

156

à la

RAPPORT DE STAGE

1998

Maymouna Sy NDIR

Recherche de diversité au sein d'une population d'isolats de *Stemphylium solani* Weber au Sénégal.

IRSTOM DAKAR	
Date	24/02/2000.....
N	2 1279B.....
COTE COUVREUR RAP SOL NDI/4	

Stage effectué au laboratoire de Phytopathologie Tropicale De l'ORSTOM - Montpellier.

Sous la direction de Komi ASSIGBETSE

Dans le cadre d'un Contrat-Formation-Insertion (CFI) de l'ORSTOM

Durée du stage 3 mois (mi-Septembre à mi-Décembre)

091571

Fonds Documentaire IRD



010021679

Fonds Documentaire IRD

Cote : B * 21679 Ex unique

SOMMAIRE

	<i>page</i>
I INTRODUCTION	1
11 L'agent pathogène	
12 Symptomatologie	
II MATERIELS ET METHODES	3
21 Echantillonnage	
22 Culture du champignon	
23 Etude du pouvoir pathogène	
Mode d'inoculation de la plante	
24 Techniques moléculaires	4
241 Technique d'extraction de l'ADN au NaOH	
Protocole	
242 Extraction de l'ADN par la technique au Phenol/	
Chloroforme/Alcool isoamylique	
a - Culture de Stemphylium solani	
b - Extraction de l'ADN	
c - Vérification de l'état de pureté des ADN	
243 L'amplification par PCR	5
a - Principes	
b - Les ITS	
c - Protocole d'amplification	7
d - Les cycles de température	
244 La technique PCR-RFLP	8
a - Principes	
b - Protocole	
245 La technique RAPD ou AP-PCR	
a - Principes	
b - Protocole	9
c - Cycles de température	
d - Choix des amorces	10
Electrophorèse sur gel d'agarose	
246 Séquençage	11
III RESULTATS - DISCUSSION	12
31 Le pouvoir pathogène	
32 Amplification des ITS	
33 PCR-RFLP	
34 RAPD	13
35 Séquençage	14
IV CONCLUSION - PERSPECTIVES	15
V REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
VI ANNEXES	

**RECHERCHE DE DIVERSITE GENETIQUE AU SEIN D'UNE
POPULATION DE *STEMPHYLIUM SOLANI* Weber
AU SENEGAL**

I - INTRODUCTION

La stemphyliose est une maladie foliaire de l'aubergine africaine (*Solanum aethiopicum* L.) causée par un champignon Ascomycète imparfait (*Stemphylium solani*). Cette maladie est probablement, parmi les pressions parasitaires affectant cette culture, la plus sévère de plus, au Sénégal, elle est présente sur toutes les surfaces de culture de cette Aubergine. Elle est responsable de plus de 80% de pertes de récoltes. L'infection se produit à tous les stades végétatifs de la plante. Beaucoup de variétés d'Aubergines et des variétés d'espèces voisines de l'Aubergine présentent les symptômes de la maladie.

Les programmes d'amélioration s'intéressent plus à des besoins de productivité qui malheureusement débouchent sur une sensibilité accrue de la plante à divers parasites notamment au *Stemphylium*.

11 - L'agent pathogène

Stemphylium solani Weber est l'agent responsable de cette maladie foliaire de l'Aubergine africaine (Ndir et Lacoste, 1996). Le pathogène est un champignon Ascomycète Imparfait appartenant au groupe des Adélomycetes. Sa reproduction asexuée se fait par l'intermédiaire de conidies, sa culture *in vitro* est obtenue sur les milieux synthétiques usuels. La forme parfaite *Pleospora* n'a pas été décrite pour l'espèce *S. solani*.

12 - Symptomatologie

Les premiers signes de la maladie sont des tâches sur les feuilles et les pétioles. Ces tâches sont d'abord brunes, arrondies ou anguleuses de 1 à 2 mm de diamètre, puis elles confluent pour atteindre des dimensions plus importantes. Une marge noire borde ces zones de nécrose tandis que leur centre se fissure. Les feuilles ainsi recouvertes se chlorosent et tombent laissant des plantes dénudées.

Pour contrôler cette maladie, des mesures prophylactiques simples telles que l'utilisation de semences saines sont préconisées. L'utilisation de molécules chimiques (telles que le Thiram, le Manèbe et le Captafol) permet de contrôler la maladie.

Pour apporter un complément important au programme d'amélioration variétale de l'Aubergine africaine, il est indispensable de bien cerner la diversité génétique qui règne au sein des populations pathogènes. C'est dans ce cadre que nous nous intéressons à la structure génétique de la population de 30 isolats du Sénégal.

Tableau 1 : Quelques données sur les souches de *Stemphylium solani* Weber

N°	Souches	Localité	Année	Hôte d'origine
1	S0	kourouna	1993	S.aethiopic
2	S1	jard.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	thies	1996	-
12	11	malika	1997	S.melongena
13	K1	kourouna	1998	S.aethiopic
14	K2	kourouna	1998	S.aethiopic
15	SL1	s.louis	1996	S.melongena
16	SL2	s.louis	1996	S.melongena
17	III	s.louis	1998	S.aethiopic
18	MBJ	mbao	1997	S.aethiopic
19	MBA	mbao	1997	S.melongena
20	PJ2	pikine	1996	S.aethiopic
21	PJ1	pikine	1996	S.aethiopic
22	I	s.louis	1998	lycopersic
23	12	malika	1997	S.aethiopic
24	V	s.louis	1998	S.melongena
25	V'	s.louis	1998	S.melongena
26	Sip2	sips	1998	S.aethiopic
27	Sip2'	sips	1998	S.aethiopic
28	Sip3	sips	1998	lycopersic
29	Sip3'	sips	1998	lycopersic
30	T5inra	avignon	?	lycopersic

II - MATERIELS ET METHODES

21 - Echantillonnage

Des feuilles de différentes espèces maraîchères présentant les symptômes de la stemphyliose ont été récoltées dans différents sites de la zone maraîchère des Niayes (large bande côtière, s'étendant de Dakar à Saint Louis). Au niveau de cette bande la nappe phréatique affleure presque et permet le maraîchage en toute saison.

30 souches de *Stemphylium solani* dont une provenant de la collection de l'INRA d'Avignon Montfavet ont fait l'objet de cette étude. Les souches appartenant à un même site d'isolement sont notées X1 et X2 ou X et X'.

Les provenances géographiques, l'année d'isolement et l'hôte d'origine des souches sont répertoriés dans le tableau 1.

22 - Culture du champignon

Les isollements ont été faits sur milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar) (annexe 1). Toutes les cultures dérivent de clones monospores, issus de la germination d'une conidie. Elles sont conservées sur PDA incliné en tubes à 4°C. Suivant les besoins, ces cultures seront par la suite reprises sur l'un des milieux suivants:

- V8 agar en boîte de Pétri (jus de légumes V8-Agar) (annexe 1)
- PDA agar en boîte de Pétri
- PDB liquide en fiole de Roux (Potato-Dextrose-Broth) (annexe 1).

Ces cultures ont été reprises sur milieu V8 agar, pour la production d'inoculum (en effet *Stemphylium* cultivé sur ce milieu sporule abondamment). Ce travail a été réalisé à Dakar en vue des inoculations expérimentales visant à analyser le pouvoir pathogène.

Quant aux cultures sur PDA un petit fragment de mycélium prélevé des tubes est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant du PDA. Après une semaine d'incubation à 27°C le mycélium s'est suffisamment développé.

23 - Etude du pouvoir pathogène

Mode d'inoculation de la plante

Les graines des différentes accessions sont semées dans des bacs en terre contenant un mélange 50% de terreau, 50% de sable, le tout stérilisé à l'autoclave 1 heure à 120°C. Les plantes au stade 2 à 3 vraies feuilles sont inoculées par pulvérisation de leur feuillage avec une suspension de spores titrant 5.10^5 spores/ml. L'inoculum a été préparé en raclant la surface des cultures et en suspendant les spores recueillies dans de l'eau stérile. Après comptage des spores à l'aide d'une cellule de Malassez, le titre de la suspension est ajusté à 5.10^5 spores/ml.

Les plantes ainsi inoculées sont recouvertes d'une poche en plastique pendant 4 jours pour créer une humidité suffisante à la germination des spores. Un arrosage quotidien est assuré. Des observations sont effectuées à partir du 6ème jour et sont notées tous les jours.

*les tests de pathogénie ont été réalisés sur un lot de 10 plantes, chaque test a été repris 3 fois. Les plantes témoins sont pulvérisées avec de l'eau stérile et sont recouvertes pendant 4 jours.

24 - Techniques moléculaires

241 -Technique d'extraction de l'ADN au NaOH

C'est une méthode d'extraction rapide de l'ADN. L'extraction se fait à partir de culture sur PDA en boîte de Pétri.

Protocole:

1- Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, il est mis une petite quantité de mycélium prélevée à la surface de la culture.

2- 500 µl de NaOH (0,5 M) fraîchement préparé sont ajoutés au mycélium, et l'ensemble est bien homogénéisé à l'aide d'un petit mixeur.

3- Le mélange est centrifugé 5 minutes à 10000 g, le surnageant (environ 400 µl) est repris dans un nouveau tube.

4- 10 µl de ce surnageant sont dilués dans 190 µl de TE (annexe 1).
Cette dilution d'ADN est prête à l'emploi.

