

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER
CENTRE D'ADIOPODOUME

B.P. V51 - ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

Laboratoire de Virologie

ÉTUDE D'UNE MOSAÏQUE DU MIL (*PENNISETUM AMERICANUM*)
EN CÔTE D'IVOIRE

par

Brice KUKLA

février 1981

P L A N

Pages

INTRODUCTION	1
1. MATERIELS ET METHODES	1
1.1. Le virus	1
1.2. Transmission	1
1.2.1. Transmission mécanique et gamme d'hôtes	1
1.2.2. Transmission par insectes	1
1.3. Etude des propriétés biologiques <i>in vitro</i>	1
1.3.1. Point de dilution limite	1
1.3.2. Mesure de la température de thermoïnactivation	1
1.3.3. Conservation à la température ambiante	1
1.3.4. Conservation à 4°C	2
1.3.5. Résistance à la congélation	2
1.4. Purification du virus	2
1.5. Etude des propriétés biophysiques et biochimiques	2
1.5.1. Absorption en U.V.	2
1.5.2. Détermination du point isoélectrique (pHi)	2
1.5.3. Détermination du poids moléculaire de la protéine capsidaire	3
1.6. Microscopie électronique	3
1.6.1. Morphologie des particules	3
1.6.2. Recherche des inclusions d'origine virale	3
1.7. Sérologie	4
1.7.1. Préparation d'un antiserum	4
1.7.2. Tests sérologiques	4
2. RESULTATS	4
2.1. Symptomatologie et gamme d'hôtes	4
2.2. Transmission du virus	4
2.2.1. Par la graine	4
2.2.2. Par pucerons	4
2.3. Propriétés biologiques <i>in vitro</i>	5
2.3.1. Point de dilution limite	5
2.3.2. Température de thermoïnactivation	5
2.3.3. Conservation à la température ambiante	5
2.3.4. Conservation à 4°C	5
2.3.5. Résistance à la congélation	5
2.4. Propriétés biophysiques et biochimiques	6
2.4.1. Absorption en U.V.	6
2.4.2. Point isoélectrique des virions	6
2.4.3. Poids moléculaire de la protéine capsidaire	6
2.5. Microscopie électronique	8
2.5.1. Morphologie des particules	8
2.5.2. Recherche des inclusions d'origine virale	8
2.6. Sérologie	8
3. DISCUSSION	9
3.1. Identification du virus	9
3.2. Comparaison du virus de la Mosaïque du Mil avec les potyvirus connus	9
3.2.1. Comparaison des gammes d'hôtes	9
3.2.2. Comparaison des transmissions par pucerons	11
3.2.3. Comparaison des propriétés biologiques <i>in vitro</i>	11
3.2.4. Comparaison des propriétés biophysiques et biochimiques	11
3.2.5. Comparaison des relations sérologiques	12
CONCLUSION	12
RESUME	
FIGURES	
BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

Le Mil (*Pennisetum americanum*) représente une des cultures vivrières importantes des pays sahéliens et sub-sahéliens ; c'est, avec le Sorgho, la plus importante céréale d'hivernage de la zone semi-aride en Afrique de l'ouest. En Côte d'Ivoire sa culture se limite à la région de savane, mais présente une grande importance pour les populations de cette partie du pays qui en sont les seules productrices (44.600 T en 1978). Aussi le Gouvernement veut-il favoriser le développement de cette culture (parallèlement à celles du Sorgho et du Fonio) : objectif 1985 pour les trois cultures : 56.000 T (Commission des programmes de Côte d'Ivoire 1980). Un des moyens retenus pour atteindre ce but est la recherche de variétés améliorées, résistant aux maladies et aux prédateurs. Les généticiens de l'ORSTOM participent à ce projet et c'est dans leurs essais expérimentaux du Centre d'Adiopodoumé que nous avons observé des plants présentant une mosaïque de petites plages vert-pâles à jaune, sur les jeunes feuilles. Nous avons entrepris l'étude de cette maladie pour en caractériser l'agent pathogène.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Le virus

La souche virale utilisée provient de plants de Mil prélevés dans les essais du périmètre ORSTOM. Nous l'avons multipliée par passages successifs sur *P. americanum*.

Nous utiliserons pour certaines expériences le Guinea Grass Mosaic Virus A (souche *Panicum*) et le Guinea Grass Mosaic Virus B (souche Maïs).

1.2. Transmission

1.2.1. Transmission mécanique et Gamme d'hôtes

La transmission mécanique et la détermination de la gamme de plantes hôtes ont été effectuées à partir d'extrait brut, obtenu par broyage des feuilles de mil malades dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M, chlorhydrate de cystéine 0,02 M pH 7,1, bentonite 0,02 %. (5 à 10 ml pour 1 g de feuilles).

Les inoculations-retour ont été faites sur *P. americanum* pour détecter d'éventuelles plantes-hôtes ne présentant pas de symptômes.

Des contrôles ont été effectués par sérologie sur des extraits bruts clarifiés au chloroforme.

1.2.2. Transmission par insectes

Des pucerons (*Hysteroneura setariae*, ou *Rhopalosiphum maidis*) sont mis à jeûner pendant deux heures puis transférés sur des plantes malades pendant 10 min, de manière à leur permettre de se nourrir. Ensuite ils sont placés sur des plantules saines à raison de 10 pucerons par plantule (K.G. SWENSON, 1967).

1.3. Etude des propriétés biologiques in vitro

Les propriétés biologiques du virus ont été déterminées à partir d'extrait brut de plantes virosées.

1.3.1. Point de dilution limite

Il est déterminé par inoculation sur *P. americanum*, de différentes solutions obtenues par dilution successives de l'extrait brut dans le tampon phosphate décrit ci-dessus.

1.3.2. Mesure de la température de thermo-inactivation

Du jus brut de feuilles malades dilué au 1/10 est réparti dans une série de tubes à hémolyse en verre à raison de 2 ml par tube. Chaque tube est alors plongé pendant 10 min. dans un bain-marie thermostaté à la température voulue puis refroidi dans de la glace. Un tube traité dans les mêmes conditions dans un bain-marie à 25°C sert de témoin. Les différentes solutions sont ensuite inoculées sur *P. americanum*.

1.3.3. Conservation à la température ambiante

Comme pour l'étude précédente, des tubes à hémolyse sont remplis de 2 ml de jus brut dilué au 1/10, dans le tampon phosphate et laissés à température ambiante. L'inoculation d'un lot de plantes au moment du broyage sert de témoin, puis on inocule le contenu des différents tubes à des intervalles de temps réguliers.

1.3.4. Conservation à 4°C

Dans ce cas les tubes à hémolyse contenant les 2 ml de jus brut dilué au 1/10 sont placés dans un réfrigérateur à 4°C. Les inoculations se font à des intervalles de temps réguliers : de 24 h. en 24 h.

1.3.5. Résistance à la congélation (conservation à -20°C)

Les 2 ml de jus brut dilué au 1/10 sont placés au congélateur et les inoculations réalisées chaque semaine.

1.4. Purification du virus

La méthode de purification est dérivée de celle utilisée pour l'étude des souches A et B du Guinea Grass Mosaic Virus (THOUVENEL et al., 1976 ; LAMY et al., 1979 ; THOUVENEL et al., 1978). Environ 200 gr. de feuilles virosées sont broyées en présence de 200 ml tampon K_2HPO_4 0,5 M, pH 7,5, disulfite de sodium 1% et urée 1 M. Le broyat est filtré sur étamine puis clarifié.

La clarification peut se faire par agitation en présence de chloroforme (1 vol. $CHCl_3$ /1 vol. filtrat) puis centrifugation à basse vitesse (10 min à 6000 g), ou, par agitation pendant 30 min en présence de Triton X-100 (5% vol/vol) après une centrifugation basse vitesse (10 min - 6000 g).

La solution clarifiée est ensuite ultracentrifugée 2 h. à 90500 g (Rotor 35 - 34000 rpm).

La remise en suspension du culot est opérée dans une solution phosphate de potassium 0,1M (pH 8,4) pendant une nuit. Après une centrifugation à basse vitesse (10 min à 6000 g), la purification se poursuit par une sédimentation à travers un coussin de saccharose 20% (8 ml) pendant 2h.30 à = 93000 g (SW27 - 26500 rpm). Le culot est remis en suspension dans 2 ml de la solution phosphate de potassium 0,1M, pH 8,4. La solution ainsi obtenue est à nouveau centrifugée à basse vitesse (10 min à 6000 g) puis sédimentée sur gradient de saccharose 10-40 % (poids/poids) dans du tampon phosphate de potassium pendant 2h.30 à = 93000 g.

Les gradients sont récoltés par le bas, la densité optique étant mesurée avec la cellule à flot continu de 3 mm d'un absorptiomètre Uvicord LKB. On recueille la fraction contenant le virus et on la dilue de moitié dans la solution phosphate de potassium 0,1M. Le matériel est finalement concentré par ultracentrifugation (2h.30 à 78000 g). Le culot est repris dans une solution phosphate de potassium 0,01M pH 8,4 ou du tampon borate de sodium 0,05M pH 8,4.

1.5. Etude des propriétés biophysiques et biochimiques

Cette étude a été menée sur des solutions virales purifiées. Les caractéristiques analysées au cours de cette étude sont :

- L'absorption en U.V. des solutions virales purifiées
- La détermination du point isoélectrique (pHi)
- La mesure du poids moléculaire (P.M.) de la protéine capsidaire du virus.

1.5.1. Absorption en U.V.

- . Le spectre d'absorption des solutions virales obtenues après purification est établi grâce à un spectrophotomètre enregistreur Beckman UV 5230 en utilisant une cuve en quartz de 1 cm de chemin optique.
- . Correction de la diffusion de la lumière (Light scattering).

En fait, l'enregistrement obtenu entre 315 et 230 nm est la résultante de 2 phénomènes physiques : d'une part l'absorption des particules virales et d'autre part la diffusion de la lumière par ces mêmes particules. Pour corriger cette "erreur", nous utilisons la méthode décrite par NOORDAM (1973). Il s'agit d'enregistrer la valeur de la diffusion de la lumière pour les longueurs d'onde du spectre visible et du proche U.V. (600 nm - 320 nm) par une solution virale concentrée (D.O. > 11). Les valeurs de ce paramètre de diffusion pour les longueurs d'onde 320 à 230 nm sont ensuite extrapolées à partir de courbes de référence (NOORDAM, 1973). Par différence avec l'enregistrement obtenu dans cet intervalle de longueurs d'onde, nous en déduisons la valeur réelle de l'absorption des particules virales.

