

## Caractérisation d'une collection d'isolats de *Stemphylium solani* Weber parasite de l'aubergine africaine et espèces voisines

### Characterization of *Stemphylium solani* Weber strains from Scarlet eggplant and related species

Ndir M.S.<sup>1\*</sup>, Assigbetse K.B.<sup>2</sup>, Geiger J.P.<sup>2</sup>, Nicole M.<sup>2</sup> et Ba A.T.<sup>1</sup>

#### Résumé

Vingt neuf souches fongiques, isolées à partir de macules foliaires d'aubergine africaine et espèces voisines présentent, sur milieu solide, les mêmes caractères morphologiques. Ces souches ont été caractérisées par analyse de l'opéron ribosomique en présence d'une souche référence de la mycothèque de Montfavet venant de feuilles de tomate. L'amplification de la région des espaceurs internes transcrits de l'opéron ribosomique avec deux amorces universelles donne pour tous les isolats un seul fragment. Il est d'environ 500 paires de bases pour l'isolat de Montfavet et 550 paires de bases pour les 29 isolats du Sénégal. Les produits d'amplification ont été digérés par différentes enzymes de restriction et donnent des profils similaires pour les isolats du Sénégal. La région des espaceurs internes transcrits d'une souche choisie au hasard parmi celles du Sénégal a été séquencée. L'alignement de la séquence obtenue dans la banque de données GenBank montre respectivement 96% et 98% d'homologies avec la séquence de la même région chez *Stemphylium botryosum* et *Stemphylium solani* du Brésil. L'outil moléculaire utilisé dans le présent travail a permis de confirmer la proximité entre les isolats du Sénégal et leur identification.

#### Mots clés :

*Stemphylium solani* – Biodiversité – PCR/RFLP – Séquençage.

#### Abstract

Twenty nine fungal isolates from the scarlet eggplant and related species with the same morphological characters and a strain from tomato leaves in Montfavet were characterized using ribosomal operon analyse. Amplification of the internal transcribed spacers from this operon with two universal primers resulted in a single fragment for all the strains. This fragment was about 500 bases pairs length for the Montfavet isolate and 550 bases pairs for senegalese isolates. Amplified products were digested with different restriction enzymes and provided a same pattern for senegalese strains. Alignment of the nucleotide sequence of one of these senegalese strains amplification products in GenBank database showed 96% then 98% similarities with the sequence of the same region from *S. botryosum* and Brasil *S. solani*. The molecular analysis corroborated the morphological characteristics and provides a rapid procedure for Senegalese strains identification

#### Keywords:

*Stemphylium solani* –Biodiversity – PCR/RFLP – Sequencing.

<sup>1\*</sup> **Correspondant.** Ndir Maymouna Sy, Laboratoire de Biotechnologies des Champignons (LBC), Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta DIOP (UCAD), BP 5005 Dakar-Fann, Sénégal.

E-mail : [mndir@ucad.sn](mailto:mndir@ucad.sn).

<sup>2</sup> Laboratoire de Phytopathologie Tropicale, UR 075 – Résistance des Plantes. Institut de Recherche pour le Développement (IRD) BP 5045 F – 34032 Montpellier cedex 1.

## 1. Introduction

La maladie des taches anguleuses des feuilles de l'aubergine africaine (*Solanum aethiopicum*.L.) est à l'origine d'importantes pertes de récolte au Sénégal (Benvenuti [3]). Le champignon responsable a été identifié comme étant *Stemphylium solani* W. (Ndir et al., [18]). Cette identification est basée sur les caractéristiques culturales telles que la morphologie des spores. Cependant quatre espèces du genre *Stemphylium* sont très souvent isolées et décrites à partir de macules foliaires de la tomate (*Lycopersicon esculentum*). Ce sont : *S. solani* W.; *S. floridanum* H. et W.; *S. botryosum* Wallr. et *S. vesicarium* Wallr. (Blancard et al., [4] ; Behare et al., [2]). Des études associent ces quatre espèces à de nombreuses familles botaniques (Clériveret [7] ; Cowling et al., [9] ; Blancard et al., [4] et Suheri et al., [21]). L'approche moléculaire, portant sur les séquences de l'opéron ribosomique, est de plus en plus utilisée en taxonomie fongique (Hintz et al., [14] et Neuvéglise et al., [17]). L'analyse de ces séquences, notamment celle de la région ITS (internal transcribed spacer), permet de détecter une variabilité génétique entre espèces différentes ou entre souches d'une même espèce. Elle a permis d'étudier les relations phylogénétiques entre espèces appartenant à différents genres tels que *Stemphylium*, *Alternaria*, et *Ulocladium* (Pryor et al., [19]). Elle a également permis une bonne discrimination entre espèces du genre *Fusarium* (Edel et al., [10]) et espèces du genre *Venturia* (Bruno et al., [5]). Le but de la présente étude est de caractériser génétiquement l'agent responsable de la stemphyliose de l'aubergine africaine. Pour ce faire, des isolats provenant de plants de cette aubergine et d'espèces apparentées, tous identifiés à *S. solani* par des critères morphologiques ont été comparés en utilisant des outils moléculaires tels que le polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP) et le séquençage de l'ITS de l'ADNr. L'objectif de ce travail est

