

VIROLOGIE. — Une nouvelle maladie virale du Maïs en Côte-d'Ivoire : la maladie des taches ocellées. Note (*) de **Claude Fauquet** et **Jean-Claude Thouvenel**, présentée par **Léon Hirth**.

Une nouvelle maladie virale du Maïs a été caractérisée en Côte-d'Ivoire. Sa gamme d'hôtes, une méthode de purification et quelques propriétés sont décrites. Il s'agit d'un virus sphérique de 26 nm de diamètre qui n'a pas encore été décrit sur Maïs et que nous proposons de nommer virus des taches ocellées en raison des symptômes caractéristiques qu'il provoque sur le maïs.

VIROLOGY. — A New Viral Maize Disease in Ivory-Coast, the Maize Eye Spot Virus.

A new viral disease on Maize has been characterized in the Ivory-Coast. We describe here its host-range, a method of purification and some properties. It is a spherical virus of 26 nm in diameter which has never been described on Maize and we propose to name it, "Maize Eye Spot Virus", according to the symptoms induced on Maize.

INTRODUCTION. — Depuis 1968 le programme du laboratoire de Virologie de l'O.R.S.T.O.M. en Côte-d'Ivoire est : Inventaire des maladies virales des plantes cultivées en Côte-d'Ivoire [1]. Dans le cadre de ce programme, nous avons décrit trois maladies virales sur le Maïs [2] nous venons d'en identifier une quatrième. Les symptômes que ce virus provoque, en champs, sont les suivants : jaunissement général de la plante qui est dû à une anastomose de taches ocellées jaunes. Sur les jeunes feuilles il apparaît une mosaïque en forme de tirets (fig. 1) et sur la dernière feuille quelques taches allongées très discrètes. La plante malade a une taille plus réduite que la plante saine mais ne présente pas de rabougrissement. Cette maladie n'a jamais été décrite sur Maïs et par ailleurs nous n'avons pu assimiler le virus à un virus déjà décrit. C'est pourquoi, nous proposons de le dénommer : « Maize Eye Spot Virus ».

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — L'inoculum originel provient de Maïs naturellement infectés, prélevés dans la région centrale de la Côte-d'Ivoire, près de Bouaké.

1. *Transmission.* — (a). — *Transmission mécanique.* — Les feuilles de plantes malades sont broyées dans du tampon borate de sodium 0,05 M pH 8 contenant 0,01 M de chlorhydrate de cystéine. Le broyat est inoculé par frottement sur des plantules préalablement saupoudrées de carborundum n° 400. Les plantes sont maintenues à l'abri des Insectes dans des serres conçues dans ce but et soumises aux conditions climatiques naturelles (température moyenne 32°C et humidité moyenne 90 %). Les plantes hôtes testées par inoculation sont, après 21 jours, broyées et inoculées dans les mêmes conditions, à de jeunes Maïs pour détecter la présence d'hôtes qui ne présenteraient pas de symptômes mais qui multiplieraient le virus.

(b). *Transmission par Pucerons.* — Deux espèces de Pucerons ont été utilisées : *Aphis spiraeicola* (récolté sur *Eupatorium odoratum*) et *Rhopalosiphum maidis* (récolté sur *Zea mays*). Après un jeûne de 2 h et un repas d'acquisition variant de 5 mn à 24 h sur des plantes malades, les Pucerons sont transférés sur de jeunes plantules saines, à raison de 10 individus par plante et ils sont éliminés par pulvérisation d'insecticide après 48 h.

2. *Propriétés biologiques.* — Les propriétés biologiques ont été déterminées sur un broyat, obtenu avec des feuilles de Maïs, inoculées 14 jours auparavant, et présentant de forts symptômes. Du tampon d'inoculation est ajouté aux feuilles de Maïs à raison de 1 ml/1 g de feuilles.

La détermination du pouvoir pathogène a été effectuée en inoculant de jeunes plantules de Maïs âgées de 5 jours (mosaïque systémique 14 jours après inoculation). La méthode de Raymer et Diener [3] a été utilisée pour estimer ce pouvoir infectieux.

