

VIROLOGIE. — *Un nouveau Potyvirus : Le Virus de la Marbrure d'Asystasia gangetica.*
Note (*) de **Jean-Claude Thouvenel, Claude Fauquet et Annie Monsarrat**, présentée par
Léon Hirth.

Un nouveau Potyvirus a été isolé de *Asystasia gangetica* (Acanthaceae) en Côte-d'Ivoire. Sa gamme d'hôtes, une méthode de purification et ses propriétés sont décrites. Ce virus qui a une longueur de 750 nm induit des inclusions circulaires dans les cellules des plantes malades.

VIROLOGY. — *Asystasia gangetica* Mottle, a New Potyvirus.

A new potyvirus was isolated from *Asystasia gangetica* (Acanthaceae) in the Ivory Coast. This paper reports the host range, a method of purification and its properties. This virus of 750 nm in length induces pinwheel inclusions in diseased plant cells.

INTRODUCTION. — Depuis 1968, le laboratoire de Virologie de l'O.R.S.T.O.M. en Côte-d'Ivoire effectue l'inventaire des maladies à virus atteignant les plantes cultivées en Afrique tropicale [1]. Lors de la recherche des plantes réservoirs parmi les adventices, une maladie a été décelée sur *Asystasia gangetica* (L.) T. Anders (Acanthaceae); cette plante pousse fréquemment en bordure de chemin ou de champs. La maladie qui affecte *A. gangetica* provoque une marbrure jaune (fig. 1); cette maladie n'avait pu jusqu'ici être attribuée à un agent pathogène connu. La présente Note fait le point des résultats obtenus dans l'identification d'un virus qui semble être un nouveau membre du groupe des Potyvirus.

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — L'inoculum initial provient d'une plante d'*A. gangetica* récoltée en bordure de champs cultivés à Adiopodoumé (Sud de la Côte-d'Ivoire).

1. *Transmission.* — (a) *Transmission mécanique.* — Les feuilles de plantes malades sont broyées dans du tampon phosphate de potassium 0,05 M pH 7,1 contenant 0,01 M de chlorhydrate de cystéine; l'extrait est inoculé par frottement à des plantules ou à des plantes de genres ou espèces variés (cf. résultats), préalablement saupoudrées de carborundum. Les plantes sont soumises aux conditions climatiques naturelles (température moyenne 28°C, humidité moyenne 90%) et maintenues à l'abri des Insectes dans des serres étanches à ceux-ci.

(b) *Transmission par Pucerons.* — Deux espèces de Pucerons ont été utilisées : *Aphis craccivora* (élevé sur Arachide) et *Aphis spiraeicola* (récolté sur *Eupatorium odoratum*). Après un jeûne de 2 h et un repas d'acquisition de 5 à 30 mn sur des plantes malades, les Pucerons sont transférés sur des plantules saines d'*A. gangetica*, de *Nicotiana benthamiana* et de *N. megalosiphon*, à raison de 10 individus par plante. Ils sont éliminés par pulvérisation d'un insecticide systémique (méthyl-parathion) après 48 h.

2. *Propriétés biologiques et titrage.* — Les propriétés biologiques ont été déterminées sur un extrait brut, obtenu en broyant des feuilles de *Nicotiana benthamiana* inoculé 1 semaine auparavant, et présentant les symptômes de la maladie.

La détermination de la nature et la concentration en entités infectieuses de l'agent pathogène a été effectuée en inoculant des plants de *Chenopodium amaranticolor* (hôte à réaction hypersensible) et en comptant les lésions locales induites; ou en inoculant des plantes de *N. benthamiana* (hôte à mosaïque systémique) et en évaluant le pouvoir pathogène par la méthode de Raymer et Diener [2].

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

- 8 NOV. 1983

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

N° : 3662ex1

Cote : B

Le point d'inactivation thermique a été déterminé en évaluant le pouvoir infectieux de 2 ml de l'extrait brut après chauffage de celui-ci pendant 10 mn à différentes températures [3].

