

**AFPP –CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**MALADIES DU BOIS DE LA VIGNE EN TUNISIE : COMMUNAUTES FONGIQUES ET UTILISATION
D'HUILES ESSENTIELLES COMME MOYEN DE LUTTE**

A. BEN GHNAYA-CHAKROUN^{1,2}, Y. MASTOURI^{1,3}, A. REZGUI^{1,2}, J. VALLANCE², A. YACOUB², P. REY²,
N. SADFI-ZOUAOU¹ AND L. HAMROUNI³

⁽¹⁾Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives, Département de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis. Campus Universitaire, 2092 Tunis, Tunisie + benghnaya_asma@yahoo.fr

⁽²⁾UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), INRA, Bordeaux, France + patrice.rey@agro-bordeaux.fr

⁽³⁾Laboratoire d'Ecologie Forestière, Institut National de Recherches en Génie Rural, Eaux et Forêts. PB 10, 2080 Ariana, Tunisie + hamrounilam@yahoo.fr

RÉSUMÉ

L'Esca et le Black Dead Arm sont des maladies du bois (MDB) de la vigne associées à la présence de champignons capables de dégrader les tissus ligneux. En Tunisie, ces maladies sont en pleine expansion, mais aucun moyen de lutte n'existe actuellement. Dans le but de trouver un moyen de lutte biologique efficace contre ces maladies, une étude a été menée pour la valorisation des Huiles Essentielles(HE) de *Thymus capitatus* dans une région du Nord ouest de la Tunisie (Wed ezzarga). L'HE a été obtenue par hydrodistillation et la composition chimique a été identifiée par chromatographie en phase gazeuse (GC-MS). Les résultats obtenus montrent un rendement en HE de 1,46 % pour le site d'étude. HE était constituée d'une vingtaine de composés représentant 99,98 % de la composition dont 65,90% était du **carvacrol** avec 65,90 %. En outre, l'étude de l'activité antifongique a montré que l'HE de thym de cette région a une importante capacité inhibitrice de la croissance mycélienne de deux souches de *Phaeomoniella chlamydospora* (PCLR81 et PP1SO22) à une concentration de 50 ppm (cette inhibition est de **73%** pour la souche **PCLR81** et de **61,5%** pour la souche **PP1SO22** à la même concentration).

Mots-clés : Activité antifongique, champignons, Esca-BDA, huiles essentielles, vigne.

ABSTRACT

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *THYMUS CAPITATUS* L. ESSENTIAL OIL AGAINST THE GRAPEVINE WOOD DISEASES (GTDS ESCA AND BDA).

In order to find an effective biological control against the Grapevine wood diseases, especially Esca and Black Dead Arm (BDA), a study was conducted to valorize essential oils (Eo) of *Thymus capitatus* of tunisian provenance (Wed Ezzarga). Essential oils were obtained by hydrodistillation and their chemical composition was identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The results showed an important yield of the Wed Ezzarga Eo (1.46%). Twenty compounds were identified representing 99.98% of the composition, with a majority of carvacrol (65.90%). In addition, the study of antifungal activity showed that essential oil of *Thymus capitatus* have a significant inhibitory capacity on the mycelial growth of two strains of *Phaeomoniella chlamydospora* (PCLR81 and PP1SO22), at a concentration of only 50 ppm (The inhibition rates were 73% for **PCLR81** and 61.5% for **PP1SO22**).

Keywords: Antifungal activity, Esca-BDA, essential oil, fungi, grapevine.

INTRODUCTION

La vigne cultivée (*Vitis vinifera*) est une espèce végétale très importante sur le plan socio-économique dans le monde entier. Son importance réside dans la production du raisin, du vin et dans les divers produits comme les dérivés de vinification (moûts, alcools de distillation, tartres...). Les huiles issues des pépins de raisin et des feuilles entrent également dans la composition de nombreux compléments alimentaires et phytothérapeutiques, sans oublier les produits cosmétiques. Une grande partie du vignoble mondial sert à produire des raisins de table et des raisins secs. Actuellement la superficie totale cultivée ne cesse d'augmenter pour atteindre 8,5 million à 10 millions d'hectare (Jrad, 2004).