1.5.2. Détermination du point isoélectrique (pHi)

Le point isoélectrique des particules virales a été déterminé par électrofocalisation dans une colonne LKB contenant 110 ml d'ampholytes établissant un gradient de pH allant de pH 3,5 à pH 10 (REBEYROTTE, P. et LABBE J.P., 1969). La colonne a été chargée avec une suspension virale purifiée de D.O. 260 nm = 3.

Une tension de 100 V. a été établie pendant les 12 premières heures, puis le voltage a été porté à 300 V. pendant 48 h. La densité optique (D.O. 260 nm) et le pH des fractions récoltées ont été respectivement mesurés avec la cellule à flot continu de 3 mm d'un absorptiomètre Uvicord LKB et un pH-mètre ORION 701A.

1.5.3. Détermination du Poids moléculaire de la protéine capsidaire

Le poids moléculaire de la protéine capsidaire a été déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide -SDS selon la technique décrite par WEBER et OSBORN (1969). Les expériences ont été menées à partir de solutions de protéine de concentration initiale 10 mg/ml. Dans le cas des protéines marqueurs, 0,1 ml de la solution protéique est additionné de 0,4 ml H₂O bidistillée et 0,5 ml de mélange P. Dans le cas des solutions de protéines virales, 1 volume de solution est dilué dans 1 volume de mélange P. Le mélange P est composé comme suit :

Tampon :	{ Glycérol	8 ml
	{ NaH ₂ PO ₄ - Na ₂ HPO ₄ 1M	0,4 ml
	{ SDS 10%	4 ml
	{ Mercaptoéthanol	0,4 ml
	{ H ₂ O bidistillée	5,2 ml

Les solutions de protéine ainsi obtenues sont placées durant 2 min dans un bain-marie à 100°C ce qui a pour effet de dissocier les protéines les unes des autres. Le tampon d'électrophorèse est le suivant :

NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄ 0,1M pH 7,1 SDS 1%

Après une préélectrophorèse de 30 min. sous une intensité de 8 mA, nous avons chargé les gels avec 30 µl d'une solution constituée par un mélange = 5 µl par protéine marqueur et 5 µl de la protéine virale à laquelle nous avons ajouté 5 µl de bleu de bromophénol comme indicateur de migration.

L'électrophorèse est menée sous une intensité de 8 mA par gel jusqu'à ce que le bleu de bromophénol arrive au bas du gel. Cette durée varie en fonction de la concentration du gel en acrylamide. La migration achevée les gels sont mis à colorer 30 min. puis ils sont plongés dans une solution de décoloration que l'on renouvelle plusieurs fois.

	Solution de coloration	Solution de décoloration
Bleu brillant de coomassie	1,1 g	-
Méthanol	200 ml	100 ml
Acide acétique	40 ml	150 ml
H ₂ O bidistillée	200 ml	1750 ml

Filtrer avant emploi

Les protéines marqueurs utilisées sont les suivantes :

- La pyruvate kinase de muscle de lapin	PM = 57 000 d
- La 3 phosphoglycérate kinase de Levure	PM = 47 000 d
- L'ovalbumine	PM = 43 000 d
- L'inhibiteur de la trypsine extrait de Soja (TIS)	PM = 21 000 d
- La protéine capsidaire du VMT	PM = 17 500 d
- Le lysozyme	PM = 14 000 d

1.6. Microscopie électronique

1.6.1. Morphologie des particules

Les particules virales ont été observées à partir de broyat de feuilles virosées clarifiées au chloroforme ou de suspensions purifiées.

Les préparations virales ont été colorées négativement à l'acétate d'uranyle 2% pH 4,2. Les photographies ont été prises à l'aide d'un microscope électronique SIEMENS Elmiskop 102 appartenant au GERME (Groupement d'Etude et de Recherche en Microscopie Electronique) à Adiopodoumé.

La mesure des particules virales a été effectuée sur des photographies de microscopie électronique à un grossissement final de 90 000.

1.6.2. Recherche d'inclusion d'origine virale

La préparation des échantillons a été faite selon la technique décrite par MORGAN et ROSE (1967). Des fragments de bande épidermique foliaire de Mil virosé ont été plongés dans le tampon de Sorenson :

Sol A : 3,45 g NaH₂PO₄ + 250 ml H₂O bidistillée

Sol B : 3,545 g NaH₂PO₄ + " "

Tampon = 20 ml sol A + 80 ml sol B.

% en acrylamide	5	6	7	8	9	10	11	12
Produits								
Acrylamide-Bisacrylamide (30% - 1%) ml.	5,4	6,4	7,6	8,4	9,6	10,6	11,8	12,8
SDS 10% ml.	0,32							
Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ 1 M pH= 7,1 ml.	3,2							
Urée 4 M ml.	4							
EDTA 0,2 M pH=7,2 ml.	0,8							
H ₂ O ml.	15	14	12,8	12	10,8	9,8	8,6	7,6
Catalyseurs: TEMED µl.	16							
Persulfate d'ammonium 1% ml.	3,2							

Tableau n° 1 : Composition des gels pour différentes concentrations en acrylamide.
Les volumes indiqués sont calculés pour 20 tubes 10x0,5 cm.

Ils sont ensuite fixés à la glutaraldéhyde 1,5% pendant 3h. puis rincés abondamment avec du tampon de Sorenson et placés à 4°C pour la nuit. Les échantillons sont post-fixés au tétroxyde d'osmium (OsO₄) 1% en présence de tampon pH 7,2 pendant 1h. environ puis rincés abondamment avec du tampon de Sorenson et enfin déshydratés par immersion dans une série de bains d'alcool de concentration croissante (10, 20, 30, 50, 70, 80, 95 et 100%, 15 min. environ). Les fragments sont ensuite imprégnés d'oxyde de propylène puis de résine. La résine (Epon + DMP 30 1,7%) contenant les fragments est mise à polymériser à l'étuve à 60°C pendant 72h. Les échantillons sont ensuite débités en coupes fines à l'aide d'un ultramicrotome "Sorvall MT2-B ultramicrotome". Les coupes sont colorées 10 à 15 min. à l'acétate d'uranyle 3%, puis 3 min. au citrate de plomb avant observation au microscope électronique.

1.7. Sérologie

1.7.1. Préparation d'un antisérum

Un antisérum spécifique a été obtenu en injectant chaque semaine 1 ml de solution virale purifiée à un lapin selon le programme suivant : 2 injections intraveineuses, puis 3 injections intramusculaires (VAN DER VEKEN et al., 1962 ; CARPENTER, 1965). Les solutions injectées avaient une D.O. = 3, émulsifiées avec un volume égal d'adjuvant incomplet de Freund (DIFCO) dans le cas des intramusculaires.

1.7.2. Tests sérologiques

La détermination du titre de l'antisérum et les études de parenté sérologique ont été menées suivant la technique de microprécipitation sous huile de paraffine dans des boîtes de Pétri (Van SLOGTEREN, 1955). Pour ces expériences, nous avons utilisé des solutions virales fraîchement purifiées, et, des broyats de plante clarifiés avec un volume égal de chloroforme.

2. RESULTATS

2.1. Symptomatologie et gamme d'hôte

Les jeunes plants de Mil infectés par le virus présentent des alignements de taches ocellées ("eye-spots") vert-clair ou une mosaïque vert-clair selon les cultivars. Ces symptômes évoluent vers une mosaïque en bande par étirement et anastomose des taches (fig. 1). Les plantes montrant des symptômes sévères sont en général également atteintes de nanisme (fig. 2). La maladie s'est transmise facilement par inoculation mécanique. Les symptômes apparaissent 8 à 10 jours après l'inoculation mécanique d'un jus infectieux sur des plantes au stade 2 ou 3 feuilles.

Le laps de temps précédant l'apparition des symptômes ainsi que leur intensité sont liés à la saison. Nous avons observé que la maladie était plus difficilement transmissible et occasionnait des symptômes moins nets pendant la saison des pluies, de mai à juillet.

La maladie s'est transmise, par voie mécanique, aux graminées suivantes : *Bromus commutatus*, *B. macrostachys*, *Panicum maximum* (K187), *P. crus-galli*, *Sorghum arundinaceum*, *Zea mays*.

Les symptômes observés dans ces différents cas sont du type mosaïque évoluant différemment selon l'hôte, par exemple sous forme de plages blanches dans le cas de *P. crus-galli* ou sous forme de zones de nécrose dans le cas de *B. macrostachys*.

Les essais de transmissions sur les espèces suivantes se sont révélés négatifs : *Avena sativa* Maris Tôbard, *Avena fatua*, *Briza maxima*, *Dactylis glomerata*, *Digitaria sanguinalis*, *Eleusine coracana*, *E. tocussa*, *Oryza sativa*, *Saccharum officinarum*, *Triticum durum* Hardi.

D'autres plantes-hôtes sont en cours d'étude : *Bromus unioloides*, *B. sterilis*, *Sorghum sudanense*, *S. vulgare*.

2.2. Transmission du virus

2.2.1. Transmission par la graine

Environ 1000 graines récoltées sur des *P. americanum* virosés ont été semées, après séchage, pour observer si le virus pouvait se transmettre par la graine. Aucun des 428 plants ayant germé n'a présenté les symptômes de la maladie.

2.2.2. Transmission par puceron

Le virus a été transmis de *P. americanum* à *P. americanum* par *Hysteroneura setariae* : 7 pieds présentèrent des symptômes sur les 19 utilisés.

Lors des contrôles sérologiques effectués au cours de cette expérience des réactions positives ont été obtenues à partir de plantes sans symptômes (3 sur 19). La transmission semble être du type non-persistant étant donné le bref temps d'acquisition (5 à 10 min.).

L'expérience menée avec *Rhopalosiphum maidis* démontre également la possibilité de la transmission du virus de *P. americanum* sur *Panicum maximum* (K187). Les symptômes observés sont très diffus mais les contrôles sérologiques présentent des réactions positives.

