

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTÉGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

**VARIABILITÉ PHÉNOTYPIQUE ENTRE LES ISOLATS DE *BOTRYTIS CINEREA* COLLECTÉS DANS LES
SERRES DE TOMATES EN ALGERIE ET EN EUROPE**

A. ADJEBLI⁽¹⁾, N. OUKALA⁽¹⁾, Y. BOUAUD⁽¹⁾ et K. AISSAT⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algérie (ahmed.adjebli@gmail.com)

RÉSUMÉ

La pourriture grise est l'une des maladies majeures sur plusieurs cultures d'importance agronomique en Algérie. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de températures élevées sur la croissance mycélienne et la germination des spores d'isolats de *Botrytis cinerea*, maintenus *in vitro*, ainsi que le niveau d'agressivité de ces isolats sur folioles de tomate. Cette étude inclut une dimension comparative géographique entre des isolats collectés en Algérie, en France et en Norvège. Le test d'agressivité a révélé une grande variabilité entre les isolats. Les isolats collectés en Algérie ont été plus agressifs que ceux collectés en France et Norvège. Les isolats ALG 108 et BC 21 ont été le plus agressif et le moins agressif, respectivement. La vitesse de croissance mycélienne et le taux de germination ont été maxima pour tous les isolats à 21°C. Le développement de *B. cinerea* a été significativement affecté à des températures élevées. Une inhibition totale de la croissance mycélienne à 30°C et de la germination des spores à 32°C ont été observées.

Mots-clés : Tomate, *Botrytis cinerea*, variation de température, agressivité, croissance mycélienne.

ABSTRACT

PHENOTYPIC VARIABILITY BETWEEN *BOTRYTIS CINEREA* ISOLATES

Gray mold is one of the major diseases on various crops of agronomic importance. The objective of this study was to evaluate the effect of high temperatures on the mycelial growth and spore germination of *B. cinerea* isolates *in vitro* and the level of aggressiveness on tomato leaflets. This study includes a geographical comparison between isolates of *B. cinerea* collected in Algeria, France and Norway. The aggressiveness test revealed a strong variability between isolates. Isolates collected in Algeria were more aggressive than isolates obtained in France and Norway. Both isolate ALG 108 and BC 21 were the most aggressive and least aggressive, respectively. Mycelial growth rate and spore germination were maximum for all isolates at 21°C. The development of *B. cinerea* was significantly affected by high temperatures. A total inhibition of mycelial growth at 30°C and spore germination at 32°C were observed.

Keywords: Tomato, *Botrytis cinerea*, temperature variation, aggressiveness, mycelial growth.

INTRODUCTION

Les conditions de culture des tomates sous serres fournissent un environnement idéal pour le développement des maladies fongiques. La pourriture grise, causée par *Botrytis cinerea*, est l'une des maladies les plus importantes affectant les cultures de tomates dans les serres chauffées et non chauffées, où il infecte habituellement les feuilles (Baptista, 2007 ; Dik et Wubben, 2007). La chaleur et le taux d'humidité élevé dans les serres favorisent le développement de la maladie. Les contaminations par *B. cinerea* sont plus virulentes dans les cultures sous serres soumises à des températures modérées, une humidité relative élevée et de l'air stagnant (Baptista *et al.*, 2011). La maîtrise de *B. cinerea* a toujours été difficile, plus particulièrement sous serre. Cette situation est favorisée par plusieurs facteurs à savoir le climat, les plantes qui sont particulièrement réceptives (disposant d'organes succulents, blessées par la taille ou l'ébourgeonnage), aptitude particulière de ce champignon à s'adapter rapidement aux traitements chimiques utilisés. La pourriture grise pourrait être responsable de pertes de production de 20% et les traitements fongicides contre *B. cinerea* pourraient représenter environ 60% du total des fongicides utilisés durant une saison de culture (Prieto *et al.*, 2003).

