



Les *Colletotrichum* agents d'Anthracnose en Côte-d'Ivoire

II. — Polymorphisme enzymatique dans une collection d'isolats de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

J. P. GEIGER, M. LOURD, B. HUGUENIN

Laboratoire de Phytopathologie,
Centre ORSTOM d'Adiopodoumé,
BP V-51, Abidjan (Côte-d'Ivoire)

Résumé

Une analyse en électrophorèse des spectres enzymatiques α -estérase, leucyl-aminopeptidase et phosphatase acide a été menée sur quarante souches de *Colletotrichum gloeosporioides* isolées en Côte-d'Ivoire. L'interprétation, faisant appel aux techniques de la taxonomie numérique, est effectuée enzyme par enzyme afin d'examiner l'apport et l'intérêt de chaque type de caractère. Enfin, un dendrogramme généralisé est établi, intégrant l'ensemble des données. Il révèle l'importante diversification des génomes au sein de l'espèce. Cette hétérogénéité interdit la mise en évidence d'une éventuelle structure de groupe.

Introduction

De manière classique, la systématique du genre *Colletotrichum* Corda, au sens de von Arx (1957), repose essentiellement sur des critères morphologiques. Toutefois, en raison de l'extrême variabilité de ces organismes, la séparation entre les espèces apparaît souvent difficile et confuse (Simonds, 1965). Cette confusion est particulièrement marquée chez le complexe spécifique *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. au sein duquel von Arx a regroupé près de six cents espèces préalablement décrites.

Nous avons utilisé les critères spécifiques établis par cet auteur pour constituer, en Côte-d'Ivoire, une collection d'isolats de *C. gloeosporioides* devant nous permettre, après analyse adéquate, de préciser la structure de la population du parasite. Une première approche en ce sens avait été réalisée, basée sur une identification des individus par leurs seuls caractères morphologiques et culturaux (Lourd et al., 1979). L'interprétation, effectuée par des méthodes de taxonomie numérique, avait mis en lumière une très large variabilité au niveau des caractères phénotypiques des souches tout en révélant une certaine structure du groupe.

Nous avons tenté d'affiner ces résultats en prenant en compte des marqueurs d'ordre biochimique. Dans cette optique, des données acquises chez d'autres microorganismes ont montré que les techniques d'analyse électrophorétique des protéines

offraient des possibilités de résolution intéressantes en matière de classification (Clare, 1963 ; Garber et Rippon, 1968 ; Hall, 1973). Leur utilisation a, en particulier, permis d'apporter certains arguments significatifs dans la classification d'espèces de

TABLEAU 1

Origine géographique et parasitaire des isolats de *Colletotrichum gloeosporioides*
 Geographical and parasitic origin of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates

Code	Plante hôte	Organe attaqué	Lieu de récolte
AG2	<i>Solanum melongena</i>	Fruit	Adiopodoumé
AGL	<i>Solanum integrifolium</i>	Fruit	Adiopodoumé
AR	<i>Arachis hypogea</i>	Tige	Adiopodoumé
AV	<i>Persea americana</i>	Rameau	Dabakala
BN	<i>Musa</i> sp.	Fruit	Adiopodoumé
BR	<i>Breynia nivosa</i>	Tige	Adiopodoumé
CA	<i>Theobroma cacao</i>	Feuille	Gagnoa
CE	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Feuille	Adiopodoumé
CF1	<i>Coffea arabica</i>	Rameau	Man
CF2	<i>Coffea canephora</i>	Rameau	Adiopodoumé
CF3	<i>Coffea canephora</i>	Rameau	Adiopodoumé
CR	<i>Codiaeum variegatum</i>	Feuille	Ferkéssédougou
CT	<i>Gossypium hirsutum</i>	Fruit	Bouaké
DI	<i>Dieffenbachia</i> sp.	Feuille	Adiopodoumé
FV	<i>Vicia faba</i>	Tige	Adiopodoumé
HE	<i>Heliconia</i> sp.	Feuille	Adiopodoumé
HV	<i>Hevea brasiliensis</i>	Feuille	Dabou
IG	<i>Dioscorea alata</i>	Tige	Bouaké
KF	<i>Hibiscus cannabinus</i>	Tige	Bouaké
MC	<i>Manihot utilisima</i>	Tige	Adiopodoumé
MG1	<i>Mangifera indica</i>	Feuille	Korhogo
MG2	<i>Mangifera indica</i>	Rameau	Korhogo
PH	<i>Philodendron</i> sp.	Feuille	Adiopodoumé
PI1	<i>Capsicum annuum</i>	Fruit	Touba
PI2	<i>Capsicum annuum</i>	Fruit	Adiopodoumé
PL8 (66)	<i>Elaeis guineensis</i>	Feuille	Aboisso
PL10 (09)	<i>Elaeis guineensis</i>	Feuille	Dabou
PP1	<i>Carica papaya</i>	Feuille	Adiopodoumé
PP2	<i>Carica papaya</i>	Feuille	Adiopodoumé

