

ETIOLOGIE DE LA MOSAIQUE AFRICAINE DU MANIOC (CMD) AU NIGERIA

ROSSEL, H.W., THOTTAPPILLY, G.,
VAN LENT J.M.W.⁽¹⁾ & HUTTINGA, H.⁽²⁾
Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA), PMB 5320,
IBADAN, NIGERIA

INTRODUCTION

Après les toutes premières études réalisées sur l'étiologie du CMD par Storey et Nichols (1930) et Chant (1958), et l'analyse approfondie des vecteurs de la maladie, la recherche menée depuis de nombreuses années sur ce virus en Afrique n'a pas permis d'élargir le domaine de nos connaissances et, par conséquent, de corroborer les hypothèses émises quant à l'étiologie de cette affection.

Les maladies transmises par les aleurodes sont souvent considérées comme virales, bien qu'elles ne soient généralement pas transmissibles par inoculation mécanique. En effet, à une exception près, le CMD n'a jamais pu être inoculé de cette manière (Bock, 1978). Des essais de transmission de l'*Euphorbia mosaic* par inoculation mécanique réalisés à grand-peine au Brésil ont été néanmoins couronnés de succès (Costa et Bennett, 1950). Plus tard, ce virus a pu être inoculé à plusieurs autres espèces de plantes-tests. Il a été également transmis à d'autres hôtes naturels et isolé à nouveau à partir de ceux-ci (notamment le haricot *Phaseolus vulgaris*) (Costa, 1965). En général, les maladies portées par les aleurodes se transmettent difficilement par inoculation mécanique sauf pour une affection du concombre en Israël (Cucumber vein yellowing) (Cohen et Nitzany, 1960) et le *Cowpea mild mottle virus* (Brunt et Kent, 1973).

La "golden mosaic" du haricot cultivé en Amérique Centrale et du Sud, constitue une autre exception à la règle (Bird *et al.*, 1975). On a pu obtenir, dans certains cas, des taux élevés de transmission par inoculation mécanique, surtout lorsqu'un certain nombre de conditions étaient réunies, comme la sélection d'une plante-test adéquate (Goodman *et al.*, 1977). Ceci explique peut-être pourquoi, lors d'expériences antérieures menées au Brésil, on n'a pu inoculer la golden mosaic au haricot par inoculation mécanique (Costa, 1965). En général, la plante d'où est extrait le virus, ainsi que la plante-test utilisée pour les tentatives d'inoculation, jouent un rôle primordial dans la transmission par inoculation mécanique de ces agents pathogènes.

Bock et Guthrie (1976) de l'Institut de recherches agronomiques du Kenya (Kari) (anciennement Eaafro), de Nairobi (Kenya), ont été les premiers à réaliser et à signaler la transmission par inoculation mécanique d'un agent pathogène, prélevé sur du manioc affecté par le CMD, à *N. clevelandii*. La maladie a été ensuite transmise de cette plante-test à d'autres solanacées. Les toutes premières tentatives de rétro-inoculation du virus au manioc afin d'en déterminer l'étiologie se sont soldées par un échec. On peut dès lors en déduire que l'affection est due à un virus latent (CLV), et non pas au virus qui est à l'origine du CMD (Bock *et al.*, 1978). Or, il semblerait qu'aucun nouveau prélèvement du virus à partir de manioc inoculé n'ait été effectué afin d'établir avec certitude le phénomène de latence.

(1) Adresse actuelle : Agricultural University Wageningen, Department of Virology, Binnenhaven 11, Wageningen, The Netherlands.

(2) Adresse actuelle : Research Institute for Plant Protection (IPO), Binnenhaven 12, Wageningen, The Netherlands.

D'autres preuves visant à soutenir l'hypothèse du virus latent semblent s'être ajoutées à la suite d'expériences menées au Kenya sur la transmission de la maladie. En effet, on n'a pu obtenir des isolats du CMD chez tous les plants de manioc virosés. D'autres tentatives de prélèvement sur du matériel en provenance de la région située à l'est de la vallée du Rift n'ont d'ailleurs donné aucun résultat (Bock *et al.*, 1978).

Par la suite, Bock et Guthrie (1978) ont réussi à transmettre le CMD par inoculation mécanique au manioc au moyen de pieds de manioc indicateurs issus de boutures de deux clones sud-américains particulièrement sensibles. Aucune autre transmission de ce genre n'a été signalée à ce jour.