242 - Extraction de l'ADN par la technique au Phénol/ Chloroforme /Alcool isoamylique

a) Culture de *Stemphylium solani*

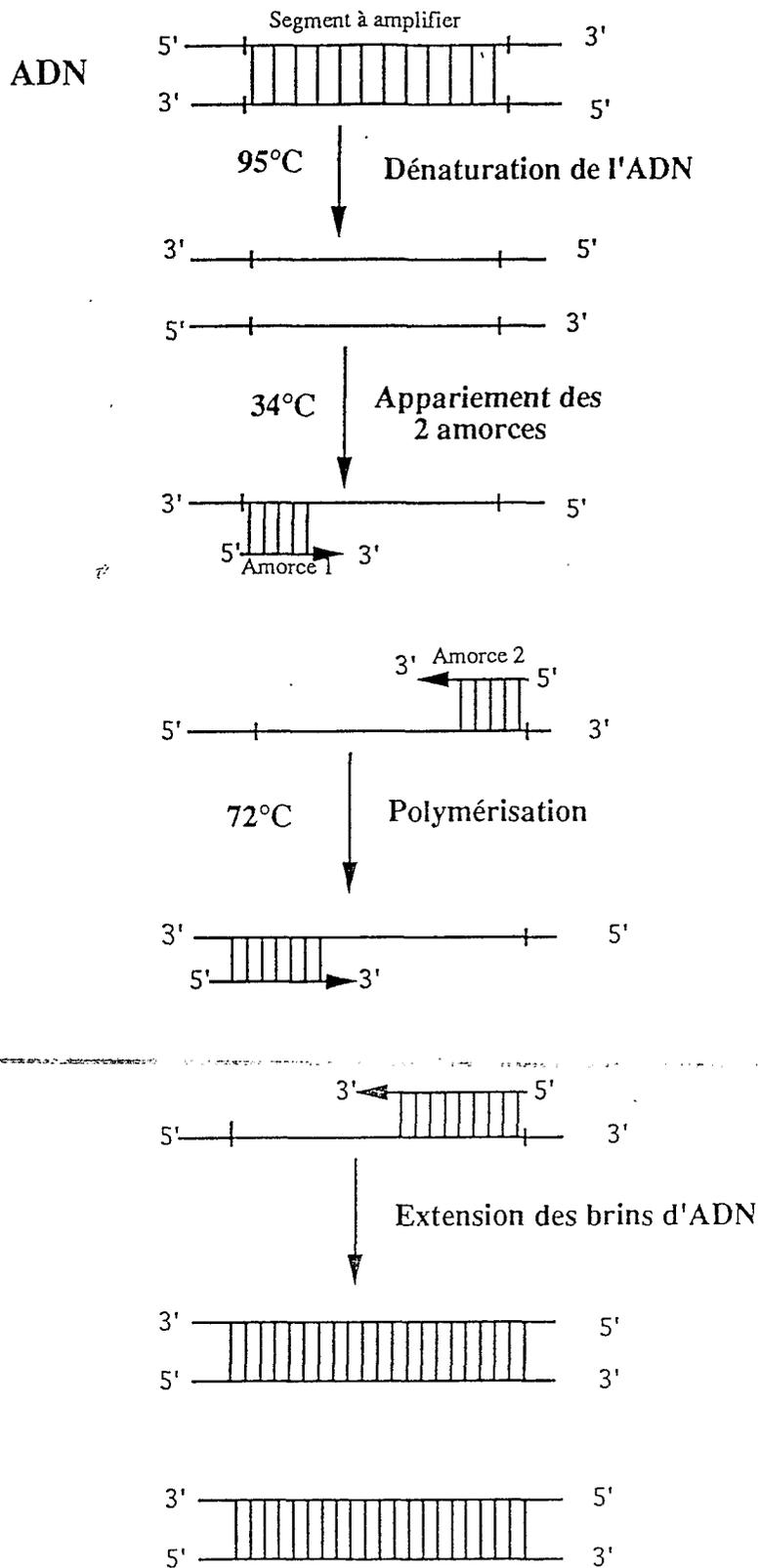
- Production de mycélium pour l'extraction de l'ADN

Un ou deux morceaux de cette culture sont découpés à l'aide d'un scalpel et sont utilisés pour ensemercer 200 ml de milieu PDB contenu dans des fioles de Roux. Ces fioles sont disposées à plat afin d'accroître la surface de milieu nutritif et incubées à la température du labo (25°C) pendant 7 jours.

Au bout de 7 jours, le mycélium envahit toute la surface du milieu; il est récupéré par filtration sur une toile à Butter en Nylon, (les fragments de mycélium ayant servi à l'ensemencement sont retirés à l'aide d'une spatule). Le mycélium est rincé à l'eau stérile, puis déposé sur plusieurs épaisseurs de papier filtre afin de bien le sécher. Il est ensuite enveloppé dans du papier aluminium avant d'être conservé à -20°C.

Les mycéliums aussitôt sortis du congélateur (-20°C) sont traités avec de l'azote liquide, pour éviter la décongélation, et lyophilisés pendant 48 heures. La lyophilisation est une méthode de dessiccation par sublimation à très basse température. Elle permet d'avoir du matériel sec, friable donc facile à broyer.

Figure 1 : Les étapes de la PCR pour 1 cycle d'amplification



b) Extraction de l'ADN

- Protocole de Lee *et al.* modifié

Des tubes Eppendorf de 1,5 ml sont remplis au tiers avec du mycélium lyophilisé broyé (environ 0,1 g) dans du sable de Fontainebleau. 500 µl de tampon de lyse (annexe 1) sont ajoutés au broyat. Après homogénéisation du mélange avec une pince en bois, le mycélium est mis en incubation pendant 30 minutes à 1 heure au bain-marie à 65 °C.

Les protéines sont éliminées par un traitement au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique (25/24/1) (volume égal à celui du tampon de lyse). Après homogénéisation du mélange et centrifugation (15 min à 13000 g), la phase supérieure aqueuse est récupérée (environ 400 µl) et l'ADN est précipité sélectivement en présence de 10 % (40 µl) d'acétate de sodium (3 M à pH 8) et avec 0,54 volume (216 µl) d'isopropanol pour ne pas précipiter les polysaccharides.

Après une nouvelle centrifugation (3 min à 12000 g), le surnageant est retiré et le culot d'ADN est rincé avec 300 µl d'éthanol 70 %. Après une nouvelle centrifugation le culot est repris dans 300 µl de tampon TE puis placé à 65 °C jusqu'à redissolution complète. L'ADN dissout est traité avec 3 µl de ribonucléase A (conc. finale: 100 µg/ml) (Boehringer Mannheim) pendant 1 heure à 37 °C. L'ADN est ensuite reprécipité avec 30 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 8) en présence de 600 µl d'éthanol pur (conservé à -20 °C), le culot rincé avec 300 µl d'éthanol 70 % puis séché au "Speed vac" pendant 15 à 20 min.

L'ADN est ensuite repris dans 100 µl de TE (annexe 1), maintenu une nuit à 4°C (pour dissoudre l'ADN) puis conservé à -20°C.

c) Vérification de l'état de pureté des ADN après l'extraction.

L'état de pureté de l'ADN est vérifié en déposant 5 µl sur gel d'agarose à 1,5%. Après cette étape, des dilutions sont réalisées au 1/100^{ème} et au 1/1000^{ème} dans de l'eau qui serviront pour l'amplification par PCR.