B. cinerea est caractérisé par sa capacité d'adaptation, ce qui limite les méthodes de lutte entreprises (Baptista, 2007). La variabilité génétique de *B. cinerea* lui a permis de s'adapter à de nombreux fongicides qui lui ont été opposés, générant des phénomènes de résistance. Plusieurs études ont démontré la variabilité phénotypique de *B. cinerea* pour plusieurs traits de vie tels la morphologie, l'agressivité, l'effet des facteurs environnementaux et la résistance aux différents fongicides (Barnes, 1930 ; Lorbeer et Vencelli, 1990 ; Martinez *et al.* 2009 ; Ajouz *et al.*, 2011), ainsi que la variabilité génétique entre les populations de *B. cinerea* (Fournier *et al.*, 2005 ; Karchani-Balma *et al.*, 2008 ; Decognet *et al.*, 2009 ; Fekete *et al.*, 2012 ; Adjebli *et al.*, 2015). La difficulté dans la gestion de la pourriture grise a augmenté ce qui a suscité le besoin de rechercher des méthodes alternatives. L'adoption de techniques culturales, comme la ventilation et le chauffage des serres, s'est révélée très efficace (Jarvis, 1992).

Dans les serres de tomate, le contrôle des paramètres climatiques est lié à la température de l'air et l'humidité relative, car les producteurs estiment que ces deux facteurs sont les plus importants et influencent la productivité des cultures. Le contrôle des conditions environnementales est une préoccupation majeure des ingénieurs et des phytopathologistes pour éviter les épidémies. La lutte climatique telle que le pilotage des températures peut aider à limiter les conditions favorables au développement de la pourriture grise pendant la croissance de la tomate et ainsi minimiser l'utilisation de fongicides (Yunis *et al.*, 1990 ; Baptista, 2007).

Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur l'impact de la température sur le développement des isolats de *B. cinerea*, mais peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la variabilité entre les isolats de *B. cinerea* et leur capacité à tolérer des températures élevées. Les objectifs principaux de cette étude portent par conséquent sur : (i) l'effet de températures élevées sur l'agressivité de *B. cinerea* sur des folioles de tomate en conditions contrôlées ; (ii) la capacité de l'inoculum secondaire produit à des températures élevées à infecter des folioles de tomates ; (iii) la vérification de l'existence d'une tolérance aux températures élevées entre les isolats de *B. cinerea* collectés en Algérie, en France ou en Norvège.

MATERIEL ET MÉTHODE

CHOIX DES ISOLATS

Un ensemble de 9 isolats de *B. cinerea* a été collecté à partir de tomates sous serres (chauffées et non chauffées) et recueillies sur différents organes de la plante et dans trois régions géographiques différentes (Tableau I). La purification des isolats a été effectuée par la technique d'isolement monospore en utilisant un milieu de culture eau gélosée (1,5% agar Difco) (Leyronas *et al.*, 2012). La conservation des isolats est assurée à -20 °C, dans un tampon phosphate (0,06 M) contenant 20% (v/v) de glycérol.

Caractérisation morphologique

La caractérisation morphologique des souches de *B. cinerea* est réalisée sur milieu PDA. Pour chaque souche, un implant mycélien est déposé au centre d'une boîte de Pétri (90 mm de diamètre), les implants sont incubés à 21°C pendant 7 jours, à l'obscurité. L'aspect macroscopique des colonies de *B. cinerea*, la répartition des spores et des sclérotés sur la surface de milieu sont examinés selon la méthode décrite par Mirzaei *et al.* (2009). La classification est établie selon les travaux de Martinez *et al.* (2003).