α -estérases :

α -naphthyl acétate de sodium	40 mg
Fast Blue RR	100 mg
Tampon phosphate mono-disodique 0,1 M pH 7,0	100 ml

Leucyl-amino-peptidases :

l-leucyl- β -naphthylamide	50 mg
Black K salt	50 mg
Tampon tris-maléate 0,1 M pH 6,0	100 ml

Phosphatases acides :

α -naphthyl phosphate de sodium	25 mg
Fast Garnet GBC	50 mg
Tampon acétate 0,05 M pH 5,0	100 ml

Après révélation, les gels sont fixés à l'acide acétique à 7 p. 100 ; ils peuvent être conservés plusieurs mois soit dans cette solution soit sous gaine plastique scellée. De plus, chaque zymogramme est archivé sous forme de document photographique.

4. — Interprétation et analyse des données

Les spectres ainsi obtenus ont été confirmés par deux analyses successives de l'ensemble des souches pour les trois enzymes étudiées. Les interprétations ont été faites directement par mesure des migrations relatives (par rapport au bleu de bromophénol marqueur du front). De plus chaque spectre est comparé à celui d'un témoin (souche PP2 ou PP4) présent sur chaque plaque. Ces interprétations ont également été complétées par étude du document photographique. Dans chaque cas, la présence du témoin nous a permis de lever les ambiguïtés liées à de faibles différences de Rf entre les deux répétitions.

L'analyse des données a été faite selon les méthodes de la taxonomie numérique (René-Chaume, 1975). Dans un premier temps le calcul, pour chaque enzyme, d'un indice de similarité simple (indice de Sokal et Michener) nous a permis, par construction du dendrogramme correspondant à chacune des trois matrices de similarité, de visualiser les affinités respectives entre isolats ou groupes d'isolats.

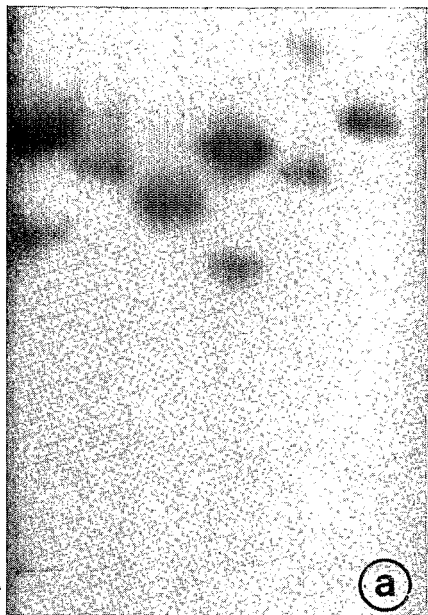
Pour préciser les résultats ainsi obtenus, nous avons fait appel à une méthode d'analyse plus complexe qui nous a permis d'étudier simultanément, pour l'ensemble des souches, la totalité des caractères retenus, chaque fraction isozymique étant alors considérée comme un critère taxonomique distinct. Cette étude, utilisant le programme d'analyse factorielle des correspondances mis au point par Benzecri (1973) a été réalisée au Centre de Calcul du CNRS (CIRCE) à Orsay. Les résultats en sont donnés sous forme du dendrogramme obtenu en utilisant comme critère d'agrégation la maximisation du moment centré d'ordre 2 de la partition.

FIG. 1. — Photographie de zymogrammes en gel d'amidon. Les exemples ont été choisis pour montrer diverses positions des bandes chez les LAP (a), le type de spectres obtenus avec les Phosphatases acides (b) et la variabilité des isozymes α -estérases au sein d'un ensemble de souches isolées d'un même hôte (Papayer) (c).

Starch gel electrophoresis : photographs of selected zymograms. a) Leucyl-amino-peptidases. b) Acide phosphatases. c) α -estérases : isozymic patterns of six strains isolated from the same host, Carica papaya.

