

VIROLOGIE. — *Une nouvelle maladie virale de l'Arachide en Côte-d'Ivoire: la maladie de la moucheture chlorotique de l'Arachide.* Note de **Claude Fauquet, Jean-Claude Thouvenel et Denis Fargette**, présentée par **Léon Hirth**.

Une nouvelle maladie virale de l'Arachide a été identifiée en Côte-d'Ivoire. Sa gamme d'hôtes, ses propriétés biologiques, une méthode de purification et quelques propriétés sont décrites. Il s'agit d'un virus filamenteux de 456 nm de longueur et de 13 nm de diamètre. Ce virus est très aisément transmissible par Pucerons et par inoculation mécanique. Les symptômes qu'il provoque sur Arachide, sa gamme d'hôtes, et ses caractéristiques morphologiques nous font penser qu'il s'agit du premier potexvirus isolé sur Arachide en Afrique. Nous proposons donc de le nommer: le virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide (groundnut chlorotic spotting virus-GCSV).

VIROLOGY. — A new viral disease of groundnut in Ivory Coast, the Groundnut Chlorotic Spotting Virus.

A new viral disease of groundnut has been identified in Ivory Coast. Its host range, biological properties, transmission mode, purification method and some other properties are described. It is a filamentous virus of 456 nm in length and 13 nm in width. The virus is easily transmissible by aphids and by sap inoculation. The symptoms on groundnut, its host-range, its morphological properties lead us to conclude that this is the first identification of a potexvirus on groundnut in Africa. We propose, because of the characteristic symptoms, to name it groundnut chlorotic spotting virus (GCSV).

INTRODUCTION. — Dans le cadre du programme: Inventaire des maladies virales des plantes cultivées en Côte-d'Ivoire [1], nous avons été amenés à identifier plusieurs maladies virales de l'Arachide [2], et nous en avons tout récemment identifié une nouvelle. Les symptômes caractéristiques de cette maladie sont les suivants: petites taches chlorotiques, panachure, taches en anneaux, arabesques, et taches vert-foncé sur les vieilles feuilles. La plante malade a une taille légèrement réduite par rapport à une plante saine, mais en champs on peut facilement repérer les plantes virosées par leur aspect chlorotique. Bien que les symptômes soient assez forts et puissent induire des pertes importantes sur la production des plants atteints, il ne semble pas que cette maladie présente un caractère de gravité pour la culture de l'Arachide en raison de la faible fréquence de plantes virosées. Bien que la symptomatologie soit assez comparable à celle d'autres maladies virales décrites sur arachide, il apparaît à l'étude des autres propriétés décrites dans cette Note qu'il s'agit d'un nouveau virus du groupe des potexvirus que nous proposons de nommer: le virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide (groundnut chlorotic spotting virus-GCSV).

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — L'inoculum originel provient d'Arachides naturellement infectées et prélevées dans différentes régions du nord de la Côte-d'Ivoire.

1. *Transmission.* — (a) *Transmission mécanique.* — Les feuilles de plantes malades sont broyées dans différents tampons, à raison de 5 ml de tampon pour 1 g de feuilles: dans du tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 7, contenant 0,01 M de chlorhydrate de cystéine. Le broyat est inoculé par frottement sur des feuilles de plantules de différentes espèces de plantes, préalablement saupoudrées de carborundum n° 400. Les plantes sont maintenues à l'abri des insectes dans des serres «insect-proof» et soumises aux conditions climatiques naturelles (température moyenne 32°C et humidité moyenne 90 %).

(b) *Transmission par Pucerons.* — Deux espèces de Pucerons ont été utilisées: *Aphis spiraeicola* Patch (récolté sur *Eupatorium odoratum*) et *Aphis craccivora* Koch (récolté sur Arachide). Après un jeûne de 2 h, et un repas d'acquisition variant de 5 mn à 24 h sur des Arachides malades, les Pucerons sont transférés à raison de 1,5 ou 10 individus sur des plantules saines et ils sont éliminés par pulvérisation d'insecticide après 48 h.

2. *Propriétés biologiques.* — Les propriétés biologiques ont été déterminées à l'aide d'un broyat de feuilles d'Arachides malades inoculées 10 jours auparavant, et présentant de très forts symptômes. Ce broyat est réalisé avec du tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 7 (1 ml/1 g de feuilles).