d'obtenir des marqueurs spécifiques à l'espèce fongique responsable de la maladie. Ces marqueurs permettront une identification rapide et sûre des isolats de l'espèce *S. solani* et de détecter une éventuelle variabilité entre ces isolats. Cette étude a déjà été entreprise pour d'autres champignons tels que *Colletotrichum* (Martin et al., [16]) et a montré que la caractérisation de la région ITS constitue un bon marqueur génétique pour l'identification des isolats fongiques à partir d'un minimum de mycélium (White et al., [23]).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Matériels fongiques et conditions de culture

Le pathogène a été isolé sur milieu Potato-Dextrose-Agar (PDA) à partir de nécroses foliaires de plants de *Solanum aethiopicum*, de *Solanum melongena* et de *Lycopersicon esculentum* provenant de différentes zones de maraîchage au Sénégal. Les isolats collectés sont présentés dans le tableau I. Des isolats monospores sont cultivés en boîte de Pétri sur milieu solide PDA à 25°C à l'obscurité pour les observations morphologiques. Pour la production de mycélium, chaque monospore est cultivée en fiole de Roux sur 200 ml de milieu Potato-Dextrose-Broth (PDB) pendant sept jours à 25°C à la photopériode naturelle. Après filtrage sur de la toile à Butter, le mycélium est rincé à l'eau stérile, séché, congelé à -20°C, puis lyophilisé.

### 2.2 Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir des lyophilisats selon le protocole de Lee et al., [15] modifié. Cent milligrammes de mycélium broyé sont mélangés à 500 µl de tampon de lyse (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 50mM pH 8,0, SDS 3% et β<sup>-</sup> mercaptoéthanol 1%) puis incubés au bain-marie à 65°C pendant 1 heure. Le mélange est traité avec 500 µl de Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique dans les proportions (25/24/1) suivi d'une centrifugation 15mn à 13000g pour

éliminer les protéines. L'ADN est précipité dans la phase aqueuse en présence de 10% d'Acétate de sodium (3M, pH 8) et 0,54 volume d'Isopropanol suivi d'une centrifugation à 1200g pendant 3mn. Le culot d'ADN est lavé avec 300 µl d'Ethanol 70%, centrifugé à nouveau, séché puis repris dans 100 µl de tampon Tris-HCl, EDTA. Il est redissout à 65°C et conservé à -20°C.

### 2.3 Amplification enzymatique in vitro de l'ITS de l'ADNr

Les régions ITS de l'ADNr des 30 isolats ont été amplifiées en ajoutant 2 µl d'ADN matrice à 25 µl d'un mélange réactionnel contenant 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM d'un mélange de nucléotides, 40pmoles de chaque amorce ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') décrites respectivement par (Gardes *et al.*, [12] et par White *et al.*, [23]), et 2 unités d'enzyme (Taq polymérase). Un témoin sans ADN est réalisé pour tester la présence d'éventuels contaminants dans les réactifs et tampons. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (PTC-100) programmé pour une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 5mn suivie de 30 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95°C pendant 30s, une hybridation à 55°C pendant 30s et une extension à 72°C pendant 1mn. Une extension finale à 72°C pendant 15 minutes termine la réaction. Les échantillons sont conservés à 4°C. Les fragments d'ADN amplifiés sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1,4% dans du tampon TAE (Tris-Acétate 40mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0). Un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, Eurogentec) permet de déterminer la taille des amplifiats révélés sous lumière UV et photographiés.