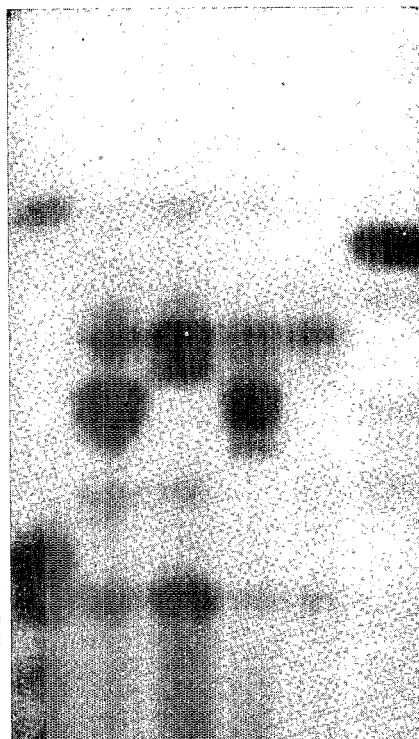
BR CR BN P2 C1 KF

LAP



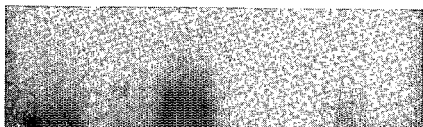
TM1

P1 P3 P2 P4 P5 PF



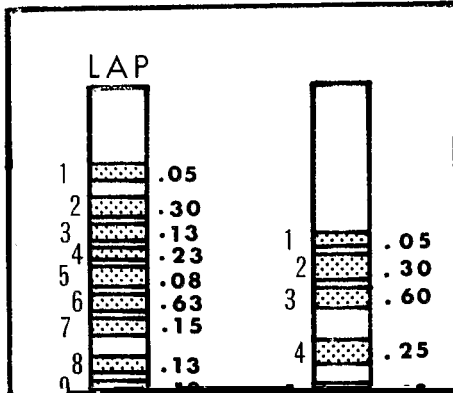
Di AR1 Ct P4 He Mg2

α .EST.



Résultats

Les photographies de la figure 1 présentent un exemple des zymogrammes à partir desquels les schémas d'interprétation des figures 2, 3, 4 et 5 ont été établis. Les