En France, où le secteur viticole occupe depuis longtemps une place au premier plan dans l'économie, le solde de la balance commerciale des vins affiche un excédent de plus de 6 milliards d'euros en 2007, avec en plus, de nombreux et très diversifiés emplois générés par la filière (Bastien. 2008). Par ailleurs, les vignobles tunisiens jouent également un rôle satisfaisant dans l'économie du pays avec une superficie de plus de 17 000 hectares pour les raisins de cuve et environ 10 000 hectares pour le raisin de table (DG/EDA, 2013).

La plupart des vignobles mondiaux sont actuellement touchés par les maladies du bois de la vigne (MDBs). Celles-ci comprennent trois principales maladies de dépérissements chez les plants adultes : l'eutypiose, l'esca et les chancre à *Botryosphaeriaceae* (notamment le Black Dead Arm (BDA)). Ces maladies, attaquent les organes pérennes de la vigne causant à plus au moins long terme la mort du cep et la destruction de la souche. Une augmentation de l'incidence des MDBs a été observée ces quinze dernières années à l'échelle mondiale (Urbez-Torrez *et al.*, 2006). Ces maladies de dépérissement engendrent des pertes économiques importantes et sont véritablement au cœur des préoccupations des viticulteurs. En France, environ 13% du vignoble est improductif à cause des dépérissements qu'elles provoquent (Bruezet *et al.*, 2013). L'utilisation de l'arsénite de sodium permettait le contrôle de ces maladies. Mais ce produit a été interdit en raison de sa toxicité pour l'homme et pour l'environnement en 2001. Aujourd'hui, aucune méthode de lutte, chimique ou biologique, ne remplace l'arsénite de sodium. Les seules solutions existantes sont d'ordre prophylactique. De ce fait, l'absence de solutions de lutte efficaces rend ces pathogènes très difficiles à combattre. Cette problématique est donc actuellement l'un des sujets de recherche majeur de la filière viti-vinicole. En Tunisie, les MDBs sont encore mal connues mais en pleine expansion, d'où la nécessité de chercher rapidement un moyen de lutte efficace afin de réduire ou même de mettre fin à cette impasse tout en préservant la pérennité de la vigne et en protégeant l'environnement de tout produit synthétique menaçant sa durabilité. De ce fait, on s'intéresse à la recherche d'un moyen de lutte biologique et on s'attache principalement à exploiter les vertus qui caractérisent certains végétaux telles que les huiles essentielles. Celles-ci présentent en effet des propriétés intéressantes, *i.e.* antioxydantes, antitoxiques, cicatrisantes, anti-inflammatoires, antiseptiques, anticancéreuses, antibactériennes, antifongiques... Dans ce contexte, l'objectif de notre étude a été de chercher à exploiter la flore tunisienne riche en plantes médicinales et aromatiques, et d'étudier plus particulièrement l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus capitatus* contre des agents pathogènes impliqués dans les maladies du bois de la vigne.

MATERIELS ET METHODES

I. Échantillonnage, séchage et conservation

Des échantillons de *Thymus capitatus* ont été récoltés au mois d'Avril, 2014 dans la région de Wed Ezzarga (Béja, Nord-ouest de la Tunisie). Les échantillons de Thym fraîchement récoltés ont été séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant environ 10 jours. Les feuilles ont été par la suite isolées et conservées.

II. Extraction de l'Huile Essentielle (HE) de *Thymus capitatus*

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation de type Clevenger. Cet appareil est constitué d'une chauffe ballon, un ballon en verre pyrex dans lequel on a placé 50g de

matériel végétal séché (feuilles de Thym) avec 500 ml d'eau distillée, une colonne de 60 cm de longueur qui est reliée à un réfrigérant et un collecteur qui reçoit les extraits. Les distillations ont été réalisées par ébullition pendant 3 heures à 160°C, puis l'HE a été récupérée à l'aide d'une seringue et conservée à 4°C à l'abri de la lumière, dans des tubes hermétiquement fermés jusqu'au moment de leur utilisation.