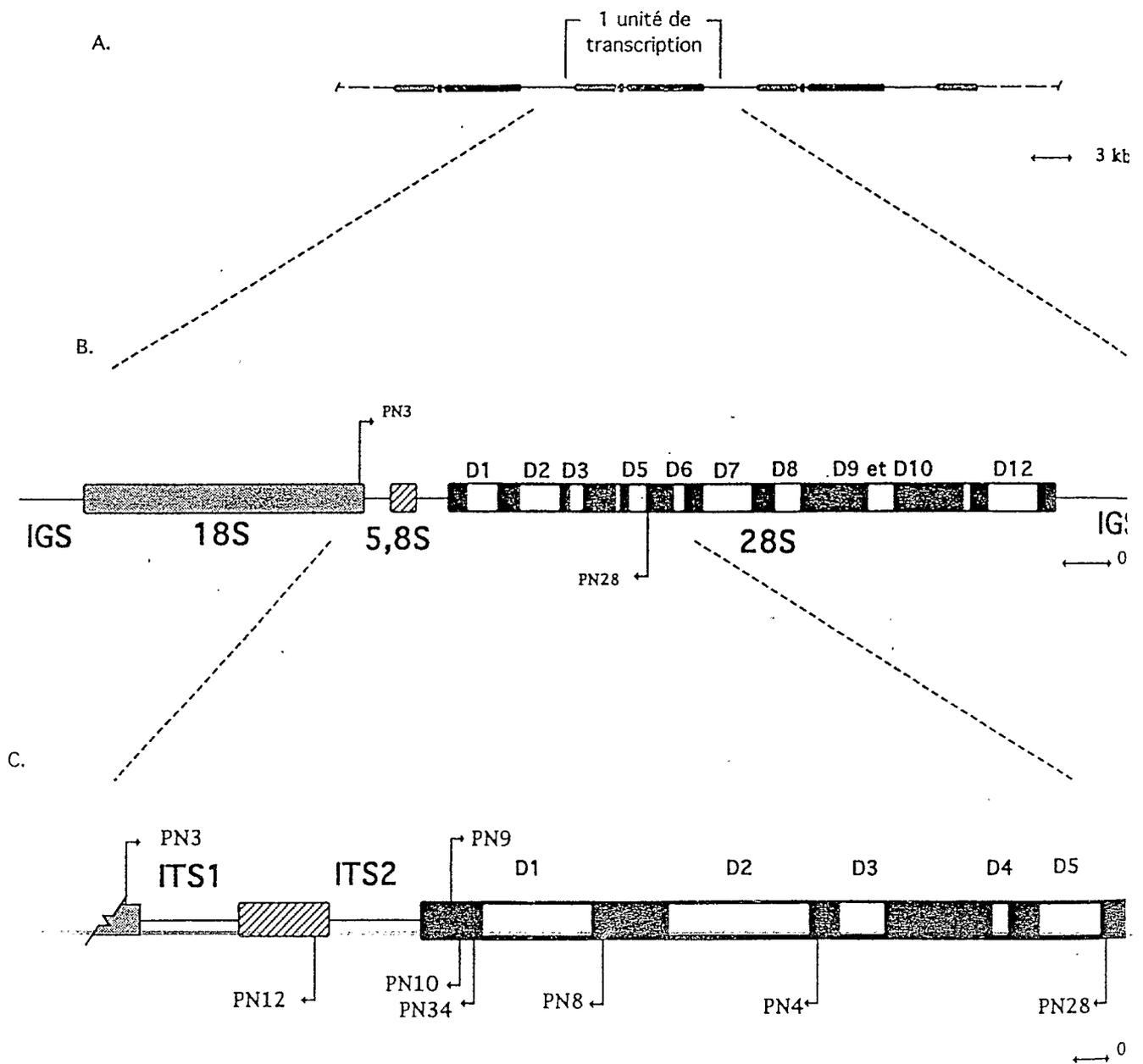
243 - L'amplification par PCR

(Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne)

a - Principes:

La technique de la PCR (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et Faloona*, 1987) consiste en une amplification enzymatique *in vitro* d'un segment d'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques qui sont complémentaires des séquences en 5' et 3' du segment à amplifier (Fig.1). Ce segment est recopié en plusieurs millions d'exemplaires par une série de réactions successives. Cette technique est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante (Taq DNA polymérase) isolée à l'origine d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus*. Cette enzyme a un optimum d'activité pour une température se situant entre 70°C et 80°C et peut supporter des températures allant jusqu'à 96°C.

Figure 2 : L'unité de transcription ribosomique de champignon



- A. Organisation en tandem des unités ribosomiques;
 B. Structure d'une unité ribosomique
 C. Amorces utilisées dans les réactions de séquences et d'amplification

Domaines variables (D1 à D12)
 Régions très conservées du gène 28S
 ITS: séquence interne transcrite; IGS: séquence intergène
 amorces: le sens de la flèche indique la direction de l'élongation à partir de l'amorce

La réaction d'amplification nécessite, outre la présence de l'ADN utilisé comme matrice et la Taq polymérase, l'utilisation de deux oligonucléotides (amorces) qui s'hybrident avec les séquences situées aux extrémités 5' de la zone à amplifier, et des déoxynucléotides triphosphates (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) nécessaires à la synthèse de nouveaux brins d'ADN. La réaction d'amplification s'opère au cours d'une succession de cycles de températures sur le mélange réactionnel adéquat.

Un cycle d'amplification est composé de trois étapes (Fig. 1):

- dénaturation de l'ADN bicaténaire à amplifier (92 - 95°C)
- hybridation ou appariement des amorces sur la région complémentaire (varie selon les T_m des amorces).
- extension ou polymérisation à partir des amorces des brins d'ADN. On se place généralement à 72°C.

Un certain nombre de cycles d'amplification (en général 30) est effectué et chaque cycle permet de doubler la quantité d'ADN à amplifier, entraînant une accumulation exponentielle de l'ADN amplifié de 2^n ; (n étant le nombre de cycles d'amplification).

La technique de la PCR a ainsi permis d'améliorer les possibilités de détection des variabilités génomiques en vue d'une meilleure caractérisation des entités biologiques. Cependant elle n'est applicable que si l'on dispose des informations sur les séquences du génome à étudier, ce qui n'est pratique que lorsque les genres ou les espèces de champignon sont bien caractérisés.

Récemment, pour palier à cette limitation de la PCR, Welsh et McClelland, (1990) et Williams *et al.* (1990), ont décrit une variante (RAPD) de la PCR permettant d'amplifier des fragments d'ADN sans aucune information préalable sur le génome généralisant ainsi l'application de cette technique. Il s'agit de la technique AP-PCR (Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction; Welsh et McClelland, 1990) ou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams *et al.*, 1990).

Nous avons utilisé la PCR pour amplifier les ITS de l'unité ribosomique des différentes souches.

~~b - Les ITS (Internal Transcribed Spacer ou espaceurs internes transcrits)~~

Parmi les approches moléculaires disponibles en systématique fongique, nous avons utilisé celle basée sur l'analyse des séquences de l'ADN ribosomal. L'unité ribosomique (Fig. 2), présente dans le génome de tous les organismes, est répétée en tandem chez les champignons. Les séquences de cette unité contiennent à la fois des régions variables et des régions conservées. Ainsi, la région ITS (internal transcribed spacer, ou espaceurs transcrits internes) de l'ADN ribosomique est une zone assez bien conservée à l'intérieur d'une même espèce fongique mais elle est très variable d'une espèce à l'autre et constitue donc un bon indicateur taxonomique à l'échelle de l'espèce, chez bon nombre de champignons.

Nous avons choisi d'amplifier par PCR cette région ITS avec deux amorces universelles ITS1F et ITS4.

Séquences des amorces

ITS1F 5'- TCC-GTA-TAG-GTG-AAC-CTC-GG - 3'
ITS4 5'- TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC - 3'

c - Protocole d'amplification:

La réaction d'amplification a été faite dans un volume final de 25 µl du mélange suivant:

- Tampon de la réaction 10X	2.5 µl
- MgCl ₂	1.5 µl
- une solution des différents désoxyribonucléotides triphosphates notée: dNTPs (10 mM)	0.5 µl
- ITS1F (20 pmoles/µl)	2 µl
- ITS4 (20 pmoles/µl)	2 µl
- H ₂ O stérile filtrée	12.5 µl
- Taq polymérase	2 µl

Dans un premier temps un mélange ou mix est réalisé pour un nombre n de tubes, puis réparti à raison de 23 µl/tube. L'ADN (2 µl) est ajouté en dernier au mélange réactionnel.

d- Les cycles de température

La réaction d'amplification proprement dite est effectuée grâce à différents cycles de température réalisés sur un thermocycler (PT100, Labover).

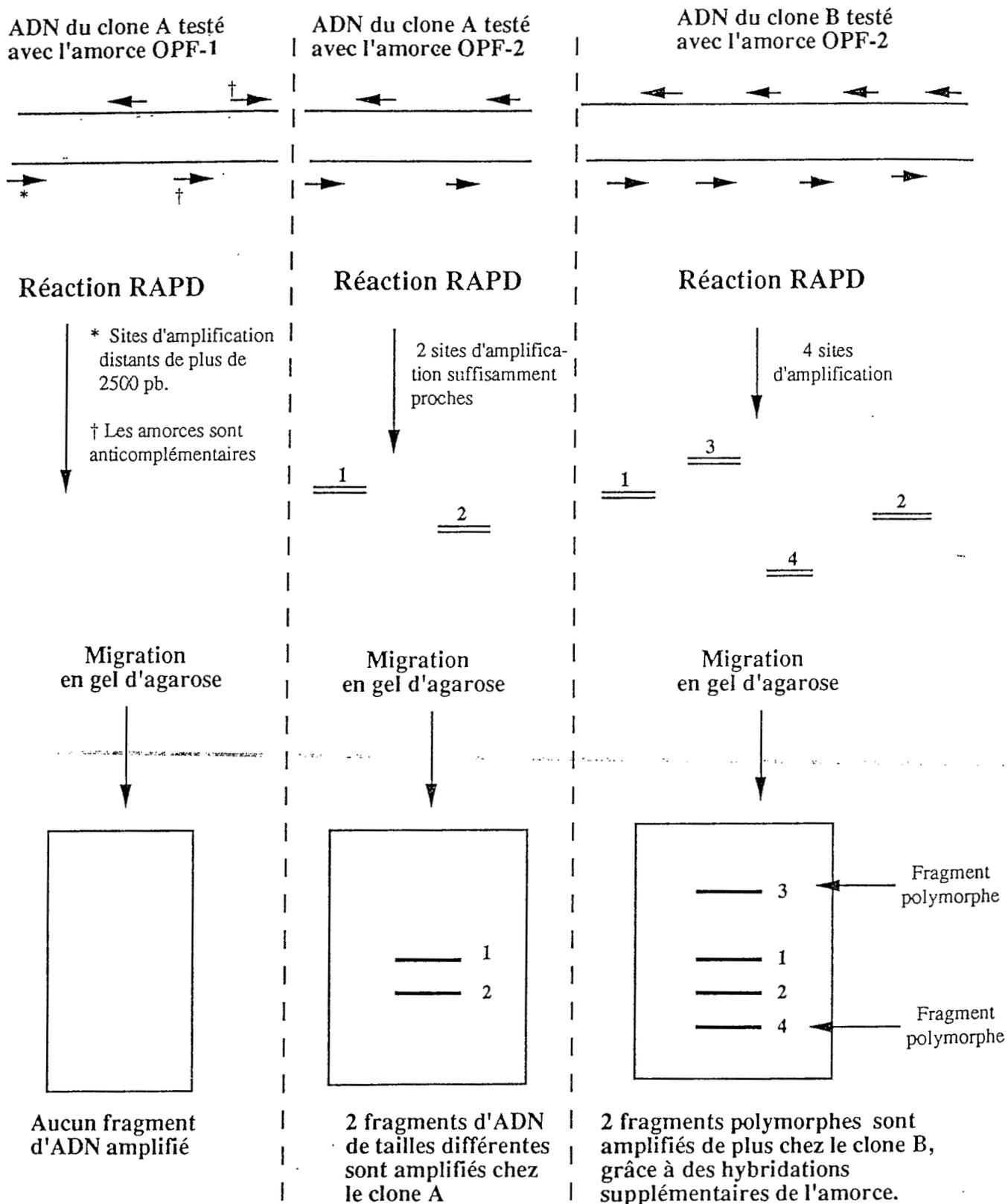
Un premier cycle consiste à dénaturer l'ADN: 95°C pendant 5 min

puis suit une série de 30 cycles, chaque cycle se déroulant comme suit:

95°C pendant 30 secondes	Dénaturation
55°C pendant 30 secondes	Hybridation des amorces (annealing)
72°C pendant 1 minute	Extension ou polymérisation

ensuite suit un dernier cycle de 72°C pendant 15 minutes pour achever la polymérisation.