2.3. Propriétés biologiques *in vitro*

2.3.1. Point de dilution limite

L'étude du point de dilution limite montre que le jus brut de plante malade est encore infectieux après une dilution à 10^{-2} mais plus à 10^{-3} .

2.3.2. Température de thermoinactivation

Le virus est inactivé après un chauffage de 10 min. à 55°C .

2.3.3. Conservation à la température ambiante

Le virus ne reste infectieux que quelques heures (moins de 4 h. dans nos expériences) à la température ambiante, soit environ 24°C .

Par contre, l'inoculum extrait de feuilles malades qui ont été conservées en atmosphère humide à température ambiante pendant 6 jours s'est encore révélé infectieux.

2.3.4. Conservation à 4°C

Le jus brut dilué au 1/10 garde son pouvoir infectieux après 24h. de conservation à 4°C , mais le perd au bout de 48h.

2.3.5. Résistance à la congélation

Le pouvoir infectieux du jus brut dilué à 10^{-1} est conservé pendant au moins deux mois de stockage à -20°C .

Cependant, si la solution est congelée et décongelée à plusieurs reprises, elle perd rapidement son pouvoir pathogène.

2.4. Propriétés biophysiques et biochimiques

Tableau N° 2 - Correction pour la diffusion de la lumière effectuée sur les mesures d'absorption de la solution virale purifiée en UV.

λ	Témoïn blanc : T	Solution virale concentrée : D	Différence D - T	Extrapolation	D.O. spectre non corrigé	Valeur à soustraire	Valeur corrigée
600	0,000	0,170	0,170				0
580	1	190	189				0
560	2	214	212				0
550	2	228	226				0
540	2	242	240				0
520	3	274	271				0
500	3	311	308				0
480	4	358	354				0
460	4	418	414				0
450	4	455	451				0
440	5	506	495				0
420	5	617	612				0
400	6	756	750				0
380	7	905	898				0
360	8	1,137	1,129				0
355	9	1,223	1,214				0
350	10	1,330	1,320				0
340	10	1,535	1,525	pente $n = 3,8$		fact.cor. 14,88	0
320	11	1,870	1,859	1,859	0,125	0,125	0
310	11	2,045	2,034	2,034	0,135	0,137	0
305	-12		pente $n = 3,8$	2,160	0,145	0,145	0
300	-12	2,670		2,300	0,175	0,155	0,020
295	12			2,440	0,255	0,164	91
290	12			2,600	0,395	0,175	220
285	12			2,800	0,560	0,188	372
280	12			3,000	0,680	0,202	478
275	12			3,200	0,745	0,215	530
270	12			3,420	0,785	0,230	555
265	13			3,660	0,805	0,246	559
260	13			3,950	0,816	0,265	551
255	13			4,250	0,790	0,286	504
250	-14			4,600	0,755	0,309	446
245	14			4,950	0,745	0,333	412
240	14			5,360	0,945	0,360	585
235	15			5,800			
230	15			5,300			

% acrylamide \ protéines	5	6	7	(7,5)	8	9	10	11	12	Pente de la courbe Log Rf=f(c)
ruvate-kinase 000	49,6	42	29,4	28,8	26,8	17,4	17,5	17,4	14	6,1
Phosphoglycerate-kinase 000	58,5	51,2	39,8	38,5	36,7	23,9	26	23	19,9	4,98
albumine 000	63	56,9	42,6	43,5	40,5	27,6	30,5	27,2	24,2	4,4
tyrosine inhibitor du ja 21 000	87,8	85	80,2	82,2	80	69,7	73,2	71,3	67,6	1,2
protéine capsidaire du T 17 500	92,2	88,6	83,4	81,8	83,3	75,6	78,4	78,1	73	0,92
protéine capsidaire virus mosaïque Mil	59,8	56,6	47,2	48,7	45,2	33,8	38,6	34	31,7	3,02
C. GGMV.A	58,3	56,2	45,7	/	45,5	34,1	39	34,1	31,9	2,9
C. GGMV.B	56,3	53,1	45,4	(66,1)	43,8	31,7	36,7	32,4	30	3,1

Tableau 3 - Valeur des Rf moyennes des différentes protéines en fonction de la concentration en acrylamide

% acrylamide \ protéine	5	6	7	(7,5)	8	9	10	11	12	Moyenne
protéine capsidaire virus de la mosaïque du Mil	44,5	41,5	40	40	40	39	38	40	38,5	40 (±4 K)
GGMV.A	47	42	41,2	39,7	40	39	38	40	38,5	41 (±6 K)
GGMV.B	48,5	45	41,7	41,2	41,2	40,7	39	41	39,5	42 (±6 K)

Tableau 4 - Valeur des P.M. des protéines capsidaires déterminés à partir des courbes Log PM = f (Rf moy)

De plus, cette expérience a également permis d'étudier les bandes de dégradation des protéines capsidaires des trois virus. La figure 8 montre une représentation de la position de ces différentes bandes pour différentes concentrations de gel. Sept bandes sont déterminées dans le cas de la protéine GGMV.A alors qu'il y en a huit dans le cas du GGMV.B et du virus de la mosaïque du Mil. Les poids moléculaires de ces différentes bandes déterminées par la méthode de HEDRICK et SMITH (1968) sont indiqués dans le tableau suivant :

Bandes de dégradation	Virus de la mosaïque du Mil	GGMV.A	GGMV.B
Protéine capsidaire = D1	32 500 ± 500	32 500 ± 500	34 500 ± 500
D2	33 000 ± 500	30 000 ± 500	32 300 ± 500
D3	31 500 ± 500	29 300 ± 500	30 700 ± 500
D4	30 700 ± 500	31 100 ± 500	28 900 ± 500
D5	30 000 ± 500	30 100 ± 500	27 700 ± 500
D6	28 500 ± 500	27 700 ± 500	30 300 ± 500
D7	27 100 ± 500	26 300 ± 500	27 400 ± 500
D8	25 900 ± 500		25 500 ± 500

Tableau 5 - Comparaison des P.M. des différentes bandes de dégradation des protéines capsidaires de chacun des trois virus.

2.5. Microscopie électronique

2.5.1. Morphologie des particules

Les particules virales observées en microscopie électronique à partir de solutions purifiées et du jus brut clarifié apparaissent comme des filaments (fig. 9) d'environ 15 nm de diamètre et 820 ± 10 nm de longueur (48,8% des 258 particules mesurées - fig. 10).

2.5.2. Recherche des inclusions virales

Les coupes ultrafines du matériel virosé inclus dans la résine observées au microscope électronique ont révélé la présence de deux grands types d'inclusions, l'un présentant une symétrie circulaire alors que l'autre montre une structure laminaire.

Ces inclusions sont semblables à celles décrites par EDWARDSON (1966) à propos des virus à structure hélicoïdale. Nous avons donc utilisé la nomenclature définie par EDWARDSON et al. (1968) pour les caractériser.

Les photographies de microscopie électronique nous permettent de distinguer en ce qui concerne les inclusions à symétrie circulaire :

- 1) Des inclusions cylindriques composées d'éléments plus ou moins ronds superposés et décalés légèrement les uns par rapport aux autres. Le diamètre de ces éléments est d'environ 150 nm.
- 2) Des "roues" ou, "soleils", composés d'un certain nombre de "bras" issus d'un "noyau" central et divergeant avec une certaine courbure vers la périphérie. Ce sont les "pin-wheels" de la littérature anglosaxonne.
- 3) Des inclusions circulaires : composés d'éléments ronds à bords relativement épais et apparaissant de manière plus isolés que les éléments des inclusions cylindriques.

Pour ce qui est des inclusions à structure laminaire, nous pouvons observer des "tubes" isolés ou en groupe. Les tubes apparaissent sur les photos comme des éléments (= 50 nm d'épaisseur) présentant des bords sombres (osmiophiles) relativement épais, délimitant une zone centrale plus claire (= 17 nm de large) (fig. 11).

2.6. Sérologie

L'antiserum produit contre le virus de la mosaïque du Mil possède un titre homologue de 1/1024. Nous avons étudié les degrés de parenté de ce virus avec d'autres virus filamenteux isolés à partir de Graminées à Adiopodoumé : les souches A et B du Guinea Grass Mosaic Virus (GGMV).

Le tableau 6 présente les résultats obtenus.

Virus de la mosaïque du Mil	Antiserum contre virus de la Mosaïque du Mil				Anti GGMV-A				Anti GGMV-B			
	Expérience I		Expérience II		Expérience I		Expérience II		Expérience I		Expérience II	
	titre : 1024		titre : 1024		titre : 1024		titre : 2048		titre : 1024		titre : 1024	
	00 300	00 30	00 300	00 100	00 300	00 30	00 300	00 100	00 300	00 30	00 300	00 100
	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	2048	128	128	256	256
GGMV-A	512	128	256	512	1024	32	512	1024	64	32	64	128
GGMV-B	512	1024	128	1024	1024	128	512	2048	512	128	1024	1024

Tableau 6 - Résultats des différents tests sérologiques effectués entre le virus de la mosaïque du Mil, le GGMV-A et le GGMV-B, et leurs antisera.

Le virus de la Mosaïque du Mil réagit jusqu'au titre avec l'antiserum GGMV-A. De même le virus GGMV-A réagit au titre avec l'antiserum contre le virus du mil. Par contre, les réactions de ces deux virus avec l'anti-GGMV-B s'arrêtent à 3 ou 4 dilutions du titre homologue de cet antiserum. Le GGMV-B réagit au voisinage du titre de chacun des 3 antisera utilisés.

Des relations ont également été trouvées avec les antisera des 3 potyvirus.:

Pepper veinial mottled virus (titre 1/8192 - réaction 1/256),
Maize dwarf mosaic virus - strain B (titre ? - réaction 1/8)
et Maize dwarf mosaic virus - strain A (titre ? - réaction 1/4).

Les tests effectués avec les antisera des potyvirus suivants se sont révélés négatifs.:
Bean common mosaic virus (1/512), Bean yellow mosaic virus (1/1024), Henbane mosaic virus (1/8192),
Passiflora ringspot virus (1/2048), Peanut mottle virus (1/4096), Potato virus A (1/160), Potato virus Y (?), Sugarcane mosaic virus (?).