### 2.4 Digestion des ITS par des enzymes de restriction

Les réactions de digestion sont réalisées avec 10 µl de produit d'amplification et 10 µl d'un mélange contenant 2 µl du tampon

correspondant à l'enzyme (10x), 6 µl d'eau filtrée stérile et 2 µl de l'enzyme (20 unités/µl). Les digestions sont effectuées à 37°C pendant 3 heures avec les enzymes Alu1, Bsp1, Msp1 et EcoR1, choisies parmi celles à coupure fréquente sur les génomes fongiques. Les fragments de restriction sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1,5% dans un tampon TAE en présence d'un contrôle négatif et d'un marqueur de poids moléculaire. Toutes les amplifications et digestions sont effectuées 2 fois.

### 2.5 Séquençage de l'ITS

La région ITS de l'isolat T5 et celle de l'isolat S3 choisi parmi ceux du Sénégal ont été amplifiées en grande quantité, purifiées sur un kit de purification Wizard PCR prep (Promega) puis séquencées par la société Genome Express. Les séquences obtenues sont comparées à des séquences homologues de la banque de données GenBank.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1 Caractéristiques morphologiques

Tous les isolats monospores donnent, en sept jours de culture, un aspect ras uniforme, d'un gris sombre. L'observation microscopique montre des tubes mycéliens septés et des conidies ovales, cloisonnées avec des bouts obtus. Cette description est conforme à celle déjà donnée par Weber [22] sur *Stemphylium solani* isolé de feuilles de tomate *Lycopersicon esculentum* puis par Rieuf [20].

### 3.2 Amplification de la région ITS de l'ADNr

Pour tous les isolats du tableau I, la région des espaceurs internes transcrits (ITS) a été bien amplifiée en présence des amorces ITS1 et ITS4 et a donné un seul fragment d'ADN. Le fragment issu de l'amplification est long d'environ 500 pb pour l'isolat T5 et de 550 pb pour les isolats du Sénégal (fig. 1).

**Tableau 1:** Code, origine géographique, année d'isolement et hôte d'origine des trente isolats utilisés dans l'étude.

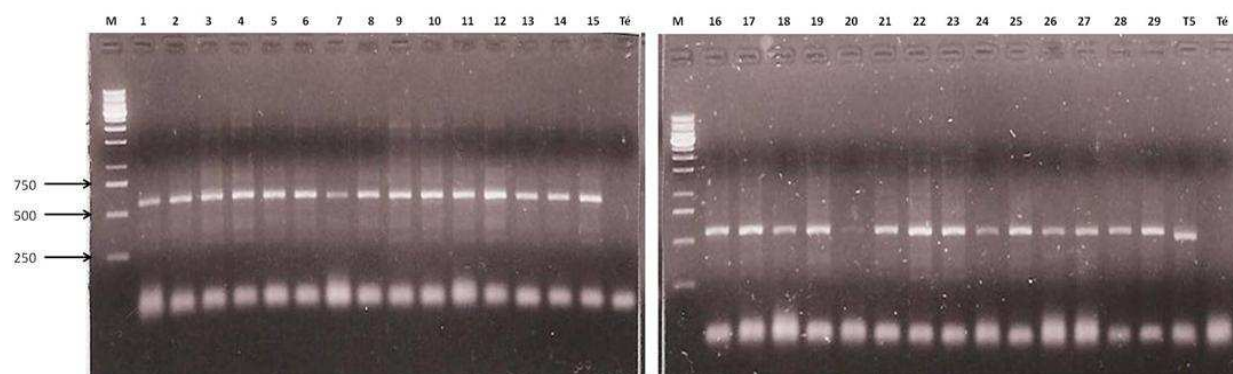
N°	Souche	Localité	Année	Hôte d'origine
1	S0	kourounar	1993	S.aethiopicum
2	S1	Jardin bot	1995	-
3	S2	thiaroye	1995	-
4	S2'	thiaroye	1995	-
5	S3	thiaroye	1995	-
6	S4	Pik.can	1995	-
7	S5	pikine	1995	-
8	S6	gorom	1995	-
9	S8	kayar	1995	-
10	S9	pout	1995	-
11	S10	thiès	1996	-
12	I1	malika	1997	S.melongena
13	K1	kourounar	1998	S.aethiopicum
14	K2	kourounar	1998	S.aethiopicum
15	SL1	s.louis	1996	S.melongena
16	SL2	s.louis	1996	S.melongena
17	III	s.louis	1998	S.aethiopicum
18	MBJ	mbao	1997	S. aethiopicum
19	MBA	mbao	1997	S.melongena
20	PJ2	pikine	1996	S.aethiopicum
21	PJ1	pikine	1996	S.aethiopicum
22	I	s.louis	1998	Lycopersicon
23	I2	malika	1997	S.aethiopicum
24	V	s.louis	1998	S.melongena
25	V'	s.louis	1998	S.melongena
26	Sip2	sips	1998	S.aethiopicum
27	Sip2'	sips	1998	S.aethiopicum
28	Sip3	sips	1998	Lycopersicon
29	Sip3'	sips	1998	Lycopersicon
30	T5	INRA-Montfavet	?	Lycopersicon

