



Laboratoire de Phytopathologie, Centre Orstom d'Adiopodoumé,  
Côte d'Ivoire

Comparaison Entre Isolats  
de *Colletotrichum falcatum* et *Colletotrichum graminicola*  
sur la Base de Leurs Caractéristiques  
Morphologiques, Physiologiques et Pathologiques

Par

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

Avec 2 figures

Reçu le 22 octobre 1981

Les *Colletotrichum* graminicoles sont classiquement rattachés à deux espèces: le *Colletotrichum falcatum* Went groupant les souches parasites de la canne à sucre et le *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson. Une controverse subsiste cependant depuis que von ARX et MULLER (1954) ont placé tous ces champignons en synonymie sous le binôme *Glomerella tucumanensis* (Speg.) Arx et Muller, sur la base d'une forme sexuée présumée commune à toutes les souches. Pour des raisons d'ordre morphologique et pathogénique et parce que la forme sexuée *G. tucumanensis* n'est connue que chez le *C. falcatum*, d'autres auteurs (TARR 1962, SUTTON 1968) ont maintenu la distinction entre les deux espèces. Plus récemment, la séparation s'est trouvée renforcée par la description sur maïs de la forme parfaite du *Colletotrichum* parasitant cette plante: *Glomerella graminicola* Pol., différente du *G. tucumanensis* (POLITIS 1975).

L'existence de deux espèces de *Colletotrichum* graminicoles, morphologiquement proches mais à caractères pathogènes distincts, apparaît donc comme

isolats parasites de sorgho de ceux attaquant le maïs. Tous ces résultats tendent à montrer que l'espèce *Colletotrichum graminicola* est en réalité un agrégat de souches morphologiquement proches les unes des autres mais manifestant des différences importantes dans leur spécialisation parasitaire et leurs aptitudes pathogéniques. SUTTON allait plus loin dans ses conclusions en suggérant l'existence, au sein de l'espèce, de deux unités taxonomiques distinctes regroupant respectivement les souches parasites du maïs et celles attaquant les sorghos et autres graminées.

Dans le cadre d'une étude de la variabilité chez certaines espèces de *Colletotrichum* nous avons déjà utilisé les techniques d'électrophorèse en gel d'amidon pour déceler une éventuelle structuration des populations de *Colletotrichum gloeosporioides* en Côte d'Ivoire (GEIGER *et al.* sous presse). Par ailleurs une approche préalable (LOURD *et al.* sous presse) s'était intéressée à une comparaison morphologique entre quelques souches provenant de graminées et l'ensemble de nos isolats de *Colletotrichum gloeosporioides*. Dans le présent travail nous nous sommes efforcés d'appliquer les diverses techniques ainsi mises au point à la définition de nouveaux critères de distinction, au niveau spécifique ou subs spécifique, au sein du groupe des *Colletotrichum* parasites des graminées.

### Matériel et Méthodes

Les origines des différentes souches étudiées sont données dans le Tableau 1. Elles ont toutes été isolées de feuilles, sauf les souches maïs qui proviennent de lésions sur tiges. Les isolats sont conservés au laboratoire à 20 °C soit sur milieu malt gélosé soit sur feuilles de *Saccharum* stérilisées en tube de Roux.

1. L'étude des caractères morphologiques et culturaux a été faite sur milieu gélosé à 1 % d'extrait de malt. Les caractères retenues, avec leurs différents états possibles, sont repris au Tableau 2.

Tableau 1  
Origine des souches

No. de la souche	Plante hôte	Localité	Leg.
CS1	<i>Saccharum officinarum</i>	Adiopodoumé (CI)	M. LOURD
CS2	<i>Saccharum officinarum</i>	Adiopodoumé (CI)	M. LOURD
CS3	<i>Saccharum officinarum</i>	Adiopodoumé (CI)	M. LOURD
CSF	<i>Saccharum officinarum</i>	Ferkessedougou (CI)	M. LOURD
SO	<i>Sorghum vulgare</i>	Korhogo (CI)	M. LOURD
SOG	<i>Sorghum vulgare</i>	Guadeloupe	C. M. MESSIAEN
Mi	<i>Zea mays</i>	Ferkessedougou (CI)	C. M. MESSIAEN
MF1	<i>Zea mays</i>	Montpellier (F)	C. M. MESSIAEN
MF2	<i>Zea mays</i>	Montpellier (F)	C. M. MESSIAEN
MF3	<i>Zea mays</i>	Montpellier (F)	C. M. MESSIAEN
MF4	<i>Zea mays</i>	Montpellier (F)	C. M. MESSIAEN