Tableau I : Origine des isolats de *B. cinerea* collectés à partir des serres de tomates
Table I: Origin of *B. cinerea* isolates collected from tomatoes in greenhouses

Isolat	Origine d'isolement
ALG 88, ALG 89, ALG 90, ALG 92, ALG 101, ALG 108	Bejaia, Algérie
BC 01, BC 21	Avignon, France
BC 142	Norvège

Effet de la température sur la croissance mycélienne *in vitro*

La vitesse de croissance mycélienne a été étudiée à quatre températures différentes (21, 28, 30 et 32 °C) sur le milieu de culture PDA (39 g/l ; Laboratoire Difco, Detroit, Michigan, USA). Les expériences ont été menées dans des boîtes de Pétri (diamètre-90 mm) inoculés avec un implant mycélien de 3 mm de diamètre, le mycélium en contact direct avec le milieu de culture. Les boîtes ensemencées ont été incubées à l'obscurité pendant 7 jours. Deux diamètres perpendiculaires par colonie ont été mesurés quotidiennement sans avoir à ouvrir les boîtes et la vitesse de croissance a été calculée sur la base de ces deux diamètres. Trois répétitions (=3 boîtes) ont été utilisées pour chaque combinaison 'isolat-température' ; l'expérience a été menée trois fois simultanément.

Effet de la température sur la germination des spores *in vitro*

La germination des spores a été évaluée sur des lames contenant du milieu de culture PDA (39 g/l ; Laboratoire Difco, Detroit, Michigan, USA). Les lames ont été inoculées avec 10 µl d'une suspension contenant 10⁶ conidies par ml et ont été incubées pendant 10 heures dans l'obscurité à 21, 28, 30 et 32 °C. Sur chaque lame, un total de 100 conidies a été examiné et le nombre de spores germées a été enregistré. Une conidie germée a été comptée si le tube germinatif est au moins aussi long que la longueur de spores. Cinq lames ont été utilisées pour chaque combinaison 'isolat-température' et l'ensemble de l'expérience a été menée deux fois simultanément.

Pour les tests de comparaison des moyennes, une analyse statistique a été menée en utilisant le module ANOVA implémenté dans le logiciel STATISTICA 5.5. Le test de comparaison

multiple de Newman-Keuls a été ensuite utilisé pour la comparaison du développement de *B. cinerea* (croissance mycélienne, germination des conidies) des différents isolats à différentes températures.

Agressivité des isolats de *B. cinerea* sur folioles de tomate

L'agressivité des isolats de *B. cinerea* a été étudiée sur des folioles de tomates (*Lycopersicon esculantum* v. Monalbo). L'inoculum a été produit à 21 °C sur milieu PDA (39 g/l ; Laboratoire Difco, Detroit, Michigan, USA). Les tests ont été effectués sur des folioles de tomates âgées de six à huit semaines. Des folioles de taille uniforme ont été recueillies à partir de feuilles de tomates, puis placés dans des boîtes en plastique transparente avec un fond humidifié avec du papier absorbant. Trois folioles par couple 'isolat-température' ont été utilisées, les folioles ont été inoculées avec un implant mycélien âgé de trois jours pour chaque isolat.




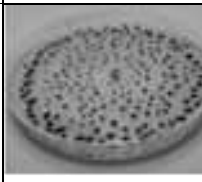
Les boites contenant les folioles inoculées ont été incubées dans des enceintes climatiques à l'obscurité. L'expérience a été répétée trois fois indépendamment. Les notations ont été effectuées après 24 h d'inoculation et pendant cinq jours suivant l'inoculation. Les surfaces des lésions obtenues ont été mesurées pour chaque boîte par le logiciel Asses 2.0 (APS Press, St Paul, Minnesota, USA) qui consiste en une prise de photo toutes les 24 heures analysée ensuite par ce dernier logiciel.

RESULTATS

L'étude de la morphologie des isolats de *B. cinerea* collectés à partir de plusieurs origines différentes (Algérie et Europe) a montré l'existence de différents morphotypes 'mycélien' et 'sclérotien'. Il est à noter que tous les isolats de *B. cinerea* collectés à Bejaia (Algérie) sont de type 'mycélien', tandis que les isolats collectés en France et en Norvège présentent un aspect 'sclérotien' (Tableau II).