Le point de dilution limite a été effectué en diluant l'extrait brut dans de l'eau distillée [3].

Le point de thermo-inactivation a été déterminé en éprouvant le pouvoir infectieux de 2 ml d'extrait brut dilué de moitié par du tampon d'inoculation, après chauffage pendant 10 mn à différentes températures [3].

La conservation du pouvoir infectieux *in vitro* a été déterminée en inoculant périodiquement de jeunes plantules de Maïs, avec de l'extrait brut dilué de moitié conservé dans différentes conditions : à la température ambiante (24°C), au réfrigérateur (4°C) au congélateur (-25°C) ou bien encore dans des feuilles malades desséchées à 24°C.

3. *Purification.* — Les feuilles de Maïs malades sont broyées dans un tampon phosphate de potassium

17 OCT. 1983

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 3402ex 1

Cote : B

B3402ex1

0,2 M pH 6 contenant 0,4 % d'acide thioglylique, à raison de 5 ml de tampon/1 g de feuilles. Après 2 mn de broyage, le mélange est clarifié par du chloroforme, à raison de 1 ml de chloroforme pour 1 g de feuilles. Après une centrifugation de 10 mn à 10 000 g, le surnageant est ultracentrifugé pendant 3 h à 78 000 g. Les culots sont repris dans du tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 7 dans le dixième du volume de broyage. Après une courte centrifugation à 10 000 g, cette suspension est ultracentrifugée sur un coussin de saccharose 20 %, de 8 ml. Les culots sont repris dans du tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 7 (0,1 ml/2 g de feuille) et purifiés sur gradient de saccharose 10-40 % pendant 3 h à 90 000 g, à la température de 10°C. La bande opalescente correspondant au virus est récoltée après fractionnement, diluée 4 fois et reconcentrée par ultracentrifugation de 4 h à 78 000 g.

4. *Microscopie électronique.* — Une suspension de virus purifié, ayant une concentration de 0,1 mg/ml est déposée sur une grille de microscopie électronique recouverte d'un film de Formvar et carbonnée. Les particules sont ensuite colorées négativement avec de l'acétate d'uranyle à 0,5%. Les observations ont été réalisées au G.E.R.M.E. en Côte-d'Ivoire (Groupement d'Études et de Recherches en Microscopie Electronique) à l'aide d'un microscope « Siemens Elmiskop 102 ».

5. *Sérologie.* — Un antisérum a été préparé en injectant du virus purifié à un lapin, à raison de 1 mg par semaine, pendant 3 semaines. Les deux premières injections ont été intraveineuses et la dernière intramusculaire. Le Lapin est ensuite saigné une fois par semaine pendant 10 semaines et le sérum est récupéré après coagulation à température ambiante. Les tests sérologiques ont été effectués par double diffusion en agar à 1 % dans du NaCl 0,9 % additionné d'azide de sodium à 0,1 %, suivant la méthode d'Ouchterlony [4].

RÉSULTATS. — 1. *Transmission.* — (a) *Transmission mécanique.* — La maladie a pu être transmise facilement par inoculation mécanique à de jeunes plantules de Maïs, en reproduisant exactement les mêmes symptômes que ceux observés en champs, à savoir : mosaïque en tiret sur les jeunes feuilles, taches ocellées sur les vieilles feuilles (fig. 2) qui donnent par anastomose des feuilles jaunes.

La maladie a pu également être transmise aux plantes des familles suivantes : Gramineae : *Avena sativa*, (sans symptômes), *Bromus sterilis* (sans symptômes), *Hordeum vulgare* (mosaïque, taches en anneaux), *Triticum aestivum* (sans symptômes), *Triticum durum* (sans symptômes); Scrophulariaceae : *Torenia fournieri* (sans symptômes); Solanaceae : *Nicotiana clevelandii* × *N. glutinosa* (sans symptômes), *Nicotiana megalosiphon* (sans symptômes).

Parmi les hôtes négatifs, nous pouvons noter dans les Chenopodiaceae : *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* et *C. murale* et dans les Gramineae : *Oryza sativa*.