En 1978 (IITA, 1979; Huttinga et Rossel, non publié), des chercheurs de l'IITA ont pu isoler une particule géminée à partir de manioc infecté par le CMD en inoculant le virus par inoculation mécanique à *Nicotiana benthamiana*. Ce dernier a exhibé des symptômes prononcés, caractéristiques de la maladie dans les 7 à 10 jours qui ont suivi l'inoculation. Le virus a été par la suite transmis de *N. benthamiana* à plusieurs autres plantes-tests de la famille des solanacées, dont *N. glutinosa*, *N. tabacum* "Samsun NN", "White Burley", et "Xanthii n.c.", *N. clevelandii* x *glutinosa*, ainsi qu'à *N. clevelandii* qui, pour la première fois, a pu être utilisé avec succès par Bock *et al.*, (1976) afin d'isoler une particule géminée à partir de manioc contaminé par le CMD (IITA, 1979; Rossel et Huttinga, non publié). Des isolats de virus semblables, voire identiques, ont été obtenus à l'IITA à partir de *Manihot glaziovii*, une adventice commune et rustique qui est en fait un vestige des anciennes cultures laticifères pratiquées dans le sud-ouest du Nigéria. Les symptômes qu'elle manifeste rappellent ceux du CMD du manioc. Pareillement, l'inoculation routinière à *N. benthamiana* d'un virus prélevé sur des plants de *Laportea aestuans* (L.) Chew (autrefois appelé *Fluerya aestuans* L.), une adventice commune, a permis l'obtention d'isolats identiques à ceux du manioc et de *Manihot glaziovii* infectés par le CMD.

Depuis peu, des isolats de virus semblables à ceux obtenus sur du manioc contaminé, pour ce qui est des réactions observées sur *N. benthamiana*, ont pu être prélevés sur *Sechium edule* (Jacq.) Swartz (Fam. Cucurbitaceae). A l'IITA, les plants de cette espèce manifestent souvent de graves symptômes à une maladie d'apparence virale (Thottappilly, non publié).

A l'ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire), Walter (1980) a réussi à transmettre par inoculation mécanique des particules jumelées obtenues sur manioc et *Manihot glaziovii* contaminés en utilisant *N. benthamiana* comme plante-test. Les tentatives de rétro-inoculation de l'isolat au manioc n'ont pas eu plus de succès que celles entreprises à l'IITA. Seuls Bocks et Woods (1983) ont réussi au Kenya à rétro-inoculer le virus autrefois appelé *Cassava latent virus* (virus latent du manioc) (CLV) au manioc, et ce à partir de *N. benthamiana*. Ils ont pu conclure que le CLV était en fait à l'origine du CMD. Les difficultés apparentes auxquelles les chercheurs ont été confrontés lors des expériences précédentes de rétro-inoculation du virus au manioc peuvent être attribuées au faible niveau d'infectiosité des isolats. En effet, seules les préparations concentrées et partiellement purifiées obtenues à partir de *N. benthamiana* ont permis une contamination efficace du matériel végétal.

Les études signalées dans le présent article ont été entreprises afin de faciliter la compréhension de l'étiologie du CMD en Afrique, au Nigéria en particulier.

MATERIEL ET METHODES

Le manioc contaminé provient des parcelles d'essai du siège principal de l'IITA, à Ibadan, et des champs d'agriculteurs répartis dans différentes régions du Nigéria. Les boutures ont été prélevées sur des plants apparemment virosés. Celles-ci ont été ensuite plantées en pots puis placées en serre à l'abri des insectes.

Des échantillons de *M. glaziovii*, espèce adventice du genre *Manihot*, ont été prélevés sur la végétation naturelle de l'IITA et de la région. Les plants infectés de *L. aestuans* et *Sechium edule* provenaient des champs de l'Institut. Jusqu'à ce jour, on n'a rencontré que deux cas d'infection chez *L. aestuans*, une adventice commune. Tous les tests d'inoculation mécanique étaient réalisés à l'aide d'une solution tampon de phosphate 0,01 M, contenant de la cystéine 0,001 M à laquelle on avait mélangé du mercaptoéthanol (0,1%) juste avant l'inoculation. On a également utilisé du carborundum comme abrasif (600 mesh).

Les mortiers, pilons et solutions tampons ont été au préalable refroidis, à une température d'environ 0°C. La production des plantes-tests ainsi que l'inoculation ont eu lieu à l'abri des insectes, dans une serre conçue à l'IITA et dont le régime thermique se rapproche des conditions ambiantes durant la journée (Rossel, 1982). Les plants de manioc sains utilisés pour les expériences proviennent de semences récoltées sur les cultivars nigériens particulièrement sensibles et améliorés localement (*60444* et *60506*), ainsi que d'autres semences produites en Amérique du Sud. Les plantules de *L. aestuans* utilisées comme plantes-tests sont issues de semences des deux seuls plants infectés de cette espèce d'adventice que l'on ait rencontrés à ce jour. Les plantules de *Manihot glaziovii*, également employées comme plantes-tests, proviennent de semences d'adventices poussant généralement à la lisière des forêts de l'IITA.

PURIFICATION, ANALYSE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE ET SEROLOGIE

Plusieurs lots (100 g) de plants de *N. benthamiana* infectés artificiellement et récoltés 12 à 15 jours après l'inoculation, sont par la suite homogénéisés à l'agitateur, dans une solution de 300 ml de citrate de sodium 0,01 M, contenant de l'EDTA 0,004 M, de l'acide thioglycolique (0,1%) et du sulfite de sodium (0,1%).

