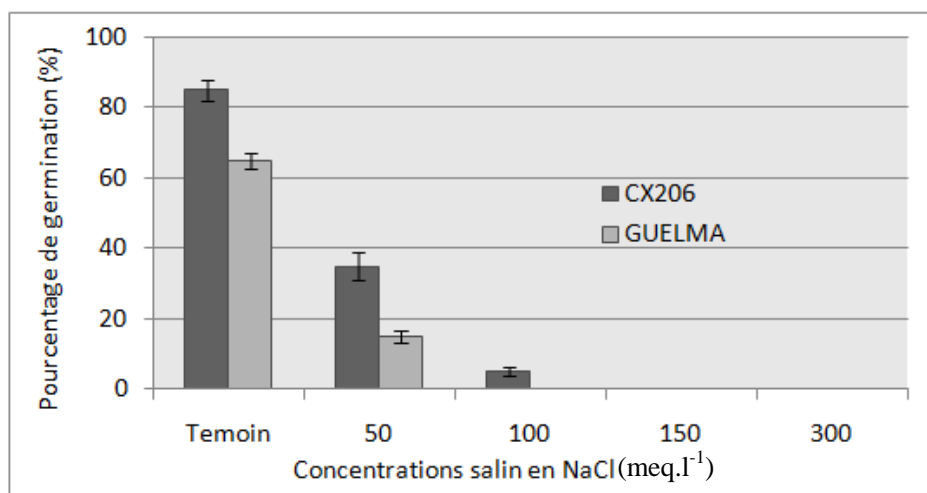


Figure 13-Effets de la salinité sur le pourcentage final de germination (%) de deux génotypes de la tomate *Lycopersicon esculentum*).

Pour la durée de germination, les deux génotypes expriment la même réponse au traitement témoin (Fig. 13). Par contre, elle s'étale significativement à 3 jours dans le traitement de 50 meq.l⁻¹ pour le génotype Guelma.

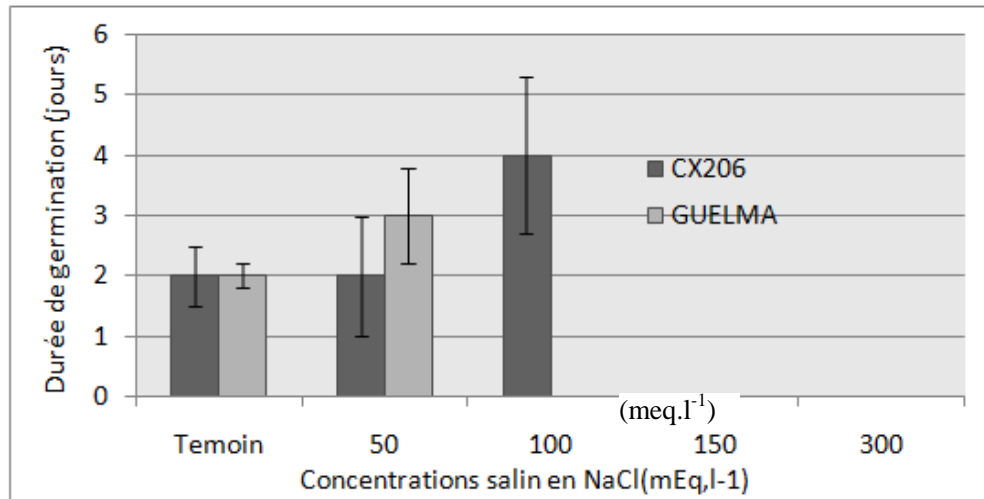


Figure 14-Effets de la salinité sur la durée de germination (jours) de deux génotypes de la tomate (*Lycopersicon esculentum*).

Cet étalement n'est que de 2 jours pour la variété CX206. L'effet de NaCl sur le comportement germinatif de tomate se traduit par une augmentation du temps de latence et une diminution du taux de germination.

Discussion et conclusion

Compte tenu des résultats obtenus dans cette expérience, le stress salin conduit à une inhibition du pourcentage final de germination pour les deux génotypes de tomate. Ces résultats confirment ceux obtenus sur la même espèce par Bozouk(1981) et Regragui (2005). Il est important de noter que des doses fortes dépassant les 150 meq.l⁻¹ conduisent à une inhibition totale de la germination. En effet, l'excès de NaCl entraîne une carence hydrique chez la plante. Cette carence est le résultat d'une déshydratation du cytoplasme qui affecte le métabolisme des cellules et la fonction des macromolécules et réduit finalement la croissance des plantes (Taffou et al., 2009). Le sodium absorbé a des effets toxiques sur la germination des graines, principalement par une perturbation du déplacement de Ca²⁺ dans la paroi cellulaire. Ceci est de nature à perturber la synthèse calcique et par conséquent, affecter la croissance des racicules (Xue et al.,2004 ; Martinez et al.,2005).

Le taux et la durée de germination constituent les deux paramètres pertinents de sélection variétale dans plusieurs études en milieux salés (Mallek et Maalej, 1998). En effet, Prado et al. (2000), montre que la diminution du taux de germination des graines est due à un processus de dormance osmotique développé sous des conditions salines. Il pourrait s'agir également d'une difficulté d'hydratation des graines suite à un potentiel osmotique élevé entraînant une certaine

inhibition des mécanismes aboutissant à la sortie de la radicule hors des téguments et par conséquent un retard de germination des graines (Gill, 2003). Parmi les causes de l'inhibition de la germination en présence de sel, la variation de l'équilibre hormonal a été évoquée par Debez et *al.* (2001). Elle pourrait être due à l'altération des enzymes qui se trouvent dans la graine (Botia, 1998). Ce dérèglement hormonal va de ce fait, modifier l'organogenèse et la morphogenèse de radicule. Les hormones de croissance telles que, l'acide abscissique (ABA), composé métabolisé sous l'action du Na^+ joue un rôle important dans la germination et possède les mêmes propriétés que NaCl. Cet ABA agit en limitant l'absorption d'eau (Schopper et *al.*, 1979) et en inhibant la synthèse d'enzymes spécifiques à la germination (Black, 1983). En définitif, le pourcentage et la durée de germination sont ainsi utilisés comme stratégie d'adaptation des plantes à l'égard des contraintes environnementales.

Chapitre V - Influence de la salinité du milieu sur le développement in vitro de *Botrytis cinerea*

Introduction

Une bonne croissance et un bon développement de la plante assurent un état intérieur cellulaire favorable non seulement au milieu intercellulaire mais aussi au sol. Les conditions climatiques et édaphiques sont des facteurs limitants à la croissance et au développement des plantes. Les stress biotiques et abiotiques constituent de nos jours des contraintes importantes à la production agricole. En effet, la salinité figure parmi les contraintes environnementales les plus néfastes pour l'agriculture. Un stress salin croissant commence souvent par une augmentation de la pression osmotique de la solution du sol et se termine par un niveau de toxicité de plus en plus élevé tel que l'ensemble des fonctions physiologique, biochimique et moléculaire de la plante soient perturbé. Dans ce cas, suite à l'augmentation de la salinité du sol, l'eau a tendance à quitter les cellules et donc provoquer un déficit hydrique. Ce qui provoque une réduction de la croissance de la plante et une baisse de sa productivité.

Dans les régions arides et semi arides, les contraintes biotiques et abiotiques peuvent affectés simultanément les plantes cultivées. Dans ce cas de figure, l'étude de la réaction des cultures s'avère très complexe étant que non seulement la plante est affectée par la salinité des sols et des eaux d'irrigation mais aussi par l'agressivité des agents pathogènes d'origine fongique elle-même stimuler par la salinité. C'est le cas du *Verticillium dahliae* et du *Fusarium oxysporum fsp lycopersici* et *Phytophthora*. Spp. (Ioannou et al., 1977; Besri, 1981; Benyahya, 1998; Sommers et al., 1970), Swiecki et Mac Donald (1991), rapportent que la formation des sporanges de *Phytophthora parasitica* est plus importante en présence de NaCl et de CaCl₂ par rapport aux témoins sans sel.

A la lumière de ces données, il apparaît donc nécessaire d'examiner l'impact de la salinité sur le développement de *Botrytis cinerea*. Pour cela, nous abordons dans l'essai suivant, l'étude *in vitro* des effets de la salinité sur le développement de *Botrytis cinerea* en vue d'une meilleure compréhension du comportement du champignon dans des sols salés.

Article 1 (International Journal of Microbiology)

Hindawi Publishing Corporation
International Journal of Microbiology
Volume 2015, Article ID 572626, 8 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/572626>



Research Article

Effects of Two Salts Compounds on Mycelial Growth, Sporulation, and Spore Germination of Six Isolates of *Botrytis cinerea* in the Western North of Algeria

Boualem Boumaaza,¹ Mohamed Benkhelifa,¹ and Moulay Belkhouja²

¹Department of Agronomy, Laboratory of Plant Protection, University of Abdelhamid Ibn Badis, BP 300, 27000 Mostaganem, Algeria

²Sciences Faculty, Vegetal Ecophysiology Laboratory, University of Es Senia, BP 1524, ElMnouer, Oran, Algeria

Correspondence should be addressed to Boualem Boumaaza; agroboum@hotmail.fr

Received 19 December 2014; Revised 26 February 2015; Accepted 5 March 2015

Academic Editor: Maurizio Sanguinetti

Copyright © 2015 Boualem Boumaaza et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Six isolates of *Botrytis cinerea* were isolated from leaves and stems of different tomato varieties taken from four areas in the northwest of Algeria where tomato is mostly grown in greenhouses and high tunnels. The purpose of this research was to determine the effect of two salts, NaCl and CaCl₂, on three stages of *Botrytis cinerea*'s life cycle. All isolates tested were stimulated in 50 to 150 ppm; NaCl was the most effective treatment to increase mycelial growth at two tested concentrations. However, at 300 ppm concentration, CaCl₂ completely inhibited the growth of mycelium; they reach 34.78% for the isolate TR46 and 26.72% for isolate F27. The sodium and calcium salts stimulated conidia production in liquid culture. We noticed that the effect of calcium chloride on sporulation was average while sodium chloride. In the medium containing 50 ppm, calcium chloride and sodium chloride increased the germination capacity of most isolates compared with the control. Other calcium salts, at 100 or 300 ppm, decreased the germination percentage of the conidia. With the exception of sodium salts, the inhibitions of germination reduce at 150 or 300 compared with the control. Conidial germination was slightly inhibited by sodium chloride only when the concentration was over 300 ppm.

1. Introduction

Grey mould, caused by *Botrytis cinerea* (Sclerotiniaceae family), is an important plant disease that affects a large number of plant species and is particularly important in greenhouse production of tomatoes in the Mediterranean Basin [1]. In greenhouse tomato, the fungus infects flowers, fruits, and leaves and can grow through the petiole into the stem [2, 3].

Soil salinity is a major constraint to agricultural production around the world. This problem is one of the major stresses especially in arid and semiarid regions [4] and can severely limit plant growth and productivity [5, 6].

In Algeria, a wide range of environmental stresses (such as high and low temperature, drought, alkalinity, salinity, and pathogen infection) are potentially harmful to the plants. Soil salinity and irrigation water are two of the main serious problems hindering the development of most plant species [7].

Thus, the effect of these factors may result from structural and physiological changes in the plant, an increased incidence, and severity of diseases caused by various species pathogen. Reference [8] showed that relatively low levels of salinity (25–50 mEq) could increase the severity of *Phytophthora* root rot of tomato with high Na:Ca ratios (10:1), *Phytophthora* [9–12], *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* [13], *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* [14], and *Verticillium dahliae* and *Alternaria solani* [15].

Ca is an essential element in all plants [16]. The ability of Ca to form intermolecular linkages gives it an important role in maintaining the integrity and structure of membranes and cell walls [17]. Ca is also used as a second messenger in many signal transduction pathways within the cell [18]. Its role in the physiology of plant tissue is well established [19]. Several studies have reported that Ca treatment of plant tissue induces an increase in tissue Ca content [20], resulting in reduced fungal diseases. The mechanisms by

which calcium salts inhibit the development and severity of diseases are not known. One hypothesis is that high external Ca^{2+} concentrations may increase the concentration of Ca^{2+} in the cytosol, which can be toxic to the fungus. The ability of calcium to reduce the development of postharvest diseases of fruit has been attributed mainly to the formation of calcium cross-linkages in the cell wall, resulting in decreased effectiveness of cell wall-macerating enzymes secreted by the pathogen [21]. Reference [22] also demonstrated a relationship between increasing levels of calcium in the cell walls of potato tubers and a reduction in the macerating activity of *Erwinia carotovora*.

All the studies on the effect of Ca on *Botrytis* showed that it has an inhibitory effect on growth of this fungus at high concentrations [23–25]. This effect is thought to be mainly due to the role of calcium in ameliorating physiological disorders and thus indirectly reducing pathogen activity [26, 27]. Reference [25] has indicated that calcium chloride reduced germination and germ tube elongation of *B. cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro. Reference [28] also has reported a similar effect of calcium in reducing the susceptibility of rose flowers to gray mold caused by *Botrytis cinerea*.

For the most effective control of disease, it seems necessary to examine the impact of salinity on the development of pathogen. The objective of this study was to determine the in vitro effect of sodium and calcium salts on spore production, conidia germination, and mycelial growth of *B. cinerea*.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal Isolates. *B. cinerea* isolates were obtained from decayed tomato (*Lycopersicon esculentum*) in northwestern Algeria. The leaf fragments were placed on filter paper moistened with sterile water in a Petri dish. *B. cinerea* was cultured on potato dextrose agar (PDA) incubated at 25°C. Conidia were harvested from 14-day-old cultures by agitating small pieces of agar, bearing mycelia and conidia, in a glass tube.

2.2. Effect on Sporulation. Conidia of *B. cinerea* were obtained from 2 week old PDA cultures incubated at 25°C in 12/12 hours light/dark. Culture plates were vortexed in a tube containing 10 mL sterile distilled water and 0.05 mL Tween 80. A sterile magnetic stir bar was placed on the agar and set stirring for 5 minutes to loosen the spores. The suspension enriched in spores was filtered through glass filter to eliminate mycelium. Finally the conidial concentration was determined using a Malassez cell and adjusted to 10^5 spores per mL.

2.3. Effect on the Germination of Conidia. To determine the influence of NaCl and CaCl_2 on spore germination of *B. cinerea*, a drop containing 100 conidia was transferred onto water agar plates enriched with NaCl and CaCl_2 : 0, 50, 100, 150, and 300 mEq. The plates were incubated at 25°C in the dark for 24 hours. Results were expressed as the percentage of germinated conidia. A conidium was considered as

germinated if the germ tube length was at least twice the length of the conidium.

2.4. Effect on Mycelial Growth. The influence of NaCl and CaCl_2 on the diameter growth was determined by growing the isolates in a PDA medium at four NaCl and CaCl_2 levels (50, 100, 150, and 300 mEq); control medium was not amended with salts. Mycelium growth inhibition was evaluated by placing a plug (4 mm diameter) from an actively growing culture in the centre of a PDA agar plate of 9 cm plastic Petri dishes. Cultures were incubated for 7–14 days at 25°C in the dark, and each treatment had four replications. Colony diameters were measured at two perpendicular directions.

2.5. Statistical Analysis. All statistical analyses were analyzed by the software of statistics (STATBOX 6.0.4, Grimmersoft). The data were analyzed by two-way factorial. Comparison of means and interactions was performed by Duncan's multiple range tests. Statistical significance was assessed at the level of $P = 0.05$ or $P = 0.01$.

3. Results

Morphological Characteristics. All the isolates exhibited variation in their colony characteristics such as color, shape, and texture (Figure 1).

B. cinerea colonies from tomato on PDA at 25°C were visually classified into three morphological groups, GI, GII, and GIII, based on colony color and pycnidial distribution. GI (F27) isolate produced white to light grey colonies, where colony texture was generally cottony, and was present at the center of the Petri dish. GII (FA13, S27, B27, and TR13) isolates had off-white to pale gray color. Colonies generally had a medium texture. GIII (R13) isolate had grown and spread rapidly by aerial mycelia growth. The colony was generally grey color. Based on the morphological parameter of length, pycnidia can be classified into two groups: length greater in isolates FA13, S27, B27, and F27 and length less in isolates TR13 and R13. Sclerotia also vary in abundance and distribution. In some isolates both superficial and imbedded sclerotia were produced. They scattered all over the medium in Petri dish, covering the entire surface of the agar (B27 and TR13 and F27). In some isolates sclerotia were produced on concentric rings, formed along the edges of the Petri dish (FA13, S27, and R13). Sclerotia were variable in shape and size. They were black, rounded, roughly circular, or irregular in shape.

3.1. The Effects of NaCl and CaCl_2 of Culture Medium on Mycelial Growth of Six Isolates. This study evaluated the activity of 2 salts against *B. cinerea* in vitro at 4 concentrations. The effect of salts at different concentrations on mycelial growth of colonies of six isolates of *B. cinerea* in PDA was observed after 3 days. The results are shown in Table 1. All concentrations, except 300 ppm, of NaCl significantly stimulated growth of *B. cinerea*. ($P < 0.001$). Beyond this range, reduced growth has been correlated with the increasing in the NaCl of the medium.

The calcium chloride at 50 and 100 ppm stimulated mycelial growth of *B. cinerea* relative to the control. However,

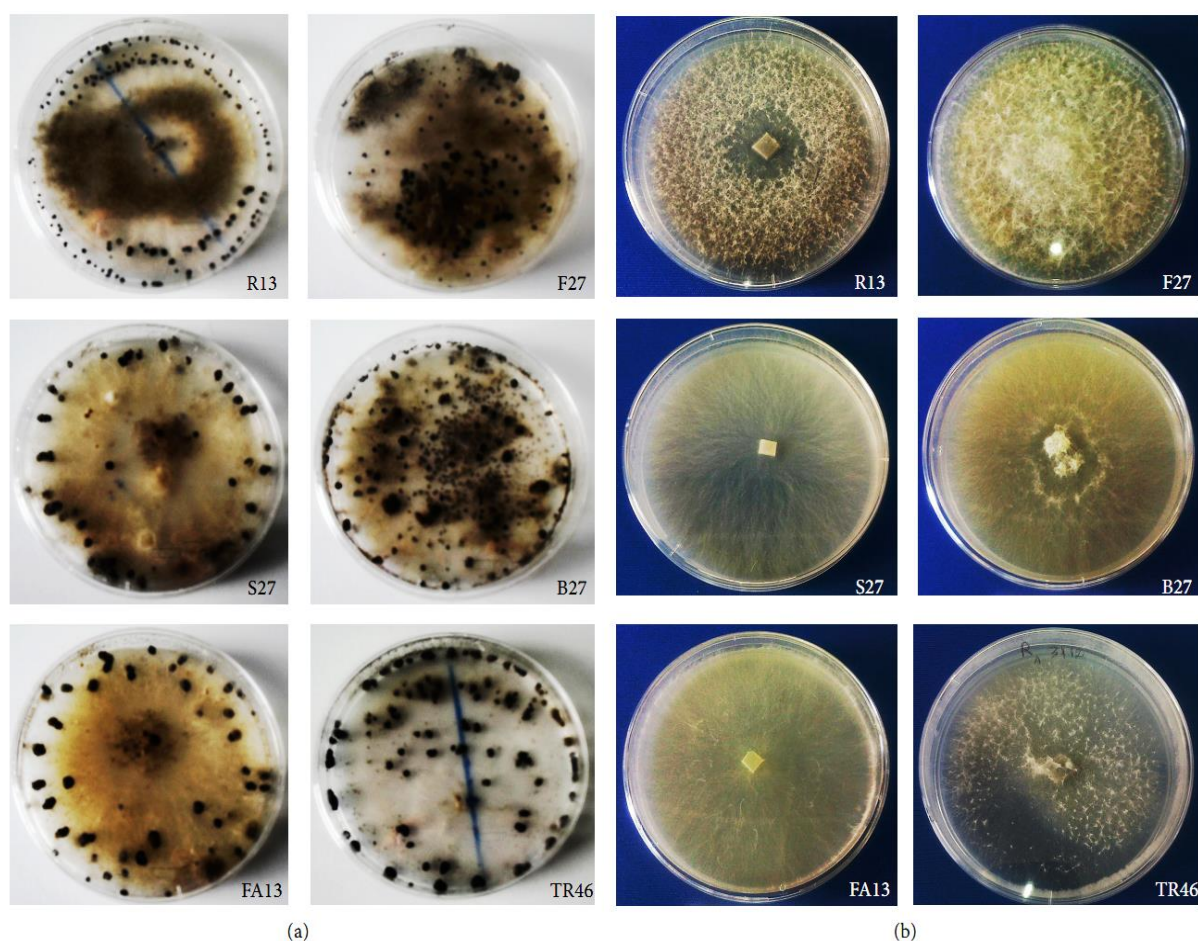


FIGURE 1: Morphological types of *B. cinerea*. (b) Mycelial growth on potato dextrose agar (PDA) medium at 25°C after two weeks. (a) Distribution and pattern of sclerotia formation on the surface of PDA after 4 weeks.

higher concentrations of calcium chloride (150 and 300 ppm) caused F27, B27, R13, TR46, S27, and FA13 to reduce growth by 26.72, 24.26, 23.24, 34.78, 15.07, and 17.04%, respectively. There was a significant reduction in growth of isolates ($P < 0.001$) with increasing calcium salt. At 300 ppm, calcium chloride was the most inhibitory, reducing growth on PDA by 34.78% for the isolate. The interaction between salt and concentration was significant for R13, TR45, S27, and FA13 ($P < 0.001$), but not significant for F27 and B27 isolates.

All concentrations were significantly different from the control ($P < 0.001$); 150 ppm CaCl_2 and 300 ppm NaCl or CaCl_2 were similar to each other and different from other concentrations in reducing mycelial growth.

3.2. The Effects of NaCl and CaCl_2 on the Production of Spores of the Six Isolates. In the absence of salt (Table 2), isolates of *B. cinerea* do not present the same profile of conidial production.

The optimum density for spore production of this fungus was from 1.97×10^6 to 2.2×10^6 spores/mL, of R13 and B27, respectively. Data in Table 2 indicate that application of chloride salts and sodium salt caused a significant increase in the production of conidiogenesis at various concentrations

tested compared with control ($P < 0.001$). However, these observations indicate that the conidial production of the six isolates might increase, even at high salinity. There was a significant increase in these characters between the control and 50 ppm concentration of salinity.

Under these salt conditions, sodium chloride is most favorable to the sporulation of all isolates of *B. cinerea*, especially at high concentrations of the culture medium. By adding 300 ppm of NaCl to the culture medium, an increase in spore production by 1.21×10^7 spores/mL can be obtained from the isolate B27. Calcium chloride stimulates little sporulation of the isolates, with only 9.2×10^6 /mL to isolate R13. The amount of spore production is in direct proportion to the concentration of salinity in the culture medium. The interaction between salt and concentration was significant for all salts isolates ($P < 0.05$) except FA13 (Table 2).

The results for the percentage germination of different isolates studied in terms of germination capacity under the effect of different salt concentrations are shown in Table 3.

The six isolates presented dissimilar percentages of germination in the presence of sodium and calcium chloride. The analysis shows that salinity affects the percentage of germination for each value of salt. There are significant

TABLE 1: Effect of different concentrations of NaCl and CaCl₂ on the percentage of mycelial growth areas (millimeter) of six isolates of *Botrytis cinerea* in PDA medium after incubation at 25°C for 3 days.

Treatment	<i>B. cinerea</i> isolate					
	F27	B27	R13	TR46	S27	FA13
Control	36.16 ^a	38.5 ^c	40.16 ^c	38.33 ^b	31 ^{cd}	37.16 ^{cd}
NaCl						
50	37.83 ^{ab}	42 ^b	41.5 ^{bc}	41.2 ^a	35.16 ^{ab}	38.66 ^{abc}
100	38.5 ^a	44.33 ^a	45.5 ^a	43.5 ^a	37.83 ^a	40.33 ^a
150	38 ^a	41.5 ^c	44 ^{ab}	43 ^a	37.66 ^a	39.83 ^{ab}
300	31.16 ^d	31.33 ^d	32.16 ^{de}	32.66 ^d	28.33 ^{de}	28 ^f
CaCl ₂						
50	36.5 ^a	40.5 ^b	41.33 ^{bc}	40.83 ^{ab}	32.66 ^{bc}	38.33 ^{bc}
100	37 ^d	42 ^a	42.5 ^{bc}	42.5 ^a	34.16 ^{bc}	39.5 ^{ab}
150	33.5 ^a	37.33 ^a	34 ^d	35.5 ^c	28.66 ^{de}	36 ^d
300	26.5 ^c	29.16 ^c	30.83 ^c	25 ^e	26.33 ^c	30.83 ^e
Two-way factor analysis of variance						
Salt	<i>P</i> = 001	<i>P</i> = 00018	<i>P</i> = 0.00001	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0.00001	<i>P</i> = 0
Concentration	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0	NS
Salt * concentration	NS	NS	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.00001	<i>P</i> = 0.001	<i>P</i> = 00004

P = probability value (significance level). NS; not significant. Z: Letters denote significant differences among means in columns within trial according.

TABLE 2: Effect of different concentrations of NaCl and CaCl₂ on sporangium formation by six isolates of *Botrytis cinerea* in vitro after 14 days in potato dextrose agar (PDA) at 25°C.

Treatment	<i>B. cinerea</i> isolate					
	F27	B27	R13	TR46	S27	FA13
Control	14.25 ^c	22.7 ^c	19.75 ^d	20.2 ^b	10.37 ^d	8.87 ^d
NaCl						
50	26.49 ^c	29.55 ^c	21.16 ^d	22.57 ^b	20.39 ^c	21.1 ^c
100	31.33 ^{bc}	31.33 ^c	45.54 ^c	35.62 ^b	32.04 ^d	29.58 ^b
150	63.04 ^b	57.62 ^b	88.41 ^b	41.87 ^b	68.65 ^b	35.66 ^b
300	109.25 ^a	121.45 ^a	107.49 ^b	95.83 ^b	95.53 ^a	56.11 ^a
CaCl ₂						
50	27.29 ^c	26.96 ^c	24.74 ^d	21.29 ^b	34.5 ^c	15.95 ^d
100	27.62 ^c	32.41 ^c	28.19 ^{cd}	24.33 ^b	31.54 ^c	28.16 ^c
150	35.33 ^{bc}	36.36 ^c	45.66 ^c	28.74 ^b	46.66 ^c	35.33 ^b
300	59.16 ^b	67.47 ^b	90.29 ^a	54.37 ^a	73.7 ^b	59 ^a
Two-way factor analysis of variance						
Salt	<i>P</i> = 0.0005 ^z	<i>P</i> = 0.0008	<i>P</i> = 0.024	NS	<i>P</i> = 0.034	NS
Concentration	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0.00002	<i>P</i> = 0	<i>P</i> = 0
Salt * concentration	<i>P</i> = 0.008	<i>P</i> = 0.00009	<i>P</i> = 0.00001	<i>P</i> = 0.029	<i>P</i> = 000018	NS

P = probability value (significance level). NS; not significant. Z: Letters denote significant differences among means in columns within trial according.

differences between saline treatments. The highest germination percentage, 78.33% and 63.67%, was obtained in the absence of salt after 24 h incubation at 25°C, from isolates FA13 and TR46, respectively. Concerning the salts, the 50 and 100 ppm also increased the conidial germination except TR13 and FA13 isolates, which was significantly different from the stimulation caused by NaCl. Conversely, spore germination was decreased for sodium concentrations of 150 and 300 ppm relative to the control.

The application of lower concentrations of CaCl₂ (50 ppm) to wounds did not inhibit their percentage germination. However, germination percentages were very low in

all concentrations except 50 ppm. CaCl₂ was toxic at lower concentrations than the other salts. The toxicity of calcium chloride (EC₅₀ = 100 ppm) to spores was higher than that of sodium chloride (EC₅₀ = 150 ppm). The interaction between salt and concentration was significant for all isolates (*P* < 0.001) except F27 and TR46.

4. Discussion

The purpose of this study was to compare the effect of sodium and calcium salts against *B. cinerea*. Our in vitro tests showed that sodium chloride stimulates the development of

TABLE 3: The effect of sodium and chloride salts on the germination of Six Isolates of *Botrytis cinerea* (percent germination was measured after 24 h incubation at 25°C).

Treatment	<i>B. cinerea</i> isolate					
	F27	B27	R13	TR46	S27	FA13
Control	54 ^b	56 ^b	58.66 ^{ab}	63.67 ^a	50.33 ^d	78.33 ^b
NaCl						
50	69 ^a	67.33 ^a	61.66 ^{ab}	64.66 ^a	66.66 ^a	90.66 ^a
100	66.33 ^a	68.33 ^a	60.66 ^{ab}	32.33 ^b	61.33 ^b	63.33 ^c
150	50.33 ^b	52 ^b	34.33 ^c	26.33 ^b	57.33 ^c	61.66 ^c
300	41 ^c	33.33 ^c	32.33 ^c	23 ^b	39.33 ^e	42.66 ^c
CaCl ₂						
50	58 ^a	60.33 ^{ab}	69.66 ^a	65.33 ^a	55 ^c	88 ^a
100	50 ^{ab}	51 ^b	55.33 ^{ab}	39.66 ^b	41.33 ^c	49.66 ^d
150	45 ^b	29.33 ^c	50.66 ^b	35.66 ^b	36.33 ^f	38.33 ^e
300	33.33 ^c	25.66 ^c	18.29 ^d	30.33 ^b	18.33 ^f	28.33 ^f
Two-way factor analysis of variance						
Salt	$P = 0.00001^z$	$P = 0$	NS	$P = 0.04$	$P = 0$	$P = 0$
Concentration	$P = 0$	$P = 0$	$P = 0$	$P = 0$	$P = 0$	$P = 0$
Salt * concentration	NS	$P = 0.001$	$P = 0.0007$	NS	$P = 0$	$P = 0.0003$

P = probability value (significance level). NS; not significant. Z: Letters denote significant differences among means in columns within trial according.

the fungal up to 150 ppm. In contrast, only calcium salts were effective at low concentrations as compared to sodium chloride. However, higher concentrations of calcium chloride reduced mycelial growth of *B. cinerea* PDA medium.

Our data indicate that salinity stimulated growth of all six isolates at high concentration (NaCl at up to 150 ppm). On the contrary, high salinity (more than 300 ppm) of several sodium has been shown to decrease mycelial growth and inhibit spore germination. Reference [29] showed that increasing the salinity of the medium promotes the in vitro mycelial growth of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica*, agents of root rot of citrus, with an optimum between -1.44 and -3.11 bars. Similarly, [23] showed that all calcium salts tested (except formate, calcium pantothenate, and dibasic calcium phosphate) reduced the growth of *Monilia fructicola* responsible for brown rot of peach, on amended potato dextrose agar (PDA).

In the comparison of the inhibitory effect of the various salts, higher concentrations with 300 ppm to NaCl or CaCl₂ reduced mycelial growth to 16 and 23%, respectively. The mechanisms by which sodium salts effect mycelia growth are not known. Regragui and Lahlou [30] showed that the stimulator effect of salinity was observed on the mycelial growth, conidia production, and conidia germination of the tested stain of *V. dahliae*, respectively, in concentrations 170, 120, and 256 mM of NaCl. Oppositely, Pelizza et al. [31] showed that the presence of NaCl in the medium culture reduces the growth of an isolate of *Leptolegnia chapmanii*. However, Reid et al. [32] reported that sodium chloride was more effective than other chloride salts (calcium chloride, ammonium chloride, and manganese chloride) in controlling *Fusarium* crown and root rot caused by *F. oxysporum* f. sp. *asparagi* and *F. proliferatum*. van Bruggen and Semenov [33] reported that on a long-term basis there is a decrease in the genetic diversity of fungi as a result of stress. On the

other hand Zahran [34] mentioned that the hydric stress has to deal with the increase in osmotic pressure and may therefore change their physiology [35] and morphology in response to this [34]. Two strategies used by microorganisms to adapt to osmotic stress were described by Killham [35], both of which result in an accumulation of solutes in the cell to counteract the increase in osmotic pressure. One is the selective exclusion of the solute incorporated (e.g., Na⁺, Cl⁻), thus accumulating the ions necessary for metabolism (e.g., NH₄⁺).

The results of the present study demonstrate that calcium salts also have been shown to reduce mycelial growth in vitro; the percentage of reduction varied between 15 and 34% as compared to the control. Several studies have reported that calcium applications can suppress diseases caused by several pathogens [23, 27, 28, 36]. Our result further supports the results of Maouni et al. [37], who found that calcium chloride significantly reduced pear fruit decay caused by *A. alternata* and *Penicillium expansum* when used at 4 and 6%. Tian et al. [38] recorded that calcium chloride at 2% inhibited the growth and spore germination of *R. stolonifer*, although CaCl₂ was tolerated by *Alternaria alternata* and *P. expansum* in vitro. It was reported that 1,000 mg of calcium (calcium chloride) enhanced the growth of *Botryosphaeria dothidea* [39]. Calcium salts also have been shown to reduce mycelial growth in vitro and reduce incidence and severity of infection of peach fruits and shoots by *Monilinia fructicola* and *Leucostoma persoonii*, respectively [23, 40]. Kaile et al. [24] reported that mycelia cultured with 100 to 200 mM Ca²⁺ exhibited a lower viability compared with mycelia grown with 10 mM Ca for some isolates of *Botrytis* spp. While little information is available on the role of Ca²⁺ in fungi, results of experiments with yeasts have shown that mutants that have defective intracellular Ca²⁺ transport systems or defective vacuolar H⁺-ATPase that produces the proton motive force

necessary for the activity of the vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger [41] could not grow in high Ca^{2+} concentrations [42–45]. Maintenance of low basal concentrations of free cytosolic Ca^{2+} , in the submicromolar range, is essential for normal cell functions [46, 47].

In the case of the evaluation the effect of NaCl and CaCl_2 on the spore production by the fungus, all isolates of *B. cinerea* are able to sporulate in salinity tested, but to varying degrees. The largest sporulation was observed for different concentrations between 50 and 300 ppm. The incorporation of 300 ppm salt stimulated the sporulation. In fact, sporangium formation of *Phytophthora parasitica* in vitro appeared to be stimulated by salinity, as the numbers of sporangia were generally higher (120% to 225%) in the salt-amended treatments than the distilled water controls [30]. With regard to conidiogenesis, sodium chloride was significantly higher than those at the other calcium chloride concentrations. Reference [25] showed that stimulation of sporulation under the effect of salinity is due to a specific effect of ions. According to this author, Na^{+} and Cl^{-} stimulate the production of sporangia of *P. citrophthora* and *P. parasitica* while the osmotic effect inhibits biological activity. In *Verticillium*, increased sporulation under the effect of the salt appears to be not only solely due to the effect of Na^{+} and Cl^{-} ions, but also due to the osmotic effect. However calcium salts did not reduce spore production of *B. cinerea* spores in this study. Similarly, a minimum concentration of calcium is necessary for the production of zoosporangia or zoospore release by *Phytophthora* spp. [48–50].

In view of these findings, it was reported that, at low concentration (50 ppm), the germination capacity for most isolates increased compared with the control in both types of salt. Beyond this concentration, the effect of CaCl_2 resulted in a linear reduction in % of germination. Similarly, a low reduction of conidial germination was observed for two salt types at the maximum concentration used. Reference [42] showed that increasing the concentration of calcium chloride (25–175 mM) causes a decrease in germination and germ tube growth in vitro of *B. cinerea* and *Penicillium expansum*, respectively, causing the gray and blue mold in apples stored. Incubating *B. cinerea* spores in increasing concentrations of CaCl_2 ($4\text{--}26\text{ g L}^{-1}$) resulted in decreased spore germination and germ tube growth [51]. Calcium was effective in inhibiting spore germination of *C. gloeosporioides* [23], *Rhizopus stolonifer* [37], and *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* [52]. Physiologically, the maintenance of low basal concentrations of internal Ca^{2+} is essential for normal cell functions of organisms, and the inability to regulate Ca^{2+} may affect the organisms' normal growth [53].

Calcium ions may reduce the incidence of fungal infection by directly inhibiting fungal growth and by inhibiting cell wall degrading enzymes produced by the pathogens [45, 54, 55].

The effects of calcium in reducing spore germination were probably due to toxicity, with high concentrations likely affecting the osmotic balance in fungal cells [56].

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank M. Benzohra, I. E. Gesmi, A. and Ouabel, H for their help and Berrahal, N for their excellent technical assistance.

References

- [1] T. M. O'Neill, D. Shtienberg, and Y. Elad, "Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*," *Plant Disease*, vol. 81, no. 1, pp. 36–40, 1997.
- [2] D. Shtienberg, Y. Elad, A. Niv, Y. Nitzani, and B. Kirshner, "Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses," *European Journal of Plant Pathology*, vol. 104, no. 8, pp. 753–763, 1998.
- [3] S. Kalogiannis, S. E. Tjamos, A. Stergiou, P. P. Antoniou, B. N. Ziogas, and E. C. Tjamos, "Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of tomato," *European Journal of Plant Pathology*, vol. 116, no. 1, pp. 69–76, 2006.
- [4] R. Munns, "Comparative physiology of salt and water stress," *Plant, Cell and Environment*, vol. 25, no. 2, pp. 239–250, 2002.
- [5] S. I. Allakhverdiev, A. Sakamoto, Y. Nishiyama, M. Inaba, and N. Murata, "Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp.," *Plant Physiology*, vol. 123, no. 3, pp. 1047–1056, 2000.
- [6] H. Koca, M. Bor, F. Özdemir, and I. Türkan, "The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars," *Environmental and Experimental Botany*, vol. 60, no. 3, pp. 344–351, 2007.
- [7] A. Levigneron, F. Lopez, G. Vansuyt, P. Berthomieu, P. Fourcroy, and F. Casse-Delbart, "Les plantes face au stress salin," *Cahiers Agricultures*, vol. 4, pp. 263–273, 1995.
- [8] N. Bouchibi, A. H. C. van Bruggen, and J. D. MacDonald, "Effect of ion concentration and sodium: calcium ratio of a nutrient solution on *Phytophthora* root rot of tomato and zoospore motility and viability of *Phytophthora parasitica*," *Phytopathology*, vol. 80, no. 12, pp. 1323–1329, 1990.
- [9] N. S. Blaker and J. D. MacDonald, "The role of salinity in the development of *Phytophthora* Root Rot of citrus," *Phytopathology*, vol. 76, no. 10, pp. 970–975, 1986.
- [10] J. D. MacDonald, "Effect of salinity stress on the development of *Phytophthora* root rot of chrysanthemum," *Phytopathology*, vol. 72, no. 2, pp. 214–219, 1982.
- [11] S. Sanogo, "Response of chile pepper to *Phytophthora capsici* in relation to soil salinity," *Plant Disease*, vol. 88, no. 2, pp. 205–209, 2004.
- [12] T. J. Swiecki and J. D. Macdonald, "Histology of chrysanthemum roots exposed to salinity stress and *Phytophthora cryptogea*," *Canadian Journal of Botany*, vol. 66, no. 2, pp. 280–288, 1988.
- [13] E. Turco, D. Naldini, and A. Ragazzi, "Disease incidence and vessel anatomy in cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum under salinity stress," *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, vol. 109, no. 1, pp. 15–24, 2002.

- [14] J. P. Jones, J. B. Jones, S. S. Woltz, and J. W. Scott, "Influence of soil pH, nitrogen source, and transplant drenches on development of crown rot of tomato," *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, vol. 106, pp. 170–172, 1993.
- [15] A. Nachmias, Z. Kaufman, L. Livescu, L. Tsrur, A. Meiri, and P. D. S. Caligari, "Effects of salinity and its interactions with disease incidence on potatoes grown in hot climates," *Phytoparasitica*, vol. 21, no. 3, pp. 245–255, 1993.
- [16] H. Marschner, *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, London, UK, 2nd edition, 1995.
- [17] J. B. Hanson, "The function of calcium in plant nutrition," in *Advances in Plant Nutrition*, P. B. Tinker and A. Läuchli, Eds., pp. 149–208, Praeger, New York, NY, USA, 1984.
- [18] D. S. Bush, "Calcium regulation in plant cells and its role in signaling," *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 46, pp. 95–122, 1995.
- [19] G. R. Chaplin and K. J. Scott, "Association of calcium in chilling injury susceptibility of stored avocados," *Hortscience*, vol. 15, pp. 514–515, 1980.
- [20] W. S. Conway, K. C. Gross, and C. E. Sams, "Relationship of bound calcium and inoculum concentration to the effect of postharvest calcium treatment on decay of apples by *Penicillium expansum*," *Plant Disease*, vol. 71, no. 1, pp. 78–80, 1987.
- [21] W. S. Conway, K. C. Gross, C. D. Boyer, and C. E. Sams, "Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium," *Phytopathology*, vol. 78, no. 8, pp. 1052–1055, 1988.
- [22] R. G. McGuire and A. Kelman, "Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*," *Phytopathology*, vol. 76, no. 4, pp. 401–406, 1986.
- [23] A. R. Biggs, M. M. El-Kholi, S. El-Neshawy, and R. Nickerson, "Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*," *Plant Disease*, vol. 81, no. 4, pp. 399–403, 1997.
- [24] A. Kaile, D. Pitt, and P. J. Kuhn, "Calcium cytotoxicity, protoplast viability and the role of calcium in soft-rot of *Brassica napus* due to *Botrytis cinerea* Pers.," *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 40, no. 1, pp. 49–62, 1992.
- [25] M. Wisniewski, S. Droby, E. Chalutz, and Y. Eilam, "Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* *in vitro* and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*," *Plant Pathology*, vol. 44, no. 6, pp. 1016–1024, 1995.
- [26] D. F. Bateman and R. D. Lumsden, "Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*," *Phytopathology*, vol. 55, pp. 734–773, 1965.
- [27] W. S. Conway, C. E. Sams, R. M. McGuire, and A. Kelman, "Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay," *Plant Disease*, vol. 76, no. 4, pp. 329–334, 1992.
- [28] H. Volpin and Y. Elad, "Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to *Botrytis blight*," *Phytopathology*, vol. 81, no. 11, pp. 1390–1394, 1991.
- [29] H. Benyahya, *Effect of Salinity on Root Rot of Citrus Caused by Phytophthora Parasitica*, edited by: D. E. S. Ducan, Cadi Ayyad University, Marrakesh, Morocco, 1998.
- [30] A. Regragui and H. Lahlou, "Effect of salinity on *in vitro* *Trichoderma harzianum* antagonism against *Verticillium dahliae*," *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 8, no. 6, pp. 872–876, 2005.
- [31] S. A. Pelizza, C. C. L. Lastra, J. J. Becnel, V. Bisaro, and J. J. García, "Effects of temperature, pH and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae," *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 96, no. 2, pp. 133–137, 2007.
- [32] T. C. Reid, M. K. Hausbeck, and K. Kizilkaya, "Effects of sodium chloride on commercial asparagus and of alternative forms of chloride salt on Fusarium crown and root rot," *Plant Disease*, vol. 85, no. 12, pp. 1271–1275, 2001.
- [33] A. H. C. van Bruggen and A. M. Semenov, "In search of biological indicators for soil health and disease suppression," *Applied Soil Ecology*, vol. 15, no. 1, pp. 13–24, 2000.
- [34] H. H. Zahran, "Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments," *Biology and Fertility of Soils*, vol. 25, no. 3, pp. 211–223, 1997.
- [35] K. Killham, *Soil Ecology*, vol. 1, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994.
- [36] H. Yamazaki and T. Hoshina, "Calcium nutrition affects resistance of tomato seedlings to bacterial wilt," *HortScience*, vol. 30, no. 1, pp. 91–93, 1995.
- [37] A. Maouni, A. Lamarti, A. Aidoun, M. Khaddor, and A. Badoc, "Effect of benzimidazole fungicides and calcium chloride on *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* rot during storage of pears," *African Journal of Biotechnology*, vol. 6, no. 11, pp. 1289–1292, 2007.
- [38] S. P. Tian, Q. Fan, Y. Xu, and A. L. Jiang, "Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*," *Plant Pathology*, vol. 51, no. 3, pp. 352–358, 2002.
- [39] A. R. Biggs, "Effect of inoculum concentration and calcium salts on infection of apple fruit by *Botryosphaeria dothidea*," *Plant Disease*, vol. 88, no. 2, pp. 147–151, 2004.
- [40] A. R. Biggs and C. A. Peterson, "Effect of chemical applications to peach bark wounds on accumulation of lignin and suberin and susceptibility to *Leucostoma persoonii*," *Phytopathology*, vol. 80, no. 9, pp. 861–865, 1990.
- [41] Y. Ohsumi and Y. Anraku, "Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, no. 9, pp. 5614–5617, 1983.
- [42] K. W. Cunningham and G. R. Fink, "Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} ATPases," *The Journal of Cell Biology*, vol. 124, no. 3, pp. 351–363, 1994.
- [43] F. Foury, "The 31-kDa polypeptide is an essential subunit of the vacuolar ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 30, pp. 18554–18560, 1990.
- [44] D. Halachmi and Y. Eilam, "Cytosolic and vacuolar Ca^{2+} concentrations in yeast cells measured with the Ca^{2+} -sensitive fluorescence dye indo-1," *FEBS Letters*, vol. 256, no. 1-2, pp. 55–61, 1989.
- [45] Y. Ohya, Y. Ohsumi, and Y. Anraku, "Isolation and characterization of Ca^{2+} -sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of General Microbiology*, vol. 132, no. 4, pp. 979–988, 1986.
- [46] E. Carafoli, "Intracellular calcium homeostasis," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 56, pp. 395–433, 1987.
- [47] H. Rasmussen and J. E. Rasmussen, "Calcium as intracellular messenger: from simplicity to complexity," *Current Topics in Cellular Regulation*, vol. 31, pp. 1–109, 1990.
- [48] D. M. Halsall and R. I. Forrester, "Effects of certain cations on the formation and infectivity of *Phytophthora zoospores*. 1. Effects of calcium, magnesium, potassium, and iron ions,"

- Canadian Journal of Microbiology*, vol. 23, no. 8, pp. 994–1001, 1977.
- [49] N. Sato, "Effect of some inorganic salts and hydrogen ion concentration on indirect germination of the sporangia of *Phytophthora infestans*," *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, vol. 60, no. 4, pp. 441–447, 1994.
- [50] S. L. Von Broembsen and J. W. Deacon, "Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solutions," *Phytopathology*, vol. 87, no. 5, pp. 522–528, 1997.
- [51] C. O. Chardonnet, C. E. Sams, and W. S. Conway, "Calcium effect on the mycelial cell walls of *Botrytis cinerea*," *Phytochemistry*, vol. 52, no. 6, pp. 967–973, 1999.
- [52] A. R. Biggs, "Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp.," *Plant Disease*, vol. 83, no. 11, pp. 1001–1005, 1999.
- [53] A. R. Biggs, M. Ingle, and W. D. Solihati, "Control of *Alternaria* infection of fruit of apple cultivar nittany with calcium chloride and fungicides," *Plant Disease*, vol. 77, no. 10, pp. 976–980, 1993.
- [54] W. S. Conway and C. E. Sams, "Possible mechanisms by which post-harvest calcium treatment reduces decay in apples," *Phytopathology*, vol. 74, no. 2, pp. 208–210, 1984.
- [55] S. Droby, M. E. Wisniewski, L. Cohen et al., "Influence of CaCl₂ on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*," *Phytopathology*, vol. 87, no. 3, pp. 310–315, 1997.
- [56] G. Arras, P. Sanna, V. Astone, and S. Arru, "Effect of calcium chloride on the inhibitory activity of *Rhodotorula glutinis* against *Penicillium italicum* on orange fruits," *Italus Hortus*, vol. 5, pp. 67–70, 1998.