souches d'une collection, mais elle ne suffit pas à elle seule pour distinguer les souches les unes des autres. Par rapport à ce critère, les isolats du Sénégal constituent un groupe nettement différent de l'isolat T5.

### 3.3 Analyse des produits d'amplification

Chaque série de réactions de digestion donne un profil commun à tous les isolats du Sénégal et un profil différent pour l'isolat T5, confirmant ainsi la différence entre les deux types d'isolats. Parmi les enzymes utilisées, AluI donne avec les isolats du Sénégal un profil à deux bandes correspondant à environ 220 et 300 pb et deux bandes de longueur différente avec l'ITS de l'isolat T5 (fig. 2). Ce profil à deux bandes témoigne de la présence d'un site de restriction pour AluI sur la région ITS.

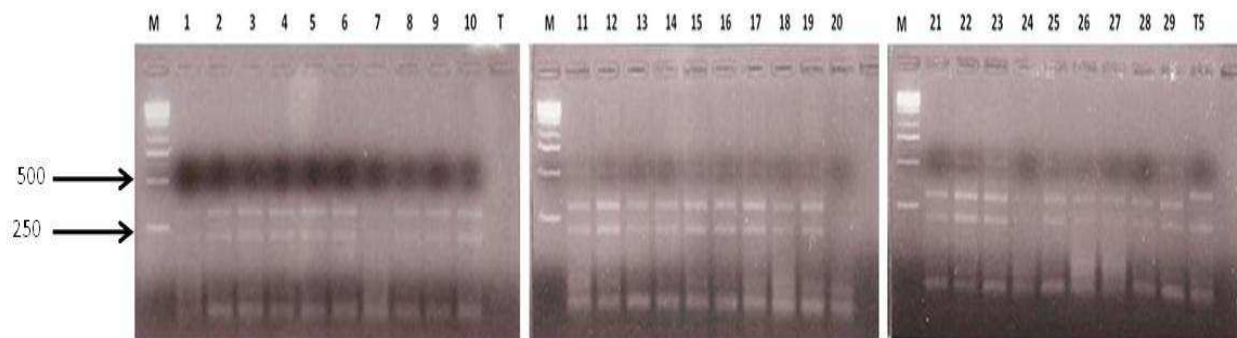
L'enzyme EcoRI donne une bande d'un peu plus de 260 pb pour les isolats du Sénégal et deux bandes plus ou moins égales à 250 pb pour l'ITS de T5 (fig. 3). L'unique bande obtenue avec EcoRI peut être le résultat d'une coupure située au milieu de l'ITS donnant deux fragments de même longueur pour les isolats du Sénégal.



