

**C. FAUQUET**

**J-C. THOUVENEL**

**UNE VIROSE DU RIZ EN CÔTE D'IVOIRE**



**OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER**

**CENTRE D'ADIPODOUMÉ - CÔTE D'IVOIRE**

**B.P.V 51 - ABIDJAN**



**MAI 1976**

UNE VIROSE DU RITZ EN R.C.I.

---

C. FAUQUET

J.C. THOUVENEL

# S O M M A I R E

## UNE VIROSE DU RIZ EN R.C.I.

INTRODUCTION

LOCALISATION GEOGRAPHIQUE ET IMPORTANCE

SYMPTOMES DE LA MALADIE

TRANSMISSION

- 1 - Mécanique
- 2 - Naturelle
- 3 - Par la graine
- 4 - Par la sudation

INFLUENCE DU VIRUS SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA PRODUCTION

PROPRIETES BIOLOGIQUES

- 1 - Dilution limite
- 2 - Thermo inactivation
- 3 - Résistance in vitro

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

PURIFICATION

PROPRIETES SPECTRO - PHOTOMETRIQUES

POINT ISO - ELECTRIQUE

DENSITE

DISCUSSION - CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

## UNE VIROSE DU RIZ ISOLEE EN R.C.I.

---

### INTRODUCTION

La riziculture prenant une énorme importance en R.C.I. nous avons consacré une partie de nos recherches, aux viroses du Riz, pouvant y sévir.

Au cours de différentes tournées nous avons détecté une maladie de type viral. Cette maladie étudiée d'abord en champs, puis au laboratoire a été transmise mécaniquement à plusieurs espèces d'oryza et différentes études ont été conduites en vue de sa caractérisation.

L'agent de cette maladie est bien un virus, parasphérique, dont l'identification est en cours. Ce rapport décrit les symptômes de cette maladie ainsi que les différentes expériences effectuées sur ce virus.



Fig. 1 : Symptômes de virose sur riz IR 8 en champ.

## LOCALISATION GEOGRAPHIQUE ET IMPORTANCE DE LA MALADIE

---

Au cours de l'année 1975 nous avons effectué différentes missions qui nous ont amené à visiter presque toutes les régions où se pratique la riziculture en R.C.I.

Nous avons reconnu la même maladie virale dans 3 endroits différents : GAGNOA, LAMTO et YAMOUSSOUKRO et dans plusieurs rizières à chaque endroit.

Cette maladie n'a pour l'instant été trouvée que dans des rizières irriguées. Elle reste apparemment ponctuelle et n'a pas encore d'importance économique.

### SYMPTOMES DE LA MALADIE OBSERVES EN CHAMPS

---

Les zones malades se caractérisent par des plages jaune - orangé disséminées dans les champs mais surtout en bordure des rizières. Apparemment on peut détecter cette maladie aussi bien dans des rizières récemment repiquées que dans des cultures en montaison.

Les symptômes sur un pied de riz malade sont les suivants :

- les feuilles les plus anciennes sont jaunes à la base et oranges à l'extrémité.
- sur les jeunes feuilles on peut observer un mottle très fin ou panachure allant du jaune au vert - foncé (photo 1-2).

Cette virose a été observée sur Riz irrigué IR8 et JAYA mais les symptômes sur jeunes feuilles sont beaucoup plus évidents sur IR8 que sur JAYA.

Enfin il semblerait que les pieds atteints jeunes restent plus petits que les pieds sains (photo 3).



Fig. 2 : Symptômes de la virose sur feuille de riz inoculé...



Fig. 3 : Symptômes de nanisme sur pieds de riz inoculés (centre).

## TRANSMISSION

---

### 1 - Transmission mécanique

Les premières transmissions mécaniques restant infructueuses nous avons testé plusieurs tampons et plusieurs conditions d'inoculation. Les conditions s'étant révélées positives sont : Broyage des jeunes feuilles de riz coupées en fragments d'un demi-centimètre dans un mortier gardé à 0°C sur de la glace pilée, avec du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,1 contenant de la bentonite 0,25% et du chlorure de cystéine 0,35 %.

L'inoculation est réalisée par frottement avec un doigtier après avoir saupoudré les feuilles de riz avec du carborundum (granulométrie approximative 0,066 mm).

Cette virose a été transmise avec succès à 15 variétés de Riz fournies par l'IRAT de Bouaké.

N° IRAT	Nom collection
10	LSX 104 X 144 B9
8	1487/9/5
13	Mutant 50
1166	IR8
1165	IR5
935	Carréon
856-1684-1908	ZENITH
120	MOROBEREKAN
89	IGUAPE CATETO
383	C 463 A
1167	JAYA
4545	TEPEP
6	OS6
485	CICA 4
?	OS5

Les symptômes obtenus par inoculation sont exactement les mêmes que ceux observés en champs. Il faut noter que le virus est léthal pour les plants de riz de moins de 15 jours.

Suivant les variétés on peut observer des variations dans l'intensité des symptômes mais pas dans leur nature.

De plus nous avons transmis cette virose à d'autres riz d'origine asiatique, ainsi qu'à quelques espèces d'oryzae (tableau I) Nous avons essayé de transmettre ce virus à d'autres familles de plantes mais jusqu'à présent sans succès (Tableau I).

Par conséquent jusqu'à présent la rangée d'hôtes de ce virus est donc uniquement réduite à des espèces d'oryzae.



## PLANTE TESTEE

## SYMPTOMES OBSERVES

PLANTE TESTEE	SYMPTOMES OBSERVES
<i>O. sativa</i> F K 135	Mosaïque et mottle très accentué
<i>O. Sativa</i> Pacita	Mottle difus et décoloration jaune
<i>O. Sativa</i> Taichung native 1	Nécrose apicale
<i>O. rufipogon</i> balunga	Chlorose
<i>cubensis</i>	Chlorose
Taiwan	Mottle accentué et thallage excessif
<i>O. spontanea</i>	Nécrose
<i>O. glaberrima</i>	Jaunisse
<i>O. nivarra</i>	Chlorose
<i>O. barthii</i>	Mottle
<i>O. australiensis</i>	Chlorose
<i>O. latifolia</i>	Mottle très faible
<i>O. alta</i>	Mottle sur les jeunes feuilles des nouveaux thalles
<i>Eleusine indica</i>	-o-
<i>Eleusine coracana</i>	hôte sans symptômes
<i>Zea maïs</i>	-o-
<i>Chenopodium amanticolor</i>	-o-
<i>Physalis alkekengi</i>	-o-
<i>Physalis floribunda</i>	-o-
<i>Datura stramonium</i>	-o-
<i>Datura innoxia</i>	-o-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	-o-
<i>Nicotiana samsun</i>	-o-

Tableau I. Liste des plantes inoculées avec le virus du riz et symptômes observés.