Chapitre VI - Effets de la salinité et de *Botrytis* sur la croissance végétative de deux variétés de tomate

Introduction

L'ensemble des stress, qu'ils soient de nature biotique ou abiotique, provoquent des modifications de l'état morphologique, physiologique biochimique et moléculaire des plantes. Par conséquent, la survie des plantes dépend de leur capacité à adapter leur physiologie, et notamment leur développement et leur croissance, afin d'atténuer les effets du stress. Toutes les plantes sont connues pour percevoir et réagir aux signaux de stress comme la sécheresse, la chaleur, la salinité, les herbivores et les pathogènes (Bohnert et *al.* 1995 ; Bartels et Sunkar, 2005).

En termes de contrainte saline, les plantes cultivées sont soumises à des modifications de leurs comportements morpho-physiologiques et réagissent en conséquence par rapport à leur genre, espèce, écotype, variété et sous variété (Ykhlef, 1993; Chougui et *al.*, 2004)

Sur le plan morphologique, le stress salin ralentit la taille de la plante, par le fait que cette dernière utilise une proportion de ses ressources énergétiques pour la régulation osmotique et ionique nécessaire à la turgescence cellulaire. Dans ce cas, l'énergie disponible pour les exigences de croissance de la plante est diminuée (Shannon, 1984). Plusieurs auteurs confirment ce phénomène de réduction de la croissance des plantes par la salinité (Romero-Aranda et *al.*, 2001; Ghoulam et *al.*, 2002).

La rhizosphère est également affectée par la salinité du sol. L'effet du sel entraîne une diminution de la densité racinaire pour préserver la partie aérienne devant maintenir et assurer la production photosynthétique. Une étude réalisée par Bouaouina et *al.* (2000) met en évidence que la partie racinaire est toujours la plus affectée par la salinité par rapport à la partie aérienne.

La plante, du fait de la diminution de la croissance de la partie aérienne, doit réguler plus strictement la pénétration des ions à travers les racines pour empêcher une accumulation aérienne ionique trop rapide, ce qui conduit à une accentuation du déficit hydrique (Sing *et al.*, 1989). Dans ce cas, la plante réduit sa croissance et sa surface foliaire qui se manifeste par une diminution de sa capacité photosynthétique (Steduto et *al.*, 2000). Certains chercheurs notent que la réduction de la croissance des plantes liée au stress salin peut se faire sans symptôme de toxicité (Levy et Shalhevet 1999). Dans ce cas, ils suggèrent que la diminution de la croissance pourrait être en relation avec une perte de turgescence. Chez la tomate, la diminution de la croissance n'est pas considérée comme une conséquence des perturbations osmotiques, mais comme une stratégie qui

permet à la plante de limiter les pertes d'eau par transpiration et de maintenir ainsi une bonne valeur de l'efficacité de l'eau (Sing *et al.*, 1989). L'autre effet de la salinité concerne l'équilibre ionique qui peut être affecté pour entraîner (accumulation des ions Cl⁻) une toxicité importante dans le cytoplasme et provoque la réduction de flux d'assimilats vers les tissus méristématiques en croissance et une diminution des matières fraîches et sèches des feuilles, tiges et racines (Hernandez *et al.*, 2000).

Il est connu que le comportement de la tomate vis-à-vis des agents pathogènes est conditionné par certaines interactions environnementales telles que l'humidité relative, la température, le rayonnement et la pollution atmosphérique. Certains travaux montrent que la salinité constitue un facteur environnemental qui augmente la sensibilité des tomates aux maladies fongiques principalement la fusariose (Standaert *et al.*, 1978), la verticilliose (Afailal 1987, Besri, 1990) et la pourriture racinaire due à *Phytophthora parasitica* (Swiecki et Mac Donald, 1991). La stimulation de la colonisation des plantes par l'agent pathogène en présence de NaCl a été rapportée par plusieurs auteurs notamment Mac Donald (1984) sur le couple *Phytophthora cryptogea*-Chrysanthemum, Afailal (1987) sur le couple Verticillium-tomate et ceux de Benyahia (1998) sur le couple *P. parasitica*-agrumes. Ces auteurs ont tous montré que l'augmentation de la salinité du milieu favorise la colonisation des plantes par l'agent pathogène. Une étude réalisée par Regragui (2005) met en évidence un déficit de croissance de la taille et du poids frais des parties aériennes de la tomate (variétés Marmande Claudia et VR) en réaction à l'infection par l'isolat P80 de Verticillium.

Pour Regragui (2005), la combinaison salinité-infection se manifeste par une aggravation des symptômes de rabougrissement. Les mesures de la taille et du poids frais des tiges montrent un effet additif des effets des deux facteurs séparés plutôt qu'un effet synergique. Ce même auteur montre que la salinité affecte la physiologie de la tomate en réduisant sa croissance et en augmentant sa sensibilité à la verticilliose. Elle intervient dans la relation hôte-pathogène favorisant une plus grande expression du pouvoir pathogène du parasite. A cet effet, ces résultats démontrent un ralentissement dans l'émission des feuilles chez les deux variétés comme effet direct de l'interaction salinité-Verticillium sur le développement de l'appareil foliaire. Cette perturbation serait en rapport avec une plus grande sensibilité des variétés de tomate à la verticilliose en conditions salines.

Par rapport aux données de la littérature citées ci-dessus, se pose la question de la relation de la salinité-*Botrytis cinerea* avec la tomate pour laquelle les travaux sont rares. C'est pourquoi, nous allons, dans ce chapitre, étudier l'influence de la combinaison salinité-*Botrytis* sur le développement

végétatif de deux génotypes de tomate. L'objectif étant d'évaluer l'interaction de ces deux types de stress sur la hauteur et la biomasse de la culture.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal se compose de deux variétés de l'espèce *Lycopersicon esculentum* : Guelma et CX206. Le semis est effectué en pépinière dans des plateaux alvéolaires remplis de tourbe sous serre à raison d'une graine par mini-motte à une profondeur de 1 cm. Les plants sont arrosés jusqu'au stade 3/4 feuilles où le repiquage est effectué. La transplantation des plants est effectuée dans des pots remplis de terreau (Profert). Tous les deux jours, les plantes sont arrosées, au début par de l'eau distillée, puis avec la solution nutritive de Hoagland diluée au 1/1000^{ème}. Au bout de 45 jours suivant la transplantation, les plantes sont soumises à trois traitements : salinité, Botrytis et la combinaison.

Les concentrations en NaCl de l'eau d'irrigation sont préparées à partir des résultats de conversion du meq.l^{-1} vers le g.l^{-1} . Le témoin correspond à 0 g.l^{-1} à 17 g.l^{-1} de NaCl. Les cultures ont été réalisées dans des conditions contrôlées à la serre de la société de Amor Benamor où nous avons assuré l'arrosage des plants dont les besoins en eau sont estimés sur la base de la méthode de détermination pondérale de la réserve utile du sol. La moyenne de la température est de 30 C° et celle de l'humidité de 90%.



Figure 15-vue générale de la serre de la pépinière Amor Benamor (Fdjoudj W Guelma).

Le dispositif expérimental

Les plantes des deux variétés sont soumises aux différents traitements de NaCl, CaCl₂, *Botrytis cinerea*.

Le premier traitement consiste à appliquer les différentes concentrations en NaCl :

$N_0=0 \text{ meq.l}^{-1}$; $N_1= 50 \text{ meq.l}^{-1}$; $N_2 = 100 \text{ meq.l}^{-1}$; $N_3 = 150 \text{ meq.l}^{-1}$; $N_4 = 300 \text{ meq.l}^{-1}$

Le deuxième traitement consiste à appliquer les différentes concentrations en CaCl₂ :

$C_0 = 0 \text{ meq.l}^{-1}$; $C_1 = 50 \text{ meq.l}^{-1}$; $C_2 = 100 \text{ meq.l}^{-1}$; $C_3 = 150 \text{ meq.l}^{-1}$; $C_4 = 300 \text{ meq.l}^{-1}$

Le troisième traitement consiste à inoculer les plants avec une suspension de spores à $10^5 \text{ spores.ml}^{-1}$ issue de l'isolat pathogène de *Botrytis cinerea*.

N₁	N₂	N₃	N₄	N₁C₁	N₂C₂	N₃C₃	N₄C₄
N₁B	N₂B	N₃B	N₄B	C₁B	C₂B	C₃B	C₄B
N₁C₁B	N₂C₂B	N₃C₃B	N₄C₄B	N0		B	

Méthodes d'étude

Analyses morphologiques

Effet sur la taille de l'axe aérien et souterrain

Les longueurs des tiges et des racines ont été déterminées à l'aide d'une règle graduée en mm.

Effet sur la biomasse des parties aériennes et racinaires

Les biomasses des organes aériens et racinaires ont été mesurées par la masse de la matière fraîche (MF) puis sèche (MS) après séchage de 48 h à l'étuve réglée à 80°C. Les pesés ont été effectués grâce à une balance de précision et sont exprimées en g.

Résultats

Effet du stress salin sur la croissance végétative

Chez le génotype CX206 (Fig. 16), il n'apparaît pas d'effet significatif de la salinité par NaCl sur les longueurs de la tige et des racines de la plante. Cette situation est inchangée pour le cas de l'irrigation avec une eau contenant les deux sels de NaCl et de CaCl₂.

Chez la variété Guelma, la situation est similaire qu'avec la variété de CX206 à l'exception du traitement de 100 meq.l⁻¹ en présence des deux sels combinés. Dans ce cas, la stimulation de la

croissance de la partie souterraine est de 30 % et l'allongement total relevé est de l'ordre de 11,83%.

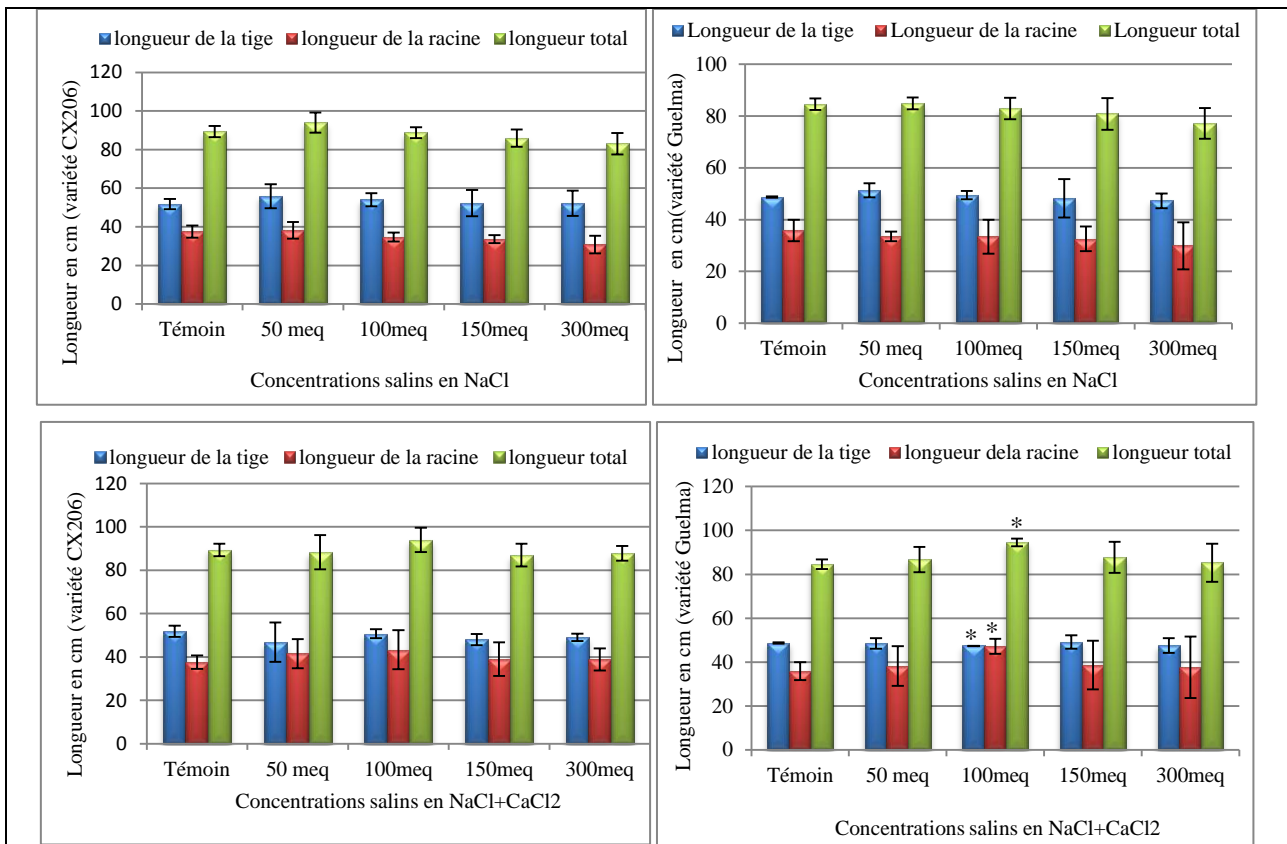


Figure 16-Effet de la salinité sur la croissance des plantes de tomate.

Effet du *Botrytis cinerea* sur la croissance végétative

L'inoculation du génotype CX206 par *Botrytis cinerea* avec une dose de 10^5 spores.ml⁻¹ ne montre aucune différence significative de croissance par rapport aux témoins.

Le génotype Guelma réagit à l'infection par une inhibition de 5,31% pour la partie aérienne des plantes. Dans ce cas, il n'y a pas de différences significatives de la partie racinaire ($p > 0.05$).

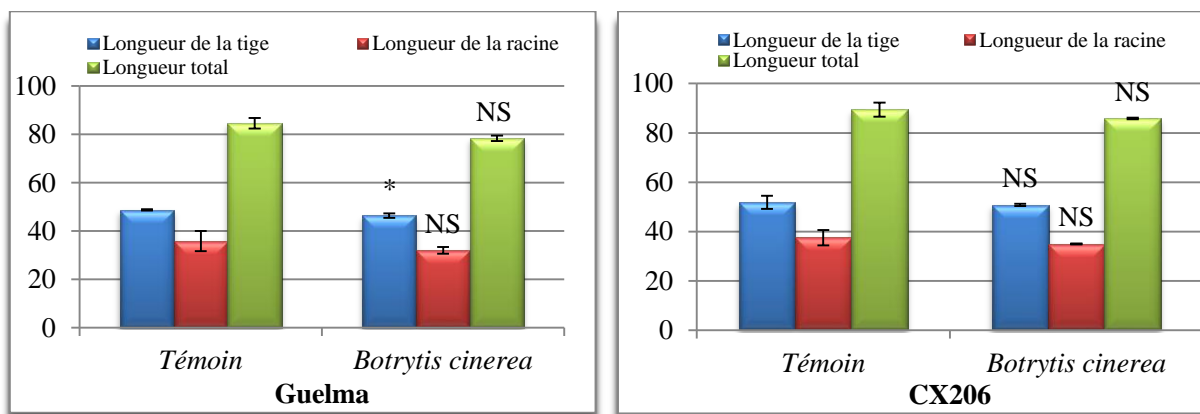


Figure 17-Effet de *Botrytis cinerea* sur la croissance des plantes de tomate.

Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la croissance végétative

L'effet combiné des traitements de la salinité et de Botrytis modifie la réaction des deux variétés de tomate étudiées par rapport à l'influence de ces deux traitements pris isolément. Ainsi, pour la concentration de 50 meq.l⁻¹, la taille totale de la plante (parties aérienne et souterraine) de la variété CX206 augmente par rapport au témoin (Fig. 18). Dans ce cas, la variété exprime une certaine résistance à Botrytis grâce à la présence de NaCl. Pour la dose de 300 meq.l⁻¹ de NaCl, la taille totale de la plante diminue de 2,75 %.

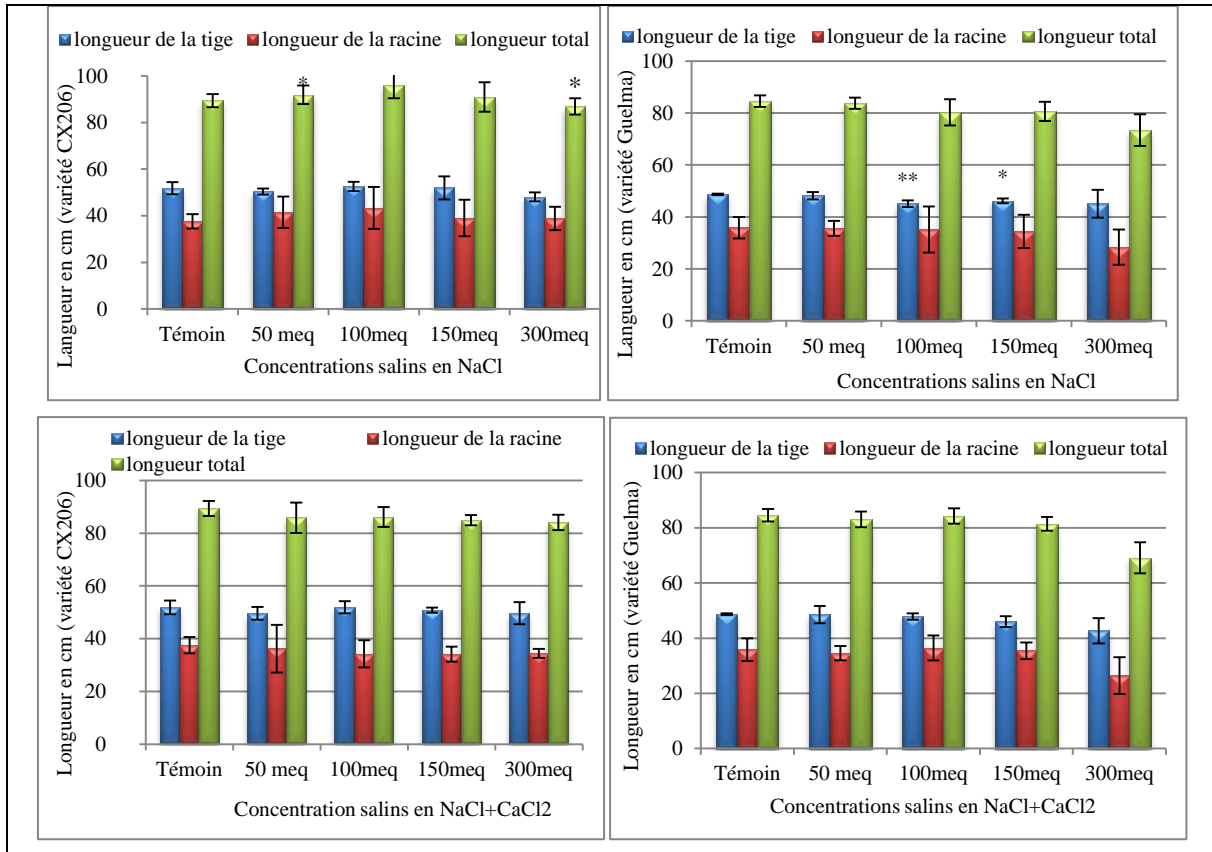


Figure 18-Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la croissance des plantes de tomate.

Pour la taille de la tige et des racines, le NaCl ne semble pas avoir un effet significatif sur l'influence de l'agent pathogène Botrytis.

En revanche, l'infection par Botrytis des plants de la variété Guelma en présence de NaCl, provoque une baisse de la taille de la partie aérienne de la plante de 7,45 et 5,11 % respectivement pour les concentrations de 100 et 150 meq.l⁻¹. Il est à noter que pour l'ensemble des traitements salins, la taille de la partie racinaire et totale présentent des résultats non significatifs (Figure 16).

Pour les deux variétés, l'effet Botrytis+NaCl+CaCl₂ n'induit aucun changement significatif de la taille de la tige, des racines et totale par rapport au témoin ($p > 0.05$).

Effets de la salinité et de *Botrytis* sur la biomasse des deux variétés de tomate

Effet du stress salin sur la biomasse de la plante

Poids frais

Pour le génotype **CX206**, les résultats de la biomasse fraîche aérienne (Fig. 19), diminuent significativement sous l'effet de la présence de sel dans la solution d'arrosage. En effet, mis à part la concentration de 50 meq.l⁻¹, la biomasse fraîche aérienne diminue de 5.17, 13.76 et 17.81% respectivement pour les concentrations de 100, 150 et 300 meq.l⁻¹ par rapport au témoin.

La biomasse fraîche racinaire croît avec un pourcentage de 1,02 et 29,2% respectivement pour les concentrations de 50 et 150 meq.l⁻¹ par rapport au témoin. Ils montrent que l'effet de salinité sur poids frais entier pour le même génotype n'apparaît qu'au-delà de 300 meq de NaCl. Pour la biomasse totale fraîche, une inhibition de 17, 81% de la plante est observée par rapport au témoin.

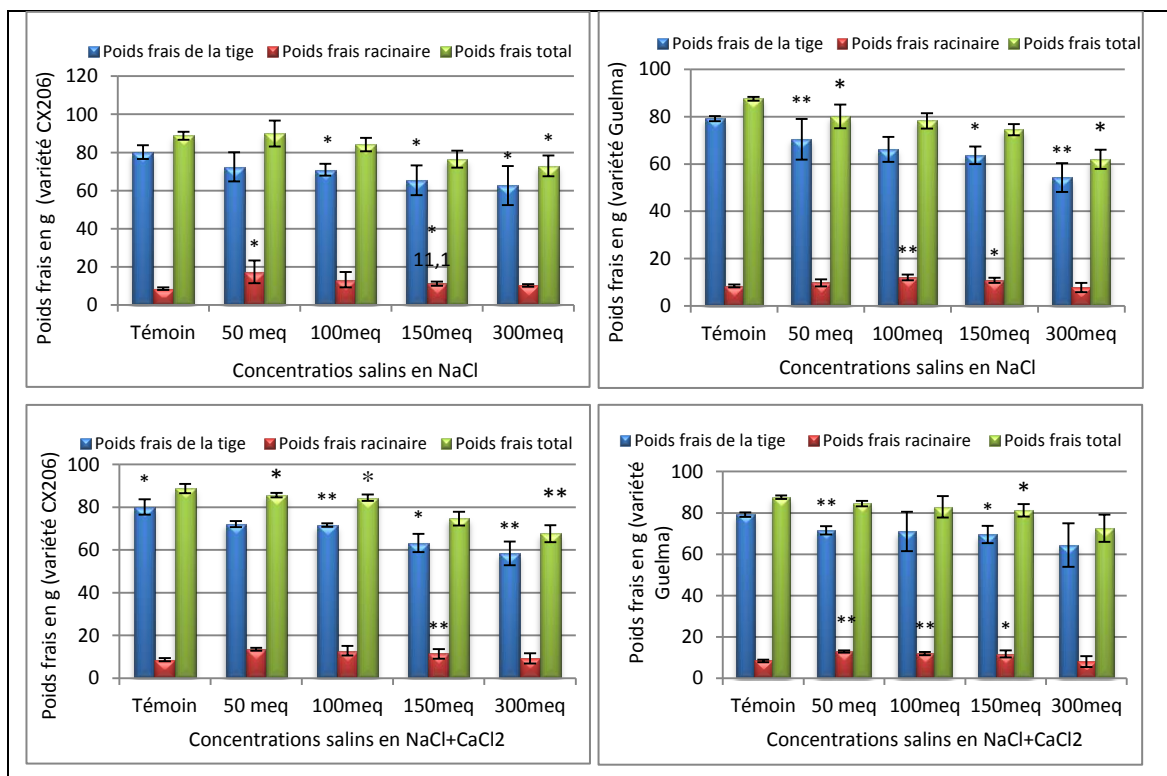


Figure 19-Effet de la salinité sur la biomasse fraîche des plantes de tomate.

Il apparaît qu'un traitement supplémentaire avec CaCl₂, n'affecte pas l'effet de NaCl sur la biomasse fraîche totale (Fig. 19) pour les concentrations inférieures à 150 meq.l⁻¹. Cependant, la combinaison NaCl+CaCl₂ à 300 meq.l⁻¹ semble déclencher une atténuation de l'effet de NaCl sur la biomasse fraîche totale de 7,28%.

Pour la biomasse aérienne fraîche, cette atténuation est de 3,03 et 6,71 % respectivement pour les concentrations de 150 et 300 meq.l⁻¹.

Pour la biomasse racinaire, l'atténuation est de 1,8% pour la concentration de 150meq.l⁻¹.

Dans le cas du génotype **Guelma**, la plante enregistre une diminution du poids frais de la partie aérienne sous l'effet du NaCl pour toutes les concentrations par rapport au témoin.

Aux concentrations salines de 50 et 300 meq.l⁻¹ de NaCl, l'accumulation en matière fraîche totale a diminué par rapport au témoin. Pour les concentrations de 100 et 150 meq.l⁻¹ de NaCl, l'analyse ne montre aucune différence significative ($P \geq 0,05$).

Pour la biomasse racinaire fraîche, une augmentation de 43,8 et 27,3% est obtenue respectivement pour les traitements de 100 et 150 meq.l⁻¹.

L'addition de CaCl₂ au milieu permet d'atténuer l'effet de NaCl sur le poids frais de la culture par rapport au témoin. Ainsi, la réduction de la matière fraîche totale est passée de 8,50 à 3,55 % respectivement en présence de NaCl et NaCl+CaCl₂ à 50 meq.l⁻¹. Cette réduction passe de 29,21 à 17,19 % à 300 meq.l⁻¹.

Pour les données de la biomasse aérienne, l'apport de CaCl₂ enregistre le passage de sa réduction de 11,06 à 9,56 % à 50 meq.l⁻¹. A 150 meq.l⁻¹, cette réduction passe de 19,57 à 12,20 %.

Dans le cas de la biomasse racinaire, l'apport de CaCl₂ induit des augmentations de près de 40, 43 et 53 %, respectivement pour les traitements de 50, 100 et 150meq.l⁻¹.

Poids sec

Comme pour les données du poids frais de la culture, les résultats de la biomasse sèche totale en fonction de la salinité enregistrent (Fig. 20), pour le génotype **CX206**, une diminution de près 31, 42, 43 et 45 % respectivement pour les traitements de 50, 100, 150 et 300 meq.l⁻¹ par rapport au témoin.

Pour la biomasse sèche aérienne, une diminution de près de 22, 36, 38 et 41 % est observée respectivement pour les traitements de 50, 100, 150 et 300 meq.l⁻¹ de NaCl par rapport au témoin.

Les concentrations salines testées pour ce génotype n'induit aucun changement significatif du poids sec de la partie souterraine par rapport au témoin.

Pour le génotype **Guelma**, une inhibition de près de 29, 40, 42 et 49 % du poids sec total de la plante est enregistrée respectivement pour les concentrations de 50, 100, 150 et 300 meq.l⁻¹ en NaCl par rapport au témoin.

De manière similaire, le poids sec de la partie aérienne de la plante est inhibé proportionnellement à l'augmentation de la concentration de NaCl. Dans ce cas, la diminution de ce paramètre dépasse le seuil de 50% à 300 meq.l⁻¹ en NaCl par rapport au témoin.

Le stress salin ne cause pas de variations significatives de la biomasse sèche racinaire.

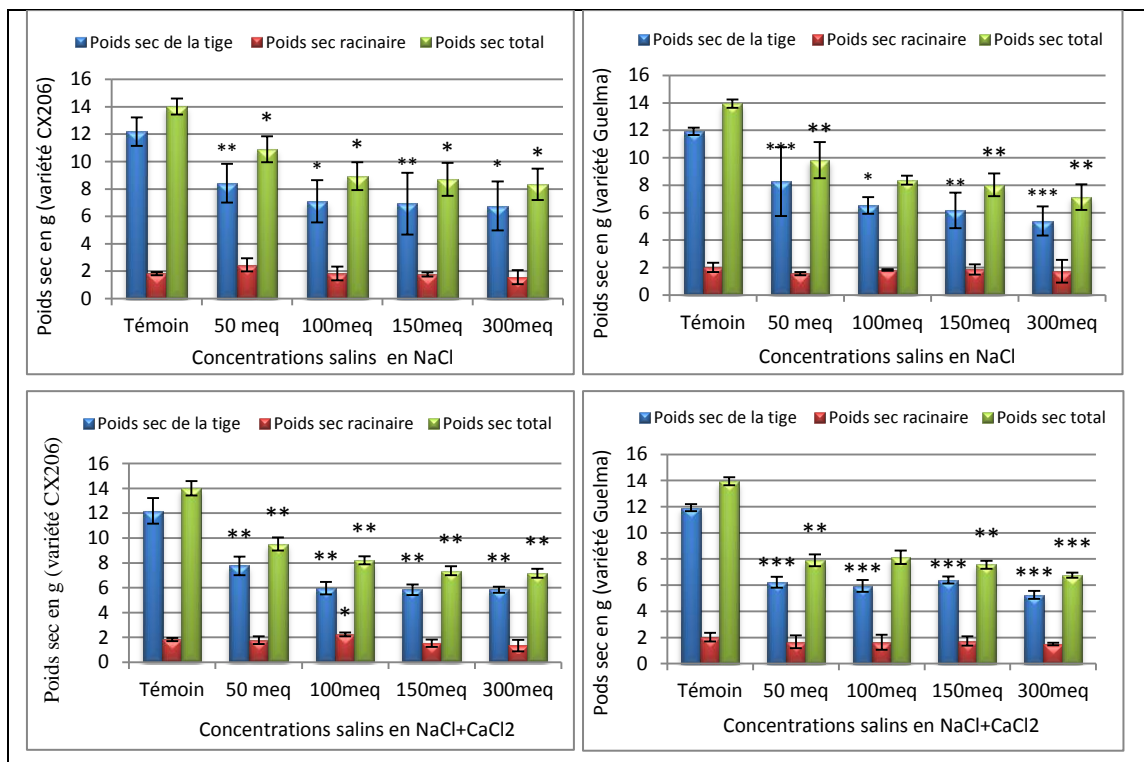


Figure 20-Effet de la salinité sur biomasse sèche des plantes de tomate.

L'association NaCl+CaCl₂ n'a non seulement entrainé aucune diminution de l'effet de NaCl sur le poids sec total de la plante mais a amplifié son pouvoir d'inhibition par rapport au témoin. Dans ce cas le CaCl₂ joue le même rôle d'inhibition de ce paramètre que celui de NaCl. En effet, cette inhibition passe de près de 32 à 49 % pour CX206 et près 43 à 51 % pour Guelma respectivement pour les concentrations de 50 et 300 meq.l⁻¹(p<0,01).

Effet de *Botrytis cinerea* sur la biomasse végétative

Poids frais

Les résultats du poids frais des parties souterraine et aérienne de la plante (Fig. 21), montrent une différence entre les deux géotypes par rapport aux témoins. Pour le géotype CX206, il n'y a pas d'effet significatif de l'agent pathogène sur le poids frais de la tige et des racines. Par contre cette variété réagit par rapport à la biomasse fraîche totale à l'infection de l'isolat. Elle subit une diminution significative de 18,42 % de la biomasse total par rapport au témoin.

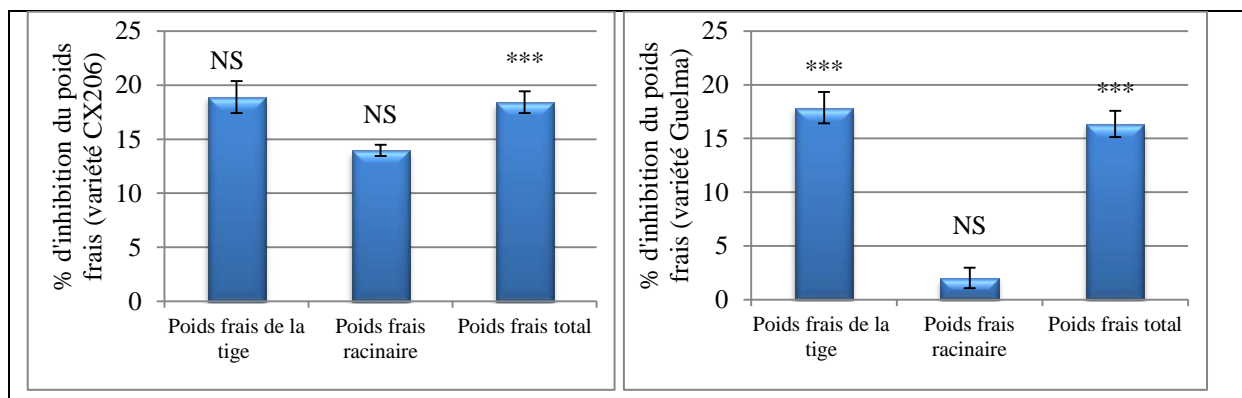


Figure 21- Effet de *Botrytis cinerea* sur la biomasse fraîche des plantes de tomate.

Pour le génotype Guelma, l'infection par *Botrytis cinerea* entraîne, une diminution de 17,87 % par rapport au témoin sur la biomasse fraîche aérienne. Il n'y a pas d'effet significatif de *Botrytis* sur la biomasse fraîche racinaire. La somme des biomasses aérienne et racinaire enregistre une diminution de 16,35 % par rapport au témoin.

Le génotype CX206 semble plus sensible à *Botrytis* que celui de Guelma puisqu'il subit une inhibition dépassant de 18 % celle subie par le génotype Guelma. De ce point de vue, il est intéressant de noter que les deux génotypes sont sensibles à l'infection bien qu'ils soient moyennement tolérants à la salinité.

Poids sec

L'inoculation des plants du génotype CX206 ne montre aucune différence significative par rapport à la biomasse sèche de la tige, des racines et totale.

Le génotype Guelma réagit à l'infection de l'isolat par une inhibition de 12,34 % de la biomasse sèche aérienne de la tige par rapport au témoin. Dans ce cas, aucune différence significative n'est observée par rapport à la biomasse sèche racinaire et totale.

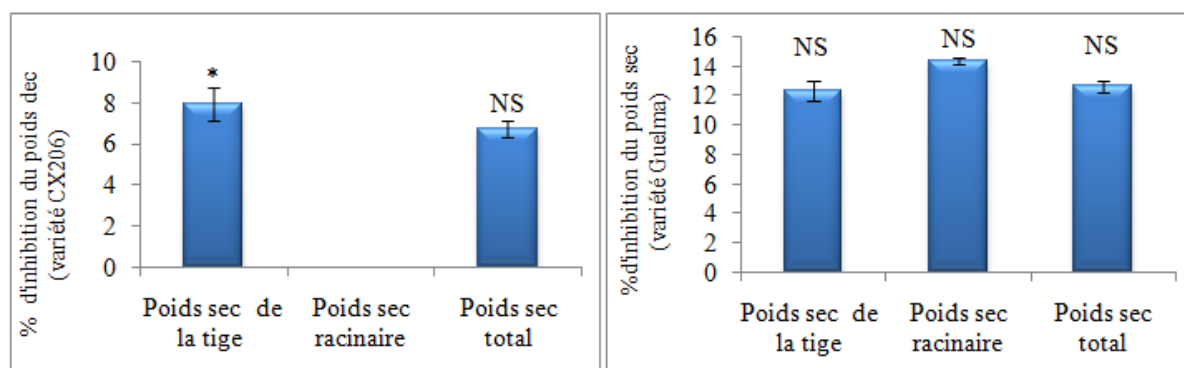


Figure 22- Effet de *Botrytis cinerea* sur la biomasse sèche des plantes de tomate.

Effet de la combinaison salinité-*Botrytis cinerea* sur la biomasse végétative

Dans ce paragraphe, nous abordons l'effet de l'inoculation par *Botrytis* sur les poids frais et sec des deux parties aérienne et souterraine de la plante soumise à une irrigation saline en utilisant trois traitements : NaCl, CaCl₂ et le mélange NaCl-CaCl₂ (rapport 1/1). Les résultats de cette expérience sont présentés pour les deux génotypes en considérant les poids de la tige et des racines séparément et la somme de leurs poids pris ensemble.

Poids frais

Pour les deux génotypes, nous observons un comportement différent entre les tiges et les racines de la plante vis-à-vis de l'effet combiné de *Botrytis* et de la salinité. En effet, pour les tiges il s'agit d'une inhibition (Fig. 23), du poids frais pour tous les traitements à la salinité (NaCl, CaCl₂ et NaCl-CaCl₂) par rapport au témoin. A contrario, le poids frais des racines subi une augmentation par rapport au témoin pour tous les traitements à la salinité (NaCl, CaCl₂ et NaCl-CaCl₂) par rapport au témoin.

Néanmoins, pour CX206, les concentrations de 150 et 300 meq.l⁻¹ (Fig. 23a₁), montrent que l'inhibition diminue par rapport au témoin non inoculé et soumis aux mêmes concentrations de NaCl. En effet, l'accumulation de biomasse fraîche des tiges sous l'effet unique de la salinité est de 62,46 et 58,69 g/plant respectivement pour 150 et 300 meq.l⁻¹. Ce paramètre enregistre 65,35 et 62,63 g/plant sous l'effet combiné de *Botrytis* avec la salinité. Ce qui montre qu'aux fortes concentrations en NaCl (150 et 300 meq.l⁻¹), un effet bénéfique de la salinité apparaît qui inhibe le degré d'infection de la culture par l'isolat. Le même effet est constaté pour la somme des poids de la tige et des racines.

Dans le cas de la variété Guelma, les mêmes constatations que la variété précédente sont valables mais pour les concentrations de 50 et 150 meq.l⁻¹ (Fig. 23a₂). En effet, le pourcentage d'inhibition de la biomasse aérienne de la culture sous l'effet combiné salinité-*Botrytis* est de 6,21 et 24,14% respectivement pour les concentrations salines de 50 et 150 meq.l⁻¹ par rapport au témoin. L'infection par *Botrytis* se manifeste sur la plante par une inhibition de la biomasse totale par rapport aux plants sains soumis aux mêmes doses de 50 et 150 meq.l⁻¹ de NaCl.

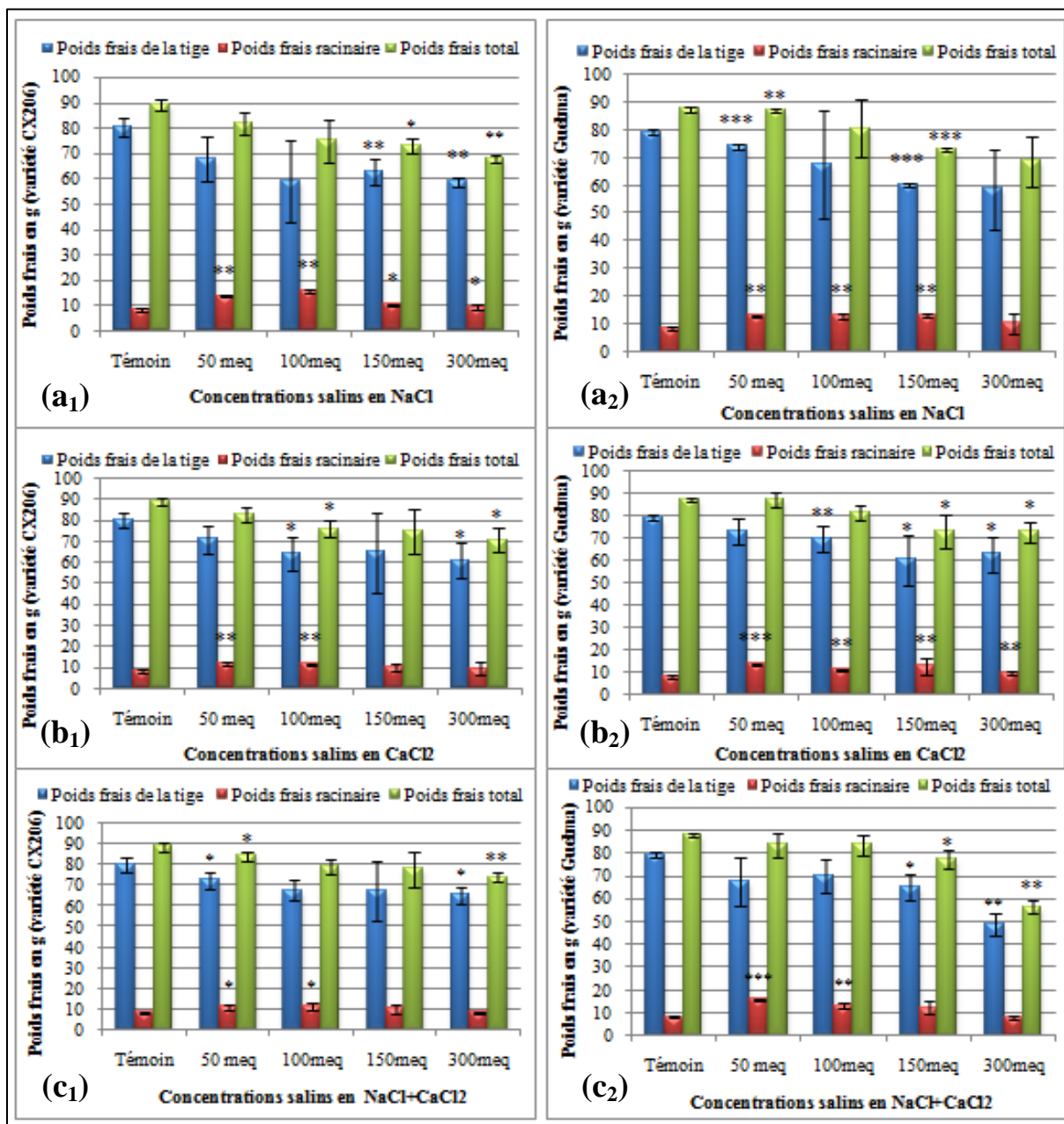


Figure 23-Effet de *B.cinerea* sur la biomasse fraîche des plantes de tomate.