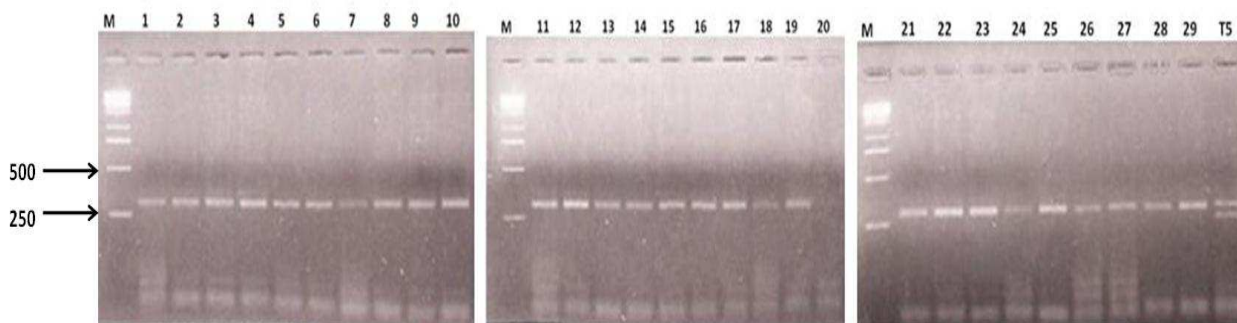
**Figure 1 :** Profil d'amplification obtenu avec les amorces ITS1 et ITS4. Les lignes 1 à 29 correspondent aux isolats du Sénégal, (T5) à l'isolat de la mycothèque de Montfavet, (Té) est un témoin sans ADN et (M) est un marqueur de poids moléculaire

La taille de la région ITS comprise entre 500 et 550 pb est en accord avec les résultats obtenus pour d'autres espèces végétales et fongiques (Gardes *et al.*, [12] et Collopy *et al.*, [8]). La différence dans la taille de l'ITS peut être utilisée comme critère de rapprochement ou non entre

D'autre part, l'absence de polymorphisme au sein des isolats du Sénégal révèle une grande proximité entre eux. Le même constat a été fait au sein d'une population d'isolats de *Phytophthora nicotianae* venant de *Capsicum annuum* en Tunisie (Allagui *et al.*, [1])



**Figure 2** : Profil de restriction de la région ITS obtenu avec l'enzyme de restriction AluI.  
Les lignes 1 à 29 correspondent aux isolats du Sénégal et T5 à l'isolat de la mycothèque de Montfavet.  
La ligne (M) correspond au marqueur de poids moléculaire.



**Figure 3** : Profil de restriction de la région ITS obtenu avec l'enzyme de restriction EcoRI.  
Les lignes 1 à 29 correspondent aux isolats du Sénégal et (T5) l'isolat de la mycothèque de Montfavet.  
La ligne (M) correspond au marqueur de poids moléculaire.

### 3.4 Séquençage de l' ITS.

Les séquences nucléotidiques des produits d'amplification des deux types d'isolats ont été identifiées (fig. 4). La séquence de la région ITS de T5 correspond à 500 pb et son alignement dans la banque de données *Genbank* montre des homologies avec la séquence de l'ITS du genre fongique appelé *Ampelomyces*. La séquence de la région ITS de l'isolat S3, choisi parmi ceux du Sénégal, compte environ 552 pb. Son alignement comparé à d'autres séquences ITS de *Genbank* révèle 96% d'homologies avec la séquence ITS de l'espèce *Stemphylium botryosum* (fig. 5) et 98% d'homologies avec l'ITS de *Stemphylium solani* du Brésil. Les similitudes notées entre la séquence ITS de l'isolat S3 et celle d'isolats appartenant au genre *Stemphylium* répertoriées dans *Genbank* confirment l'appartenance des 29 isolats du Sénégal à

l'espèce *Stemphylium solani* comme l'ont montré les observations morphologiques. D'autres travaux ont mis en évidence la valeur de la région ITS de l'ADNr dans les études taxonomiques à l'échelle de l'espèce (Bruns *et al.*, [6] et Gardes *et al.*, [13]). La caractérisation des isolats de l'espèce *S. solani* menée dans cette étude grâce à l'aptitude de la PCR à amplifier des fragments d'ADN spécifiques (Foster *et al.*, [11]), va être utilisée dans l'identification d'autres isolats fongiques. La séquence de la région ITS de la souche S3 a été soumise à *GenBank*, elle a été acceptée et répertoriée sous le numéro d'accèsion AF 426739.