## 2 - Transmission naturelle

Etant donné la dissémination naturelle en champs (taches très diffuses) il y a tout lieu de penser que le vecteur est un insecte mais pour l'instant aucune expérience sur ce vecteur aérien n'a été menée.

## 3 - Transmission par la graine

La transmission par la graine est en cours de réalisation.

## 4 - Transmission par la sudation

Il est intéressant de noter qu'il semble y avoir transmission par les gouttes de sudation de l'extrémité des feuilles malades tombant sur des plantes saines. Des expériences sont en cours pour mettre en évidence ce phénomène.

INFLUENCE DU VIRUS SUR LE DEVELOPPEMENT ET LA PRODUCTION

DE 15 VARIETES DE RIZ

Le but de cette expérience est quadruple :

- 1° - Noter si le virus se développe sur toutes les variétés choisies.
- 2° - Etudier l'influence du virus sur le développement de la plante en fonction de l'âge de l'infection.
- 3° - Chiffrer l'incidence de cette maladie sur la production en riz.
- 4° - Tirer de cette expérience un protocole nous permettant de tester un grand nombre de variétés ceci permettrait d'introduire une nouvelle donnée dans le catalogue IRAT des variétés de riz; leur sensibilité vis à vis d'un virus isolé en R.C.I.

Cette expérience a été effectuée dans une serre vitrée où la température est en moyenne de 30°C avec des maximum à 37°C et où le degré hydrométrique approche 100%. Le riz est cultivé sur un mélange : 1/3 terre de forêt stérile, 1/3 compost stérile et 1/3 sable de lagune lavé. Les plantes reçoivent de l'engrais complet 1 fois par semaine. Le riz est repiqué dans des pots non percés à raison de 3 graines par pot (diamètre 12). Les plantules sont mises à germer dans des bacs et repiquées à l'âge de 14 jours.

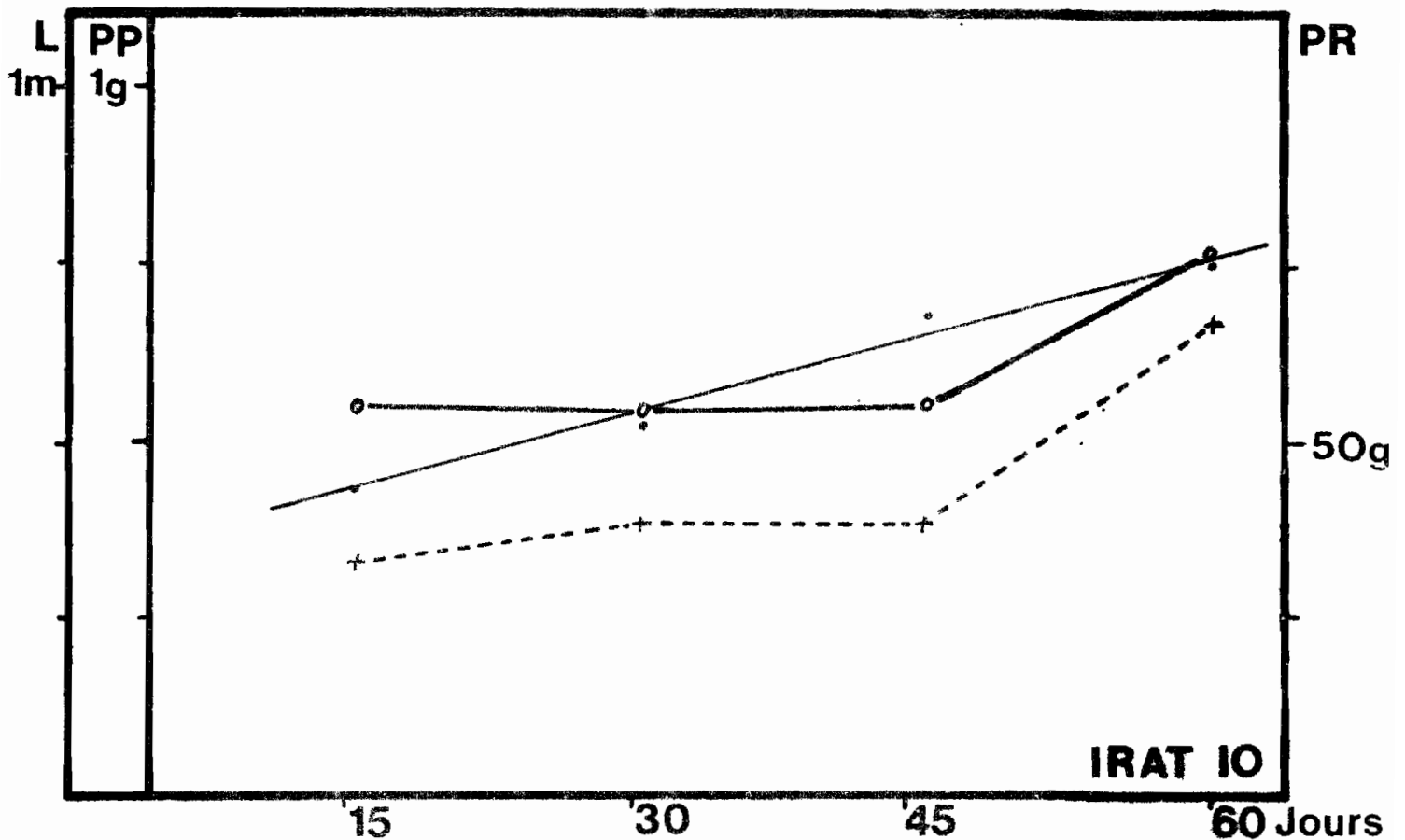
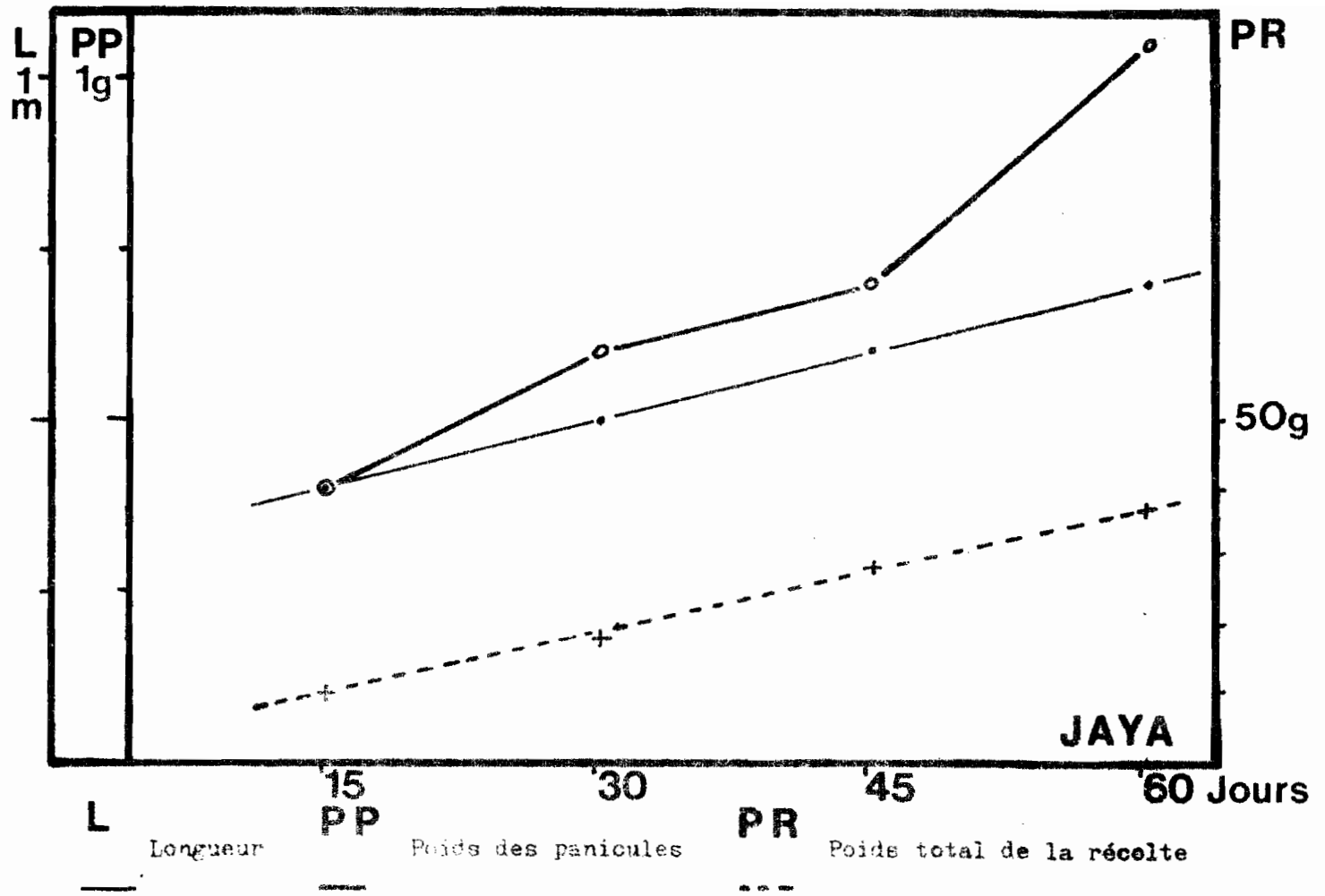
En ce qui concerne l'inoculation mécanique nous avons utilisé la méthode décrite ci-dessus en employant pour la préparation de l'inoculum des jeunes feuilles de IR8 âgées de 6 semaines et inoculées deux semaines auparavant, ceci afin d'essayer de toujours avoir un inoculum standard. Les 15 variétés ont été inoculées à 15, 30 et 45 jours après repiquage. En plus de ces 3 lots nous avons fait un témoin pour chaque variété. Avant la moisson (environ à 60 j) les pieds sont mesurés et l'intensité des symptômes est notée. Le tableau II résume ces résultats ainsi que le poids moyen des panicules récoltées et le poids de la récolte totale.