Figure 3 : Détection du polymorphisme génomique par les marqueurs RAPD.



244 - La technique PCR - RFLP

Nous avons rechercher du polymorphisme dans notre population par restriction des ITS.

a- Principe

L'unité ribosomique est constituée de séquences contenant des domaines conservées, répétées en tandem et séparées par une séquence intergénique moins conservée : l'IGS (l'Inter Genic Spacer) (Fig. 2). Des mutations ponctuelles dans ces régions peuvent avoir pour effet l'apparition ou la disparition de sites de restriction. De plus, l'étude de cette unité permet d'établir des relations phylogénétiques et reflète bien l'évolution des organismes.

Nous avons utilisé des enzymes de restriction qui reconnaissent 4 paires de bases (*Alu* I, *Hae* III, *Nde* II, *Msp* I, *Bsp* 143) ou 6 (*Bam*H I, *Eco* RI) (annexe 2)

b - Protocole

La réaction de digestion s'effectue dans un mélange réactionnel de 20 µl:

Tampon de l'enzyme 10X	2 µl
Eau filtrée stérile	11 µl
Enzyme (20 unités/µl)	2 µl
Produit PCR	5 µl

Incubation au bain - marie à 37 °C minimum 3 heures.

Une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée avec les produits de digestion suivie d'une visualisation sous lampes UV.

245 - La technique RAPD ou AP-PCR

a- Principes:

La technique RAPD décrite par Williams et *al.* (1990), consiste comme la PCR, en une amplification de séquences d'ADN, mais à l'aide d'une seule amorce de séquence aléatoire et en l'absence de toute information concernant les séquences nucléotidiques de l'ADN à amplifier (Fig. 3).

L'hybridation de l'amorce se fait à basse température (34-36°C) pour permettre une hybridation peu spécifique favorisant la fixation au maximum de sites. La température d'hybridation est déterminée par la relation: $T^{\circ} = 22.3 + 1.45 [(A+T)+0.5 (G+C)]$ (Maniatis et *al.*, 1989), qui tient compte du pourcentage en guanine et en cytosine de l'amorce utilisée.

L'amorce pourra s'hybrider à différents endroits sur l'ADN; lorsque les deux amorces se seront hybridées de façon anti-complémentaire sur les 2 brins d'ADN et à une distance suffisamment proche (2500 pb maximum), l'amplification se réalise. En revanche, si les 2 amorces ne trouvent pas de séquence qui leur est complémentaire sur l'ADN ou s'hybrident trop loin l'une de l'autre, aucun fragment d'ADN ne sera amplifié.

Les fragments d'ADN amplifiés permettent de mettre en évidence d'importants polymorphismes génomiques au sein des organismes étudiés. Ces polymorphismes peuvent être expliqués par des mutations qui correspondent à:

- la délétion d'un site d'hybridation, entraînant l'absence de fragment amplifié;
- une trop grande distance séparant les deux sites d'hybridation des amorces anti-complémentaires, ce qui conduit à l'absence de fragment amplifié;
- des insertions ou des délétions au voisinage ou dans le site d'hybridation conduisant à des différences dans la taille des fragments d'ADN amplifiés.

La technique RAPD a une résolution potentiellement illimitée, car le nombre de marqueurs (amorces) possibles est lui même virtuellement illimité.

Au vu de ces données, la technique RAPD apparaît comme une méthode rapide et efficace d'étude de la structure génétique de la population surtout des champignons phytopathogènes. Nous l'avons donc appliquée à l'étude de la diversité génétique de nos souches de *Stemphylium solani*.

b - Protocole:

La réaction d'amplification a lieu dans un volume réactionnel de 25 µl avec le protocole suivant:

- Tampon de réaction de la Taq DNA polymérase 10X	2.5 µl
- MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.25 µl
- Amorce	4 µl
- H ₂ O stérile filtrée	14.25 µl
- Taq	0.5 µl

c - Cycles de température

95°C.....4 min. Dénaturation
suivi de 35 cycles d'amplification; chaque cycle étant constitué de:

92°C.....1 min. Dénaturation de l'ADN
36°C.....1 min. Fixation des amorces
72°C.....1 min.30 sec. Elongation

puis 1 dernier cycle de:

72°C.....15 min

d - Choix des amorces

Des essais préliminaires ont été effectués sur 2 souches (S1 et S2) avec 14 amorces OPF (Opéron Technology, kit F) afin de déterminer celles qui mettent en évidence le maximum de polymorphisme.

Au vu des profils obtenus, nous avons testé toutes les amorces disponibles.

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées:

Noms	5'	3'
OPF - 4	GGTGATCAGG	
OPF - 5	CCGAATTCCC	
OPF - 6	GGGAATTCGG	
OPF - 7	CCGATATCCC	
OPF - 8	GGGATATCGG	
OPF - 10	GGAAGCTTGG	
OPF - 11	TTGGTACCCC	
OPF - 12	ACGGTACCAG	
OPF - 13	GGCTGCAGAA	
OPF - 14	TGCTGCAGGT	
OPF - 15	CCAGTACTCC	
OPF - 17	AACCCGGGAA	
OPF - 18	TTCCCGGGTT	
OPF - 19	CCTCTAGACC	
OPF - 20	GGTCTAGAGG	

- électrophorèse sur gel d'agarose

*préparation du gel

Suivant la consistance du gel (x% d'agarose- x variable), l'agarose est pesé et mis dans la quantité adéquate de tampon TAE. L'agarose est fondu au four micro-ondes jusqu'à ce que le mélange devienne limpide; puis il est refroidi jusqu'à environ 60°C. Il est alors coloré avec du bromure d'éthidium (BET) à raison de 1 µl /20 ml de gel (10 mg/ml), puis coulé dans un petit porte gel où un peigne a été soigneusement placé. Il est laissé jusqu'à polymérisation complète. Le peigne sera soigneusement ôté.

* dépôt des amplifiats

Le gel solidifié est déposé dans une cuve puis recouvert par le tampon TAE. Dans chaque puits, une quantité d'amplifiat préalablement mélangée avec du tampon de charge (annexe 1) sera déposée. Le premier et le dernier puits sont réservés au marqueur de poids moléculaire (5 µl) marqueur 1 ou marqueur 2 (annexe 3).

NB: dans ce mélange, le tampon de charge doit être le 1/5ème de l'amplifiat.

*migration de l'ADN

La migration de l'ADN est réalisée à 100 volts; elle se fait du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode). En effet, les acides nucléiques en solution sont chargés négativement à cause de l'ionisation de leurs groupements phosphates; ils se déplacent donc vers l'électrode positive. La vitesse de déplacement des molécules à travers le gel est limitée par la dimension des pores: les acides nucléiques ayant le même rapport charge/masse seront séparés d'après leur longueur car les molécules plus longues migrent plus difficilement à travers les pores du gel (Darnell J., Lodish H & Baltimore D. 1988. La Cellule: Biologie Moléculaire).

*visualisation de l'ADN sur le gel

Lorsque le front de migration, identifié au bleu de charge, se situe à 2 cm de la partie inférieure du gel, l'alimentation électrique est arrêtée, le gel retiré du porte gel et déposé sur une plaque de lumière ultraviolette. Le BET étant un cation qui s'intercale entre les bases de l'ADN, le complexe ion éthidium/ADN est fluorescent sous UV. Ainsi il est possible de visualiser les fragments d'ADN dans le gel et de prendre des photos polaroid en noir et blanc (voir photos).

Les fragments d'ADN amplifiés sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose (230 ml à 1,4 % dans du tampon TAE) contenant du BET dans des plaques (21cm /20). Chaque gel est placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du TAE. La migration a été faite sous une tension de 120 Volts pendant 2 heures 30 minutes. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous UV et photographiés.

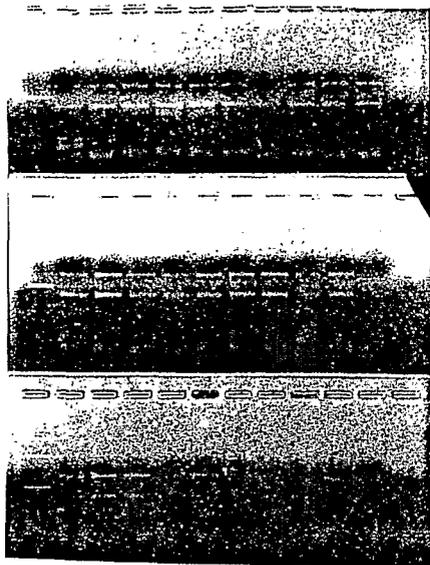
246 - Le Séquençage

Dans le but de comparer les séquences ITS des souches nous avons procédé au séquençage des ITS d'une des souches du Sénégal (S3) et de la souche de l'INRA (T5). Deux options de préparation des produits à séquencer sont possibles: soit faire séquencer directement les produits PCR ou cloner ces derniers dans un vecteur (voir expérimentation clonage en annexe 5).