Tableau II : Classification phénotypique des isolats de *B. cinerea* sur milieu PDA

Table II: Phenotypic classification of *B. cinerea* isolates on PDA medium

Isolats	ALG 89	ALG 88, ALG 90, ALG 92, ALG 101, ALG 108	BC 01, BC 21	BC 142
Aspect sur boîte de Pétri				
Phénotype	M 1	M2	M3	M4
Mycélium	rasant	aérien	masses mycéliennes	épais et dense
Sporulation	0	1 ou 2	1 ou 2	1
Sclérotos	0	0	0	0

Effet de la température sur la de croissance mycélienne *in vitro*

L'effet de la température sur la croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* est déterminé à trois températures : 21, 28 et 30 °C. Une différence significative de croissance mycélienne entre les isolats à une même température a été observée. L'augmentation de la température d'incubation diminue la croissance de tous les isolats étudiés (Figure 1).

Les neuf isolats utilisés dans cette étude ont été capables de croître sur le milieu PDA à une température de 30 °C et tous ont été inhibés à 32 °C. L'analyse de la variance à deux facteurs a montré que la croissance du mycélium diffère de manière significative ($P < 0,0001$) entre les isolats, elle est significativement influencée par les températures ($P < 0,0001$) (Tableau III), avec une interaction significative entre les isolats et la température ce qui suggère que les différents isolats ont été affectés différemment par la température. A 32 °C, aucune croissance mycélienne n'a été observée pour tous les isolats testés. En revanche, il n'y a pas d'interaction entre l'effet de la température et l'origine des souches sur la croissance mycélienne (Tableau III).

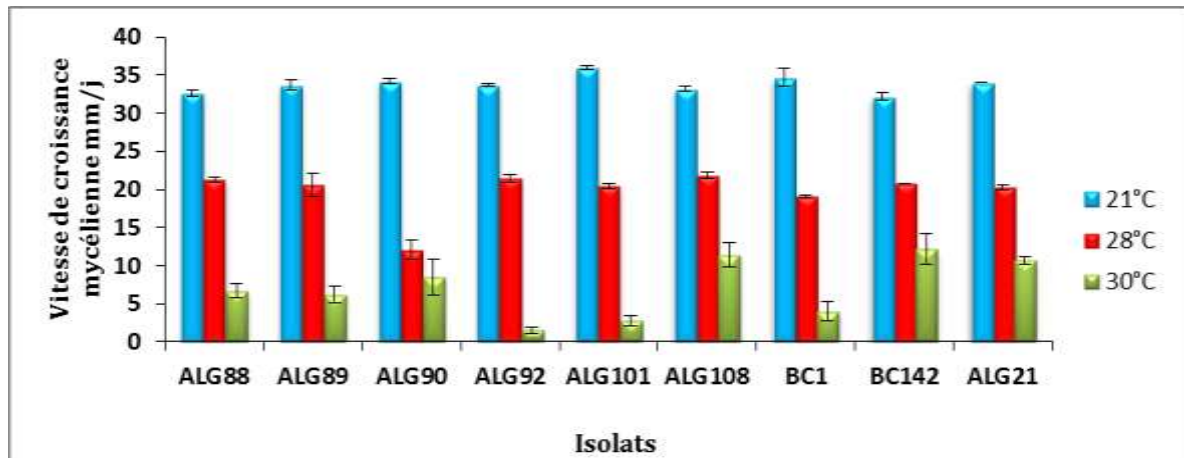


Figure 1 : Vitesses de croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* à différentes températures. Les barres verticales (I) représentent l'erreur standard.

Figure 1: Mycelial growth rate of *B. cinerea* isolates at different temperatures, (I) standard error.