Noms	15 j.				30 j.			
	Intensité Symptômes	Long cm	Poids Panic. g	Poids récolte	Intensité Symptômes	Long cm	Poids Panic. g	Poids récolte
LSX 104	++	42	1,17	33,8	+	52	0,99	143,1
1487.9.5	++	70	0,81	25		95	1,19	46
Mutant 50	+++	60	1,40	17	++	75	1,46	23
JAYA	++	40	0,39	8	+	50	0,60	12
IR8	+++	40	0,48	9,2	+++	50	0,58	10,5
Carreon	+	55	0,69	-		70	0,81	-
Zenith	+	90	0,14	-	+	90	0,77	-
Moro	++	80	0,67	-	+	90	0,80	-
IR5	+	30	-	-	+	45	0,7	-
OS5	+	40	0,46	-		55	0,53	-
OS6	++	40			++	60	-	-
IGUARE CATETO	+	75	-	-	+	90	-	-
C 463 A	+	45	0,7	-	+	60	1,1	-
TEPEP	+++	50	0,83	-	++	60	0,65	-
CICA 4	+++	35	0,61		++	45	0,7	

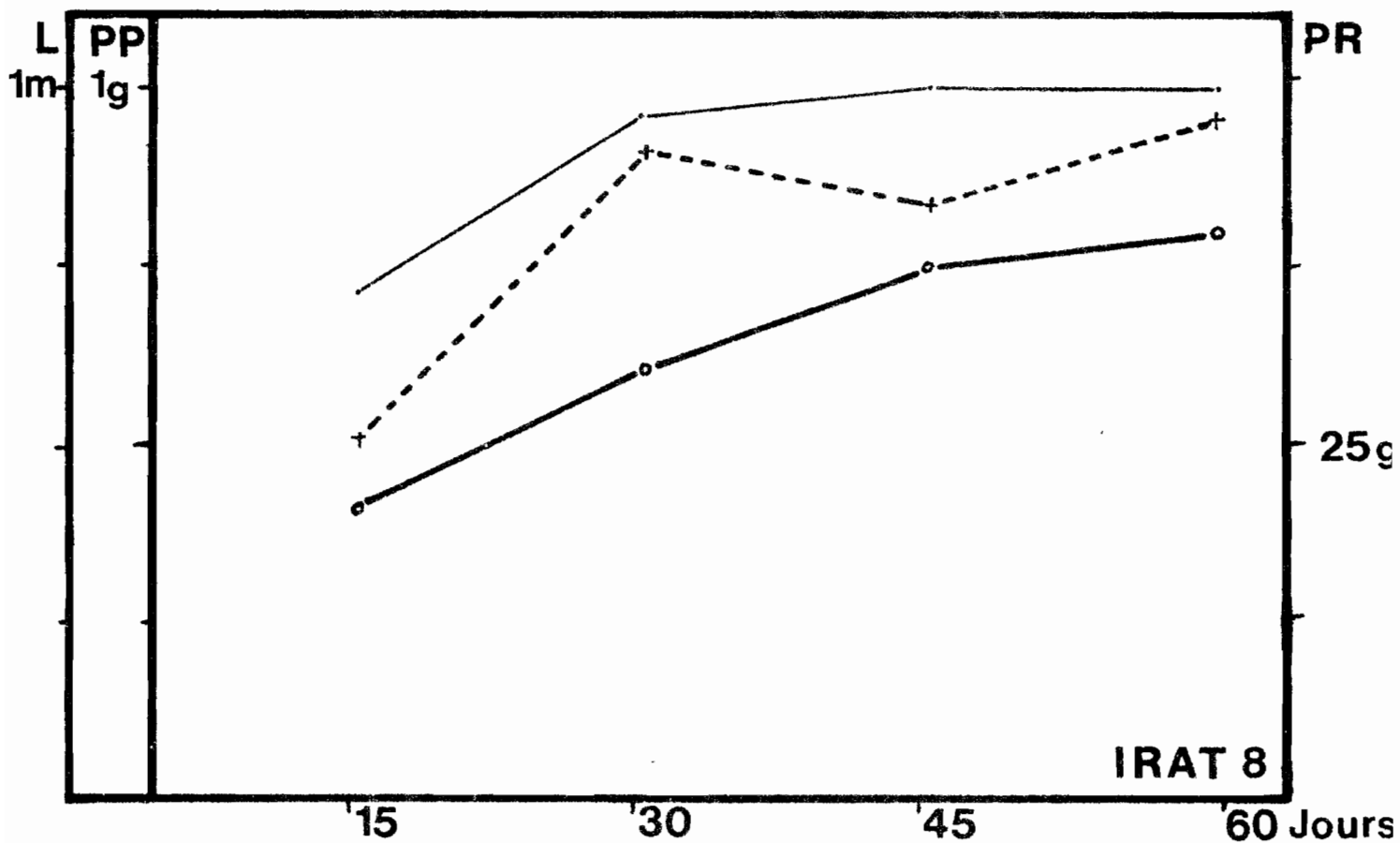
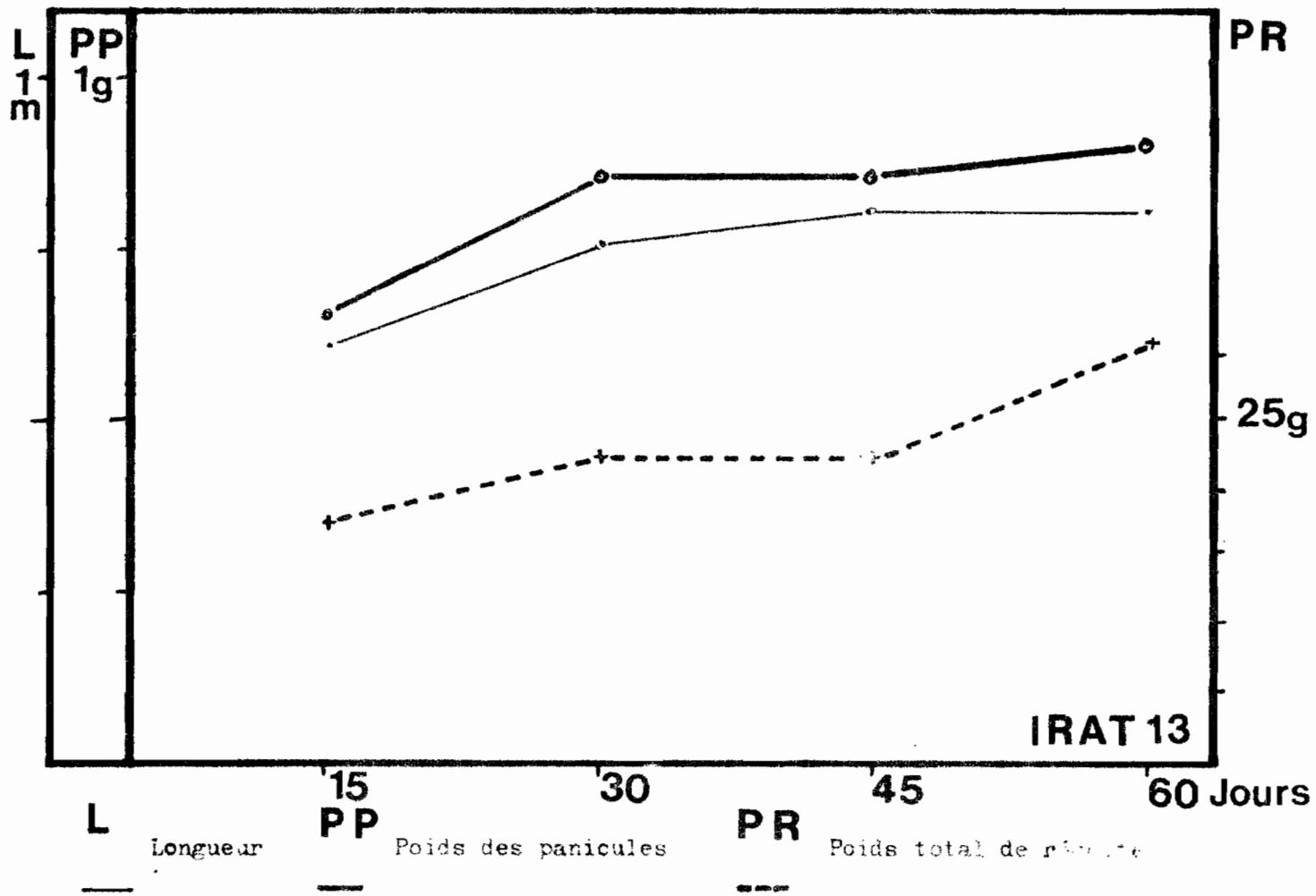
TABLEAU II : Résultats de l'expérience de l'influence du virus du riz sur le développement des plantes et leurs productions.

Noms	45 j.				60 j. = T			