Tableau 2  
Caractères phénotypiques et matrice de description

Caractère	Etats	CS1	CS2	CS3	CSF	SO	SOG	Mi	MF1
Aspect du mycelium aérien	Ras	+	-	-	+	-	-	-	-
	Irrégulier	-	-	-	-	+	-	-	-
	Cotonneux, abondant	-	+	+	-	-	+	+	+
Couleur du revers de la culture	Incolore	-	+	+	+	-	+	-	-
	Gris foncé	+	-	-	-	-	-	-	-
	Violet	-	-	-	-	-	-	+	+
	Jaune (pigment)	-	-	-	-	-	+	-	-
Longueur des spores	20—24 $\mu$	+	-	-	+	-	-	-	-
	24—28 $\mu$	-	-	+	-	-	-	-	-
	>28 $\mu$	-	+	-	-	+	+	+	+
Largeur des spores	4,5—5,4 $\mu$	-	-	-	-	+	+	+	+
	5,5—6,2 $\mu$	+	+	+	+	-	-	-	-
Diamètre du thalle à 5 jours	50—75 mm	-	-	-	-	+	+	-	-
	75—100 mm	+	+	+	+	-	-	+	+

2. Les protéines solubles des isolats ont été analysées par électrophorèse en gel d'amidon selon SMITHIES (1955): gel d'amidon Connaught à 14 % dans un tampon Tris-Maleate 0,03 M pH 7,0. Les extraits, déposés par le biais de pastilles de papier filtre épais, sont obtenus par broyage au mortier de thalles cultivés sur extrait de malt liquide, durant 5 jours à 27 °C et sous éclairage continu. Après migration (120 volts durant 18 heures) les gels sont démolés et clivés et les techniques de SHAW et PRASAD (1970) utilisées pour révéler les activités  $\alpha$ -esterases, phosphatases acides et leucyl amino peptidases. Simultanément des électrophorèses en gel de polyacrylamide à 7 % sont effectuées et révélées pour les protéines totales par coloration au Bleu de Coomassie.

Les zymogrammes et protéinogrammes ainsi obtenus sont photographiés, les interprétations étant faites à la fois sur les gels originaux et les enregistrements photographiques. Certains cas litigieux ont pu être résolus, soit par analyse densitométrique des gels de polyacrylamide, soit par coélectrophorèse d'extraits mélangés deux à deux.

3. Les différents isolats ont enfin été triés sur la base de leur pouvoir pathogène vis à vis des plantes du Tableau 3. Les inoculations sont réalisées à partir de broyats de culture sur milieu liquide (malt à 1 %) soit par pulvérisation directe des feuilles, soit par injection à la seringue dans la gaine de la jeune feuille non encore déroulée. Les plants utilisés sont jeunes, au stade 4—5 feuilles, issus de boutures (canne à sucre) ou de graines. L'incubation est réalisée en enceinte close saturée d'humidité à 25 °C pendant trois jours, les lectures étant faites après huit et quinze jours.

4. Les résultats des études morphologiques et enzymatiques, regroupés en matrices de description, ont été traités par les méthodes de la taxonomie numérique (SOKAL et SNEATH 1963, RENE-CHAUME 1975). A partir des matrices ont été calculés les indices de similarité entre souches (indice de Rogers-Tanimoto pour les caractères morphologiques multivalents, indice de Sokal et Michener pour les caractères protéiques bivalents). A partir des valeurs de ces indices ont été ensuite construits les dendrogrammes correspondants.