L'extrait homogénéisé est mélangé à 100 ml de chloroforme. L'émulsion est ensuite séparée par centrifugation, à 7.700 g durant 10 minutes. On mélange à la couche aqueuse 6% de PEG (6000) et 1% de NaCl. La solution est ensuite remuée pendant 1 heure à 4°C, et le précipité recueilli par centrifugation au rotor Sorvall GSA pendant 15 minutes, à 10.000 tr/mn. Le culot est remis en suspension dans du citrate 0,01M, utilisé comme tampon pH 7, auquel on ajoute de l'EDTA 0,004 M. L'extrait est centrifugé pendant 10 minutes à 10.000 t/mn au rotor Sorvall SS-34, et le surnageant de nouveau centrifugé pendant 3 heures, à 78.000 g. Le culot est remis en suspension dans une solution tampon de citrate 0,005 M, pH 7,4, additionnée d'EDTA 0,004 M, et centrifugée pendant 10 minutes à 10.000 tr/mn.

Le surnageant est ensuite disposé sur des gradients de sucrose linéaires (de 10 à 40%), dans du citrate 0,005 M utilisé comme tampon, pH 7,4, auquel on mélange de l'EDTA 0,004 M. Les gradients sont centrifugés pendant 4 heures et demie à 25.000 tr/mn au rotor Beckman SW 27. Des fractions de virus sont récoltées, diluées dans une solution tampon et centrifugées pendant 4 heures à 78.000 g. Les culots sont remis en suspension dans du citrate 0,005 M, pH 7,4, mélangés à de l'EDTA 0,004 M et centrifugés pendant 10 min. à 10.000 tr/mn. Les préparations virales sont examinées au microscope électronique Philips EM-201C, après avoir été colorées au phosphothungstate de sodium (2%), pH 7. On distingue dès lors plusieurs particules de virus jumelées. Celles-ci sont également utilisées pour l'analyse de l'infectiosité et les études sérologiques (IITA, 1983 ; Van Lent, non publié ; IITA 1985, Thottappilly, non publié).

Lors de tests de diffusion dans le gel d'agar, les préparations purifiées réagissent fortement à l'antisérum préparé pour le *Cassava latent virus* (Virus latent du manioc) (CLV) (Antisérum pour le CLV offert par Bock, K.R.), rebaptisé plus tard African cassava mosaic virus (Virus de la mosaïque africaine du manioc) (ACMV) (Bock et Woods, 1983).

Des antisérums spécifiques titrant 1/128 - 1/256 (au cours de tests de diffusion dans le gel

d'agar) sont préparés à partir d'isolats de virus obtenus à l'IITA. Les antisérums réagissent au virus purifié, ainsi qu'au jus de *N. benthamiana* infecté n'ayant subi aucun traitement préalable (IITA, 1983; Van Lent, non publié; IITA, 1985; Tottappilly, non publié). La méthode immunoenzymatique (Elisa), mise au point à l'aide d'un antisérum obtenu à l'IITA, est généralement utilisée pour indexer les nouvelles variétés améliorées à l'Institut qui, par la suite, seront expédiées sous forme de culture *in vitro* aux collaborateurs des différents pays africains. Cette méthode permet, dans le cas du manioc, de détecter le virus au moyen de dilutions titrant jusqu'à 1/625, 1/3.125 (IITA, 1985 ; Tottappilly, non publié).

Jusqu'à présent, il semble qu'aucune autre maladie virale ou autre type de virus, sérologiquement indétectable à l'aide de cet antisérum (Séqueira et Harrison, 1983), n'infecte les champs de manioc du Nigéria.

SYMPTOMATOLOGIE DES PLANTES TESTS

Lorsque l'on utilise la plante-test *N. benthamiana*, sensible à une large gamme de virus, pour des expériences de transmission par inoculation mécanique à l'aide d'échantillons de manioc contaminés manifestant les symptômes caractéristiques du CMD, toutes les plantes-tests exhibent généralement des signes graves d'infection dans les 2 à 3 semaines qui suivent l'inoculation (IITA, 1979; Huttinga et Rossel, non publié). Au stade initial, la plante présente des symptômes d'épinastie et d'enroulement des jeunes feuilles en pleine croissance. Ce phénomène se produit d'habitude 7 jours environ après l'inoculation. Chez *N. benthamiana*, les symptômes peuvent, à un stade plus avancé, prendre des proportions assez considérables. On peut facilement les décrire comme une combinaison de frisolée, de rabougrissement foliaire et de mosaïque jaune.

N. clevelandii, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* x *glutinosa*, *N. tabacum* vars. "White Burley", "Samsun NN" et "Xanthii n.c.", après contamination à partir de *N. benthamiana* infecté, présentent les mêmes symptômes caractéristiques d'épinastie et d'enroulement des feuilles, un phénomène jamais observé chez les autres maladies virales actuellement étudiées à l'IITA. Notons cependant que l'affection semble se résorber à un stade plus avancé. Outre *N. benthamiana*, l'inoculation de plusieurs espèces de *Nicotinana* à l'aide d'échantillons prélevés sur du manioc malade ne s'est avérée concluante que chez *N. clevelandii* et *N. clevelandii* x *glutinosa*.