	Intensité symptômes	Long cm	Poids Panic. g	Poids récolte	Intensité symptômes	Long cm	Poids Panic. g	Poids récolte
LSX 104	0	64	0,98	42,2	0	72	1,48	63,8
1487.9.5	0	100	1,51	41	0	100	1,56	47
Mutant 50	+	80	1,33	20	0	80	1,81	31
JAYA		60	0,71	25	0	70	1,59	31
IR8	++	60	0,59	11,8	0	-	1,0	-
Carreon	90	90	0,63	-	0	100	0,93	-
Zenith	(	100	0,68	-	0	110	1,10	-
Moro	(	90	0,85	-	0	100	0,93	-
IR5		70	-	-	0	80	-	-
OS5		80	0,37	-	0	100	0,7	-
OS6	+	70	-	-	0	75	-	-
IGUAPE CATETO	+	-	-	-	0	-	-	-
C 463 A	+	75	0,8	-	0	75	1,86	-
TEPEP	+	90	0,68	-	0	100	1,05	-
CICA 4	++	60	0,46	-	0	75	1,25	-

TABLEAU II : Résultats de l'expérience de l'influence du virus du riz sur le développement des plantes et leurs productions.



Graphique I : Courbes de croissance, de poids des panicules, et de poids de récolte des variétés JAYA et IRAT 10.