Tableau III : Analyse de la variance de la vitesse de croissance mycélienne des isolats de *B. cinerea* sur milieu PDA

Table III: Analysis of variance of mycelial growth rate of *B. cinerea* isolates on PDA medium

Source	ddl	F de Fisher	Pr > F
Origine	1	0,041	0,840
Température	2	653,223	< 0,0001
Origine x Température	2	0,463	0,631

ddl. degrés de liberté

Effet de la température sur la germination des spores *in vitro*

Une germination optimale des spores a été observée à 21 °C pour tous les isolats étudiés, la germination des spores a été significativement réduite à partir de 28 °C (Figure 2). Aucune germination n'a été observée à 32 °C pour tous les isolats. En revanche, le taux de germination a été élevé pour tous les isolats à 21 °C ($94,0 \pm 1,5\%$). À 28 °C et 30 °C, la germination a été globalement réduite à $50,2 \pm 7,3\%$ et $20,3 \pm 6,3\%$, respectivement, tandis que l'effet de la température diffère significativement entre tous les isolats et à différentes températures (Tableau IV).

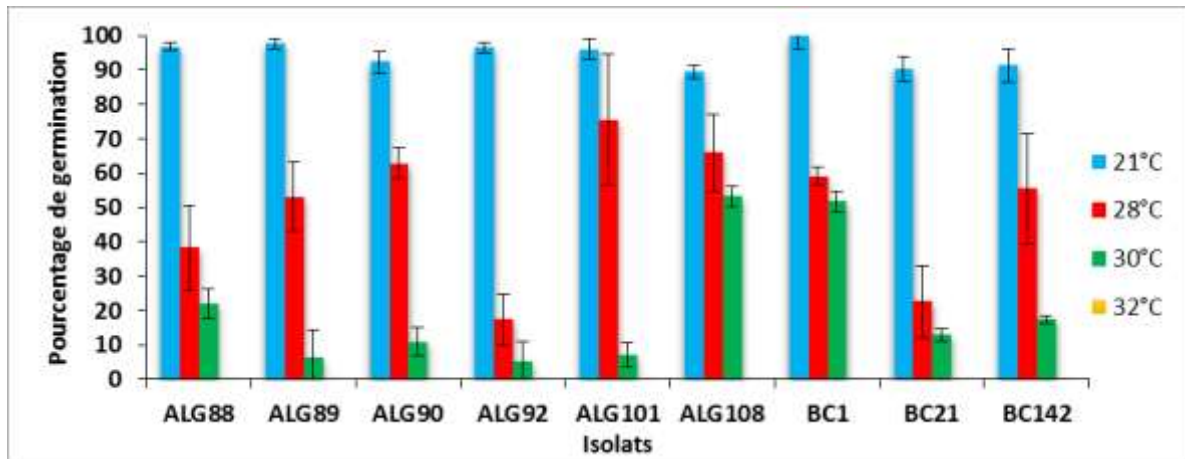


Figure 2: Pourcentage de germination des spores des isolats de *B. cinerea* à différentes températures. Les barres verticales (I) représentent l'erreur standard.

Figure 2: Percentage of germination of *B. cinerea* isolates at different temperatures, (I) errors standard.

Le pourcentage de germination des spores des isolats de *B. cinerea* est significativement influencées par la température ($P < 0,0001$; tableau IV). Par contre, aucun effet significatif n'a été détecté entre les isolats selon l'origine des isolats testés et l'interaction entre le site d'isolement et la température sur le pourcentage de germination des spores des isolats de *B. cinerea* n'est pas significative ($P > 0,05$; tableau IV).

Tableau IV. Analyse de la variance du pourcentage de germination des spores des isolats de *B. cinerea* sur milieu PDA

Table IV: Analysis of variance of mycelial growth rate of *B. cinerea* isolates on PDA medium

Source	ddl	F de Fisher	Pr > F
Origine	1	0,677	0,411
Température	3	273,877	< 0,0001
Origine X Température	3	0,678	0,566

ddl. degrés de liberté

Agressivité des isolats de *B. cinerea* sur folioles de tomate

Tous les isolats de *B. cinerea* ont produit des lésions croissantes sur folioles de tomate (Figure 3). Les lésions ont commencé à apparaître, à partir de 12h après inoculation, sous forme de petites taches grises qui s'agrandissent en fonction du temps, avec des vitesses variables de propagation selon le niveau d'agressivité des isolats testés (Figure 4).