Les tentatives de clonage des produits PCR dans un vecteur plasmidique pGEMt (Promega, France) ayant échoué, nous avons fait séquencer directement les produits d'amplification.

Les produits PCR (ITS amplifiés) sont mis à migrer sur un gel LMP (Low Melting Point). Les bandes sont découpées et purifiées à l'aide du Kit de purification Wizard PCR Prep (Promega) (Protocole annexe 4). Les produits purifiés sont dosés au spectrophotomètre et envoyés à séquencer à la société Genome Express.

1



2

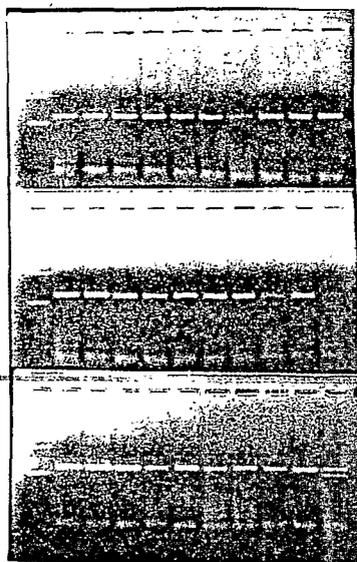
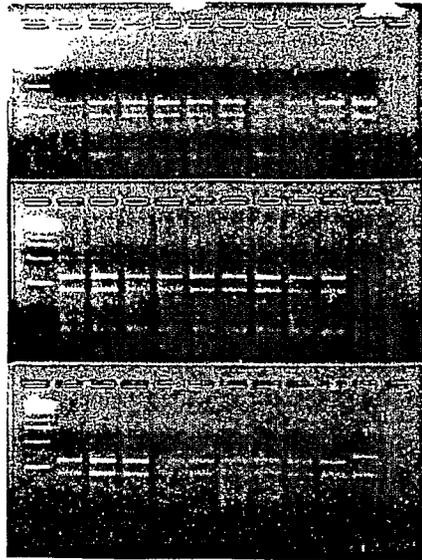
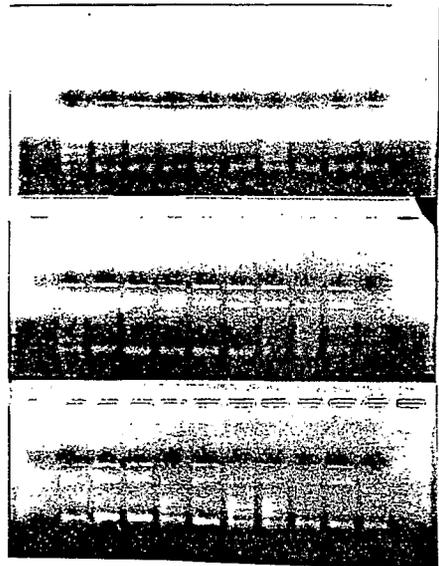


Planche 2 : Profils de restriction de l'ITS des différentes souches digéré avec Nde II (1ère photo) et EcoR I (2e photo), et analysé sur un gel d'agarose 1,5 %.

1



2



3

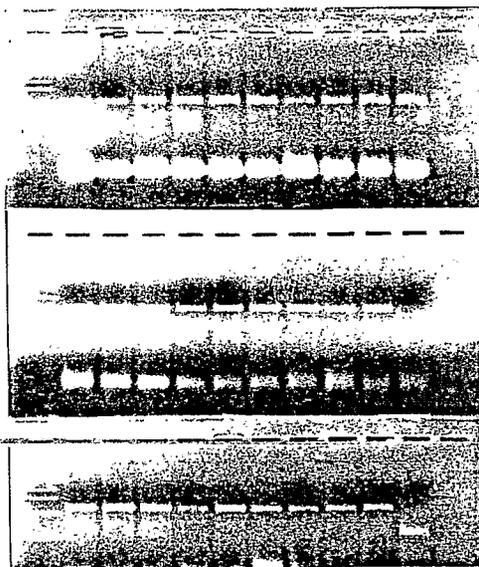
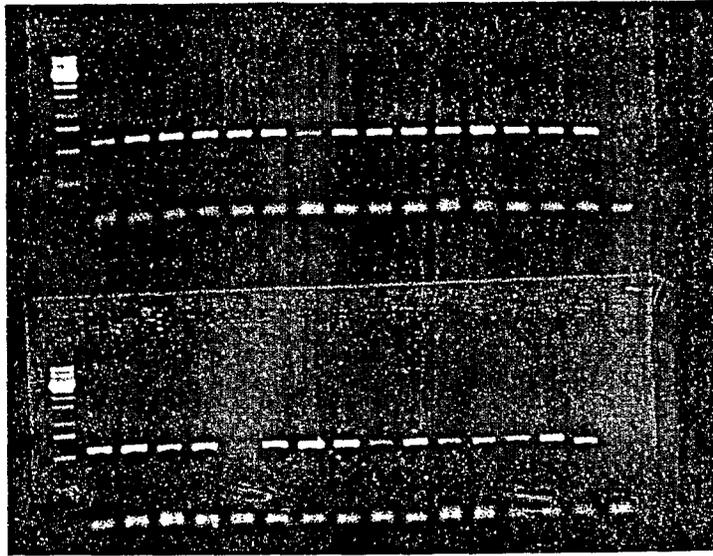


Planche 1: Profils de restriction de l'ITS des différentes souches digéré avec ALu I (1ère photo) et Bsp I (2e photo) et Msp I (3e photo), analysé sur un gel d'agarose 1,5 %.



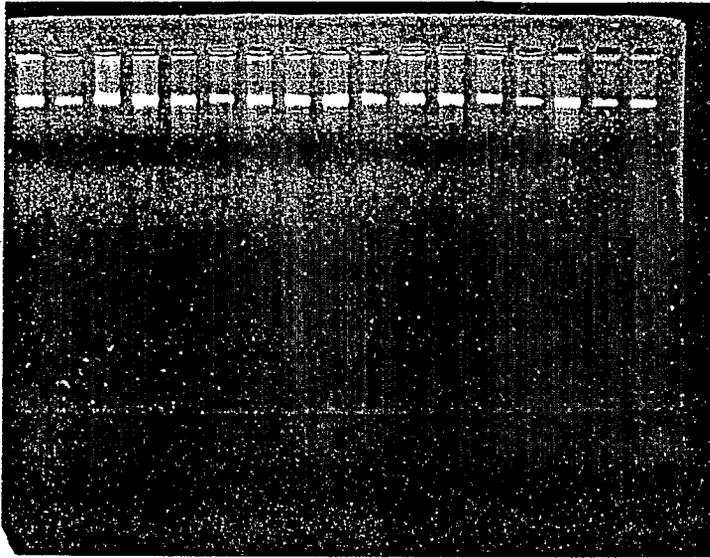
premier gel

<u>Puits</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<u>Souche</u>	M	S0	S1	S2	S'2	S3	S4	S5	S6	S8	S9	S10	11	K1	K2	SL1	SL2	III

deuxieme gel

<u>Puits</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<u>Souche</u>	M	MBJ	MBA	PJ2	PJ1	I	12	V	V'	SIP2	SIP2'	SIP3	SIP3'	T5

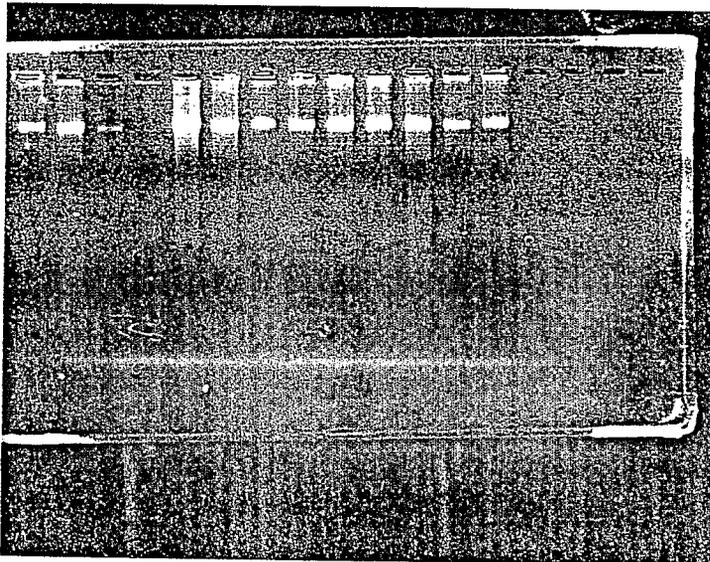
Photo 3 : Gels d'électrophorèse montrant l'amplification des ITS des 30 souches de *S. solani* à partir de l'ADN extrait par la méthode classique.



Puits

Souches

1	S0
2	S1
3	S2
4	S2'
5	S3
6	S4
7	S5
8	S6
9	S8
10	S9
11	S10
12	11
13	K1
14	K2
15	SL1
16	SL2
17	III



Puits

Souches

1	MBJ
2	MBA
3	PJ1
4	PJ2
5	T5
6	I
7	12
8	V
9	V'
10	SIP2
11	SIP2'
12	SIP3
13	SIP3'

Photos 1 et 2 : Gels d'électrophorèse montrant l'ADN extrait des différentes souches de *S. solani*. On remarque qu'au niveau de certains puits il part des trainées d'impuretés.