Graphique II : Courbe de croissance, de poids des panicules et de poids de récolte des variétés IRAT 8 et IRAT 13.

Les graphiques I et II nous montrent que dans la plupart des cas les courbes de croissance sont parallèles aux courbes de production ainsi qu'aux courbes de poids des panicules. Par conséquent s'il se révèle exacte que les courbes de croissance sont le fidèle reflet des courbes de production il suffit d'étudier les premières en fonction de l'infection dans le temps pour connaître la sensibilité d'une variété vis à vis de ce virus. Ceci nous permettrait de réduire considérablement le nombre de plantes nécessaires à ce test et nous ne serions pas obligés d'attendre la récolte pour connaître le comportement d'une variété. Ces deux éléments nous permettraient de tester un grand nombre de variétés.

Il y a deux sortes de courbes de croissance :

- soit une courbe linéaire comme LS X 104 ou JAYA
- soit une courbe asymptotique comme 1487-9-5 ou Mutant 50

Pour chaque date d'inoculation nous pouvons calculer un pourcentage de réduction de taille, la somme de ces pourcentages pour les 3 inoculations effectuées (15, 30 et 45 j) nous donne un chiffre qui n'exprime pas la perte à la production mais qui représente une donnée quantitative de la sensibilité d'une variété. Pour simplifier ce chiffre est divisé par 10 ou par 30 et nous obtenons ainsi une note de 1 à 30 ou de 1 à 10, les variétés ayant un petit chiffre sont donc très peu sensibles par rapport à celles qui avoisinent 30 ou 10.



	DATE INOCULATION			SENSIBILITE		
	15 j	30 j	45 j	Total	1 - 30	1 - 10
LSX 104	43	28	14	84	8	3
1487-9-5	30	5	0	35	4	1
JAYA	43	29	14	86	9	3
MUTANT 50	25	6	0	31	3	1
CARREON	45	30	15	90	9	3
ZENITH	18	10	7	35	4	1
MORO	20	14	8	42	4	1
IR5	62	42	19	123	12	4
OS5	60	40	20	120	12	4
IR8	43	30	14	87	9	3
C 463 A	50	33	18	101	10	3
TEPEP	50	35	18	103	10	3
OS6	45	20	7	72	7	2
CICA 4	50	33	20	103	10	3

TABLEAU III Pourcentages de pertes de taille en fonction de la date d'infection et sensibilité des variétés testées.

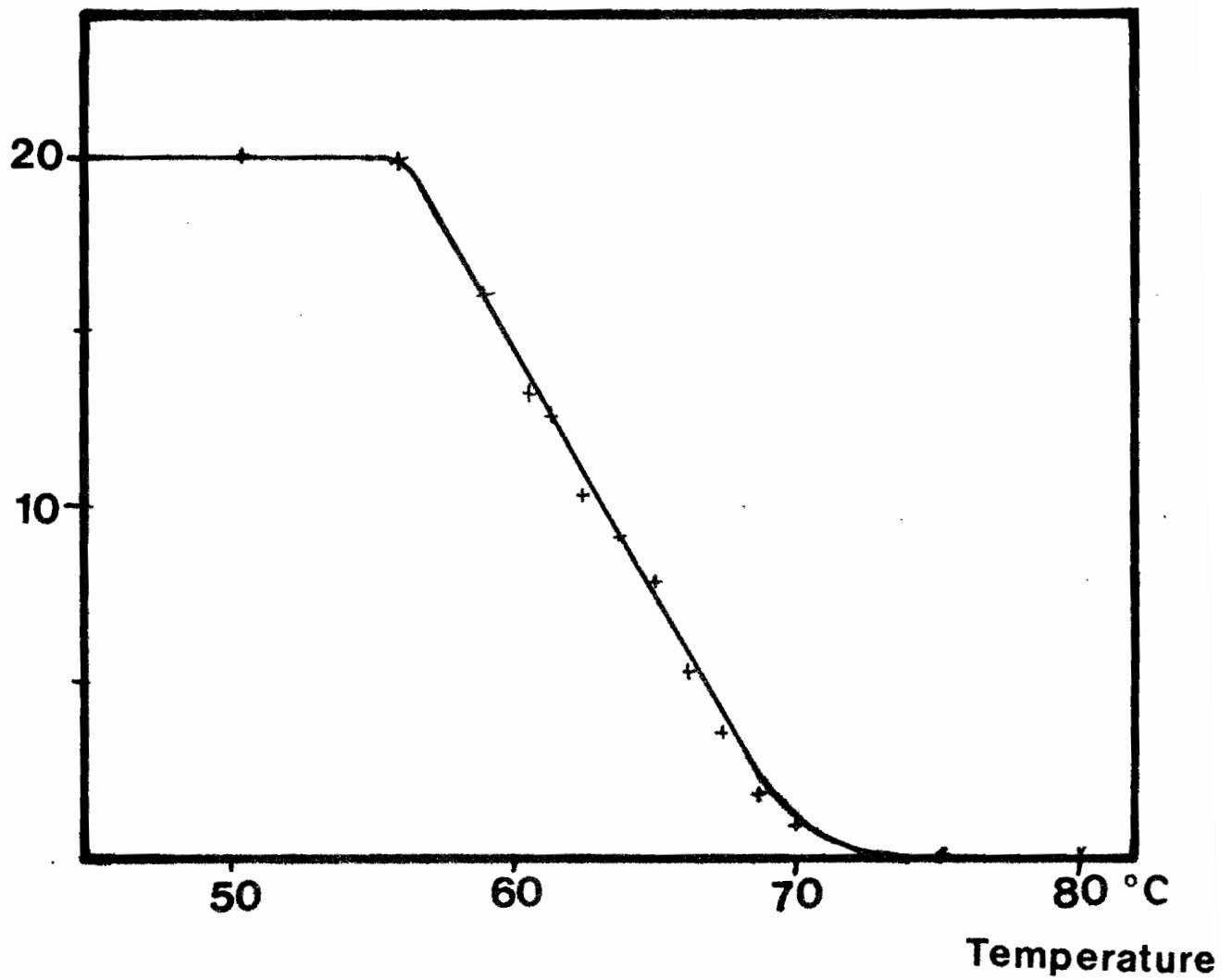
Cette méthode peut donc fournir une estimation de la sensibilité d'une variété et peut nous permettre de les comparer entre elles. Les mesures effectuées sur quelques plantes peuvent nous donner une assez bonne précision. Des expériences plus fixes sur 4 variétés sont en cours, pour vérifier la validité de cette méthode.

De cette expérience on peut néanmoins conclure que ce sont IRAT 13 (Mutant 50) et IRAT 8 (1487-9-5) qui ont la plus faible sensibilité vis à vis de cette virose.