L'évolution, en fonction du temps de conservation, du pouvoir infectieux des extraits bruts a été déterminée en évaluant périodiquement le pouvoir pathogène de cet extrait conservé dans différentes conditions; à la température ambiante (25°C), au réfrigérateur (4°C), au congélateur (-30°C).

3. *Purification.* — La purification du virus supposé être l'agent pathogène a été effectuée à partir d'un hôte systémique : *N. benthamiana*. Les feuilles présentant des symptômes sont broyées dans un tampon phosphate de potassium 0,2 M pH 7,8 contenant 1% d'acide thioglycolique, en présence de chloroforme (1 g de feuille/1 ml de chloroforme/2 ml de tampon). 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 borate de potassium 0,05 M pH 8 et soumis à un nouveau cycle de centrifugation et d'ultra-centrifugation; puis la suspension finale est fractionnée sur gradient de saccharose 10-40% pendant 3 h à 90 000 × g. La bande opalescente parfaitement visible est récoltée, diluée; puis le virus qu'elle contient concentré par une ultra-centrifugation de 3 h à 78 000 × g.

4. *Microscopie électronique.* — Des grilles de microscopie électronique, recouvertes d'un film de « Formvar » et carbonées, ont été préparées pour examiner le virus purifié; une coloration négative avec de l'acétate d'uranyle 0,5% a été effectuée.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Symptômes systémiques provoqués par le virus de la Marbrure sur un plant spontané d'*Asystasia gangetica*.

Fig. 1. — *Systemic symptoms induced by Asystasia mottle virus on Asystasia gangetica volunteer.*

Fig. 2. — Symptômes systémiques provoqués sur une feuille d'*Asystasia gangetica*, après inoculation mécanique du virus de la Marbrure; à droite feuille saine.

Fig. 2. — *Systemic symptoms induced on Asystasia gangetica leaf, after mechanical inoculation of Asystasia mottle virus; healthy leaf on the right.*

Fig. 3. — Lésions locales nécrotiques provoquées par inoculation du virus de la Marbrure d'*Asystasia*, sur une feuille de *Chenopodium amaranticolor*.

Fig. 3. — *Necrotic local lesions induced by inoculation of Asystasia mottle virus on a leaf of Chenopodium amaranticolor.*

Fig. 4. — Symptômes systémiques de gaufrage et de mosaïque provoqués sur un plant de *Nicotiana benthamiana*, après inoculation mécanique du virus de la Marbrure d'*Asystasia*.