La détermination du pouvoir infectieux a été effectuée en inoculant de jeunes plantules d'Arachide âgées de 10 jours. Le point de dilution limite a été déterminé en diluant l'extrait brut dans de l'eau distillée. 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 phosphate de potassium 0,01 M, pH 7, après chauffage pendant 10 mn à différentes températures. La conservation du pouvoir infectieux *in vitro* a été déterminée en inoculant périodiquement de jeunes plantules d'Arachide, avec de l'extrait brut dilué de moitié avec du tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 7 et conservé dans différentes conditions; à la température ambiante (24°C), au réfrigérateur (4°C) ou au congélateur (-25°C).

3. *Purification.* — Les feuilles d'Arachides ou de Tabacs infectés sont broyées, à raison de 5 ml de tampon pour 1 g de feuilles, dans du tampon borate de sodium 0,5 M, pH 8 contenant 0,4 % de mercapto-éthanol et 0,4 % d'acide thioglycolique. Après 2 mn de broyage au froid (0°C), le mélange est clarifié par du chloroforme, à raison de 1 ml de chloroforme pour 2 ml de broyat. 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 sodium 0,05 M, pH 8, dans le dixième du volume de broyage. Après une courte centrifugation à 10 000 g, cette suspension est ultracentrifugée pendant 1 h à 160 000 g, les culots sont repris dans du tampon borate de sodium 0,05 M, pH 8 et purifiés à l'aide d'un gradient de saccharose 10-40 % (dans du tampon borate de sodium 0,05 M, pH 8) pendant 3 h à 90 000 g, à la température de 4°C. Les tubes de gradient sont ensuite récoltés par fractionnement et les fractions correspondant à la bande opalescente ayant en ultraviolet une absorption caractéristique d'un virus, sont rassemblées, diluées trois fois et concentrées par ultracentrifugation pendant 1 h à 160 000 g. Le culot de virus ainsi purifié est repris dans du tampon borate 0,05 M, pH 8.

4. *Microscopie électronique.* — Une suspension de virus purifié, de 0,1 mg/ml est déposée sur une grille de microscopie électronique recouverte d'un film de Formvar et carbonée. Les particules sont ensuite colorées négativement avec de l'acétate d'uranyle 0,4 %.

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 1 fois par semaine pendant 10 semaines et le sérum est récupéré après coagulation à température ambiante. Les tests sérologiques ont été effectués par microprécipitation sous huile de paraffine [3].

RÉSULTATS. — 1. *Transmission.* — (a) *Transmission mécanique.* — La maladie est transmissible mécaniquement à de jeunes plantules d'Arachide, en reproduisant les mêmes symptômes que ceux observés en champs, et ceci 7 jours après inoculation. Les premiers

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Symptômes de taches chlorotiques sur jeunes feuilles d'Arachide, provoqués par le virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide.

Fig. 1. — *Chlorotic spots induced by the groundnut chlorotic spotting virus on young leaves of groundnut.*

Fig. 2. — Symptômes de panachure sur jeunes feuilles d'Arachide, provoqués par le virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide.

Fig. 2. — *Mottle induced by the groundnut chlorotic spotting virus on young leaves of groundnut.*

Fig. 3. — Symptômes de taches en anneaux sur jeunes feuilles d'Arachide, provoqués par le virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide.

Fig. 3. — *Ringspot induced by the groundnut chlorotic spotting virus on young leaves of groundnut.*

Fig. 4. — Symptômes d'arabesques sur jeunes feuilles d'Arachide, provoqués par le virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide.

Fig. 4. — *Line pattern induced by the groundnut chlorotic spotting virus on young leaves of groundnut.*

Fig. 5. — Symptômes de taches vert-foncé sur vieilles feuilles d'Arachide, provoqués par le virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide.

Fig. 5. — *Green vein banding induced by the groundnut chlorotic spotting virus on old leaves of groundnut.*

Fig. 6. — Feuille saine d'Arachide.