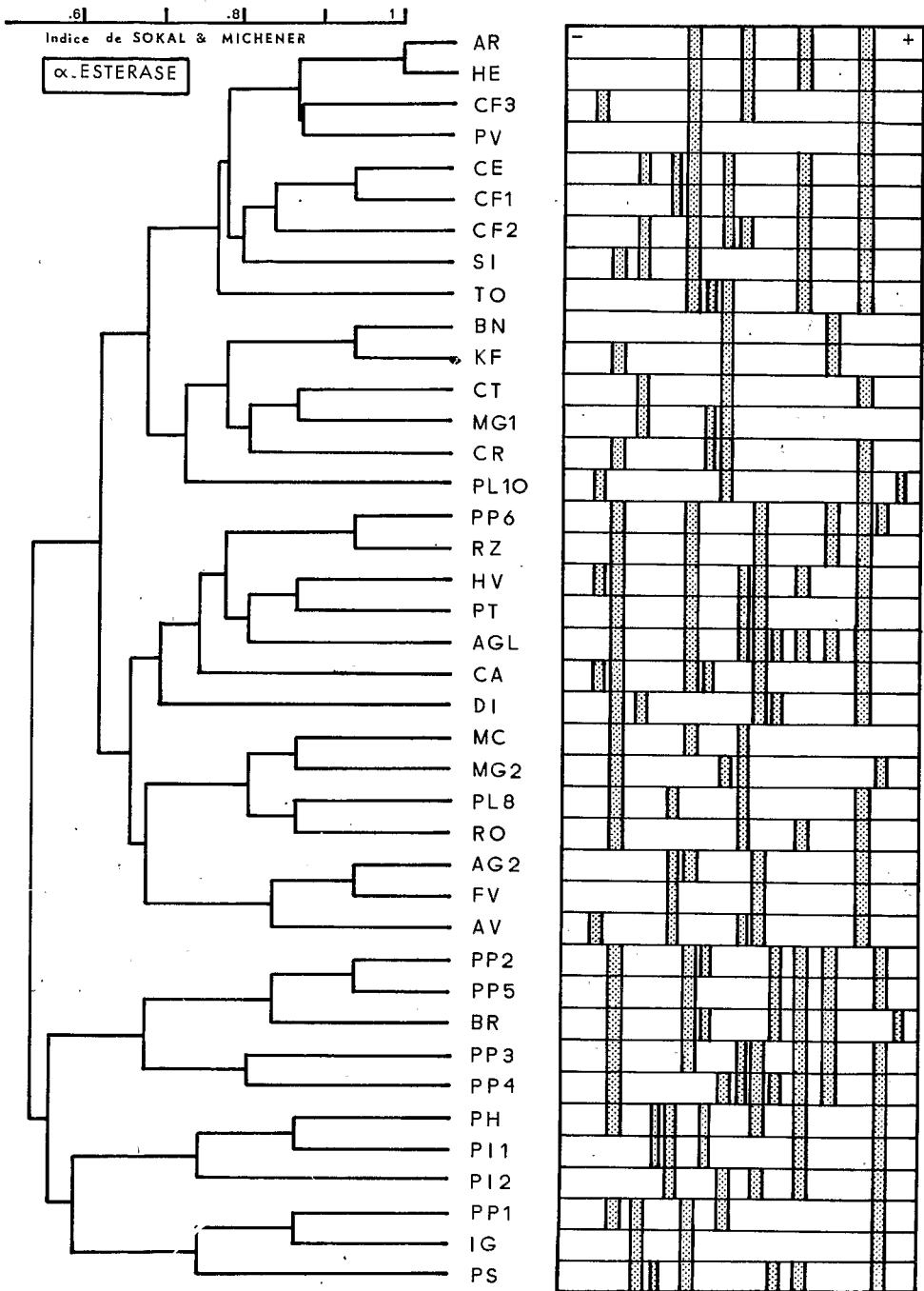


FIG. 3. — α -estérases : spectres enzymatiques des quarante souches et dendrogramme calculé par analyse numérique.

α -esterases : isozymic spectra of the forty strains and computed dendrogram.

analyses ont porté sur trente-huit sites d'activité enzymatique, seize pour les α -estérases, dix pour les leucyl-aminopeptidases et douze pour les phosphatases acides (fig. 2).

1. — Activités α -estérases

Nous n'avons pas tenu compte des activités révélées entre le dépôt et l'emplacement de la bande 16, ceci en raison de phénomènes de traînée rendant cette zone non interprétable. Parmi toutes les bandes restantes, aucune, commune à toutes les souches, ne peut être considérée comme marqueur spécifique bien que quelques isozymes, ayant des fréquences d'apparition supérieures à 0,5, puissent avoir une certaine valeur systématique. Il n'est d'ailleurs pas exclu que des combinaisons de bandes puissent avoir un degré de signification supérieur à celui des mêmes bandes prises isolément (cas des bandes 2 et 3 présentes, seules ou en combinaison, chez 90 p. 100 des isolats ou des bandes 10, 11 et 12 que l'on trouve, associées de façon variable, chez la totalité des souches).

L'hétérogénéité des zymogrammes α -estérases (fig. 3) donne une assez bonne représentation de la complexité génétique de l'espèce. Cette situation est également illustrée par le dendrogramme chez lequel l'existence apparente de nombreux sous-ensembles se raccordant à des niveaux variables tendrait à indiquer que, pour ce critère particulier, les structures de groupe sont faibles au sein de la collection étudiée, seul se détachant un ensemble de souches apparemment mieux structuré que le reste de la collection (souches PP2 à PS).

2. — Activités LAP

L'interprétation des zymogrammes LAP présente des difficultés analogues. Pour un nombre total d'isozymes plus faible que précédemment (dix sites distincts), il n'existe cependant pas de locus commun à toutes les souches, seule la bande 6 — avec une fréquence 0,63 — pouvant, à la limite, être considérée comme assez représentative de la collection. Ce faible nombre d'isozymes par souche (fig. 4) apparaît d'ailleurs surprenant si l'on compare ce résultat à celui d'une analyse similaire menée sur les *Colletotrichum* des graminées qui avait révélé l'existence, en moyenne, de quatre isozymes LAP par souche, dont une était commune aux deux espèces *Colletotrichum*