Tableau 3  
Plantes utilisées pour les inoculations expérimentales

Espèce botanique	Variété	Origine	
<i>Saccharum officinarum</i>	N 51-186	Ile Maurice	(Collection ORSTOM)
<i>Saccharum officinarum</i>	CO 453	Ile Maurice	(Collection ORSTOM)
<i>Saccharum officinarum</i>	L 60-25	Ile Maurice	(Collection ORSTOM)
<i>Saccharum officinarum</i>	Q 51	Ile Maurice	(Collection ORSTOM)
<i>Sorghum vulgare</i>	Local	Touka (Mali)	(Collection ORSTOM)
<i>Pennisetum spicatum</i>	Local	Touka (Mali)	(Collection ORSTOM)
<i>Panicum maximum</i>	Clone K 187	Korogwe (Tanzanie)	(Collection ORSTOM)
<i>Zea mays</i>	Tuxpeno 1	Mexique	(Collection IRAT)
<i>Zea mays</i>	CP J	Caraïbes	(Collection IRAT)
<i>Zea mays</i>	C JB	Côte d'Ivoire	(Collection IRAT)
<i>Zea mays</i>	18 F	Côte d'Ivoire	(Collection IRAT)

## Résultats

### 1. Caractéristiques morphologiques et culturales

Chez les souches isolées de canne à sucre et rapportées à l'espèce *Colletotrichum falcatum*, le mycelium en culture présente des aspects variables. Il peut ainsi être cotonneux et abondant (Cs2, Cs3), ras et peu développé (Cs1, CsF), blanc (Cs1, Cs2, CsF) ou gris violacé (Cs3 — Référence Seguy 555). Cette variabilité se retrouve chez les isolats de *C. graminicola* dont la couleur va du blanc pur de la souche So au violet des souches maïs (Seguy 669). La couleur des revers des cultures traduit généralement celle du mycelium. Ils peuvent ainsi être incolores, gris plus ou moins foncé, violacés ou, comme So, fortement colorés en jaune orangé (Seguy 212) par un pigment soluble diffusant dans le milieu.

Aucune séparation n'apparaît donc possible d'après ces caractères culturaux. De même les vitesses de croissance à 27 °C ne permettent de séparer, de l'ensemble des souches, que les isolats sorgho à croissance apparente plus lente.

Les dimensions des conidies sont souvent utilisées pour distinguer les deux espèces. SPRAGUE (1950) donne les étendues de variation suivantes pour ces mesures:

20—27 × 4—5  $\mu$  chez *C. falcatum*, 18—26 × 3—4  $\mu$  chez *C. graminicola*. VON ARX et MULLER (1963) regroupant les deux espèces donnent comme dimensions des spores: 22—38 × 4—7  $\mu$ . Les mensurations faites sur les conidies produites en culture sur isolats de canne à sucre et de maïs sont les suivantes:

Souches provenant de canne à sucre	21,0—32,5 × 5,4—6,5 μm
Souches provenant de sorghum	21,2—25,6 × 4,9—5,5 μm
Souches provenant de maïs	23,8—27,9 × 4,6—5,2 μm

Tous ces résultats ont été regroupés au sein de la matrice de description du Tableau 4. Un calcul de l'indice de Rogers et Tanimoto (SOKAL et SNEATH 1963) à partir de cette matrice nous a permis de mesurer les affinités entre souches et de construire le dendrogramme correspondant de la Figure 2. Celui-ci autorise deux remarques: si le regroupement des données ainsi opéré permet de distinguer, au sein de nos souches, les deux ensembles formés par les deux espèces *falcatum* et *graminicola*, la variabilité phénotypique apparaît aussi importante chez l'une que chez l'autre et il en résulte que les niveaux de signification des séparations interspécifiques sont voisins de ceux des séparations intraspécifiques. Sur le plan pratique, ceci entraîne qu'une distinction nette, sur la base des caractères phénotypiques, entre les deux espèces, reste très aléatoire et qu'il est donc nécessaire de faire intervenir d'autres caractères discriminants.

Tableau 4  
Résultats des inoculations expérimentales

Hôtes	Souches							
	CS1	CS2	CS3	CSF	SO	SOG	Mi	MF1
<i>Saccharum</i>	+	++	++	++	—	—	—	—
<i>Sorghum</i>	—	±	—	±	++	++	+	+
<i>Zea mays</i>	—	—	—	—	—	—	++	++
<i>Panicum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pennisetum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—

++ grandes taches nécrosées évolutives; + taches nécrosées peu développées; ± taches non nécrosées avec pigment rouge; — réaction nulle ou parfois petites taches chlorotiques n'évoluant pas.