EXPERIENCES -ETIOLOGIE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

I. Lors d'une expérience de routine, 20 échantillons prélevés au hasard dans la collection vivante de matériel génétique du manioc de l'IITA ont été inoculés chacun à 5 plants de *N. benthamiana*. Le matériel utilisé pour la contamination consistait en 10 extrémités apicales de plants manifestement atteints par l'affection, et de 10 extrémités apicales analogues prélevées sur des plants apparemment sains. A part quelques exceptions, tous les plants de *N. benthamiana* contaminés par les échantillons virosés ont manifesté des symptômes graves et caractéristiques de la maladie. En revanche, tous les plants inoculés à partir des échantillons apparemment sains sont restés indemnes.

Ia. Dans le cadre d'une autre expérience de routine, 14 boutures apicales ont été prélevées dans un champ récemment établi, destiné à la multiplication d'un clone de manioc amélioré de l'IITA et modérément résistant au CMD ("4 (2)1425"). De ces 14 échantillons, 10 provenaient de rameaux latéraux ou apicaux indemnes prélevés sur des plants présentant des signes extérieurs de la maladie. Les quatre autres sommets apicaux étaient, quant à eux, ostensiblement atteints par le virus. Les plants de *N. benthamiana* contaminés à l'aide de ces quatre échantillons ont tous manifesté des symptômes saillants, caractéristiques de la maladie. Par contre,

l'inoculation s'est avérée concluante uniquement dans un seul des 10 lots de *N. benthamiana* contaminés au moyen des échantillons apparemment sains, où deux plants sur cinq ont présenté les symptômes caractéristiques du virus.

Iib.**** Pareillement, lors d'une expérience visant à isoler l'ACMV sur des plants de manioc soumis pendant 9 semaines à un traitement thermique (45°C) en milieu contrôlé, l'inoculation d plants de *N. benthamiana* (3 lots de 10 plants), à partir de sommets apicaux de 3 plants de manioc ainsi traités, s'est soldée par un échec. Notons que les feuilles supérieures du manioc ne présentaient aucun signe apparent du CMD au moment du prélèvement des échantillons destinés à l'inoculation.

III. Dans une étude comparable à la précédente, on a procédé au repiquage en serre de jeunes pousses de manioc apparemment saines, et prélevées sur différents plants du même clone ("4(2)1425"), dans le but d'évaluer l'expression même du virus. A l'origine, et si l'on se réfère aux symptômes observés à la base des plants, le manioc utilisé pour l'échantillonnage était sans conteste infecté par le CMD. De nouveaux plants ont été établis à partir de 5 de ces jeunes pousses. Celles-ci mesuraient chacune environ 20 cm.

Quatre de ces plants n'ont présenté aucun symptôme durant la période d'observation (9 mois). En revanche, le cinquième a manifesté des signes apparents de la maladie en cours de croissance, mais uniquement sur les trois premières feuilles. Les autres feuilles, quant à elles, étaient indemnes. Après la période d'observation de 9 mois, les cinq plants ont été finalement élagués pour le clonage. Les nouvelles boutures ont été repiquées. Les sommets apicaux des cinq plants ont fait l'objet de tests par inoculation à *N. benthamiana*. Comme aucun symptôme ne s'est manifesté chez ces plantes-tests, on a pu conclure qu'elles étaient exemptes de virus.

Le matériel végétal produit à partir des quatre plants de manioc indemnes n'a présenté aucun signe apparent de la maladie. Seules trois boutures prélevées sur le plant ayant produit les trois feuilles symptomatiques ont manifesté des symptômes après la reprise. Les trois boutures en question avaient été prélevées à la base des tiges du plant. Il semble dès lors que le virus n'exerce aucune action systémique sur le manioc. On observe, chez ce dernier, une forte tendance à résoudre l'affection en cours de croissance.

Les plantes-mères ont été conservées après l'élagage afin d'observer leur reprise. Elles ont par la suite produit deux ou trois pousses. Trois plants ont manifesté des symptômes de la maladie sur certaines feuilles des nouveaux jets : le virus infectait une pousse sur trois chez le premier plant, deux sur trois chez le deuxième, et deux sur deux chez le troisième. Les deux derniers plants sont restés indemnes. Ceci tend à prouver que le virus existe à l'état de dormance chez certains bourgeons (en repos végétatif), et qu'il peut être carrément absent dans d'autres pousses de la même bouture.