Les résultats de la Fig. 23 b₁ et 23 b₂, permettent de savoir si les constatations précédentes sont propres au NaCl ou à tout autre sel. Le génotype CX206, marque un comportement similaire avec le CaCl₂ que celui observé avec le NaCl. L'accent doit être mis sur le poids frais total des plants qui diminue fortement sous l'effet combine salinité-Botrytis (Fig. 23 b₁) par rapport au témoin. En effet, le poids frais total de la variété varie entre 70,41 et 82,57 g pour respectivement les quatre traitements salins (50, 100, 150 et 300 meq.l⁻¹) par rapport au traitement témoin (0 meq.l⁻¹). Comme dans le cas de NaCl, le poids frais des racines augmente pour les deux concentrations de 50 et 100 meq.l⁻¹ par rapport au témoin. Ce paramètre est non significatif pour les autres concentrations en CaCl₂.

Pour CX206 (Fig. 23 b₂), l'évolution du poids frais de la partie aérienne de la plante inoculée et soumise à CaCl₂ 75,76 et 70,41g, respectivement pour 100 et 300 meq.l⁻¹), montre que la salinité réduit l'effet de Botrytis comparativement au témoin (88,74g). Dans ce cas, le poids frais des racines subit une augmentation pour toutes les concentrations en CaCl₂ par rapport au témoin.

Toujours pour le génotype CX206 (Fig. 23 c₁ et 23 c₂), l'effet combiné des deux sels (NaCl+CaCl₂) ajouté à celui de Botrytis entraîne une diminution significative de 5,22 à 16,89 % du poids frais total de la plante respectivement pour 50 et 300 meq.l⁻¹ par rapport au témoin. Ce paramètre enregistre 8,10 et 23,46 % respectivement pour 50 et 300 meq.l⁻¹ par rapport aux plants inoculés en présence de NaCl. Ce qui induit un rôle inhibiteur de l'effet de Botrytis attribué à CaCl₂. Les résultats du poids frais de la partie aérienne de la plante sont similaires. Dans ce cas, ce paramètre enregistre pour l'effet NaCl+CaCl₂+Botrytis, 15,49 et 26,77 % pour respectivement 50 et 300 meq.l⁻¹ alors qu'il n'en marque que 9,18 et 22,81 % sous l'effet NaCl+Botrytis (Fig. 23 c₂). Par ailleurs, le poids frais de la partie souterraine augmente sous l'effet de NaCl+CaCl₂+Botrytis par rapport à celui de NaCl + Botrytis. Il compte 24,56 et 27,37% respectivement pour les concentrations de 50 et 100 meq.l⁻¹. Cet important accroissement du poids frais souterrain peut être alloué à l'effet propre de Botrytis ou à l'effet combiné de Botrytis-NaCl.

Pour revenir à la variété Guelma (Fig. 23 c₂), un effet analogue à celui de CX206 est observé. En effet, l'apport de CaCl₂ à la combinaison CaCl+Botrytis réduit significativement le poids frais de la partie aérienne avec un pourcentage de diminution de 11,73, 23,63 et 20,75% respectivement pour les doses de 100, 150 et 300 meq.l⁻¹. Le même effet est constaté pour le poids frais total. Néanmoins, il faut noter que pour la concentration de 150 meq.l⁻¹, l'effet de Botrytis+CaCl₂+NaCl entraîne une augmentation de la biomasse totale de 11,94 % par rapport à celle liée à l'effet unique de CaCl₂ (77,1 contre 73,3 g/plant). A contrario, pour la concentration de 300 meq.l⁻¹, l'effet combiné Botrytis+CaCl₂+NaCl entraîne une réduction de la biomasse totale de 35,72 % par rapport à l'effet propre de CaCl₂. Dans ce cas, la biomasse racinaire fraîche enregistre une augmentation de 47 et 36,67 % respectivement pour 50 et 100 meq.l⁻¹.

Poids sec

Les effets combinés de la salinité et Botrytis sur le poids sec de la plante sont abordés (Fig. 24), pour les deux variétés étudiées en prenant en compte l'influence des deux sels de NaCl et de CaCl₂ pris isolément ou associés. Il apparaît qu'en absence de sel, l'effet inhibiteur de Botrytis compte 6,7% de diminution du poids sec total pour CX206 et 12,62% pour Guelma.

Si on irrigue le milieu avec des solutions de concentrations allant de 50 à 300meq.l⁻¹ de NaCl, le poids sec total régresse par rapport au témoin. Dans le cas du génotype **CX206**, la diminution par rapport au témoin est de près de 23, 29, 34, et 41 % respectivement aux concentrations de 50, 100, 150 et 300meq.l⁻¹.

Pour le génotype **Guelma**, la diminution par rapport au témoin est de près de 22, 25, 35, et 40 % respectivement aux concentrations de 50, 100, 150 et 300 meq.l⁻¹.

Si l'on considère le poids sec racinaire, le traitement combiné Botrytis-NaCl produit une réduction de ce paramètre de 8,79 % à 50meq.l⁻¹ et une stimulation de 13,33% à 100 et 150meq.l⁻¹.

Pour le génotype **CX206**, l'effet combiné de NaCl-Botrytis est particulièrement marqué par une inhibition allant de près de 11 à 28 % respectivement pour des concentrations de 50 et 300 meq.l⁻¹.

Pour le génotype **CX206** toujours, l'addition de CaCl₂ au milieu ne permet pas d'inhiber l'effet de Botrytis sur la biomasse sèche total des plants infectés. Cette variété exprime une grande sensibilité à Botrytis qui entraîne une réduction de ce paramètre variant de 24,83 à 41,97%.

Parallèlement, la variété **Guelma** semble moins sensible à Botrytis comparativement à **CX206**, puisque l'inhibition varie entre 18,27 et 27,54% dans la gamme des concentrations allant de 50 à 300meq.l⁻¹.

Il est important de connaître l'effet associé aux deux sels de NaCl et de CaCl₂ ensemble. Le CaCl₂ à 50meq.l⁻¹, conduit à une augmentation de la biomasse sèche racinaire pour les deux variétés. Entre 50 et 300 meq.l⁻¹, ce paramètre diminue continuellement.

La réduction de la matière sèche totale due à l'effet combiné Botrytis+CaCl₂+NaCl, passe de 31,04 à 34,18 % pour la gamme de concentrations variant de 50 à 300 meq.l⁻¹pour **CX206**. Comparée à l'inhibition liée uniquement à Botrytis (6,7 %) l'influence de l'association des deux sels paraît très importante.

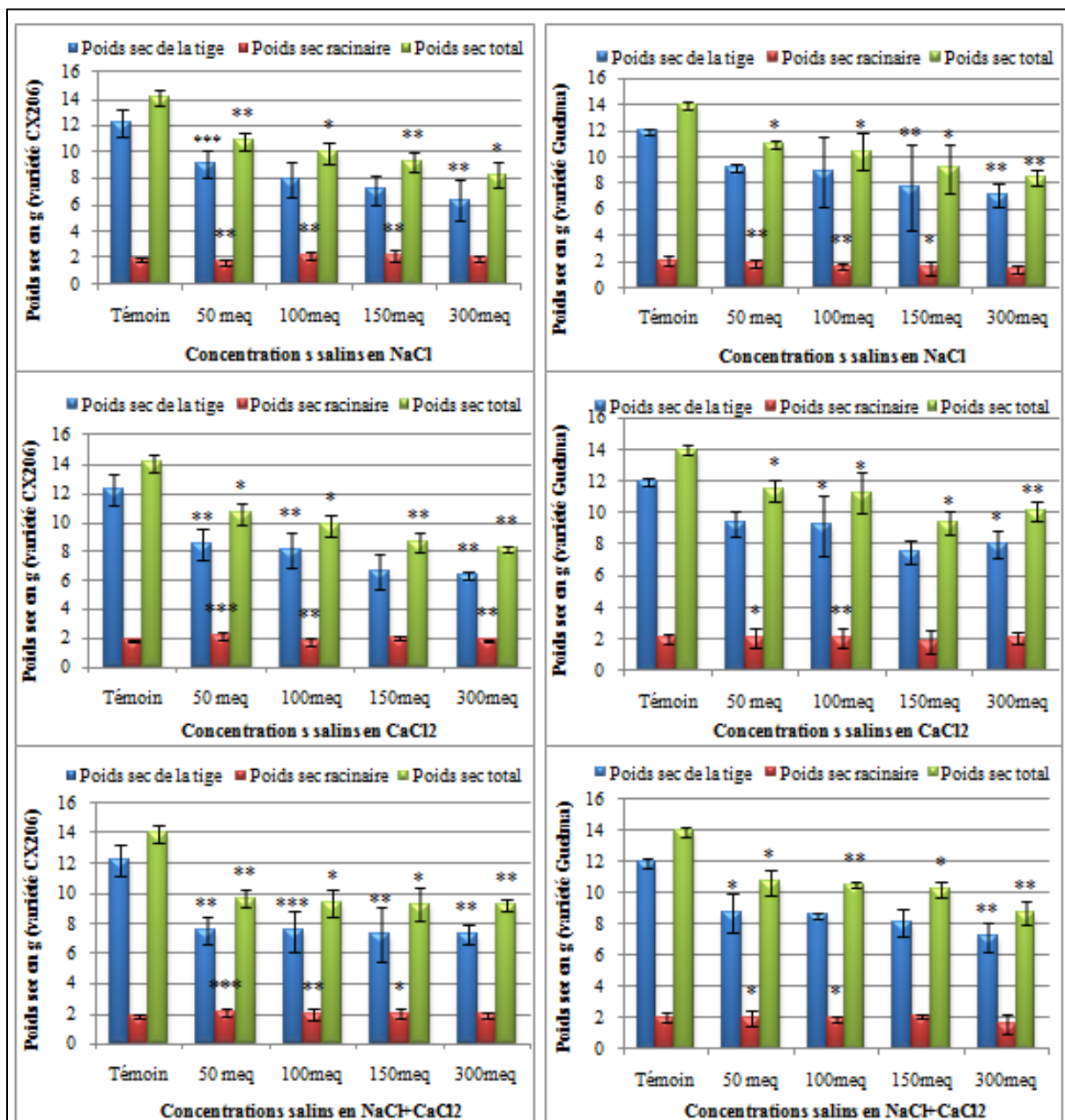


Figure 24-Effet de *B.cinerea* sur la biomasse sèche des plantes de tomate.

En revanche, l'effet combiné Botrytis+CaCl₂+NaCl varie de 23,45 à 39,95 % pour la même gamme de concentrations salines pour **Guelma**. Dans ce cas de figure, la réduction de ce paramètre liée uniquement à Botrytis (12,62%) demeure très faible. Néanmoins, c'est l'inhibition du poids sec de la culture obtenue avec le traitement de NaCl qui est la plus importante pour les deux génotypes étudiés. En termes de concentration saline, c'est la dose de 300 meq.l⁻¹ qui correspond au plus grand pourcentage d'inhibition.

Discussion

Les résultats morphologiques de la culture étudiée, montrent qu'il n'y a pas de différences significatives en termes de paramètres de croissance évalués sous l'effet de NaCl ou Botrytis pour les deux variétés. Néanmoins, l'effet combiné de NaCl et de CaCl₂ entraîne une baisse de la taille des parties aériennes. De même, la variété Guelma réagit à cette combinaison par une stimulation de la croissance de la partie souterraine. Ces résultats concordent avec les observations de Sing et al., 1989. En effet, la plante, du fait de la diminution de la croissance de sa partie aérienne, régule plus scrupuleusement la pénétration d'éléments biodisponibles à travers ses racines pour empêcher une accumulation trop importante à l'équilibre ionique avec la partie aérienne. Ce qui conduit à un déficit hydrique. El Arbi Daroui et al (2012), montrent que l'augmentation de la salinité engendre une réduction de la croissance des jeunes plantules du *W. filifera*, à l'exception de la longueur de la racine et de la biomasse sèche racinaire qui ont augmentées avec l'accroissement de la concentration de NaCl. Par ailleurs, Bouraoui et al. (1998), montrent que la demande énergétique de la croissance des racines chez le triticale est augmentée en milieu salé. Ils précisent que le passage des cellules du stade de division au stade d'élongation s'accompagne d'une modification du métabolisme respiratoire.

La variété de tomate Guelma étudiée, réagit à Botrytis par un déficit de la croissance de la taille de la partie aérienne. Selon la littérature en général, les espèces végétales réagissent aux agents pathogènes en développant des mécanismes de défense variés qui leur permettent de s'adapter. Ces mécanismes de défense résultent d'une multitude de modifications écologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires. L'une des réactions à l'infection selon les variétés, peut s'exprimer par une stimulation ou une régression du développement de l'appareil foliaire (Beye et Lafay, 1985). Beaucoup de travaux se rapportent à certains microorganismes qui produisent les mêmes réactions à l'agression pathogène mais *in vivo*. En effet, Androusse (2006), montre que la croissance racinaire des plantules inoculées avec les *Pythium* testés, exprime une réduction de plus de 50 % par rapport au témoin. Les plantules inoculées par *P. diclinum* montrent la croissance racinaire la plus faible (5,2mm), suivie de celles par *P. torulosum* (12,09mm) et enfin celles par *P. middletonii* (17,11mm). Au stade de post-levée, la différence entre le taux de mortalité des plantules soumises à *P. diclinum* et celles à *P. middletonii* ou à *P. Torulosum* est importante. En effet, *P. diclinum* provoque 4 fois plus de mortalité que *P. torulosum* et 8 fois plus que *P. middletonii*.

Pour ce qui est de la croissance de la taille de la variété CX206 sous l'effet de l'interaction salinité-Botrytis, les résultats de notre étude qui indiquent un développement de l'appareil végétatif

demeurent pertinents malgré que la tomate soit considérée comme une espèce moyennement tolérante à la salinité (El Aissami et Lahlou, 1999 ; Ben Salah *et al.*, (2008). Pour expliquer la part d'effet de chacun des deux paramètres de salinité et de Botrytis, il est utile de rappeler que la plante est capable de mettre en œuvre plusieurs stratégies de réponse aux contraintes biotiques et abiotiques. Dans ces conditions, elle produit divers métabolites de défense tels que les protéines PR (pathogenesis-related protéines), les peroxidases, les phenylalanine ammonialyases, les polyphenol oxidases, les chalcone synthases et les phytoalexines (Chen *et al.*, 2000 ; Ramamoorthy *et al.*, 2001 ; Jeun *et al.*, 2004). L'exemple de la luzerne montre qu'elle synthétise des phytoalexines de type médicarpines suite à son préinoculation par *Sinorhizobium* (Dakora *et al.*, 1993).

A contrario, pour de faibles concentrations salines, la taille de la partie aérienne pour la variété Guelma enregistre une diminution sous l'action combinée de la salinité et de l'infection par rapport aux effets isolés de la salinité et de Botrytis. Ces affirmations concordent avec les travaux de Nachmias *et al.*, (1993), sur la verticilliose de la pomme de terre cultivées en zones semi arides à forte salinité. Ces auteurs ont montré qu'aussi bien la salinité que l'infection par le *Verticillium* induisent une sénescence précoce de la pomme de terre. Ils ont, en outre, observé une augmentation des effets de la verticilliose avec l'augmentation de la salinité des sols sans toutefois qu'il y est signe d'une interaction substantielle entre les deux facteurs. Parallèlement, Regragui (2005), remarque un ralentissement dans l'émission des feuilles chez deux variétés de tomate sous l'effet direct de l'interaction salinité-*Verticillium* sur le développement de l'appareil foliaire. Cette perturbation serait en rapport avec une plus grande sensibilité des variétés de tomate à la verticilliose en conditions salines.

La stimulation de la colonisation des plantes par l'agent pathogène en présence de salinité a été étudiée par plusieurs auteurs notamment : Mac Donald (1984), sur le couple *Phytophthora cryptogea-Chrysanthemum* ; Afailal (1987), sur le couple *Verticillium*-tomate et Benyahia (1998) sur le couple *P. parasitica*-agrumes. Ces auteurs ont tous montré que l'augmentation de la salinité du milieu favorise une colonisation plus intense des plantes par l'agent pathogène.

Contrairement à l'effet de NaCl, le CaCl₂, considéré comme un produit phytosanitaire, n'a pas eu d'influence notable sur l'atténuation des effets de NaCl ou du pathogène.

La présence de sel dans l'eau d'irrigation s'est manifestée par une réduction significative de la croissance végétative au fur et à mesure de l'augmentation de la salinité. Aussi bien pour le poids frais que pour le poids sec, la salinité affecte les différentes parties de la plante pour les deux variétés. Ces résultats sont similaires à ceux de Sadiki et Trabelsi (1989), qui ont travaillé sur les

réponses de cinq variétés de tomate irriguées avec des eaux salines confirmant qu'une dose de 100 mM de NaCl entraîne une réduction de la matière sèche et fraîche de tous les organes de la plante (tiges et racines) sont plus affectées que les feuilles. Ce résultat correspond aux observations de Babas (1985), sur les variétés Vémone et Carmello, et de Amor (1991) qui rapportent une baisse de la croissance de trois variétés de tomate en fonction de la salinité du milieu. La salinité réduit également le poids frais et sec, les protéines et les carbohydrates contenus dans toutes les parties de la plante (Shakil et al. ,2004). D'autres travaux, indiquent que la salinité réduit l'espace intercellulaire de feuilles d'épinards et la densité des stomates de la tomate (Omami, 2005). Aziz et Khan (2001), ont constaté que la croissance optimale de *Rhizophora mucronata* a été obtenue après l'irrigation par 50% d'eau de mer. Dans ce cas, la croissance diminue quand la concentration saline augmente tandis que chez la légumineuse *Alhagi pseudoalhagi*, le poids frais s'accroît sous une faible salinité de 50 mM de NaCl, mais diminue dès lors que la concentration s'élève à 100 et 200 mM de NaCl (Kurban et al.,1999). Selon Zhu (2001), la réduction de la croissance de l'appareil végétatif aérien constitue la capacité d'adaptation nécessaire à la survie des plantes exposées à un stress abiotique. La salinité diminue la croissance des glycophytes en modifiant l'équilibre hydrique et ionique au niveau des tissus (Greenway et Munns, 1980). La réduction du flux d'assimilats vers les tissus méristématiques en croissance peut se manifester par une diminution des matières fraîches et sèches au niveau des feuilles, mais aussi au niveau des tiges et des racines (Hernandez et al., 2000). Au niveau des feuilles, ce phénomène induit des changements du statut hydrique de la plante (Hopkins, 2003). En outre, les effets de la salinité sur la croissance des plantes peuvent être attribués à d'autres facteurs dont une augmentation de la rigidité de la paroi cellulaire, probablement à cause d'une modification de sa structure ou une diminution de son extensibilité, d'une réduction du taux de production de nouvelles cellules (Kinraide et Parker ,1990) et/ou à la toxicité des ions Na^+ et Cl^- (Van Volkenburgh et Boyer, 1985), d'une carence nutritionnelle ainsi qu'à des déséquilibres minéraux (Van der Hoorn et al. , 2002).

Les deux génotypes de tomate, réagissent à l'infection par *Botrytis cinerea*, par un déficit de la croissance touchant le poids frais et sec. En effet, certaines pathogènes possèdent la capacité de changer les caractéristiques anatomiques des plantes. Ceci a pour conséquence de gêner les composantes qualitatives et quantitatives de la cellule hôte. Par la suite, les plantes ne possèdent pas un système immunitaire comme les animaux, mais elles ont une immunité innée pour reconnaître des agents pathogènes potentiels et induire des réponses de défense qui vont arrêter ou ralentir la croissance de l'agent pathogène (Jones et Dangl, 2006). Lorsqu'un agent pathogène est placé au contact d'une plante dans des conditions environnementales favorables, le parasite se procure l'eau et les aliments soit en tuant les cellules de l'hôte et en effectuant des prélèvements dans les

cellules mortes, soit en établissant des relations avec des cellules vivantes et en absorbant leurs produits solubles sans causer de nécrose, au moins pendant un temps. En plus des barrières physiques et chimiques préformées, les plantes possèdent des systèmes de reconnaissance et de réponses de défense induites qui sont déclenchées immédiatement après le premier contact avec des molécules étrangères et sont renforcées par l'interaction prolongée avec les agents pathogènes (Göhre et Robatzek, 2008).

Au cours du déroulement d'une maladie, le premier effet, semble résulter des troubles du métabolisme qui peuvent dériver d'une action destructrice du parasite sur les tissus de son hôte. Les Champignons parasites peuvent agir soit sur les processus de l'assimilation, soit sur les transformations ultérieures des hydrates de carbone synthétisés et leur répartition.

L'exemple de *F. oxysporum* est connu pour produire une grande quantité d'enzymes dégradant la paroi végétale in vitro et in planta (Di Pietro et al., 2003), néanmoins dans le cortex de la racine de *M. truncatula* il ne semble pas en produire. Ceci pourrait être lié au fait que la croissance intercellulaire de *F. oxysporum f.sp. medicaginis* a été observée principalement dans les méats intercellulaires ne nécessitant pas la dégradation de polymères pectiques.

Pour *B. cinerea*, différents facteurs d'origines extérieures ou dépendants de la plante interviennent dans les premiers stades d'infection et dans le développement de la maladie (Elad and Yunis, 1993). Ce champignon a besoin d'une source exogène de nutriments pour se développer (Yoder and Whalen, 1975). Les nutriments sont nécessaires à la germination des spores, au développement du mycélium, et à la formation des appressoria (Li et al., 2004). D'après Blakeman (1975), la présence à la fois de carbone et d'azote est nécessaire à la germination des spores du champignon. Pour survivre dans la plante, le pathogène développe des mécanismes qui leur permettent de surmonter ou inactiver les défenses préformées et dégrader la paroi (Göhre et Robatzek, 2008). La sécrétion d'enzymes de dégradation des polymères de la paroi (enzymes pectolytiques, cellulases, xylanases, protéases ...) peut permettre la pénétration sans structures spécialisées. Toutes ces structures et mécanismes permettent de surmonter les défenses préformées et contribuent à la virulence de l'agent pathogène. *Botrytis cinerea* serait ainsi capable de contourner l'alpha-tomatine, phytoanticipine constitutivement produite par la tomate (Osborn, 1996) en détoxifiant ce composé. La capacité de *B. cinerea* à contourner la phytoalexine resveratrol, dont la production est induite chez la vigne, a également été observée par Sbaghi et al. (1996), qui établissent une corrélation entre la capacité de huit isolats de *B. cinerea* à détoxifier le resveratrol et leur pouvoir pathogène sur feuilles de vigne.

Pour estimer l'impact de la salinité sur *B. cinerea*, les plantes de tomate infectées ont été soumises à des arrosages avec des eaux chargées de NaCl, CaCl₂ et NaCl+CaCl₂. La tomate répond généralement à l'interaction salinité-Botrytis par stimulation de la biomasse fraîche par rapport aux plants sains exposés à la même salinité, mais cette croissance et rendement reste faible par rapport au témoin sain sans sels. La stimulation de la croissance en poids des plantes par l'interaction Botrytis-salinité, peut être expliquée par l'activation de la réponse des plantes induit par l'infection du parasite.

Au cours de l'interaction hôte-pathogènes, la plante est capable d'exprimer de nombreuses réactions de défense, dont les plus connues sont la production de composés renforçant la paroi pectocellulosique, la synthèse de phytoalexines, la modification des flux ioniques, la production de FAO et l'accumulation de protéines PR. Ces dernières confèrent aux plantes une grande stabilité dans les environnements défavorables (cas du stress salin) où elles s'accumulent, notamment dans la vacuole et dans les espaces intercellulaires. L'accumulation de ces composés est généralisée chez de nombreuses plantes en réponse à l'exposition aux stress biotiques ou abiotiques et sont donc considérées plus généralement comme des protéines de stress (Yun et al., 1996; Bishop et al., 2000). Plus particulièrement, des études ont permis de mettre en évidence une relation entre l'augmentation de FAO ou « burst oxydatif » et l'infection à différents pathogènes (Lamb et Dixon, 1997). La FAO la plus étudiée est le peroxyde d'hydrogène. Dans ce cas, l'H₂O₂ est capable d'induire l'expression de nombreux gènes de défense (Wu et al., 1997 ; Aziz et al., 2004). Durant les dix dernières années, plusieurs auteurs, relatent l'accumulation de protéines de métabolites secondaires (phytoalexines) qui jouent un rôle essentiel dans la lutte contre les pathogènes. Les phytoalexines sont des substances de faible poids moléculaire, plutôt lipophiles dont la synthèse est stimulée chez les végétaux en réponse à différents stress biotiques et abiotiques (Morrissey et Osbourn, 1999, Fofana et al., 2002).

Il convient de remarquer, par ailleurs, que lorsque les plantes sont soumises à l'action combinée de la salinité et de Botrytis, le poids sec reste sensiblement faibles et régresse très lentement par rapport au témoin. En effet, la combinaison salinité-Botrytis, modifie complètement la réaction de tomate vis-à-vis de cette interaction. Nos résultats montrent une inhibition de la biomasse sèche des deux génotypes étudiés comme effet direct de l'interaction salinité-Botrytis sur la production biochimique. Cette perturbation serait en rapport avec une plus grande sensibilité des variétés de tomate à la pourriture en conditions salines.

Les résultats de la présente étude montrent également que la salinité du milieu stimule le développement de *Botrytis cinerea in vitro*. On peut supposer qu'*in vivo*, la combinaison salinité-

infection se manifeste par une aggravation de l'inhibition du poids sec. En effet, la salinité semble augmenter le pouvoir inhibiteur sur un large éventail du champignon. Cela peut être extrêmement favorable pour le parasite qui cherche à obtenir des aliments de son hôte. La stimulation de la colonisation des plantes par l'agent pathogène en présence de NaCl a été rapportée par plusieurs notamment Benyahia (1998).

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons remarqué que l'irrigation avec une eau salinée de NaCl n'a pas d'effets significatifs sur la taille pour les deux variétés de tomate étudiées. Cependant, l'effet combiné de NaCl+CaCl₂ entraîne une baisse de la taille de la partie aérienne et une stimulation de la partie souterraine.

Le géotype Guelma, réagit à l'infection de l'isolat *Botrytis*, par un déficit de la croissance touchant la taille des parties aériennes.

L'effet combiné de la salinité et de l'infection entraîne une diminution de la croissance des plants de la variété CX206 moins prononcée que celles générées par les effets de ces deux contraintes pris isolément. Pour la variété Guelma, l'effet combiné de la salinité et de l'infection exprime une réduction de la taille de la partie aérienne plus importante que les effets de ces deux contraintes pris isolément. Ce qui démontre un comportement variétal complètement différent en termes de réponses aux contraintes biotiques et abiotiques.

La salinité entraîne une réduction importante de la biomasse végétative en fonction de l'accroissement de la concentration saline. Aussi bien pour le poids frais que celui sec, la salinité affecte les différentes parties de la plante.

Les deux géotypes de tomate, réagissent à l'infection par *Botrytis cinerea*, par un déficit de la croissance touchant le poids frais et sec.

Les plantes soumises à la combinaison salinité et infection montrent une amélioration significativement de la biomasse fraîche par rapport aux plants sains exposés à la même salinité. Néanmoins, cette croissance reste faible par rapport au témoin sain sans sels. Il convient, par ailleurs, de remarquer que lorsque les plantes sont soumises à l'action combinée de la salinité et de *Botrytis*, le poids sec reste sensiblement faible et régresse très lentement par rapport au témoin.

On peut noter que dans la majorité des cas, l'exposition des plantes à plusieurs contraintes biotiques et abiotiques, entraîne une réponse cellulaire complexe par rapport aux effets des

contraintes pris isolément. L'étude des relations entre la nature et la forme des contraintes en relation avec la réponse des cultures constitue des atouts supplémentaires à la compréhension des mécanismes d'auto-défense de espèces végétales et donc aux possibilités de lutte et d'adaptation biologique de ces dernières aux agents pathogènes.

Chapitre VII - Effets de la salinité et *Botrytis cinerea* sur le comportement physiologique de la tomate

Introduction

En termes physiologiques, l'effet dépressif de la salinité du milieu sur la physiologie de la plante peut s'exercer de plusieurs manières : soit une forte concentration saline entraîne une diminution du potentiel osmotique et par conséquent réduit l'absorption de l'eau par les racines, soit la turgescence cellulaire est abaissée ce qui entraîne un phénomène de plasmolyse (El Jaafari S., 1993, Lachâal et al 1997). Le stress salin induit des changements qui affectent le statut hydrique de la plante (Hopkins 2003, Gorham *et al.*, 1990). Ces changements conduisent à un dessèchement des feuilles (Blumwald 2000), une diminution de leur RWC (Mehani et al., 2012), une réduction générale de la croissance, de la transpiration et de l'absorption hydrique (Blumwald, 2000 ; Verslues et al., 2006 ; Urban and Urban, 2010). Ces processus sont d'origine à perturber l'homéostasie cellulaire (Perdiguero, et al., 2013, Iqbal, et al., 2014).

Plusieurs études faites sur le blé (Morant-Manceau et al., 2004), mettent en évidence les processus cités précédemment concernant la baisse de la teneur relative en eau (RWC). Ceci est vraisemblablement dû à la toxicité des ions Na^+ et/ou Cl^- accumulés dans le cytoplasme à des seuils dépassant la capacité de compartimentage dans la vacuole (Rochdi et al., 2005). L'accumulation apoplasmique des ions Na^+ et Cl^- serait le paramètre le plus impliqué dans le flétrissement et la mortalité de certaines espèces (Hasanuzzaman et al., 2013). Selon (Flowers and Yeo, 1981), la mortalité des plantes en milieu salin s'explique par une perturbation de l'alimentation hydrique et d'une inhibition du métabolisme.

Peu d'études abordent la relation entre le statut hydrique des plantes et leur infection par des phytopathogènes. Une étude menée sur le tabac a montré que lors de l'interaction avec un nématode parasite, l'expression d'un gène TIP est stimulée (Opperman et al 1994). Ce processus pourrait être impliqué dans l'approvisionnement en eau et en solutés du parasite au niveau de la cellule géante nourricière (giant cell) ainsi que dans la régulation osmotique de cette cellule. Chez la tomate, l'interaction avec le parasite *Cuscuta reflexa* induit l'expression d'une protéine homologue de PIP1, probablement liée à un processus d'élongation cellulaire dépendant de l'auxine (Werner et al 2001). A ce jour, rares sont les études disponibles sur la régulation de l'eau en réponse à une interaction entre une plante et un agent pathogène.

Matériels et méthodes

Détermination de la teneur en eau par la méthode d'étuvage (Multon et al, 1991)

La teneur en eau de la plante est la différence en % de son poids avant et après passage à l'étuve à 80 °C pendant 48heures.

$$TE = \left(\frac{MF - MS}{MF} \right) \times 100$$

TE : la teneur en eau.

MF : poids frais juste après récolte (en g)

MS : poids sec après séchage à l'étuve (en g)

Résultats

Effet du stress salin sur la teneur en eau des plantes

Les effets de la salinité sur la teneur en eau de la plante sont étudiés en utilisant séparément le NaCl et le CaCl₂ ensuite les deux sels associés dans un rapport 1/1.

L'effet du NaCl entraîne une inhibition importante de la teneur en eau pour les deux génotypes (Fig. 25). Pour CX206, cette inhibition est de l'ordre de 0.47, 1.61 et 1.62 % à 50, 100 et 150 meq.l⁻¹ en NaCl. Pour la variété Guelma, cette inhibition n'est observée que pour le traitement à 150 meq.l⁻¹ de NaCl et est de l'ordre de 1,25%.

Pour le CaCl₂, l'analyse de la variance révèle un effet significatif de la teneur en eau uniquement pour les doses de 50 et 100 meq.l⁻¹ dans le cas de CX206 et 50 meq.l⁻¹ pour le génotype Guelma.

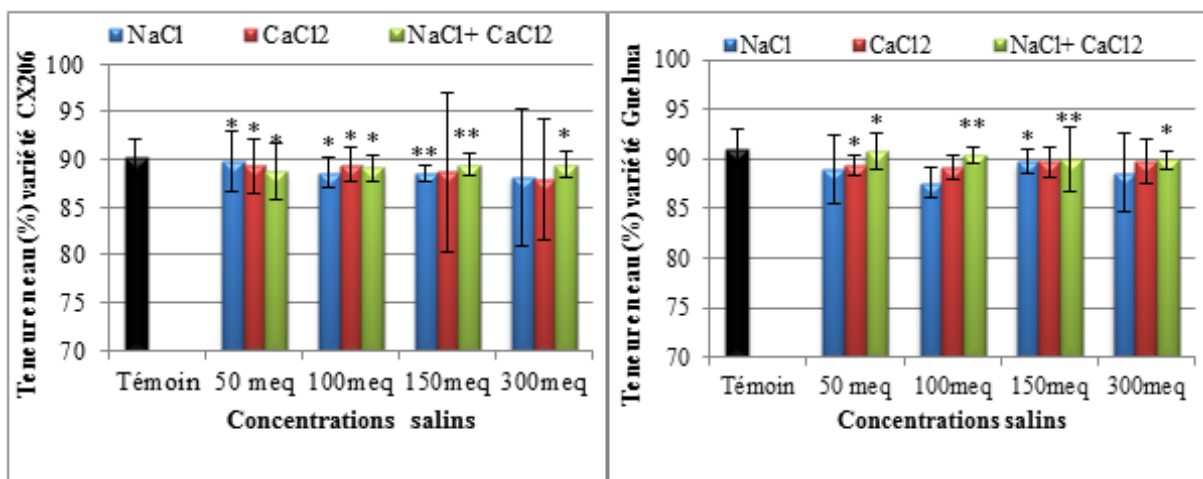


Figure 25-Effet de la salinité sur la teneur en eau des plantes de tomate.

Dans le cas de l'association NaCl+CaCl₂, l'effet de la salinité sur la teneur en eau de la plante s'évère similaire aux effets produits par les deux sels séparément. Néanmoins, il est important de noter que les deux sels associés entraînent un accroissement significatif de la teneur en eau par rapport à leurs effets séparés. En effet pour CX206, cet accroissement est de 0.46, 0.83 et 1.25 % respectivement pour les concentrations de 100, 150 et 300 meq.l⁻¹ (effet non significatif à 50 meq.l⁻¹). Pour le génotype Guelma, il est de 1.81, 2.82, 0.27 et 1.31% respectivement pour les quatre concentrations de NaCl+CaCl₂ dans l'ordre croissant.

Effet de *Botrytis cinerea* sur la teneur en eau des plantes

Les résultats de la figure 26 montrent qu'en absence de sel, l'infection par *Botrytis cinerea* à 10⁵ spores.ml⁻¹ n'a aucun effet sur la teneur en eau des plantes puisque les teneurs des plantes infectées sont similaires à celles des plantes saines.

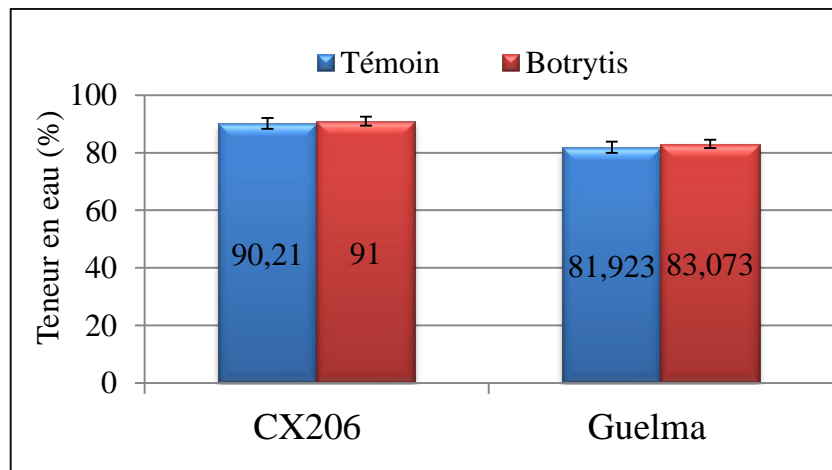


Figure 26-Effet de *B.cinerea* sur la teneur en eau des plantes de tomate.

Effet de la combinaison salinité-*Botrytis cinerea* sur la teneur en eau des plantes

Pour commencer avec le génotype CX206, la combinaison salinité-Botrytis modifie la teneur en eau de la tomate observée pour chacun des trois traitements : NaCl, CaCl₂ et NaCl-CaCl₂.

Pour le traitement NaCl+Botrytis, ce génotype enregistre une diminution de sa teneur en eau de 0,52 % par rapport à l'effet seul de NaCl à 50meq.l⁻¹(effet non significatif pour les autres concentrations de NaCl).

L'effet du traitement CaCl₂+Botrytis révèle des variations non significatives (P > 0,05).

L'effet combiné de NaCl+CaCl₂+Botrytis indique le même effet que le traitement NaCl+Botrytis à 100 et 300 meq.l⁻¹.

En ce qui concerne le génotype de **Guelma**, le traitement NaCl+Botrytis enregistre une diminution de sa teneur en eau de 2.5, 3.3 et 3.7 % par rapport à l'effet seul de NaCl respectivement à 100, 150 et 300 meq.l⁻¹ (effet non significatif à 50 meq.l⁻¹ de NaCl).

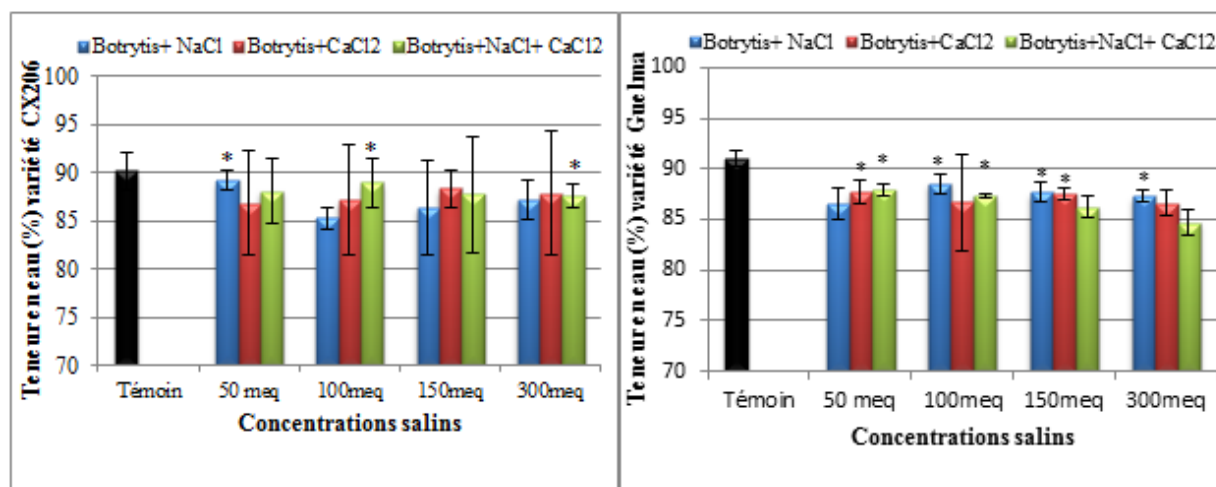


Figure 27-Effet de *B.cinerea* sur la teneur en eau des plantes de tomate.

En présence de deux sels, les plantes infectées ont le même comportement vis-à-vis des effets combinés de la salinité et de l'infection par *Botrytis cinerea*. Les plantes infectées et soumises au stress salin voient leur contenu en eau diminuer fortement dès que la salinité du milieu commence à augmenter.

L'effet combiné de NaCl+CaCl₂+Botrytis indique le même effet que les traitements de NaCl+Botrytis et de CaCl₂+Botrytis.

Discussion

Il est intéressant de rappeler, que l'eau en tant qu'élément vital des végétaux, constitue près de 70 à 80% de leurs poids. Elle joue un rôle essentiel dans la croissance et le développement des plantes cultivées (Heller et al., 1993 et Riou, 1993). Elle est impliquée dans les processus métabolique de la photosynthèse ainsi que le transport et l'accumulation des éléments nutritifs. Elle intervient également dans la division cellulaire et la régulation thermique. C'est pourquoi, une diminution de la teneur en eau d'une plante se traduit immédiatement par une réduction de sa croissance en taille avant même que la photosynthèse ne soit affectée (Debouba et al., 2007).

Dans le présent travail, nous avons abordé l'effet de la salinité combinée à celui d'une infection par un agent pathogène, *Botrytis cinerea*, sur la teneur en eau de deux variétés de tomate.

L'influence de NaCl seul, entraîne une faible diminution de la teneur en eau pour les deux génotypes de tomate étudiés. Ceci est en accord avec les travaux de Albouchi et al., (2003) et ceux de Morant-Manceau et al., (2004). Il est rapporté que des différences de sensibilité au sel

étaient constatées entre plusieurs variétés de tomate testées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Amor, 1991).

Le comportement hydrique des deux génotypes étudiés vis-à-vis de la salinité, dénote que sous l'effet du stress salin, la croissance du système racinaire latéral est considérablement affectée et des mécanismes d'ajustement osmotique sont déclenchés par la plante.

En effet, l'absorption de sel par les tissus de la plante trouble le bon fonctionnement physiologique cellulaire du fait que la pression osmotique dans la solution du sol perturbe la voie d'approvisionnement de la plante en eau et en éléments minéraux.

À l'issue d'observations *in vivo*, nous avons constaté que l'effet combiné de salinité+Botrytis se manifeste pour les deux variétés de tomate par une diminution importante de la teneur en eau non seulement par rapport au témoin sans sel et non infecté, mais aussi par rapport à la plante sous salinité et non infectée.

La diminution de la teneur en eau de la plante est le résultat d'une réduction de son volume cellulaire d'une part et de la transformation anatomique tendant à réduire la dépense hydrique foliaire d'autre part (Taiz and Zeiger, 2002). Standaert (1978), montre que la nutrition de la plante en milieu salé augmente la sévérité de la fusariose chez la tomate.

Conclusion

À l'issue de la discussion des résultats de ce chapitre et d'un point de vue global, il semble que les contraintes salines provoquent des changements physiologiques tant au niveau cellulaire qu'au niveau de la plante entière.

Les résultats obtenus sur le plan physiologique du comportement de la tomate soumise aux stress biotique et abiotique sont fondamentaux pour une meilleure compréhension des mécanismes relativement complexes de son adaptation aux conditions du milieu eu égard aux nombreux facteurs qui y interviennent.

Le comportement morphologique et physiologique des végétaux face aux contraintes environnementales est difficilement perceptible, irrégulier et souvent perturbé. La présente étude montre que l'effet de la salinité sur la tomate se manifeste par une accélération du développement de Botrytis et une inhibition des teneurs en eau de la plante.

Chapitre VIII - Influence de la salinité sur l'antagonisme microbien

***Trichoderma harzianum* vis-a-vis de *Botrytis cinerea* et sur la bioprotection des tomates contre la pourriture grise**

Introduction

De nos jours la lutte chimique s'est révélée être une méthode de lutte performante et indispensable pour combattre les agents pathogènes (Leroux, 2003 ; Pezet *et al.*, 2004). Ce sont essentiellement des pesticides de synthèse qui sont considérés comme l'arme la plus efficace, mais l'épandage massif et répété de certains de ces pesticides chimiques conduit à une pollution de notre environnement. Ainsi, des résidus sont retrouvés dans l'eau, dans les sols et dans les produits finis (Coubart et Reulet, 2000, Thakore, 2006). En effet, l'utilisation massive des pesticides a engendré l'apparition de souches pathogènes multi-résistantes, contre lesquelles les produits actuels sont devenus peu efficaces voire inefficaces. Le développement de résistances aux fongicides est un phénomène fréquent chez les phytopathogènes et pose un réel problème agronomique.