## 2. Caractéristiques protéiques et enzymatiques

a) Une première analyse de protéines solubles totales a été réalisée en électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les spectres, révélés par coloration au Bleu de Coomassie ont été dépouillés par densitométrie et ont donné les résultats de la Figure 1. Seules ont été prises en compte, dans cette analyse et pour des raisons techniques de densité de coloration, les bandes à taux de migration relatif compris entre 0 et 0,50 soit au total 22 bandes protéiques. Ces résultats, traités par les méthodes de la taxonomie numérique et le calcul de l'indice de Sokal et Michener ont abouti au deuxième dendrogramme de la Figure 2. Ce dendrogramme, par rapport à celui déjà obtenu à partir des caractères morphologiques et culturels, précise la distinction entre les souches de *C. falcatum* et celles de *C. graminicola*, tout en soulignant la variabilité importante des secondes.

Dans ces conditions l'espèce *Colletotrichum falcatum*, telle que représentée

du groupe *graminicola* et, au sein du groupe sorgho, la souche africaine de la souche antillaise.

c) En ce qui concerne les  $\alpha$ -estérases, seize sites d'activité, au total, ont pu être révélés et identifiés d'après leur migration relative. Le schéma d'interprétation montre ici encore l'homogénéité des isolats *falcatum* et la séparation nette, au sein du groupe *graminicola* entre souches maïs et sorgho. Une certaine diversification se manifeste également au sein des souches maïs provenant du Sud de la France et qui ont été intégrées à cette partie de l'étude.