III. Détermination du rendement en HE

Le rendement (Rdt) est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Rdt en HE (en\%)} = (M / m) * 100$$

Avec : **M** : masse de l'HE obtenue (en gramme)

m : masse de la matière végétale utilisée (en gramme) et qui vaut 50g

IV. Détermination de la composition chimique de l'Huile essentielle (HE) de *Thymus capitatus* par chromatographie en phase gazeuse (GC-MS)

La composition des HE de *Thymus capitatus* a été effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Agilent Technologies 7890A. Il est équipé d'un injecteur Split-splitless, a une température de 250°C, et d'une colonne capillaire de silice fondue HP5MS (30m*0,25mm*0,25µm). La programmation de la température du four est de 60°C à 0min, elle augmente jusqu'à 250°C à raison de 4°C/min. Le gaz vecteur est l'Hélium avec un débit de 0,8ml/min et une température d'interface de 280°C. Le spectromètre de masse couplé à ce chromatographe est de type Agilent Technologies 5975C. La température de la source est de 230°C, celle du quadripôle est de 150°C. La plage du balayage de masse est de 50 à 550 UMA à 70°V et la vitesse du balayage, de 2,91 scan/s. L'identification de la composition chimique des différentes HEs a été confirmée en comparant les spectres de masse de chaque composé avec ceux enregistrés dans les bibliothèques NIST08 et W8N08 du dispositif chromatographique.

On procède tout d'abord à la préparation d'une solution de chaque HE du Thym dans l'hexane qui représente la phase mobile à raison de 5µl de chaque HE dans 500µl d'hexane. Ensuite, des injections de 1µl sont réalisées à l'aide d'une micro-seringue et les résultats sont obtenus sous forme de chromatogramme.

V. Activité antifongique

V.1. Souches fongiques utilisées

Deux souches de *Phaeomoniella chlamydospora* : **PCLR 81** et **PP1SO22**, champignons pionniers de l'Esca, ont été fournies par le **Dr. Gwenaëlle Comont** (chercheur à l'INRA Bordeaux, France). Ces deux souches ont été utilisées dans notre étude pour la réalisation des tests d'évaluation de l'activité antifongique de l'HE de *Thymus capitatus*. Ces souches ont été conservées et repiquées sur du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) quand nécessaire.

V.2. Évaluation de l'activité antifongique

V. 3. 1. Protocole expérimental

Les HEs de *Thymus capitatus* ont été exploitées afin d'évaluer leur activité antifongique sur les deux souches de *Phaeomoniella chlamydospora* : **PCLR 81** et **PP1SO22**. Pour cela, ces deux souches ont été cultivées en triplicat sur du milieu PDA additionné de différentes concentrations en HEs de Thym (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Différentes concentrations de l'HE de Thym utilisées pour l'évaluation de l'activité antifongique

Table 1: Different concentrations of the thyme essential oils used for the evaluation of antifungal activity

	PDA (en ml)	HE de <i>Thymus capitatus</i> (en µl)
Témoin	50	0
Concentration 1	50	2.5
Concentration 2	50	5
Concentration 3	50	10

V.2. 2. Suivi du test de fongitoxité

Notre principal objectif, dans cette étude, était de trouver un moyen de lutte biologique contre les MDBs, et plus particulièrement d'évaluer l'activité antifongique des HEs du thym contre des champignons pionniers de l'Esca, *i.e.* deux souches de *Phaeomoniella chlamydospora*: PCLR81 et PP1SO22. Des concentrations de **50**, **100** et **200ppm** de l'HE ont été adoptées afin d'identifier le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne.

L'étude de l'activité antifongique a été réalisée en ciblant le pourcentage d'inhibition caractérisant chaque teneur en huile. Ainsi, pour évaluer l'efficacité des HEs du thym, des mesures des deux diamètres perpendiculaires de la croissance mycélienne ont été prises hebdomadairement (temps nécessaire pour un développement maximal du champignon dans un milieu sans traitement), et les données obtenues ont été exprimées en valeurs moyennes et soumises à une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel SPSS13.