**Seq 1**

G TTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAGTTAAAAAAATAGGGTCTTG  
 ATGGATGCTCAACCAAGGCTGATTCAAAGTGCAAGAATTGTGCTGCGCTCCGAAACC  
 AGTAGGTCGGCTGCCAATGATTTTAAGGCGAGTCTCGTGAGAGACAAGACGCCCAAC  
 ACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATAC  
 CAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACT&AATTCTGCAATTCACAC  
 TACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG  
 AAAGTTGTAATAATTACATTGTTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATG  
 GTTTGGTCCTGGTGGCCGGGCGAACCCGCCAGGAAACAAGAAGTGCGCAAAGACA  
 TGGGTGAATAATTCAGACAAGCTGGAGCCCTACCGAAGTAAGGTCCCAGCCCGCTT  
 TCATATTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTACCTTTCCGG.

**Seq 2**

T TAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAGAGTGTAAAAAATGTACTTT  
 GTGGACGTCGTCGTTGTGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATA  
 CGCCGGCTGCCAATCGTTTTGAGGCGAGTCTGCGCGCAGAGGCGAGACAAACACCCA  
 ACACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAAT  
 ACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC  
 ACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT  
 TGAAAGTTGTAATAATTAAGTTTTTTCAGACGCTGATTTCAATTACAAAGGGTTTAAG  
 TGTTGTCCAGCCGGTGGGCGAACCCACCGAGGAAACGAAGGTACTCAAAGACATGG  
 GTAAGAGATGGCAGGCAAAGCCCGCAACTCT AGGT AATGATCCTT.

**Figure 4** : Séquences de L'ITS des souches S3 (Seq 1) de *Stemphylium solani* du Sénégal et T5 (Seq 2).



**Alignement de séquences des rDNA ITS de *Stemphylium botryosum* SBY17068  
et de *Stemphylium solani* S3 du Sénégal.**

*St. so:* 1 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagtnnnnnnnntagggtcttgatg 60  
|||||  
*St. bo*525 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagtgaaaaaaatggtcttgatg 466

*St. so:* 61 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtcaagaattgtgctgcgctccgaaaccagtagg 120  
|||||  
*St. bo:*465 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtcaagaattgtgctgcgctccgaaaccagtagg 406

*St. so:* 121 tcggctgccaatgattttaaggcgagtctcgtgagagacaa-gacgccaacaccaagca 179  
|||||  
*St. bo:* 405 tcggctgccaatcattttaaggcgagtctcgtgagagacaaagacgccaacaccaagca 346

*St. so:* 180 aagcttgagggtacaaatgacgctcgaacaggcatgccctttggaataccaaagggcgca 239  
|||||  
*St. bo:* 345 aagcttgagggtacaaatgacgctcgaacaggcatgccctttggaataccaaagggcgca 286

*St. so:* 240 atgtgcgttcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcactacgtatcgatt 299  
|||||  
*St. bo:* 285 atgtgcgttcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcactacgtatcgatt 226

*St. so:* 300 tcgctgcgttcttcacatcgatgccagaaccaagagatccgttggtgaaagttgtaataatt 359  
|||||  
*St. bo:* 225 tcgctgcgttcttcacatcgatgccagaaccaagagatccgttggtgaaagttgtaataatt 166

*St. so:* 360 acattgttactgacgctgattgcaattacaaaaaggttatggtttggtcctggtggcc 419  
|||||  
*St. bo:* 165 acattgttactgacgctgattgcaattacaaaaaggttatggtttggtcctggtggc- 107

*St. so:* 420 gggcgaacccgcccaggaaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 479  
|||||  
*St. bo:* 106 ggcgaacccgcccaggaaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 48

*St. so:* 480 gctggagccctcaccgaagtaagggtcccagcccgtttcatattgtg 526  
|||||  
*St. bo:* 47 gctggagccctcaccgaggtgaggtcccacccgctttcatattgtg 1

Identities = 510/527 (96%), Positives = 510/527 (96%), Gaps = 3/527 (0%)

**Figure 5 :** Alignement de séquences des rDNA ITS de *Stemphylium botryosum* et de *Stemphylium solani* du Sénégal.

#### 4. Conclusion

Dans ce travail nous avons amplifié pour chaque isolat une région ITS de taille comprise entre 500 et 550 paires de bases. Les profils de restriction obtenus ont permis une caractérisation suffisante de l'ensemble des isolats et de rapprocher ceux du Sénégal dans un même groupe. L'analyse des séquences ITS a permis de confirmer l'identification des isolats du Sénégal