Dans le cas de la lutte contre *B. cinerea*, certaines souches sont connues pour avoir développé une résistance aux produits chimiques étant donné que les mécanismes de résistance aux fongicides anti-*Botrytis* ont largement été étudiés (Leroux, 2004). L'exemple de la résistance de certains phytopathogènes aux dicarboximides, phenylpyrroles et hydrocarbures aromatiques, semble être liée à la cascade mitogen-activated protein kinases (MAP kinase), impliquée dans la réponse des organismes aux stress (Cui *et al.*, 2002).

Eu regard à ces inconvénients, il est important de trouver des solutions alternatives qui permettront de continuer à lutter contre *B. cinerea* tout en diminuant l'emploi de produits chimiques. Néanmoins à l'heure actuelle où les pressions économique, écologique, sanitaire et législative sont de plus en plus fortes, on comprend l'intérêt d'exploiter d'autres moyens de lutte contre *B. cinerea* sans remettre en cause les pratiques culturales tout en mettant en œuvre des systèmes cultureux moins vulnérables aux pathogènes, donc moins dépendants des pesticides. Ces systèmes sont donc basés sur la rationalisation des pratiques agricoles (fumigation-stérilisation en horticulture, désinfection des graines, rotation des cultures, contrôle du vecteur de la maladie...), par l'utilisation de variétés végétales résistantes. Une autre alternative à l'utilisation des pesticides consiste à utiliser des micro-organismes bénéfiques et qui peuvent être essentiellement des champignons, des bactéries ou des levures (Bakker *et al.*, 2003). La découverte de tels agents de lutte biologique et la démonstration de leur capacité à réduire l'incidence et la gravité des maladies ont tracé la voie à plusieurs recherches prometteuses (Alabouvette *et al.* 1993; Bélanger et Labbé 1994). Dans ce

contexte, une attention particulière a été portée aux champignons antagonistes, principalement à cause de leur potentiel à diminuer la densité de l'inoculum des champignons pathogènes (Elad et al. 1982 ; Lockwood 1988 ;Larkin et Fravel 1998).

La protection biologique contre *B. cinerea* à l'aide de microorganismes antagonistes, champignons filamenteux, levures et bactéries, a été intensivement étudiée au cours des dernières décennies (Droby et al., 2009; Elmer and Reglinski, 2006; Mari et al., 2003). En effet, parmi les champignons antagonistes qui ont démontré un bon potentiel de lutte figure le trichoderma spp. Très souvent rapporté par la littérature (Elad et al. 1982; Harman 2000). Ce champignon est connu pour ses effets contre : *Pythium* (Chet et al. 1981; Clavet et al. 1993); *Phytophthora cinnamomi* Rands (Kelley 1976), *Rhizoctonia solani* Kühn (Elad et al. 1980; Lewis et Papavizas 1987; Windham et al. 1986); *Sclerotium rolfsii* Saccardo (Backman et Rodriguez-Kabana 1975). En effet, Lynch et al. (1991a, b) ont étudié l'effet du Trichoderma sur la croissance de la laitue et son aptitude à lutter contre le *Rhizoctonia solani* Kühn et le *Pythium ultimum* Trow comme agents de la fonte des semis. L'utilisation de Trichoderma sp pour abaisser la pression d'inoculum de Phytophthora sp en réduisant ainsi l'incidence de la pourriture brune a été entreprise depuis quelques années en particulier en Amérique latine (Hebbar et al., 1999; Krauss et Soberanis, 2002). Le parasitisme de *T. viride*, par exemple, est défini par la sécrétion d'un type d'enzyme incluant les cellulases, les chitinases et des antibiotiques, tel que la gliotoxine (Haran et al. 1996). Des études récentes montrent que *T. viride* est un améliorateur de la croissance chez le soja (Harman 2001), il protège la tomate, le piment (Verma 2007) et quelques cucurbitacées contre les phytopathogènes. En plus, ce genre d'antagonistes peut augmenter la croissance racinaire, détruit les métabolites toxiques produits par la microflore et contrôle directement les pathogènes des racines. Des observations microscopiques sur des cultures de différents champignons ont montré que Trichoderma croit parallèlement avec *Rizoctonia Solani*. Dans ce cas, *Trichoderma* s'enroule autour du *Rizoctonia solani* et forme des crochets empêchant ainsi le développement de celle-ci (Shalini et al. 2007).

La fixation de Trichoderma sur les racines des plantes favorise l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs (cuivre, fer, phosphore, manganèse et le sodium) à partir de la solution du sol (Yedidia et al. 2001). L'augmentation de l'absorption des éléments nutritifs indique une amélioration du mécanisme actif d'absorption des éléments nutritifs. En outre, Huaying (1998) ainsi que Liansheng et Weihua (2000) ont rapporté que le mycoparasitisme fait partie du mécanisme de biocontrôle de Trichoderma contre *Botrytis cinerea*. Yedidia et al. (2000) ont prouvé que l'association de Trichoderma avec les racines réduit les maladies des racines par l'activation de la réponse de la défense des plantes.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la performance de l'association *Botrytis cinerea* et *Trichoderma harzianum* sur deux variétés de tomate. En effet, il est recherché l'effet de la salinité des sols sur l'antagonisme de *T. harzianum* à l'encontre de *B. cinerea*.

Article 2 (Asian Journal of Plant Pathology)

Asian Journal of Plant Pathology 9 (4): 158-166, 2015
ISSN 1819-1541 / DOI: 10.3923/ajppsaj.2015.158.166
© 2015 Academic Journals Inc.



Salinity Influence upon Activity of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*

¹Boumaaza Boualem, ¹Benkhelifa Mohamed and ²Belkhouidja Moulay

¹Laboratory of Plant Protection, Department of Agronomy, University of Abdelhamid Ibn Badis, BP 300, 27000, Mostaganem, Algeria

²Laboratory of Vegetal Ecophysiology, Faculty of Sciences, University of Es Senia, BP 1524, ElMnouer, Oran, Algeria

Corresponding Author: Boumaaza Boualem, Laboratory of Plant Protection, Department of Agronomy, University of Abdelhamid Ibn Badis, BP 300, 27000, Mostaganem, Algeria

ABSTRACT

Three isolates of *Botrytis cinerea* were isolated from leaves and stems of different tomato varieties taken from four areas in the North-west of Algeria where tomato is mostly grown in greenhouses and high tunnels. The purpose of this study was to determine the effect of two salts: NaCl and CaCl₂ tolerance of *Trichoderma harzianum* and to evaluate the impact of salinity on its antagonistic capacities in order to use it as a biological agent controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mold disease of tomato. In the absence of salt, the volatile and non-volatile secondary metabolites from *T. harzianum* showed 52, 23-79, 81% inhibition of *B. cinerea*. In the presence of salt, the inhibition percentages of the mycelial growth of *B. cinerea* by volatile metabolites were stimulated by the high concentrations of NaCl 94,70 and 90,85% for CaCl₂ compared to the control. However, non-volatile compounds from *Trichoderma*, the percentage of growth inhibition varied between 65.17% and 82, 12% for NaCl and 61.19-85.01 in the presence of CaCl₂.

Key words: Grey mould, salt stress, NaCl, CaCl₂, saline tolerance, volatile metabolites, *Lycopersicon esculentum*

INTRODUCTION

Grey mould, caused by *Botrytis cinerea* (Sclerotiniaceae family) is an important plant disease that affects a large number of plant species and is particularly important in greenhouse production of tomatoes in Mediterranean basin (O'Neill *et al.*, 1997). In greenhouse tomato, the fungus infects flowers, fruits and leaves and can grow through the petiole into the stem (Shtienberg *et al.*, 1998; Kalogiannis *et al.*, 2006).

Soil salinity is one of the major environmental factors that lead to a deterioration of agricultural land and reduction in crop productivity worldwide Keshavarzi *et al.* (2011). This problem is one of the major stresses especially in arid and semi-arid regions (Munns, 2002) and can severely limit plant growth and productivity (Allakhverdiev *et al.*, 2000; Koca *et al.*, 2007).

In Algeria, a wide range of environmental stresses (such as high and low temperature, drought, alkalinity, salinity and pathogen infection) are potentially harmful to the plants. Soil salinity and irrigation water are two of the main serious problems hindering the development of most plant species (Levignron *et al.*, 1995). Thus, the effect of these factors may result from structural and physiological changes in the plant, an increase incidence and severity of diseases caused by various species pathogen. (Bouchibi *et al.*, 1990) showed that relatively low levels of salinity (25-50 mEq

could increase the severity of phytophthora root rot of tomato with high Na:Ca ratios (10:1), *Phytophthora* (Blaker and MacDonald, 1986; MacDonald, 1982; Sanogo, 2004; Swiecki and MacDonald, 1988), *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Turco *et al.*, 2002), *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Jones *et al.*, 1993), *Verticillium dahliae* and *Alternaria solani* (Nachmias *et al.*, 1993).

Chemical control has always been essential for the management of gray mold, caused by *Botrytis cinerea*. Continuous use of the same fungicide against the same pathogen results in the development of fungicide resistant strains of the pathogen (Kumar and Dubey, 2001; Mamgain *et al.*, 2013). Additionally chemical fungicides not only develop fungicide resistant strains but also accumulate in food and ground water as residues. In addition, it results in environmental hazards and has harmful side effects on human beings and animals. However, due to the polluting and non-biodegradable nature of such pesticides.

Biological control offers the chance to improve crop production within the existing resources, besides avoiding the problem of pesticide resistance (Khan *et al.*, 2014). However, has been considered as a more natural and environmentally acceptable alternative to existing chemical treatment methods (Baker and Paulitz, 1996; Eziashi *et al.*, 2007).

There are a variety of fungal species and isolates that have been reported as biocontrol agents, although *Trichoderma* species clearly dominate, perhaps due to their ease of growth and wide host range (Whipps and Lumsden, 2001). *Trichoderma* as a potent fungal biocontrol agent against a wide range of plant pathogens has attracted considerable scientific attention (Hermosa *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2010; Moran-Diez *et al.*, 2012). The effectiveness of this antagonist species depends on the suppress plant diseases by direct antibiosis or mycoparasitism as well as indirect IR (Lorito *et al.*, 2010; Shores *et al.*, 2010). The various mechanisms include antibiosis, parasitism, inducing host-plant resistance, competition and secretion of chitinolytic enzymes, mycoparasitism and production of inhibitory compounds (Harman *et al.*, 2004). For the most effective control of disease, it seems necessary to examine the impact of salinity on its antagonistic capacities, in order to use it as a biological agent controlling *B. cinerea* of tomato.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates: *Botrytis cinerea* isolates were obtained from decayed tomato (*Lycopersicon esculentum*) in North-western Algeria. The leaf fragments were placed on filter paper moistened with sterile water in a Petri dish. *B. cinerea* was cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) incubated at 25°C.

Antagonist: The isolate of *Trichoderma harzianum*, obtained from the laboratory of plant protection (University of Mostaganem, Algeria) was grown in PDA. The media were added with the same concentration of NaCl (50, 100, 150, 300 mEq).

Colony growth inhibition assay with *Trichoderma harzianum* in dual culture method: Interactions between antagonistic of *T. harzianum* against *Botrytis cinerea* were determined by the method described by Dennis and Webster (1971). A 4 mm diameter mycelial disc from the margin of the *Trichoderma* one week old culture and the pathogen *Botrytis cinerea* were placed on opposite of the plate at equal distance from the periphery and in control plates only *Botrytis cinerea* was placed. The plates were incubated at 25±1°C, observed after 4 days and the colony interactions were measured as percentage of inhibition of radial growth of *Botrytis cinerea* by following equation:

$$L = \frac{(D1 - D2)}{D1} \times 100$$

where, L is the percentage inhibition of radial mycelial growth, D1 is radial growth of the pathogen in the control, D2 is radial growth of the pathogen in the presence of *T. viride* (Edgington *et al.*, 1971).

Evaluation of volatile metabolites: The effect of the volatile metabolites released by *T. harzianum* on the mycelial growth of the pathogens was evaluated by the inverted plate technique as described by Dennis and Webster (1971). The 5 mm mycelial discs of *T. harzianum* obtained from the margin of young cultures were placed centrally on the PDA glass dish and incubated in 25±1°C for 72 h. In the control plates, sterile PDA media discs 5 mm in diameter were placed on the plates as mentioned above. At the end of the incubation period, the top of each petri dish was replaced with the bottom of the petri dish inoculated with pathogen and sealed together with adhesive tape. A completely randomized experimental design was used with three replicates. Radial growth of the pathogens was recorded on the 5th day of incubation and L was calculated, as described above.

The influence of NaCl and CaCl₂ on the diameter growth was determined by growing the isolates in a PDA medium at 4 NaCl and CaCl₂ levels (50, 100, 150, 300 mEq), control medium was not amended with salts.

Statistical analysis: All statistical analyses were analyzed by the software of statistics (STATBOX 6.0.4 grammersoft). The data was analyzed by two-way factorial. Comparison of means and interactions was performed by Duncan's multiple range tests. Statistical significance was assessed at the level of p = 0.05 or p = 0.01.

RESULTS

Effect of non-volatile metabolites from *T. harzianum* on the radial growth of *B. cinerea*: In the absence of salt (Table 1), isolates of *B. cinerea* do not present the same profile of growth inhibition, the optimum percent for growth inhibition of this fungus was from 63.76-68.15 of F27 and TR46, respectively. In the dual culture experiment, *T. harzianum* had a marked significant inhibitory effect on the growth of isolates (Table 1). Growth inhibition decreased as follows: TR46 (68.15%)>B27 (66.8 %)>F27 (63.76%). Data in Table 1 indicate that, application of sodium salt caused a significant increase the growth inhibition at various concentrations tested compared with control except TR46 (p>0.05), growth inhibition was decreased for sodium concentrations of 50 and 100 ppm can be obtained from this isolate relative to the control.

Calcium chloride stimulates mycelial growth of *T. harzianum*. These observations indicate that the growth inhibition of the F27 and B27 isolates might increase (85.01, 70.17%), even at high salinity (150 ppm). However, higher concentrations of calcium chloride (300 ppm) caused F27 and B27 to reduce the percentage of inhibition growth by 81.63 and 65.84%, respectively. Calcium chloride was reducing growth inhibition of the TR46 in the dual culture for all concentrations. The interaction between salt and concentration was significant (p<0.001).

Effect of volatile metabolites from *T. harzianum* on the radial growth of *B. cinere*: In the absence of salt, TR46 and F27 was most resistant and revealed lowest percent inhibition of mycelial growth as 52,23% and 53,13, respectively in combination with *T. harzianum*.

Table 1: Growth inhibition of three isolates by *Trichoderma harzianum* in dual culture after incubation at 25°C for 3 days

<i>Botrytis cinerea</i> isolates			
Treatments	F27	B27	TR46
NaCl			
0	63.76+4.34 ^c	66.80+4.32 ^{bc}	68.15+3.01 ^{abc}
50	74.39+0.83 ^b	72.56+1.44 ^{bc}	65.17+0.86 ^{bc}
100	71.01+5.22 ^b	66.80+3.81 ^{bc}	67.16+1.49 ^{abc}
150	82.12+2.21 ^a	71.12+2.9 ^{bc}	71.63+1.49 ^{ab}
300	80.18+3.01 ^a	78.83+0.83 ^a	73.13+0 ^a
CaCl₂			
50	76.81+2.90 ^a	73.06+0.83 ^b	67.16+2.58 ^{abc}
100	80.67+0.83 ^{bc}	73.54+0.83 ^b	67.16+2.58 ^{abc}
150	85.01+0.83 ^b	70.17+0.83 ^{bc}	65.66+2.98 ^{abc}
300	81.63+2.21 ^{bc}	65.84+0.83 ^c	61.19+5.38 ^c
Two-way factor analysis of variance			
Salt	***	NS	***
concentration	***	***	NS
Salt*concentration	NS	***	***

*, **, ***Significant effects at 0.05, 0.01 and 0.001, respectively, NS: Not significant

Table 2: *In vitro* growth inhibition of three isolates of *Botrytis cinerea* by volatile compounds of *T. harzianum* in PDA medium after incubation at 25°C for 3 days

<i>Botrytis cinerea</i> isolates			
Treatments	F27	B27	TR46
NaCl			
0	53,13+0.83 ^c	79,81+2,88 ^c	52,23+2,98 ^c
50	61,83+3.01 ^b	80,30+0,80 ^c	48,75+0,86 ^c
100	77,29+0.83 ^a	88,93+0,83 ^b	65,66+5,37 ^b
150	71,97+1.67 ^a	90,37+1,66 ^b	68,65+6,50 ^b
300	73,91+2.9 ^a	94,70+0,83 ^a	78,6+3,75 ^a
CaCl₂			
50	76,80+5.79 ^a	90,37+0,83 ^b	65,66+3,94 ^b
100	77,77+7.14 ^a	90,85+0,83 ^b	67,65+6,03 ^b
150	81,15+3.83 ^a	92,78+0,0 ^{ab}	62,68+6,50 ^b
300	81,64+4.65 ^a	90,25+0,83 ^b	63,18+3,75 ^b
Two-way factor analysis of variance			
Salt	***	***	***
Concentration	***	***	NS
Salt*concentration	*	***	***

****, **, ***Significant effects at 0.05, 0.01, 0.001, respectively, NS: Not significant

After 3 days of incubation, it is observed that volatile compounds from *Trichoderma harzianum* exhibited maximum growth inhibition by adding 300 ppm of NaCl to the culture medium when compare to the others salts (Fig. 1). The highest growth inhibition, 94,70, 78,6 and 73,91% was obtained in the high concentrations from isolates B27, TR46 and F27, respectively. The interaction between salt and concentration was significant for all salts isolates ($p < 0.05$) (Table 2). In the presence of low salt concentrations (50 and 100 ppm), the percentage of inhibition growth due to the interaction between fungi and *T. harzianum* was still very important with CaCl₂ more than NaCl. However, the antifungal activity of volatile metabolites produced by *T. harzianum* showed 90.037% maximum inhibition of mycelia growth with B27 in presence of higher concentrations of calcium chloride (300 ppm). On the other hand the effect of CaCl₂ on *T. harzianum* volatile metabolites action on the growth of B27 isolat presented in table 2 showed that the volatile metabolic substances of antagonistic present the same profile of the percentage inhibition of mycelia growth in the different concentrations tested.

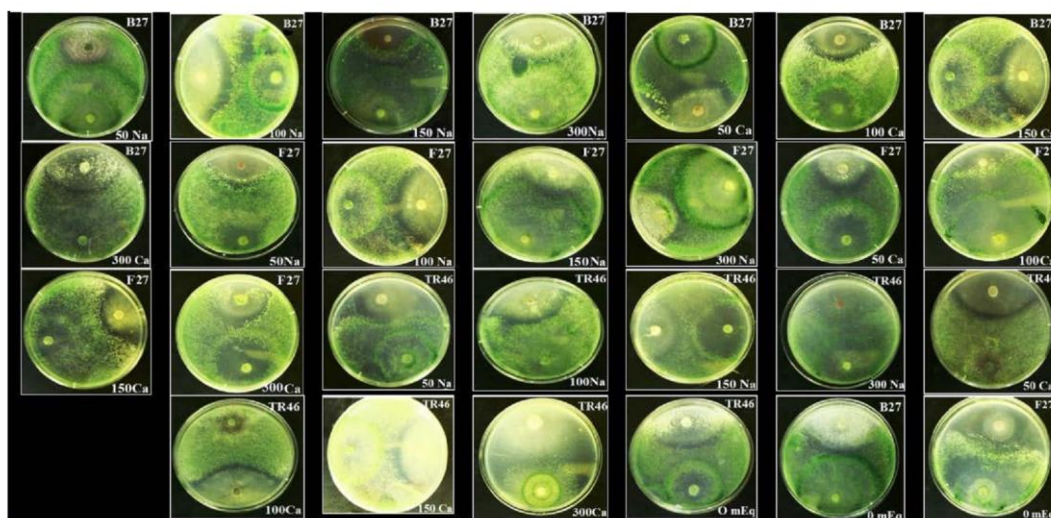


Fig. 1: Antagonistic effect of the isolates on *Botrytis cinerea* in dual culture assay at 25°C on potato dextrose agar media

DISCUSSION

In the present study, we tested effect of salinity on *in vitro* *Trichoderma harzianum* antagonism against *B. cinerea* for their production of volatile and non-volatile compounds.

In the absence of salt, The direct confrontation of *T. harzianum* against the different isolates of *B. cinerea* *in vitro* on PDA medium showed that *T. harzianum* inhibited the growth of pathogenic fungi at varying degrees.

The non-volatile secondary metabolites from *T. harzianum* were found more effective in suppressing the mycelial growth of all isolate when compared to volatile compounds except B27 isolate, growth inhibition was recorded by volatile compounds up to 79,81%.

The inhibition in radial growth of two interacting organisms in dual culture has been attributed to secretion of extracellular hydrolytic enzymes (Schirmböck *et al.*, 1994) by the production of antibiotics Howell (1998) or as well as some cell walls degrading enzymes such as chitinases, glucanases that break down polysaccharides, chitins and β -glucanase, thereby destroying cell wall integrity (Elad, 2000). *Trichoderma* species are known to produce a number of antibiotics such as Trichodermin, Trichodermol, Harzianum A and Harzianolide (Dennis and Webster, 1971; Kucuk and Kivanc, 2004).

Ajith and Lakshmidēvi (2010) examined the potential of *Trichoderma harzianum* which suppress the mycelia growth of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose on bell peppers. Doi and Mori (1994) reported volatile compounds produced from *Trichoderma* species were able to arrest and inhibit the hyphal growth of various plant pathogenic fungi. Amin *et al.* (2010) reported the effectiveness of volatiles produced by *T. harzianum* (Th-1) causing 53.63% inhibition of *Colletotrichum capsici*.

In the case of the evaluation the effect of NaCl and CaCl₂ on the *Trichoderma harzianum* against *B. cinerea*, salinity is most favorable to the increase growth of *Trichoderma harzianum*, especially at high concentrations. *T. harzianum* was able to tolerate the presence of salt in the medium culture even at high concentrations.

The analysis shows that CaCl_2 stimulate the development of the *Trichoderma harzianum* as compared to sodium chloride.

Our data indicate that volatile compounds from *Trichoderma* were found more effective in suppressing the mycelial growth of all fungal pathogens when compared to non-volatile metabolites.

In indirect confrontation, the effect of salinity on *T. harzianum* volatile compounds action is perceived in salt concentrations demonstrate that *T. harzianum* was able to colonize the space and to inhibit the mycelial growth of *Botrytis cinerea*. It was found that NaCl inhibited the growth of pathogen (94,70%) more than CaCl_2 (92,78%).

In the direct confrontation, the growth of *Botrytis cinerea* was intensely inhibited by non-volatile metabolites was stimulated by salt and moderately inhibited the pathogen growth. The percentage of growth inhibition varied between 65.17 and 82, 12% for NaCl and 61.19-85.01 in the presence of CaCl_2 .

The growth and multiplication of *T. harzianum* were stimulated by the addition of salt to the growth media, it showed also some good antagonist abilities at the high concentrations of salinity demonstrated by confrontation techniques. The strain activity of *T. harzianum* was able to tolerate the presence of salt in the medium culture even at high concentrations. Benyahya (1998) showed that increasing the salinity of the medium promotes the *in vitro* mycelia growth of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* agents of root rot of citrus with an optimum between -1.44 and -3.11 bars. The mycelium growth of *T. harzianum* developed in saline media between 2 and 6 g L⁻¹ of NaCl doses not differ from the control cultures without salt. Nevertheless, the capacity C declines significantly starting from 6 g L⁻¹ of NaCl but C value remain high (80%), showing an important capacity of the antagonist to cover the colony of the pathogen in presence of salt (Regragui and Lahlou, 2005).

Growth inhibition of the pathogens by the *Trichoderma* metabolites has been reported by several workers., such as *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Bipolaris sorokiniana* and *Colletotrichum lagenarium*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Yang *et al.*, 2006; Zivkovic *et al.*, 2010). The antagonistic activity of *Trichoderma* depends on multiple synergistic mechanisms (Nallathambi *et al.*, 2009; Howell, 2003). The various mechanisms include antibiosis, parasitism, inducing host-plant resistance, competition and secretion of chitinolytic enzymes, mycoparasitism and production of inhibitory compounds (Harman *et al.*, 2004). Also it is found that there is large variety of volatile secondary metabolites produced by *Trichoderma* such as ethylene, hydrogen cyanide, aldehydes and ketones which play an important role in controlling the plant pathogens (Vey *et al.*, 2001). Previous studies have demonstrated that before mycelia of fungi interact, *Trichoderma* sp. produces low quantities of extracellular exochitinases (Kullnig *et al.*, 2000; Brunner *et al.*, 2003). The diffusion of these enzymes dissolves cell fragments of host cells. These cell fragments in turn induce the production of further enzymes and trigger a cascade of physiological changes, stimulating rapid and directed growth of *Trichoderma* sp. (Zeilinger *et al.*, 1999).

Although, *Trichoderma* sp. species is widely used to control many plant pathogens but not much work has been done to give the effect of salinity on the antagonist effect of *Trichoderma* sp. Knowledge of soil salinity and its potential effects on the antagonist against diseases is essential for disease management strategies. Therefore, it is important that biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* under salinity conditions should be further evaluated *in vivo* against *Botrytis cinerea* causing grey mould disease.

REFERENCES

- Ajith, P.S. and N. Lakshmidhevi, 2010. Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. Nat. Sci., 8: 265-269.
- Allakhverdiev, S.I., A. Sakamoto, Y. Nishiyama, M. Inaba and N. Murata, 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. Plant Physiol., 123: 1047-1056.
- Amin, F., V.K. Razdan, F.A. Mohiddin, K.A. Bhat and P.A. Sheikh, 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro*. J. Phytol., 2: 34-37.
- Baker, R. and T.C. Paulitz, 1996. Theoretical Basis for Microbial Interactions Leading to Biological Control of Soil Borne Plant Pathogens. In: Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens, Hall, R. (Ed.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MN., pp: 50-79.
- Benyahya, H., 1998. Effect of Salinity on Root Rot of Citrus Caused by *Phytophthora Parasitica*. Cadi Ayyad University, Marrakesh, Morocco.
- Blaker, N.S. and J.D. MacDonald, 1986. The role of salinity in the development of phytophthora root rot of citrus. Phytopathology, 76: 970-975.
- Bouchibi, N., A.H.C. van Bruggen and J.D. MacDonald, 1990. Effect of ion concentration and sodium: Calcium ratio of a nutrient solution on *Phytophthora* root rot of tomato and zoospore motility and viability of *Phytophthora parasitica*. Phytopathology, 80: 1323-1329.
- Brunner, K., C.K. Peterbauer, R.L. Mach, M. Lorito, S. Zeilinger and C.P. Kubicek, 2003. The Nag1 *N*-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. Curr. Genet., 43: 289-295.
- Dennis, C. and J. Webster, 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., 57: 41-48.
- Doi, S. and M. Mori, 1994. Antifungal properties of metabolites produced by *Trichoderma* isolates from sawdust media of edible fungi against wood decay fungi. Mater. Organ., 28: 143-151.
- Edgington, L.V., K.L. Khew and G.L. Barron, 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology, 61: 42-44.
- Elad, Y., 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Protect., 19: 709-714.
- Eziashi, E.I., I.B. Omamor and E.E. Odigie, 2007. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. Afr. J. Biotechnol., 6: 388-392.
- Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito, 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol., 2: 43-56.
- Hermosa, R., A. Viterbo, I. Chet and E. Monte, 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 58: 17-25.
- Howell, C.R., 1998. The role of Antibiosis in Biocontrol. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, Harman G.E. and C.P. Kubieek (Eds.). Vol. 2, Taylor and Francis, London, pp: 173-184.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Dis., 87: 4-10.
- Jones, J.P., J.B. Jones, S.S. Woltz and J.W. Scott, 1993. Influence of soil pH, nitrogen source and transplant drenches on development of crown rot of tomato. Proc. Florida State Horticult. Soc., 106: 170-172.

- Joshi, B.B., R.P. Bhatt and D. Bahukhandi, 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. J. Environ. Biol., 31: 921-928.
- Kalogiannis, S., S.E. Tjamos, A. Stergiou, P.P. Antoniou, B.N. Ziogas and E.C. Tjamos, 2006. Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of tomato. Eur. J. Plant Pathol., 116: 69-76.
- Keshavarzi, M.H.B., M.S.O. Rafsanjani S.M. Moussavinik and A.P Lak, 2011. Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of Spinach (*Spinacia oleracea* L.). Ann. Biol. Res., 2: 490-497.
- Khan, F., M. Mazid, T.A. Khan, H.K. Patel and R. Roychowdhury, 2014. Plant derived pesticides in control of lepidopteran insects: Dictum and directions. Res. J. Biol., 2: 1-10.
- Koca, H., M. Bor, F. Ozdemir and I. Turkan, 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environ. Exp. Bot., 60: 344-351.
- Kucuk, C. and M. Kivanc, 2004. *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Turk. J. Biol., 28: 111-115.
- Kullnig, C., R.L. Mach, M. Lorito and C.P. Kubicek, 2000. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. Applied Environ. Microbiol., 66: 2232-2234.
- Kumar, D. and S.C. Dubey, 2001. Management of collar rot of pea by the integration of biological and chemical methods. Indian Phytopathol., 54: 62-66.
- Levignron, A., F. Lopez, G. Vansuyt, P. Berthomieu, P. Foucroy and F. Casse-Delbart, 1995. Les plantes face au stress salin. Cahiers Agric., 4: 263-273.
- Lorito, M., S.L. Woo, G.E. Harman and E. Monte, 2010. Translational research on *Trichoderma*: From omics to the field. Annu. Rev. Phytopathol., 48: 395-417.
- MacDonald, J.D., 1982. Effect of salinity stress on the development of *Phytophthora* root rot of Chrysanthemum. Phytopathology, 72: 214-219.
- Mamgain, A., R. Roychowdhury and J. Tah, 2013. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. Res. J. Biol., 1: 1-9.
- Moran-Diez, E., B. Rubio, S. Dominguez, R. Hermosa, E. Monte and C. Nicolas, 2012. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. J. Plant Physiol., 169: 614-620.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ., 25: 239-250.
- Nachmias, A., Z. Kaufman, L. Livescu, L. Tsrer, A. Meiri and P.D.S. Caligari, 1993. Effects of salinity and its interactions with disease incidence on potatoes grown in hot climates. Phytoparasitica, 21: 245-255.
- Nallathambi, P., C. Umamaheswari, B.B.L. Thakore and T.A. More, 2009. Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations. Crop Protect., 28: 225-232.
- O'Neill, T.M.O., D. Shtienberg and Y. Elad, 1997. Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. Plant Dis., 81: 36-40.
- Regragui, A. and H. Lahlou, 2005. Effect of salinity on *in vitro* *Trichoderma harzianum* antagonism against *Verticillium dahliae*. Pak. J. Biol. Sci., 8: 872-876.
- Sanogo, S., 2004. Response of chile pepper to *Phytophthora capsici* in relation to soil salinity. Plant Dis., 88: 205-209.

- Schirmbock, M., M. Lorito, Y.L. Wang, C.K. Hayes and I. Arisan-Atac *et al.*, 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied Environ. Microbiol.*, 60: 4364-4370.
- Shoresh, M., G.E. Harman and F. Mastouri, 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 48: 21-43.
- Shtienberg, D., Y. Elad, A. Niv, Y. Nitzani and B. Kirshner, 1998. Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 753-763.
- Swiecki, T.J. and J.D. MacDonald, 1988. Histology of chrysanthemum roots exposed to salinity stress and *Phytophthora cryptogea*. *Can. J. Bot.*, 66: 280-288.
- Turco, E., D. Naldini and A. Ragazzi, 2002. Disease incidence and vessel anatomy in cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* under salinity stress. *J. Plant Dis. Protect.*, 109: 15-24.
- Vey, A., R.E. Hoagland and T.M. Butt, 2001. Toxic Metabolites of Fungal Biocontrol Agents. In: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* but t, T.M., C. Jackson and N. Magan (Eds.). CAB International, Bristol, pp: 311-346.
- Whipps, J.M. and R.D. Lumsden, 2001. Commercial Use of Fungi as Plant Disease Biological Control Agents: Status and Prospects. In: *Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* but t, P.P.T., C. Jackson and N. Magan (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, pp: 9-22.
- Yang, D.M., Y. Bi, X.R. Chen, Y.H. Ge and J. Zhao, 2006. Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on muskmelons (*Cucumis melo* L. cv. Yindi). *Acta Horticulturae*, 712: 735-740.
- Zeilinger, S., C. Galhaup, K. Payer, S.L. Woo and R.L. Mach *et al.*, 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol.*, 26: 131-140.
- Zivkovic, S., S. Stojanovic, Z. Ivanovic, V. Gavrilovic, T. Popovic and J. Balaz, 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Arch. Biol. Sci.*, 62: 611-623.

Chapitre IX - Évaluation *in vivo* de l'effet de *Trichoderma harzianum* sur la protection de la tomate contre *Botrytis cinerea*

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons étudier *in vivo*, l'effet de *T. harzianum* sur la protection de la tomate contre *B. cinerea* dans le cas de deux variétés de tomate.

Matériels et méthodes

Choix des microorganismes antagonistes

L'antagoniste testé correspond au microorganisme bénéfique rapporté par la littérature comme étant l'auxiliaire le plus indiqué dans la lutte biologique contre *Botrytis cinerea*.

Préinoculation par le mélange de spores des deux champignons

Les plantes de tomate âgées de dix semaines sont inoculées avec le mélange de spores à 10^5 spores/ml préparée à partir de la souche de *Trichoderma harzianum* et de suspension de spores à 10^5 spores/ml issue de l'isolat pathogène de *Botrytis cinerea*. Des plantes témoins reçoivent uniquement de l'eau stérile.

Résultats

L'effet de *T.harzianum* sur la protection de la tomate contre *B. cinerea*

Croissance végétative

En réponse au traitement par addition de *Trichoderma harzianum*, la protection contre *Botrytis cinerea* s'est révélée significative sur la croissance végétative totale de **CX206** (Fig. 28). Dans ce cas, l'inhibition de ce paramètre par *Botrytis* est très faible par rapport au témoin grâce à la présence de *Trichoderma*.

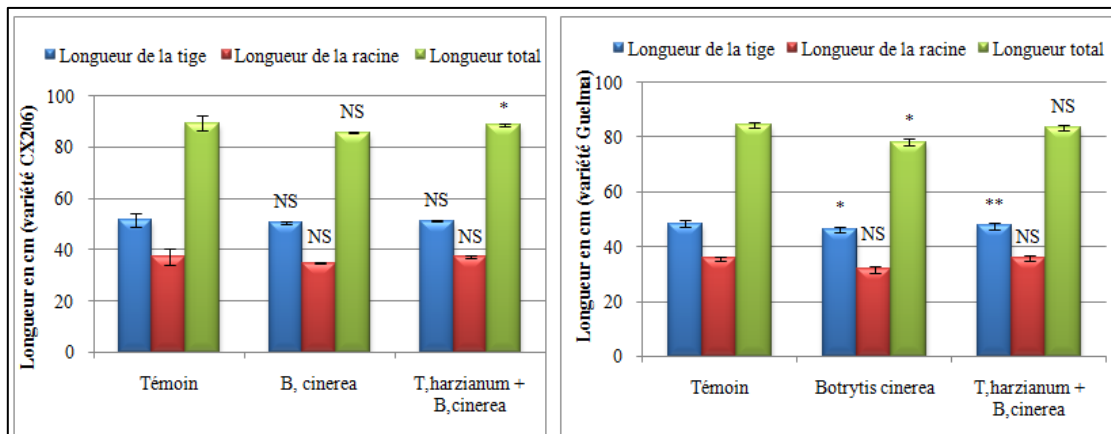


Figure 28- Influence de l'antagoniste *T. harzianum* vis-à-vis de *B. cinerea* sur la croissance végétative.

Pour le génotype **Guelma**, l'agent antagoniste a permis d'obtenir une taille de la partie aérienne majorée de 2,93% par rapport à la plante inoculée par *Botrytis*. Le traitement par l'agent antagoniste permis d'accroître la taille totale de la plante de 6,45% par rapport à l'effet de *Botrytis* seul. Néanmoins, les variations de ce paramètre sous l'effet de l'agent antagoniste ne sont pas significatives.

Biomasse végétative

Poids frais

L'ensemble des deux génotypes de la tomate, **CX206** et **Guelma**, réagit à l'infection par *B. cinerea*, en diminuant le poids frais total de la plante (Fig. 29). Cette diminution est de l'ordre de 18,42 % pour **CX206** et de 17,82% pour **Guelma**. La croissance de la biomasse racinaire des plantes inoculées avec les deux agents pathogène et antagoniste n'induit pas de changement significatif.

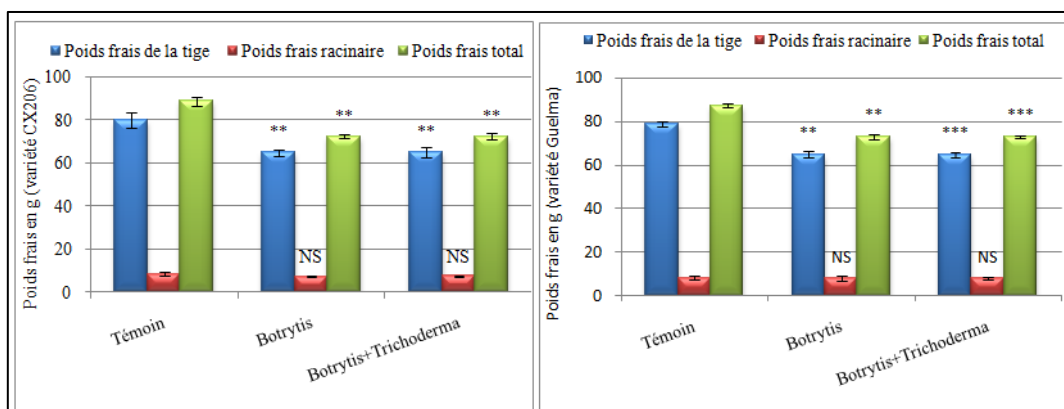


Figure 29-Influence de l'antagoniste *T. harzianum* vis-à-vis de *B. cinerea* sur la biomasse fraîche des tomates

Les essais ont montré que les plants de tomate inoculés avec *Trichoderma* et *Botrytis* associés, manifestent un déficit de la biomasse fraîche pour **Guelma** par rapport à l'effet de *Botrytis* seule. Par contre, on observe une légère augmentation de la biomasse aérienne par rapport aux plants inoculés par *Botrytis* seule. Dans ce cas, l'augmentation est de l'ordre de 0,22% pour **CX206**. Cette amélioration du poids frais n'atteint toutefois pas la valeur du témoin.

Poids sec

Les résultats du poids sec des plants de **CX206** (Fig. 30), indiquent que l'inoculation foliaire de *Botrytis cinerea*, n'induit aucun changement significatif sur les différents organes de la plante. Par contre, pour le génotype **Guelma**, une inhibition du poids sec total est observée de l'ordre de 13,06 % par rapport au témoin.

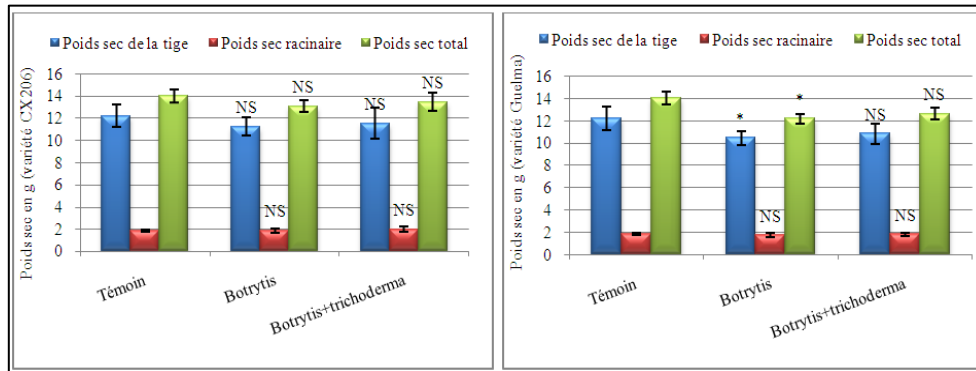


Figure 30- Influence de l'antagoniste *T. harzianum* vis-à-vis de *B. cinerea* sur la biomasse sèche des tomates.

L'inoculation des plants de tomate avec *Trichoderma* et *Botrytis* ne montrent pas également des variations significatives du poids sec sur l'ensemble des organes par rapport aux plants inoculés avec *Botrytis* seul.

Teneur en eau des plantes

Pour les deux génotypes inoculés par *Botrytis cinerea*, les résultats de la teneur en eau (Fig. 31), indiquent des variations non significatives pour l'ensemble des organes de la plante. La situation est similaire pour les deux génotypes inoculés par *Botrytis cinerea* et *Trichoderma harzianum* ($p > 0.05$).

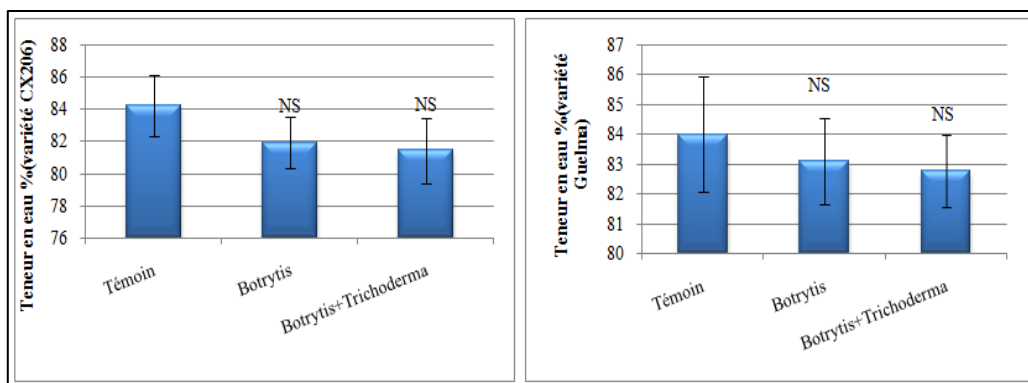


Figure 31- Influence de l'antagoniste *T. harzianum* vis-à-vis de *B. cinerea* sur la teneur en eau des tomates.

Impact de la salinité sur la bioprotection des tomates contre la pourriture grise par *Trichoderma harzianum*

Croissance végétative

À 150meq.l⁻¹ de NaCl, les plants du génotype **CX206** inoculés avec le mélange Botrytis-Trichoderma manifestent une croissance de la longueur totale de 86,53cm(Fig. 32), par rapport aux plants inoculés avec Botrytis seul qui comptent 85,80 cm. Cependant, la comparaison entre les plants inoculés par les deux isolats en absence de salinité enregistre une taille plus importante (88,77 cm) qu'en conditions de présence de salinité (86,53 cm). Autrement dit, la salinité du milieu (NaCl), favorisa le degré d'agressivité de Botrytis.

Pour le génotype **Guelma**, le traitement combiné Botrytis-Trichoderma-NaCl n'induit aucun changement significatif de la croissance des plants dans les différents organes et pour toutes les concentrations salines par rapport au témoin ($p>0,05$).

Le même effet est constaté pour l'impact de CaCl₂ sur la bioprotection de la tomate contre Botrytis et Trichoderma.

À 150meq.l⁻¹ de CaCl₂, la taille des plants **CX206** est plus faible que celle des plants développés en absence de sel.

À 100meq.l⁻¹ de CaCl₂, le traitement Botrytis-Trichoderma-CaCl₂ améliore significativement la taille de la partie aérienne du génotype **Guelma**.

À 150meq.l⁻¹ de CaCl₂, le traitement Botrytis-Trichoderma-CaCl₂, entraîne une réduction de la taille racinaire des plants du génotype **CX206** par rapport au témoinet aux plants soumis au traitement Botrytis-Trichoderma.