(b) *Transmission par Puceron.* — La maladie n'a pu être transmise par les deux espèces de Puceron utilisées, de Maïs à Maïs, que ce soit sur le mode persistant ou non persistant.

2. *Propriétés biologiques.* — Le point de dilution limite est supérieur à 10^{-7} pour des feuilles présentant une forte symptomatologie; la température de thermo-inactivation se situe entre 80 et 85°C. Il s'agit d'un virus extrêmement stable qui est toujours infectieux après plus de 20 jours à +24, +4, -25°C ou bien dans des feuilles desséchées.

3. *Purification.* — Le rendement de la méthode de purification varie entre 50 et 400 mg/kg de feuilles, suivant l'intensité des symptômes. Le virus purifié est hautement infectieux puisque une suspension de 0,001 unité de densité optique induit des symptômes sur Maïs. Sur gradient de saccharose, nous n'avons constaté la présence que d'une seule bande opalescente.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Symptômes systémiques provoqués par le virus des taches ocellées du Maïs sur une plante infectée en champs.

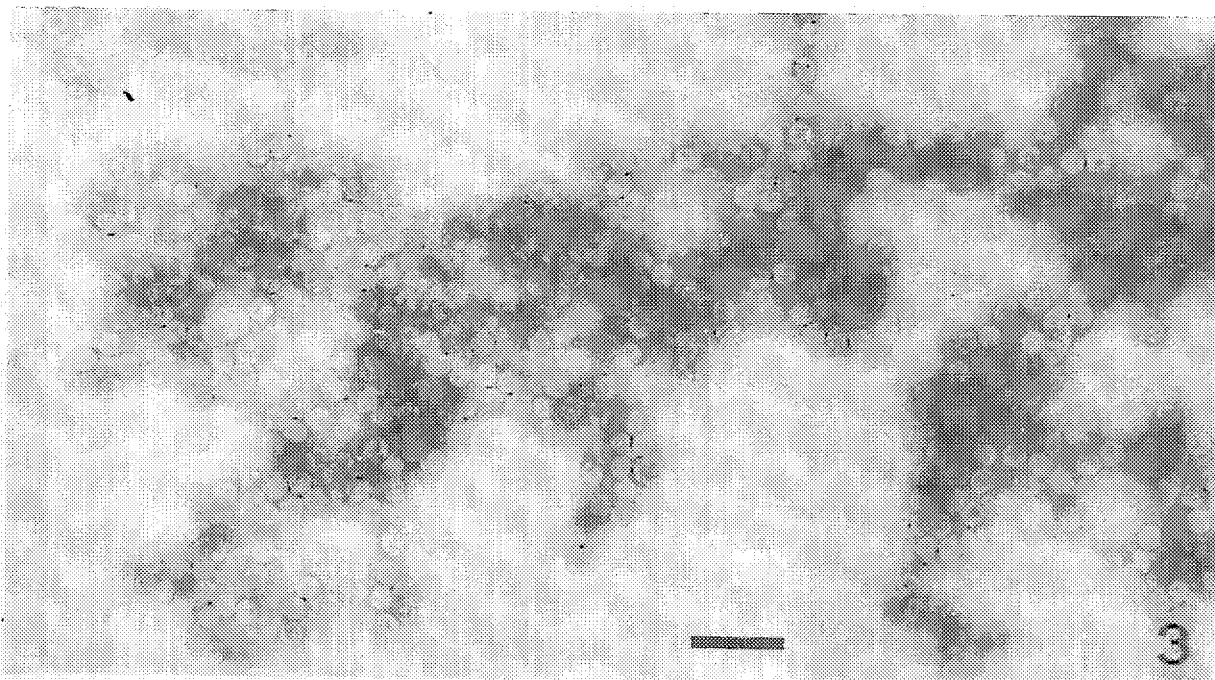
Fig. 1. — *Systemic symptoms induced by the Maize eye spot virus on Maize in the field.*