IV. Au cours d'une expérience visant à déterminer la répartition géographique du CMD au Nigéria, tout en accordant une attention particulière à la possibilité d'isoler une particule géminée sur des plants infectés au moyen de *N. benthamiana*, des boutures ont été prélevées sur du manioc contaminé dans plusieurs zones écologiques du Nigeria. Des échantillons de plants offrant des symptômes caractéristiques du virus ont été récoltés dans la partie la plus méridionale du pays (région de Port Harcourt), une zone de bas-fonds au climat tropical humide, jusqu'au Nord du pays, et plus exactement dans la région de Kano qui jouit d'un climat de savane soudanaise. L'inoculum extrait des pousses infectées produites par les boutures repiquées en serre a permis l'inoculation du virus à *N. benthamiana*. L'efficacité de la transmission était générale, puisque les différents plants, tous lots confondus, ont présenté les symptômes caractéristiques de la maladie.

V. Des essais ont également été réalisés afin d'isoler le virus sur des feuilles plus âgées, prélevées sur des plants infectés de "60444", un cultivar particulièrement sensible offrant généralement des symptômes graves et caractéristiques du CMD sur chacune des feuilles. Au cours de l'expérience, le virus n'a pu être transmis à *N. benthamiana* à l'aide de l'inoculum

extrait de feuilles arrivées au terme de leur développement, et situées à environ 10 cm au-dessous du sommet apical.

Le virus a pu être facilement isolé sur les parties apicales de ces plants, à savoir sur les derniers centimètres de l'apex, y compris les jeunes feuilles en pleine croissance. Néanmoins, l'obtention de l'isolat a posé beaucoup plus de difficultés sur les jeunes feuilles immatures de la zone apicale (cf. tableau 1).

Source de l'inoculum	Nombre de plants inoculés	Nombre de plants infectés
Sommets apicaux	a. 5	a. 5 sur 5
	b. 5	b. 5 sur 5
Jeunes feuilles, au développement incomplet, environ 2 cm au-dessous de l'apex	a. 5	a. 1 sur 5
	b. 5	b. 2 sur 5
Feuilles parfaitement développées, environ 10 cm au-dessous de l'apex	a. 5	a. 0 sur 5
	b. 5	b. 0 sur 5

Tableau 1 : Influence de la position des feuilles sur la transmissibilité de la particule géminée isolée sur du manioc infecté par le CMD à *N. benthamiana*

VI. Au cours d'inoculations routinières au départ d'adventices infectées par le virus à *N. benthamiana*, on a remarqué que l'inoculum de deux plants de *L. aestuans* provoquait les symptômes caractéristiques du CMD, du moins en apparence. Ceux-ci étaient analogues à ceux observés sur le manioc contaminé. Dans le cadre d'une étude plus approfondie sur les hôtes potentiels du virus, les deux isolats prélevés sur *L. aestuans* ont été inoculés aux mêmes solanacées que celles utilisées pour tester l'inoculum extrait du manioc. Les symptômes observés étaient identiques.

Toutes les tentatives visant à inoculer les isolats de *L. aestuans* et ceux du manioc aux plantules de *L. aestuans* n'ont donné, jusqu'à ce jour, aucun résultat concluant.

Pareillement, on n'a pu procéder à la rétro-inoculation du virus isolé sur *Schedium edule* à cette même cucurbitacée.

VII. Dans le cadre d'une autre expérience, 10 échantillons infectés et 10 échantillons apparemment sains ont été prélevés au hasard sur des clones améliorés de manioc résistant au CMD (ex. TMS 30573, TMS 50395, TMS 30001). Les isolats ont été transmis à *N. benthamiana*. On a pu remarquer que l'inoculation du virus obtenu sur les pousses manifestement atteintes par l'affection induisait des symptômes caractéristiques. Les résultats de cette expérience étaient similaires à ceux obtenus précédemment à partir d'échantillons de clones sensibles au CMD.

VIII. La particule géminée isolée sur du manioc infecté par le CMD a été rétro-inoculée au manioc. La contamination était néanmoins limitée (IITA, 1984, 1985; Rossel, non publié; Rossel et Thottappilly, 1984, 1985). De meilleurs résultats ont été obtenus avec des populations de plantules en provenance d'Amérique du Sud (cf. tableau 2). On a notamment sélectionné un clone (n°207) dont l'incidence d'infection atteignait un taux constant d'environ 10% après l'inoculation de jus de sève brut de *N. benthamiana* virosé. Le clone a été cultivé dans les abris du département de virologie de l'IITA, à l'abri de tout insecte. Les chercheurs intéressés par ce clone peuvent adresser leur demande aux auteurs. Le matériel végétal est disponible sous forme de culture *in vitro*.

Origine des plantules de manioc utilisées comme plantes-tests	Nombre de plantules inoculées	Nombre de plantules infectées
"60444" (cultivar local)	20	0
"60444"	18	0
"60506 O.P."3 (cultivar local)	15	0
"60506 O.P."	20	2
"60506 O.P."	20	0
"60506 O.P."	50	1
"Amérique latine" (mélange de plusieurs sources)	57	7

Tableau 2 : Résumé des résultats obtenus après rétro-inoculation au manioc d'isolats prélevés sur *N. benthamiana* infecté par la particule géminée extraite de plants de manioc contaminés par le CMD

IX. Des différences énormes ont été observées entre les espèces de *Nicotiana* quant à leur susceptibilité et/ou leur sensibilité à la particule géminée isolée sur le manioc au moyen de *N. benthamiana* (cf. tableau 3).

