

VIROLOGIE. — *Association d'un nouveau virus en bâtonnet avec la maladie de la nécrose à rayures du Riz, en Côte-d'Ivoire.* Note (*) de **Claude Fauquet** et **Jean-Claude Thouvenel**, présentée par **Léon Hirth**.

Un virus en bâtonnet est présent dans les plants de Riz présentant les symptômes de nécrose à rayures, en Côte-d'Ivoire. Les symptômes de la maladie, les modes de transmission, une méthode de purification et quelques propriétés physico-chimiques sont décrites. Il s'agit d'un virus en bâtonnet à plusieurs composants qui n'a pas encore été décrit et que nous proposons de dénommer; virus de la nécrose à rayures du Riz.

VIROLOGY. — Presence of a New Rod-Shaped Virus in Rice Plants with Stripe Necrotic Symptoms, in Ivory Coast.

A rod-shaped virus is present in Rice plants showing stripes and necrosis, in the Ivory Coast. The symptoms of the disease, the mode of transmission ways, a method of purification and some physico-chemical properties of the virus are described. This rod-shaped virus has not been described before and we propose to name it, Rice Stripe Necrosis Virus (RSNV).

INTRODUCTION. — Jusqu'à ce jour, un seul virus a été isolé du Riz en Afrique [1] il s'agit du virus de la panachure jaune qui est un virus sphérique transmis par chrysomelles. Une autre maladie soupçonnée d'être une maladie à virus avait cependant été décrite en 1977 en Côte-d'Ivoire [2] mais sans mise en évidence de l'agent causal, ni de son mode de transmission. C'est, à partir de plants de Riz présentant ces mêmes symptômes de rabougrissement (fig. 1) et de rayures chlorotiques (fig. 2) que nous avons isolé un virus en bâtonnet. Nous avons pu déterminer son mode de transmission naturel et quelques unes de ses propriétés. Les résultats obtenus suggèrent que ce virus n'a pas encore été décrit, que ce soit sur Riz où sur une autre graminée, en Afrique où ailleurs dans le monde.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — L'inoculum originel provient de plantes de Riz infectées naturellement, prélevées dans la région Centre de Côte-d'Ivoire, près de Bouaké.

1. *Transmission.* — (a) *Transmission mécanique.* La méthode classique d'inoculation mécanique par frottement du jus brut à +0°C avec du carborundum a été utilisée sur différentes plantes-hôtes et de différentes manières. Nous avons éprouvé les tampons citrate de sodium, phosphate de sodium, phosphate de potassium, borate de sodium, tris-HCl, hepes et mepes, à des concentrations variant de 0,05 à 0,5 M et à des pH variant de 5 à 9. Divers anti-oxydant comme le chlorhydrate de cystéine, le diethyl-di-thiocarbamate, l'acide thioglycolique ou le mercapto-ethanol ont été ajoutés au tampon de broyage.

Nous avons également essayé d'infecter avec le jus brut conservé à 0°C, congelé à -20°C pendant 2 h ou chauffé à 50°C pendant 10 mn. Nous avons par ailleurs fait varier la dilution du jus brut de 1 à 20 fois avec du tampon de broyage avant l'inoculation.

Les plantes inoculées, cultivées sur sol stérilisé, sont maintenues en serre à l'abri des insectes, et soumises aux conditions climatiques naturelles (température moyenne 32°C et humidité moyenne 90 %).

(b) *Transmission par la graine.* Des graines ont été prélevées sur des plantes malades en champs, à partir de différentes variétés ayant présenté en 1981 un fort pourcentage d'infection. Elles ont été semées dans de la terre stérilisée, maintenues en serre à l'abri des insectes, et les plantes ainsi obtenues ont été recépées plusieurs fois.

(c) *Transmission par le sol.* De la terre a été prélevée avec des pieds malades et ramenée au laboratoire en serre à l'abri des insectes. Des graines ont été semées autour de ces plantes malades et observées périodiquement. Des expériences identiques ont été faites en supprimant la plante malade ou en ajoutant des racines malades à de la terre stérilisée. Des expériences ont également été faites avec de la terre, prélevée près de pieds malades, qui a été desséchée pendant des temps variables. Pour chaque expérience des témoins ont été effectués avec de la terre prélevée sur des plantes saines du même champ.

(d) *Transmission par Insectes.* Deux espèces de Pucerons ont été utilisées : *Histeroneura setariae* (récolté sur Riz) et *Rhopalosiphum maidis* (récolté sur Maïs). 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.