#### 5. Bibliographie

- [1] Allagui M.B. and Lepoivre P. Molecular and pathogenicity characteristics of *Phytophthora nicotianae* responsible for root necrosis and wilting of pepper (*Capsicum annuum*) in Tunisia. European Journal of Pathology. 2000, **106**, 887- 894.
- [2] Behare J., Laterrot H., Sarfatti M. and Zamir D. Restriction fragment length polymorphism mapping of the *Stemphylium* resistance gene in tomato. Molecular Plant-Microbe Interactions.1991, **4**, n° 5, pp.489-492.
- [3] Benvenuti G.C. Rapport semestriel d'activités (Juil.-Nov. 1983), CDH/ISRA, Dakar: 2-5.
- [4] Blancard D. et Laterrot H. Les *Stemphylium* rencontrés sur tomate. Phytopathol. Medit.1986, **25**, 140-144.
- [5] Bruno Le Cam, Devaux M. and Parisi L. Specific polymerase chain reaction identification of *Venturia nashicola* using internally transcribed spacer region in the ribosomal DNA. Phytopathology.2001, **91**, n° 9, 900-904.
- [6] Bruns T., White T.J. and Taylor J.W. Fungal molecular systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 1991, **22**, 525-564.
- [7] Clériveret A. Une maladie foliaire de *Solanum gilo* Raddli due à *Stemphylium floridanum* Hannon et Weber en Côte d'Ivoire. Agronomie. 1982, **2**, (10): 1015-1018.
- [8] Collopy P.D., Largeteau-Mamoun M.L., Romaine C.P. and Royse D.J. Molecular phylogenetic analyses of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. Phytopathology. 2001, **91**, n° 9, 905-912.
- [9] Cowling W. and Gilchrist D. G. Expression of pathogen virulence and host resistance during infection with *Stemphylium botryosum*. Phytopathology.1982, **72**, (1): 36-42.
- [10] Edel V., Steinberg C., Gautheron N. and Alabouvette C. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. Mycol. Res. 1996, **101**(2): 179-187.
- [11] Foster L. M., Kozak K. R., Loftus M. G., Stevens J. J. and Ross I. K. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. Mycol. Res.1993, **97** (7): 769-781.
- [12] Gardes M. et Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 1993, **2**: 113-118.
- [13] Gardes M. and Bruns T.D. ITS-RFLP matching for identification of fungi. Species Diagnostics Protocols. 1996, **50**: 177-186.
- [14] Hintz W.E.A., Anderson J.B. et Horgen P.A. Relatedness of the three species of *Agaricus* inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of the ribosomal DNA repeated and



- mitochondrial DNA. Genome. 1989, **32**, 173-178.
- [15] Lee S.B., Milgroom M.G. and Taylor J.W. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. Fungal Genet. Newsl. 1990, 23-24.
- [16] Martin M.P. and Garcia-Figueroles. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. European Journal of Plant Pathology. 1999, **105**, 733-741.
- [17] Neuvéglise C., Brygoo Y., Vercambre B. and Riba G. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. Mycol. Res. 1994, **98** (3), 322-328.
- [18] Ndir S.M. et Lacoste L. Aspects morphologiques et physiologiques de la stemphyliose de la tomate amère, *Solanum aethiopicum* L., du Sénégal. Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire. Série A, Sciences Naturelles. 1994, **47**, 33-41.
- [19] Pryor B.M., Gilbertson R.L. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. Mycological research. 2000, **104**: 111, 1312-1321; 36 ref.
- [20] Rieuf, P. Clé d'identification des champignons rencontrés sur les plantes maraîchères. INRA Publications. 1985, 59 pages.
- [21] Suheri H. and Price T.V. Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controlled environments. Plant Pathology. 2000, **49**, 375-382.
- [22] Weber G. F. Gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani* sp. Nov. Phytopathology. 1930, **20**, pp. 513-518.
- [23] White J.T., Bruns T.D., Lee S. and Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to Methods and Applications (ed. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. S. Sninsky and T J White), Ac Press; San Diego, California. 1990, pp. 315-322.