RESULTATS

I. Caractérisation des huiles essentielles (HEs) de *Thymus capitatus* L.

I.1 Rendement et propriétés physico-chimiques

Le rendement d'extraction des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation à partir des feuilles fraîches de *Thymus capitatus* a été calculé et exprimé en gramme d'huile essentielle par 100 gramme de matériel utilisé pour l'extraction. Le rendement en HE est de 1,46% (**Tableau 2**).

I.2.Composition chimique des HEs de *Thymus capitatus*

L'analyse chromatographique a permis d'identifier une vingtaine de composés chimiques représentant 99,98% de la composition totale (**Tableau 2**).

Cette HE a également montré une variabilité importante de la nature et des teneurs en composés chimiques. En effet, l'HE de *Thymus capitatus* se caractérise par le chémotype **carvacrol**. Le composé majeur étant le carvacrol, sa teneur est particulièrement la plus importante par rapport aux autres. Effectivement, l'HE de *Thymus capitatus* de Wed Ezzarga contient **65,90 %** de ce composé. Cette huile a également une forte teneur en **p-cymène** (9,30 %) et en **γ-terpinène** (8,40 %) (**Tableau 2**).

II. Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus capitatus*

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogrammes pour chaque test de fongitoxité, montrant l'évolution du pourcentage d'inhibition de chaque concentration en HE, durant trois semaines successives (une semaine correspond à 8 jours), ainsi que des photos prises à la fin du traitement fortifiant les résultats trouvés.

II. 1. Activité antifongique des HEs de *Thymus capitatus* contre *Phaeomoniella chlamydospora* (PCLR81)

Une progression du pourcentage d'inhibition en fonction de l'augmentation des concentrations en HE a été enregistrée d'une façon générale,. En effet, pour une teneur égale à 50ppm, on note une différence significative entre les premiers 8 jours et les deux dernières semaines du traitement où l'activité antifongique inhibe jusqu'à la moitié voire de 53 % à 73 % la croissance mycélienne de la

souche traitée (**Fig. 1**). Également, pour les concentrations de 100 et de 200 ppm, on note qu'il y a une différence nettement significative entre la première semaine et les deux autres, tel un accroissement du % d'inhibition qui augmente de 61,32 % à 79,59 % pour 100 ppm, et de 60 à 80 % pour 200 ppm, entre la première et la dernière semaine du traitement (**Fig. 1**).

Ainsi, l'HE de *Thymus capitatus* a montré une activité antifongique intéressante après 24 jours de traitement, contre la croissance du champignon pionnier de l'Esca à partir d'une concentration de 50 ppm (**Fig. 2**).

Tableau 2 : Compositions chimiques des HEs de *T. capitatus* de la provenance de Wed Ezzarga (P%)

Table 2: Chemical composition of *T. capitatus* essential oils from Tunisian provenance Wed Ezzarga

Numéros	Temps de rétention	Composés	P (%)
1	5,335	α -Thujène	1,44
2	5,507	α -Pinène	0,67
3	5,868	Sabinène	0,24
4	6,549	β - Pinène	0,30
5	6,835	β -Myrcène	1,31
6	6,978	Octan-3-ol	0,21
7	7,247	α -Phellandrene	0,25
8	7,578	α -Terpinène	1,71
9	7,813	p-Cymène	9,30
10	7,933	β -Phellandrene	0,51
11	8,797	γ-Terpinène	8,40
12	9,089	5-Isopropyl- 2-methylbicyclohexane-2-ol	0,29
13	9,095	4-Thujanol-cis	-
14	10,062	Linalol	1,64
15	12,259	Borneol	0,60
16	12,608	Carvomenthenol	0,84
17	16,545	2-Isopropyl-5-methylphénol	-
18	16,923	Carvacrol	65,90
19	18,902	Carvacryl-acétate	2,52
20	20,436	β -Caryophyllen	2,23
21	25,391	Aromadendrene	-
22	25,403	Cis-Davanone	1,36
23	38,477	Methyl-trans-9- octadecenoate	0,26
Rendement en %		1,46	
Identification total en %		99,98	