VARIÉTÉ	1 - 30	1 - 10
MUTANT 50	3	1
1487 - 9 - 5	4	1
ZENITH	4	1
MORO	4	1
OS6	7	2
LSX 104	8	3
JAYA	9	3
IR8	9	3
CARREON	9	3
C 46 3 A	10	3
CICA 4	10	3
TEPEP	10	3
OS 5	12	4
IR 5	12	4

TABLEAU IV Classement des variétés testées dans l'ordre croissant de sensibilité.

Nombre de plantes infectées



Graphique III : Courbe de thermo-inactivation du virus du riz .

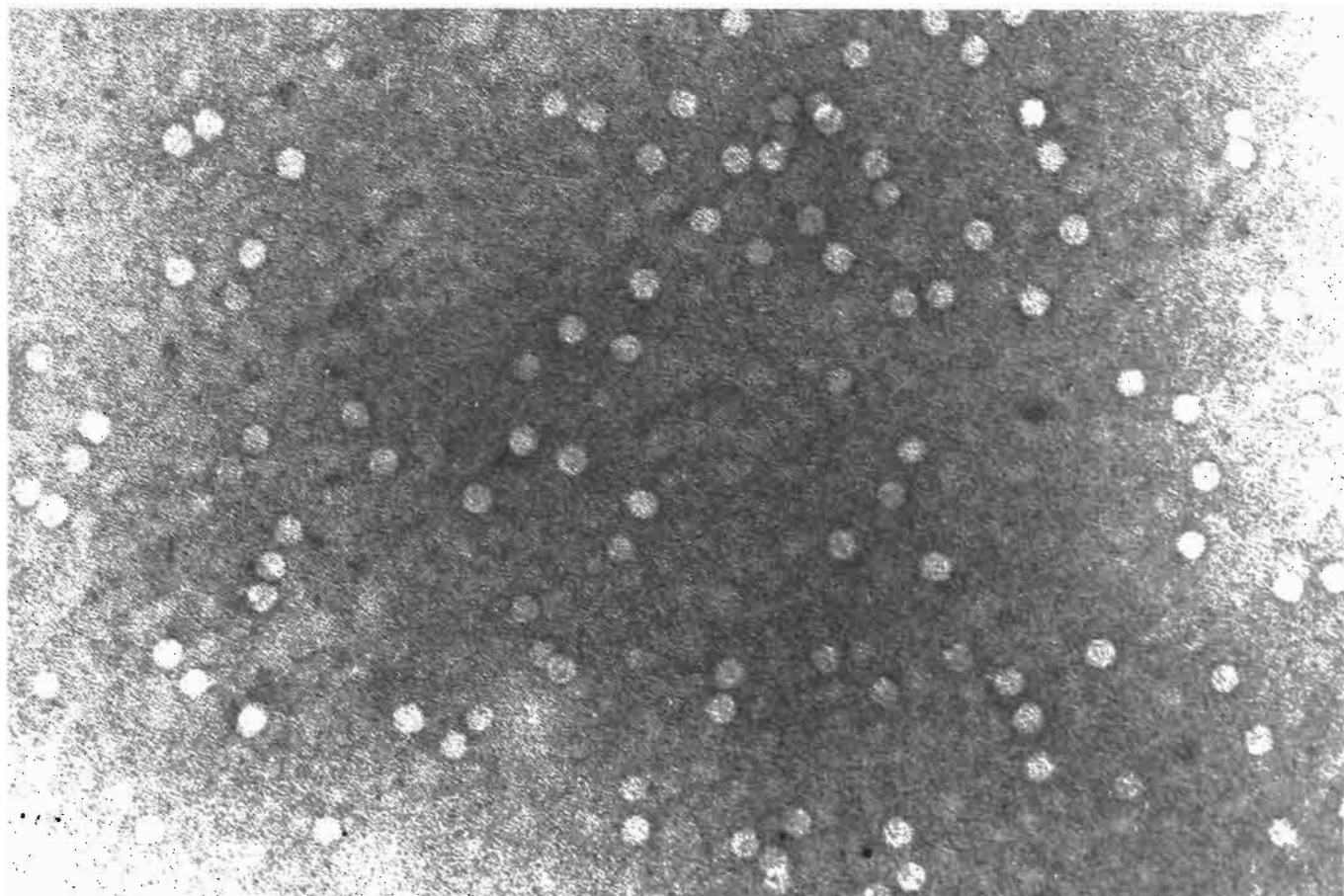


Fig. 4 : Observation de particules virales au microscope électronique (Grandissement 125 000).

## PROPRIETES BIOLOGIQUES

Toutes les expériences sont effectuées avec du jus brut de feuilles de riz IR8 inoculées à l'âge de 4 semaines et récoltées 2 semaines plus tard.

- 1 - Dilution limite - le virus est infectieux jusqu'à la dilution  $10^{-6}$ . Il semble que cette dilution limite soit éminemment variable avec l'inoculum prélevé aussi cette expérience sera refaite avec du virus purifié dès que possible.
  
- 2 - Thermo-inactivation - des lots de 2 ml de jus brut de riz IR8 sont chauffés pendant 10' à des températures allant de 50 à 90° de 2 en 2 degrés. Nous constatons que l'inoculum perd de son pouvoir infectieux à partir de 55° et jusqu'à 70° (graphique III), donc la température d'inactivation du virus se situe aux alentours de 70°C.
  
- 3 - Résistance in-vitro - des lots de tubes contenant 2 ml de jus brut sont conservés à diverses températures : +4, +20, et -25° C, pour la résistance à la dessiccation de jeunes feuilles de riz sont mises à sécher en laboratoire.
 

34 j	+ 20° c	41 j
84 j	+ 4° c	
84 j	- 20° c	
56 j	dessiccation	

En conclusion sur les propriétés biologiques nous pensons dire que c'est un virus très stable et que la congélation peut-être utilisée comme moyen de conservation de matériel virosé.

## MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Nous avons effectué des observations au microscope électronique de grilles carbonées préparées suivant la Dop-Method avec du jus brut de feuilles de riz et colorées avec de l'acétate d'uranyle à 1 %. Ces observations ont mis en évidence des particules virales parasphériques de 25-30 nm de diamètre (photo 4).