Figure 3 : Lésions causées par les isolats de *B. cinerea* sur les folioles de tomate après 96h d'incubation.

Figure 3: Lesions caused by isolates of *B. cinerea* on tomato leaflets after 96h of incubation.

Les isolats de *B. cinerea* testés ont montré des niveaux différents d'agressivité sur les folioles de tomate ($P < 0.05$). Les isolats ALG 108 et ALG 101 ont été les isolats les plus agressifs avec des AUDPC de 3529 et 3282 respectivement, tandis que l'isolat BC 21 a été le moins agressif (Figure 4).

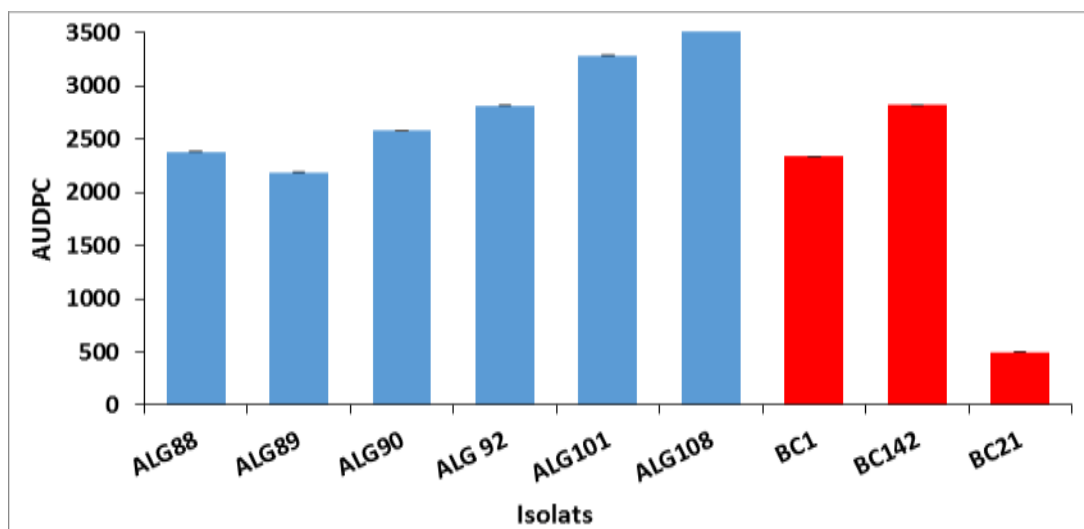


Figure 4 : Agressivité des isolats de *B. cinerea* sur folioles de tomate exprimée en AUDPC. Les barres verticales représentent l'erreur standard.

Figure 4: Aggressiveness isolates of *B. cinerea* on tomato leaflets expressed as AUDPC. Vertical bars represent standard error.

L'analyse statistique entre l'agressivité des isolats de *B. cinerea* testés a montré différents niveaux d'agressivité, les isolats collectés dans la région de Bejaia ont montré une grande agressivité comparés à ceux collecté en France et en Norvège ($P < 0.05$).

DISCUSSION

L'objectif de ce travail de recherche vise à comprendre la variabilité montrée par *B. cinerea* en étudiant l'effet de la température sur le développement de *B. cinerea* et les niveaux d'agressivité des isolats collectées dans différentes régions sur des folioles de tomate. Une grande variabilité a été observée entre les isolats vis-à-vis des températures élevées testées sur la croissance mycélienne et

la germination des spores. Plusieurs études antérieures ont évalué l'impact de la température sur le développement de *B. cinerea* et confirment les résultats obtenus dans cette étude. En effet, Boneche et Pucheu, (1986) ont étudié l'effet de la température sur la croissance de *B. cinerea* sur un milieu gélosé. Entre 5°C et 22°C, la vitesse de croissance de *B. cinerea* augmente avec la température. Au-dessus de 25°C, le développement du champignon est ralenti et il y a très rapidement inhibition totale. Il n'a pas été possible d'obtenir la germination des conidies pour des températures supérieures à 35°C.