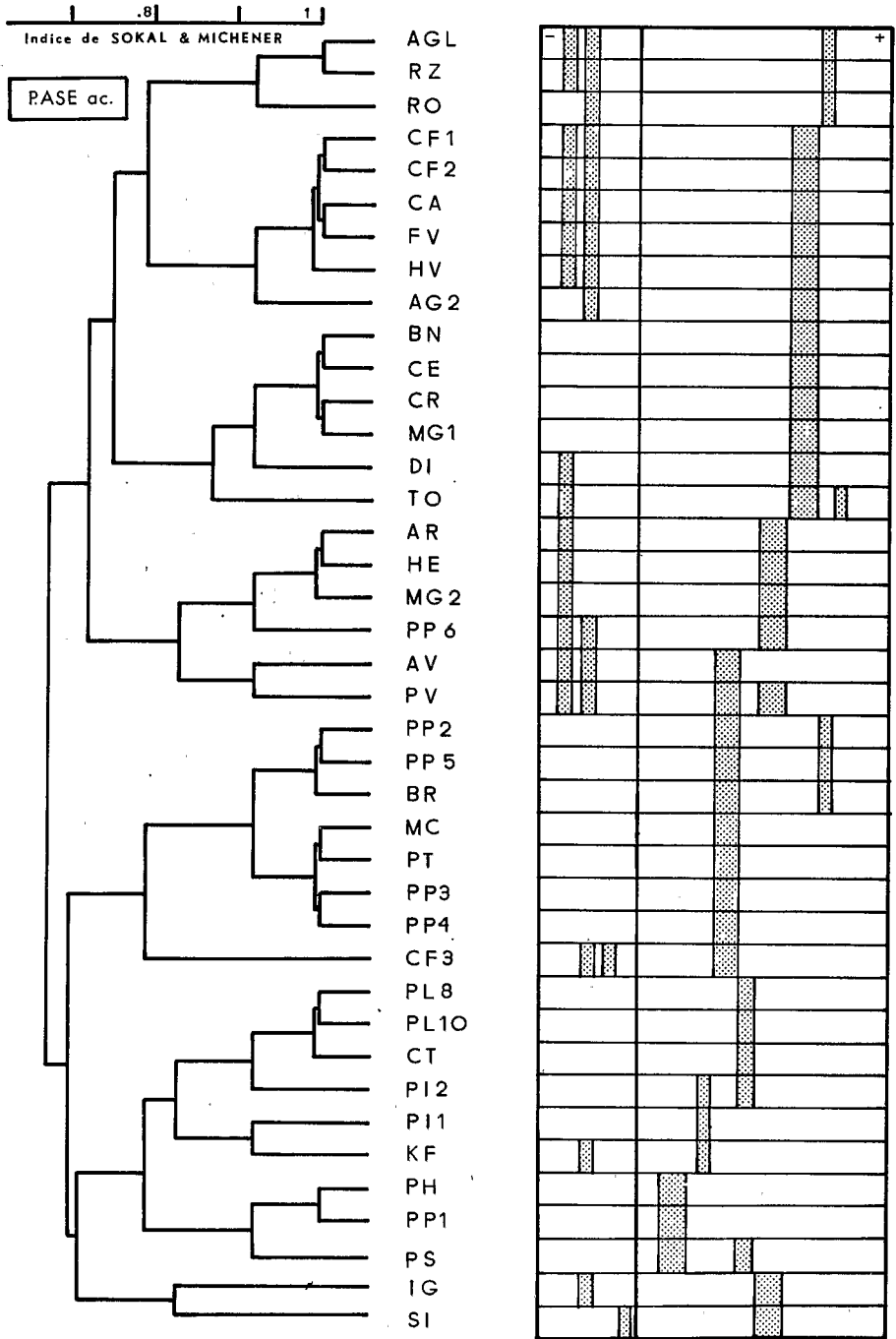


FIG. 5. — Phosphatases acides : spectres enzymatiques des quarante souches et dendrogramme calculé par analyse numérique.

Acid phosphatases : isozymic spectra of the forty strains and computed dendrogram.

faibles. Par ailleurs, certaines d'entre elles pourraient correspondre à une présence simultanée de plusieurs fractions caractérisées par des migrations très voisines et non séparables dans le système utilisé. D'autres systèmes de tampons ont été testés mais n'ont pas permis d'affiner la résolution. Le même problème avait, par ailleurs, été déjà rencontré au cours de l'étude des *Colletotrichum* des graminées (Huguenin *et al.*, 1978).