Tableau 3 : Résultats partiels du test de pouvoir pathogène

(test sur 10 plantes, avec 3 répétitions)

Isolat ⇒	S0	S1	S2	S2'	S3	S4	S5	SL1	SL2	PJ1	PJ2
variété↓											
Soxna S.aethi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
k.B.ND. S.aethi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rossol lycoper	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
Romitel lycoper	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Xina lycoper	R	R	R	R	S	R		S	S	S	S
Bot3 S.aethi	S		R	R		S		S	S	S	S
Bot18 S.aethi	R	?	S	S		S		S	S	S	S

III - RESULTATS - DISCUSSION

31 - Le pouvoir pathogène

Les premiers résultats des tests d'infection sont consignés dans le tableau 3. Ils donnent pour l'instant les conclusions suivantes:

- 1 - Toutes les souches sont pathogènes sur les deux variétés d'aubergine du Sénégal.
- 2 - Elles présentent une interaction différentielle avec les deux variétés d'aubergine du Burkina.
- 3 - Le même constat est fait quand on analyse les variétés de tomate.

L'analyse de ces premiers résultats révèle 5 pathotypes lorsqu'on considère les variétés de tomate, alors que 3 pathotypes sont identifiés quand on considère les variétés d'aubergine.

Etat des ADN extraits par la méthode classique

Les photos 1 et 2 montrent que les ADN obtenus par la méthode classique sont d'une pureté assez bonne, cependant il subsiste au niveau de certains puits une traînée blanchâtre due à des résidus de polysaccharides.

32 - Amplification des ITS

La photo 3 présente les ITS amplifiés par PCR. Une seule bande d'environ 600 paires de bases a été amplifiée chez les souches de *Stemphylium solani* du Sénégal. La souche T5 de l'INRA présente quant à elle une bande d'environ 500 pb.

Il ressort de ce résultat que toutes les souches étudiées du Sénégal appartiennent à l'espèce *Stemphylium solani* contrairement à la souche T5 de l'INRA.

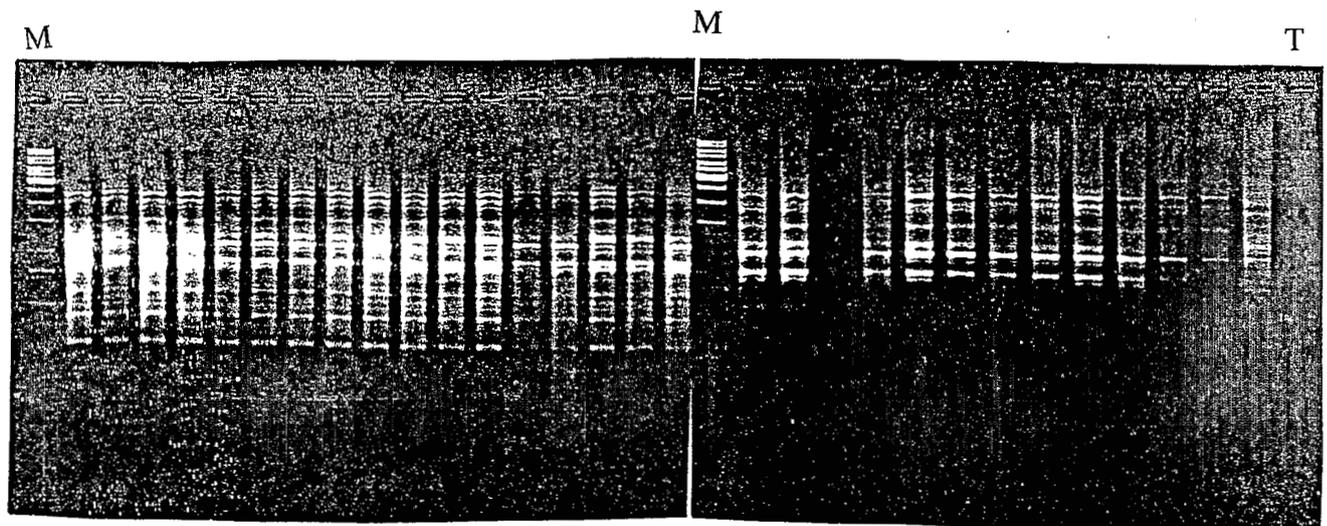
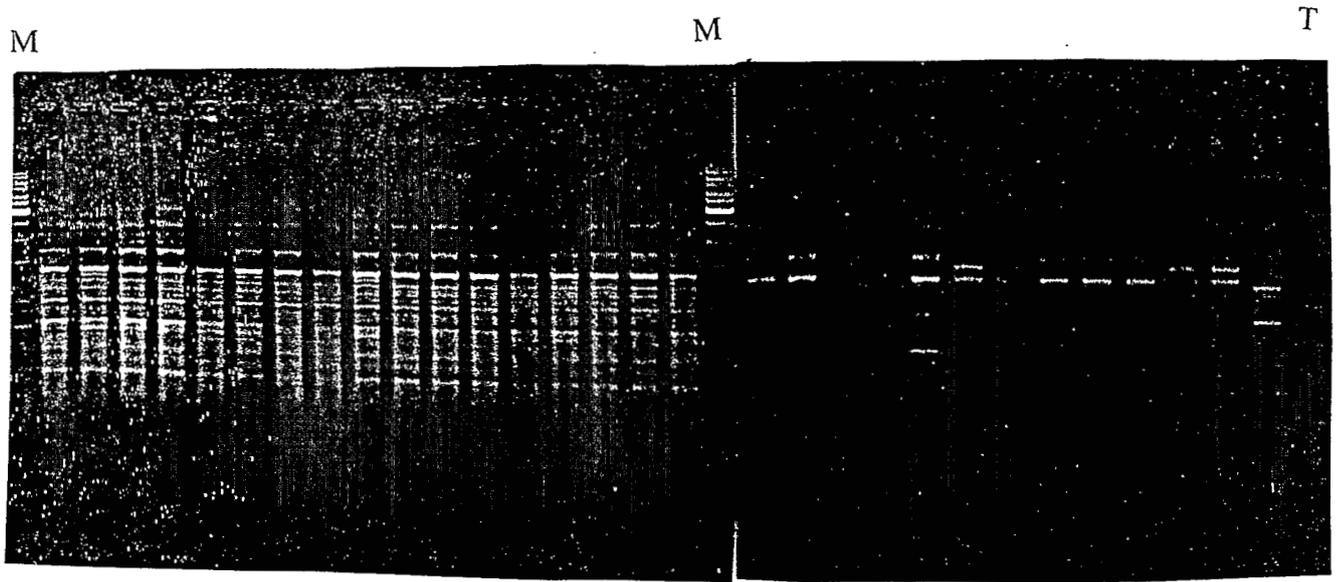
33 - PCR-RFLP

La recherche du polymorphisme nous a amené à digérer les ITS avec des enzymes de restriction. Les planches 1 et 2 présentent les profils obtenus après les différentes digestions.

- On remarque que les profils RFLP obtenus avec la souche T5 diffèrent de ceux obtenus avec les souches de *Stemphylium solani*. Ceci confirme la différence déjà notée avec l'amplification des ITS.

- D'autre part, toutes les autres souches présentent le même profil pour les enzymes de restriction utilisées. Ce profil montre deux bandes majeures sauf pour l'endonucléase *EcoRI* qui donne une bande majeure.

Ce résultat veut dire que les digestions jusqu'ici effectuées ne génèrent pas de polymorphisme au sein de nos souches.



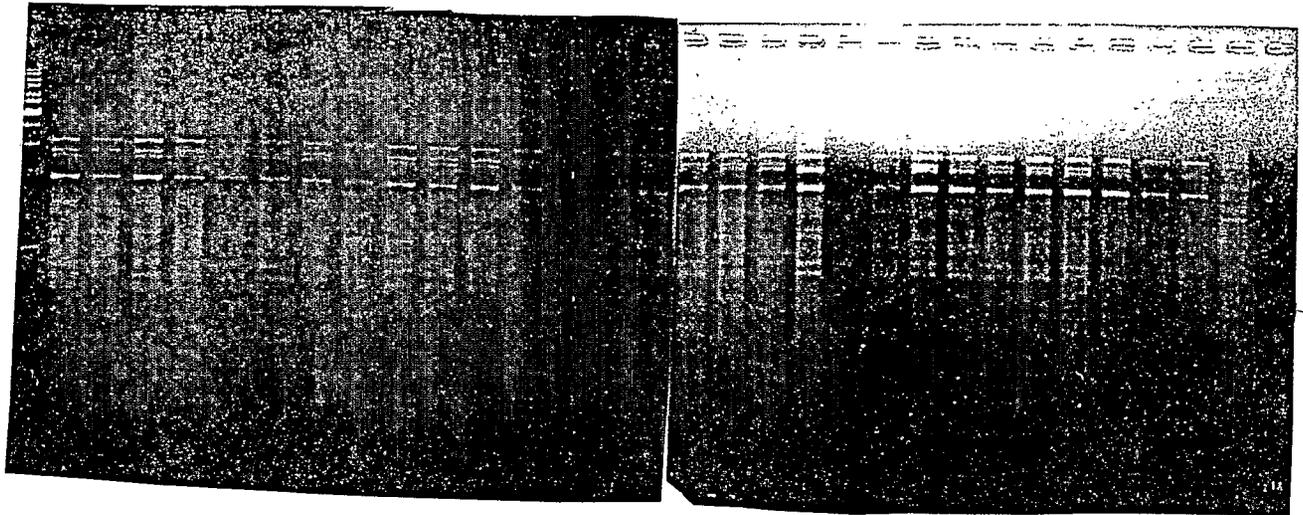
S0 S1 S2 S2' S3 S4 S5 S6 S8 S9 S10 S11 S12 S13 S14