DEC. 1983

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

N° : 4010 ex 1

Cote B

B4010 ex 1

Une espèce indéterminée de Cochenille, fréquente sur Riz, a été utilisée pour essayer de transmettre la maladie. Des larves ont été prélevées sur des plantes ne présentant pas de symptômes et mises en élevage sur des plantes malades. Périodiquement, nous avons prélevé sur cet élevage des larves mobiles de Cochenilles, que nous avons remis sur des plantules saines de Riz.

2. *Purification.* — Des feuilles de Riz malade prélevées en champ sont broyées dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 7,5 contenant 0,4 % d'acide thioglycolique, à raison de 4 ml de tampon pour 1 g de feuilles. Après un broyage de 2 mn, le broyat est clarifié par un mélange de chloroforme/butanol dans un rapport 2/8, à raison de 1 ml de ce mélange pour 1 g de plante. Après une centrifugation de 10 mn à 10 000 × g, le surnageant est ultra-centrifugé pendant 3 h à 78 000 × g. Les culots obtenus sont repris dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7 (0,1 ml/2 g de feuilles) et purifiés sur coussin de saccharose 20 % de 8 ml. Les culots sont à nouveau remis en suspension dans 2 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 7 et centrifugés à 10 000 × g pendant 10 mn. Le surnageant est déposé sur un gradient de saccharose 15-40 % qui est ultra-centrifugé pendant 3 h à 90 000 × g, à la température de 4°C. Le gradient est récolté et fractionné grâce à un ISCO-UA 5, les fractions absorbantes sont regroupées et concentrées par ultra-centrifugation de 4 h à 78 000 × g.

A chaque étape de la purification ainsi que pour les différentes fractions du gradient une fraction aliquote est prélevée et inoculée à des plantes sensibles.

3. *Microscopie électronique.* — Une suspension de virus purifié de 0,3 u. DO/ml est déposée sur une grille de microscopie électronique recouverte d'un film de Formvar et carbonnée. Les particules virales sont ensuite colorées négativement avec de l'acétate d'uranyle à 0,5 %.

4. *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 intra-veineuses et la dernière intramusculaire. Le lapin est ensuite saigné 1 fois par semaine et le sérum est récupéré après coagulation à température ambiante. Les tests sérologiques ont été effectués par micro-précipitation sous huile de paraffine [3].

RÉSULTATS. — 1. *Transmission.* — (a) *Transmission mécanique.* La maladie n'a pu être transmise à *Oryza sativa*. Sur *chenopodium amaranticolor* nous pouvons cependant obtenir des lésions locales chlorotiques qui s'étendent peu à peu à toute la feuille. Il est également possible d'obtenir des lésions locales nécrotiques en anneaux sur *Nicotiana benthamiana*. Par contre, il n'a pas été possible d'obtenir de lésions locales sur *C. amaranticolor* à partir de *N. benthamiana*, ni de retour positif sur *Oryza sativa*. A partir de lésions locales sur *C. amaranticolor* il est possible d'en obtenir à nouveau sur la même plante mais il est impossible d'obtenir un retour positif sur *Oryza sativa*.

En se basant sur le nombre de lésions sur *C. amaranticolor*, on peut dire que le meilleur tampon d'inoculation est le tampon borate de sodium 0,05 M pH 8 contenant 0,01 M de chlorhydrate de cystéine et maintenu à 0°C pendant le temps de broyage et d'inoculation, avec une dilution de 5 ml de tampon par gramme de feuilles.

Les plantules de Riz inoculées sur les racines n'ont pas montré plus de symptômes que celles inoculées sur les feuilles.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Symptômes de rabougrissement et tallage excessif sur *Oryza sativa*, var. Irat 10 âgé de 45 jours.

Fig. 1. — Symptoms of stunting and excessive tylosis on *Oryza sativa*, var. Irat 10, 45 days old.

Fig. 2. — Symptômes de stries chlorotiques et de nécrose sur *Oryza sativa*, var. Irat 10, feuille saine à droite.