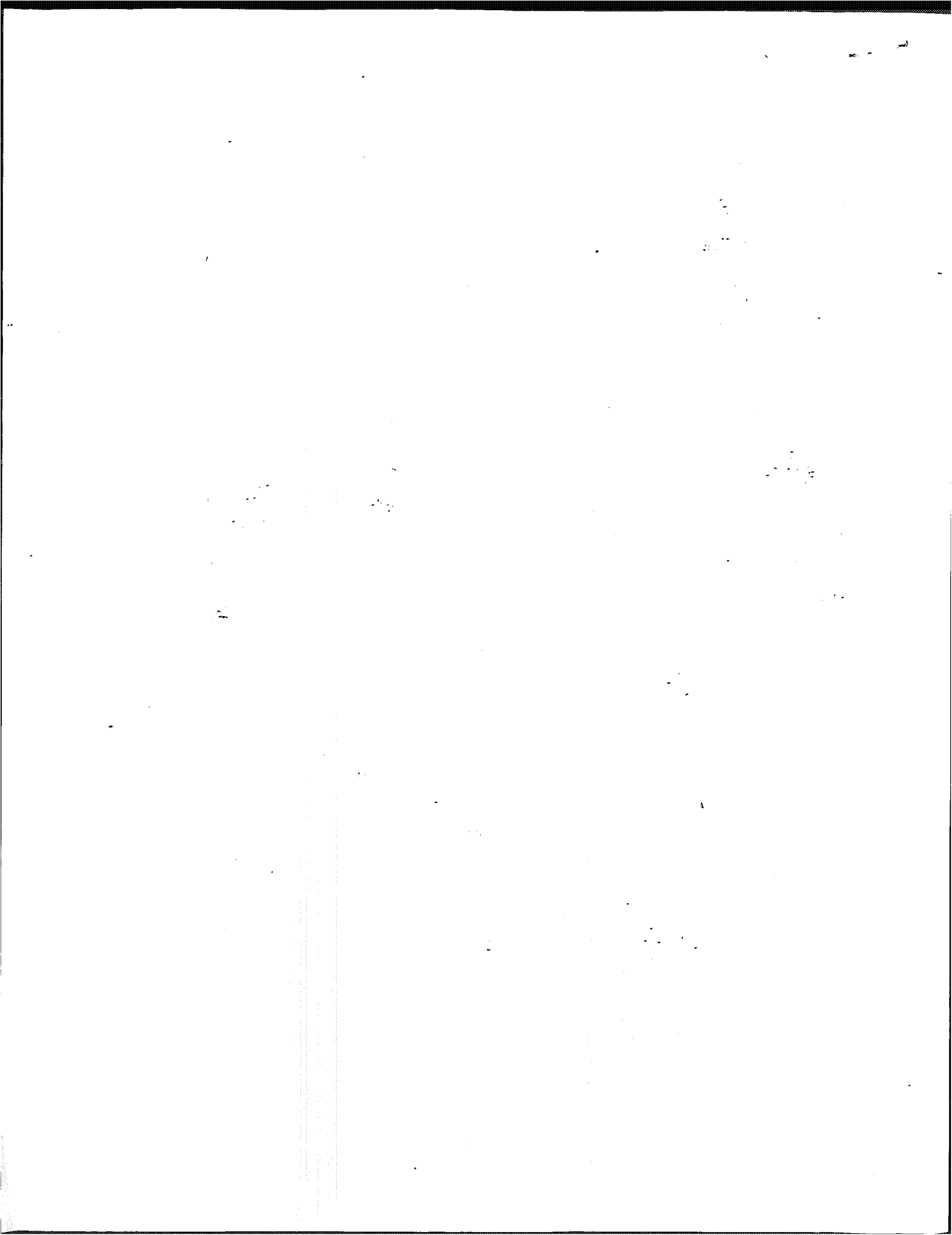
Fig. 2. — Symptômes systémiques provoqués sur une feuille de Maïs, après inoculation mécanique du virus des taches ocellées du Maïs, à gauche feuille saine.

Fig. 2. — *Systemic symptoms induced on a Maize leaf after mechanical inoculation of Maize eye spot virus, healthy leaf on the left.*

Fig. 3. — Aspect en microscopie électronique d'une préparation purifiée du virus des taches ocellées du Maïs, après coloration négative à l'acétate d'uranyle (grandissement 120 000). La barre représente 100 nm.