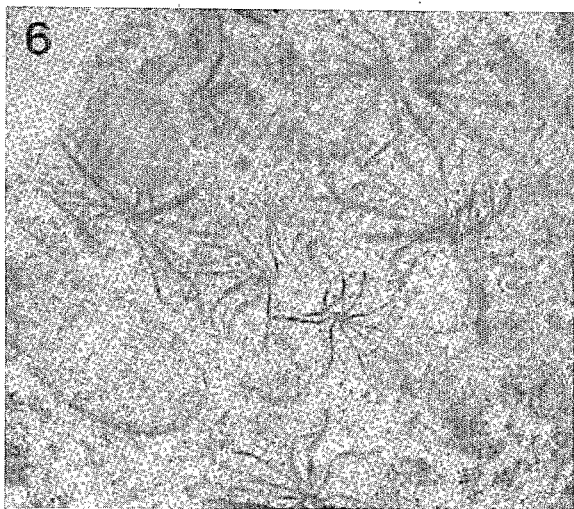
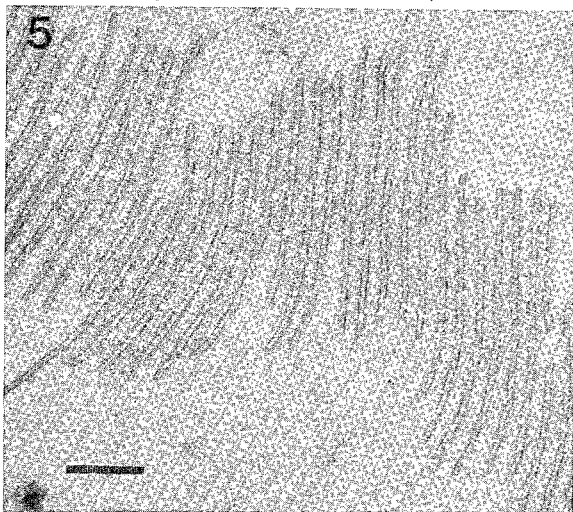
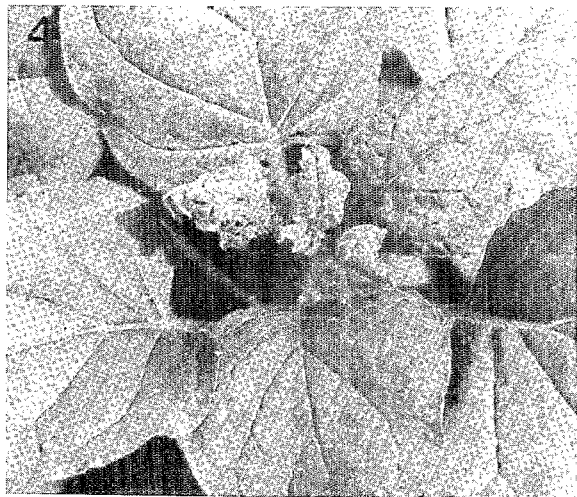
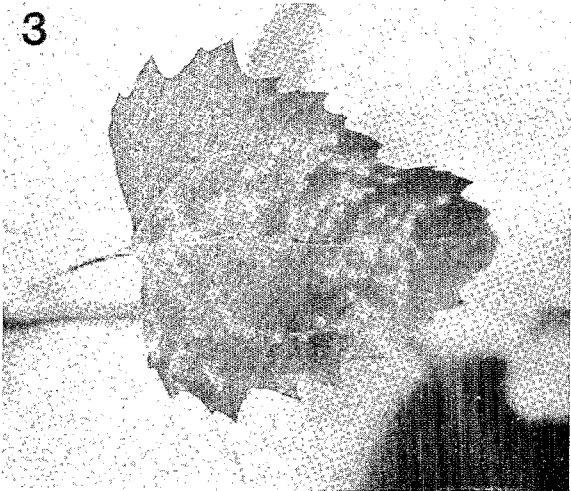
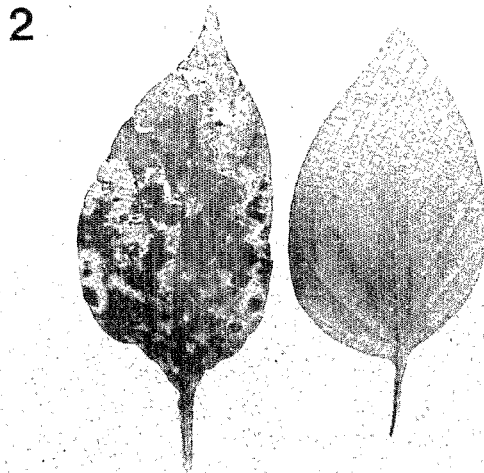
Fig. 4. — *Systemic symptoms of crinkling and mosaic induced on Nicotiana benthamiana, after mechanical inoculation of Asystasia mottle virus.*

Fig. 5. — Aspect en microscopie électronique d'une préparation purifiée du virus de la Marbrure d'*Asystasia*, après coloration négative à l'acétate d'uranyle (G × 50 000). La barre représente 200 nm.

Fig. 5. — *Electron microscope aspect of a purified preparation of Asystasia mottle virus, after negative staining with uranyl acetate (magnification 50,000). The bar represents 200 nm.*

Fig. 6. — Observation en microscopie électronique des inclusions circulaires induites par le virus de la Marbrure d'*Asystasia* dans des cellules de feuille de *N. benthamiana* (G × 35 000).

Fig. 6. — *Electron microscope observation of pinwheel inclusions induced by Asystasia mottle virus in cells of N. benthamiana leaves (magnification 35,000).*



Pour l'étude ultra-structurale, des échantillons de feuilles malades ont été préparés par la méthode de Morgan et Rose [4]. Les coupes ont été réalisées au moyen d'un ultramicrotome « Sorvall MT2 B »; elles ont été colorées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb [5].