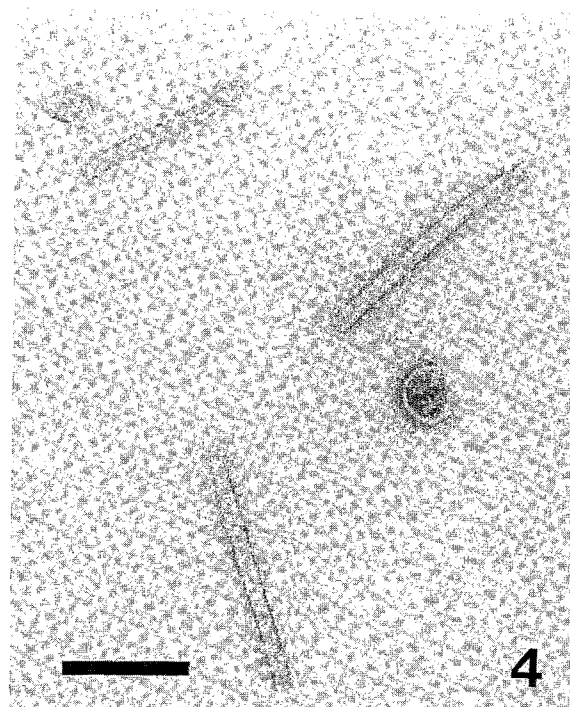
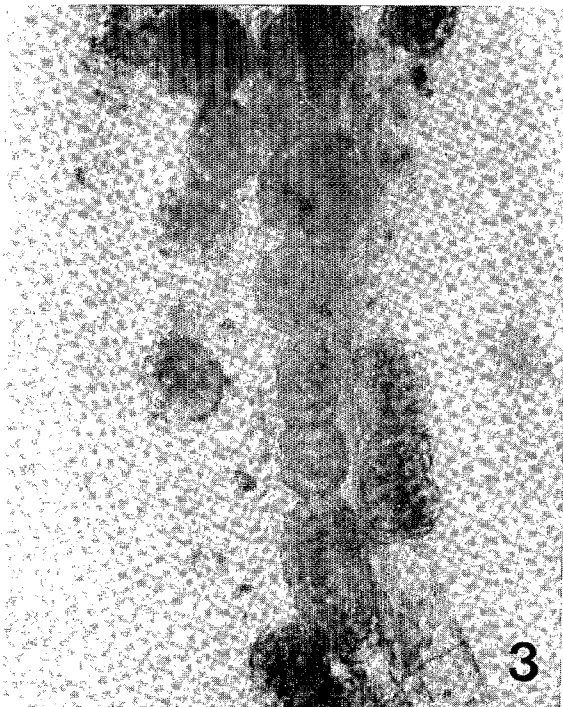
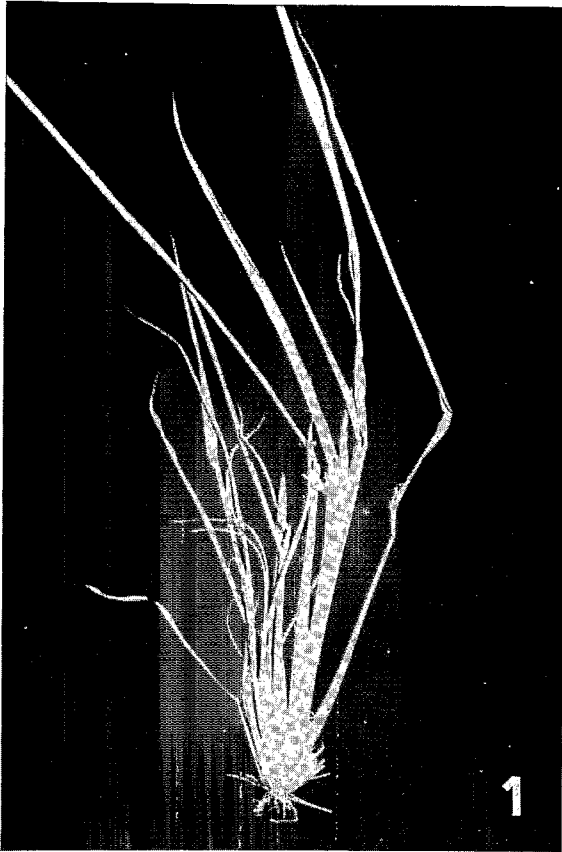
Fig. 2. — Symptoms of chlorotic stripes and necrosis of *Oryza sativa*, var. Irat 10, healthy leaf on the right.

Fig. 3. — Spores de *Polymixa graminis* dans les cellules de racine de Riz.

Fig. 3. — Resting spores of *Polymixa graminis* in the root cells of Rice.

Fig. 4. — Aspect en microscopie électronique d'une préparation purifiée de virus à partir de la maladie de la nécrose à rayures du Riz, après coloration négative à l'acétate d'uranyle (grandissement 100 000, bande 51 à 56 % du gradient de saccharose). La barre représente 200 nm.