3. DISCUSSION

3.1. Identification du virus de la Mosaïque du Mil

Les résultats obtenus au cours de l'étude des propriétés biophysiques et biochimiques (contenu en acide nucléique ≈6% ; PM protéine capsidaire ≈32 500 d ; longueur ≈820 nm et diamètre ≈15 nm), la sérologie et la transmission du virus par puceron sur le mode non-persistant démontrent que ce virus appartient au groupe des Potyvirus. L'association des diverses inclusions d'origine virale servant de critère de diagnose et de classification (EDWARDSON et CHRISTIE, 1978), l'appartenance du virus de la Mosaïque du Mil au groupe des Potyvirus est confirmée par la mise en évidence, dans les plantes virosées, de toutes les inclusions caractéristiques des potyvirus (roues, tubes, rouleaux, agrégats lamellaires..).

Nous pouvons préciser la position systématique du virus de la Mosaïque du Mil parmi les Potyvirus en nous référant à la monographie d'EDWARDSON (1974) traitant de ce groupe. L'auteur subdivise ce groupe très vaste (83 membres classés sur 264 relativement bien étudiés) en trois sous-groupes en fonction des inclusions induites par les virus. Ainsi, du fait de la présence dans les Mils virosés de tous les types d'inclusions décrits dans le cas des Potyvirus, le virus de la Mosaïque du Mil est placé dans la subdivision III d'EDWARDSON.

3.2. Comparaison du virus de la Mosaïque du Mil avec les potyvirus connus

Les propriétés déterminées au cours de l'étude du virus de la Mosaïque du Mil se sont révélées très proches de celles de deux souches d'un virus isolées à partir de Graminées en Côte d'Ivoire : le GGMV-A trouvé sur *Panicum* (THOUVENEL et al., 1979) et le GGMV-B trouvé sur *Zea mays* (LAMY et al., 1979). Une comparaison plus précise des propriétés de ces trois virus va nous permettre de dire si le virus de la Mosaïque du Mil est différent ou si il représente une souche du Guinea Grass Mosaic Virus.

3.2.1. Comparaison des gammes d'hôtes

Le tableau comparatif des plantes-hôtes nous montre deux différences entre le virus de la Mosaïque du Mil et le GGMV-A : leurs comportements face à *Bromus sterilis* et *Setaria italica*, mais ces résultats demandent à être confirmés.

Les différences sont plus nombreuses entre le virus de la Mosaïque du Mil et le GGMV-B : *Avena fatua*, *A. sativa*, *Bromus macrostachys*, *Eleusine coracana*, *E. tucussa*, *Panicum maximum*, *Setaria italica* (?).

Au vu de cette étude, et pour les plantes utilisées, nous ne pouvons différencier le virus de la Mosaïque du Mil de la souche A du GGMV, alors qu'il existe une différence nette entre ce virus et la souche B.

Gamme des plantes-hôtes	Virus de la Mosai- que du Mil	GGMV-A	GGMV-B
<i>Avena fatua</i>	-	-	+
<i>Avena sativa</i> (Maris Tabard)	-	-	+
<i>Briza maxima</i>	- (à contrôler)	/	/
<i>Bromus commutatus</i>	+	+	+
<i>B. macrostachys</i>	+	+	-
<i>B. sterilis</i>	- (à contrôler)	+	+
<i>B. uniloides</i>	-	-	/
<i>Dactylis glomerata</i>	-	-	-
<i>Digitaria sanguinalis</i>	-	-	-
<i>Eleusine coracana</i>	-	-	+
<i>E. tucussa</i>	-	-	+
<i>Oryza sativa</i>	-	-	-
IRAT 13	-	-	-
Iguape cateto	-	-	-
<i>Panicum maximum</i> K187	+	+	-
<i>P. crus-galli</i>	+	+	+
<i>Pennisetum americanum</i>	+	+	+
<i>Setaria italica</i>	- (à contrôler)	+	+
<i>Sorghum arundinaceum</i>	+	+	+
<i>S. sudanense</i>	- (à contrôler)	- (à contrôler)	+
<i>S. vulgare</i>	- "	- "	+
<i>Saccharum officinarum</i>	-	-	-
<i>Triticum durum</i> (var. Hardi)	-	-	-
<i>Zea mays</i> CJB	+	+	+
		(très difficilement)	

Tableau 7 - Comparaison des gammes de plantes-hôtes pour les 3 virus :
Virus de la Mosaique du Mil, GGMV-A et GGMV-B.

- + hôte systémique positif
- hôte négatif
/ hôte non étudié

Propriétés biologiques	Virus de la Mosai- que du Mil	GGMV-A*	GGMV-B**
Point de dilution limite	10 ⁻² - 10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻²
Température de thermoinactivation	10 min. à 55°C	10 min. à 50°C	10 min. à 55°C
Résistance à la température ambiante	<4h	quelques heures	5. < tps < 8h
Résistance à 4°C			
+ extrait broyat	24h	24h	<96 h
+ dans les feuilles	=6 j	=4 j	?
Résistance à -20°C			
+ broyat	>2 mois	?	0
+ dans les feuilles	>4 semaines	2 semaines	

Tableau 8 - Comparaison des propriétés biologiques *in vitro* pour les trois virus

- * Valeurs reprises de THOUVENEL et al. (1976)
** Valeurs reprises de LAMY et al. (1979)

Propriétés biophysiques	Virus de la Mosaïque du Mil	GGMV-A	GGMV-B
Longueur particule diamètre	820 ± 10 nm ≈ 15 nm	816 ± 16 nm * ≈ 15 nm	825 ± 15 nm ** ≈ 15 nm
DO 260 DO 280	1,22 ± 0,02 1,15 après correction light scattering	1,22 ± 0,02*	1,22 ± 0,02**
DO max DO min	DO 260 DO 247 = 1,09 ± 0,03 DO 265 DO 247 = 1,37 après correction light scattering	- -	- -
Contenu en acide nucléique	6 %	6 %	6 %
P.M. protéine capsidaire	32 500 ± 500 d	32 500 ± 500 d	34 500 ± 500 d
pHi	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,2	5,3 ± 0,2

Tableau 9 - Comparaison des propriétés biophysiques et biochimiques des 3 virus.

* Valeurs reprises de THOUVENEL et al. (1976)

** Valeurs reprises de LAMY et al. (1979).

3.2.2. Comparaison de la transmission par pucerons

Nous avons démontré la transmission du virus de la Mosaïque du Mil par *Hysteroneura setariae*. LAMY et al. (1979) l'avaient fait avec *Rhopalosiphum maidis* pour le GGMV-B. Par contre THOUVENEL et al. (1976) n'ont pas observé de transmission du GGMV-A de *Panicum* à *Panicum* par pucerons, et nos propres expériences à ce propos sont restées négatives.

Il y aurait donc là une différence nette entre le GGMV-A et le virus de la Mosaïque du Mil, mais cette différence peut être due au fait que les pucerons s'alimentent peu ou mal sur *Panicum*.

Il est à noter que nous avons observé la transmission du virus de la Mosaïque du Mil de *Pennisetum americanum* sur *Panicum maximum* par *Rhopalosiphum maidis*.

3.2.3. Comparaison des propriétés biologiques in vitro

Le tableau 8 fait apparaître quelques légères différences d'un virus à l'autre, mais elles ne sont pas suffisamment importantes pour être significatives. Ce sont en effet des propriétés qui peuvent varier légèrement selon les extraits, pour un même virus et ne peuvent donc être considérées dans l'absolu.

3.2.4. Comparaison des propriétés biophysiques et biochimiques

Le tableau 9 fait ressortir deux différences nettes entre les pHi d'une part et les P.M. des protéines capsidaires d'autre part.

En ce qui concerne le pHi, la souche B du GGMV se différencie nettement des deux autres virus, alors que le GGMV-A et le virus de la Mosaïque du Mil présentent le même pHi.

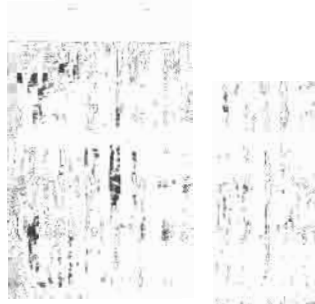
En ce qui concerne le P.M. des protéines capsidaires, le GGMV-B montre à nouveau une différence nette avec les deux autres virus tandis que les protéines capsidaires du GGMV-A et du virus de la Mosaïque du Mil ont des P.M. voisins. Par contre la figure 12 met en évidence des comportements différents en ce qui concerne les bandes de dégradation des protéines capsidaires des trois virus, ce qui tendrait à différencier le virus de la Mosaïque du Mil et le GGMV-A.

Résumé:

Dans le cadre de l'inventaire des viroses affectant les plantes d'importance économique en Côte d'Ivoire, nous avons détecté une maladie sévissant sur Mil (*Pennisetum americanum*). Cette maladie est caractérisée par une mosaïque, et, elle est transmissible mécaniquement ou par puceron, mais non par la graine. L'agent causal a été purifié et ses propriétés étudiées. Ce virus appartient au groupe des Potyvirus. Sa gamme d'hôtes, ainsi que ses propriétés biologiques, physico-chimiques et sérologiques sont très semblables à celles du Guinea Grass Mosaic Virus souche A (GGMV-A), mais il s'en distingue en ce qui concerne la transmission par pucerons. Nous proposons de le nommer - Guinea Grass Mosaic Virus souche D (GGMV-D).

Summary:

A viral disease has been detected on pearl millet (*Pennisetum americanum*) in the Ivory Coast. The symptoms are a light-green mosaic more or less severe, and eventually dwarfing. This disease is mechanically transmissible and aphid-borne, but not seed-borne. The agent has been purified and its properties studied. It is a flexuous virus about 820 nm long, member of the potyviruses group. Its host range, its biological, physico-chemical and serological properties make it very close to the Guinea Grass Mosaic Virus strain A (GGMV-A). But, as this virus is distinguishable by the aphid transmission, we propose to name it : Guinea Grass Mosaic Virus strain D (GGMV-D).