		Inoculé/infecté
15	<i>N. benthamiana</i>	15/15
20	<i>N. tabacum</i> "Samsun NN"	15/15
5	<i>N. glutinosa</i>	5/5
10	<i>N. tabacum</i> "Xanthii n.c."	17/20
10	<i>N. clevelandii</i> x <i>glutinosa</i>	4/10
5	<i>N. clevelandii</i>	2/5
5	<i>N. tabacum</i> "White Burley"	1/10
5	<i>N. megalosiphon</i>	0/5
5	<i>N. rustica</i>	0/5

* Inoculum préparé à partir de *N. benthamiana* infecté.

Tableau 3 : Etude comparative des différentes espèces de *Nicotiana* pour leur capacité à s'infecter après inoculation de la particule géminée isolée sur le manioc et conservée chez *N. benthamiana*.

X. Les isolats obtenus sur *M. glaziovii*, *L. aestuans* et *Sechium edule* ont été testés à l'aide d'un antisérum préparé pour un isolat du manioc. Leur parenté sérologique avec le virus en question était évidente. En effet, on a pu observer la formation de lignes de précipité infléchies et confluentes (spécifiques) au cours de tests de diffusion dans le gel d'agar, en présence de préparations virales concentrées obtenues à l'IITA à partir des isolats de ces trois espèces. Seuls les isolats de *Sechium edule* ont induit la formation d'un éperon.

METHODES DE LUTTE

D'après plusieurs études menées précédemment par E. Terry sur l'épidémiologie du CMD (IITA 1978, 1979, 1980; Terry, non publié), l'infection virale a pris une telle ampleur à Ibadan que son incidence atteint presque 100% au cours des trois premiers mois qui suivent la plantation en mai, c'est à dire en début de campagne.

Néanmoins, les cultivars résistants (ex. "30395") n'échappent pas à la maladie, quoiqu'en général le taux d'infection reste à un niveau peu élevé (environ 20% dans le cas de "30395"). Malgré la propagation végétative et le taux d'infection élevé, le pourcentage de contamination reste limité chez ces mêmes cultivars. D'après les résultats des recherches menées sur le clonage de plants capables de résorber l'affection en cours de croissance, un équilibre semble se créer entre, d'une part les plants initialement virosés et capables de surmonter la maladie ("auto-guérison") et, d'autre part, le nombre limité de plants réinfectés. Donc, seule une partie des boutures prélevées sur les plants infectés de clones résistants provoqueront une première contamination chez toute culture nouvellement établie. L'épuration de ces variétés ne sera pas nécessaire. Cette opération s'avérerait inutile puisque, contrairement aux variétés sensibles, la réinfection de ces clones résistants reste particulièrement limitée. En outre, la plupart des plants manifestant dans un premier temps des symptômes de la maladie, finissent par la surmonter. Ces faibles taux de réinfection semblent être dus à l'efficacité du mécanisme de résistance chez ces variétés.

CONCLUSIONS

Les recherches de l'IITA corroborent celles menées au Kenya par Bock et Woods (1983) sur le *cassava latent virus* (CLV), à savoir que la particule géminée isolée sur du manioc infecté par le CMD au Nigéria peut être rétro-inoculée au manioc, causant ainsi les mêmes symptômes que ceux observés en champ. Cette rétro-inoculation n'est pas particulièrement aisée. En fait, la maladie a été transmise au manioc par du jus de sève brut de *N. benthamiana*. Les résultats des recherches laissent peu de doute quant à la nature infectieuse du CLV, d'autant que, dans le cas présent, les plantules contaminées proviennent de graines fertiles, semées à l'abri de tout insecte. De surcroît, le virus a été transmis par la sève, à l'aide de jus de *N. benthamiana* infecté n'ayant subi aucun traitement préalable. Les semences proviennent de cultivars sud-américains et locaux (du Nigéria).

La réussite de la rétro-inoculation au manioc semble être tributaire du génotype (sensibilité ?) des plantes-tests utilisées. Néanmoins, les différences d'infectiosité observées parmi les isolats peuvent également revêtir une certaine importance. Bock et Woods (1983), dans leurs recherches sur la transmission virale (leurs inoculums sont d'ailleurs des préparations concentrées et partiellement purifiées de *N. benthamiana*), ont utilisé comme plantes-tests des clones d'un cultivar de manioc originaire d'Amérique du Sud ("N Mex 55"), *N. benthamiana*, qui lors des expériences précédentes s'est avéré un hôte sensible pour l'isolement du virus, (IITA 1979, Huttinga et Rossel, non publié), et constitue apparemment une plante-test particulièrement réceptive. En effet, à l'IITA, on peut facilement obtenir un taux d'infection de 100% tant que les inoculums sont préparés à l'aide d'isolats prélevés sur les sommets apicaux, et que la contamination s'opère dans des conditions optimales. Notons que le matériel végétal

infecté en provenance des différentes régions du Nigéria a permis, dans tous les cas, une transmission efficace du virus à *N. benthamiana*. Cette plante-test a manifesté exactement les mêmes symptômes caractéristiques. En revanche, Bock et Guthrie n'ont pu transmettre le virus à *N. clevelandii* à partir de matériel végétal infecté originaire de la côte kényane. Il semble dès lors que *N. clevelandii* fasse la différence entre plusieurs "souches" du même virus.