Les observations ont été réalisées au G.E.R.M.E. (Groupement d'Études et de Recherches en Microscopie Électronique) à l'aide d'un microscope « Siemens Elmiskop 102 ».

5. *Sérologie.* — Un antisérum a été préparé en injectant à 1 lapin environ 0,5 mg de virus purifié chaque semaine pendant 6 semaines. Les tests sérologiques ont été effectués par microprécipitation sous huile de paraffine [6].

RÉSULTATS. — 1. *Transmission.* — (a) *Transmission mécanique.* — La maladie a pu être transmise aisément par inoculation mécanique à de jeunes plantules d'*A. gangetica* et à différentes plantes de plusieurs familles : Acanthaceae : *A. gangetica* (marbrure liée aux nervures) (fig. 2), *Crossandra flava* (marbrure diffuse); Aizoaceae : *Tetragonia expansa* (lésions locales chlorotiques); Chenopodiaceae : *Chenopodium amaranticolor* (lésions locales nécrotiques) (fig. 3); Leguminosae : *Phaseolus mungo* (chlorose), *Phaseolus vulgaris* (chlorose); Pedaliaceae : *Sesamum indicum* (spots chlorotiques); Scrophulariaceae : *Antirrhinum majus* (chlorose), *Penstemon hirsutus* (chlorose); Solanaceae : *Browallia speciosa* (chlorose), *Nicotiana benthamiana* (mosaïque et gaufrage) (fig. 4), *N. clevelandii* (marbrure), *N. megalosiphon* (marbrure), *N. tabacum* Samsun NN et Xanthi n.c. (lésions locales, spots concentriques nécrotiques).

(b) *Transmission par Pucerons.* — La maladie n'a pu être transmise par les deux espèces de Pucerons utilisées malgré plusieurs centaines de plantes éprouvées; et cela à partir d'*A. gangetica*, de *N. benthamiana* ou de *N. megalosiphon* infectés.

2. *Propriétés biologiques.* — Le point de dilution limite est compris entre 10^{-3} et 10^{-4} ; la température de thermo-inactivation se situe entre 70 et 75°C. La durée de conservation du pouvoir infectieux à température ambiante est de 3 jours, elle est de plus de 4 mois à 4°C et à -30°C.

3. *Purification.* — L'examen au spectrophotomètre de la suspension virale purifiée montre un maximum d'absorption à 260 nm et un minimum à 247 nm; le rapport A_{260}/A_{280} est de 1,20. En utilisant un coefficient d'absorption A 0,1%/1 cm, 260 = 2,9 [7], le rendement de la purification est d'environ 15 mg de virus par kilogramme de feuilles. Le pouvoir pathogène de la suspension de virus purifié a été comparée, après dilution, au pouvoir pathogène de l'extrait brut; les résultats obtenus ont montré que ceux-ci étaient identiques pour un nombre de particules considérées du même ordre de grandeur.

4. *Microscopie électronique.* — L'examen en microscopie électronique du virus purifié a montré la présence de particules filamenteuses de 750 ± 15 nm de longueur, pour une largeur de 13 ± 1 nm (fig. 5).

L'observation des coupes effectuées dans les échantillons de feuilles de *N. benthamiana* et de *N. megalosiphon* malades a montré la présence d'inclusions circulaires de type « pinwheel » (fig. 6) [8].

5. *Sérologie.* — Un antisérum a été obtenu avec du virus purifié de titre 1/1024.