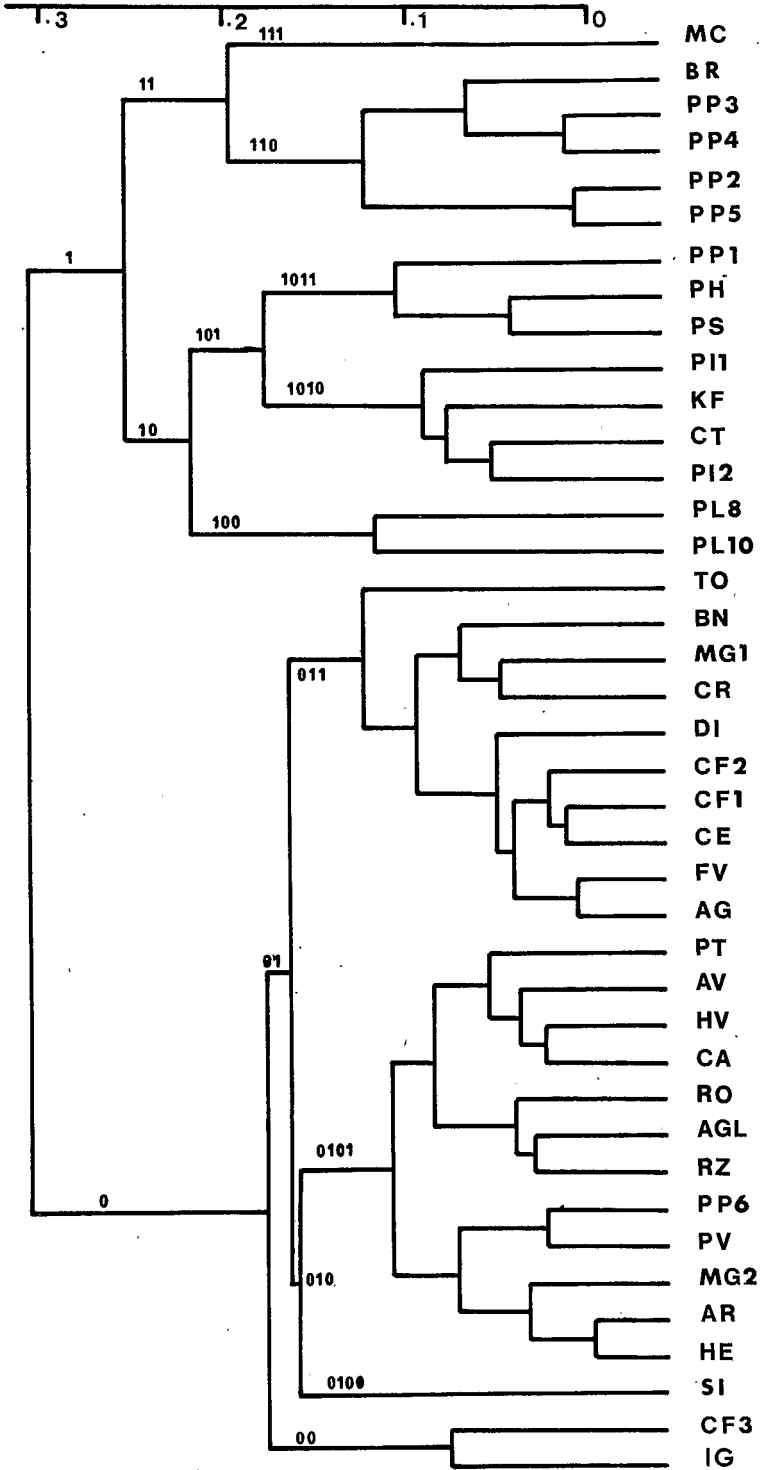
Quoi qu'il en soit, l'étude du dendrogramme de la figure 5 met en évidence l'individualisation de groupes assez bien structurés mais sans toutefois qu'il y ait de relations apparentes entre ce regroupement et ceux déjà obtenus.

4. — *Interprétation et analyse des données*

Une analyse factorielle des correspondances menée sur l'ensemble des données recueillies pour les trois types d'isoenzymes a permis la construction du dendrogramme de la figure 6. Celui-ci fournit ainsi une image synthétique de la collection étudiée. Les données de l'analyse mathématique (projections du nuage de points sur les différents plans de référence en particulier) permettent de définir un premier ensemble de deux groupes relativement diffus (groupes 011 et 0101) associés à des individus isolés (SI-0100 et CF3-IG00). Ces deux ensembles de points correspondent à des individus ayant entre eux un certain nombre de ressemblances mais chez lesquels il est difficile de déceler une quelconque hiérarchisation. Toutes ces souches présentent d'importantes affinités et semblent correspondre à des voies d'évolution parallèles des génomes.

Un second ensemble de souches apparemment mieux structuré est formé par deux éléments prépondérants (groupes 10 et 11), chacun regroupant des isolats présentant de fortes affinités. A ces groupes se relie ici encore des souches satellites dont l'inclusion apparaît comme impossible (souches Mc et PL8-10). Il est vraisemblable que cette séparation des isolats de la collection en deux grands ensembles (0 et 1) corresponde à une réalité génétique de la population d'autant que si aucune homogénéité ne peut être trouvée au plan de la spécialisation parasitaire pour le premier groupe, celle-ci se manifeste clairement au sein du second par l'inclusion, dans un même ensemble, de sous-groupes rassemblant des souches de même origine parasitaire comme par exemple les isolats PP2, PP3, PP4 et PP5 issus de papayer, ou PL8 et PL10 provenant de palmier à huile. On peut noter également les proximités KF-CT, souches provenant de Malvacées ou PI1 et PI2 issues de piment.

Malgré cela, ce dendrogramme considéré globalement, comme les précédents et celui obtenu à la suite de l'étude morphologique et culturale des mêmes souches (Lourd *et al.*, 1979), ne révèle, au sein de la collection, aucune organisation évidente. Les isolats se regroupent en fonction de leurs affinités génétiques mais la variabilité et le polymorphisme sont trop importants pour que, sur le nombre de souches relativement restreint que nous avons utilisé, puisse se dégager une tendance structurale précise. La principale conclusion qu'il est donc possible de tirer de cette analyse est que la méthode utilisée fournit davantage une image globale d'un ensemble de souches qu'une représentation ordonnée de l'espèce.