Fig. 4. — Electron microscope preparation of purified virus from stripe necrosis disease of Rice, negatively stained with uranyl acetate (magnification 100,000, band 51-56% in the sucrose gradient). Bar represents 200 nm.



(b) Transmission par la graine. Nous avons semé un total de 7 600 graines prélevées sur des plantes malades. Aucune de ces plantes, même recépées 2 ou 3 fois, n'a montré de symptômes. On peut donc estimer qu'il n'y a pas de transmission par la graine.

(c) Transmission par le sol. Tous les échantillons de terre prélevés autour de plantes malades, dans un horizon 0-20 cm se sont révélés infectieux lorsque l'on y sème du Riz, alors que des échantillons prélevés, dans le même champ, sur des plantes saines ne sont pas infectieux. De la terre infectieuse reste infectieuse même si on la sèche pendant 2 mois. Enfin des racines de plantes malades, lavées, peuvent rendre de la terre stérilisée, infectieuse. Nous avons pu démontrer [4] que cette transmission par le sol est toujours en relation avec la présence de *Polymixa graminis* sur les racines (fig. 3). Les plantules infectées par le sol, au laboratoire, montrent les mêmes symptômes que ceux observés en champs et inoculées sur *C. amaranticolor* provoquent les mêmes lésions locales.

(d) Transmission par Insectes. Les essais de transmission par Pucerons et par Cochenilles se sont révélés négatifs. Il faut noter toutefois que les Cochenilles lorsqu'elles sont en colonie sur un plant de Riz induisent des rabougrissements, un tallage excessif et même des déformations sur la dernière feuille qui pourraient faire penser à une maladie virale. Mais l'inoculation de ces plantes sur *C. amaranticolor* ne provoque jamais de lésions locales et il n'y a jamais apparition de rayures, ou de nécroses caractéristiques de cette maladie.

2. *Purification.* — La méthode de purification décrite est celle qui nous a donné le meilleur rendement en virus, soit 12 mg/kg de feuilles avec symptômes. Le virus est également présent dans les racines et peut être purifié, de la même façon, en augmentant toutefois le pourcentage d'antioxydant.

Jusqu'au gradient de saccharose, les fractions aliquotes prélevées aux différentes étapes sont infectieuses sur *C. amaranticolor* mais après gradient nous n'avons plus retrouvé le pouvoir infectieux.

Sur gradient de saccharose, on peut voir 3 bandes opalescentes distinctes, respectivement à une R_f de 40, 51 et 56 % du tube, à partir du ménisque.

Ces trois bandes ont exactement le même spectre, à savoir; maximum à 264 nm et minimum à 254 nm. Le rapport A_{260}/A_{280} est de 1,07 et le rapport A_{Max}/A_{Min} est de 1,02. Ces rapports corrigés pour la diffusion de la lumière selon Noordam [5] deviennent 1,00 et 1,37, le maximum devient 272 nm et le minimum 245 nm. Les rapports indiquent, selon la méthode graphique de Paul [6] un pourcentage d'acide nucléique de 5 % et selon la méthode graphique de Gibbs & Harrison [7] un coefficient d'extinction de 3,0.

3. *Microscopie électronique.* — L'observation en microscopie électronique des 3 bandes purifiées a montré la présence de particules virales en forme de bâtonnet. Dans la bande de R_f 40 % la longueur des particules varie entre 110 et 160 nm, alors que dans les bandes de 51 et 56 %, les particules font respectivement 270 et 380 nm de long (fig. 4). Le diamètre est identique pour toutes les particules et il est de 20 nm.

4. *Sérologie.* — Un antisérum de titre 1/250 a été préparé. Le virus purifié a été éprouvé contre les antisérums spécifiques des virus suivants, le titre et l'origine est donné pour chaque anti-sérum entre parenthèses : la mosaïque du *Nicotiana velutina* (titre 1/? : Dr. Harrison); le virus des nécroses des nervures jaunes de la Betterave (titre 1/500 : Dr. Putz); le virus du « rattle » du Tabac (titre 1/512 : Dr. Harrison); le virus du brûnissement précoce du petit pois (titre 1/128 : Dr. Harrison); le virus du « clump » de l'Arachide (titre 1/1024 : Dr. Thouvenel); les virus de la mosaïque à rayures de l'Orge (titre 1/1024 : Dr.

Hamilton); le virus de la mosaïque jaune de l'Orge (titre 1/? : Dr. Brakke). Pour aucun de ces antiserum nous n'avons obtenu de réaction positive avec le virus que nous avons isolé du Riz en Côte-d'Ivoire.