Ce dernier a été éprouvé contre les antisérums spécifiques des virus cités ci-dessous, le titre et l'origine étant donné pour chaque antisérum entre parenthèses : Aneilema Mosaic Virus (titre 1/8 192; Dr Bock), Bean Common Mosaic Virus (1/256; Dr Bos), Bean Yellow Mosaic Virus (1/1 024; Dr Bos), Clover Yellow Vein Virus (1/2 048; Dr Barnett),

Columbia Datura Virus (?; Dr Bartels), Cowpea Aphid-borne Mosaic Virus (1/4 000; Dr Bock), Henbane Mosaic Virus (1/8 000; Dr Bartels), Hippeastrum Mosaic Virus (1/1 024; Dr Brunt), Iris Fulva Mosaic Virus (1/256; Dr Barnett), Parsnip Mosaic Virus (1/64; Dr Murant), Passionfruit Woodiness Virus (?; Dr Smith), Pea Seed-borne Mosaic Virus (1/400; Dr Mink), Peanut Mottle Virus (1/4 000; Dr Bock), Peanut Mottle Virus souche M2 (1/256; Dr Bock), Potato Virus A (1/160; Dr Bartels), Potato Virus Y (1/512; Dr Bartels), Soybean Mosaic Virus (1/128; Dr Barnett), Sugarcane Mosaic Virus (?; Dr Gillaspie), Tobacco Etch Virus (?; Dr Bartels), Tobacco Virus 3 (1/16 000; Dr Guthrie), Turnip Mosaic Virus (1/64; Dr Tomlinson), Wisteria Vein Mosaic Virus (1/1 024; Dr Luisoni). Aucune réaction n'a été observée avec ces différents antisérums.

De même aucune réaction n'a été obtenue avec les antisérums préparés par nous contre les virus suivants trouvés en Côte-d'Ivoire : Canavalia Mosaic Virus (1/2 000), Yam Mosaic Virus (1/500), Groundnut Eyespot Virus souche A (1/2 048), Groundnut Eyespot Virus souche B (1/256), Guinea Grass Mosaic Virus souche A (1/1 024), Guinea Grass Mosaic Virus souche B (1/2 048), Passionfruit Ringspot Virus (1/2 048), Pepper Veinal Mottle Virus (1/4 096), Voandzeia Distortion Mosaic Virus (1/1 000).

CONCLUSION. — Par sa morphologie (virus filamenteux de 750 nm de longueur) [7], et par le type caractéristique des inclusions induites dans les cellules des plantes infectées [8], le virus responsable de la Marbrure d'*Asystasia gangetica* semble bien appartenir au groupe des Potyvirus [7], bien qu'il n'ait pu être transmis par les deux espèces de Puceron utilisées.

Ce virus est à notre connaissance le premier Potyvirus trouvé sur une Acanthacée, mais il possède une gamme d'hôtes assez large puisqu'elle comporte sept familles différentes; ce virus atteint des plantes cultivées comme le Haricot (*Phaseolus vulgaris*) et le Sésame (*Sesamum indicum*).

Aucune relation sérologique n'a pu être établie avec un autre membre du groupe, malgré les tests effectués avec plus de 30 antisérums préparés contre des virus différents. Le Virus de la Marbrure d'*Asystasia gangetica* semble donc être un nouveau membre du groupe des Potyvirus.

(*) Remise le 26 avril 1982, acceptée le 14 juin 1982.

[1] C. FAUQUET et J. C. THOUVENEL, *Initiations-Documentations Techniques* n° 46, 1980, O.R.S.T.O.M., Paris, 128 p.

[2] W. B. RAYMER et T. O. DIENER, *Virology*, 37, 1968, p. 343-350.

[3] D. NOORDAM, *Identification of Plant Viruses*, 1973, Wageningen, 207 p.

[4] C. MORGAN et H. M. ROSE, *Methods in Virology*, K. MARAMOROSCH et H. KOPROWSKI, éd., Academic Press, New York et Londres, 3, 1967, p. 576.

[5] E. S. REYNOLDS, *J. Cell Biol.*, 17, 1963, p. 208-212.

[6] D. H. M. VAN SLOGTEREN, *Proc. of the Second Conference on Potato Virus Diseases*, Lisse, Wageningen, juin 1954.

[7] M. HOLLINGS et A. A. BRUNT, *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, n° 245, 1981, 7 p.

[8] J. R. EDWARSON et G. R. CHRISTIE, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 16, 1978, p. 31-55.

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