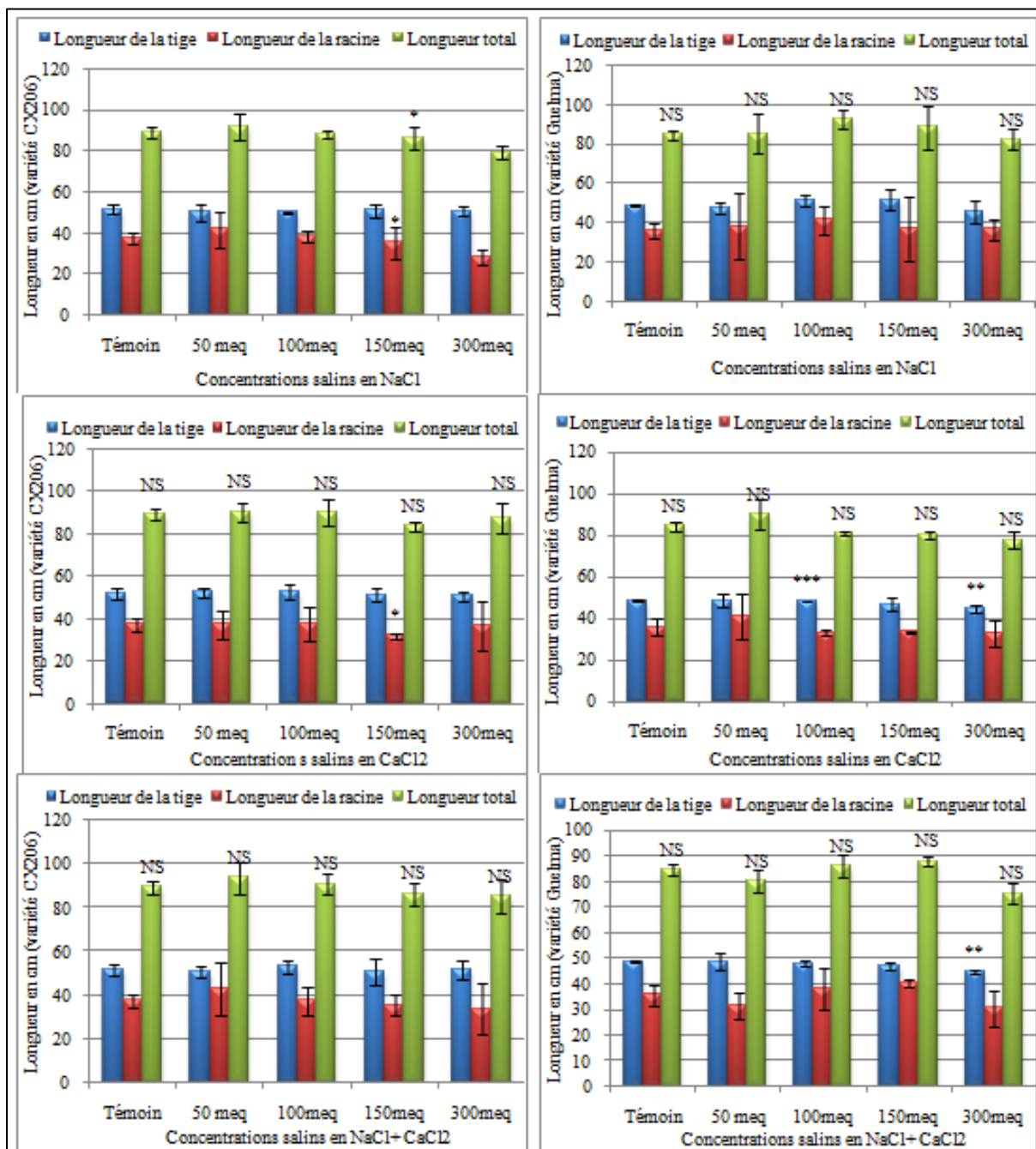


Figure 32-Effet de la salinité sur l'interaction *Trichoderma*-*Botrytis* sur la croissance végétative des tomates.

L'effet combiné du traitement *Botrytis*-*Trichoderma*- NaCl - CaCl_2 ne produit pas d'effets significatifs sur la croissance végétative de l'ensemble des organes et pour les deux génotypes. Néanmoins, à 300 meq.l^{-1} de $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$, le génotype Guelma enregistre une diminution de la taille de la partie aérienne par rapport aux conditions de non salinité.

Biomasse végétative

Poids frais

L'effet du traitement Botrytis-Trichoderma-NaCl, provoque une augmentation du poids frais de la partie aérienne des deux génotypes à 50 et 100 meq.l⁻¹ par rapport aux conditions de non salinité (Fig. 33). Dans ce cas, ces augmentations sont de l'ordre de 3,22 et 0,64 % respectivement pour les doses de 50 et 100 meq.l⁻¹ pour le génotype **CX206** et 6,5 et 1,72% pour le génotype **Guelma**.

Cette évolution est inversée pour la gamme de concentrations comprise entre 150 et 300 meq.l⁻¹. En effet dans ce cas, les diminutions du poids frais de la partie aérienne sont de l'ordre de 0,27 et 9,19% respectivement pour les concentrations de 150 et 300 meq.l⁻¹ pour le génotype **CX206** et 5,6 et 10,87% pour le génotype **Guelma**.

Toujours pour le traitement Botrytis-Trichoderma-NaCl, la biomasse de la partie racinaire, est nettement supérieur à celle observée en conditions de non salinité. En effet, la biomasse fraîche racinaire augmente de 41.55, 38.87, 29.94 et 38.86% respectivement pour les quatre concentrations salines prise dans l'ordre croissant pour le génotype **CX206**. En outre, cette augmentation est de 30.22, 25, 27.7, et 16.4 % pour le génotype **Guelma**.

Le traitement Botrytis-Trichoderma-CaCl₂, améliore significativement la biomasse fraîche de la partie aérienne pour le génotype **CX206**. En effet, à 50 et 100 meq.l⁻¹ de CaCl₂, les augmentations de la biomasse aérienne s'élèvent respectivement à 7,84 et 7,03 %.

Ce traitement réduit significativement la biomasse aérienne de la tomate pour le génotype **Guelma**. Dans ce cas, l'inhibition de ce paramètre est de 0.6 et 6.84% respectivement pour les concentrations de 150 et 300 meq.l⁻¹ par rapport aux conditions de non salinité.

Le même effet est constaté pour le traitement Botrytis-Trichoderma-CaCl₂ sur la biomasse fraîche racinaire du génotype **Guelma** à 100 meq.l⁻¹ de CaCl₂. Cette constatation est valable pour le génotype **CX206** mais aux concentrations de 50, 100 et 150 meq.l⁻¹ de CaCl₂. En effet, les pourcentages d'augmentation de ce paramètre sont de l'ordre de 9.84, 4.32 et 2.09% respectivement pour la gamme de salinité allant de 50 à 150 meq.l⁻¹ de CaCl₂. A contrario, ce même paramètre enregistre une diminution de 9,27 % à 300 meq.l⁻¹ de CaCl₂ par rapport aux conditions de non salinité.

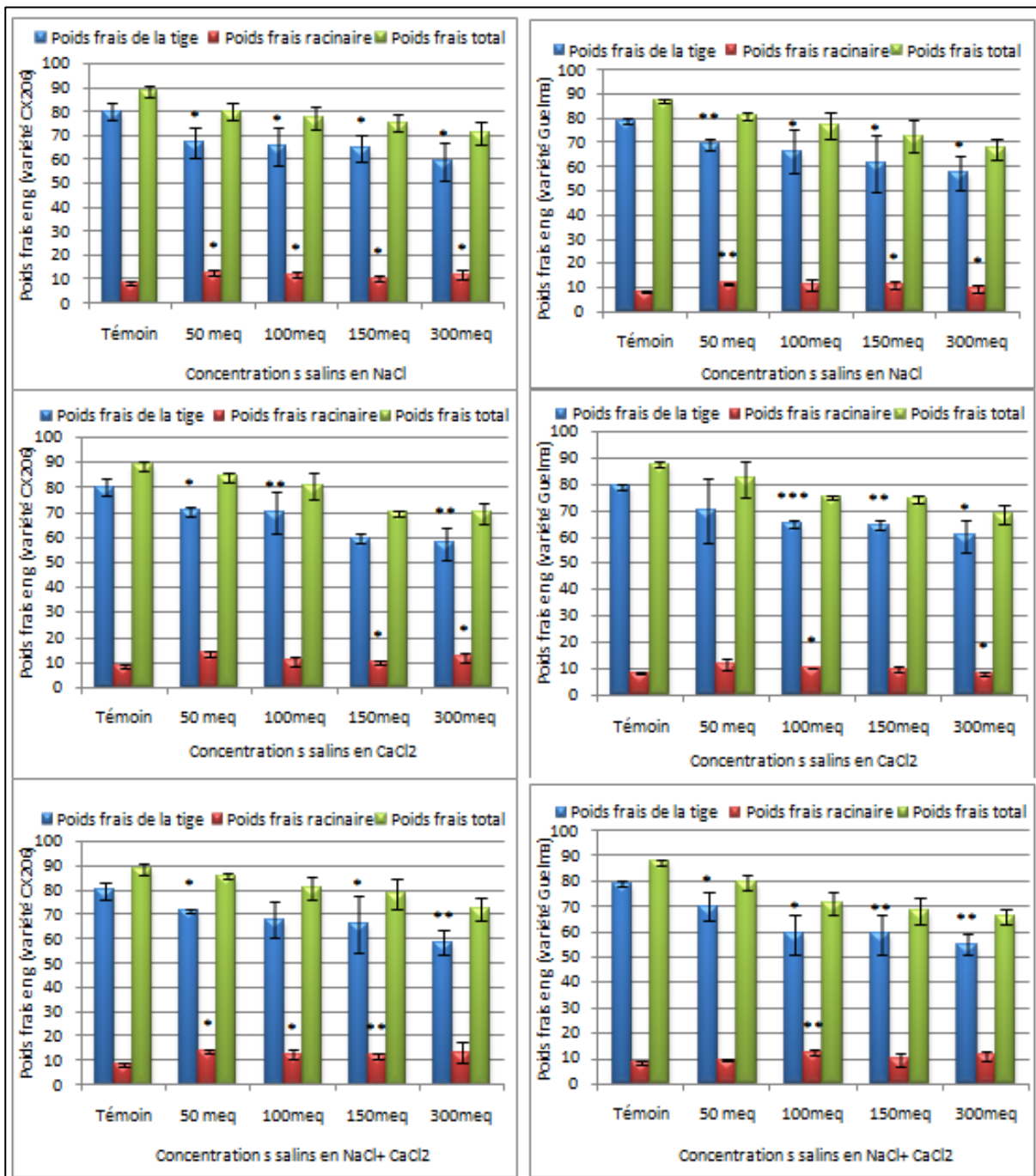


Figure 33- Effet de la salinité sur l'interaction Trichoderma-Botrytis sur la biomasse fraîche des tomates.

Dans le cas du traitement Botrytis-Trichoderma-NaCl-CaCl₂, les plantes du génotype **CX206**, montrent des augmentations de la biomasse souterraine variant de 46,39 et 38,91% pour la gamme de salinité allant de 50 à 150meq.l⁻¹ par rapport aux conditions de non salinité. Dans le cas du génotype **Guelma**, cette augmentation ne concerne que la concentration de 100meq.l⁻¹.

Sous les conditions de ce même traitement, le génotype de **Guelma** enregistre une augmentation de sa biomasse fraîche aérienne de plus de 7,63% à 50meq.l⁻¹ par rapport aux conditions de non salinité. Dans la gamme des concentrations allant de 100 à 300 meq.l⁻¹, cette

variété enregistre respectivement des diminutions de sa biomasse aérienne variant de 8,72 à 15,08%.

Enfin pour la biomasse totale, les variations liées au traitement Botrytis-Trichoderma-NaCl-CaCl₂, ne montrent pas des différences significatives par rapport aux conditions de non salinité.

Poids sec

L'effet Botrytis+Trichoderma+NaCl (Fig. 34), provoque une forte réduction de la biomasse sèche au fur et à mesure que la concentration en sel est élevée. Le pourcentage d'inhibition de la biomasse totale pour **CX206** atteint 20.5, 24.96, 26.44 et 38.33 % respectivement à 50, 100 ,150 et 300 meq.l⁻¹ de NaCl.

Le traitement de la variété Guelma par les deux champignons simultanément, entraîne une réduction de la biomasse des parties aériennes d'autant plus importante que la concentration en NaCl est élevée. Cette réduction est de 13.96, 28.76, 26.64 et 25.94% respectivement à 50, 100 ,150 et 300 meq.l⁻¹ par rapport à l'effet combiné Botrytis+Trichoderma sous conditions non salines. Le même effet est constaté pour la biomasse sèche racinaire à l'exception toutefois de la concentration 50 meq.l⁻¹ pour laquelle une augmentation de 13.1% est observée.

L'effet Botrytis+Trichoderma+CaCl₂ réduit significativement biomasse sèche aérienne pour les deux génotypes. Cette réduction est de 31.91 à 51.91% pour **CX206** et de 22.94 à 27.97% pour Guelma, respectivement à 50 et 300 meq.l⁻¹ par rapport aux conditions non salines.

Un effet similaire est constaté sur la biomasse sèche racinaire à l'exception des traitements 50 et 150 meq.l⁻¹ respectivement pour **Guelma** et **CX206**. Dans ce cas, la biomasse sèche racinaire augmente de 2.18 et 5.33 % respectivement pour les deux génotypes guelma et CX206 mais par rapport au témoin.

L'effet Botrytis+Trichoderma+NaCl+CaCl₂, provoque une réduction de la biomasse sèche aérienne. En effet pour **CX206**, pour les concentrations comprises entre 50 et 300 meq.l⁻¹, les pourcentages de réduction sont de 31.91, 27.82, 30.43 et 39.13 %. La même situation se présente pour le génotype **Guelma** à l'exception de la dose de 300 meq.l⁻¹ où l'inhibition est de 13.96, 23.86 et 25.99 % respectivement à 50, 100 et 150 meq.l⁻¹.

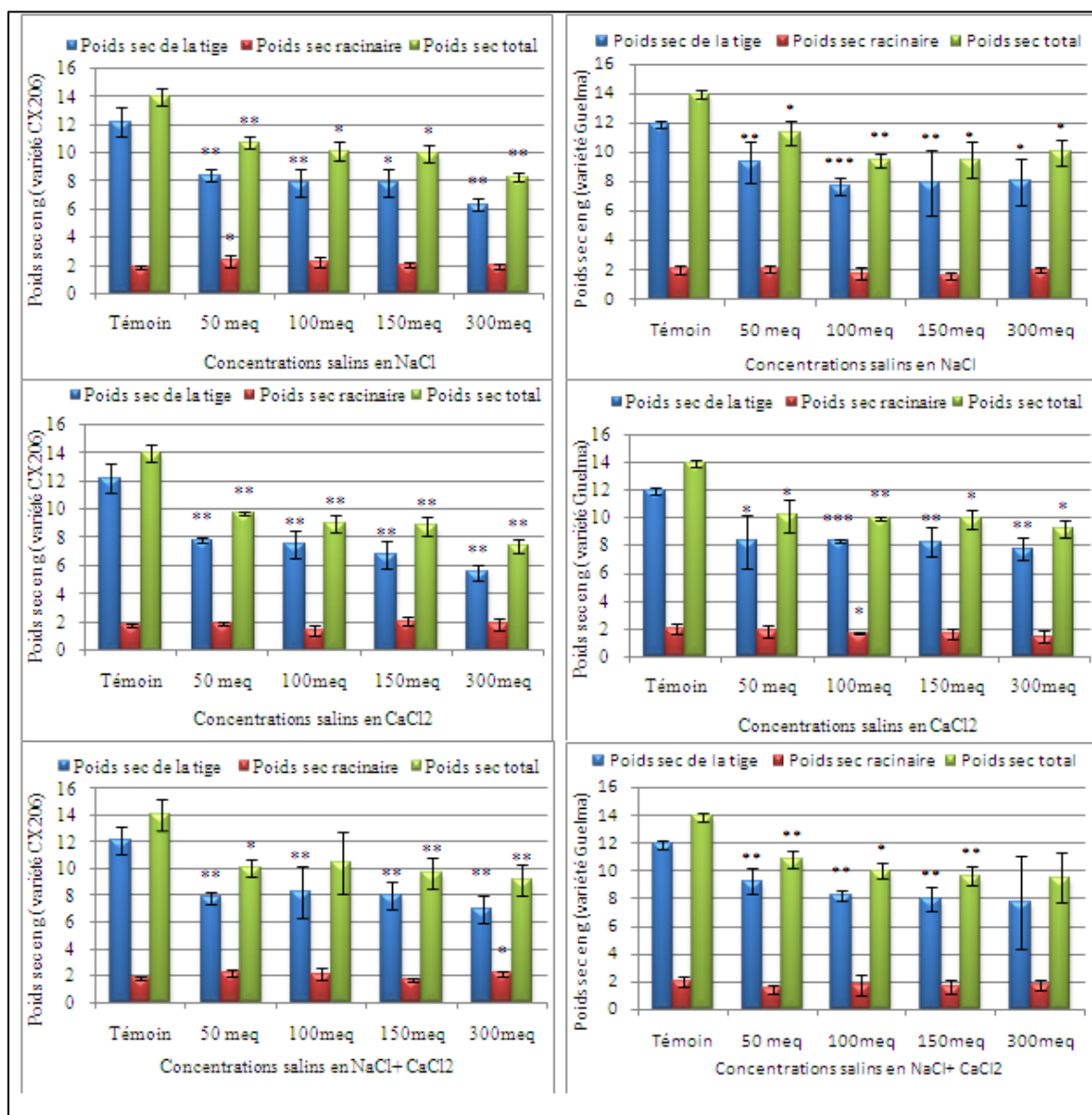


Figure 34- Effet de la salinité sur l'interaction Trichoderma-Botrytis sur la biomasse sèche des tomates.

L'effet Botrytis+Trichoderma+NaCl+CaCl₂, provoque une réduction de la biomasse sèche aérienne. En effet pour CX206, pour les concentrations comprises entre 50 et 300 meq.l⁻¹, les pourcentages de réduction sont de 31.91, 27.82, 30.43 et 39.13 %. La même situation se présente pour le génotype Guelma à l'exception de la dose de 300 meq.l⁻¹ où l'inhibition est de 13.96, 23.86 et 25.99 % respectivement à 50, 100 et 150 meq.l⁻¹.

Pour la biomasse racinaire sèche, l'effet Botrytis+Trichoderma+NaCl+CaCl₂ induit une stimulation significative de 13,71 et 9,72% pour CX206 respectivement à 50 et 100 meq.l⁻¹. A contrario, pour les concentrations de 150 et 300 meq.l⁻¹, la biomasse sèche racinaire diminue de 11,28 et 11,36 % par rapport au régime non salin. La réaction du génotype Guelma au même traitement, se manifeste par une réduction de ce paramètre de 14,52 et 7,26 % respectivement à 50

et 150 meq.l⁻¹. Néanmoins, à 100 meq.l⁻¹, une augmentation de 0,5 % est enregistrée par rapport au régime non salé.

Teneur en eau des plantes

L'effet Botrytis+NaCl +Trichoderma (Fig. 35 a et b), montre que Trichoderma n'affecte pas la teneur en eau de la culture pour les deux génotypes étudiés. Dans ce cas, les résultats sont significatifs.

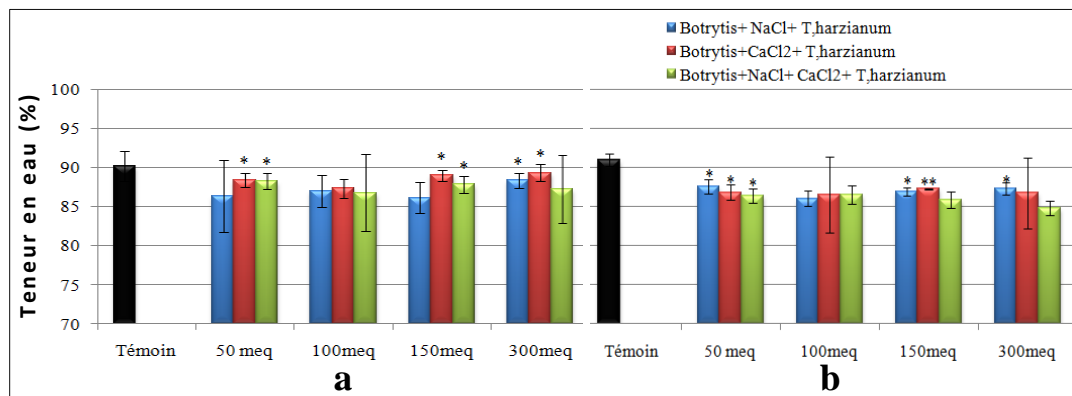


Figure 35- Effet de la salinité sur l'interaction Trichoderma-Botrytis mesuré sur la teneur en eau de la tomate, (a) : variété CX206 et (b) : variété Guelma.

L'effet Botrytis+CaCl₂+Trichoderma (Fig. 35 a), montre une augmentation de la teneur en eau pour CX206. Cette augmentation est de 89,39 % par rapport au traitement Botrytis+NaCl+Trichoderma. C'est la dose de 300 meq.l⁻¹ qui enregistre la plus grande valeur de ce paramètre. Par ailleurs, l'effet du traitement Botrytis+NaCl+CaCl₂+Trichoderma, entraîne un effet similaire à celui de Botrytis+NaCl+Trichoderma.

Discussion

La pourriture grise provoquée par *Botrytis cinerea* sur plus de 200 espèces végétales est souvent traitée par voie chimique susceptible d'entraîner des dégradations des ressources édaphiques et hydriques et à terme une pollution de l'écosystème (Rosslenbroich et Stuebler, 2000 ; Hubert et al., 2005). En plus, la littérature rapporte des cas d'apparition de souches pathogènes multi-résistantes aux produits fongicides utilisés. Ce cas de figure concerne particulièrement *Botrytis cinerea* (Yourman et al., 2003), d'où la nécessité de développer des alternatives biologiques pour une agriculture durable favorable à la protection de l'environnement.

De nombreuses études mettent en évidence l'efficacité de la lutte biologique contre Botrytis. Ces agents de lutte biologique, sont principalement représentés par des bactéries et des champignons non pathogènes, capables de confiner ou ralentir le développement de Botrytis.

L'efficacité de la protection dépend de plusieurs paramètres : les conditions climatiques, le mode d'application de l'antagoniste, sa rémanence, sa capacité écologique et son mécanisme d'action (Elad and Stewart, 2004). Une meilleure connaissance de ces paramètres, offre des perspectives nouvelles et écologiquement avantageuses pour la protection des cultures.

Trichoderma sp constitue l'agent de biocontrôle le plus utilisé contre les phytopathogènes. Il est capable d'entrer en compétition avec les phytopathogènes et les ravageurs sans pour autant affecté le fonctionnement normal la plante. En fonction de la situation dans laquelle une plante est affectée par un phytopathogène, il est important de faire recours à des souches d'antagonistes adaptés et performantes pour escompter obtenir une protection efficace.

Les résultats de la taille, de la biomasse et de la teneur en eau des parties aérienne et souterraine de la tomate, montrent que la souche de *Trichoderma harzianum* est capable de protéger cette culture contre *Botrytis cinerea*. En effet, cette protection est apparente sur la croissance en taille et en poids des plants traités par rapport aux témoins malades. Ceci est lié à l'action de *Trichoderma* qui semble exercer un effet stimulateur de la croissance des plants. Les résultats de Windham et al., (1986), qui concernent l'addition de *T. harzianum* aux substrats des cultures de tomate et de tabac montrent une amélioration du poids de la biomasse sèche aérienne et racinaire et concordent avec nos résultats. Ceci peut être en partie expliquer par le fait que *Trichoderma* soit connu comme productrice de substances antibiotiques et parasite à l'égard d'autres champignons (Chang et al. 1986). Des constatations similaires sont faites par Elad et al., (2004), sur des plants de tomate, laitue, poivron, le haricot et tabac. Il a été remarqué, que l'efficacité de la protection des plantes est assurée sur les parties supérieures bien que les agents antagonistes soient appliqués dans le sol (De Meyer et al., 1998 ; Elad et al., 2004). Par ailleurs, il est prouvé que la souche T-22 de *Trichoderma* est capable d'augmenter le développement des racines du maïs et d'autres cultures (Harman 2000 et 2001 ; Harman et al. 2004). Des recherches plus récentes, montrent que *Trichoderma* améliore la croissance du soja, protège la tomate, le piment et d'autres cucurbitacées contre les phytopathogènes (Verma 2007).

Les travaux de l'effet stimulateur des conditions salines sur le développement de *Botrytis* sont rares. En effet, les résultats de la présente étude, montrent que la bioprotection des tomates contre la pourriture grise en conditions salines est inhibée. Cependant, l'efficacité de l'action de *T. harzianum* s'est montrée variable contre *Botrytis cinerea*. Ce qui concorde avec ce que rapporte Regragui, 2005, sur l'efficacité de *Trichoderma* qui dépend des facteurs climatiques, de la salinité du sol et du couple hôte-pathogène.

Ainsi, à travers les résultats de la croissance végétative (en taille et en poids sec), la salinisation du milieu de culture entraîne une modification de l'action inhibitrice de *Trichoderma* à l'encontre de *Botrytis*. En effet, les pourcentages d'inhibition de la croissance végétative augmentent au fur et à mesure que la concentration saline augmente. L'effet inhibiteur de *Trichoderma* sur *Botrytis* initialement exacerbé en absence de salinité, manifeste un rôle de plus en plus limité par la concentration croissante de sel.

L'effet des facteurs climatiques est rapporté Blanca et *al.*, (2001), qui montrent que la suppression de la fusariose du pois-chiche par *Pseudomonas fluorescens* est observée exclusivement à 20° et 30°C, températures optimales du développement de la maladie. De même, Köhl&Molhoeck (2003), indiquent que le succès du contrôle biologique de *Botrytis cinerea* par l'antagoniste *Ulocladiumatrum* est conditionné par le potentiel hydrique du sol. L'effet compétitif de cet antagoniste avec *Botrytis* est maximal à -7 MPa et diminue avec l'augmentation du potentiel hydrique (Regragui 2005). Les enquêtes préliminaires de Kredics et *al.* (2000), prouvent que le stress salin a des effets néfastes importants sur la croissance, la sporulation et l'activité antagoniste de *T. harzianum* contre *Fusarium oxysporum*. Regragui et Lahlou (2005), montrent que l'efficacité des modes d'action antagonistes de *Trichoderma* contre *Verticillium* dépend des concentrations salines utilisées.

Les résultats du poids frais de la tomate, montrent dans le cas de notre travail, un effet stimulateur de la salinité sur *Trichoderma* à l'encontre de *Botrytis* aux concentrations seulement de 50 et 100 meq.l⁻¹ de NaCl. La différence de l'effet de l'antagoniste entre les résultats du poids sec et frais de la biomasse est rapportée par la littérature. En effet, parmi 29 souches de *Trichoderma* isolées en Méditerranée, seulement quelques unes expriment une sensibilité à la salinité. Les autres expriment soit une tolérance ou même une amélioration de la croissance à la salinité. Dans des essais *in vitro*, ces mêmes antagonistes révèlent une forte activité antibiotique envers les phytopathogènes en raison de la production de deux métabolites solubles et volatils non encore identifiés (Gal-Hemed et *al.*, 2011).

Les résultats de la teneur en eau de la tomate montrent que l'application d'un agent de lutte biologique à l'encontre de *Botrytis cinerea* dans des conditions salines peut conduire à une forte accumulation d'eau par rapport aux plants infectés sous l'effet unique de l'eau déminéralisée. Dans ce cas, une certaine modification physiologique des tomates est observée suite à l'application des mélanges de champignons. Ces effets peuvent être liés à la formation d'une molécule d'eau à l'aide de différents enzymes tels que la catalase peroxydomale, la peroxyrédoxine, la glutathion peroxydase ou l'ascorbate peroxydase.

Il a été rapporté que lors d'une interaction *B. cinerea*-tomate, la plante est capable d'exprimer de nombreuses réactions de défense, dont les plus connues sont la production de composés renforçant la paroi pectocellulosique, la synthèse de phytoalexines et l'accumulation de FAO. Ces molécules sont issues du métabolisme basal qui implique des processus cellulaires localisés au niveau des chloroplastes, peroxyosomes et mitochondries mais sont aussi produites lors de la réponse à différents stress (Apel & Hirt, 2004).

La FAO la plus étudiée est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 est capable d'induire l'expression de nombreux gènes de défense (Green et Fluhr, 1995 ; Wu et al., 1997 ; Aziz et al., 2004). Il est impliqué dans le renforcement des parois du végétal (Bradley et al., 1992) et est également susceptible d'inhiber directement la germination des spores de nombreux pathogènes fongiques (Low et Merida, 1996 ; Lamb et Dixon, 1997). Chez le tabac, il est montré que les FAO favorisent l'expansion des lésions causées par l'infection par *Botrytis* (Asai et Yoshioka, 2009). *Botrytis* est capable de produire des formes activées d'oxygène (FAO) telles que le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est produit lors de la germination des conidies et pendant l'infection (Choquer et al., 2007).

Chapitre X - Conséquences biochimiques de l'interaction salinité- *Botrytis cinerea* chez la tomate

Introduction

Dans la nature, les relations hôte-parasite-environnement sont très complexes. La réponse des plantes aux stress abiotique et biotique est la résultante de plusieurs processus physiologiques et métaboliques d'adaptation de la plante aux contraintes hydriques et nutritionnelles. Dans ce cas, la plante élabore des mécanismes de défense contre les mécanismes d'attaque de l'agent causal de la maladie. Dans ce chapitre, nous étudions les conséquences biochimiques liées à la salinité en relation avec l'infection par *Botrytis cinerea* chez la tomate. Le but est d'évaluer « *in vivo* » la réponse biochimique de la variété de tomate AXIOM F1 à l'action combinée du stress salin et de *Botrytis cinerea*. L'analyse porte sur la teneur relative en pigments chlorophylliens des feuilles de la plante, la teneur en sucres solubles totaux, le taux de protéines totales et la teneur en acides aminés libres totaux.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et fongique

Il s'agit d'une variété de tomate hybride F1 appelée AXIOM F1 disponible sur le marché.

La souche de l'agent pathogène *B. cinerea* utilisées dans cette étude a été échantillonnée en 2012 à partir de feuilles et tiges de pieds de tomate présentant des symptômes de pourriture grise. La souche provient de serres localisées dans le plateau de Mostaganem au nord-ouest d'Algérie. Cette souche était conservée sous forme de suspension sporale ($>10^7$ spores/ml) dans 20 % de glycérol.

Méthodes

Conduite culturale

Le semis est effectué en pépinière dans des plateaux alvéolaires remplis de tourbe sous serre à raison d'une graine par mini-motte à une profondeur de 1 cm. Les plants sont arrosés avec l'eau de robinet jusqu'au stade 3-4 feuilles où le repiquage est réalisé. Après un mois, au stade 3-4 feuilles, la transplantation est faite dans des pots en plastique de 30 x15 cm de dimensions. Les plantules sont repiquées soigneusement à raison d'une plantule par pot puis déposés sous serre. Avant l'application du stress salin avant l'apparition de la première fleur, l'irrigation est appliquée avec

une fréquence de 3 fois à l'aide de la solution de Hoagland (1938). La dose d'irrigation compte 30 % de la réserve utile (RU) du substrat durant le premier mois et 60% de la RU au second mois (Annexe I, p...).

Au 57^{ème} jour après le repiquage, le stress salin et l'inoculation par *Botrytis* sont appliqués à la plante. Le dispositif expérimental adopté est celui des blocs complets aléatoires de Fisher avec 3 répétitions. Chaque comprends les 4 traitements en plus du témoin : C_0 (témoin sans sel = solution de Hoagland), $C_1 = 50 \text{ meq.l}^{-1}$, $C_2 = 100 \text{ meq.l}^{-1}$, $C_3 = 150$, $C_4 = 300 \text{ meq.l}^{-1}$ de NaCl.

Méthodes d'analyses

Dosage des pigments chlorophylliens

Les teneurs en chlorophylles a et b et caroténoïdes sont déterminées selon le protocole de Lichtenthaler (1987).

Détermination de la teneur en acides aminés libres totaux

Pour le dosage des acides aminés libres, la méthode de Yemm et Cocking (1955) a été utilisée.

Détermination de la teneur des sucres solubles totaux

Les sucres solubles totaux sont dosés en milieu sulfurique avec l'antrone dont l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 625 nm (Cerning-Beroard, 1975).

Teneur en protéines totales

Les protéines solubles sont dosées selon la méthode de Bradford (1976).

Résultats

Les pigments chlorophylliens

Les résultats de la teneur en pigments chlorophylliens sont présentés (Fig. 36), sous la forme **a**, **b** et **ab** dans des conditions salines. Ils montrent, de manière générale, une augmentation de ce paramètre au fur et à mesure que la concentration en NaCl augmente par rapport au témoin. Dans ce cas, la dose de 300 meq.l^{-1} enregistre une diminution. En effet, la teneur en chlorophylle **a** indique une augmentation variant de 42,98 à 28,19 % respectivement pour les doses de 50 et 150 meq.l^{-1} . Pour ces mêmes concentrations de NaCl, les augmentations respectives sont de 47,03 et 20,36 % pour la chlorophylle **b** et 26,21 et 44,01 % pour la chlorophylle **ab**.

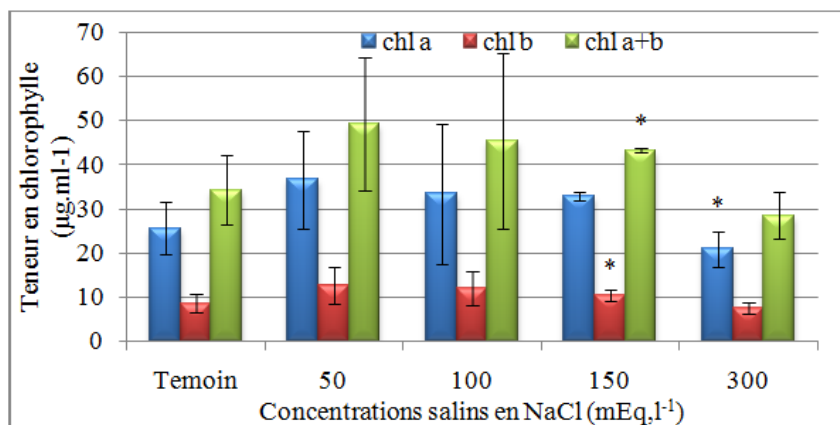


Figure 36- Effet de la salinité sur la teneur en chlorophylle de tomate

En absence de sel, les résultats de ce paramètre (Fig.37), montrent que les plantes inoculées par la suspension des spores de *Botrytis cinerea* réagissent par une augmentation significative pour les trois variantes **a**, **b** et **ab**. Le pourcentage d'augmentation est de 14.96, 18.10 et 22.26 % respectivement pour les chlorophylles **a**, **b** et **ab**.

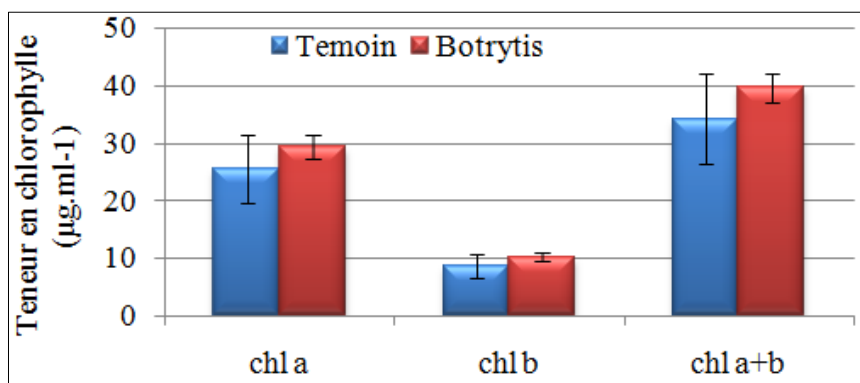


Figure 37- Effet de *B.cinerea* sur la chlorophylle de tomate.

L'effet combiné de la salinité et de *Botrytis* n'est perçu qu'à la concentration de 300 meq.l⁻¹ (Fig. 38).

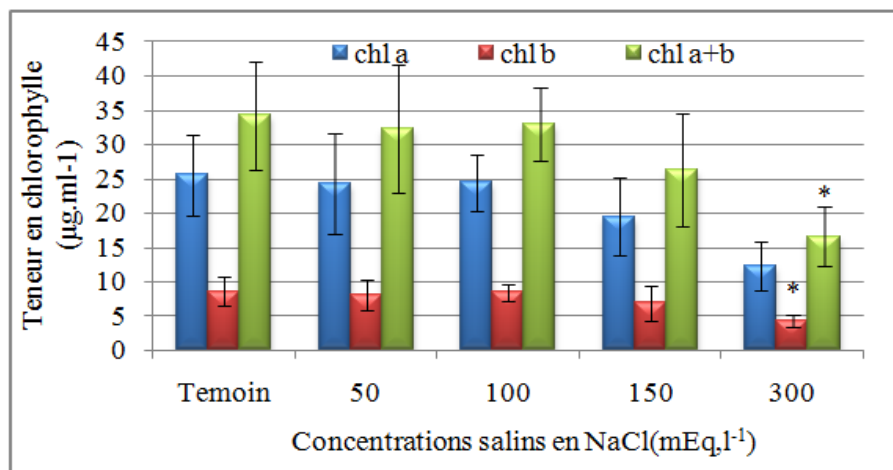


Figure 38- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en chlorophylle de tomate.

L'analyse de la variance (Tableau 6), montre que l'effet de l'infection par Botrytis (25,84 %) est plus important que celui de la salinité (9,78 %). Dans ce cas, l'effet interaction salinité-Botrytis n'est pas significatif ($p < 0,05$).

Tableau-6 parts des variations de la salinité et de l'infection par Botrytis sur les variations globales de la teneur en chlorophylle, b et ab

	dl	a		b		ab		
		SCE	%age de variation	SCE	%age de variation	SCE	%age de variation	
Effet salinité	4	176,07	9,78%	18,19	9,56%	306,36	9,83%	*
Effet Botrytis	1	465,32	25,84%	52,48	27,6%	830,34	26,65%	*
Interaction Salinité x Botrytis	4	72,63	4,03%	10,71	5,63%	138,12	4,43%	NS
résiduelle	20	1086,27	60,34%	108,7	57,18%	1839,74	59,06%	
SCE total	29	1800,24	100,00%	190,08	100,00%	3114,56	100,00%	

Les pigments caroténoïdes (xanthophylles et carotènes)

La teneur en pigments caroténoïdes (Fig. 39), semble insensible à l'effet de la salinité puisqu'elle enregistre des valeurs très proches de $8 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pour les quatre concentrations de NaCl (50, 100, 150 et 300 meq.l⁻¹).

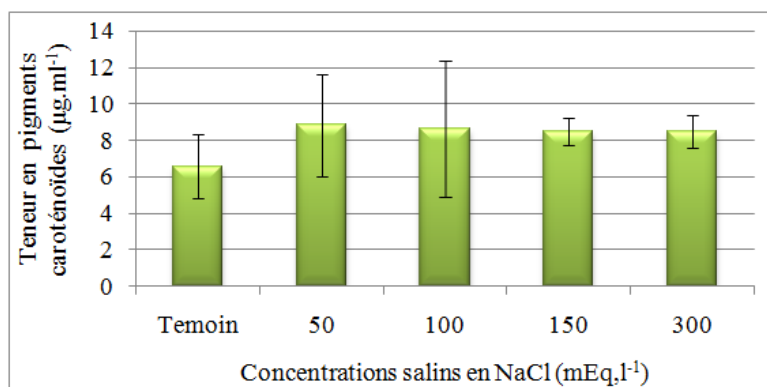


Figure 39- Effet de la salinité sur la teneur en pigments caroténoïdes de la tomate

L'effet de l'infection par *Botrytis* sur la teneur en caroténoïdes (Fig. 40), se manifeste par une augmentation de 2,43% par au témoin.

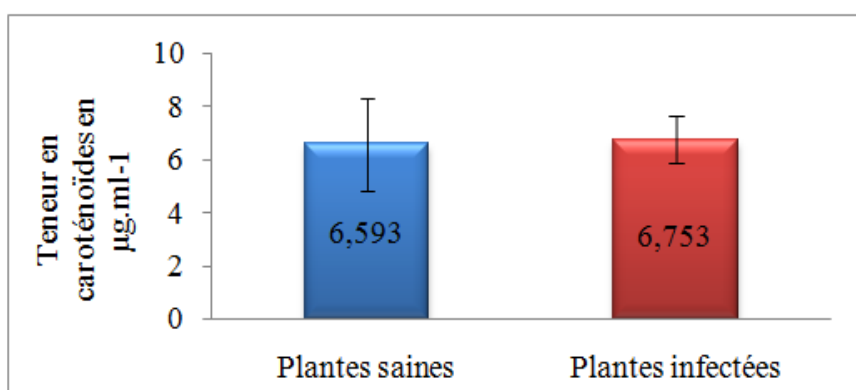


Figure 40- Effet de *B.cinerea* sur la teneur en pigments caroténoïdes de tomate.

L'effet combiné salinité x *Botrytis* (Fig. 41), montre que la salinité diminue la teneur en caroténoïdes des plants infectés par *Botrytis*. La dose de 50 meq.l⁻¹ enregistre une augmentation de ce paramètre par rapport au témoin (plant sain) contrairement aux autres doses qui indiquent une diminution.

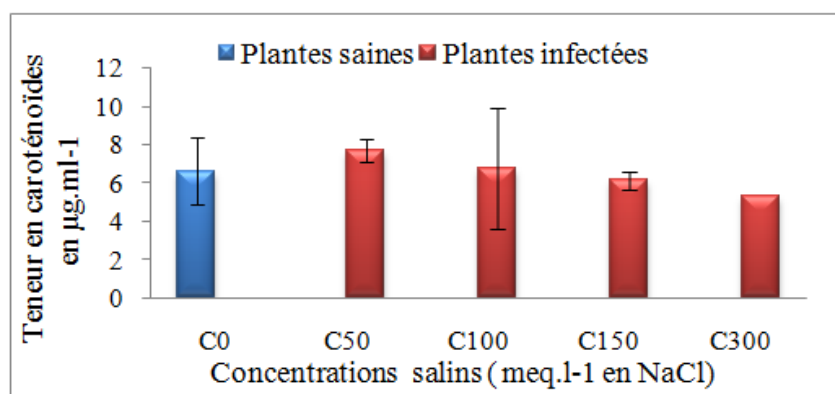


Figure 41- Effet de l'interaction salinité-*Botrytis* sur la teneur en pigments caroténoïdes de tomate

L'analyse statistique des résultats de la teneur en caroténoïdes (Tableau 7), indique une signification uniquement pour l'effet de l'infection par Botrytis qui enregistre une part d'effet de 19,68% par rapport aux variations globales.

Tableau7-Analyse de la variance des carrés moyens des résultats du contenu foliaire en pigments caroténoïdes (xanthophylles et carotènes)

Source de Variation	dl	SCE	%age de variation	
Effet salinité	4	2,45	2,25%	NS
Effet Botrytis	1	21,43	19,68%	*
Interaction Salinité x Botrytis	4	2,4	2,2%	NS
résiduelle	20	91,6	84,12%	
SCE total	29	108,88	100,00%	

Sucres solubles totaux

La teneur en sucres totaux (Fig. 42), diminue sous l'effet des doses croissantes de la salinité par rapport au témoin à l'exception de la dose de 50 meq.l⁻¹ qui indique une légère augmentation.