A des températures favorables (15 °C, optimale 20 et 25 °C), les isolats ont montré des différences significatives de vitesse de croissance mycélienne. À des températures limites inférieure et supérieure (5 et 28 °C), la vitesse de croissance mycélienne de *B. cinerea* a été significativement affectée. Les différences entre les isolats ne sont significatives qu'à 20 °C, mais pas aux températures limites (Martinez *et al.* 2003). La germination des spores a été supposée entre 5 et 30 °C. Salinas *et al.* (1989) ont montré que la germination de conidies et la formation de lésions nécrotiques sur des fleurs de Gerbera sont observées à une gamme de températures comprises entre 4 et 25°C avec un optimum allant de 18°C à 25°C et selon Latorre *et al.* (2002) les températures optimales sont comprises entre 15 à 20 °C.

Les résultats d'agressivité obtenus coïncident avec ceux obtenus dans d'autres études réalisées sur différentes parties aériennes de différentes plantes hôtes. L'étude des traits de pathogénicité des isolats de *B. cinerea* provenant de fruits de fraise ont montré des variations de degrés de virulence des trois isolats étudiés sur les différentes parties de la plante de fraise à côté de différences dans leurs caractéristiques morphologiques en culture (Valiuskaite *et al.* 2010). La comparaison de l'agressivité sur tomate de 15 souches de Botrytis isolées à partir de l'air et deux souches de référence révèle que ces deux dernières montrent une agressivité supérieure aux 15 souches étudiées. Cela est due selon les auteurs au fait que les spores de *B. cinerea* isolées à partir de l'air ont été peut être endommagées par différentes contraintes physiques rencontrées pendant la dissémination à savoir, le taux faible d'humidité, les températures élevées de l'air ou leur exposition aux rayons solaires (Decognet *et al.* 2009).

Shen *et al.* (2009) ont réalisé une étude sur la pathogénicité de 26 souches de *B. cinerea* sur les feuilles de concombre. Ces auteurs ont remarqué une différence importante de pathogénicité entre les souches testées. Les conditions de culture influencent l'apparition et la progression de la maladie. En effet, dans des serres non chauffées, la plupart des lésions sur les tiges provenaient de la progression de l'agent pathogène le long des pétioles infectés. L'infection des feuilles proches de la tige nécessite 6 semaines pour qu'elle soit établie. Influence de l'environnement sur la progression de *B. cinerea* sur les pétioles a été également déterminé. Dans la gamme de température allant de 5 à 30°C, plus la température augmente, plus rapide est la progression de la maladie. Le champignon a progressé plus rapidement sur les pétioles de tomate incubés à haute pression de vapeur plutôt qu'à une pression de vapeur faible (Shtienberg *et al.* 1998).

CONCLUSION

L'étude phénotypique réalisée sur le type du morphotype a montré une grande variabilité entre les isolats testés. Deux principaux morphotypes ont été identifiés, un type mycélien et un type sclérotien avec une prédominance de type sclérotien pour les isolats collectés en France et en Norvège. Quant aux isolats collectés à Bejaia (Algérie), ils sont exclusivement du type mycélien. L'étude de l'effet de la température sur le développement des isolats de *B. cinerea* (croissance mycélienne et germination des spores) *in vitro* a montré que 21°C est la température optimale de développement pour tous les isolats. La croissance mycélienne et la germination des spores est significativement réduite en fonction de l'augmentation de la température et enfin une inhibition totale du développement est obtenue à 32 °C. Les résultats obtenus dans le test d'agressivité des isolats de *B. cinerea* sur des folioles de tomates ont montré une hétérogénéité entre les isolats

testés, avec une différence significative entre les isolats collectés à Bejaia et ceux obtenus en France et en Norvège.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le Laboratoire d'Ecologie Microbienne, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Algérie. Nous remercions infiniment le Dr Philippe Nicot pour la fourniture des isolats collectés en France et en Norvège.