Fig. 3. — *Electron microscope preparation of purified Maize eye spot virus, negatively stained by uranyl acetate (magnification 120,000). Bar represents 100 nm.*





Le spectre d'absorption de ce virus présente un maximum à 260 nm et un minimum à 243 nm. Le rapport A_{260}/A_{280} est de 1,54 et le rapport A_{\max}/A_{\min} est de 1,32. Ces rapports corrigés pour la diffusion de la lumière, selon Noordam [5] deviennent 1,71 et 1,43. Ils indiquent selon la méthode graphique de Paul [6] un pourcentage d'ARN de 26 % et selon la méthode graphique de Gibbs et Harrison [7] un coefficient d'extinction de 6,9.

4. *Microscopie électronique.* — L'observation en microscopie électronique du virus purifié a montré la présence de particules sphériques de 26 nm de diamètre en moyenne (fig. 3). Il ne semble pas y avoir de particules vides mais l'acétate d'uranyle semble mieux pénétrer certaines particules.

5. *Sérologie.* — Un antisérum de titre 1/500 a été préparé. Le virus purifié a été éprouvé contre les antisérums spécifiques des virus suivants, le titre homologue et l'origine sont donnés pour chaque antisérum entre parenthèses : le virus de la panachure jaune du Riz (titre 1/2048; Dr Fauquet); le virus de la nécrose du Tabac (titre 1/1024; Dr Putz), le virus des rayures du Maïs (titre ?; Dr Bock), le virus latent du *Tephrosia* (titre 1/1024; Dr Bock), le virus de la mosaïque du Haricot du sud (titre 1/4096; Dr Fauquet), le virus du dessèchement de la Fève (titre ?; Dr Smith), le virus des énaions du Pois (titre ?; Dr Musil), le virus de la panachure du Vigna (titre 1/128; Dr Shoyinka), le virus de la mosaïque de la Courge (titre 1/1024; Dr Campbell), le virus de la mosaïque de la Fève (titre 1/500; Dr Cockbain), le virus de la mosaïque foncée de la Fève (titre 1/500; Dr Cockbain), le virus de la mosaïque du Vigna (titre ?; Dr Van Kammen), le virus de la mosaïque jaune du Vigna (titre ?; Dr Ladipo), le virus de la panachure chlorotique du Vigna (titre ?; Dr Bancraft), le virus des taches annulaires du Tabac (titre 1/320; Dr Stace-Smith), le virus des taches annulaires de la Tomate (titre 1/320; Dr Stace-Smith), le virus de la mosaïque du Concombre, souche *d* (titre 1/512; Dr Thouvenel), le virus du nanisme de l'Arachide (titre 1/256; Dr Mink), le virus stérilisant de la Tomate (titre 1/2048; Dr Devergne) et le virus de la panachure du Trèfle rouge (titre ?; Dr Musil). Pour aucun de ces antisérums nous n'avons obtenu de réactions sérologiques avec le virus isolé du Maïs en Côte-d'Ivoire.

CONCLUSION. — Nous avons isolé un virus sphérique de 26 nm de diamètre qui provoque des symptômes sur Maïs en Côte-d'Ivoire. Cette maladie se transmet aisément par inoculation mécanique au Maïs et quelques autres hôtes, mais généralement sans provoquer de symptômes, exception faite de l'Orge qui développe des symptômes sous forme de taches ocellées comme le Maïs. Il n'a pas été possible de transmettre cette maladie par Pucerons, que ce soit sur le mode persistant ou non persistant, et la transmission par la graine n'a pas encore été éprouvée.