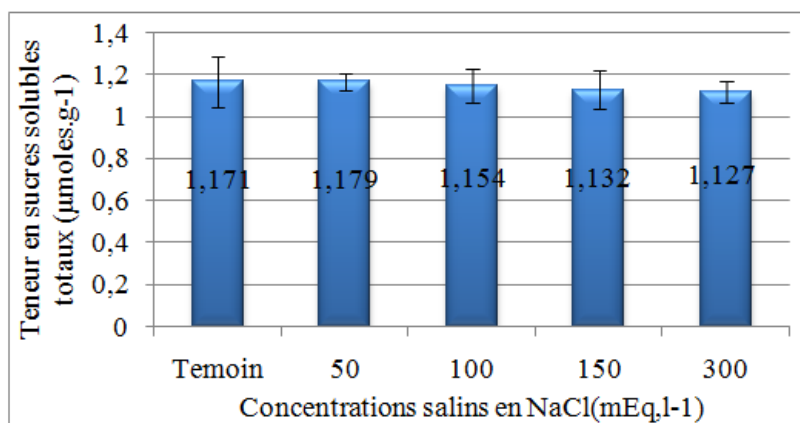


Figure 42- Effet de la salinité sur la teneur en sucres solubles totaux de tomate.

L'effet de Botrytis semble diminuer la teneur en sucres solubles totaux (Fig. 43).

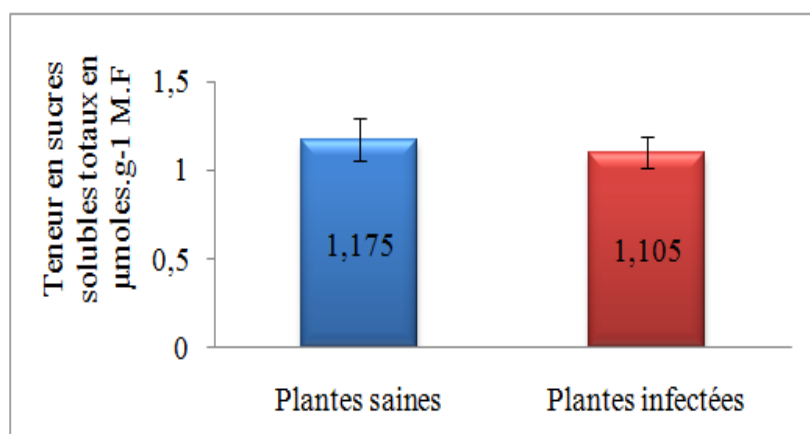


Figure 43- Effet de *B.cinerea* sur la teneur en en sucres solubles totaux de tomate.

De même l'effet combiné Botrytis-salinité (Fig. 44), montre des diminutions très faibles par rapport au témoin particulièrement pour les doses de 150 et 300 meq.l⁻¹.

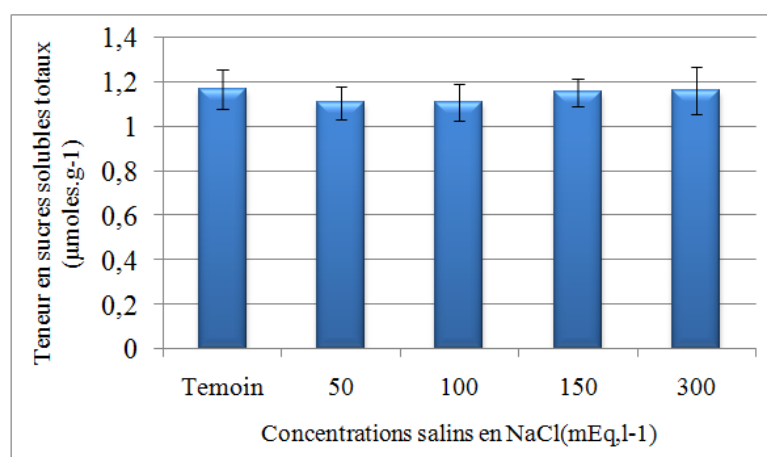


Figure 44- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en en sucres solubles totaux de tomate.

Néanmoins, l'analyse de la variance révèle des effets non significatifs pour les trois traitements : salinité, Botrytis et salinité-Botrytis (Tableau 8).

Tableau 8-Analyse de la variance des résultats de la teneur en sucres solubles totaux

Source de Variation	dl	SCE	%age de variation	
Effet salinité	4	0,001	0,65%	NS
Effet Botrytis	1	0,005	3,26%	NS
Interaction Salinité-Botrytis	4	0,003	1,96%	NS
résiduelle	20	0,144	94,11%	

Protéines totales

L'influence des doses croissantes de la salinité (Fig. 45), diminue la teneur en protéines totales de la plante de 0,82 % à 50 meq.l⁻¹ et 2,83 % à 100 meq.l⁻¹ par rapport au témoin. Ensuite, ce paramètre augmente de 0,35 % à 150 meq.l⁻¹ par rapport à 100 meq.l⁻¹. À 300 meq.l⁻¹, la teneur en protéine enregistre une augmentation de 0,38 % par rapport au témoin.

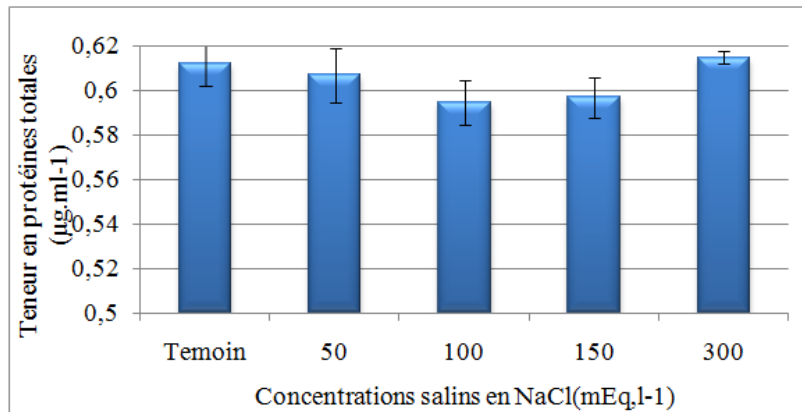


Figure 45- Effet de la salinité sur la teneur en protéines totales de tomate.

L'effet de l'infection par *Botrytis* sur la teneur en protéines totales (Fig. 46), montre une décroissance de 0,49 % par rapport au témoin. Ce qui est insignifiant.

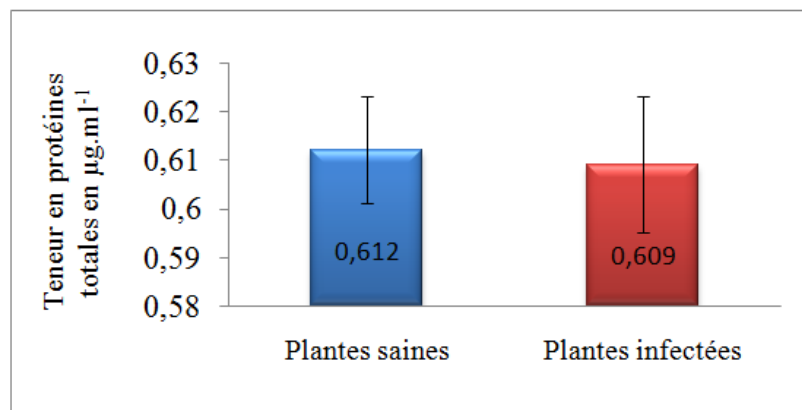


Figure 46- Effet de *B.cinerea* sur la teneur en protéines totales de tomate.

L'influence combinée de la salinité et de *Botrytis* (Fig. 47), diminue progressivement la teneur en protéines totales de la plante respectivement à 50, 100 et 150 meq.l⁻¹ par rapport au témoin. À 300 meq.l⁻¹, ce paramètre subit un accroissement de 2,13 % par rapport à celui de 150 meq.l⁻¹. Pour cette dernière dose saline, la teneur en protéine totale demeure inférieure au témoin.

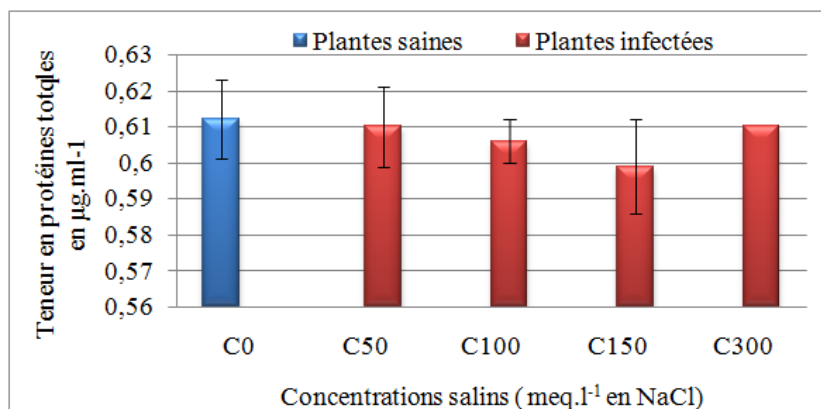


Figure 47- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en protéines totales de tomate.

L'analyse de la variance des données de la teneur en protines totales (Tableau 9), indique un effet significatif pour la salinité et non significatif pour l'infection par Botrytis et l'interation Botrytis-salinité.

Tableau 9- Analyse de la variance des carrés moyens des résultats du contenu foliaire en protéines totales

Source de Variation	dl	SCE	%age de variation	
Effet salinité	4	0,005	45,54%	*
Effet Botrytis	1	0,003	27,27%	NS
Interaction Salinité x Botrytis	4	0,001	9,09%	NS
résiduelle	20	0,002	18,18%	

Acides aminés totaux libres

L'évolution de la teneur en acides aminés totaux libres sous l'effet de NaCl (Fig. 48), montre une augmentation de 27,24 et 3,32 % respectivement à 50 et 300 méq.l⁻¹ par rapport au témoin. En revanche, elle indique une diminution de 2,99 et 7,31 % respectivement à 100 et 150 meq.l⁻¹.

L'analyse de la variance des résultats obtenus (Tableau 10) révèle que l'application de la salinité ne provoquent aucune action notable sur la teneur en acides aminés totaux libres (p=0,543).

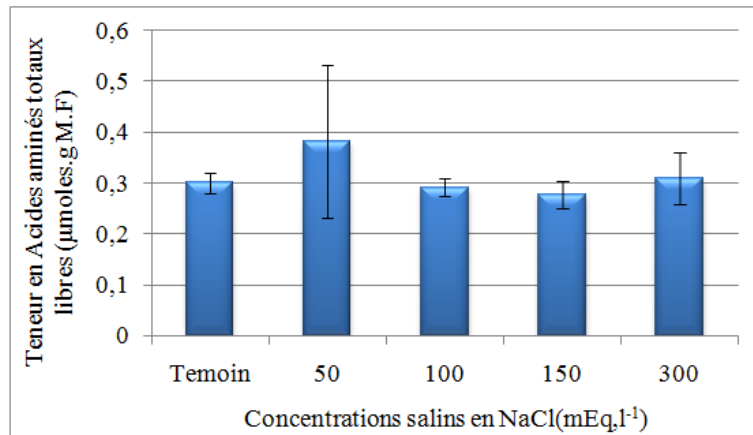


Figure 48- Effet de la salinité sur la teneur en acides aminés totaux libres de tomate.

L'effet de *Botrytis* sur la teneur en acides aminés totaux libres (Fig. 49), entraîne une augmentation de 11,76% par rapport au témoin.

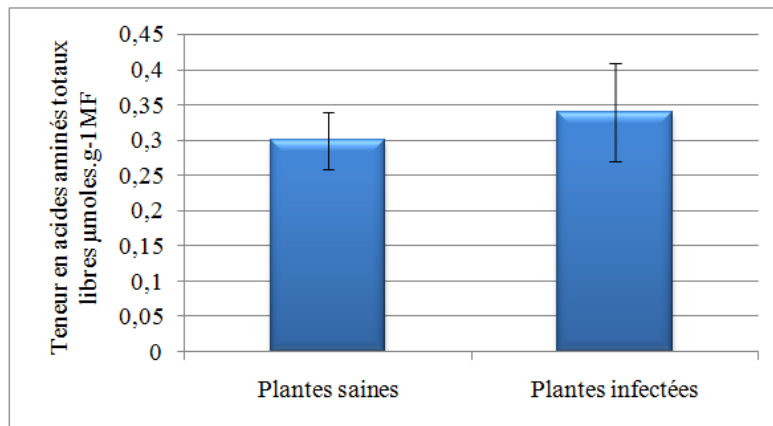


Figure 49- Effet de *B.cinerea* sur la teneur en acides aminés totaux libres de la tomate.

L'effet interaction salinité-*Botrytis* sur la teneur en acides aminés totaux libres (Fig. 50), diminue de 13.95, 21.26, 5.32 et 1 % respectivement pour les doses de 50, 100, 150 et 200 meq.l⁻¹.

L'analyse des variances des résultats de la teneur en acides aminés totaux libres (Tableau 10), montre que l'effet de *Botrytis* est significatif contrairement aux deux autres effets de la salinité et de l'interaction.

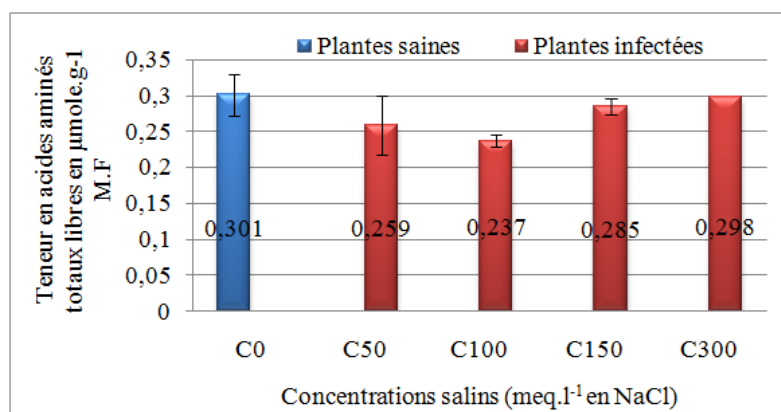


Figure 50- Effet de l'interaction salinité-Botrytis sur la teneur en acides aminés totaux libres de tomate

Tableau 10-Analyse de la variance des carrés moyens des résultats du contenu foliaire en acides aminés totaux libres

Source de Variation	DL	SCE	% de variation	
Effet salinité	4	0,003	2,97%	NS
Effet Botrytis	1	0,016	15,84%	*
Interaction Salinité x Botrytis	4	0,004	3,96%	NS
résiduelle	20	0,078	77,22%	

Discussion

Les résultats obtenus dans ce chapitre, montrent que la variété AXIOM F1 réagit à la salinité par une augmentation des teneurs en pigments chlorophylliens (a, b et ab) par rapport au témoin. Ceci est en accord avec les observations de Terry et Waldrow (1984), qui dévoilent que pour des concentrations inférieures à 200 et 300 meq.l⁻¹ de NaCl, la photosynthèse par unité de surface foliaire n'est pas affectée. Raj et *al.*, (1993), rapportent des réactions de deux variétés de blé tendre différentes vis-à-vis de la salinité. L'une semble très sensible contrairement à l'autre d'apparence plus tolérante. La teneur total en chlorophylle de la variété tolérante augmente significativement suite au stress salin, avec une augmentation aussi bien de la chlorophylle (a) que la chlorophylle (b), alors que chez la variété sensible, il n'y a pas de variations significatives. L'apport de NaCl à 50 et 100 meq.l⁻¹ stimule respectivement la biosynthèse de la chlorophylle a et b d'une variété de Gombo (*Abelmoschus esculentus* L.) (Asma. A et *al* 2015).

Pour notre cas, la solution à 300 meq.l⁻¹ de NaCl provoque une diminution des teneurs en pigments chlorophylliens (a, b et ab) chez la variété AXIOM F1. Ce qui montre une certaine sensibilité des pigments chlorophylliens aux hautes valeurs du stress salin. Ces résultats confirment

ceux de Nieves et al (1991), qui montrent que la réduction de la teneur foliaire en chlorophylle a peut être liée à la forte concentration du chlore et /ou du sodium.

La diminution de la teneur en chlorophylle sous l'effet de la salinité est rapportée par de nombreux auteurs. Cela peut être attribué aux contraintes salines qui se manifestent par une diminution du CO₂ dans les chloroplastes et une décroissance de la conductance stomatique (Del Zoppo et al, 1999 ; Gama et al., 2007). Dans ce cas le Cl⁻, présent en grande quantité dans le milieu, entraîne une dégradation de la chlorophylle et l'apparition de chlorose à la périphérie des feuilles. Cette toxicité est différente de celle causée par le Na⁺ qui provoque une réduction des teneurs en K⁺ et Ca²⁺. Ce qui réduit l'activité photosynthétique via la diminution de la conductance stomatique.

Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en MDA foliaire, indicateur d'une dégradation oxydative des lipides membranaires, peut être expliquée par la dégradation lipidique qui elle-même entraîne une perturbation des membranes thylacoïdales et une perte de l'intégrité des chloroplastes suivie d'une diminution de l'activité photosynthétique (Benhassaine-Kesri et al, 2002). Une autre thèse rapportée par Zheng et al. (2009), explique l'augmentation du MDA par une réduction de l'activité des enzymes antioxydants notamment le SOD et le catalase. Cela entraîne une accumulation des ROS (espèces réactives à l'oxygène), telles que O₂⁻, H₂O₂ et OH au niveau des tissus de la plante en faveur de de l'oxydation des lipides membranaires.

Pour revenir aux résultats de la présente étude, l'infection par *Botrytis* des pigments chlorophylliens de type a, b et ab, semblent stimulés. Ceci exprime une certaine résistance de la tomate à l'infection. En effet, Ouhibi (2015), révèle que la quantité de chlorophylle rapportée à l'unité de surface foliaire augmente avec le temps dans les feuilles inoculées avec *Sclerotinia minor* mais reste stable dans celles inoculées avec *Botrytis cinerea*. Ce qui conforme l'augmentation ou la stabilisation de la teneur en chlorophylle dans notre cas.

La chlorophylle pourrait participer à la résistance en limitant le développement du champignon. Dans le cas *Botrytis cinerea*, se présente l'hypothèse de la présence de mécanismes de résistance aux toxines qu'elle produit.

Le taux de caroténoïdes de la plante a subi une forte stimulation sous l'effet de la salinité. Il est important de rapeler que les caroténoïdes, en tant que métabolites secondaires assurent des fonctions variées et en particulier le rôle antioxydant (De Pascale et al, 2001). L'implication des caroténoïdes dans la réponse des cultures au stress salin est signalée dans plusieurs travaux (Charles et al, 2008 a). En effet, la synthèse de composés antioxydants tels que les vitamines C et E, des

flavonoïdes et des caroténoïdes induits par les EAO (espèces activées de l'oxygène), contribue à renforcer la protection cellulaire durant le stress (Larson, 1995). Il est donc mis en évidence que lors d'un stress oxydatif généré par les contraintes de salinité du milieu, l'augmentation de la production de ROS est accompagnée d'une stimulation de la production de nombreux antioxydants non enzymatiques tels que les caroténoïdes et les composés phénoliques (Allende et *al.*, 2003). Ouhibi (2015), relève une accumulation excessive des caroténoïdes dans les feuilles des plantes inoculées par *Botrytis* 24 heures après l'inoculation. Souvent, la détection de la présence de microbes par les plantes, incitent ces dernières à produire naturellement des ROS et des RNS (Reactive Nitrogen Species) dans les mitochondries, les chloroplastes et les peroxysomes (Grob et *al.*, 2013). En plus de leur activité antimicrobienne, les ROS sont impliqués aussi dans l'induction de l'expression de gènes d'autodéfense. Parmi les mécanismes d'autodéfense de la plante, on peut citer : hypersensibilité (HR), la résistance systémique acquise (SAR), la production de phytoalexines et le dépôt de callose (Agrios, 2004). Le terme phytoalexine regroupe l'ensemble des métabolites secondaires hétérogènes, de faible masse moléculaire qui ont des effets antimicrobiens sur une grande variété de pathogènes. Ils sont de ce fait, considérés comme des marqueurs moléculaires de résistance à la maladie (Ahuja et *al.*, 2012).

A travers les résultats de cette étude, au stade de préfloraison, le NaCl ne provoque pas de modifications notables sur la teneur en sucres solubles totaux dans les feuilles. Dans ce cas, la différence entre les plants sains et ceux infectés n'est pas significative.

Pour les protéines totales au sein des feuilles de la plante étudiée, nos résultats indiquent une diminution aux doses de 50, 100, 150 meq.l⁻¹ de NaCl. Néanmoins, la dose de 300 meq.l⁻¹ enregistre une augmentation de ce paramètre. En effet, Hamdia et *al.* (2004) et Fariba et Ali akbar. (2005), rapportent une augmentation de la teneur en protéines totales solubles dans les tiges et dans les feuilles pour la variété d'Isfahani de tomate contrairement à celle de Shirazy suite à l'accroissement de la salinité du milieu. Pour la variété *Datura stramonium*, la concentration des protéines totales solubles décroît avec l'augmentation des concentrations salines (Ali, 1991). Les résultats rapportés par Abdel Haleem (2007), sur *Vignaradiata L.*, variété «Wilczek», montrent une décroissance significative de la teneur en protéines totales solubles sous des conditions de salinité du milieu. Dans les mêmes conditions, une accumulation des protéines totales solubles a été vérifiée chez *Nicotiana rustica* et *Anacardium occidentale* et *Sorghum bicolor* (Oliveira et *al.*, 2006).

La paroi des cellules racinaires possède une grande capacité d'échange cationique. Le premier effet de la présence de sels dans la solution du sol est soit une inhibition, soit une stimulation de

l'absorption des cations par les racines. Ceci est de nature à causer des changements importants du métabolisme de la plante (déficience en éléments : K^+ , Ca^{++} ...). Dans ce cas, la génération de ROS sous l'effet de la salinité, entraîne une peroxydation des lipides du plasmalemme. Il en découle une fuite sévère suivie d'une destruction de certaines protéines membranaires.

Les résultats obtenus dans le présent travail, montrent une stimulation de la production protéique aux fortes concentrations salines. Cet effet s'accorde avec les travaux d'Agastian *et al.*, (2000), qui notent que les teneurs en protéines chez les cultivars de mûrier augmentent pour les faibles doses de NaCl et diminuent aux fortes doses. Ashraf *et al.*, (1995), ont démontré que les teneurs en protéines foliaires demeurent inchangées selon qu'il s'agisse de variétés tolérantes ou sensibles de tournesol à la salinité. Plusieurs autres auteurs, s'accordent sur la diminution de la teneur en protéines solubles en réponse à la salinité. Les plantes présentent plusieurs mécanismes de défense résultant d'une multitude de changements biochimiques vis-à-vis de l'agent pathogène. Ces mécanismes incluent l'accumulation de métabolites de défense tels que les protéines PR, les peroxidases, les phenylalanines ammonialyases, les polyphenoloxidasés, les chalcone synthases et les phytoalexines (Ramamoorthy *et al.*, 2001). En effet, il a été démontré que la luzerne synthétise des phytoalexines de type medicarpines suite à son préinoculation par *Sinorhizobium* (Dakora *et al.*, 1993). Les protéines PR peuvent également être produites lors de la mise en place de mécanismes de défense en réponse aux stress abiotiques tels que les blessures, le froid, le sel ou les UV (Hammond-Kosack & Jones, 1996 ; Van Loon *et al.*, 2006). Ils jouent un rôle important dans la stabilité des protéines membranaires et dans l'ajustement osmotique (Hasegawa *et al.*, 2000, Svensson 2001, Ashraf *et al.*, Foolad, 2007).

La synthèse de ces différents métabolites PR est réalisée par l'action combinée d'une série de protéines de type SOS (saltoverly sensitive). Parmi les SOS, SOS1 se présente comme un antiport Na^+/H^+ localisé au niveau de la membrane plasmique. Il joue un rôle primordial dans l'exclusion du sodium vers le milieu extérieur (SHI *et al.* 2000 ; Zhu 2003 ; Mahajan *et al.* 2008). Le SOS2 et SOS3 assurent conjointement la régulation de l'activité de SOS1 mais également celle de l'antiport vacuolaire NHX1 (Liu *et al.* 2000 ; Zhu 2002). Les formes actives d'oxygène, telles que H_2O_2 , O_2^- et OH, sont produites au cours de processus cellulaires de façon plus accrue sous l'effet de stress abiotiques, notamment la salinité (Logan, 2005; Brosche *et al.* 2010). Elles sont accumulées en faibles quantités et peuvent servir de signal pour induire l'expression de gènes de réponse et de défense cellulaires (Parent *et al.* 2008).

Dans ce chapitre, nos résultats montrent que l'inoculation des plantes par *Botrytis* induit une accumulation des acides aminés libres totaux. Cette accumulation peut être liée à une optimisation

de l'expression des gènes impliqués dans les réponses de défense et plus particulièrement lors du contact plante-*Botrytis*. Ceci s'apparente à une activation plus rapide des systèmes de détoxification des protéines et leur dégradation sous l'effet des protéases sécrétées par le champignon. Clémentine (2014), montre que ce processus biochimique vise uniquement la production de nouvelles protéines fongiques. Les acides aminés issus de la dégradation des protéines sont métabolisés en glutamate et en ammonium via des réactions de transamination et de déamination (Buchanan-Wollaston, 1997 ; Masclaux et *al.*, 2001). En effet, les carbohydrates, protéines, acides aminés, lipides, lignines, tannins et pigments peuvent être dégradés en composés plus simples et très réactifs par des réactions enzymatiques microbiennes puis polymérisés et condensés pour former les composés aromatiques et aliphatiques que sont les substances humiques (Stevenson, 1985).

B. cinerea possède pas moins de 252 protéases réparties en 60 familles réunies en 7 classes. Il s'agit des protéases aspartiques, glutamiques, des protéases à cystéine, à sérine et à thréonine, ainsi que des métalloprotéases (Clémentine, 2014). Des travaux menés par Hathou et *al.*, (1997), montrent que les tomates infectées par des champignons pathogène, principalement *Alternaria* spp. ont un taux d'acides aminés aromatiques plus élevés par rapport aux fruits sains.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié les réponses biochimiques de la tomate sous les effets combinés de stress biotique et abiotique en l'occurrence la salinité et *Botrytis*. En effet, la réponse de la culture est exprimée à travers plusieurs paramètres : les pigments chlorophylliens, les protéines totales, les sucres solubles totaux et les acides aminés libres totaux.

La salinité et/ou *Botrytis* induit une augmentation des pigments chlorophylliens a, b et ab. Ces résultats suggèrent que *Botrytis* a eu un effet de stimulation du pouvoir de résistance systémique chez la tomate. Associée à la salinité, l'infection par *Botrytis* semble insignifiante. Il est important de noter que parmi les cinq paramètres biochimiques analysés, seule la teneur en pigments caroténoïdes enregistra une augmentation et sous l'effet de l'infection par *Botrytis*. Dans ce cas, l'effet de la salinité est non significatif.

En revanche, le sel semble diminuer l'activité des protéines totales des feuilles de la tomate. Dans cette situation, le pouvoir d'autodéfense de la culture vis-à-vis de *Botrytis* ne répond pas.

Les variations de la teneur en sucres solubles totaux sous les effets de la salinité et de *Botrytis* sont non significatives.

Les variations de la teneur en acides aminés seraient associées vraisemblablement à une dégradation des protéines intracellulaires produite par *Botrytis*. Ainsi, le pathogène aurait sécrété des protéases en mesure de dégrader in vivo les protéines PR en acides aminés identifiés dans les cellules hôte. Parallèlement, ce processus de dégradation des protéines PR n'a pas été affecté par les doses croissantes de la salinité du milieu.

Chapitre XI – Synthèse des discussions

Les cultures sont confrontées à de nombreuses contraintes qui affectent aussi bien le rendement que la qualité des fruits. Les stress abiotiques de sécheresse et de salinité qui caractérisent les régions arides et semi-arides sont des facteurs supplémentaires qui peuvent amplifier et/ou réduire les maladies fongiques par un effet direct sur la plante et/ou le pathogène (Ayres, 1984). La salinité est l'une des plus importantes contraintes environnementales qui limite la croissance et le développement des cultures (Munns et *al.*, 1995; Chougui et *al.*, 2004). Ces contraintes dépendent à la fois, du stade de développement de l'espèce, du génotype et de la durée de l'exposition aux stress.

La culture de tomate représente le groupe de légume le plus important du marché national. Elle est cultivée aussi bien dans les zones littorales que les régions du sud de l'Algérie (Adrar, Biskra, El Oued ..). En effet, cette culture est confrontée à des contraintes biotiques et abiotiques croissantes. La salinité se présente comme étant la contrainte la plus importante qui affecte aussi bien le rendement que le calibre des fruits. L'effet de la salinité peut également constituer un facteur d'amplification de la sensibilité des tomates aux maladies d'origine fongique principalement la fusariose (Standaert, 1978), la verticilliose (Afailal 1987, Besri, 1990) et la pourriture racinaire due à *Phytophthora parasitica* (Swiecki & Mac Donald, 1991).

Si les travaux sur la lutte chimique et biologique contre *Botrytis* sont relativement nombreux, ceux liés à l'interaction des effets de la salinité et de l'infection par *Botrytis* sont rares. C'est pourquoi, la présente étude se présente comme une contribution à l'étude des actions combinées de la salinité et du pathogène sur la croissance et le développement de la tomate. Dans ce sens, nous avons abordé en premier, les effets de la salinité sur la plante hôte et sur l'agent pathogène séparément. Par la suite, nous avons étudié les effets de l'interaction salinité-*Botrytis* sur les paramètres physiologiques et biochimiques de la plante.

L'étude *in vitro* d'une collection d'isolats de *B. cinerea* montre que l'augmentation de la salinité du milieu affecte la croissance mycélienne en fonction de la nature du sel mis en jeu. En effet, à de fortes concentrations en NaCl (300 meq.l⁻¹), l'inhibition de la croissance mycélienne demeure insuffisante à l'élimination de l'agent pathogène. Néanmoins, le CaCl₂ se démarque par une action inhibitrice de la croissance mycélienne qui se manifeste à 150 meq.l⁻¹ et devient maximum à 300 meq.l⁻¹. A cette dernière concentration, près de 70 % de l'effet du pathogène est éliminé (Boumaaza et *al.*, 2015^a).

Parallèlement à la croissance mycélienne, l'effet de NaCl entraîne un nombre cinq fois plus important de spores qu'en conditions non salines. Benyahya (1998), a montré que la croissance et la

production de sporanges chez *Phytophthora citrophthora* et *Phytophthora parasitica* sont exacerbées par la présence de NaCl dans le sol et dans les eaux d'irrigation.

Par ailleurs, l'augmentation de la salinité affecte la germination des conidies de *Botrytis*. Dans ce cas, l'inhibition par CaCl₂ semble plus importante que celle engendrée par NaCl. Dès lors, l'inhibition du pouvoir germinatif du pathogène varie de 66,67 à 81,71 % (50 à 300 meq.l⁻¹) et 57,34 à 77 % respectivement pour CaCl₂ et NaCl. Selon Cunningham et al., (1994), l'augmentation de la concentration de CaCl₂ (25-175 mM) provoque une diminution de la germination et de la croissance des conidies in vitro de *Botrytis cinerea* et de *Penicillium expansum*.

Les résultats jadis discutés concernent des essais réalisés in vitro. Il est important de les vérifier dans des conditions in vivo et voir si la salinité favorise la reproduction de l'agent pathogène. Pour cela, nous avons étudié l'effet de *Botrytis cinerea* sur le comportement de la plante hôte dans des conditions salines. Il est connu que la réponse des plantes aux stress abiotiques génère des processus complexes impliquant de nombreux changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires.

Sur le plan morphologique, les résultats révèlent un effet inhibiteur de la salinité sur la germination de la tomate se traduisant par une forte diminution du taux et de la vitesse de germination finale.

Par ailleurs, la présence de NaCl dans l'eau d'irrigation réduit significativement la croissance végétative de la plante proportionnellement à la concentration saline. Ceci concerne aussi bien le poids frais des parties aérienne et souterraine de la culture que leurs poids sec. Les observations de Babas (1985), sur les variétés Vémone et Carmello ainsi que celles d'Amor (1991) sur trois autres variétés de tomate collectées dans les régions présahariennes marocaines, montrent une baisse de la croissance sous l'effet de la salinité du milieu. D'autres travaux (Ashraf et Rasul, 2006), indiquent que la salinité réduit la biomasse fraîche et sèche de la plante ainsi que les protéines et les carbohydrates contenus dans la partie foliaire et la longueur des bourgeons et racines. Cette réduction concerne aussi le développement des cosses, le rendement de la semence et les composantes du rendement. Il a été également remarqué une réduction de la densité des stomates (Omami, 2005). La réduction de la croissance de l'appareil végétatif aérien exprime la capacité d'adaptation nécessaire à la survie des plantes exposées à un stress abiotique (Zhu, 2001).

À la lecture des résultats concernant l'effet des concentrations de CaCl₂, il apparaît évident que l'incorporation de fortes concentrations de sel n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance de tomate. Ces résultats obtenus ne correspondent pas à l'hypothèse qui suggère que le calcium supplémentaire améliore les effets négatifs du NaCl (Silva et al., 2003).

D'un point de vue physiologique, l'effet de la salinité du milieu sur la plante est essentiellement variable avec la concentration saline. Dans cette étude, nous avons constaté que l'effet du NaCl entraîne une diminution de la teneur en eau de la plante. Ces résultats sont confirmés par plusieurs travaux. En effet, le stress salin, induit des changements au niveau du statut hydrique de la plante (Asegawa et *al.*, 2010), réduit la teneur en eau relative des feuilles (Albouchi et *al.*, 2003), diminue la transpiration (Rengasamy, 2006) et l'absorption hydrique des racines (Snoussi et *al.*, 2004). Ces manifestations peuvent être également liées au phénomène d'ajustement osmotique, caractérisé par la diminution du potentiel hydrique. Il s'ensuit qu'une augmentation brutale de la salinité se traduit par une réduction immédiate de la croissance foliaire. Celle-ci est associée à une baisse de la turgescence, elle-même liée à la diminution du gradient du potentiel hydrique entre les tissus de la plante et la solution du sol.

Dans ce cas aussi, les résultats révèlent que l'influence de CaCl₂ sur la teneur en eau de la plante aux différentes concentrations indique le même effet que les traitements de NaCl.

D'un point de vue biochimique, la culture de tomate exprime une certaine résistance à un stress salin modéré de 50 à 150 meq.l⁻¹. Cette résistance est liée à l'augmentation des teneurs en pigments chlorophylliens. Il s'agit d'une adaptation de la plante au stress salin. Ces résultats rejoignent ceux de Sharaf et *al* (1990) sur la tomate et Dali et *al.* (1997) sur le piment qui ont indiqué qu'une salinité modérée augmente la quantité de chlorophylle totale.

Contrairement aux concentrations modérées, les fortes doses de NaCl (300 meq.l⁻¹) provoquent une diminution des pigments chlorophylliens qui se manifeste par une sensibilité de la plante au stress salin. La diminution de la teneur en chlorophylle comme conséquence de l'accroissement de la concentration saline du milieu est rapportée par Ranjbar et *al.*, (2000). Ceci peut être lié à la dégradation de la chlorophylle et/ou à la réduction du taux de sa synthèse.

Le stress salin diminue l'accumulation des protéines dans la partie foliaire de la plante particulièrement pour les concentrations modérées de 50 et 150 meq.l⁻¹ de NaCl. En effet, les résultats rapportés par Abdel Haleem (2007) sur une variété de vigne (Wilczek), montrent une décroissance significative de la teneur en protéines totales solubles sous stress salin. Cependant, aux fortes doses de NaCl (300 meq.l⁻¹), la concentration en protéines totales foliaires augmente. Ce qui concorde avec les travaux rapportés par Hamdia et *al* (2004). Selon cet auteur, l'accroissement de la salinité augmente la teneur en protéines totales solubles dans les tiges et les feuilles pour deux cultivars de tomate.

En ce qui concerne les facteurs morpho-physiologiques de la tomate, les influences respectives de la salinité et de Botrytis n'entraînent pas d'effet cumulatif sur l'influence de

l'interaction salinité-Botrytis pour les trois paramètres mesurés : la taille de la plante, sa biomasse et sa teneur en eau.

Dans un premier temps, discutons l'effet unique de Botrytis sur les trois paramètres considérés. Dans le cas de la taille aérienne de la plante, un déficit est observé pour la variété Guelma au moment où la variété CX206 ne subit pas de variations significatives. Ce qui permet d'affirmer que le degré d'infection par Botrytis dépend de la sensibilité de la variété de l'espèce affectée. Ce qui dégage une possible voie biologique de sélection variétale pour l'obtention de cultivar tolérant à Botrytis.

L'effet de Botrytis sur la biomasse fraîche et sèche entraîne une diminution de la biomasse fraîche et sèche pour les deux génotypes de tomate étudiés. Regragui (2005), trouve les mêmes résultats pour la tomate infecté par le *Verticillium*. Dans ce cas, la teneur en eau de la plante ne subit pas des changements significatifs sous l'effet de l'infection par Botrytis.

Sous l'effet combiné de la salinité et de *Botrytis cinerea*, il convient de remarquer que la plante réagit par :

- une faible croissance de la tige des plants de la variété CX206
- une réduction cumulée plus importante de la taille de la tige de la variété Guelma
- une diminution cumulée qui demeure sensiblement faible et qui s'accroît lentement
- une stimulation de la biomasse fraîche par rapport aux plants non infectés soumis à la même salinité mais sensiblement faible par rapport au témoin.
- une inhibition de la teneur en eau par rapport au témoin.

Il est important de rappeler que l'infection de la plante hôte par l'agent pathogène est soumise aux facteurs de l'environnement. Parmi ces facteurs, les plus importants sont : la température, l'humidité et l'insolation. Mais pour des conditions environnementales données, l'agent pathogène est capable de reconnaître la plante hôte grâce à certains facteurs qu'elle porte (Thordal-Christensen 2003), et ensuite de modifier son métabolisme pour fournir les conditions favorables à sa pathogénicité (Chang et al. 2004). En conséquence, la plante réagit par le biais d'une série de changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires en fonction de son espèce et de sa variété. Selon les variétés, cette réaction peut s'exprimer par un développement ou une régression de l'appareil foliaire (Beye&Lafay, 1985). Androusse (2006), a montré que la croissance racinaire des plantules est réduite en moyenne de plus de 50% par rapport au témoin sous l'effet de l'inoculation par *Pythium*.

Nous rappelons que la salinité affecte la biologie de l'agent pathogène et peut dans beaucoup de cas exacerber sa pathogénicité au point d'envahir les tissus de la plante. Cette approche est abordée dans notre cas *in vitro* et *in vivo*.

In vitro, nous avons remarqué que la salinité du milieu stimule le développement du pathogène (Boumaaza et al., 2015^a). En effet *in vivo*, Besri (1981^a), remarque une forte diminution de la résistance de plusieurs variétés de tomate aux races 1 et 2 de *Verticillium dahliae* sous l'influence d'une irrigation avec des eaux salines.

La colonisation des plantes par l'agent pathogène en présence de salinité est étudiée par plusieurs auteurs notamment : Mac Donald (1984) sur le couple *Phytophthora cryptogea*-*Chrysanthemum*, de Afailal (1987) sur le couple *Verticillium*-tomate et Benyahia (1998) sur le couple *Phytophthora parasitica*-agrumes. Ces auteurs montrent que l'augmentation de la salinité du milieu favorise une colonisation plus intense des plantes par l'agent pathogène. Dans ce cas, la salinité semble diminuer la tolérance des cultures pour un large éventail de champignons.

C'est pourquoi, malgré la sélection de variétés de tomate tolérantes à *Botrytis cinerea*, ce dernier continu à provoquer des dégâts considérables particulièrement en conditions de culture sous serre. En effet, l'infection de la plante par le pathogène est soumise à plusieurs facteurs liés soit à la plante hôte, soit au parasite lui-même (Notteghem et al., 1979), ou encore liés à l'interaction entre la plante, les nutriments et l'espèce pathogène. Cette interaction est très complexe et n'est pas complètement comprise à ce jour (Anderson, 2002). Dans ce cas, la qualité de l'eau d'irrigation joue un rôle non négligeable par rapport à cette interaction qu'il faut prendre en compte. En effet, suite aux irrigations successives, une accumulation de sels dans la solution du sol accroît la croissance du mycélium du parasite dans les tissus de la plante via la circulation de la sève.

Pour revenir à la sensibilité ou la tolérance de la tomate, il est important de noter qu'il existe une similitude entre les effets propres de la salinité, ceux propres de l'infection par *Botrytis* et ceux liés à l'interaction salinité-*Botrytis*. Néanmoins, pour certains paramètres étudiés, nous constatons des effets opposés tels que la biomasse sèche et la teneur en eau de la plante. Dans notre cas, la combinaison salinité-*Botrytis* se manifeste par une diminution de la biomasse sèche. Ceci est la conséquence au fait que le parasite recherche les conditions favorables à son alimentation à partir de la plante hôte (Yoder and Whalen, 1975). Les nutriments sont nécessaires à la germination des spores, au développement du mycélium et à la formation des appressoria (Li et al., 2004). Dans ce sens, Blakeman (1975), avait évoqué la nécessité de la présence à la fois de carbone et d'azote pour la germination des spores du champignon. En effet, pour survivre dans la plante, le pathogène développe des mécanismes qui lui permettent de surmonter ou d'inactiver les défenses préformées et dégrade la paroi (Göhre et Robatzek, 2008). La sécrétion d'enzymes de dégradation des polymères par l'agent pathogène (enzymes pectolytiques, cellulases, xylanases, protéases ...) lui permet de pénétrer la paroi de la plante hôte.

Les résultats du comportement biochimique de la tomate en réaction à l'effet unique de *Botrytis* montrent :

- une augmentation des pigments chlorophylliens totaux et des pigments caroténoïdes. Cette thèse déjà confirmée par Ouhibi (2015), montre que la chlorophylle est susceptible de contribuer à la résistance de la plante hôte contre *Botrytis* en limitant le développement de ce dernier. Par ailleurs, les caroténoïdes sont connus en tant que métabolites secondaires pouvant assurer des fonctions variées dans la plante dont particulièrement le rôle antioxydant (De Pascale et *al.*, 2001). L'hypothèse du déclenchement de mécanismes de résistance aux toxines produites par *Botrytis* n'est pas à écarter comme une autre manière d'expliquer la relation entre le taux de pigments chlorophylliens et caroténoïdaux et la résistance de la plante infectée. L'implication des pigments chlorophylliens et notamment des caroténoïdes dans les réponses aux stress a été signalée par plusieurs auteurs (Charles et *al.*, 2008^a et Larson, 1995).
- une modification de la teneur en acides aminés vraisemblablement associée à une action profonde sur la dégradation des protéines intracellulaires.

Toujours sur le plan biochimique, la combinaison salinité-*Botrytis* ne modifie pas la réaction de la plante comme on vient de voir avec les effets propres de la salinité et de *Botrytis*.

La lutte contre *B. cinerea* repose principalement sur l'utilisation de fongicides. Leur efficacité est variable selon le produit lui-même, son mode d'application, sa rémanence, sa fréquence d'apport et les stades de la plante durant lesquels il est apporté (Jorgensen et *al.*, 1999). Le contrôle chimique de la pourriture grise est une pratique relativement ancienne en Algérie. A l'état actuel, les fongicides utilisés dans le monde ne garantissent pas une efficacité totale contre *B. cinerea*. Souvent, l'utilisation de produits inadaptés aux conditions des zones arides et semi arides, caractérisés par la présence de sécheresse et de salinité, affecte profondément leur efficacité. Ce phénomène constitue en lui-même, une contrainte importante pour les programmes de lutte contre les pathogènes. A ce titre, intervient l'intérêt et la pertinence d'une ouverture sur d'autres méthodes alternatives à la lutte chimique contre ce champignon. L'utilisation de variétés résistantes associée à la lutte biologique, s'avère une alternative incontournable et permet d'étudier les interactions plantes/pathogènes avec une stratégie adaptée aux zones arides et semi arides.

Beaucoup de travaux rapportent une efficacité avérée de certains microorganismes pour inhiber le développement de *B. cinerea*. Cependant, l'essentiel de ces travaux sont effectués en conditions contrôlées au laboratoire (Jacobsen, 2006). C'est pourquoi, l'efficacité de ces

microorganismes n'est pas durable sur le terrain où les conditions de l'environnement sont beaucoup plus fluctuantes.