Densité optique

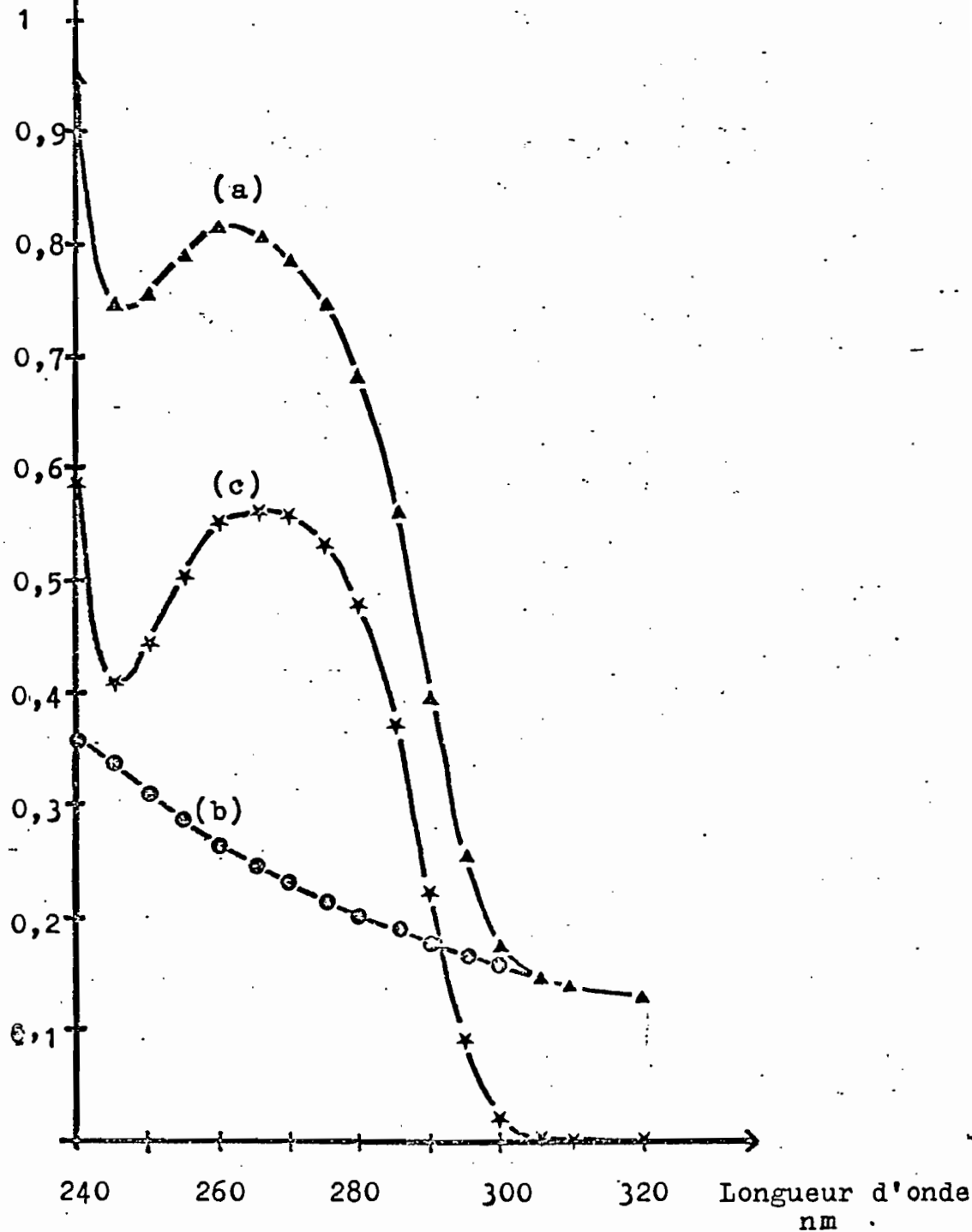


Figure n° 3: Spectre d'absorption en UV du Virus de la Mosaïque du Mil.

- courbe (a) ▲: spectre d'absorption non corrigé pour la diffusion.
- courbe (b) ●: valeurs extrapolées de la diffusion de la lumière par les particules virales entre 320 et 240 nm.
- courbe (c) ✖: spectre d'absorption corrigé pour la diffusion.

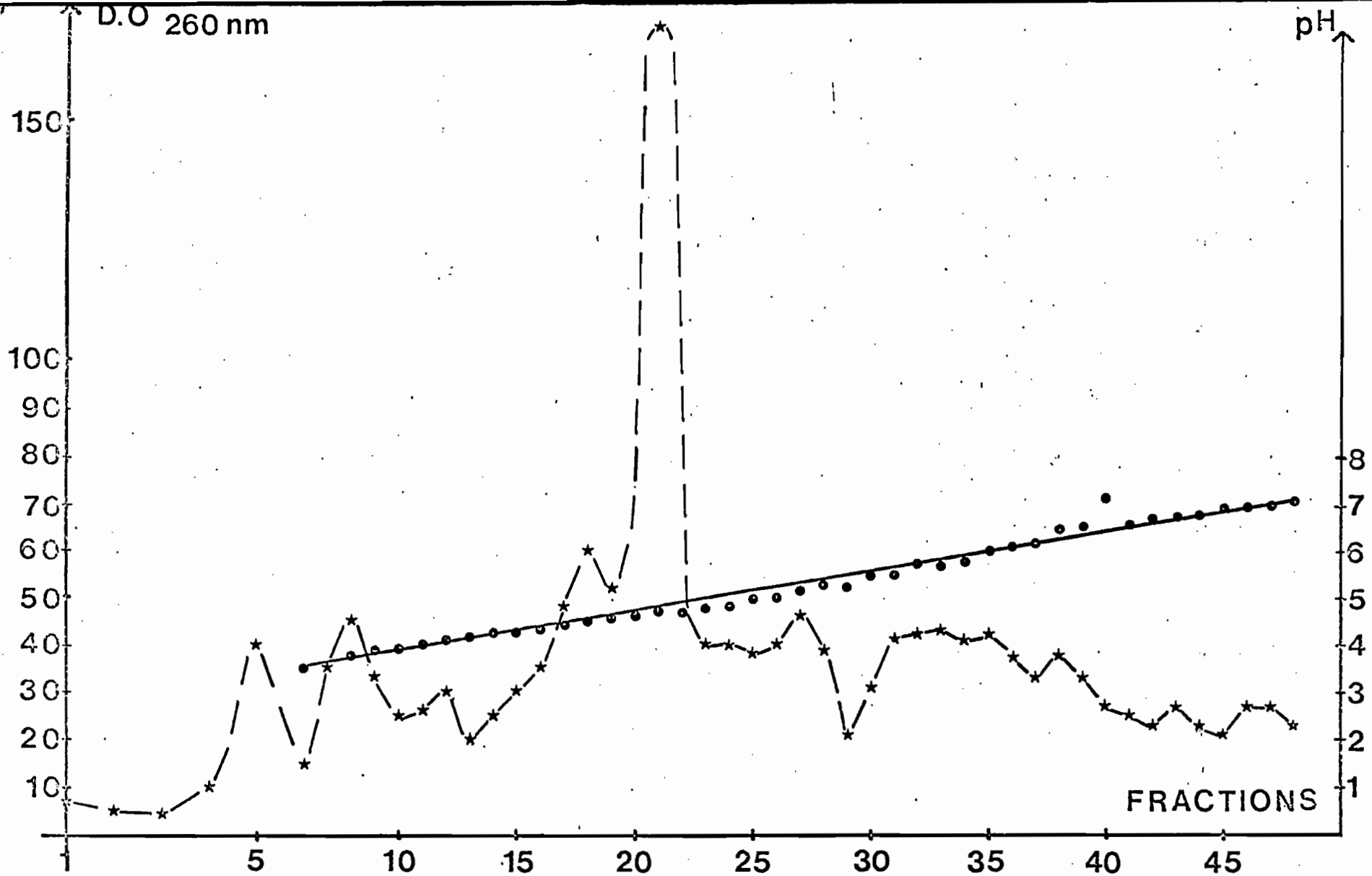


Figure n° 4: Détermination du point isoélectrique (pH_i) des particules virales par focalisation isoélectrique dans une colonne d'ampholine.

★: Densité optique (D.O) des fractions;
 ●: pH des fractions.