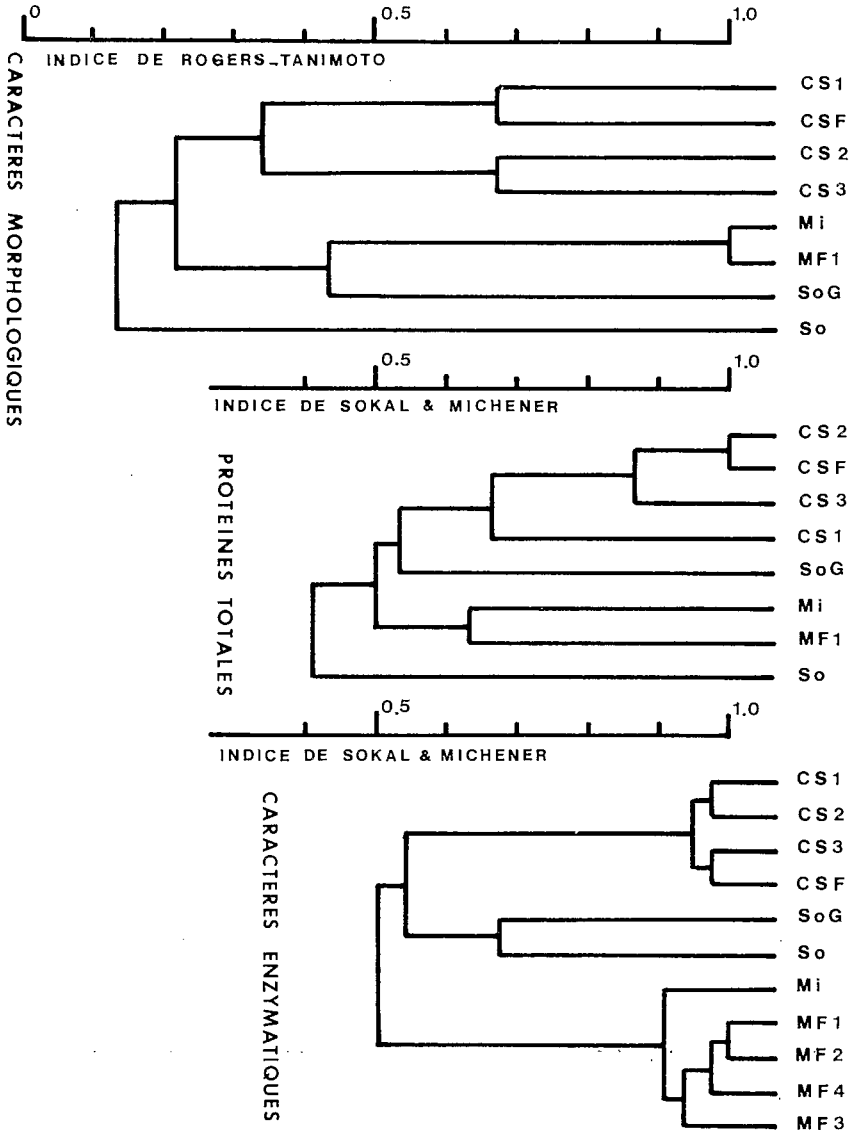


Fig. 2. Dendrogrammes de similarité entre les souches

d) Les spectres de phosphatases acides nous ont posé quelques problèmes d'interprétation. On observe en effet pour chaque groupe de souches une forte activité se manifestant par une bande très large impossible à priori à scinder en sous unités. Ces diverses bandes se recouvrant, il était nécessaire, pour pouvoir leur assigner une valeur discriminante, de déterminer si elles correspondaient ou non, à des loci distincts. Nous avons essayé de lever l'ambiguïté en faisant appel à une analyse densitométrique des spectres. Les tracés obtenus permettent de constater que:

- la bande large de souches maïs est distincte de celle des souches sorgho ou canne à sucre. Elle est désignée sous le nom de groupe  $\alpha$ .
- un ensemble de sites actifs, désigné par  $\beta$ , est présent chez tous les *falcatum* mais également chez les souches sorghum de *C. graminicola*.
- le troisième ensemble de sites, désigné par  $\gamma$ , apparaît enfin comme spécifique de l'espèce *falcatum*.

L'interprétation globale de ces spectres phosphatases fait donc finalement appel à huit bandes bien délimitées et à trois bandes larges correspondant vraisemblablement à des ensembles de sites actifs (bandes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ).

e) L'exploitation de ces résultats par le calcul de l'indice de similarité de Sokal et Michener, a intégré, aux souches préalablement utilisées, les isolats maïs France numérotés 2, 3 et 4. Ces isolats n'avaient pas été considérés dans l'étude des protéines totales, tous leurs spectres étant identiques sur le plan qualitatif. Les seules différences étaient d'ordre quantitatif au niveau de certaines bandes, caractère que nous n'avons pas pris en considération. En revanche nous avons vu (Fig. 1) que, en particulier pour les activités  $\alpha$ -estérases, des différences apparaissaient au sein de cet ensemble de souches qui a pu ainsi être incorporé dans l'étude enzymatique. L'analyse par les méthodes de taro





contre FRANKE et BERRY (1972) sont arrivés à des résultats intéressants en appliquant cette technique à des myxomycètes. Enfin les limites de la méthode ont été parfaitement définies par SNIDER et KRAMER (1974) dans leur étude du genre *Taphrina*.

Le problème important dans ce type d'analyse est d'interpréter objectivement les données. Dans de nombreux cas en effet l'existence préalable de coupures taxonomiques basées sur des critères morphologiques peut biaiser de manière imprévisible l'interprétation des données biochimiques. L'analyse numérique permet en principe d'éliminer toute conclusion subjective tout en permettant également de révéler des relations entre individus qui auraient pu passer inaperçues. Il ne faut cependant pas placer une signification statistique absolue dans les coefficients de similarité calculés par ces méthodes. La signification en effet se situe au niveau de l'ensemble de la matrice et non à celui d'un couple d'individus donnés (SOKAL et SNEATH 1963). Les calculs d'erreur standard sur les coefficients, basés sur un ajustement à la loi binomiale, ne peuvent donc que servir de guide pour estimer un niveau de signification. Pour les dendrogrammes que nous avons établis, il est ainsi possible de séparer, au niveau 0,60 de l'indice de similarité, les deux espèces *falcatum* et *graminicola* sur la base des caractéristiques biochimiques. Ce niveau 0,60 n'a toutefois aucune signification dans le cas des caractères morphologiques, l'indice de Rogers-Tanimoto étant calculé de façon différente de celui de Sokal et Michener. Au sein de l'espèce *graminicola* cependant ce n'est que le dernier dendrogramme, relatif aux activités enzymatiques, qui permet de distinguer clairement deux unités taxonomiques liées à l'origine parasitaire. Le même dendrogramme permet également de constater la faible variabilité intraspécifique du *Colletotrichum falcatum* et du taxon maïs du *Colletotrichum graminicola* en dépit de la séparation géographique existant, chez ce dernier, entre la souche isolée de Côte d'Ivoire et celles venant d'Europe. Cette séparation géographique apparaît, au contraire, comme jouant de manière importante chez les

tion aisée entre les deux espèces et les activités  $\alpha$ -estérases, leucyl amino peptidases et phosphatases acides permettent également de séparer sans ambiguïté deux unités au sein de l'espèce *graminicola* correspondant respectivement aux souches isolées de maïs et de sorgho.