CONCLUSION. — Nous avons pu isoler systématiquement un virus en bâtonnet à plusieurs longueurs de plants de Riz présentant des symptômes de stries chlorotiques, de nécrose et de rabougrissement. Il n'a pas été possible de transmettre mécaniquement cette maladie du Riz au Riz. Nous avons obtenu 2 hôtes à lésions locales mais sans pouvoir faire le retour sur Riz. Les symptômes obtenus sur *C. amaranticolor* sont cependant caractéristiques de ce type de virus [8].

Il n'y a pas de transmission par la graine de ce virus mais par contre, transmission par le sol qui peut être associée à *Polymixa graminis* (ordre des plasmodiophorales).

Cette maladie du Riz de Côte-d'Ivoire ressemble à une maladie du Riz décrite aux Indes [9] mais celle-ci est transmise par une Cochenille, *Ripersia oryzae*, et les auteurs n'ont pu en déterminer l'agent causal. Parmi les autres maladies virales du Riz [10] seules la maladie des rayures du Riz et la maladie de la mosaïque nécrotique ont des symptômes semblables. De ces deux maladies seule la mosaïque nécrotique est transmissible par *Polymixa graminis* mais les particules sont différentes et elle est facilement transmissible mécaniquement.

Parmi les virus de graminées seule la mosaïque du blé [11] est transmissible par le sol et possède des particules semblables. Mais elle se transmet mécaniquement à plusieurs hôtes, elle n'infecte pas le Riz, et n'est pas sérologiquement reliée au virus que nous avons isolé du Riz de Côte-d'Ivoire.

Parmi les virus transmis par le sol [12] le virus que nous avons isolé du Riz ressemble par la longueur des particules au virus des nécroses jaunes des nervures de la betterave [13] mais celui-ci n'infecte pas les Graminées et les 2 virus ne sont pas reliés sérologiquement.

Compte tenu de tous ces éléments, nous pensons que ce virus en bâtonnet à plusieurs longueurs est un nouveau virus, non relié sérologiquement à ceux déjà décrits. Bien que nous n'ayons pas réussi à reproduire la maladie sur le Riz, nous pensons que les particules observées sont transmises par le Champignon, *Polymixa graminis*, et qu'elles sont bien responsables des symptômes observés. C'est pourquoi nous proposons de le nommer; virus de la nécrose à rayures du Riz (Rice Stripe Necrosis Virus, RSNV).

(*) Remise le 17 janvier 1983, acceptée le 21 février 1983.

- [1] C. FAUQUET et J. C. THOUVENEL, *Initiations. Documentations Techniques*, n° 46, 1980, O.R.S.T.O.M., Paris, 128 p.
- [2] D. LOUVEL et J. M. BIDAUX, *Agronomie Tropicale*, XXXII-3, 1977, p. 257.
- [3] D. H. M. VAN SLOGTEREN, *Proc. 2nd Conference Potato Virus Disease*, Lisse-Wageningen, 1954, p. 51.
- [4] C. FAUQUET, P. QUENEHERVE et J. C. THOUVENEL, *Agronomie Tropicale*, 1983 (en préparation).
- [5] D. NOORDAM, *Identification of Plant Viruses*, 1973, PUDOC, éd., Wageningen, 207 p.
- [6] H. L. PAUL, *Z. Natur. Forsch.*, 14 b, 1959, p. 427.
- [7] A. GIBBS et B. HARRISON, *Plant Virology. The Principles*, 1976, E. ARNOLD, éd., London, 292 p.
- [8] J. C. THOUVENEL, M. DOLLET et C. FAUQUET, *Annals of Applied Biology*, 84, 1976, p. 311.
- [9] A. ANJANEYULU, S. K. SINGH, V. D. SHUKLA et M. M. SHENOI, *I.R.R.N.*, 5, n° 3, 1980, p. 12.
- [10] K. C. LING, *Rice Virus Diseases*, IRRI, 1972, Los Banos, Philippines, 142 p.
- [11] M. K. BRAKKE, CMI/AAB, *Descriptions of Plant Viruses*, n° 77, 1971, 4 p.
- [12] D. S. TEAKLE, *Fungi*, in *Vectors of Plant Pathogens*, K. F. HARRIS et K. MARAMOROSCH, éd., Academic Press, 1980, p. 417.
- [13] T. TAMADA, CMI/AAB, *Descriptions of Plant Viruses*, n° 144, 1975, 4 p.

Centre O.R.S.T.O.M., Adjo Podoume, B.P. n° V 51, Abidjan, Côte-d'Ivoire.