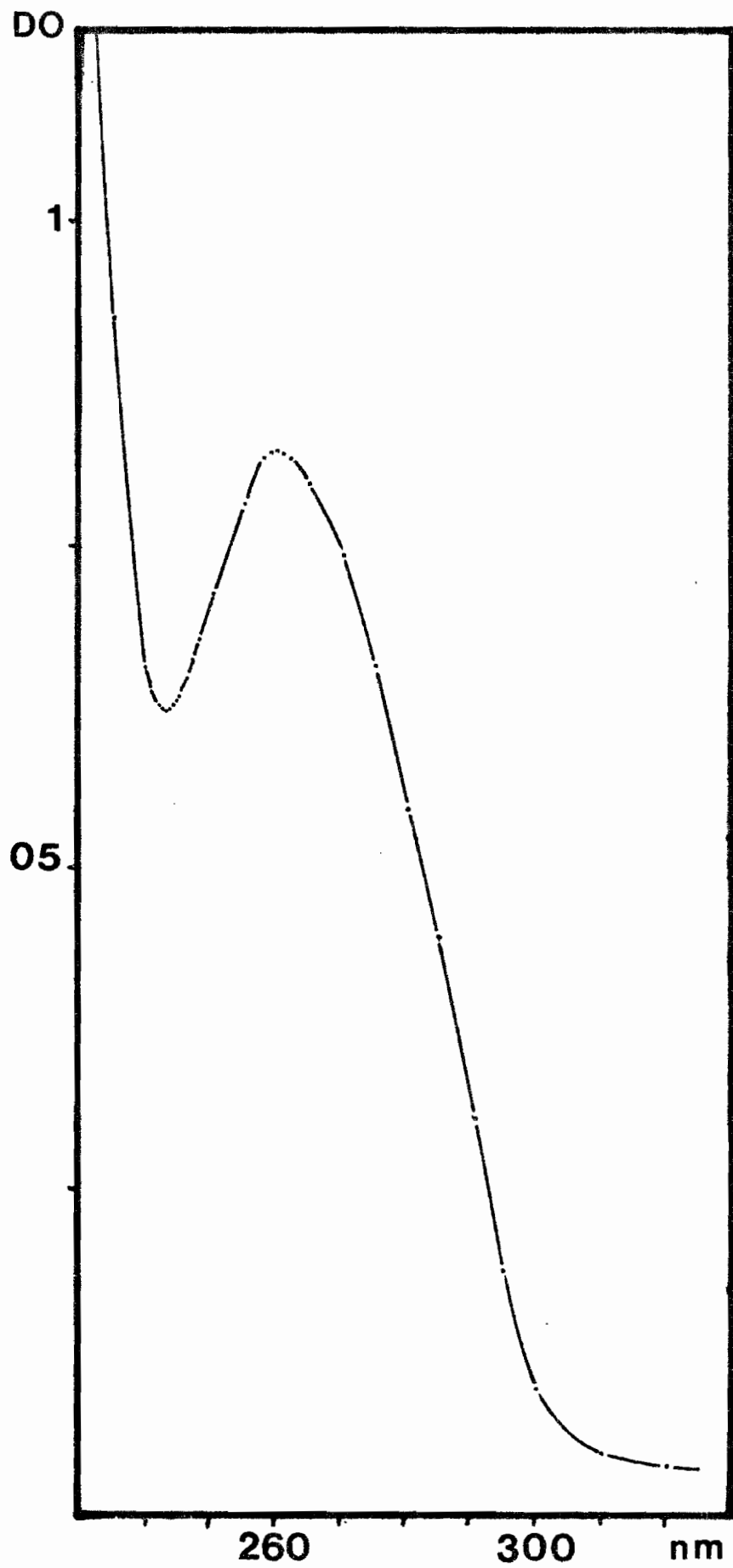
### PURIFICATION

La purification est effectuée à partir de matériel congelé selon la méthode mise au point par Bakker pour le RYMV (1974)

30 g de feuilles IR8 + 600 ml tampon phosphate PH5  
+ 0,2 % mercapto ethanol

- Passage sur étamine
- Clarification avec 300 ml de chloroforme
- Centrifugation 1500 g pendant 15'
- Précipitation de surnagement avec 120 g de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$   
pendant 15 min.
- Centrifugation 15' à 2500 g
- Précipitation du culot dans 20 ml de tampon 0,1 M  
phosphate p 45 + 0,2 % mercapto ethanol
- Dialyse contre le même tampon pendant 24 h.
- Centrifugation 20' à 6600 g
- Ultra centrifugation du surnagement 100' à 78500 g
- Reprise des culots dans 10 ml 0,01 M phosphate p4,70
- Centrifugation 20' à 6600 g
- Ultracentrifugation du surnagement 75' à 160.000 g
- Reprise du culot dans 1 ml de 0,01 M phosphate pH 7,0

VIRUS PURIFIE



Graphique IV : Spectre du virus du riz en ultra-violet .

Max.=260 nm

Min.=243 nm

PROPRIETES SPECTRO- PHOTOMETRIQUES

Une dilution de virus purifié nous donne un excellent spectre U.V. (graphique IV) avec un maximum d'absorption à 260 nm et un minimum à 243 nm, la moyenne des rapports de plusieurs expériences nous donne :