La transmission ne peut s'effectuer que lorsque l'on utilise, comme inoculum, les isolats prélevés sur les pousses apicales et latérales des plants exhibant des symptômes de la maladie. En revanche, la contamination n'a pas lieu lorsque les isolats sont prélevés sur les sommets apicaux des plants ne manifestant aucun signe extérieur de l'affection, ou sur les tiges apparemment saines des plants virosés (II). Il semble que le virus ait un taux d'incidence assez limité au sein même des plants de manioc contaminés. Les résultats obtenus lors de nos essais de clonage (III) en constituent une preuve évidente. La faible distribution systémique du virus dans le plant de manioc peut expliquer, d'une certaine manière, les difficultés rencontrées lors de la rétro-inoculation de la particule géminée au manioc.

Au terme de ses études sur la composante du CMD transmise par aleurodes, Chant (1958) a pu conclure que la maladie ne pouvait être transmise à des plants de manioc sains que par les jeunes feuilles. Cette affirmation confirme les résultats des recherches mentionnées ci-dessus. La particule géminée associée au CMD semble se manifester uniquement au niveau du point de croissance des pousses apicales et latérales, y compris les bourgeons (en état de dormance).

La transmission de ces virus par inoculation mécanique, qui semble essentiellement limitée au phloème, est régie par la nature apparemment instable des agents pathogènes. En outre, elle peut être due à l'infection potentielle d'autres tissus qui, à leur tour, semblent transmettre le virus au phloème.

En guise de conclusion, il semble que les expériences menées en Afrique occidentale et orientale confirment les postulats énoncés par Koch quant au prélèvement de la particule géminée du virus sur le manioc infecté.

Par nos études, nous avons démontré la parenté existant entre cette particule géminée et celles infectant *M. glaziovii*, *L. aestuans* et *Sechium edule* au Nigéria, chez qui elles semblent induire de graves symptômes de la maladie.

Quant à savoir si *L. aestuans* peut être considéré comme un hôte naturel de ce virus, que l'on a proposé de baptiser *African Cassava Mosaic Virus* (ACMV), nom sous lequel les spécialistes désignent la maladie depuis plusieurs d'années (Bock and Woods, 1983), il semble qu'il faille prouver que cette espèce soit bien originaire du continent africain (D'après Dalziel (1937) et Uphof (1968), *Laportea aestuans* (L.) Chew est une espèce africaine.). *M. glaziovii* et *Sechium edule*, à l'instar du manioc, ont été récemment introduits en Afrique. Par conséquent, ils ne peuvent en aucun cas constituer des hôtes naturels dudit virus.

N. benthamiana, utilisé dans un premier temps comme plante-test lors des expériences menées à l'IITA en 1978 sur le CMD (IITA 1979; Huttinga et Rossel, non publié), ne fait apparemment aucune différence entre les divers types ou souches potentiels de ce virus au Nigéria, et ce contrairement à *N. clevelandii*, au Kenya (Bock *et al.*, 1978). Par conséquent, il semble que *N. benthamiana* puisse servir de plante-test pour l'ACMV. Cette espèce a été utilisée à l'Institut pour les opérations d'indexage. Notons d'ailleurs qu'elle est particulièrement sensible à ce virus. Il s'agit peut être de l'espèce de *Nicotiana* la plus sensible que l'on ait testée jusqu'à présent.

Les chercheurs de l'IITA ont élaboré plusieurs variétés à rendement élevé combinant les caractères agronomiques les plus favorables et plusieurs niveaux de résistance (modérée à prononcée) au CMD, à la bactériose, à l'antracnose ainsi qu'à d'autres contraintes biologiques importantes (Hahn, 1978; Hahn, Terry, Leuschner, Akobundu, Okali et Lal, 1979; Hahn, Terry et Leuschner, 1980). Plusieurs de ces variétés sont déjà largement cultivées dans tout le Nigéria,

et ont été envoyées aux programmes nationaux africains afin que soient mis en place des essais de recherche appliquée dans diverses zones agro-écologiques.

L'ensemble du matériel végétal existe sous forme de culture des tissus (IITA 1981; Frison et Ng, non publié, Frison, 1981). On a procédé à des tests de dépistage du virus, conformément aux règlements de quarantaine régissant le transfert des parties végétales de ces cultures sur tout le continent africain.