Poids moléculaire $\times 10^4$

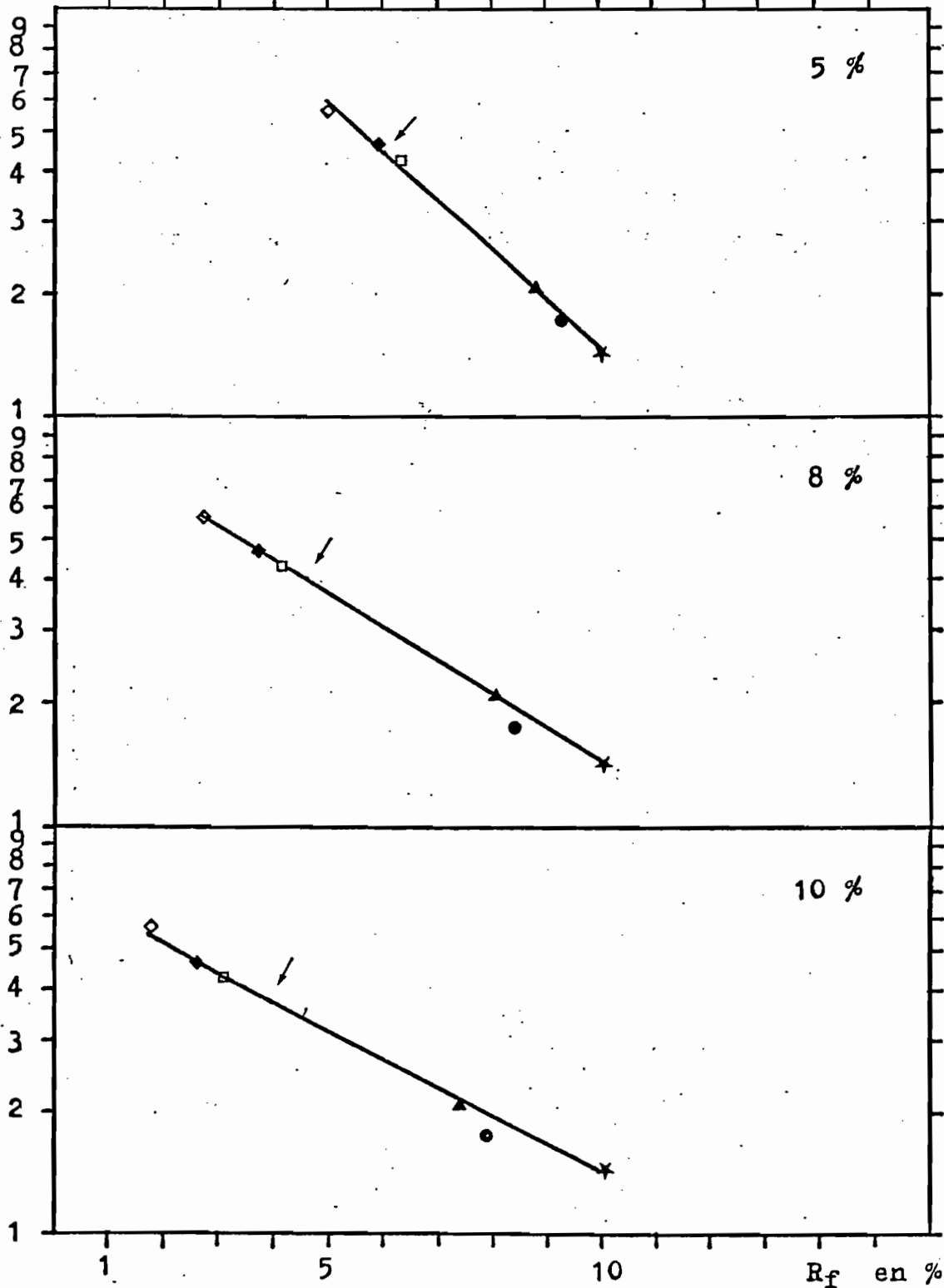


Figure n° 5: Détermination, pour différentes concentrations des gels en acrylamide, du poids moléculaire de la protéine capsidaire du Virus de la Mosaïque du Mil (\rightarrow).

Représentation graphique du $\text{Log}(\text{P.M.})$ en fonction de la R_f (mobilité relative d'une protéine par rapport à une protéine de référence).

Les protéines marqueurs utilisées sont:

- ◇: Pyruvate kinase P.M.= 57 000 d.
- ◆: Phosphoglycérate kinase P.M.= 47 000 d.
- : Ovalbumine P.M.= 43 000 d.
- ▲: Inhibiteur de la trypsine extrait du Soja P.M.= 21 000 d.
- : Protéine capsidaire du VMT P.M.= 17 500 d.
- *: Lysozyme (protéine de référence) P.M.= 14 400 d.

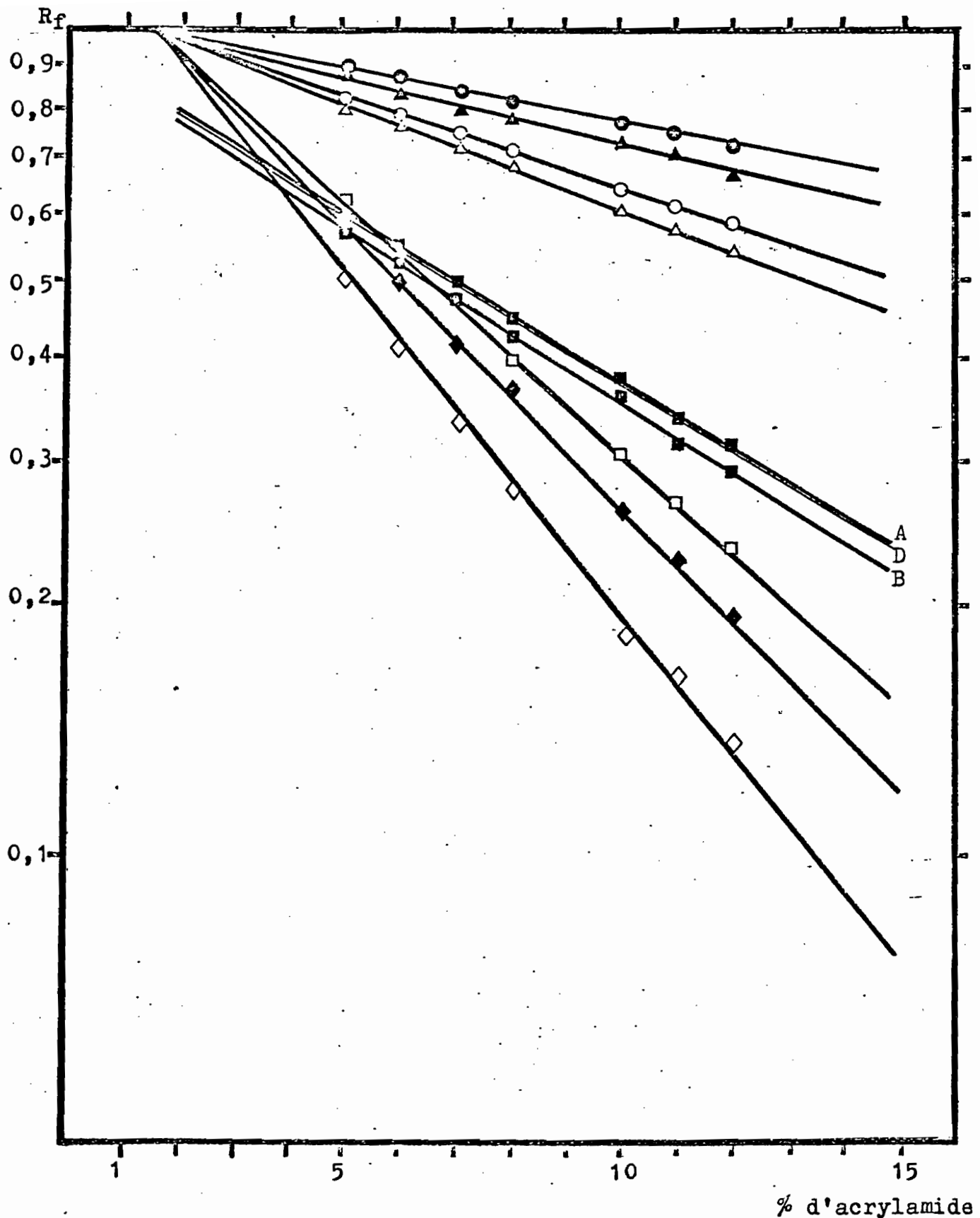


Figure n°6: Représentation graphique du $\text{Log}(R_f)$ en fonction de la concentration des gels en acrylamide.
 Les protéines figurées sont:

- : Protéine capsidaire du VMT
 - ▲ : Inhibiteur de la trypsine extrait du Soja
 - : Trypsine^(*) ; △ : α -chymotrypsinogène^(*)
 - : Ovalbumine ; ◆ : Phosphoglycérate kinase
 - ◇ : Pyruvate kinase
 - : Les protéines capsidaires des virus GGMV-A (A) , GGMV-B (B) et du Virus de la Mosaïque du Mil (D).
- Les résultats concernant les protéines marquées^(*) proviennent d'expériences antérieures, menées dans les mêmes conditions.

Pente $\frac{\Delta \text{Log}(R_f)}{\Delta \% \text{ acryl.}}$

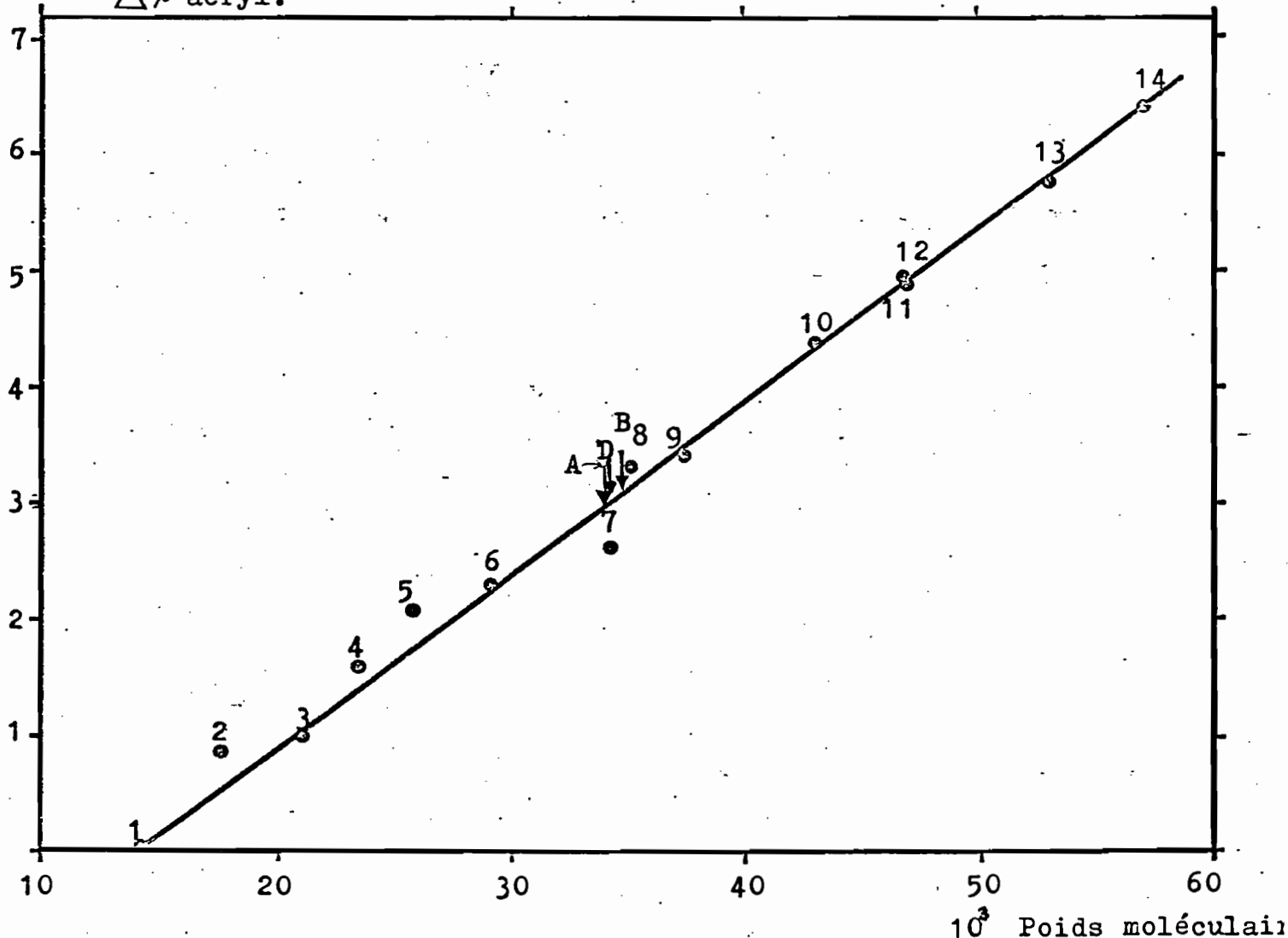


Figure n° 7: Détermination du poids moléculaire de la protéine capsidaires des virus GGMV-A (A), GGMV-B (B) et du virus de la Mosaïque du Mil (D) d'après la représentation graphique de la pente $\frac{\Delta \text{Log}(R_f)}{\Delta \% \text{ acrylamide}}$ en fonction du poids moléculaire.