Parmi les microorganismes les plus-en vue à l'encontre de *Botrytis cinerea*, se trouve *Trichoderma harzianum* que nous avons étudié dans des conditions soumises au phénomène de salinisation. Bien que les travaux soient relativement rares sur *Trichoderma harzianum* en conditions arides et semi arides, il est connu que l'efficacité de ce dernier dans la protection des cultures reste fortement dépendante des facteurs de l'environnement (Harman et al., 1981; Blanca et al., 2001).

Les résultats montrent que la souche de *Trichoderma harzianum* est capable de protéger la tomate contre *B. cinerea*. En effet, la pulvérisation de cet antagoniste sur les feuilles de tomate se traduit par une réduction significative de leur infection. Ceci est observé sur la croissance des plants traités qui dans certains cas est supérieure au témoin malade.

Les résultats de la présente étude sont de même nature que ceux rapportés par Elad et al. (2004), qui montrent que *Trichoderma harzianum* induit une résistance contre *B. cinerea* chez la tomate, la laitue, le poivron, le haricot et le tabac. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par (Windham et al., 1986), qui montrent que la biomasse sèche des racines et des parties aériennes de tomate et de tabac est améliorée.

Il est prouvé que la souche T-22 de *Trichoderma* est capable d'augmenter le développement des racines chez le maïs et chez d'autres plantes (Harman et al. 2004). Des données récentes indiquent que l'action de *Trichoderma* améliore la croissance de la tomate et du piment et les protège contre les phytopathogènes (Verma, 2007). En effet, *T. harzianum* a été connu comme producteur de substances antibiotiques et parasite d'autres champignons qui cause la fonte des semis et la pourriture des racines (Chang et al. 1986). Le parasitisme de cette espèce, par exemple, est défini par la sécrétion d'un type d'enzyme dégradant les parois de *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* et *Pythium ultimum* (Viterbo et al., 2002).

En plus de son effet inhibiteur des phytopathogènes, *T. harzianum* établit une colonisation robuste et durable au niveau des surfaces racinaires et pénètre jusqu'à l'épiderme, ce qui améliore la croissance racinaire, la productivité, la résistance au stress abiotique et l'assimilation et l'utilisation des nutriments (Harman et al. 2004). La fixation de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs (cuivre, fer, phosphore, manganèse et le sodium) à partir de la solution du sol (Yedidia et al. 2001). Cette augmentation de l'absorption racinaire indique une amélioration du mécanisme actif d'absorption des éléments nutritifs.

Dans le cas de la présente étude, l'effet stimulateur de la salinité à l'encontre de *B. cinerea* est observé sur le poids frais relatif aux concentrations respectives de 50 et 100 meq.l⁻¹ de NaCl.

L'application d'un agent de lutte biologique à l'encontre de *Botrytis cinerea* dans des conditions salines peut conduire à une accumulation de teneur en eau des plants sains ayant été exposés uniquement à l'eau déminéralisée. Ces effets peuvent être liés à la formation d'une molécule d'eau par l'action de différents enzymes comme la catalase peroxisomiale, la peroxyrédoxine, la glutathion peroxydase ou par une ascorbate peroxydase.

Ainsi, l'addition de chlorure de sodium dans le milieu de culture a entraîné une modification de l'action inhibitrice de *T. harzianum*. Ainsi, le sel semble favoriser leur pouvoir antagoniste à l'encontre de *Botrytis cinerea*. Puisque les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* par des métabolites volatils ont été stimulés in vitro par des concentrations élevées de NaCl 94,70 et 90,85% pour CaCl₂ par rapport au témoin.

Regragui et Lahlou (2005), montrent que l'efficacité des modes d'action antagonistes de Trichoderma contre Verticillium dépend des concentrations salines utilisées. Ainsi, la compétition de l'antagonisme est légèrement affectée par la concentration saline de 6 g.l⁻¹.

En outre, les enquêtes préliminaires de Kredics et *al.* (2000) prouvent que le stress salin a des effets néfastes importants sur la croissance, la sporulation et l'activité antagoniste de *T. harzianum* contre *Fusarium oxysporum*.

Les présents résultats peuvent servir aux travaux ultérieurs destinés à élaborer des plans spécifiques de gestion des propriétés du sol et de la qualité de l'eau d'irrigation pour une meilleure production de la tomate et sa protection efficace contre la pourriture grise.

Conclusion générale

La production des cultures est souvent soumise à des attaques par plusieurs agents pathogènes provoquant des maladies qui affectent le développement et la croissance des plantes et se répercutent sur leurs rendements. La plupart de ces agents pathogènes développent des relations spécifiques avec les plantes hôtes en fonction des conditions environnementales. Dès lors, la compréhension des processus de contamination et d'installation de la pourriture grise sur les plantes hôtes en l'occurrence la tomate doit prendre en compte les trois composantes impliquées dans ces processus : l'agent pathogène, la plante hôte et les conditions du milieu. Dans les régions arides et semi arides, les conditions du milieu constituent le facteur le plus important étant donné ses répercussions sur l'interaction hôte-pathogène. Dans ces régions, le comportement de l'agent pathogène, *Botrytis cinerea*, s'avère extrêmement sensible aux effets de la salinité du sol.

Dans cette étude, nous avons abordé l'effet de la salinité sur la culture de tomate conduite sous serre et sur *Botrytis*. Dans ce cas, la tomate n'est pas seulement soumise aux effets isolés de la salinité et de *Botrytis* mais aussi à l'effet de leur combinaison qui à travers plusieurs paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques étudiés montra des différences.

Cette étude indique, en premier lieu, que le chlorure de sodium affecte la germination des graines de la tomate et son développement végétatif. Dans les zones arides et semi arides, le phénomène de salinisation est très souvent lié à la qualité de l'eau d'irrigation. En effet, cette dernière entraîne l'accumulation de sels dans la solution du sol qui par la suite sont transférés aux organes aériens de la plante par les racines.

La croissance mycélienne et la reproduction de *Botrytis* a lieu dans le sol où les sels sont accumulés. C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de la salinité sur le comportement de *B.cinerea* *in vitro*. Ce qui a permis de mettre en évidence une stimulation de la croissance mycélienne et de la reproduction de ce pathogène sous l'effet de la salinité.

Les résultats obtenus dans des conditions contrôlées d'étude de paramètres écophysologiques et biochimiques a permis de conclure que l'irrigation des plants de tomate avec des eaux en concentration croissante de NaCl favorise en conséquence le développement du pathogène. Par la suite, l'étude de l'interaction entre la salinité et *B.cinerea* a montré des perturbations liées au développement foliaire exprimées par des diminutions en taille et en biomasse. Ces perturbations pourraient être expliquées par une plus grande sensibilité de la plante à l'interaction qu'aux effets isolés.

Par ailleurs, l'étude de la lutte biologique contre la pourriture grise de la tomate à l'aide de *Trichoderma harzianum* semble être une alternative à l'emploi des fongicides. Cet antagoniste peut stimuler le pouvoir d'autodéfense des plantes, ce qui provoque une résistance de la plante contre les agents pathogènes.

Ainsi, les résultats de la présente étude confirment que *T. harzianum* exprime un pouvoir antagoniste *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de *B. cinerea*. De plus, cet isolat stimule les mécanismes de défenses de la plante par une induction locale et systémique. Les résultats montrent aussi que la taille et la biomasse des plants traités sont pour certains cassupérieures au plant malade.

Dans ce contexte, l'efficacité de l'agent de lutte biologique, *Trichoderma harzianum* peut être mise en évidence dans des conditions salines. Là, l'effet de stimulation engendré par la salinité à l'encontre de *B. cinerea* se manifeste, à des concentrations relativement faibles en NaCl, pour le poids frais et la teneur en eau des plants.

À la lumière des données expérimentales obtenues, il apparaît important d'étendre les résultats au terrain par des mesures qui permettent d'assurer un milieu favorable au développement des cultures. Ces mesures doivent prendre en compte non seulement l'étude, comme pratiquée habituellement, de la tolérance des variétés à la salinité mais également l'effet de cette dernière sur le développement des principales maladies des cultures

Perspectives

Une question qui se pose est de savoir si des isolats de *B. cinerea* ayant acquis un haut niveau de résistance à la salinité. Ils sont en outre capables de sporuler *in vitro* et donc de produire des descendants conidiens. Ce phénomène a par exemple été observé chez le champignon filamentaire; *P. infestans*, *Verticillium album atrum*, *fusarium sp.* Dans ce cas, la résistance à la salinité avait induit un fort coût adaptatif.

Les deux stress appliqués sur la culture de tomate se contredisent. Il est alors possible que les comportements écologiques, physiologiques et biochimiques de tomate envers la salinité ou *B. cinerea* diffèrent d'un isolat à l'autre et d'une variété à l'autre. Il serait donc intéressant de répéter les tests en fonction des concentrations salines et de collecter sur plusieurs isolats et de les comparer.

La salinité et *B. cinerea* ont le pouvoir d'inhiber un grand nombre de métabolismes. Nous pourrions tester d'autres molécules produits par la plante, comme par exemple, les hormones, les enzymes, les polyphénols et les nutriments. Ainsi, nous pourrions identifier les principales molécules de signalisation impliquée dans les voies de réponse permettrait donc de déterminer le

type de résistance (locale ou systémique). L'étude des réponses mises en place dans les autres organes (racines et tiges) permettrait de déterminer si les réponses de défense diffèrent suivant l'organe considéré.

L'utilisation répétée de fongicides peut induire une résistance de *Botrytis cinerea*. Le développement de biopesticides non polluants ne peut être réalisé que par une étude plus approfondie. De la même façon, l'état physiologique et les conditions de culture des plantes jouent un rôle important dans le bon déroulement des phénomènes de résistance induite. Il s'agira donc de déterminer l'effet de la salinité sur l'expression de la bio-protection des cultures contre la pourriture grise par des agents antagonistes.

Références bibliographiques

- Abdel Haleem.M; Mohamed A.,2007**-Physiological aspects of Mung bean plant in response of salt stress and gibberellic acid treatment. Research Journal Of Agriculture And Biological Science.3 (4):200-213.
- Abdelly C., 2006**- Caractérisation des halophytes pour le dessalement des sols salins et le traitement des eaux salines. Rapport d'activités 2007. Centre de biotechnologie à la technopole de Borj-Cedria, Tunisie, pp. 28- 31.
- Acevedo E Hsiao TC, Henderson DW.,1971**-Immediat and subsequent growth response of maize leaves to changes in water status. Plant physiology.48: 631-636.
- Acevedo E., 1993** Potential of ^{13}C discrimination as a selection in barley breeding. in stable isotopes in agriculture. Academic press USA.p399-417
- Adda A., Sahnoune M. Kaid-Harche M. and Merah O.,2005**-Impact of water deficit intensity on durum wheat seminal roots. C.R. Bilogies III. Plant biol. Path.328 : 918-927.
- Adel J et BADER J., 2002**-Studies of some traits related to salinity tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Proceeding of the International Symposium on optimum resources utilization in salt-affected Ecosystems in arid and semi-arid regions, Cairo, Egypt, p.102
- Afailal A.,1987**-Manifestation de la verticilliose sur les tomates sensibles et résistantes : effets de la salinité sur le développement des deux races de *T. (Kleb)* et sur la réaction des plantes à l'agent pathogène. Thèse de doctorat de 3ème cycle, Université Mohamed V, 127p
- Agastian P, Kingsley SJ & Vivekanandan M., 2000**-Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. Photosyn. 38: 287-290.
- Agrios, G.N.,1988**-Plant Pathology.3e éd.Academic Press, New-York.803 pp.
- Agrios, G.N.,2004**-Plant pathology (Elsevier Academic Press: Amsterdam; Boston).
- Agrios, G.N., 2005**-Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, USA UK.
- Ahuja, I., R. Kissen et A.M. Bones.,2012**-Phytoalexins in defense against pathogens. Trends Plant Sci. 17 : 73-90.
- Ajouz, S.,2009**-Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. PhD. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, France, 198 p.
- Alabouvette, C., P. Lemanceau et C. Steinberg.,1993**-Recent advances in the biological control of *Fusarium wilts*. Pestic. Sci. 37 : 365-373.

- Albouchi A., Bejaoui Z. & El Aouni M.H., 2003**-Influence of moderate or severe waters tress on the growth of *Casuarina glauca* Sieb. seedlings. *Sécheresse*, 14, 137-142.
- Ali, R.M., 1991**-Changes in chemical composition of fruits of salinized *Datura stramonium*. *Journal of Islamic Academy of Sci.*, 4(4): 289-292.
- Allakhverdiev. S.I., A.Sakamoto,Y.Nishiyama, M.Inaba, and N. Murata.,2000**-Ionic and osmotic effects of NaCl-induced in activation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp.,” *Plant Physiology*,vol.123,no.3,pp.1047–1056,.
- Allen R.D.,1995**-Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* pp 1049-1054.
- Allende A & Artes F.,2003**-UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processe ‘Lollo Rosso’ lettuce. *Food Res Int* .36: 739–746.
- Al-Rawahy S.A., Strochlein J.L., and Pessaraki M.1990**-Effect of salt on dry matter production and notrogen uptake by tomatoes. *J. Plant Nutr.* 13(5), 567-577.
- Amirjani MR.,2011**-Effect of Salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *Intern. J.Bot.* 7: 73-81p.
- Amjad, M. J. Akhtar, M. Anwar-ul-Haq, A. Yang, S. S. Akhtar and S.E. Jacobsen, 2014**-Integrating role of ethylene and ABA in tomato plants adaptationto salt stress,” *Scientia Horticulturae*, vol. 172, pp. 109-116,.
- Amokrane.M.S., 2004**-Etude de la variabilité de la germination sous stress salin chez quelques populations d’espèce de medicago.L, Thèse Ing Agro INA El Harrach.
- Amor, H., 1991**-Etude de la résistance à la salinité in vitro et in vivo chez *Lycopersicon esculentum* et quelques espèces sauvages de tomates. D.E.S de 3ème cycle, Université Mohammed V, 99p
- Amselem, J., C. A. Cuomo, J. A. L. van Kan, M. Viaud, E. P. Benito, A. Couloux, P. M. Coutinho, R. P. de Vries, P. S.,2011**-Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*.*Plos Genetics* 7 (8).
- Amtmann, A., et Leigh, R.,2010**-Ion homeostasis.Chap. 12. Dans *Abiotic stress adaptation in plants: Physiological, molecular and genomic foundation*. Sous la direction de A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert et Govindjee. p. 245–262.
- Anderson S., 2002**-The Relationship between nutrients and other elements to Plant diseases. *Diseases Management* pp. 26-32.
- Androusse A., 2006**-Contribution à l’étude de quelques Oomycètes du barrage Sidi Mohammed Ben Abdellah : Aspects mycologique et phytopathologique. Thèse de doctorat es Sciences Biologiques de Universite Mohammed V – Agdal. Faculte des sciences Rabat.184p.

- Anonyme 2006**-Conférence électronique sur la salinisation: Extension de la salinisation et
- Apel, K. and Hirt, H. (2004)** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology Vol. 55, pp. 373-399
- Apse, M.P and Blumwald E.,2007**-Na⁺ transport in plants.FEBSLett. 581(12) : 2247-2254.doi:10.1016/j.febslet.2007.04.014. MID:17459382.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., and Blumwald, E., 1999**-Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺-antiport in Arabidopsis. Science, 285(5431):1256–1258. doi:10.1126/science.285.5431.1256. PMID:10455050.
- Asai, S, & Yoshioka H., 2009**- Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. Molecular Plant-Microbe Interactions 22(6), 619–29.
- Ashraf M.,2008**- Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers.Biotechnol. Adv. 27(1) : 84–93. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.003. PMID:18950697.
- Ashraf, M and FatimaH., 1995**-Responses of some salt-tolerant and salt-sensitive lines of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to salt stress. Acta Physiol. Plant., 17: 61-70.
- Ashraf, M. et FooladM.R., 2007**- Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot., 59: 206-216.
- Asma. A., Yasmina B and Moulay B.,2015**- The impact of salinity on water and metabolic behavior of a variety of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). International Journal of Innovation and Applied Studies. 2028-9324 Vol. 12 No. 4 Sep. 2015, pp. 943-953
- Ayres PG. 1984.** The interaction between environmental stress, injury, and biotic disease physiology. Annual Review in Phytopathology 22: 53–75.
- Aziz I, Khan MA.,2001**-Effect of seawater on the growth, ion content and water potential of *Rhizophoramucronata* Lam. *Journal of Plant Research.* ;114(1115):369–373.
- Aziz, A., Heyraud, A. et Lambert, B.,2004**-Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. Planta 218 : 767-774.
- Babas, M., 1985**-Tolérance à la salinité de *Lycopersicon esculentum*. Comparaison de la réponse de 2 variétés de tomate « Carmello » et « Vémone » à NaCl. Mémoire de fin d'étude. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Rabat. 40p.
- Backman, P.A. et R. Rodriguez-Kabana.,1975**-A System for the growth delivery of biological control agents to the soil. Phytopathology 65 : 819-821.

- Bakker, P.A.H.M., Ran, L.X., Pieterse, C.M.J. et Van Loon, L.C.,2003**-Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. Canadian Journal of Plant Pathology 25 : 5-9.
- Barak, E. & Edgington, L.V.,1984**-Cross-resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, chlorothalonil, and related fungicides. Can. J. Pl. Path. 6, 318-320.
- Barkla, B.J., Zingarelli, L., Blumwald, E., and Smith, J.A.C., 1995**-Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol. 109(2): 549–546. PMID:12228611.
- Bartels, D., and Sunkar, R.,2005**-Drought and salt tolerance in plants.Crit. Rev. Plant Sci. 24(1) : 23–58. doi:10.1080/ 07352680590910410.
- Bekhouche H.,1992**-Etude de la germination de quelques lignées de pois chiche soumis à la salinité, croissance, anatomie des racines. Thèse D.E.S. Biol. Université d'Oran. 68 P.
- Bélangier, R.R. et C. Labbé. 1994.** Commercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. Plant Dis. 78 : 420-424.
- Belkhouja M, Biady., 2004** -La réponse des graines d'*Atriplex halimus* L. à la salinité au stade de la germination Edit sècheresse, Vol 15 n°4 pp 331 -335.
- Ben Salah I, H Ben Ahmed et E. Zid.,2008**- Croissance et nutrition minérale de la tomate cultivée (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sous stress salin. Revue des régions arides 21, (2): 550-558.
- Benhassaine-Kesri, G., F. Aid, C. Demandre, J.C. Kader et P. Mazliak., 2002**-Drought stress affects chloroplast lipid metabolism in rape (*Brassica napus*) leaves. Physiol Plantarum 115: 221-227.
- Bent, E.,2006**-Induced systemic resistance mediated by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Fungi (PGPF), In: Multigenic and induced systemic resistance in plants. Tuzun, S. ,Bent, E. (eds), pp. 225-258, Springer.New-York
- Benyahya H., 1998**-Effet de la salinité sur la pourriture racinaire des agrumes due au *Phytophthora parasitica* Dunc. D.E.S, Université Cadi Ayyad, 148p
- Bernstein, L. 1975.** Effects of salinity and sodicity on plant growth. Ann. Rev. Phytopathol., 13 : 295-312.
- Besri M.,1977**-Etude de quelques aspects de l'écologie de *Fusarium oxysporum* f.s.p. lycopersici et de *Verticillium dahliae* Kleb. le long du littoral atlantique marocain. Thèse de Doctorat es-sciences. Université de Nancy, 199 p
- Besri M.,1981**-Qualité des sols et des eaux d'irrigation et manifestation des trachéomycoses de la tomate au Maroc. Phytopathologia mediterranea, Vol 20, n°2/3:107-111

- Besri M., 1990**-Effects of salinity on the development of tomato Verticillium wilt in Morocco. (abstract) Proceeding of the fifth International Symposium on Verticillium Wilt, 25-30 June 1990, St Petersburg, Russia
- Besri, M. and Afailal, A., 1993.** Effect of water salt content on the development of Verticillium wilt on resistant tomato cultivars. Proceedings of the 6th International Congress of Plant Pathology, July 28-August 6, Montréal, Canada.
- Bessis R., 1972** a- Etude de l'évolution des stomates et des tissus pristomatiques du fruit de la vigne. C.R .Acad . Sci. Paris 274, 2158-2161 .
- Beye I. et Lafay J.P., 1985**-Etude des critères de sélection pour une résistance générale à la verticilliose chez la tomate. Agronomie, 5(4) : 305-311.
- Bezier A, Lambert B and Baillieul F. 2002.** Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology, 108:111-120.
- Bishop, J.G., Dean, A.M. et Mitchell-Olds, T., 2000**-Rapid evolution in plant chitinases : molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 97 : 5322-5327.
- Black M., 1983** - Abscisic acid in seed germination and dormancy. In Abscisic acid. Ed. F. T. Addicott. Praeger, New York. Pp. 331-63
- Blakeman, J.P., 1975**-Germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro in relation to nutrient conditions on leaf surfaces. Transactions of the British Mycological Society 65: 239-247.
- Blakeman, J.P., 1972**-Effect of plant age on inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on beetroot leaves. Physiological Plant Pathology 2: 143-152.
- Blakeman, J.P., 1980**-Behaviour of conidia on aerial plant surfaces, p. 115-151, in: The Biology of Botrytis. J. R. Coley-smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London.
- Blakeman, J.P., and Fraser, A.K., 1971**-Inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on the surface. Physiological Plant Pathology 1: 45-54.
- Blanca B.B., Navas-Cortes J.A., Hervas A. and Jemenez-Diaz R.M., 2001**-Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceris on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. Phytopathology, 91: 807816.
- Blanca B.B., Navas-Cortes J.A., Hervas A. And Jemenez-Diaz R.M., 2001**-Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceris on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. Phytopathology, 91: 807816.
- Blancard, D., 2009**-Les maladies de la tomate: identifier, connaître, maîtriser. Quae éditions. pp. 679
- Blum A., 1988**-Plant Breeding for Stress Environment. CRC. Press (éds), Boca Raton, Florida, USA; 123p.

- Blumwald, E., Aharon, G.S., and Apse, M.P., 2000**-Sodium transportin plant cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465(1–2) : 140–151. doi:10.1016/S0005-2736(00)00135-8. PMID:10748251.
- Blumwald, E., Grover, A., et Good, A.G., 2004**-Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities. 2004 « New directions for a diverse planet ». Dans Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, 26 September – 1 October 2004, Brisbane, Australia.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG., 1995**- Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7, 1099–1111.
- Bondoux, P., 1992**-Maladies de conservation des fruits à pépins: pommes et poires. INRA. Paris, France. 173 p.
- Boriboonkaset, T. C. Theerawitaya, N. Yamada, A. Pichakum, K. Supaibulwatana, S. Cha-um, T. Takabe and C. Kirdmanee. 2013**-Regulation of some carbohydrate metabolism-related genes, starch and soluble sugar contents, photosynthetic activities and yield attributes of two contrasting rice genotypes subjected to salt stress,” *Protoplasma*, vol. 250, no. 5, pp. 1157-1167,
- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A., 2003**-Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73(2) : 101–115. doi:10.1023/A:1022849200433
- Botia P., Carvajal M., Cerda A., Martinez V., 1998**-Response of eight Cucumis melo cultivars to salinity during germination and early vegetative growth”, *Agronomie* 18, 503-513.
- Bouaouina S., Zid E et Hajji M., 2000**-Tolérance à la salinité, transports ioniques et fluorescence chlorophyllienne chez le blé dur (*Triticum turgidum* L.) CIHEAM–Options Méditerranéennes : 239-243.
- Bouaziz E., 1980**-Tolérance à la salure de la pomme de terre. *Physiol. Vég.* 18, p. 11–17.
- Boumaaza B, Benkhelifa M, and Belkhoudja M., 2015^a**-Effects of Two Salts Compounds on Mycelial Growth, Sporulation, and Spore Germination of Six Isolates of *Botrytis cinerea* in the Western North of Algeria. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology Volume 2015, Article ID 572626, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/572626>
- Boumendjel M. & Boutebba A., 2001**-Effet des traitements thermiques sur les antioxydants de la tomate. *Synthèse (Annaba)* 11:78-85
- Bouraoui N., Grignon C., Zid E., 1998**-Effet de NaCl sur la croissance et la respiration racinaire du triticale (X-Triticosecale Wittmack), *Cah. Agri.* 7 ; 372–376.
- Boyer, J.S., 1982**-Plant productivity and environment. *Science*, 218: 443-448.
- Bozouk S., 1981**-Effects of kinetin and salinity on germination of tomato barley and cotton seeds. *Annals of Botany* 48 : 81-84, in Abstract 8632, 51 (11).
- Bradley DJ, Kjellbom P & Lamb CJ., 1992**-Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70 : 21-30.

- Brent, K.J., Hollomon, D.W., 2007**-Fungicide Resistance: The Assessment of Risk Brussels, Belgium: Croplife International.
- Brosché M., Merilo E., Mayer F., Pechter P., Puzõrjova I., Brader G., ,2010**- Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance.*Plant Cell Environ.* 33 914–925 10.1111/j.1365-3040.2010.02116
- BuchananWollaston V., 1997**-The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **48**: 181-199
- Buck, J.W., and Jeffers, S.N.,2004**- Effect of pathogen aggressiveness and vinclozolin on efficacy of *Rhodotorula glutinis* PM4 against *Botrytis cinerea* on geranium leaf disks and seedlings. *Plant Disease* 88: 1262-1268.
- Cerning-Beroard J., 1975**- A note on sugar determination by anthrone method. *Cereal Chem.*52 :857-860.
- Chang, Y.C., R. Baker, O. Kleifeld et I. Chet.,1986**-Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma Harzianum*. *Plant Disease*, 70: 145-148.
- Charles, M. T., Benhamou, N., & Arul, J., 2008**-Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit - III. Ultrastructural modifications and their impact on fungal colonization. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 27-40.
- Chartzoulakis K., Klapaki G., 2000**- Response of two green house pepper hybridsto NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hortic.* 86, 247–260.
- Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N. et Paulitz, T.C., 2000**-Defense enzymes inducedin cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythiumaphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56 : 13-23.
- Chet I, Harman GE & Bake R., 1981**-*Trichoderma hamatum*, its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Phytium* spp. *Microbial Ecolog* 7(1), 29–38.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.-M., Simon, A., & Viaud, M., 2007**-*Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 1–10.
- Chougui Saida, Ykhlef Nadia, DjekounAbdelhamid.,2004**-Interaction iron-sainity, 1- relation of photosynthèse /K⁺ (Roots) with other morphological, physiological, and biochemical aspect of tomato (*Lycopersicum esculentum* mill) *Arab.uni.j.Sci.Ain Shms. Cairo*, 12 (2), 481-497, 2004
- CIHEAM., 2005**-Agri.Med: agriculture, fishery, food and sustainable rural development in the Mediterranean region. Annual report 2 / B. Hervieu / Paris [France].
- Clark, C.A., and Lorbeer, J.W., 1977**-Comparative nutrient dependency of *Botrytis squamosa* and *Botrytis cinerea* for germination of conidia and pathogenicity on onion leaves. *Phytopathology* 67: 212-218.

- Clavet, C, J. Pera et J.M. Barea.,1993**-Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant Soil* 148 : 1-6.
- Clementine Gerard., 2014**-Caractérisation d'inhibiteurs de protéases lors de l'interaction entre la Vigne et *Botrytis cinerea*.Thèse de doctorat. Biologie et Pathologie Végétales université de Reims Champagne-Ardenne.325p.
- Cole, L., Dewey, F.M. and Hawes, C.R., 1996**-Infection mechanisms of *Botrytis* species: Pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycol. Res.* 100: 277-286.
- Coley-Smith, J.R.,1980**-Sclerotia and other structures in survival, p. 85-114, in: *The biology of Botrytis*. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.
- Coubart, C. et Reulet, P., 2000**-Les résidus de produits phytosanitaires dans les raisins et les vins. Le point sur les deux dernières années d'enquêtes résidus de la SDQPV. *Phytoma la défense des végétaux* 532 : 30-39
- CPVQ (Conseil des Productions Végétales du Québec) 1985**-Petits fruits. Culture. Agdex 230/20. Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec, Québec. 35 pages.
- Cui, W., Beaver, R.E., Parkes, S.L., Weeds, P.L., and Templeton, M.D.,2002**-An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Fungal Genetics and Biology* 36: 187-198.
- Cunningham K. W and G. R. Fink, 1994** - Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺-ATPases," *the Journal of Cell Biology*,vol.124,no.3,pp.351–363,.
D.D.S. et J.W. Huang (éds). Taichung City, Taiwan, National Chung Hsing University,
- Dakora FD, Joseph CM, Phillips DA., 1993**-Alfalfa (*Medicago sativa*) Root Exudates Contain Isoflavonoids in the Presence of *Rhizobium meliloti* Isoflavonoids in the Presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* ;101:819–824.
- Dali, N., Ben Ghanem, H., Mougou, A., Ben Taeib, T., 1997**. Effet d'un stress salin sur la répartition entre amidon et sucres solubles dans les feuilles de deux lignées de tomate. *Revue de l'INAT, Journal des Sciences Agronomique* 12 (1), 131-
- D'Arcy W.G., 1991**-The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In J.G. Hawkes, R.N. Lester, M. Nee, N. Estrada-R, *Solanaceae*. 111 Taxonomy. *Chemistry Evolution*. Pub. Royal Botanic Gardens, pp. 75-137.
- Davidson, J.A., and Krysinska-Kaczmarek, M., 2007**-Effects of inoculum concentration, temperature, plant age and interrupted wetness on infection of lentil (*Lens culinaris*) by *Botrytis*

spp. conidia. Australasian Plant Pathology 36: 389-396. des Scéances de l'Académie d'Agriculture de France, 14, 1159-1168.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., and Höfte, M., 1998-Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 104: 279-286.

De Miccolis Angelini, R. M., Habia, W., Rotolo, C., Pollastro, S., and Faretra, F., 2010-Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. Eur. J. Plant Pathol. 128:185-199.

De Pascale S., Maggio A., Fogliano V., Ambrosino P., Ritieni A., 2001-Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 76: 447-453.

Debez A, Chaibi W, Bouzid S.,2001 - Effet du NaCl et de régulateurs de croissance sur la germination d'*Atriplex halimus* L. Cah Agric ; 10 : 135-8.

Delfine S., Alvino A., Zacchini M. and Loreto F., 1998- Consequences of salt stress on conductance to CO₂ diffusion, rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. Aust. J. Plant Physiol. 25, 395-402.

Delphine et al., 1998-Salt tolerance and salinity effect on plants: review. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 60, 349 p.

Del-Zoppo M., L. Gallechi, A. Onnis, A. Pardossi and F. Saviozzi., 1999-Effect of salinity on water relations, sodium accumulation, chlorophyll content and proteolytic enzymes in wild Wheat. Biologia Plantarum, 8: 97-104.

Denden et al., 2005- Effet de la salinité sur la fluorescence chlorophyllienne, la teneur en proline et la production florale de trois espèces ornementales. www.tropicultura.org/text/v23n4/220.pdf

Di Pietro A., Madrid M. P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J., Roncero M. I. G., 2003-*Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Mol. Plant Pathol. 4, 315-325.

Dik, A.J., and Elad, Y.,1999-Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. European Journal of Plant Pathology 105: 123-137.

Dik, A.J., and Wubben, J.P.,2004-Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses, p. 319-331, in: Botrytis: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Doehlemann, G., Berndt, P., and Hahn, M., 2006-Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. Microbiology 152: 2625-2634.

- Doganlar, S., A. Frary, M. C. Daunay, R. N. Lester and S. D. Tanksley.,2002b**- Conservation of gene function in the solanaceae as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant. *Genetics* 161: 1713-1726.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., and Wilson, C.,2009**-Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52: 137-145.
- Dubos B, Bulit J, Bugaret Y, Verdu D.,1978**-The possibilities of using *Trichoderma viride* for the biological control of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola* on grapevines.*Comptes Rendus des Seances de l'Academie d'Agriculture de France* 14, 1159–68.
- Dubos B., Jailloux F. et Bulit J., 1982**-Microbial antagonism in the control of grey mould of grapevine. *EPPPO Bulletin*, 12, 171-175.
- Dumas, Y1992**-Crop management for processing tomatoes in the year 2000.*Acta Horticulturae* 301: 117-134.
- Dumortier P., Evrad M., Maiche M., Nicolas A., De Ridder C. et Costa Santos Baltazar S., 2010**- Biodiversité chez la tomate, stratégie de conservation et valorisation de collection « luc fichot ». Rapport final, Phytotechnie et horticulture. Gembloux agro bio tech., 105 p.
- Dutuit P., Pourrat Y., Dutuit J M 1994**-La notion de stress de la cellule à l'écosystème. *Sécheresse*, Vol. 5, N°. 1: 23- 31.
- EL Aissami A. et Lahlou H., 1999**- Adaptation progressive à la luzerne d'un isolat de *Verticillium dahliae* originaire de la tomate. *Bulletin OEPP/EPPPO* 29 : 191-195.
- El Arbi Darouia , Azzouz Boukroutea , Nour- Eddine Kouddanea , Abdelbasset Berrichi.,2012**-Effet de la salinité sur la germination et la croissance in vitro du *Washingtonia filifera* L. *Revue «Nature & Technologie»*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques. Pages 32 à 38.
- El Jaafari S., 1993**-Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé. Doctorat-Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux, Belgique, 214 p.
- EL Midaoui M., 1999**-Response of sunflower (*Helianthus annuus L.*) to nitrogen and potassium deficiency. *Helia*.Vol. 22, n°30, pp. 139-148.
- Elad, Y., 1997**-Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop Protection* 16: 635-642.
- Elad, Y., and Stewart, A.,2004**-Microbial control of *Botrytis* spp, p. 223-241, in: *Botrytis: biology, pathology and control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Elad, Y., and Yunis, H. 1993**. Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* 21: 257-268.

- Elad, Y., Chet, I et Henis, Y., 1982**-Dégradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 28 : 719-725.
- Elad, Y., I. Chet et J. Katan., 1980**-*Trichoderma harzianum* : A biocontrol agent effective against *Sclerotinia ro/fs/V* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70 : 119-121.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N., 2004**-Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems - An introduction. Pages 1-8
- Elad, Y., Yunis, H., and Katan, T., 1992**-Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. Plant Pathol. 41:41-46.
- Elmer, P.A.G., and Michailides, T.J., 2004**-Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops, p. 243-272, in: Botrytis: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Elmer, P.A.G., and Reglinski., T 2006**-Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. Plant Pathology 55: 155-177.
- FAO 1997, 2005, 2010, 2013**-Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Division statistique. Web. <http://faostat.fao.org/default.aspx>.
- Fariba.A., Ali Akbar.E., 2005**-Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivars under in vitro salt stress .American Journal Of Biochemistry And Biotechnology. 1(4):212-216.
- Fernández-Ortuño, D. and G. Schnabel., 2012**-First report of thiophanate-methyl resistance in *Botrytis cinerea* on strawberry from South Carolina. Plant Dis. 96:1700.
- Ferrero M., 2009**- Etude de la variabilité des comportements alimentaires du prédateur et conséquences pour la lutte biologique. Thèse doctorat. Montpellier SupAgro., 228 p.
- Finkers, R., Bai, Y.L., van den Berg, P., van Berloo, R., Meijer-Dekens, F., ten Have, A., van Kan, J., Lindhout, P., and van Heusden, A.W. 2008. Quantitative resistance to *Botrytis cinerea* from *Solanum neorickii*. Euphytica 159: 83-92.
- Flowers T J., Flowers S A., 2005**-Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? Agricultural Water Management. Vol.78, N°. 1-2: 15- 24.
- Flowers, T.J. and A.R. Yeo., 1981**-Variability in the resistance of sodium chloride salinity within rice (*Oryza sativa* L.) varieties. New Phytol., 88: 363-373.
- Flowers, T.J., Troke, P.F., and Yeo, A.R., 1977**-The mechanisms of salt tolerance in halophytes. Annu. Rev. Plant Physiol. 28(1) : 89–121. doi:10.1146/annurev.pp.28.060177.000513.
- Fofana, B., McNally, D., Labbe, C., Boulanger, R., Benhamou, N., Seguin, A. & Belanger, R., 2002**-Milsana-Induced Resistance in Powdery Mildew-Infected Cucumber Plants Correlates with the Induction of Chalcone Synthase and Chalcone Isomerase. Physiol Plant Mol Pathol, 61, 121-132.

- Frankel, E.N.,1984**-Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids.Prog. Lipid Res. 23(4) : 197–221. doi:10.1016/0163-7827 (84)90011-0. PMID:6100997.
- Fravel, D.R2005**-Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43: 337-359.
- Gal-Hemed, I., L. Atanasova, M. Komon-Zelazowska, I. S. Druzhinina, A. Viterbo and O. Yarden., 2011**-Marine Isolates of *Trichoderma* spp. as Potential Halotolerant Agents of Biological Control for Arid-Zone Agriculture. Applied and Environmental Microbiology 77 (15): 5100– 5109.
- Gallais A., et Bannerot H., 1992**-Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. Ed. INRA. Paris.
- Gama P. B. S., Inanaga S., Tanaka K., Nakazawa R.,2007**-Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (2), pp. 079-088
- Georgopoulos, S.G.,1977**-Development of fungal resistance to fungicides, p. 439-495, in: Antifungal compounds. M. R. Siegel an H. D. Sisler, eds. Dekker, New York.
- Ghoulam C., Foursy A. and Fares K., 2002**- Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Environ. Exp. Bot. 47, 39-50.
- Gill P.K., Sharma A.D., Singh P., Bhullar S.S.,2003**-Changes in germination, growth and soluble sugar contents of Sorghum bicolor L. Moench seeds under various abiotic stresses, Plant Growth Regulation 40 (2), pp. 157-162.
- Gindro, K., 2000**-Etudes de la sporulation de *Botrytis cinerea* Pers. Fr.: purification, caractérisation et rôle d'une cutinase constitutive des conidies non germées. Thèse de la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.
- Göhre, V., Robatzek, S.,2008**-Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. Annual Review of Phytopathology, 46:189-215.
- Gorham J, Wyn Jones RG & Bristol A.,1990**-Partial characterization of the trait for enhanced K⁺-Na⁺ discrimination in the D genome of wheat. Planta . 180: 590-597.
- Green, R. et Fluhr, R.,1995**-UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. The Plant Cell 7 : 203-212.
- Greenway H. et Munns R.,1980**-Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. Annual Review of Plant Physiology. Vol. 3, pp. 149-190 .
- Gregory.B., 2005**-Écophysiologie de semis de conifères ectomycorhizés en milieu salin et sodique .Thèse de mémoire .Université Lava Canada .Chapitre 1.
- Grime, J. P.,1979**-Plant strategies and vegetation processes. John Wiley & Sons, Chichester.

- Grob S, Schmid MW, Luedtke NW, Wicker T, Grossniklaus U.,2013**-Characterization of chromosomal architecture in *Arabidopsis* by chromosome conformation capture. *Genome Biol* 14: R129.
- Groves, J. W., and Loveland, C. A.,1953**-The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia* 45:415-425.
- 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.
- Guetsky, R., Elad, Y., Shtienberg, D., and Dinooor, A.,2002**-Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillermondii* and *Bacillus mycooides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol Science and Technology* 12: 976-985.
- Gulati, M.K., Koch, E., and Zeller, W.,1999**-Isolation and identification of antifungal metabolites produced by fluorescent *Pseudomonas*, antagonist of red core disease of strawberry, p. 437-444, in: *Modern fungicides and antifungal compounds*, Vol. 2. H. Lyr, P. E. Russell, H. W. Dehne and H. D. Sisler, eds. Intercept LTD publishers, Andover, England.
- Gutterman Y.,1993** - Strategies of dispersal and germination in plants inhabiting deserts. *Bot. Rev.*, 60 : 373-425.
- Haas D, Blumer C & Keel C., 2000**-Biocontrol ability of fluorescent *Pseudomonas* genetically dissected: importance of positive feedback regulation. *Current Opinion in Biotechnology* 11:290 7.
- Hakim alilou.,2012**- Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc : *Asteriscus graveolens* subsp. odorus (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC. Thèse de doctorat es Sciences Biologiques de Université Ibn Zohr d'Agadir.215p.
- Halitim A., 1988**-Sols des régions arides d'Algérie. Office de Publications Universitaires, Alger: 39- 40.
- Hamdia.M., Shaddad.M.A.K., Doaa.M.M., 2004**-Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regulation*. V 44, n° 02, p 165-174. (10).
- Hamdy A., 1999**-Saline irrigation and management for a sustainable use. In: *Advanced Short Course on Saline Irrigation Proceeding*, Agadir: 152- 227.
- Haran, S., H. Schickler et I. Chet., 1996**-Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2321-2331.
- Harlan J. R., 1987**. Les plantes cultivées et l'homme, éd. ACCT/CILF/PUF, , p. 299-300.
- Harman EG.,2000**-Myths and Dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum*T-22. *Plant disease* 84 : 377-393.
- Harman G.E. 2001**. Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. Dans : *Proceedings of International Symposium on Biological Control*.

- Harman G.E., Chet I. And Baker R., 1981**—Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as biological agent. *Phytopathology* 71:569-572.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M.,2004**-*Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2:43–56.
- Hartung W, Jeschke WD.,1999**-Abscisic acid—a long distance stress signal in salt-stressed plants. In: Lerner H, ed. *Plant responses to environmental stresses: from phytohormone to genome reorganization*. New York: Marcel Dekker Inc.,333–348.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M.,2013**-Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In : *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*, 25–87p. Ahmad P., Azooz MM., Prasad MNV. eds. Springer, New
- Hasegawa P.M et al.,2000**:Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, pp463-499.
- Hasegawa. Paul. M., Bressan.Ray.A., Zhu.Jian-Kang., Bohnert.Hans.J., 2000**-Plant cellular and molecular responses to high salinity.*Annu.Rev.Plant.Physiol.Plant Mol.Biol.*51:463-499.
- Hathou TA., 1997**-Causes of blackening of infected spots of tomato fruits. *Egyptian journal of physiological sciences.* 17(2):351-360
- Hebbar K. P., Lumsden D. R., Krauss U., Soberanis W., Lambert S., Machado R.,
- Hebbar K. P., Lumsden D. R., Krauss U., Soberanis W., Lambert S., Machado R., Dessimoni C., & Aitken M. 1999**- Biocontrol of cacao diseases in latin America- Status of field trials. In: Krauss U. & Hebbar K.P., Eds. *Research methodology in biocontrol of plant diseases with special reference to fungal diseases of cocoa.* 28 june – 4 july 1999. CATIE, Turrialba (Costa Rica): CABI international & USDA, pp 19-28.
- Heller, R., Esnault R., and Lance C.,1993**-*Physiologie végétale 1.Nutrition.* 5e ed. Masson, Paris, France. 242p.
- Hennebert GL.,1973**-*Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* 7: 183-204
- Hernandez JA., Jimenez A., Mullineaux P., Sevilla F.,2000**-Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23: 853–862p.
- Hofstetter, B.,1990**-Nature's fungicides may banish *Botrytis*. *New Farm*, mai-juin 1990:31-32,41.
- Hopkins W G., 2003**-*Physiologie végétale.* 2éme édition. De Boeck, Bruscelles: 61-476.
- Horie T et Schroeder JL., 2004** : Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions.*PlantPhysiology* pp2457-2462.
- Hsiao T.C., Acevedo E., Fereres E. and D.E. Henderson., 1976**-Stress metabolism. Water stress, growth, and osmotic adjustment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (B)*, 273:470–500.