Discussion et conclusions

L'examen critique des résultats exposés suscite plusieurs questions relatives tant à la technique d'analyse utilisée qu'à la structure même de la collection d'isolats de *C. gloeosporioides*. Le type de regroupement auquel nous aboutissons, pourrait en effet résulter de la mise en œuvre de méthodes analytiques mal adaptées aux objectifs que nous nous étions fixés. Toutefois, les résultats obtenus par d'autres auteurs dans des cas similaires, de même que ceux que nous avons pu dégager de l'étude des *Colletotrichum* des graminées (Huguenin *et al.*, 1978) nous inclinent à penser que la méthode n'est pas en cause.

D'autres exemples militent également en faveur de l'utilisation des zymogrammes comme instrument de discrimination intraspécifique chez les champignons ou les bactéries. Stout et Shaw (1974) utilisant la même méthode d'électrophorèse en gel d'amidon ont pu ainsi définir, au sein d'une collection de *Mucor*, les affinités entre espèces et aboutissent à des regroupements sur une base phylogénétique. Toutes ces études partent de l'hypothèse que des enzymes ayant des spécificités de substrat et des migrations électrophorétiques semblables sont identiques et, en conséquence, codées par le même gène. Dans ces conditions (bien que ce postulat ne puisse être démontré pour chaque isoenzyme), les indices de similarité peuvent être considérés comme une estimation de la distance génétique entre les souches.

Dans la mesure donc où une remise en question de la méthode analytique ne paraît pas fondée, il n'en reste pas moins que les regroupements auxquels elle nous conduit paraissent plus ou moins arbitraires et, à quelques exceptions près, sans relation avec la réalité parasitaire, géographique ou climatique (zone de forêt ou zone de savane).

Malgré cette hétérogénéité l'analyse globale effectuée sur la base de l'ensemble des caractères enzymatiques révèle une répartition des isolats en deux groupes (0 et 1 du dendrogramme généralisé, fig. 6). Il est cependant remarquable qu'au sein de ces deux groupes, après exclusion de quelques souches satellites (MC, PL8 et PL10 pour l'un ; SI, CF, IG pour l'autre), la variabilité au niveau des caractères analysés soit du même ordre. Par ailleurs, au plan purement mathématique, le degré de signification des niveaux de séparation en sous-groupes est très faible. Ainsi, dans le cas particulier qui nous préoccupe, la variabilité génétique révélée par l'analyse enzymatique a pour corollaire une absence de structuration bien définie, les transitions entre deux souches voisines reposant vraisemblablement sur des modifications génétiques relativement mineures.

Sans doute serait-il possible d'imaginer plusieurs mécanismes évolutifs à même de conduire à l'installation d'une population qui, quoique hétérogène en apparence,

FIG. 6. — Dendrogramme global obtenu par analyse simultanée des trois enzymes pour les quarante souches étudiées.

Inclusive dendrogram computed from simultaneous analysis of the three enzymes among the forty studied strains.

n'en regroupe pas moins des individus génétiquement proches. Ainsi, il n'est pas exclu que la prédominance, chez ces organismes, de la reproduction asexuée ne puisse conduire à ce type de population, la diversification au sein de l'espèce n'étant assurée que par mutation spontanée ou par parasexualité. Par ailleurs, dans les conditions naturelles, un taux élevé d'hétérocaryose ne peut que restreindre les différences entre isolats disposant d'informations génétiques supérieures à celles d'individus monocaryotiques. Encore cette dernière caractéristique ne devrait-elle pas avoir de répercussion sur notre analyse, les souches étudiées étant toutes issues d'un clonage monospore.

Enfin un autre aspect de la biologie de ces champignons ne doit pas être sous-estimé. En effet, les *C. gloeosporioides* étant des parasites facultatifs, ils ne subissent que de façon peu sévère les pressions de sélection de la part de leurs hôtes potentiels. Il est probable que cette absence de sélection et contre-sélection (dont la manifestation n'est vraisemblablement pas limitée aux seuls gènes directement impliqués dans l'expression du pouvoir pathogène) puisse favoriser une dérive faible mais continue, du génome des individus. Au sein d'une telle collection on pourra trouver, classées entre deux isolats aux caractères génétiques bien différenciés, toute une gamme d'individus, aux caractéristiques intermédiaires, peu différents de proche en proche. Il paraît légitime de penser que l'analyse, par les méthodes que nous avons mises en œuvre, d'un tel ensemble, ne pourra conduire qu'à des regroupements faiblement structurés.