Les protéines marqueurs représentées sont:

- 1: Lysozyme P.M.= 14 400 d.
- 2: Protéine capsidaire du VMT P.M.= 17 500 d.
- 3: Inhibiteur de la trypsine extrait du soja P.M.= 21 000 d.
- 4: Trypsine(*) P.M.= 23 300 d.
- 5: α chymotrypsinogène(*) P.M.= 25 700 d.
- 6: Anhydrase carbonique(*) P.M.= 29 000 d.
- 7: Carboxypeptidase(*) P.M.= 34 300 d.
- 8: Pepsine(*) P.M.= 35 000 d.
- 9: Alcool deshydrogénase de Levure(*) P.M.= 37 500 d.
- 10: Ovalbumine P.M.= 43 000 d.
- 11: Phosphoglycérate kinase P.M.= 47 000 d.
- 12: Ovalbumine P.M.= 47 000 d.
- 13: Glutamate deshydrogénase(*) P.M.= 53 000 d.
- 14: Pyruvate kinase P.M.= 57 000 d.

Les paramètres relatifs aux protéines marquées (*) proviennent d'expériences antérieures, menées dans les mêmes conditions.

Les flèches indiquent la position des protéines capsidaires des GGMV-A (A), GGMV-B (B) et du Virus de la Mosaïque du Mil

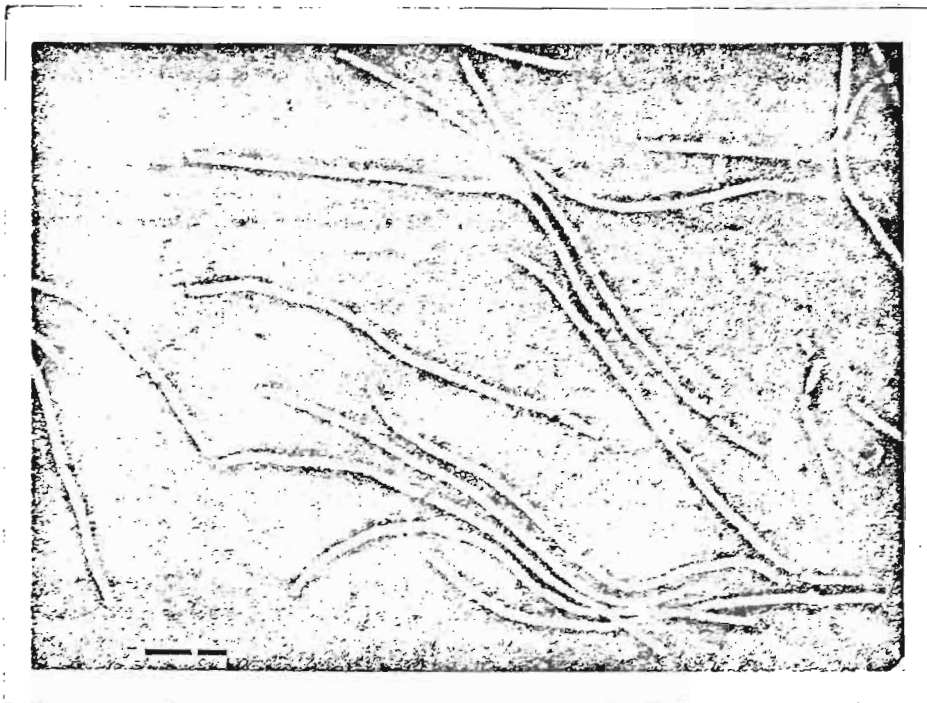


Figure n° 9 : Particules purifiées du Virus de la
Mosaïque du Mil photographiées au
microscope électronique après coloration
à l'acétate d'uranyle 1% .
Le trait représente 150 nm.

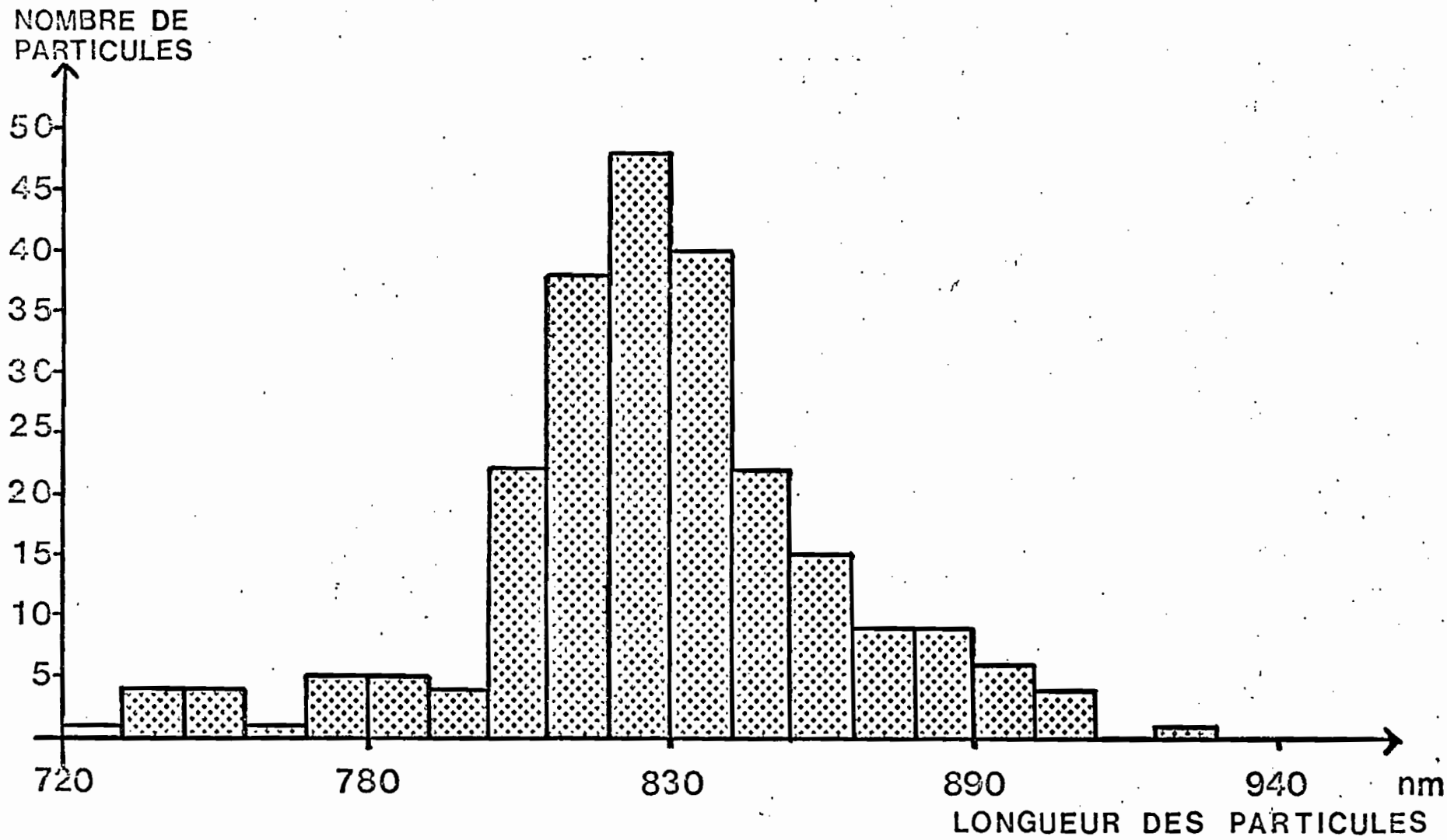


Figure n°10: Histogramme des longueurs déterminé à partir de photographies en microscopie électronique de solution virale purifiée.