- Hu, J.K., 2002**-Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Inc., New York, NY, USA.
- Hu, Y., and Schmidhalter, U., 2005**- Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. J. Plant Nutr. Soil Sci. 168, 541–549..
- Huaying Z.,1998**-Trichoderma and seed biotreatment, J. Microbiol. 18(3): 50-57.
- 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.
- Iaonnou, N., R.W. Schneider, R.G. Grogan and J.M. Duniway.,1977**-Effect of water potential and temperature on growth, sporulation and production of microsclerotia by *Verticillium dahliae*.Phytopathology 67: 637-644
- Idrenmouche S., 2011**- Biologie et écologie de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera : Gelechiidae) dans la région de Boumerdes. Mémoire Magistère en Sciences Agronomiques. E.N.S.A. El Harrach, 103p.
- Iqbal, N., Umar, S., Khan, N. A., and Khan, M. I. R.,2014**-A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. Environ. Exp. Bot. 100, 34–42. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.12.006
- Itai C.,1999**-Role of phytohormones in plant responses to stresses. In: Lerner H.R. (ed). Plant response to environmental stresses, from phytohormones to genome reorganization.Marcel Dekker Inc., Basel, NY, USA, pp 287-301.
- ITCMI., 1994**-Guides pratiques. La culture de la tomate industrielle .A . Achabane, IMP Eloufak.
- Jacobsen, B.J., 2006**-Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents, p. 133-147, in: Microbial ecology of aerial plant surfaces. M. J. Bailey, A. K. Lilley, T. M. Timms-Wilson and P. T. N. Spencer-Phillips, eds. Atheneum Press, Gateshead, UK.
- Janisiewicz, W.J.,1998**-Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits - challenges and opportunities, p. 171-198, in: Plant-microbe interactions and biological control. G. J. Boland and L. D. Kuykendall, eds. Marcel Dekker Inc., NY, USA.
- Jarvis, W.R.,1977**-Botryotinia and Botrytis species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada, p. 195.
- Jarvis, W.R.,1980**-Epidemiology, p. 219-50, in: The biology of Botrytis. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London, UK.
- Jeun Y.C., 2004**-Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biol. Control*, 29, 34-42.
- Jones J.D. and Dangl J.L.2006**-The plant immune system. Nature 16: 323-329.

- Jorgensen, L.N., Henriksen, K.E. et Nielsen, G.C., 1999**-Adjusting thresholds for septoria control in winter wheat using strobilurins. Dans : Proceedings of the Fifth International Septoria and Stagonopora Diseases of Cereals : A compilation of global research, pp. 173-175.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I., and Chernin, L., 2003**-Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 323-331.
- Karmous C., 2007**- Contribution à l'étude des mécanismes de tolérance à la salinité au stade juvénile chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat en agronomie et science de la production végétale. INAT, Tunis: 211p.
- Kelley, W.D.,1976**-Evaluation of *Trichoderma harzianum* - impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamoni* causing damping-off of pine seedlings.*Phytopathology*66:1023-1027.
- Kenfaoui.A., 1997**-La salinité des eaux d'irrigation .Synthèse bibliographique réalisé par les élèves ingénieurs de l'école nationale du génie rural des eaux et des forets de Montpellier.
- Khales A et Baaziz M., 2006**- Etude des peroxydases d'écotypes d'*Opuntia Ficus indica* L en relation avec le développement dans les conditions de stress salin. Congrès international de Biochimie, Agadir: pp. 133-136.
- Khan M A., Hamid A., Salahuddin A.B. M., Quase A. et Karim M A.,1997**-Effect of sodium chloride on growth, photosynthesis and mineral ions accumulation of different types of rice (*Ovsya sativa*). *J. Agronomy and science*: 149-161.
- Kim, Y.K., and Xiao, C.L., 2011**-Stability and fitness of pyraclostrobin and boscalid- resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101, 1385-1391.
- Kinraide, T.B. et D.R. Parker., 1990**-Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum to four dicotyledonous species. *Physiol. Plant*,79: 283-388.
- Kochenko. 1972.**, Features of sclerotial germination of *Botrytis cinerea* Fr. *Mykologia Fitopatologia* 6: 256-258.
- Köhl, J., W. M. L. Molhoek, H. M. Goosson-van de Geijn, and C. H. Lombaers-van der Plas.,2003**-Potential of *Ulocladium atrum* for biocontrol of onion leaf spot through suppression of sporulation of *Botrytis* spp. *BioControl* 48: 349-359.
- Köller, W., Scheinplflug, H.,1987**-Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors : a new challenge. *Plant Dis.* 71, 1066-1074.
- Kosuge, T., and Hewitt, W.B. 1964.** Exudates of grape berries and their effect on germination of conidia of *Botrytiscinerea*. *Phytopathology* 54: 167-172.

- Krauss U., & Soberains W.,2002**-Effect of fertilization and biocontrol application frequency on *cocoa pods* diseases. *Biological control* 24 : 82-89.
- Kredics, L.; Antal, Z.; Manczinger., L. 2000**-Influence of water potential on growth, enzyme secretion and in vitro enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Cur.Microbiol.*, 40, 310-314.
- Kretschmer, M., and Hahn, M.,2008**-Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *J. Plant Dis. Prot.* 115, 214–219.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Koyro, H.-W., and Abdelly, C.,2010**-Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity. *Adv. Bot. Res.* 53 : 117–145. doi:10.1016/S0065-2296(10)53004-0.
- Kurban H., Saneoka, H., Nehira, K., Adilla, R., Premachandra, G.S., and Fujita, K., 1999** - Effect of salinity on growth, photosynthesis and mineral composition in leguminous plant *Alhagi pseudoalhagi*. *Soil Sci. Plant Nutr*; 45: p 851–862.
- Lachaal, M., Abdelli, C., Sleimi, N.,1997**-Recherche de critères physiologiques pour le tri de plantes tolérantes au sel. Dans : 6 èmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales. AUPELF-UREF, Orsay.
- Lachiheb, K., M. Neffati And E. Zid.,2004**-Aptitudes germinatives de certaines graminées halophytes spontanées de la Tunisie méridionale. *Cah.options Méditerran.*, 62: 89-93
- Lamb, C. et Dixon, R.A.,1997**-The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 : 251-275
- Larkin, R.P. et D.R. Fravel., 1998**-Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis.* 82 : 1022-1028.
- Larson R.,1995**-Plant defenses against oxidative stress. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29 : 175-186.
- Lasram.M., 1995**-Salinity problems in the Mediterranean's area, Ed academie de Paris N°2, séances pecialisée du 22 mar 1995.
- Latigui A.,1984**-Effects des différents niveaux de fertilisation potassique sur la fructification de la tomate cultivée en hiver sous serre non chauffée. Thèse de magister.INRA El-Harrach, Algérie.
- Lawlor DW, Cornic G.,2002**-Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25:275–294
- Le Houérou HN.,1986**-Salt-tolerant plants of economic value in the Mediterranean basin. *Reclamation and Revegetation Research* 5, 319-341
- Leroux P.,2003**-Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus de Biologies* 326 : 9-21.

- Leroux P., Moncomble D., 1993a** - Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne. Passé, présent, futur (1re partie). - Phytoma , (450), 27-30.
- Leroux, P., 1999**-Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. Crop Protection. 18, 687-697.
- Leroux, P.,2004**-Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides, p. 195-222, in: Botrytis: biology, pathology and control. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Levigneron, A., Lopez, F., Vansuyt, G.,1995**-Les plantes face au stress salin. Cahiers Agricultures, 4 : 263–273.
- Levy Y., Shalhevet J.,1999**-Ranking the salt tolerance of citrus rootstocks, by juice analysis. Sci. Hort. 45,
- Lewis, J.A. et G.C. Papavizas.,1987**-Application of Trichoderma and Gliocladium in alginate pellets for controls of *Rhizoctonia solani* damping-off. Plant Pathol.36 : 438-446.
- Li, G.Q., Huang, H.C., Acharya, S.N., and Erickson, R.S.,2004**-Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. Plant Disease 88: 1246-1251.
- Liansheng, T. et W. Wweihua. 2000** - Control of of Trichoderma against *Botrytis cinera* of strawberries in greenhouse. Plant Protection, 16: 294-298.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S., and Zhu, J.K.,2000**-The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97(7) : 3730–3734. doi:10.1073/pnas.060034197. PMID:10725382.
- Lockwood, J.L.,1988**-Evolution of concept associated with soil borne plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 26 : 93-121.
- Logan, B.A.,2005**-Reactive oxygen species and photosynthesis.Dans Antioxydants and reactive oxygen species in plants.Sous la direction de N. Smirnoff. Blackwell, Oxford. p. 250–267.
- Longstreth DJ et Nobel PS., 1979**-salinity effects on leaf anatomy. plant Physical .,63(4) :700-703
- Low PS, Merida JR., 1996**-The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. Physiol Plant. 96: 533-542
- Lynch, J.M., K.L. Wilson, M.A. Ousley and J.M. Whipps.,1991**-Response of lettuce to *Trichoderma* treatment.Lett. Applied Microbiol., 12: 56-61.
- Lynch, J.M., R.D. Lumsden, P.T. Atkey and M.A. Ousley., 1991**-Prospects for control of *Pythium* damping-off of lettuce with *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Enterobacter* spp. Biol. Fertil. Soils, 12: 95-99.
- Mâalem, S. and Rahmoune, C., 2009**- Toxicity of the Salt and Pericarp Inhibition on the Germination of Some Atriplex Species. American-Eurasian Journal of Toxicologic Sciences; 1 (2): 43-49.

- Maas E. V et POSS J.A., 1989**-Salt sensitivity of wheat at different growth stages. *Irrig.Sci.* pp29-40.
- Mac Donald, J.D.,1984**-Salinity effects on the susceptibility of *Chrysanthemum* roots to *Phytophthora Cryptogea*. *Phytopathology* 74: 621-624
- MADR.,2009**-Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural , Direction des Statistiques.62.
- Mahajan, S., Pandey, G.K., and Tuteja, N.,2008**-Calcium- and salt- stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 471(2) : 146–158. doi:10.1016/j.abb.2008.01. 010. PMID:18241665.
- Maillard J.,2001**- Le point sur l'Irrigation et la salinité des sols en zone sahélienne. Risqueset recommandations. Handicap International. Novembre 2001, 34 p.
- Majumder, A.L., Sengupta, S., et Goswami, L.,2010**-Osmolyte regulation in abiotic stress.Chap. 16. Dans *Abiotic stress adaptation in plants: Physiological, molecular and genomic foundation*. Sous la direction de A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert et Govindjee. p. 349–370.
- Malek-Maalej E., Boulasnem F. & Bensalem M.,1998**-Effet de la salinité sur la germination de graines de céréales cultivées en Tunisie. *Cahier Agriculture* (7) : 153-156
- Mansour, M.M.F. 1998.** Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiol. Biochem.* 36(10) : 767–772. doi:10.1016/S0981- 9428(98)80028-4.
- Mari, M., Bertolini, P., and Pratella, G.C., 2003**-Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *Journal of Applied Microbiology* 94: 761-766.
- Martinez, F., Dubos, B. et Fermaud, M., 2005**-The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* 95 : 692-700.
- Masclaux C, Quiller I, Gallais A, Hirel B., 2001**-The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Annals of Applied Biology* 138: 69-81.
- Mashali.A, Suarez.D, L.Nabhan.H, Rabindra.R., 2005**-Integrated management for sustainable use of salt –affected soils .Rome: FAO Soils Bulletin, now printing.
- Mehani M, S. Bissati and O. Djeroudi.,2012**- Effet d'eau de mer sur deux paramètres hydriques (turgescence et transpiration) de jeunes plants *d'Atriplex canescens* (Effect of seawater on two water parameters (turgescence and transpiration) of young plants of *Atriplex canescens*), *J. Mater. Environ. Sci.*, vol.3, no.5, pp. 840-845.
- Mohamed Debouba , Mohamed Habib Ghorbel & Houda Gouia 2007**-Effets du NaCl et de la déficience en azote sur la fluorescence chlorophyllienne du photosystème II chez la tomate

(*Solanum lycopersicon*, Chibli F1), *Acta Botanica Gallica*, 154:4, 635-642, DOI: 10.1080/12538078.2007.10516084

Mohammad M., Shibli R., Ajouni M., Nimri L.,1998- Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition. *J. Plant Nutr.*21, 1667–1680

Monneveux P., 1991-Quelles stratégies pour l'amélioration génétique de la tolérance à aux déficit hydrique des céréales d'hiver ? In amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. N. Chalabi and Y. Demarly (eds). Tunis (Tinisie), AUPELF- UREF, pp: 165-186.

Morant-Manceau, A., Pradier, E., Tremblin, G.,2004-Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. *J. Plant Physiol.*, 161: 25–33.

Morrissey JP, Osbourn AE.,1999-Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 708–724.

Munns, R., 2002-Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*,25: 239-250.

Munns, R.,2005-Genes and salt tolerance: bringing them together.*New Phytol.* 167(3) : 645–663. doi:10.1111/j.1469-8137.2005. 01487.x. PMID:16101905.

Munns, R., James, R.A., and Laüchli, A.,2006-Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp.Bot.* 57(5) : 1025–1043. doi:10.1093/jxb/erj100. PMID:16510517.

Myresiotis, C.K., Karaoglanidis, G.S., and Tzavella-Monari, K., 2007-Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 91: 407-413.

Nachmias. A,Z.Kaufman,L.Livescu,L.Tsrer,A.Meiri, and P. D. S. Caligari.,1993-Effects of salinity and its interactions with disease incidence on potatoes grown in hot climates,” *Phytoparasitica*,vol.21,no.3,pp.245–25.

Naika S., Jeude J.V.L., Goffau M., Hilmi M., Dam B.V.,2005- Agrodóc 17, la cultura de la tomate, production, transformation et commercialisation Editor: Barbara van Dam / la culture de la tomate. 105 pages.

Ndour P et Danthu P.,2000- Effet des contraintes hydrique et saline sur la germination de quelques acacias africain. *Projet National de Semences Forestières du Sénégal.* 11 p.

Nechadi,S Benddine, F Moumen, A Khedam, M2002-etat des maladies virales de la tomate et stratégie de lutte en Algérie. *Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin*, 32, pp.21-24

Nicolas R., 2010-Analyse du polymorphisme moléculaire de gènes de composantes de la qualité des fruits dans les ressources génétiques sauvages et cultivées de tomate ; recherche d'associations gènes/QTL. Thèse de doctorat en Sciences de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.275p.

- Nieves, M., Cerda, A. and Botella, M.,1991**-Salt tolerance of two lemon scions measured by leaf chloride and sodium accumulation. J. Pl. Nutr. 14:623-626
- Notteghem J.L., Andriatampo G.M., 1979**-Quelques facteurs de la résistance horizontale du riz à la pyriculariose. - Agron. Trop. (Paris), 34, 180-195.
- Oliveira. L.P. B., Lucimauro. A .A., Egidio B. N., Mercia. V., Dos Santos.F., De Cassia.J., 2006**-Organic solutes in forage sorghum genotypes under saline stress. Presq.Agropec, Bras, Brasilia.V 41, n° 01, p 31-35.
- Ommamie. N., 2005**-Response of Amaranth to salinity stress. These of Ph.D.Horticulture.University of Pretoria.Chapter 1, p 5-20, chapter 6, P1.
- Omrani. A., 1993**-Evolution spatiale de la salinité et du CaCO₃ total et actif de l'horizon de surface dans les sols salés de H'MADNA (Relizane) .Thèse Ing ISA de Tiaret.
- O'Neill, T.M., Shtienberg, D., and Elad, Y. 1997**-Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81: 36-40.
- Opperman, C. H. & CONKLING, M. A.,1994**-Nematodeinduced plant gene expression and related control strategies. Fundam. appl. Nematol., 17 : 211-217.
- Orcutt D.M. & Nilsen E.T.,2000**-Physiology of plants under stress. John Wiley & Sons
- Osborn, A.E. 1996**-Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell 8: 1821-1831
- Ouhibi. C., 2015**-Effets des rayonnements UV-C sur la réponse de la laitue romaine *Lactuca sativa* var Claudius aux contraintes biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat en Sciences Agronomique. Université d'Avignon, 2014. French. 178p p. 91–102.
- Pappas, A.C., Cooke, B.K., and Jordan, V.W.L.,1979**-Insensitivity of *Botrytis cinerea* to iprodione, procymidone and vinclozolin and their uptake by the fungus. Plant Pathology 28: 71-76.
- Pardo JM., Quintero FJ.,- 2002**-Plants and sodium ions : Keeping company with the enemy. Genome Biol. 3: 1017.1-1017.4p.
- Parent C., 2008**- Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. C. R. Biologies pp 255-261.polytechnique fédérale de Lausanne, 23 p.
- Parida A.K., Das A.B., 2005**-Salt tolerance and salinity effect on plants: review. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol.60, pp. 324-349.
- Parida A.K., Das A.B., Mohanty P.2004**-Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. J. Plant Physiol., 161: 531–542.
- Peralta, I. E. and D. Spooner., 2007**-History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae).Genetic improvement of Solanaceous crops.M. K. Razdan and A. K. Mattoo. Enfield (NH), Science Publisher. 2: 1-24.

- Perdiguero. P, M. d. C. Barbero, M. T. Cervera , C. Collada and Á. Soto.,2013** -Molecular response to water stress in two contrasting Mediterranean pines (*Pinus pinaster* and *Pinus pinea*),”Plant Physiology and Biochemistry, vol. 67, pp. 199- 208..
- Perez-Alfocea F., Balibrea M.E., Cruz A.S. and Estan M.T., 1996**-Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in commercial tomato hybrid.Plant & Soil. 180(2): 251-257.
- Pezet R., Viret O. et Gindro K., 2004**-Plant-microbe interaction: the Botrytis grey mould of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control management. In: Advances in Plant Physiology (Hemantaranjan A., ed), Scientific publishers, Jodhpur, India, 7, 71-116.
- Phillips, J.R., Oliver, M.J., et Bartels, D.,2002**-Molecular genetics of desiccation and tolerant systems. Dans Desiccation and survival in plants: Drying without dying. Sous la direction de M. Black et H.Pritchard. CAB International, Mol. Gen. Genet. p. 319–341
- Pilkington LJ, Messelink G, van Lenteren JC & Le Mottee C., 2009**-Protected biological control”.Biological pest management in the greenhouse industry.Biological Control (Online First). doi:10.1016/j.biocontrol.2009.05.022.
- Plant Diseases for the New Century: Mode of Action and Application Technology. Tzeng,
- Pohronezny (K.) and R. B. Volin.,1983**-The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomato. Hortsci.18 : 69 - 70.pp 71–84
- Prado F.E., Boero C., Gallardo M., Gonzalez J.A.,2000**-Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* Willd. Seeds”, Botanical Bulletin of Academia Sinica 41, pp. 27-34.
- Price A.H. et Hendry G.A.F.,1991**-Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. Plant Cell Environ.14:477-484.
- Raj, S. K., Mawson, B. T., Yeung, E. C. et Thorpe, T. A.,1993**-Utilization of induction and quenching kinetics of chlorophyll a fluorescence for in vivo salinity screening studies in wheat (*Triticum aestivum* vars. Kharchia-65 and Fielder). Can. J. Bot. Vol. 71, n°1, pp. 87- 92.
- Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasan V., Samiyappan R.,2001**- Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection 20: 1-11.
- Ranjbar A., Lemeur R. and Van Damme P., 2000**- Ecophysiological characteristics of two pistachio species (*pistacia khinjuk* and *P. mutica*) in response to salinity.FLTBW 5th PhD, University Gent.Belgium.
- Rasool, S., Hameed, A., Azooz, M.M., Rehman, M., Siddiqi, T.O. and Ahmad, P., 2013**, Salt Stress: Causes, Types and Responses of Plants, in: P. Ahmad, M.M. Azooz and M.N.V. Prasad

(Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, Springer New York Heidelberg Dordrecht London, pp. 1-24,.

Rathert G., 1984-Sucrose and starch content of plant parts as possible indicators for salt tolerance. *Aust. J. Plant Physiol.* 5: 491-495.

Regragui . Aand H. Lahlou, 2005-Effect of salinity on in vitro *Trichoderma harzianum* antagonism against *Verticillium dahlia* ,”*Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. ,no.6,pp.872–876,

Regragui, A.,2005-Contribution à l'étude de l'influence de la salinité sur le couple tomate –*Verticillium* : Conséquences physiologiques et impact sur la bioprotection des tomates contre la verticilliose. Thèse de doctorat es Sciences Biologiques de Université mohammed V- Agdal.231p.

Rengasamy P., 2006 - World salinization with emphasis on Australia .*Journa of Experimental Botany.* 57, (5), p. 1017-1023.

Rhodes D.,1987-Metabolic responses to stress. In: *The biochemistry of plants*, 12, *Physiology of metabolism*, Davis D.D, ed., Acad. Press., pp:201-241.

Rhodes, D., Nadloska-Orczyk, A., et Rich, P.J.,2002-Salinity,osmolytes and compatible solutes. Dans *Salinity: environment- plants-molecules*. Sous la direction de A. Lauchli et U. Luttge. Kluwer, Boston. p. 181–204.

Rick , C. M., 1976-Tomato *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). *Evolution of Crop Plants*. N. W. Simmonds, Longman: 268-273.

Riou , C.1993-L'eau et la production végétale. *Sécheresse* ; 2 : 75-83.

RobertN, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R et Buffard D 2002-Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Sci* 162: 389-400.

Rochdi J A., Lemsellek A., Bousarhal A., Rachidai.,2005-Evaluation sous serre de la tolérance à la salinité de quelques portegreffes d'agrumes : *Citrus aurantium* et deux hybrides de *Poncirus trifoliata* (*Poncirus* × *Citrus sinensis* et *Poncirus* × *Mandariner sunki*), *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9 (1) 65–73.

Romero-Aranda R., Soria T. and Cuartero J., 2001-Tomato plant-water uptake and plant- water relationships under saline growth conditions. *Plant Sciences.*160,265- 272.

Rosenberger, D.A.1990-Postharvest diseases (Blue mold-Gray mold), in: *Compendium of Apple and Pear Diseases*, A.L. Jones and H.S. Aldwinkle, eds., APS Press The American Phytopathological Society, USA pp.53-58.

Rosslenbroich, H.-J.et Stuebler, D.,2000-*Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19 : 557-561

- Rotem, J., and Aust, H.J., 1991**-The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. *Journal of Phytopathology* 133: 76-84.
- Rubio, J.S., Rubio, F., Martínez, V., García-Sánchez.F.,2009**-Amelioration of salt stress by irrigation management in pepper plants grown in coconut coir dust. *Agricultural Water Management* 97, 1695-1702.
- Sadiki A. et Trabelsi H., 1989**-Réponses de 5 variétés de tomates irriguées avec des eaux salines .Mémoire de fin d'études 2ème cycle., I.A.V. CHA, Agadir.
- Salinas, J. and Verhoeff, K.,1995**-Microscopical studies of the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 377-386
- Salinas, J., Glandorf, D.C.M., Picavet, F.D., and Verhoeff, K., 1989**-Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95: 51-64.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Bessis, R., and Leroux, P.,1996**-Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathology* 45: 139-144.
- Schopfer P., Bajracharya D. and Plachy C.,1979** – Control of seed germination by abscissic acid. Time course of action in *Synapis alba* L. *Plant physiol.* 64: 822-827.
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ., 2001a**-Guard cell abscissic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*;410:327–30.
- Schwab K.B. and Gaff D.F., 1986**-Sugar and ion content in leaf tissue of several drought tolerant plants under water stress. *J. Plant Physiol.*, 125: 257-265.
- Schwartz. C., 2007**-Salinisation des sols : processus, causes, effets et gestions des sols salés .Diapositif.
- Shakil. A., Abdul Wahid.E., Abdul Wahid.,2004**-Comparative morphological and physiological responses of green gram genotypes to salinity applied at different growth stages .*Bot.Bull.Acad.sin.*46:135-142.
- Shalini, S. et A.S. Kotasthane., 2007**-Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 6: 2272-2281.
- Shannon M.C., 1984**-Effects of salinity on growth and accumulation of organic ions in cultivated and Wild tomato species. *Journal of the American Society for horticulturalScience.*112:416 – 423.
- Sharaf, A., Labib, S. et El Massry, R., 1990**. Effect of kinetin on the biochemical constituents of tomato plants under different levels of salinity. *Zagazig Journal of Agricultural Research (Egypt).*12: 417-441.

- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., and Zhu, J.K.,2000**-The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97(12) : 6896–6901.doi:10.1073/pnas.120170197. PMID:10823923.
- Shiraishi, M., Fukutomi, M., and Akai, S., 1970a**-Effects of temperature on the conidium germination and appressorium formation of *Botrytis cinerea* Pers. Annals of the Phytopathological Society of Japan 36: 234-236.
- Shiraishi, M., Fukutomi, M., and Akai, S., 1970b**-Recovery of germinability of aged conidia of *Botrytis cinerea* Pers. by several saccharides. Annals of the Phytopathological Society of Japan 36: 297-303.
- Silva. J.V., De Lacerda.F.C., De Costa.A., Filho.P.H., Joaquim. E.G.,Tarquino.P.J., 2003**-Physiological response of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂.Brazilian Journal Of Plants Physiology .V15,n°02.londrina. doi:10,1590/S 1677-04202003000200005.
- Sing N.K., P.C. LaRosa, D. Nelson, N. Iraki, N.C. Caprita, P.M. Hasegawa,R.A. Bressan. 1989**-Reduced growth rate and change in cell-wall protein of plant cell adapted to NaCl, in: J. Cherry (Ed.), Biochemical and physiological mechanism associated with environmental stress tolerance in plant, Springer Verlag, Berli.
- Sing, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. et Chung, Y.R., 1999**-Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology 89 : 92-99.
- Sippell, D.W., J.G.N. Davidson et R.S. Sadasivaiah., 1985**-Rhizoctonia root rot of raspberry in the peace région of Alberta. Can. J. Plant Pathol.7 : 184-186.
- Sirry, A.E.R., 1957**-The effect of relative humidity on the germination of Botrytis spores and on the severity of *Botrytis cinerea* pers on lettuce. Annals of Agricultural Science (Cairo) 2: 247-250.
- Slama F.,2004**-La salinité et la production végétale. Centre de publication universitaire, Tunis.163P.
- Slama, I. K. Ben Rejeb, A. Rouached, A. Jdey, M. Rabhi, O. Talbi, A. Debez, A. Savouré, C. Abdelly, 2014** -Presence of proline in salinized nutrient solution re-enforces the role of this amino acid in osmoregulation and protects lipid membrane peroxidation in Arabidopsis thaliana,” Australian Journal of Crop Science,vol. 8, no.10, pp.1367-1372,
- Snoussi S. A., 2010**- Etude de base sur la tomate en Algérie. Rapport de mission Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient. Rome, 52 p.
- Snow, D., 1949**-The germination of mould spores at controlled humidities. Annals of Applied Biology 36: 1-13.

- Sommers L.E., Harris R.F., Dalton F.N., and Gardner W.R., 1970**-Water potential relations of three root-infecting *Phytophthora* species. *Phytopathology* 60: 932-934.
- Staats, M., P. van Baarlen, and J. A. L. van Kan., 2005**-Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22 (2):333-346.
- Standaert J.Y., Maraite H. Myttenaere C. et Meyer J.A., 1978**- Etude de l'influence de la concentration saline et du rapport Na/Ca du milieu nutritif sur la sensibilité de la tomate à la fusariose vasculaire. *Plant and soil* 50: 269-286.
- Standaert, J.Y., 1975**-Influence de la force ionique et du rapport Na/Ca du milieu sur la sensibilité de la tomate à la fusariose vasculaire. Thèse de Docteur en Sciences Agronomiques, Université Catholique de Louvain, 77p
- Steduto, P, R. Albrizio, P. Giorio, G. Sorrentino., 2000**-Gas exchange response and stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation of sunflower under salinity 144 (3) (2000) 243–255
- Stevenson, F. J., 1985**-Geochemistry of soil humic substances. In *Humic substances in soil, sediment and water*. D. M. M. K. Aiken, R.L. Wershaw and P. Mac Carthy. New York, Wiley-Interscience: 13-52.
- Sudhir P., Murthy SDS.- 2004**-Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *photosynthetica* 42: 481–486p. Timasheff et al., 1989
- Svensson.,2001**-Fonctional studies of the role of plant dehydrins in tolerance to salinity dessication. Epsilon dissertation and graduate these archive dep of plant. *Biologica acta.universities agricultural.sueciae agraria*. V259.
- Swiecki T.J. and Mac Donald J.D., 1991**-Soil Salinity Enhances *Phytophthora* Root Rot of Tomato but Hinders Asexual Reproduction by *Phytophthora parasitica* J. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 (3) :471-477
- T. Karuppanapandian, J.C. Moon, C. Kim, K Manoharan and W. Kim,2011**- “Reactive Oxygen Species in Plants: Their Generation, Signal Transduction, and Scavenging Mechanisms,” *Australian Journal of Crop Science*, vol.5, no. 6, pp. 709- 725,.
- Taffouo, V.D., J.K. Kouamou, L.M.T. Ngalangue, B.A.N. Ndjeudji et A. Akoa.,2009**- Effects of salinity stress on growth, ions partitioning and yield of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivars. *Int. J. Bot.*, 5: 135-143.
- Taiz, L. and Zeiger, E.,2002**-Plant physiology. Sinauer Associates. Sunderland. USA, 690p.
- Tavakkoli E., F. Fatehi, S. Coventry, P. Rengasamy, and G. K. McDonald, 2011**-Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress,” *Journal of Experimental Botany*, vol. 62, no. 6, pp. 2189–2203. View at Publisher · View at Google Scholar · View at Scopus

- Teakle, N.L., and Tyerman, S.D.,2010**-Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ.* 33(4) :566–589.doi:10.1111/j.1365 3040.2009.02060.x. PMID:19895402.
- Terry.L et Waldrom .A., 1984**-Salinity, phoyotosynthesis, and leaf grout .J .AME. Soc. Sug.Tech ,595P. University of Pretoria.Chapter 1, p 5-20, chapter 6, P1.
- Tester, M., and Davenport, R.J.,2003**-Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* (Londres.), 91(5) : 503–527.doi:10.1093/aob/mcg058.PMID:12646496.
- Thakore Y., 2006**-The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology.* 2(3):294-208.
- Thomas, C.S., and Marois, J.J., 1986**-Effect of wind and relative humidity on sporulation and external mycelium formation of *Botrytis* on grape. *Phytopathology* 76: 1114
- Thomashow L S, Weller D M. 1996**-Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: Stacey G, Keen N T, editors. *Plant-microbe interactions*.Vol. 1. New York, N.Y: Chapman and Hall;. pp. 187–235.
- Thordal-Christensen, H. (2003)**- Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 351-357.
- Timasheff, S.N., and Arakawa, T., 1989**- Stabilization of protein structure by solvents. In: Creighton TE (Eds.), *Protein structure. A practical approach*, Oxford: IRL Press, pp. 331-44.
- Todorova, D., Katerova, Z., Sergiev I, and Alexieva, V., 2013**- Role of Polyamines in Alleviating Salt Stress, in: P. Ahmad, M.M. Azooz and M.N.V. Prasad (Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, Springer New York Heidelberg Dordrecht London, pp. 355-38.
- Türkan, I., and Demiral, T.,2009**-Recent developments in under-standing salinity tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 67(1) : 2–9. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.05.008.
- Turner, N.C., 1986**-Adaptation to water deficits: a changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 175-90.
- Urban L and I. Urban., 2010**-La production sous serre, tome 2 : l'irrigation fertilisante en culture hors sol, 2nd Ed. Lavoisier, pp.39.
- Van der Hoorn R.A.L., De Wit P.J.G.M. and Joosten M.H.A.J.,2002**-Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science* 7: 67-71.
- Van Lenteren, J.C., 2000**-A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? *Crop Protection* 19: 375-384.
- Van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C.M.J., 2006b**-Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Van Volkenburgh, E. et J.S. Boyer., 1985**-Inhibitory effects of water deficit on maize leaf elongation. *Plant Physiol.*, 77:190-194

- Veloukas, T., M. Leroch, M. Hahn, and G. S. Karaoglanidis., 2011-**Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease* 95 (10):1302-1307.
- Verma, M., 2007-**Developpement d'un processus d'obtention d'agents biologiques à base de *Trichoderma* SPP en utilisant des eaux usées ou des boues d'épuration comme substrats de fermentation. Thèse de doctorat, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada, 424 p.
- Verslues P.; agarwal M.; katiyar-Agarwal S. And Zhu J., 2006-** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing abiotic stresses that affect plant water stans. *The plant journal* 45: 523-539.
- Viterbo A., Ramot O., Chernin L., Chet I., 2002-**Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Anton. van Leeuw.* 81, 549– 556.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmülling, T., 2001-**Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10487–10492.
- West, J.S., Pearson, S., Hadley, P., Wheldon, A.E., Davis, F.J., Gilbert, A., and Henbest, R.G.C., 2000-**Spectral filters for the control of *Botrytis cinerea*. *Annals of Applied Biology* 136: 115-120.
- Wilcox, W.F., 1993-**Control of gray mold of strawberry through cultural manipulations of fruiting-zone microclimate. Reports pertinent to the IPM effort at Cornell University, New York State IPM Publication #208: 83-85.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. et Van Kan JAL., 2007-***Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology.* 8: 561–580.
- Williamson, B., Duncan, G.H., Harrison, J.G., Harding, L.A., Elad, Y., and Zimand, G., 1995-**Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99: 1303-1310.
- Windham, MT., Y.Elad, R.A. Baker., 1986-**Mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76 (5): 518-521
- Wood, R.K.S., 1951-**The control of diseases of lettuce by use of antagonistic microorganisms I. The control of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of Applied Biology* 38: 203-216.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Leon, J., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Raskin, I. et Shah, D.M., 1997-**Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology* 115 : 427-435.
- Xiong, L., et Zhu, J.K.,2002-**Salt tolerance, in: *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists. pp. 1–22.

- Xue Z.; Zhi D.; Xue G.; Zhang H.; Zhao Y. and Xia G.,2004** - Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field at a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Sci.*, 167: 849-859.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., and Somero, G.N.,1982**-Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566) : 1214–1222. doi:10.1126/science.7112124. PMID:7112124.
- Yedida I, Benhamou N & Chet I., 1999**-Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 : 1061-1070.
- Yedidia, I., A.K. Srivastva, Y. Kapulnik et I. Chet.,2001**-Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235: 235-242.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I.,2000**-Induction and accumulation of PR protein activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.* 38:863-873.
- Yemm E.W. et Cocking E.C., 1955**-The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* 80 : 209-213.
- Yin, Y.N., Kim, Y.K., and Xiao, C.L.,2011**-Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101, 986-995.
- Ykhlef N., 1993**-Effet de l'addition de l'azote et du potassium sur la tolérance du poivron doux à l'eau d'irrigation sale. Séminaire Maghrébin sur la protection de la nature, Novembre 1993, ISN Annaba Algérie.
- Yoder, O.C., and Whalen, M.L.,1975**-Factors affecting postharvest infection of stored cabbage tissue by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* 53: 691-699.
- Yokoi S., Quintero FJ., Cubero B., Ruiz MT., Bressan RA., Hasegawa PM., Pardo JM.,-2002** Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30: 529–539p. York.
- Yoshida, Y., Nanjo, T., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.,-1999**. Stress-responsive and developmental regulation of P5CS1 gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261 : 766–772. doi:10.1006/bbrc.1999. 1112. PMID:10441499.
- Yourman, L.F., Jeffers, S.N., and Dean, R.A.,2003**-Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 311-317.
- Yun D, Paino D'Urzo M, Abad L, Takeda S, Salzman R, Chen Z, Lee H, Hasegawa P, Bressan R.,1996**-Novel osmotically induced antifungal chitinases and bacterial expression of an active recombinant isoform. *Plant Physiol* 111: 1219–1225

- Yunis, H., Elad, Y., and Mahrer, Y.,1990**-Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on gray mold of cucumbers in unheated greenhouses. *Phytoparasitica* 18: 203-215.
- Yunis, H., Elad, Y., and Mahrer, Y., 1990**-Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on gray mold of cucumbers in unheated greenhouses.*Phytoparasitica*
- Zhang, H.Y.,Wang, L., Ma, L.C., Dong, Y., Jiang, S., Xu, B., Zheng, X.D.,2009**- Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *Biological Control* 48, 79–83.
- Zhu, J.K.,2002**-Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53(1) : 247–273. doi:10.1146/annurev. arplant.53.091401.143329. PMID:12221975.
- Zhu, J.K.,2003**-Regulation of ion homeostasis under salt stress.*Curr.Opin. Plant Biol.* 6(5) : 441–445. doi:10.1016/S1369-5266(03)00085-2. PMID:12972044.
- Zhu.J-K., 2001**, Plant salt tolerance. *trends in plant science* 6 :66-71.Greenway et munns, 1980),
- Zid E., Grignon C., 1991**-Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas des stress salin et hydrique. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides, AUPELF-UREF. Jon Libbey Eurotext, Paris: 91- 108.
- ZIDANI S., 2009**- Valorisation des pelures de tomates séchées en vue de leur incorporation dans la margarine. Thèse de magister, option : Technologie Alimentaire. Laboratoire de Recherche Technologie Alimentaire L.R.T.A, université M'hamedBougaraBoumerdes, 74 p.

ANNEXE

Annexe I

La solution nutritive de HOAGLAND (1938) diluée au 1/1000^{ème} ou F= 1000

Produit	Composition	Poids en g/l
Nitrate de potassium	KNO ₃	191.90
Nitrate de calcium	(NO ₃) ₂ Ca 4H ₂ O	129.80
Nitrate d'Ammonium	NO ₃ NH ₄	210
Sulfate de magnésium	SO ₄ Mg 7H ₂ O	61.5
Phosphate monopotassique	PO ₄ H ₂ K	54.40
Hydrogenophosphate di-potassium	PO ₄ K ₂ H 3H ₂ O	34.23
Chlorure de manganèse	Cl ₂ Mn 4H ₂ O	1.80
Sulfate de cuivre	Cu SO ₄ 5H ₂ O	0.176
Sulfate de zinc	Zn SO ₄ 7H ₂ O	0.219
Acide borique	H ₃ BO ₃	2.861
Molybdate d'ammonium	MO ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₇ H ₂ O	0.285
Complexe ferrique EDTA ferrique	C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈	0.050

Annexe II

Méthode de calcul de la capacité de rétention

L'arrosage des plantes est réalisé en tenant compte de la capacité de rétention du substrat calculé de la manière suivante :

Nous avons déposé (P1) g de tourbe dans un petit pot en plastique perforé à sa base, le tout est posé dans une boîte de pétri, ensuite l'eau est versée dans le pot jusqu'à saturation, ce dernier est déposé sur la paillasse pour décantation ; au bout de 24h, le pot et le sol sont pesés, le poids est égal à (P2)

Annexe III

Tampon phosphate (pH 5 à 8)

1. Solution 1 : 9,46 g de sodium hydrogénophosphate (ou disodium hydrogénophosphate dodecahydré ou sodium phosphate dibasique ou sodium phosphate disodique : Na₂HPO₄, 12H₂O) dans 1000 ml d'eau distillée
2. Solution 2 : 9,06 g de potassium phosphate monopotassique (ou potassium dihydrogénophosphate ou potassium phosphate monobasique : KH₂PO₄) dans 1000 ml d'eau distillée
 - Prendre un grand bécher (1000 ml). Y verser environ 1000 ml de la solution de potassium phosphate (solution2)

► Mettre le bécher sur un agitateur magnétique

Utiliser un pHmètre précis. Le pH doit être proche de 4,5

- Ajouter goutte à goutte la solution de sodium hydrogénophosphate (solution 1) jusqu'à l'obtention du pH 7.

Annexe IV

Tampon citrate à 160 mM (pH à 4,6)

Le tampon citrate à 160 mM est préparé comme suite :

Préparer la solution 1 de phosphate disodium à 160 mM : dissoudre 22,71 g de phosphate disodium (Na_2HPO_4) dans l'eau distillée puis compléter le volume par l'eau distillée à 1000 ml.

Préparer la solution 2 de l'acide citrique à 160 mM : dissoudre 33,63 g de l'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, H_2O) dans l'eau distillée puis compléter le volume par l'eau distillée à 1000 ml.

Prendre un grand bécher (1000 ml) puis verser environ 500 ml de la solution de l'acide citrique (solution2).

Mettre le bécher sur un agitateur magnétique.

Ajouter goutte à goutte la solution de phosphate disodium (solution 1) jusqu'à l'obtention du pH désiré (pH=4,6) à l'aide d'un pH mètre.

Annexe V

Détermination de la teneur en chlorophylles

L'extraction est réalisée à froid par 25 ml d'acétone pour environ 1 g de matière fraîche foliaire. Après 10 min de centrifugation à 5000 g, à 4°C, une mesure de l'absorbance A est effectuée à 470, 662 et 645 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV-1605). Les teneurs en pigments, exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sont calculées à partir des équations suivantes :

$$Ca = 11,24 A_{662} - 2,04 A_{645}$$

$$Cb = 20,13 A_{645} - 4,19 A_{662}$$

$$Cx + c = 1000 A_{470} - 1,90 Ca - 63,14 Cb$$

(Ca et Cb : Concentration en chlorophylles a et b ; Cx + c : Concentration en caroténoïdes).

Annexe VI

Détermination de la teneur en acides aminés libres totaux

Extraction

Environ 1 g de matière fraîche foliaire est mélangé à 7 ml d'eau distillée dans un tube en verre. Les tubes, bouchés par une bille d'agate, sont placés dans un bain-marie bouillant (100°C) pendant une heure. Après refroidissement dans de la glace, le mélange est broyé au Potter. Puis centrifugé à 5000 g pendant 10 min, à 4°C. Le culot subit une deuxième extraction avec 7 ml d'eau distillée (une heure au bain-marie à 100°C) puis le mélange est centrifugé à 5000 g pendant 10 min et à 4°C. Les deux surnageants sont récupérés et filtrés sur un papier filtre.

Dosage

Une partie aliquote de l'extrait (200 µl) est mélangée à 500 µl de tampon citrate (160 mM, pH 4,6 ajusté avec HCl 25 %). Après homogénéisation au vortex, 1 ml du mélange réactionnel ninhydrine-acide ascorbique est ajouté au broyat. Les tubes sont agités vigoureusement, bouchés par une bille d'agate et placés au bain-marie bouillant à 100°C pendant 20 min. Après refroidissement dans de la glace pilée, 3 ml d'éthanol à 70 % sont ajoutés et l'ensemble est agité vigoureusement. L'absorbance est mesurée à 570 nm. La solution de ninhydrine (54 mM : 0,575 g de ninhydrine dans 60 ml d'éthanol à 70 %) est préparée extemporanément et additionnée de 2 ml d'acide ascorbique (1%, p/v). La réaction se déroule dans un milieu tamponné à pH 4,6. Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère de leucine à 5 mM préparée dans l'eau distillée pour des valeurs comprises entre 0 et 200 nmoles de leucine. Les résultats seront exprimés en µmoles d'équivalents leucine.g⁻¹ M.F.

Annexe VII

Détermination de la teneur des sucres solubles totaux

Extraction

Environ 1 g de matière fraîche foliaire est mélangé avec 7 ml d'eau distillée dans un tube en verre. Les tubes sont bouchés par une bille d'agate puis placés dans un bain-marie bouillant (100°C) pendant une heure. Après refroidissement des tubes dans de la glace, le mélange est broyé au Potter et centrifugé à 5000 g pendant 10 min, à 4°C. Le culot subit une deuxième extraction avec 7 ml d'eau distillée (une heure au bain-marie à 100°C) puis le mélange est centrifugé à 5000 g pendant 10 min et à 4°C. Les deux surnageants sont mélangés et filtrés sur un papier filtre.

III.3.2. Dosage

Une partie de l'extrait (500 µl) sont ajoutés 5 ml de réactif à l'antrone préparé extemporanément (92 mg d'antrone et 92 mg de thiourée sont dissous dans 100 ml d'acide sulfurique à 70 %). Après agitation au vortex, les tubes bouchés par des billes d'agate sont placés dans un bain-marie bouillant pendant 10 min. Après refroidissement dans de la glace pilée,

l'absorbance est mesurée à 625 nm. Une gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère de glucose, avec des teneurs comprises entre 0 et 400 nmoles. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles d'équivalents glucose.g}^{-1}$ M.F.

Annexe VIII

Détermination de la teneur en protéines totales

Extraction

Environ 1 g de matière fraîche est mélangé à 10 ml de tampon d'extraction (tampon phosphate 0.06M pH 7) l'extraction se fait à froid (mortier dans un glace pilée). Puis centrifugé à 5000 g pendant 15 min, à 4°C.

Dosage

Prendre 1 ml d'échantillon à doser et ajouter 2 ml de réactif de Bradford, après 2 min du développement de la réaction, la densité optique est lu à 595 nm. Un courbe étalon est réalisé à partir d'une solution mère de sérum albumine préparée dans l'eau distillée pour des valeurs comprises entre 10 à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g protéine. ml}^{-1}$.