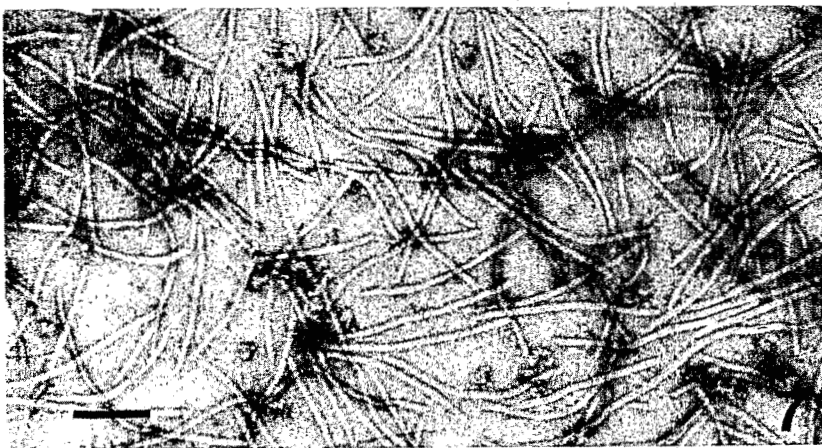
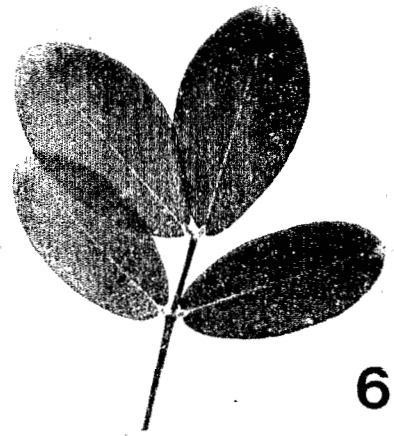
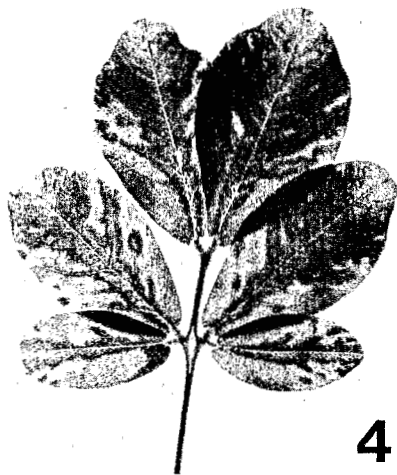
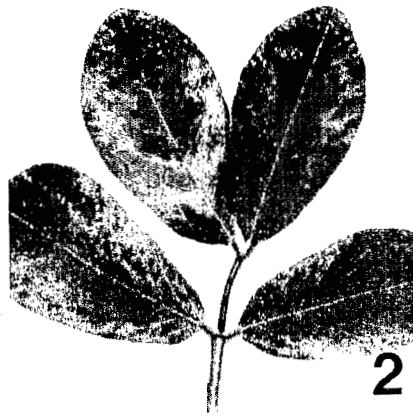
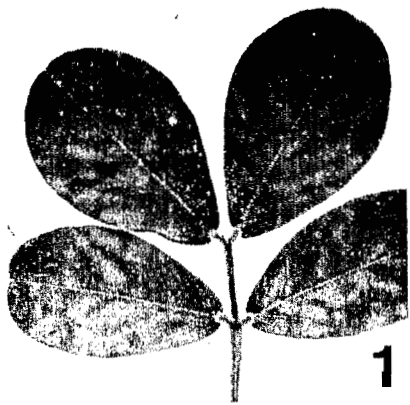
Fig. 6. — *Healthy leaf of groundnut.*

Fig. 7. — Aspect en microscopie électronique d'une préparation purifiée du virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide, après coloration négative à l'acétate d'uranyle (G × 75 000). La barre représente 100 nm.

Fig. 7. — *Electron microscope preparation of purified groundnut chlorotic spotting virus, negatively stained with uranyl acetate (M × 75,000). Bar represents 100 nm.*

Fig. 8. — Aspect en microscopie électronique de particules gonflées du virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide, après coloration négative à l'acétate d'uranyle (G × 75 000). La barre représente 100 nm.

Fig. 8. — *Electron microscope preparation of swollen particles of groundnut chlorotic spotting virus, negatively stained with uranyl acetate (M × 75,000). Bar represents 100 nm.*



symptômes sont de petites taches chlorotiques très nombreuses sur les très jeunes feuilles (*fig. 1*), celles-ci sont comparables à celles provoquées par le groundnut chlorotic spot virus [4]. Ces taches, par anastomose, provoquent une chlorose des premières feuilles virosées en ne laissant subsister que de petites taches vert-foncé (*fig. 2*). En vieillissant ces feuilles restent chlorotiques et présentent une panachure comparable à celle du peanut mottle virus (PMV) ([5], [6], [7]). Par la suite les nouvelles feuilles sont beaucoup moins chlorosées et montrent des taches ocellées ou en anneaux (*fig. 3*) assez comparables à celles que provoque le groundnut eyespot virus (GEV) [7] ou le groundnut ringspot virus ([8], [9]), mais avec des anneaux concentriques plus spécifiques qui, selon les taches, évoluent en arabesques (*fig. 4*) et enfin certaines feuilles montrent des taches vertes à la base des folioles (*fig. 5*) qui rappellent également certaines souches de GEV.