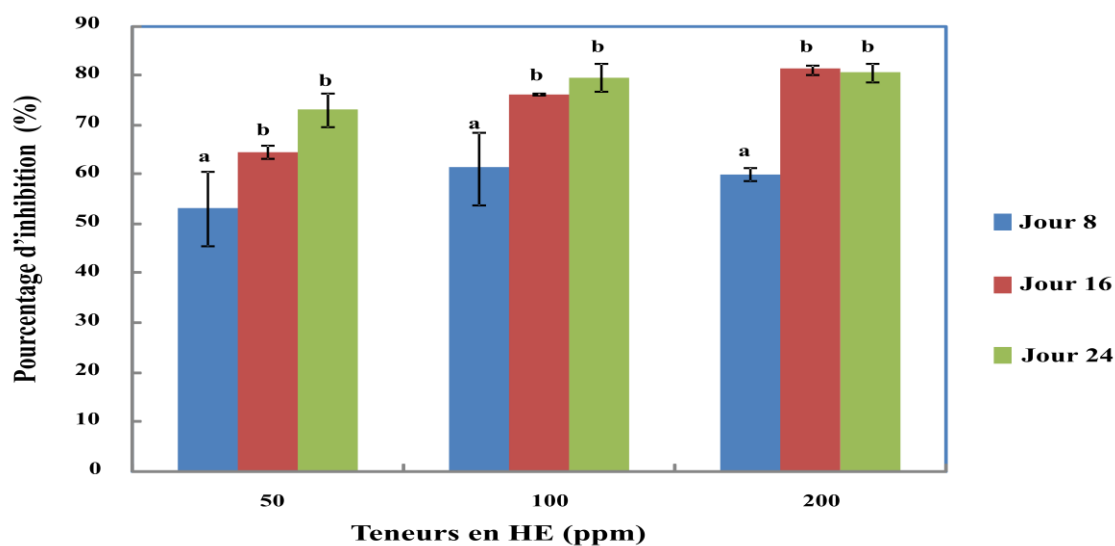


Figure 1 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche **PCLR81** en fonction des différentes concentrations d'HE de *Thymus capitatus* de la région de Wed Ezzarga (Les données marquées par une même lettre ne sont pas statistiquement différentes et inversement).

Figure 1: Percentage of inhibition of mycelial growth of PCLR81 strain according to the different concentrations of HE of *Thymus capitatus* Wed Ezzarga region