100

100

100



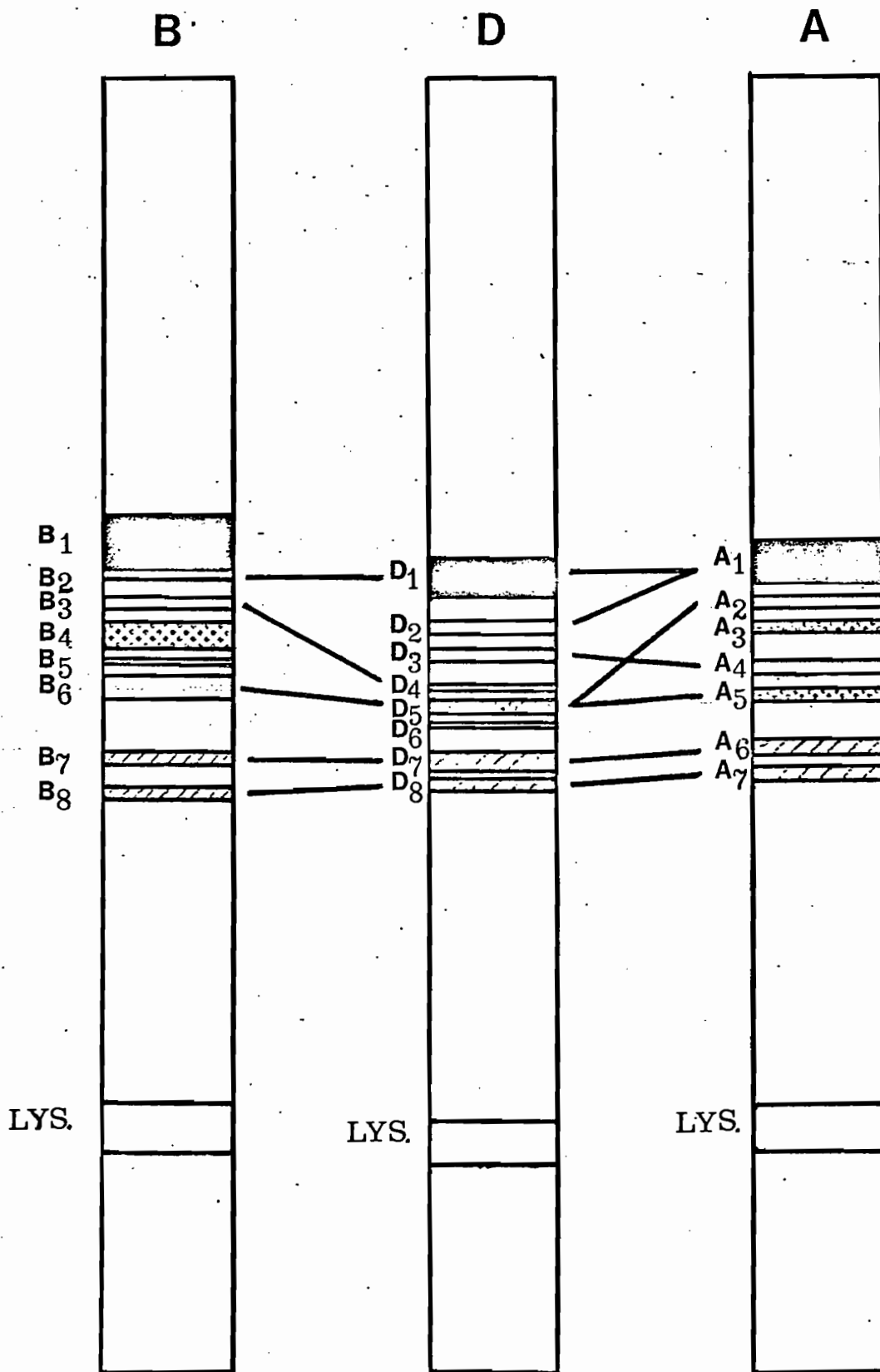


Figure n° 12: Représentation graphique de la position des protéines capsidaires des virus GGMV-A (A), GGMV-B (B) et du Virus de la Mosaïque du Mil (D) et de leurs différentes bandes de dégradation pour une concentration d'acrylamide de 8%.
 Les traits mettent en relation les bandes présentant le même poids moléculaire.

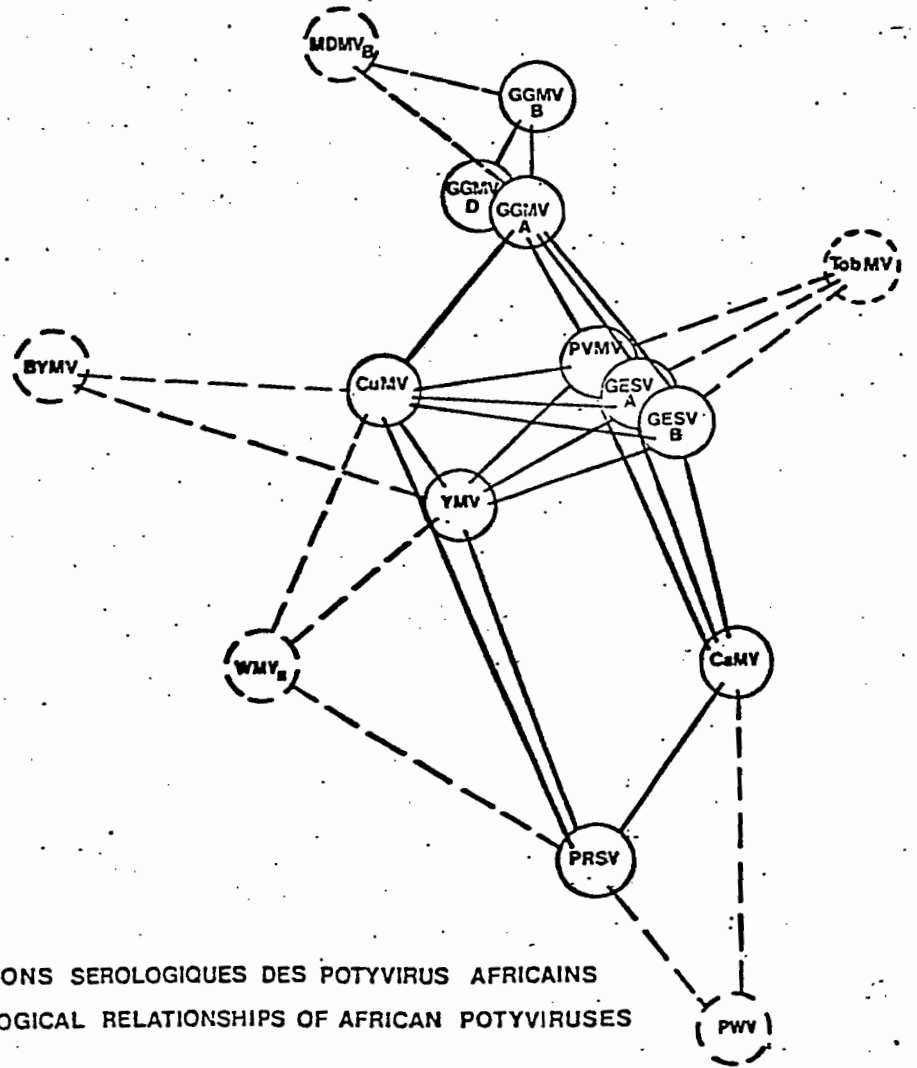


Figure n°13 : RELATIONS SEROLOGIQUES DES POTYVIRUS AFRICAINS
 SEROLOGICAL RELATIONSHIPS OF AFRICAN POTYVIRUSES

BIBLIOGRAPHIE

- CARPENTER, P.L. (1965).
Immunology and serology. 2nd ed. Saunders. Philadelphia.
- Commission des programmes de Côte d'Ivoire n° 4 (1980).
Thème : Les céréales, p. 99.
- EDWARDSON, J.R. (1966).
Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses.
Amer. J. Bot. 53, 4, 359-364.
- EDWARDSON, J.R., PURCIFULL, D.E. and CHRISTIE, R.G., (1968).
Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod-shaped viruses.
Virology 34, 250-263.
- EDWARDSON, J.R. (1974).
Some properties of the Potato Virus Y-group.
Florida Agricultural Experiment Stations Monograph, N° 4
Institute of food and agricultural Sciences. University of Florida. Gainesville.
- EDWARDSON, J.R. and CHRISTIE, G.R. (1978).
Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis.
Ann. Rev. Phytopathol. 16, 31-55.
- FAUQUET, C. and THOUVENEL, J.C. (1980).
Influence des potyvirus sur les cultures vivrières en Afrique de l'ouest.
Communication à la 2ème Conférence internationale sur l'impact des maladies virales sur le développement des pays africains et du Moyen orient, 1-6 déc., Nairobi, Kenya.
- HEDRICK, J.L. and SMITH, A.J. (1968).
Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis.
Arch. Bioch. Bioph., 126, 155-164.
- LAMY, D., THOUVENEL, J.C. and FAUQUET, C. (1979).
A strain of guinea grass mosaic virus naturally occurring on maize in the Ivory Coast.
Ann. Appl. Biol., 95, 37-40.
- LAYNE, E. (1954).
Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins.
in : S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN eds. Methods in Enzymology III, pp. 447-454.
New York Academic Press.
- MORGAN, C. and ROSE, W.M. (1967).
The application of thin sectioning. in : K. MARAMOROSCH and H. KOPROWSKI eds.
Methods in Virology III : 575-616. Academic Press, New-York.
- NOORDAM, D (1973).
Light scattering, pp 91-101. in : Identification of plant viruses. Methods and Experiments.
Centre for Agricultural Publishing and Documentation Wageningen.
- REBEYROTTE, P. & LABBE, J.P. (1969).
Application de la technique de focalisation électrophorétique à l'étude de la structure de certaines protéases. C.R. Acad. Sc. Paris, 268, 1125-1129.
- REGENMORTEL, M.H.V., Van ; HENDRY, D.A. and BALTZ, T. (1972).
A reexamination of the molecular size of cucumber mosaic virus and its coat protein.
Virology 49, 647-653.
- SLOGTEREN, D.H.M. Van (1955).
Serological microreactions with plant viruses under paraffin oil. Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases. LISSE-WAGENINGEN, 1954 : 51-54.
- SMITHIES, O. (1959).
Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins.
Adv. Prot. chem., 14, 65-113.
- SOBER, H.A. ; HARTLEY, R.W. Jr ; CARROL, W.R. and PETERSON, E.A. (1965).
Fractionation of proteins. In : H. NEURATH ed. "The Proteins III" pp. 2-91.
New York and London Academic Press.

- SWENSON, K.G. (1967).
Plant virus transmission by insects. In : K. MARAMOROSCH and H. KOPROWSKI (eds.).
Methods in Virology I : 267-308. Academic Press. New York.
- THOUVENEL, J.C. ; GIVORD, L. and PFEIFFER, P. (1976).
Guinea Grass mosaic Virus, a new member of the Potato virus Y Group. *Phytopathology*,
954-957.
- THOUVENEL, J.C.; FAUQUET, C. and LAMY, D. (1978).
Guinea Grass Mosaic Virus. *Descriptions of Plant Viruses*. CMI/AAB n° 190.
- TUNG, J.S. and KNIGHT, C.A. (1971).
Effect of charge on the determination of molecular weight of proteins by gel electrophoresis
in SDS.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 1117-1121.
- VEKEN, J.A. Van der ; SLOGTEREN, D.H.M. Van and WANT, J.P.H. Van der (1962).
Immunological methods. In : H.F. LINSKENS and M.V. TRACEY (eds).
Modern methods of plant analysis. 5 : 422-463. Springer, Berlin.
- WEBER, K. and OSBORN, M. (1969).
The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel
electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.