La maladie a pu être également transmise à quelques plantes des familles suivantes: Solanaceae: *Physalis floridana* (mosaïque verte), *Nicotiana megalosiphon* (moucheture, chlorose), *Nicotiana benthamiana* (déformation, prolifération); Chenopodiaceae: *Chenopodium amaranticolor* (lésions locales nécrotiques rouges). Par contre les hôtes à réponse négative sont très nombreux parmi les Apocynaceae, les Cucurbitaceae, les Leguminosae, les Malvaceae, les Scrophulariaceae, les Solanaceae.

(b) *Transmission par Puceron.* — La maladie a pu être transmise à 100 % par les deux espèces de Pucerons éprouvées, même avec un repas d'acquisition de 5 mn et avec 5 pucerons par plante. Il s'agit donc d'une transmission de type non persistant.

2. *Propriétés biologiques.* — Le point de dilution limite est entre 10^{-5} et 10^{-6} ; la température de thermo-inactivation se situe entre 55 et 60°C; à 24°C le virus résiste moins de 5 jours, à 4°C il est infectieux pendant 14 jours, et à -25°C le pouvoir infectieux se conserve plusieurs mois.

3. *Purifications.* — Le rendement de la méthode de purification varie entre 0,1 et 20 mg/kg de feuilles d'Arachides, suivant l'âge des feuilles et les conditions de multiplication et entre 0,2 et 40 mg/kg de feuilles de Tabac. Le virus est hautement infectieux, puisqu'une suspension virale de 0,08 unité de densité optique à 260 nm est encore très infectieuse sur Arachide, *C. amaranticolor* et *N. benthamiana*. Il faut noter que sur gradient de saccharose, il y a, une bande de virus, qui dans les conditions expérimentales définies ci-dessus à une R_f de 0,6 à partir du ménisque.

Le spectre d'absorption du virus présente un maximum à 260 nm et un minimum à 247 nm. Le rapport A_{260}/A_{280} est de 1,27 et le rapport $A_{\text{Max}}/A_{\text{min}}$ est de 1,08. Ces rapports indiquent selon la méthode graphique de Paul [10] une teneur en acide nucléique de 7,5 % et selon Gibbs et Harrison [11] un coefficient d'extinction de 3,0.

4. *Microscopie électronique.* — L'observation en microscopie électronique du virus purifié montre la présence de particules filamenteuses (*fig. 7*) de 456 ± 22 nm de longueur et de 13 ± 1 nm de diamètre. Ces paramètres ont été déterminés sur 719 particules. Ce virus a la particularité de se gonfler et il peut présenter de spectaculaires déformations (*fig. 8*) apparemment sans destruction de la structure hélicoïdale.

5. *Sérologie.* — Un antisérum de titre 1/512 a été préparé. Le virus a été éprouvé contre les antisérums cités ci-dessous, le titre et l'origine sont donnés pour chaque antisérum entre parenthèses: GEV (1/2048; Dr Dubern), GEV souche B (1/1024; Dr Dubern), PMV (1/8192; Dr Bock), PMV souche M2 (1/256; Dr Bock), PMV souche Cassia (1/8192; Dr Bock), PMV souche Voandzeia (1/8192; Dr Bock), PMV souche Phaseolus (1/8192; Dr Bock), PMV souche India (1/800; Dr Reddy), Peanut Green

Mottle Virus (1/500; Dr Reddy), Pepper Veinal Mottle Virus souche Ghana (1/4096; Dr De Wijs), Pepper Veinal Mottle Virus souche RCI (1/512; Dr Thouvenel), Cactus Virus X (1/1024; Dr Koenig), Clover Yellow Mosaic Virus (?; Dr Stace-Smith), Cymbidium Mosaic Virus (1/128; Dr Koenig), Dioscorea Latent Virus (1/4000; Dr Waterworth), Narcissus Mosaic Virus (1/1024; Dr Koenig), Papaya Mosaic Virus (1/512; Dr Koenig), Potato Virus X (1/512; Dr Koenig), White Clover Mosaic Virus (1/512; Dr Paul), White Clover Mosaic Virus (1/236; Dr Koenig). Aucune réaction sérologique spécifique n'a été obtenue entre ces antisérums et le virus isolé de l'Arachide en Côte-d'Ivoire.