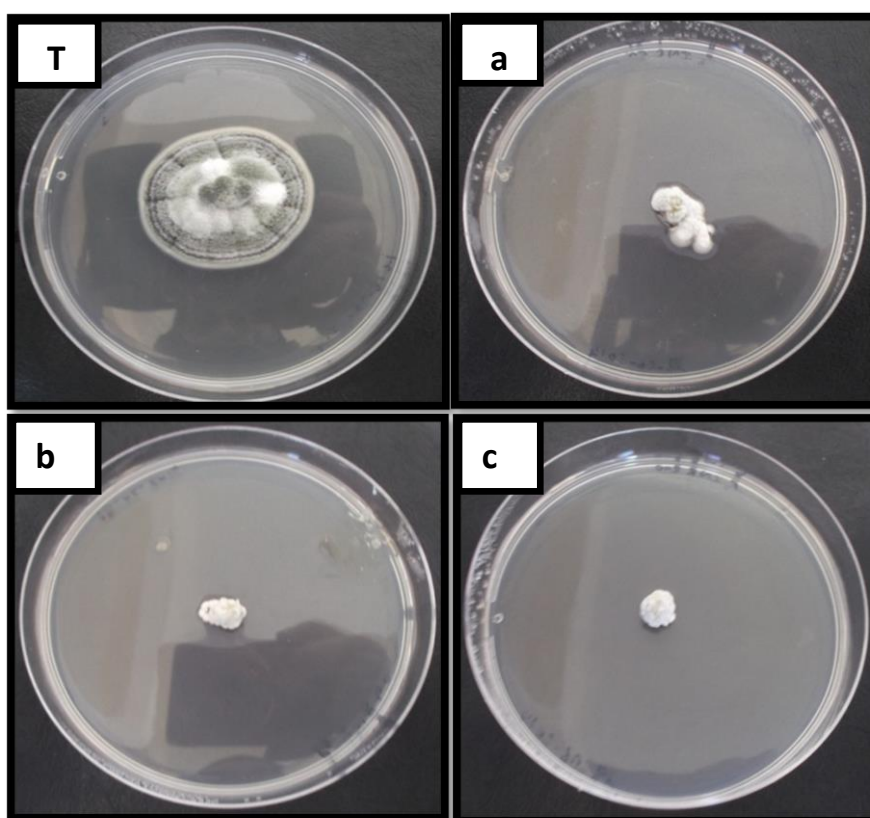


Figure 2: Effet de l'HE de *Thymus capitatus* de la région de Wed Ezzarga sur la croissance mycélienne de la souche **PCLR81** : **T** : témoin, **a**, **b** et **c** : activités antifongiques respectivement à 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm d'HE.

Figure 2: Effect of the HE of *Thymus capitatus* Wed Ezzarga region on the mycelial growth of strain PCLR81: **T**: Control, **a**, **b** and **c**: antifungal activities respectively at 50 ppm, 100 ppm and 200 ppm of EO.

II. 2. Activité antifongique d'HEs de *Thymus capitatus* contre *Phaeomoniella chlamydospora*(PP1SO22)

L'étude de l'activité antifongique de l'HE de la région de Wed Ezzarga montre qu'il y a un effet inhibiteur considérable de la croissance mycélienne à partir d'une concentration de 50 ppm. En fait, on note une différence significative, entre la première et les deux dernières semaines de traitement, pour les deux premières concentrations d'huile adoptées. En effet, le pourcentage d'inhibition augmente durant la durée du traitement de 32,47 % à 61,5%, pour une concentration de 50 ppm et de 38,38 % à 64,24 %, pour 100 ppm d'HE (**Fig. 3**).

Cependant, il n'y a pas de différence significative du pourcentage d'inhibition qui augmente d'une moyenne d'environ 11 % au cours des 24 jours du test de fongitoxité, pour une teneur de 200 ppm, pour atteindre un pourcentage d'inhibition égale à 69,16 % à la fin du traitement (**Fig. 3**). En outre, on peut déduire suivant ces résultats que le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est presque le même pour les trois teneurs adoptées en HE (61,5 % pour 50 ppm, 64,24 % pour 100 ppm et 69,16 % pour 200 ppm) (**Fig. 4**). L'effet inhibiteur de cette HE est clairement observé pour les trois concentrations adoptées par rapport au témoin (**Fig. 4**).