### Summary

#### Comparative morphological, physiological and pathogenic studies of isolates of *Colletotrichum falcatum* and *Colletotrichum graminicola*

The two species, *Colletotrichum falcatum* and *Colletotrichum graminicola* are not easily separated by morphological and cultural studies. Investigations on proteic polymorphism and pathogenicity of strains from sugar cane, maize and sorghum allowed us to segregate easily *C. falcatum* from *C. graminicola* and to distinguish, in the second species, by analysis of leucyl amino peptidase, acid phosphatase and  $\alpha$ -esterase spectra, two distinct units. These units correspond respectively to the maize and sorghum isolates.

### Zusammenfassung

#### Vergleich verschiedener Isolate von *Colletotrichum falcatum* und *C. graminicola*

Die beiden *Colletotrichum*-Arten lassen sich morphologisch und in Reinkultur nur schwer trennen. Auf Grund von Proteinspektren und Pathogenität der Stämme von Zuckerrohr, Mais und Sorghum ließ sich *C. falcatum* leicht von *C. graminicola* trennen. Bei *C. graminicola* konnten durch Analyse der Spektren von Leucyl-amino-peptidase, saurer Phosphatase und  $\alpha$ -Esterase zwei getrennte Einheiten (entsprechende den Isolaten von Mais und Sorghum) unterschieden werden.

### Bibliographie

- ARX, J. A. VON, and E. MÜLLER, 1954: Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. Beitr. Kryptogamenflora Schweiz 11, 1, 1—434.
- CHOWDHURY, S. C., 1936: A disease of *Zea mays* caused by *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson. Indian J. agric. Sci. 6, 833—843.
- FRANKE, R. G., and J. A. BERRY, 1972: Taxonomic application of isozyme patterns produced with disc electrophoresis of some myxomycetes, order Physarales. Mycologia 64, 830—840.
- LEBEAU, F. J., 1950: Pathogenicity studies with *Colletotrichum* from different hosts on sorghum and sugar cane. Phytopathology 40, 430—438.
- MEYER, J. A., and J. L. RENARD, 1969: Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 59, 1409—1411.
- POLITIS, D. J., 1975: The identity and perfect state of *Colletotrichum graminicola*. Mycologia 67, 56—62.
- RENE-CHAUME, R., 1975: Les méthodes de taxonomie numérique. Boissiera 24, 369—381.
- SEGUY, E., 1936: Code universel des couleurs. P. Lechevalier Ed., Paris.

- SHAW, C. R., and R. PRASAD, 1970: Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4, 297—320.
- SMITHIES, O., 1955: Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61, 629—641.
- SNIDER, R. D., and C. L. KRAMER, 1974: An electrophoretic protein analysis and numerical taxonomy study of the genus *Tapbrina*. *Mycologia* 66, 754—772.
- SOKAL, R. R., and P. H. A. SNEATH, 1963: Principles of Numerical Taxonomy, 359 p. Freeman & Co., Ed., San Francisco.
- SPRAGUE, R., 1950: Diseases of Cereals and Grasses in North America, 538 p. Ronald Press Co., New York.
- STOUT, D. L., and C. R. SHAW, 1974: Genetic distance among certain species of *Mucor*. *Mycologia* 66, 969—977.
- SUTTON, B. C., 1968: The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. *Canad. J. Bot.* 46, 873—876.
- TARR, S. A. J., 1962: Diseases of Sorghum, Sudan Grass and Broom Corn, 380 p. Commonw. Mycol. Inst., Ed.

Adresse des auteurs: Laboratoire de Phytopathologie, Centre Orstom d'Adiopodoumé,  
ALGER (Algérie)