III MJB MBA PJ2 PJ1 I 12 V V' SIP2 SIP24 SIP3 SIP3' T5

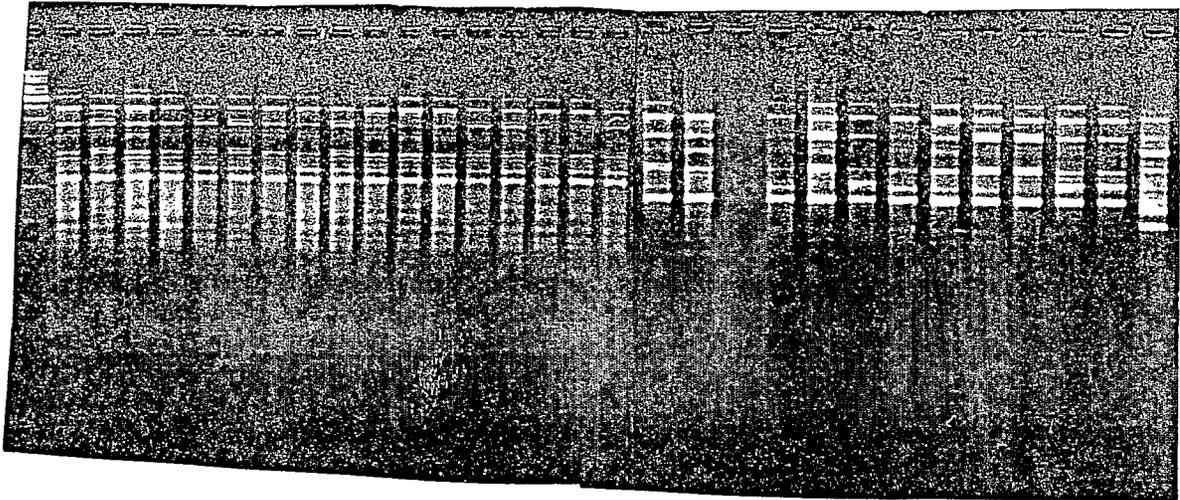
Planche 4 : Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce OPF14 et OPF17. Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,4 % dans du tampon T.A.E).

M

T



M



S0 S1 S2 S2' S3 S4 S5 S6 S8 S9 S10 11 K1 K2 SL1 SL2 III M MBJ MBA PJ2 PJ1 I 12 V V' SIP2 SIP24 SIP3 SIP3' T5

Planche 3 : Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce OPF 6 et OPF13. Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,4 % dans du tampon T.A.E).

34 - RAPD

L'analyse des profils RAPD montre que :

-Pour toutes les amorces testées, la souche T5 de l'INRA donne un

profil qui diffère totalement de ceux obtenus avec les souches du Sénégal.

-Les amorces OPF 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15 et 19 n'ont pas révélé de polymorphisme au sein des souches du Sénégal.

-Les amorces OPF 6, 13, 14, 17, 18 et 20 ont donné pour chacune d'elles des bandes polymorphes. Parmi ces amorces nous avons choisi et retenu les amorces **OPF 6, 13, 14 et 17** pour le rapprochement des souches.

Ce rapprochement s'est fait sur la base de la similitude des profils (pour une même amorce).

Les planches 3 et 4 montrent les profils d'amplification choisis pour regrouper les souches dans les trois ensembles suivants:

Premier ensemble: S0, S1, S2, S2', S3, S4, S4, S5, S6, S8, S9, S10, 11, k1, k2, SL1, SL2, III, MBJ, PJ2, I, V, V', SIPS1, SIPS2.

Deuxième ensemble: MBA, 12, SIPS3, SIPS3'.

Troisième ensemble: T5.

Pour l'instant les regroupements effectués ne peuvent pas être corrélés aux résultats des tests du pouvoir pathogène.

35 - Séquencage

Les résultats du séquençage des ITS sont ci-dessous. Nous avons pu séquencer 556 paires de bases de l'ITS de la souche S3 et 505pb de la souche T5. Des interrogations ont été effectuées dans la banque de données GenBank (Blast NCBI).

Les résultats de l'alignement des séquences de l'ITS de la souche S3 révèlent 96 % d'homologie avec les ITS de *Pleospora herbarum* et de *Stemphylium botryosum*. Alors que l'alignement avec l'ITS de la souche T5 donne 97% d'homologie avec les ITS de *Ampelomyces* sp.

Ces résultats viennent confirmer une fois de plus l'appartenance de nos souches à l'espèce *Stemphylium solani*.

Séquences de l'ITS des souches S3 (Seq1) de *Stemphylium solani* du Sénégal et T5 (Seq 2).

Seq1

GTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTAAAAAATAGGGTCTTG
ATGGATGCTCAACCAAGGCTGATTCAAAGTGCAAGAATTGTGCTGCGCTCCGAAACC
AGTAGGTCGGCTGCCAATGATTTTAAGGCGAGTCTCGTGAGAGACAAGACGCCAAC
ACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTGGGAATAC
CAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACAC
TACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG
AAAGTTGTAATAATTACATTGTTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAAGGTTTATG
GTTTGGTCCTGGTGGCCGGGCGAACCCGCCAGGAAACAAGAAGTGCGCAAAAGACA
TGGGTGAATAATTCAGACAAGCTGGAGCCCTCACCGAAGTAAGGTCCCAGCCCGCTT
TCATATTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTACACCTTCCGG.

Seq 2

TTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAGAGTGTA AAAAATGTACTTT
GTGGACGTCGTCGTTGTGAGTGCAAAGCGCGAGATGTA CTGCGCTCCGAAATCAATA
CGCCGGCTGCCAATCGTTTTGAGGCGAGTCTGCGCGCAGAGGCGAGACAAACACCCA
ACACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAAT
ACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC
ACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT
TGAAAGTTGTA ACTATTAAGTTTTTTCAGACGCTGATTTCAATTACAAAGGGTTTAAG
TGTTGTCCAGCCGGTGGGCGAACCCACCGAGGAAACGAAGGTA CTCAAAGACATGG
GTAAGAGATGGCAGGCAAAGCCCGCAACTCTAGGTAATGATCCTT.

Alignement : Les alignements des séquences sont présentés en annexe 6.

IV CONCLUSION - PERSPECTIVES

Les résultats de séquençage de l'ITS des souches étudiées a permis de conclure que toutes les souches du Sénégal étudiées appartiennent à l'espèce *Stemphylium solani* et que la souche T5 de l'INRA n'appartient pas à cette espèce.

Compte tenu du peu de travaux portant sur l'étude génétique du champignon (*Stemphylium solani*) et de l'aspect préliminaire de l'étude que nous avons entrepris et décrit dans le présent document, les approches utilisées telles que la technique RAPD et le pouvoir pathogène n'ont pas permis pour l'instant d'établir un même classement des souches de notre collection.

Sous réserve d'une analyse plus approfondie portant sur un échantillonnage plus étendu couvrant la totalité du Sénégal, un certain nombre de conclusions provisoires peuvent être tirées:

- l'étude de la diversité portant sur une trentaine de souches, toutes provenant de la maraîchère des Niayes (Dakar à St Louis), montre que toutes les souches semblent très proches génétiquement à quelques variantes près,

- La fin des tests de pouvoir pathogène permettra d'établir ou non une corrélation avec les résultats de biologie moléculaire.

Ces résultats préliminaires doivent être approfondis:

- en augmentant le nombre d'individus et en diversifiant les aires géographiques de prélèvement,
- en reprenant et en affinant les techniques d'analyse moléculaire déjà utilisées,
- en complétant et en étendant les tests de pouvoir pathogène à toutes les souches déjà en collection et à venir.

Prochainement, les résultats RAPD pourront être analysés par construction de matrices sur le critère présence/absence de bande.

V - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Darnell J, Lodish H. et Baltimore D. La Cellule: Biologie Moléculaire.

Gardes M., Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes : application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Mol. Ecol.* 2 113 - 118.

Maiatis , T., Fritsch, E.F. et Sambrook, J. 1989. *Molecular cloning: laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Mullis K. B. et Faloona F., 1987. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 51, 263 - 273.

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G.T., Erlich H.A., and Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350 - 1354.

Sy-Ndir, M. et Lacoste L. 1994. Morphological and physiological aspects of *Stemphylium* leafspot of scarlet eggplant, *Solanum aethiopicum* L. from Sénégal. *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire. Serie A, Sciences Naturelles* 47, 33 - 41.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531 -6535.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990a. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531 - 6535.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990b. Genetic analysis with RAPD markers. In: *More Gene Manipulations in Fungi*. J.W. Bennet and L.L. Lasure ed. Academic Press FL. P 429 - 439.

White T.J., Bruns T.D., Lee S., and Taylor J. W. 1990 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA 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), pp. 315-322. Ac. Press: San Diego, California.

VI - ANNEXES

ANNEXE 1

- **Milieux de culture**

Potato-Dextrose-Agar (PDA): 200 g de pommes de terre bouillie dans 1 l d'eau, 15 g d'agarose et 10 g de dextrose.

Jus de légumes-agar (V8 agar) : 200 ml de jus de légumes-V8, 800 ml d'eau, 18 g de CaCo₃ et 15 g d'agarose.

Potato-Dextrose Broth (PDB) : décoction de 125 g de purée de pommes de terre et 10 g de Dextrose pour 1 l d'eau.