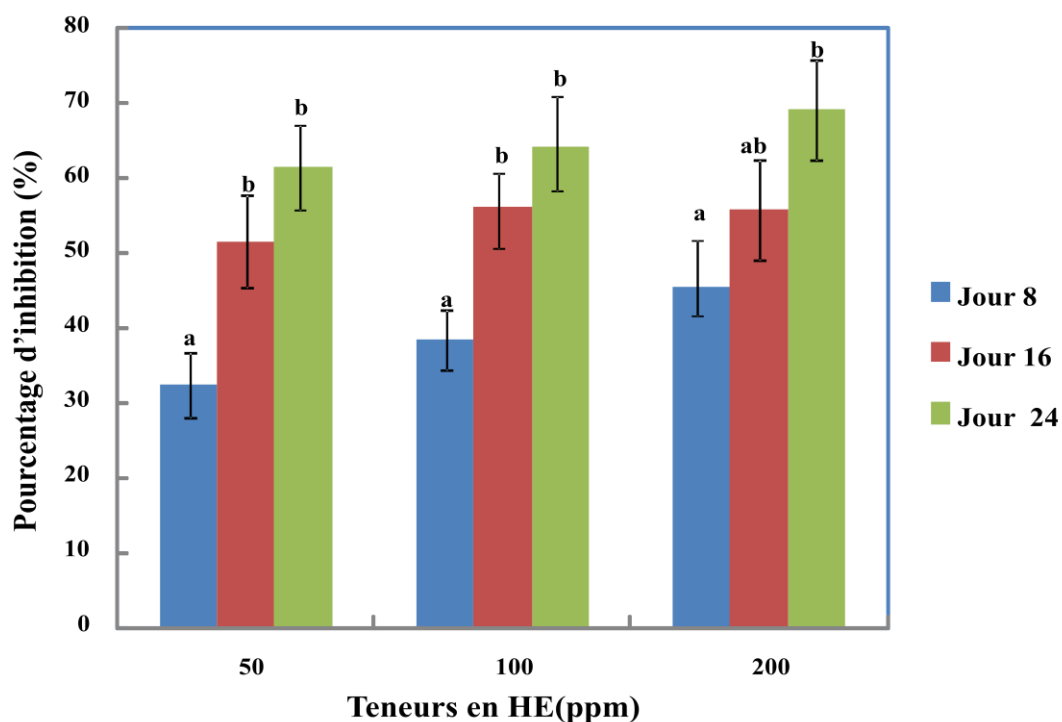


Figure 3 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de la souche **PP1SO22** en fonction des différentes concentrations d'HE de la région de Wed Ezzarga (Les données marquées par une même lettre ne sont pas statistiquement différentes et inversement).

Figure 3: Percentage of inhibition of the mycelial growth of **PP1SO22** according to the different concentrations of *Thymus capitatus* HE from the Wed Ezzarga region

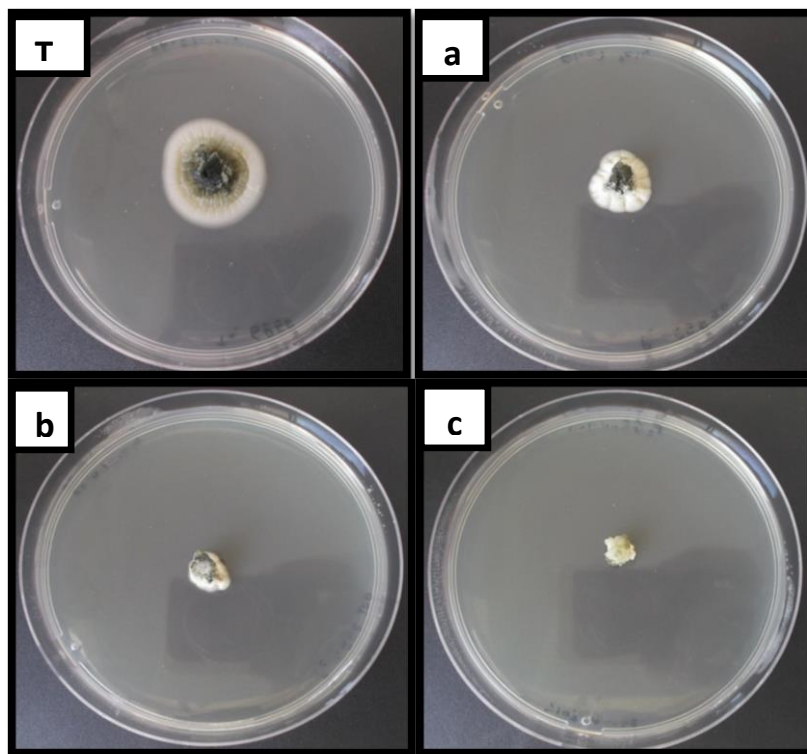


Figure 4 : Effet de l'HE de Wed Ezzarga sur la croissance mycélienne de la souche **PP1SO22** : T : témoin, **a, b et c** : activités antifongiques respectivement à 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm d'HE

Figure 4: Effect of the *Thymus capitatus* HE from the Wed Ezzarga region on the mycelial growth of **PP1SO22**: T: Control, **a, b and c**: antifungal activities respectively at 50 ppm, 100 ppm and 200 ppm of EO.

DISCUSSION

Dans le cadre de ce travail, l'extraction des HEs du thym de la région de Wed Ezzarga dans le Nord-ouest de la Tunisie a été effectuée par hydrodistillation et l'identification de la composition chimique a été réalisée par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (GC-MS). De plus, on a évalué l'activité antifongique contre deux souches de *Phaeomoniella chlamydospora* (PCLR81 et PP1SO22), champignons pionniers d'Esca.