$$\text{Max/min} = 1,29 \pm 0,03$$

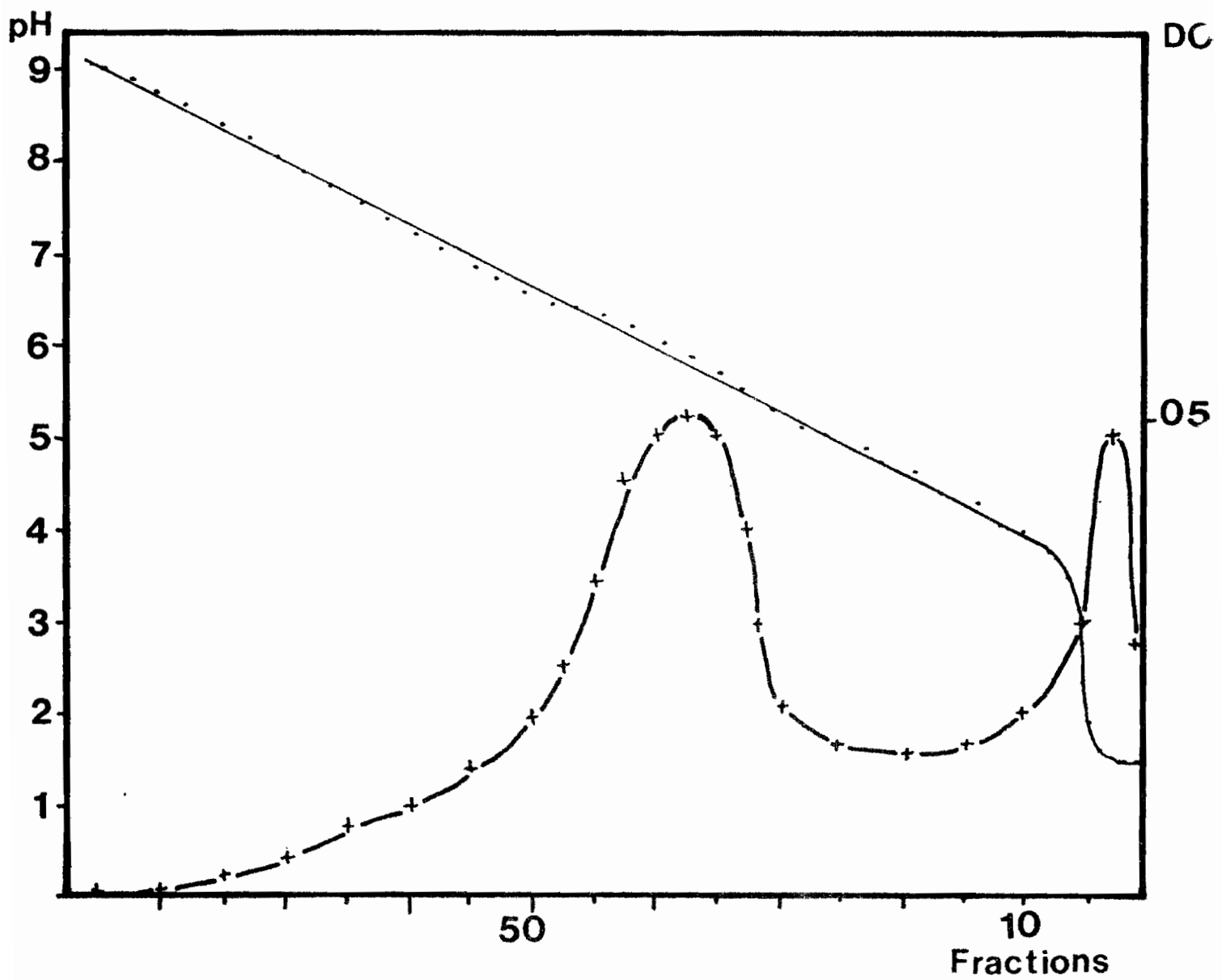
$$E_{260}/E_{280} = 1,46 \pm 0,02$$

$$E_{280}/E_{260} = 0,68 \pm 0,02$$

Light-scattering : A chaque purification nous avons essayé de prolonger le spectre d'absorption dans le visible afin d'effectuer la correction de la diffusion. Malheureusement le virus, même très purifié, est toujours accompagné d'impuretés qui empêchent de faire cette correction.

Rendement : En choisissant un coefficient d'absorption de 6000 (propre à ce type de virus) nous avons obtenu des rendements de 400 à 500 mg/kg familles.





Graphique V : Electro-focusing du virus du riz.

— Gradient de pH .

- - - Courbe d'absorption à 280 nm .

### DETERMINATION DU POINT ISO-ELECTRIQUE

Avec le virus nous avons déterminé le point iso électrique de ce virus par électrofocusing. Pour cela nous avons chargé 5 mg sur le sommet d'une colonne L K B de 110 ml de gradient d'ampholytes pH 3,5 - pH 10. Cette valeur a été soumise à tension de 300 V pendant 72 h après quoi la colonne est fractionnée en 110 fractions de 1 ml après avoir enregistré l'absorption à 280 nm. Nous obtenons ainsi une courbe d'absorption sur laquelle nous portons les pH mesurés sur les fractions.

Il suffit ensuite de voir à quel pH se situe le pic de virus. Pour ce virus du riz nous avons trouvé

$$pI = \text{pH } 6,0 \pm 0,2 \text{ (graphique V)}$$

### DETERMINATION DE LA DENSITE

La densité du virus a été déterminée sur gradient de chlorure de césium (9,2g/25ml), dans des tubes de 4 ml. Ces tubes sont centrifugés dans un S W 50 pendant 20 H à 3800rpm. Les tubes sont récoltés par le bas et fractionnés de 2 gouttes en 2 gouttes. Il suffit alors de tracer la courbe de diffraction pour déterminer la densité qui pour le virus du Riz est de  $\rho = 1,345$

DISCUSSION - CONCLUSION

Nous avons isolé des rizières de Côte d'Ivoire une maladie virale caractérisée par une panachure des jeunes feuilles, un jaunissement sur les vieilles et un nanisme plus ou moins accentué de la plante. Cette maladie transmissible mécaniquement est provoquée par un virus rond de 25-30 nm de diamètre. Les hôtes de ce virus ne sont pour l'instant que des espèces du genre Oryza. Le vecteur est certainement un insecte mais il est possible qu'il y ait une transmission par les gouttes de sudation. Ce virus résiste, dans l'extrait brut, à la congélation pendant plus de 84 j à une température de 25° entre 34 et 41 j et à la dessiccation pendant plus de 56 j. Il est inactivé par une température de 70-71°c pendant 10 mn. Toutes les variétés IRAT testées sont sensibles mais à des degrés divers. Il a été montré que l'on peut estimer cette sensibilité par l'observation de la croissance des plantes infectées, ce qui permettra de donner un indice supplémentaire pour le catalogue des variétés IRAT. Le virus peut être purifié facilement par précipitation au sulfate d'ammonium et centrifugations différentielles.

Il a un maximum d'absorption à 260 nm et un minimum à 243 nm avec un rapport  $E_{260}/E_{280} = 1,46$  et  $Max/min = 1,29$ .

Enfin nous avons pu déterminer son point isoélectrique comme étant de  $6,0 \pm 0,2$  et sa densité de  $= 1,345$

A ce jour il a été décrit et caractérisé 12 virus sur le riz (Rice Virus Diseases; K.C. Ling). Sur ces virus 3 seulement ont des symptômes semblables à cette virose. Il s'agit de :

- TUNGRO VIRUS
- ORANGE LEAF DISEASE
- RICE YELLOW MOTTLE VIRUS (RYMV)

Sur ces 3 virus il n'y a que le RYMV qui soit mécaniquement transmissible. D'autre part sa rangée d'hôte est extrêmement réduite, son comportement vis à vis de la plante est le même que le virus isolé en R.C.I., comme le RYMV ce virus est parasphérique et de 25-30 nm de diamètre, les propriétés biologiques évoluent dans le même sens, le spectre U.V. est tout à fait semblable, et son rendement en purification est du même ordre (BAKKER W. 1974 et 1975). Pour effectuer définitivement l'identification de ce virus, il faudrait le tester sérologiquement contre l'antisérum RYMV, malheureusement nous n'avons pas encore pu nous procurer cet antisérum.

Il faut remarquer qu'à ce jour, le RYMV n'a été isolé qu'en un seul endroit au monde : le Kenya. Il est donc possible que l'on retrouve ce même virus en Afrique de l'Ouest.

Nous pouvons donc conclure que ce virus isolé du Riz en R.C.I. est du RYMV ou à défaut un virus très voisin.

BIBLIOGRAPHIE

---

- BAKKER, W. (1974) Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya  
Agricultural Research Reports 829. 152 p.
- BAKKER, W. (1975) C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses.  
October 1975 - n° 149.
- LING, K.C. (1975) RICE VIRUS DISEASES.  
The International Rice Research Institute  
Third printing 1975 142 p.