Au Nigéria, dans les principales zones de culture de la région méridionale humide et semi-humide, le CMD a pris une telle ampleur que son taux d'infection atteint les 100% chez les variétés sensibles, et ce au cours des trois premiers mois qui suivent la plantation. La résistance génétique au CMD constitue, dès lors, une condition préalable à la mise au point de nouvelles variétés améliorées.

BIBLIOGRAPHIE

- BIRD, J., PEREZ, R.L., RODRIGUEZ, A.C., MONNLOR, & SANCHEZ, J. (1975). Transmission del mosaico dorado de la habichuela (*Phaseolus vulgaris*) en Puerto Rico por medios mecanicos. *Bean Protection Seminar*, 1-5 December, 1975, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- BOCK, K.R., & GUTHRIE, E.J. (1976). Recent advances in research on cassava viruses in East Africa. In African casava mosaic. *Report of an Interdisciplinary Workshop*, Muguga, Kenya, 19-22 Febr., 1976. Ed. B.L. Nestel.
- BOCK, K.R., & GUTHRIE, E.J. (1978). Transmission of African cassava mosaic by mechanical inoculation. *Plant Disease Reporter* 62, 580-581.
- BOCK, K.R., GUTHRIE, E.J. & MEREDITH, G. (1978). Distribution, host range, properties and purification of cassava latent virus, a geminivirus. *Annals of Applied Biology* 90, 361-367.
- BOCK, K.R., & WOODS, R.D.(1983). Etiology of African cassava mosaic disease. *Plant Disease* 67, 994-995.
- BRUNT, A.A. & KENTEN, R.H.(1973). Cowpea mild mottle, a newly recognised virus infecting cowpeas (*Vigna unguiculata*) in Ghana. *Annals of Applied Biology* 74, 67-74.
- CHANT, S.R. (1958). Studies on the transmission of cassava mosaic virus by *Bemisia* spp. (Aleyrodidae). *Annals of Applied Biology* 46 (2), 210-215.
- COHEN, S. & NITZANI, F.E. (1960). A whitefly-transmitted virus of Cucurbits in Israel. *Phytopathol. Mediterr.* 1, 44-46.
- COSTA, A.S., & BENNETT, C.W. (1950). Whitefly-transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology* 40, 266-283.
- COSTA, A.S. (1965). Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in Sao Paulo, Brazil. *FAO Plant Protection Bulletin* 13 (6), 121-130.
- FRISON, E.A. (1981). Tissue culture : A tool for improvement and international exchange of tropical root and tuber crops. *IITA Research Briefs* 2 (1), 1-4.
- GOODMAN, R.M., BIRD, J. & THONGMEEARKOM, P. (1977). An unusual viruslike particle associated with golden yellow mosaic of beans. *Phytopathology* 67, 37-41.
- HAHN, S.K., TERRY E.R. & LEUSCHNER, K. (1980). Breeding cassava for resistance to cassava mosaic disease. *Euphytica* 29 (3), 673-683.
- HAHN, S.K. (1978). Breeding cassava for resistance to bacterial blight. *Pesticides Abstracts and News Summary* 24 (4), 480-485.
- HAHN, S.K., TERRY, E.R., LEUSCHNER, K., AKOBUNDU, I.O., OKALI, C. & LAL, R. (1979). Cassava improvement in Africa. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. *Field Crops Research* 2, 193-226.
- IITA, (1978). In *Annual Report for 1977. International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, Ibadan, Nigeria, 50.
- IITA, (1979). In *Annual Report for 1978. International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*,

- Ibadan, Nigeria **108**, 52-53.
- IITA, (1980). In *Annual Report for 1979. International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, Ibadan, Nigeria **134**, 58-59.
- IITA, (1982). In *Annual Report for 1981. International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, Ibadan, Nigeria, 66.
- IITA, (1983). In *Annual Report for 1982. International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, Ibadan, Nigeria, 102-103.
- IITA (1984). In *Annual Report for 1983. International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, Ibadan, Nigeria, 111.
- IITA, (1985). In *Annual Report for 1984. International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, Ibadan, Nigeria, 120-121.
- ROSSEL, H.W., & THOTTAPPILLY, G. (1985). In *Virus Diseases of Important Food Crops in Tropical Africa*, Ibadan, Nigeria, International Institute of Tropical Agriculture.
- ROSSEL, H.W., & THOTTAPPILLY, G. (1984). The etiology of CMD finally clarified ? *IITA Research Briefs* **5** (3), 2-3.
- SEQUEIRA, J.C. & HARRISON, B.D. (1982). Serological studies on cassava latent virus. *Annals of Applied Biology* **101**, 33-42.
- STOREY, H.H., & R.F.W. NICHOLS (1938). Studies on the mosaic disease of cassava. *Annals of Applied Biology* **25** (4), 790-806.
- WALTER, B. (1980). Isolation and purification of a virus transmitted from mosaic-diseased cassava in the Ivory Coast. *Plant Disease* **64**, 1040-1042.