Cette maladie n'a pas encore été décrite en Côte-d'Ivoire [2], ni en Afrique Tropicale ([8, 9]), ni même ailleurs dans le monde ([10] et [11]). Parmi les virus sphériques isolés sur Maïs, le virus de la mosaïque du Brome ([10, 12]) et le virus de la mosaïque du Concombre ([10, 13]) sont transmissibles mécaniquement mais ils sont tous deux différents du virus isolé en Côte-d'Ivoire de par leur gamme d'hôtes et de plus, nous n'avons pas trouvé de relation sérologique. Un autre virus sphérique, transmissible mécaniquement, a été isolé du Maïs au Pérou le virus de la marbrure chlorotique du Maïs [11] mais les symptômes sont très différents et le virus sensiblement plus grand (30 nm) que celui isolé en Côte-d'Ivoire. Le virus de la mosaïque du *Panicum* [14] isolé de *Panicum virgatum* et de l'herbe Saint-Augustin (*Stenotaphrum secundatum*), peut artificiellement infecter le Maïs, mais les symptômes sur Maïs et la gamme d'hôtes sont complètement différents de ceux du virus de Côte-d'Ivoire et de plus, nous n'avons jamais constaté la présence d'un virus satellite dans nos purifications.

Toutes les raisons, énoncées ci-dessous, nous laissent penser que nous avons isolé un nouveau virus du Maïs et nous proposons de le dénommer le virus des taches ocellées du Maïs (Maize Eye-Spot Virus-M.E.S.V.).

Les caractéristiques biochimiques et biophysiques, que nous avons déterminées pour ce virus, ne nous permettent pas de le classer dans un des groupes des virus de plante sphériques [15]. Pour pouvoir trancher il nous faudra, si possible, trouver son vecteur naturel et comparer toutes ses propriétés avec les virus sphériques isolés de Graminées [16].

(*) Remise le 5 juillet 1982.

- [1] C. FAUQUET et J. C. THOUVENEL, *Initiations. Documentations Technique* n° 46, 1980, O.R.S.T.O.M., Paris, 128 p.
- [2] D. LAMY, C. FAUQUET, et J. C. THOUVENEL, *Agronomie Tropicale*, 35-2, 1980, p. 192-196.
- [3] W. B. RAYMER et T. O. DIENER, *Virology*, 37, 1968, p. 343-350.
- [4] O. OUCHTERLONY, *Acta Path. Microbiol. Scand.* 25, 1948, p. 115.
- [5] D. NOORDAM, *Identification of Plant Viruses*, 1973, Ed. Pudoc, Wageningen, 207 p.
- [6] H. L. PAUL, *Z. Naturforsch.*, 14 b, 1959, p. 427.
- [7] A. GIBBS et B. HARRISON, *Plant Virology. The Principles*, 1976, E. ARNOLD, éd., London, 292 p.
- [8] K. R. BOCK et E. J. GUTHRIE, *East African Agriculture and Forestry Research Organization reports*, 1972-1975.
- [9] K. R. BOCK, *Crop Virology Research Project (1973-1980) Final report*, 1980, ODA, London, 24 p.
- [10] Anonyme, *A Compendium of Maize Diseases*. Prod. The American Phytopathological Society, U.S.A., 1973, 64 p.
- [11] L. E. WILLIAMS, D. T. GORDON et L. R. NAULT, *Proceedings International Maize Virus Disease Colloquium and Workshop*, 1976, 154 p.
- [12] L. C. LANE, C.M.I./A.A.B., *Descriptions of Plant Viruses*, n° 180, 1977, 4 p.
- [13] R. I. B. FRANCKI, D. W. MOSSOP et T. HATTA, C.M.I./A.A.B., *Descriptions of Plant Viruses*, n° 213, 1979, 6 p.
- [14] C. L. NIBLETT, A. Q. PAULSEN et R. W. TOLER, C.M.I./A.A.B., *Descriptions of Plant Viruses*, n° 177, 1977, 4 p.
- [15] R. E. F. MATTHEWS, *Intervirology*, 12, n° 3-5, 1979, p. 132-296.
- [16] H. L. PAUL, G. QUERFURTH et W. HUTH, *J. Gen. Virol.*, 47, 1980, p. 67-77.

Laboratoire de Virologie, Centre O.R.S.T.O.M. d'Adiopodoumé,
B.P.n° V-51 Abidjan, Côte-d'Ivoire.