Bien que l'on ne puisse avancer d'arguments en faveur de cette hypothèse il paraît néanmoins remarquable qu'une étude similaire menée sur une collection de souches appartenant au même genre *Colletotrichum*, mais inféodées aux graminées, nous ait conduit, au contraire, à des regroupements bien définis (Huguenin *et al.*, 1978). En effet, la seule analyse isozymique nous a non seulement permis de séparer les éléments de la collection en deux groupes représentatifs, respectivement, des espèces *falcatum* et *graminicola*, mais encore de distinguer, au sein de la dernière espèce, deux taxons rassemblant d'une part les souches « Maïs » et d'autre part les souches « Sorgho ». Ainsi, dans ce cas particulier, il semble bien exister une corrélation entre une spécialisation parasitaire étroite et une structure de groupe biologiquement (et mathématiquement) significative.

Enfin, d'un point de vue purement technique, la comparaison entre les résultats acquis sur les *C. gloeosporioides* et les *Colletotrichum* des graminées présente un aspect hautement démonstratif de l'intérêt et des limites de l'utilisation de critères biochimiques comme seuls éléments d'une analyse taxonomique. Une telle analyse peut aboutir à des situations fort éloignées : dans certains cas elle peut constituer l'outil idéal pour bien structurer un groupe, dans d'autres, par suite soit d'une individualisation trop marquée des éléments, soit d'une dérive continue de leur génome, elle peut conduire à des regroupements sans signification immédiate.

Quoi qu'il en soit, il apparaît à la lumière des deux études que nous avons menées, que le problème de la structure de la population de *C. gloeosporioides* de Côte-d'Ivoire ne pourra, éventuellement, être résolu qu'en multipliant et diversifiant les données descriptives caractérisant les isolats. Une telle approche est en cours intégrant l'ensemble des éléments dont nous disposons : morphologiques, culturels, physiologiques et pathogéniques.

Reçu pour publication le 01.04.1980.

Accepté pour publication le 30.06.1980.

Summary

The genus *Colletotrichum* in Ivory Coast

II. — Enzymatic polymorphism in strains of *Colletotrichum gloeosporioides*

An electrophoretic analysis of α -estérase, leucyl-aminopeptidase and acid phosphatase activities was performed in forty african isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. Results were interpreted, enzyme by enzyme, in order to examine the contribution and the analytical interest of the different data. The final dendrogram computed from the whole biochemical data, shows the great heterogeneity in the species. This heterogeneity impedes to reveal an eventual structure among the studied strains.

Références bibliographiques

- ARX J. A. von, 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. *Phytopathol. Z.*, **29**, 413-468.
- BENZECRI J. P., 1973. L'analyse des données. 2. L'analyse des correspondances. Dunod Edit., Paris, 619 p.
- CLARE B. G., 1963. Starch gel electrophoresis of proteins as an aid in identifying fungi. *Nature*, (London), **200**, 803-804.
- CLARE B. G., ZENTMYER G. A., 1966. Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, **56**, 1337-1335.
- GARBER C. D., RIPPON J. W., 1968. Proteins and enzymes as taxonomic tools. *Adv. appl. Microbiol.*, **10**, 137-154.
- GILL H. S., ZENTMYER G. A., 1978. Identification of *Phytophthora* species by disc electrophoresis. *Phytopathology*, **68**, 163-167.
- HALL R., 1973. Electrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungi and algae. *Bull. Torrey Bot. Club*, **100**, 253-259.
- HUGUENIN B., LOURD M., GEIGER J. P., 1978. Discrimination between *Colletotrichum falcatum* and *Colletotrichum graminicola* on the basis of enzymatic polymorphism and pathogenicity. *Comm. 3^e Congr. Intern. Phytopathol. Munich*.
- LOURD M., GEIGER J. P., GOUJON M., 1979. Les *Colletotrichum* agents d'Anthracoses en Côte-d'Ivoire. I. — Caractéristiques morphologiques et culturales d'isolats de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Penz. Ann. Phytopathol.*, **11** (4), 483-495.
- RENÉ-CHAUME R., 1975. Les méthodes de taxonomie numérique. *Boissiera*, **24**, 369-381.
- SHAW C. R., PRASAD R., 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes, a compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, **4**, 297-320.
- SIMMONDS J. H., 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensl. J. Agric. Sci.*, **22**, 437-459.
- SMITHIES O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61**, 629-641.
- SOKAL R. R., SNEATH P. H. A., 1963. Principles of numerical taxonomy. W. H. Freeman and Co, San Francisco, Cal. 359 p.
- STIPES R. J., 1965. Comparative morphology, pathogenicity, physiology and biochemistry of perithecial isolates of *Glomerella cingulata* obtained from different hosts. Ph. D. Thesis North Carolina State Univ., Raleigh., 82 p.