BIBLIOGRAPHIE

- Adjebli A., Leyronas C., Aissat K., Nicot P.-C., 2015. Comparison of *Botrytis cinerea* populations collected from tomato greenhouses in Northern Algeria. *Journal of Phytopathology*, 163, 124-132.
- Ajouz S., Decognet V., Nicot P.-C., Bardin M., 2011. Microsatellite stability in the plant pathogen *Botrytis cinerea* after exposure to different selective pressures. *Fungal Biology*, 114, 949-954.
- Baptista F.-J., 2007. Modelling the climate in unheated tomato greenhouses and predicting *Botrytis cinerea* infection. Phd Thesis. Universidade de Evora. Portugal.
- Baptista F.-J., Bailey B.-J., Meneses J.-F., 2011. Development of a warning system for controlling *Botrytis cinerea* in unheated tomato greenhouses. *Acta Horticulturae*, 893, 1263-1269.
- Barnes B., 1930. Variations in *Botrytis cinerea*, Pers., Induced by the Action of High Temperatures. *Annals of Botany*, 44, 825-858.
- Boneche B., Pucheu B., 1986. Influence de divers effecteurs sur le développement de *Botrytis cinerea* en milieu synthétique : définition d'un cycle conidien. *Vitis*, 25, 21- 30.
- Decognet V., Bardin M., Trottin-Caudal Y., Nicot P.-C., 2009. Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology*, 99, 185-193.
- Dik A.-J., Wubben J.-P., 2004- Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Press, pp 319–333.
- Fournier E., Giraud T., Albertini A., Brygoo Y., 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*, 97, 1251-1267.
- Jarvis W.-R., 1992. Managing diseases in greenhouse crops. American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- Karchani-Balma S., Gautier A., Raies A., Fournier E., 2008. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology*, 98, 1271-1279.
- Latorre B.-A., Rioja M.-E., Lillo C., 2002. Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. *Ciencia e investigación agraria*, 29, 3, 145-151.
- Leyronas C, Duffaud M, Nicot P.C., 2012. Compared efficiency of the isolation methods for *Botrytis cinerea*, Mycology. *International Journal of Fungal Biology*, 4, 221–225.
- Lorbeer J.-W., Vincelli P.-C., 1990. Efficacy of dicarboximide fungicides and fungicide combinations for control of botrytis leaf-blight of onion in new-york. *Plant Disease*, 74, 235-237.
- Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., Fermaud M., 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 479-488.

Martinez J.-A., Gomez-Bellot M.-J. Banon S., 2009. Temperature-dependent growth of *Botrytis cinerea* isolates from potted plants. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 74, 729-738.

Prieto R., Rodrigues S., Henriques S., 2003. Protecção integrada de tomate em estufa. Relatório Projecto Agro 4-Desenvolvimento de técnicas de produção integrada na horticultura protegida e de ar livre na região Oeste. 2 pp.

Salinas J., Glandorf D., Picavet F., Verhoeff K., 1989. Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 95, 51-64.

Shen D., Li B., Li X., Song J., Shi Y., Wang H., Shen D., Li B.-J., Li X.-X., Song J.-P., Shi Y.-X., Wang H.-P., 2009. Pathogenicity analysis of different *Botrytis cinerea* strains in cucumber. China. *Vegetables*, 25-28.

Shtienberg D., Elad Y., Niv A., Nitzani Y., Kirshner B., 1998. Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 753-763.

Valiuskaite A., Surviliene E., Baniulis D., 2010. Genetic diversity and pathogenicity traits of *Botrytis spp.* isolated from horticultural hosts. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97, 85-90.

Yunis H., Elad Y., Mahrer Y., 1990. Effects of air temperature, relative humidity and canopy wetness on grey mould of cucumbers in unheated greenhouses. *Phytoparasitica*, 3, 203-215.