CONCLUSION. — Nous avons isolé un virus filamenteux sur Arachide qui, par ses caractéristiques morphologiques ne peut être qu'un potexvirus. A ce jour aucun potexvirus n'a été décrit sur Arachide, que ce soit comme hôte naturel ou artificiel ([2], [12]). Parmi tous les membres du groupe des potexvirus aucun ne possède la gamme d'hôtes que nous avons établi, même sans considérer l'Arachide [12]. Ce virus isolé de l'Arachide possède la majeure partie des caractéristiques du groupe des potexvirus, à savoir: morphologie (bien que ce soit un des virus les plus courts de ce groupe jamais décrits [13]), transmission mécanique aisée, gamme d'hôtes très peu étendue (cinq espèces dans trois familles), virus très infectieux et assez résistant aux conditions de conservation, virus en concentration relativement importante dans les feuilles, et caractéristiques spectrales. Par contre tous les potexvirus n'ont pas de vecteurs connus, alors que ce virus de l'Arachide est transmissible par Pucerons sur le mode non persistant comme plusieurs virus candidats pour le groupe des potexvirus ([14] à [17]). L'absence de relations sérologiques avec les potexvirus testés n'est pas non plus une exception [13]. Toutes les raisons énoncées ci-dessus nous portent à croire que nous avons identifié un nouveau virus du groupe des potexvirus et nous proposons de le nommer: virus de la moucheture chlorotique de l'Arachide (groundnut chlorotic spotting virus-GCSV).

Remise le 20 mai 1985, acceptée le 1^{er} juillet 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. FAUQUET et J.-C. THOUVENEL, *Init. Doc. Tech.*, n° 46, 1980, O.R.S.T.O.M., Paris, 128 p.
- [2] J. DUBERN, *Phytopath. Z.*, 96, 1979, p. 193-207.
- [3] D. H. M. VAN SLOGTEREN, *Proc. 2nd Conference Potato Virus Disease*, Lisse-Wageningen, 1954, p. 51.
- [4] T. HARAGOPAL et M. V. NAYUDU, *Phytopath. Z.*, 71, 1971, p. 33-41.
- [5] K. R. BOCK et C. W. KUHN, *CMI/AAB, Descriptions of plant viruses*, n° 141, 1975, 4 p.
- [6] D. V. R. REDDY, N. IZUKA, A. M. GHANEKAR, V. K. MURTHY, C. W. KUHN, R. W. GIBBONS et J. S. CHOCHAN, *Plant Disease Repr.*, 62, n° 11, 1978, p. 978-982.
- [7] J. DUBERN et M. DOLLET, *Ann. appl. Biol.*, 96, 1980, p. 193-200.
- [8] C. W. KUHN, R. O. HAMMONS et G. SOWELL, *Plant. Disease Repr.*, 48, 1964, p. 729-732.
- [9] P. J. KLESSER, *South Afric. J. agric. Sc.*, 9, 1966, p. 711-720.
- [10] H. L. PAUL, *Z. Natur.forsch.*, 14b, 1959, p. 427.
- [11] A. J. GIBBS et B. D. HARRISON, *Plant. Virology. The Principles*, 1976, E. Arnold éd., London, 292 p.
- [12] D. E. PURCIFULL et J. R. EDWARDSON, *Potexviruses in Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*, 1981, E. KURSTAK éd., Amsterdam, p. 627-693.
- [13] R. KOENIG et D. E. LESEMANN, *CMI/AAB, Descriptions of plant Viruses*, n° 200, 1978, 4 p.
- [14] R. W. GOTH, *Phytopathology*, 52, 1962, p. 1228.
- [15] R. J. VAN VELSEN et N. C. CROWLEY, *Austr. I. Agric. Res.*, 13, 1962, p. 220-232.
- [16] B. KASSANIS et D. A. GOVIER, *CMI/AAB, Description of plant viruses*, n° 98, 1972, 4 p.
- [17] J. A. FROWD et J. A. TOMLINSON, *Ann. appl. Biol.*, 72, 1972, p. 177-188.