* **Tampons**

Tampon T.E.

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM, pH 8,0

Tampon de lyse

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	50 mM, pH8,0
SDS	3 %
β-mercaptoéthanol	1 %

Tampon de réaction d'amplification

Tris-HCl	750 mM, pH 9,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM

Tampon d'électrophorèse

T.A.E. :

Tris-Acétate	40 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM, pH 8,0

Tampon de charge :

Saccharose dans H ₂ O	40 %
Colorant Orange G	

ANNEXE 2

Enzymes de restriction utilisées et leurs sites de restriction

(sites à 4 paires de bases)

Alu I 5' ...AG ↓ CT ...3'
 3' ...TC ↑ GA ...5'

Bsp 143 I 5' ... ↓ GATC ...3'
 3' ...CTAG ↑ ...5'

Hae III 5' ...GG ↓ CC ...3'
 3' ...CC ↑ GG ...5'

Msp I 5' ...C ↓ CGG ...3'
 3' ...GGC ↑ C ...5'

Nde II 5' ... ↓ GATC ...3'
 3' ...CTAG ↑ ...5'

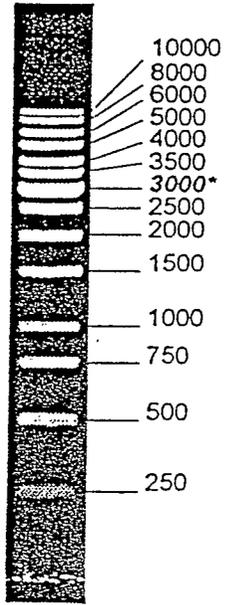
(sites à 6 paires de bases)

Bam H I 5' ...G ↓ GATCC ...3'
 3' ...CCTAG ↑ G ...5'

EcoR I 5' ...G ↓ AATTC ...3'
 3' ...CTTAA ↑ G ...5'

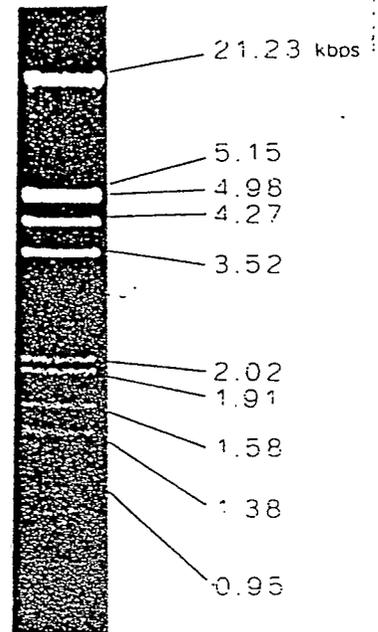
ANNEXE 3

- marqueur 1Kb



1.0% agarose

- marqueur 2



1% agarose gel

ANNEXE 4

Protocole purification produits PCR, suivant le Kit de purification Wizard PCR Prep (Promega)

(pour chaque produit PCR préparer une Mini-colonne Wizard)

- les tubes contenant le gel LMP +les fragments d'ADN sont incubés à 65 degrés, jusqu'à dissolution complète du gel.
- Numérotés des tubes, introduire 300µl du mélange gel/ADN dans chaque tube, ajouter 500µl de la résine disponible dans le kit, mélanger soigneusement.
- Séparer les 2-éléments d'une seringue de 5 ml, fixer la mini-colonne sur la seringue, introduire le mélange dans la seringue et à l'aide du piston pousser délicatement le mélange dans la colonne.
- Mettre 2 ml d'isopropanol 80% dans la seringue, pousser comme précédemment.
- Mettre 30 µl d'eau dans la colonne pour l'éluer, détacher la colonne l'introduire dans un nouveau tube et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
- Conserver cette élution car elle contient l'ADN.
- Remettre la colonne dans un autre tube, ajouter 20 µl d'eau recentrifuger 20 sec. à 10 000g, conserver cette deuxième élution.

Pour vérifier la qualité de l'ADN purifié, faire un petit gel et déposer 5 µl de la solution d'ADN, faire migrer et visualiser aux UV.

Dosage de l'ADN au spectrophotomètre:

- diluer 20 µl de la solution d'ADN dans 180 µl d'eau stérile
- lire la DO au spectrophotomètre et à l'aide de la formule: $DO=1$ correspond à 50 ng/µl, calculer la quantité d'ADN contenue dans notre extrait.

Annexe 5

Protocole clonage

Les produits PCR ainsi purifiés constituent notre insert .

Cet ADN est introduit dans un vecteur, ici on a utilise le plasmide pGEMt comme vecteur.

*Ligation:

Elle a lieu dans le mélange suivant a un volume final de 10/ μ l :

T4 DNA ligase.....1 μ l
Tampon de la réaction.....1 μ l
Vecteur pGEMt.....1 μ l
Produits PCR.....4 μ l

Eau filtrée stérile...qsp 10 μ l

Incubation à 4 degrés toute une nuit.

*Transformation

Elle se fait en introduisant les plasmides par choc électro-thermique dans des bactéries compétentes (bactéries dont la paroi à été perméabilisée), ce sont des E coli X L 1 Blue.

*Mise en culture sur milieu LB ampicilline/IPTG/Xgal

On isole les clones d'intérêt (ceux qui ont intégré le plasmide et qui sont de couleur blanche) on les multiplie sur milieu LB ampicilline.

A partir de cette culture on ressort notre insert à l'aide d'exonucléases et on le purifie comme précédemment.

Annexe 6

Alignement de séquences des rDNA ITS de *Pleospora herbarum* DAOM 150679
et de *Stemphylium solani* S3 du Sénégal.

Stemp: 1 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagttnnnnnnntagggtcttgatg 60
|||||
Pleos:549 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagttgaaaaaat-gtggcttgatg 490

Stemp: 61 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtcaagaattgtgctgcgctccgaaaccagtagg 120
|||||
Pleos: 489 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtcaagaattgtgctgcgctccgaaaccagtagg 430

Stemp: 121 tcggctgccaatgatttaaggcgagtctcgtgagagacaa-gacgccaacaccaagca 179
|||||
Pleos: 429 tcggctgccaatcatttaaggcgagtctcgtgagagacaaagacgccaacaccaagca 370

Stemp: 180 aagcttgagggtacaaatgacgctcgaacaggcatgcccttggaaataccaaggcgca 239
|||||
Pleos: 369 aagcttgagggtacaaatgacgctcgaacaggcatgcccttggaaataccaaggcgca 310

Stemp: 240 atgtcggtcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcactacgtatcgatt 299
|||||
Pleos: 309 atgtcggtcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcactacgtatcgatt 250

Stemp: 300 tcgctgcgttctcatcgatgccagaaccaagagatccgttggaaagttgtaataatt 359
|||||
Pleos: 249 tcgctgcgttctcatcgatgccagaaccaagagatccgttggaaagttgtaataatt 190

Stemp: 360 acattgttactgacgctgattgcaattacaaaagtttatggttggctcctggtggcc 419
|||||
Pleos: 189 acattgttactgacgctgattgcaattacaaaagtttatggttggctcctggtgg-c 131

Stemp: 420 gggcgaacccgccaggaaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 479
|||||
Pleos: 130 gggcgaacccgccaggaaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 71

Stemp: 480 gctggagccctaccgaagtaagggtcccagcccgtttcatattgtgtaatgatccctcc 539
|||||
Pleos: 70 gctggagccctaccgaggtgaggtccaacccgtttcatattgtgtaatgatccctcc 11

Stemp: 540 g-aggttcac 548
|
Pleos: 10 gcaggttcac 1

Identities = (96%), Positives = 532/550 (96%), Gaps = 3/550 (0%)

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

St. so: 1 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagttnnnnnnntagggtcttgatg 60

|||||
|||||

*St. bo:*525 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagttgaaaaaatgtggtcttgatg 466

St. so: 61 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtgaagaattgtgctgcgctccgaaaccagtagg 120

|||||
|||||

*St. bo:*465 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtgaagaattgtgctgcgctccgaaaccagtagg 406

St. so: 121 tcggctgccaatgatttaaggcgagtctcgtgagagaaa-gacgcccaacaccaagca 179

|||||
|||||

St. bo: 405 tcggctgccaatcatttaaggcgagtctcgtgagagaaaagacgcccaacaccaagca 346

St. so: 180 aagcttgagggtacaatatgacgctcgaacaggcatgcccttgggaataccaaagggcgca 239

|||||
|||||

St. bo: 345 aagcttgagggtacaatatgacgctcgaacaggcatgcccttgggaataccaaagggcgca 286

St. so: 240 atgtgcgttcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcacactacgfatcgatt 299

|||||
|||||

St. bo: 285 atgtgcgttcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcacactacgfatcgatt 226

St. so: 300 tcgctgcgttcttcatcgatgccagaaccaagagatccgttggtgaaagttgaataatt 359

|||||
|||||

St. bo: 225 tcgctgcgttcttcatcgatgccagaaccaagagatccgttggtgaaagttgaataatt 166

St. so: 360 acattgttactgacgctgattgcaattacaaaaagtttatggttggctcctggtggcc 419

|||||
|||||

St. bo: 165 acattgttactgacgctgattgcaattacaaaaagtttatggttggctcctggtggc- 107

St. so: 420 gggcgaaccgcccaggaaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 479

|||||
|||||

St. bo: 106 ggcgaaccgcccaggaaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 48

St. so: 480 gctggagccctcaccgaagtaaggctcccagccgctttcatattgtg 526

|||||
|||||

St. bo: 47 gctggagccctcaccgaggtgaggtccaaccgctttcatattgtg 1

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