Les résultats obtenus montrent, d'une part, la variation de la composition chimique de cette huile (20 composés chimiques différents ont été identifiés). En effet, notre étude a révélé que le composé majeur de l'HE de *Thymus capitatus* de notre site d'étude était le **carvacrol** : sa teneur particulièrement importante par rapport aux autres, atteignait **65, 90 %**. Ce résultat est en accord avec des études précédentes prouvant que le *Thymus capitatus* Tunisien est de chémotype carvacrol (Hedhili *et al.*, 2002; Amarti *et al.*, 2010). Cette teneur, par comparaison avec d'autres recherches précédentes, est remarquablement plus forte que les teneurs en carvacrol trouvées chez *Thymus capitatus* en Turquie (35,6%) (Goren *et al.*, 2003) et en Sardaigne (10,8 %) (Cosentino *et al.*, 1999). En revanche, on a remarqué que l'HE de Wed Ezzarga avait également des teneurs fortes en p-cymène (9,30%) et en γ-terpinène (8,40%). On a également détecté la présence d'autres composés avec des teneurs différentes tels que l'α-pinène, le β-myrcène, l'α-terpinène, le linalol... (**Tableau 2**).

D'autre part, l'HE de *Thymus capitatus* a montré une importante activité antifongique contre les deux souches de *Phaeomoniella chlamydospora* étudiées : une inhibition de la croissance mycélienne avec seulement 50 ppm d'HE a été notée. Les résultats obtenus, ont révélé une inhibition de **61,5 %** de la croissance mycélienne de la souche **PP1SO22** et une inhibition de **73 %** pour la souche **PCLR81**.

CONCLUSION

Finalement, il faut signaler que cette étude est une initiative de recherche très intéressante ayant pour objectif de trouver un moyen de lutte biologique efficace contre les maladies du bois de la vigne. Les résultats obtenus encouragent à poursuivre les investigations pour mieux caractériser l'HE de *Thymus capitatus* et ses propriétés antifongiques en déterminant notamment la **CI50** (Concentration Inhibitrice de 50 % de la croissance mycélienne). L'analyse de la composition chimique permettra d'étudier l'influence de l'environnement (température, altitude, plantes voisines...) et du stade physiologique (stade végétatif ou stade floraison) sur la composition de l'HE, et de déterminer la ou les molécules bioactives pour, à terme, synthétiser et produire un pesticide biologique destiné à lutter contre les champignons pionniers des maladies du bois de la vigne, afin de préserver et de protéger à la fois le vignoble et l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Abdellah F., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Chaouch A., 2010- Composition chimique et activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss et Reut et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth du Maro. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 14(1), 141-8.
- Bastien, J.P., 2008-La vigne, le vin : Atout pour la France. *Avis et rapport du conseil économique et social*.
- Bruez E., Lecomte P., Grosman J., Doublet B., Bertsch C., Fontaine F., Ugaglia A., Teissedre PL., Da Costa J.-P., Guérin-Dubrana L and Rey P., 2013. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *PhytopathologiaMediterranea*, 52, 2, 262-275.
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G, Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999-*In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *LettApplMicrobial*, 29,130-5.
- DG/EDA, 2013-Direction Générale des Etudes et de Développement Agricoles, Ministère de l'agriculture et des ressources hydrauliques.
- Goren A.C., Bilsel G., Bilsel M., 2003-Analysis of essential oil of *Coridothymus capitatus* (L) and its antibacterial and antifungal activity. *Z Naturforsch*, 58,687-90
- Hedhili L.,Romdhane M.,Abderrabba M.,PlancheH., et Cherif I., 2002-Variability in essential oil composition of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. *Et link. Flavour and Fragrance J*, 17, 26-28.
- Jrad A., 2004-Culture et production de la vigne. Dar Ala-eddin. Syrie, 7-18.
- Urbez-Torres J.R., 2011-The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50 (Supplement), S5-S45