

**Etude d'un nouveau virus à ARN isolé  
de *Turnaca rufisquamata* (Lépidoptère  
Notodontidae) défoliateur du palmier à  
huile en Côte-d'Ivoire.**

al., 1981). Une seconde espèce, *Arciera grisea*, se rencontre sur palmier à huile mais toujours en très faible nombre.

Aucun virus n'a été signalé chez les Notodontidae défoliateurs des palmacées ; seul un virus a été décrit en Côte-d'Ivoire chez *Epicerura pergrisea*, ravageur du framiré (Fédière et al., 1987).

En octobre 1984, sur la plantation privée Aghien à La Mé, une très forte infestation de larves d'une nouvelle espèce de Lépidoptère Notodontidae défoliateur du palmier a eu lieu. Ce défoliateur fut ensuite totalement éliminé de la plantation par Philippe (1986) qui utilisa des insecticides chimiques (Décis et Evisect).

Au cours de cette infestation, une épizootie naturelle se déclara dans une parcelle et des larves malades et mortes furent collectées pour la recherche et l'étude de l'agent pathogène.

*Arciera grisea*, is found on oil palm, but always in limited numbers.

No virus has been reported on palm leaf-eating Notodontidae; only one virus has been described in Côte-d'Ivoire on *Epicerura pergrisea*, a framiré pest (Fédière et al., 1987).

In October 1984 a severe infestation by the larvae of a new species of oil palm leaf-eating Lepidoptera Notodontidae occurred at the private Aghien plantation in La Mé. This leaf-eater was then totally eliminated from the plantation by Philippe (1986), using chemical insecticides (Decis and Evisect).

During this outbreak, a natural epizootic broke out in a plot and the diseased and dead caterpillars were collected to detect and study the pathogen.

## MATERIEL ET METHODES

### Méthode d'infection

Les larves de *Turnaca rufisquamata* Hampson 1910, récoltées en plantation de palmier à huile durant la pullulation

## MATERIALS AND METHODS

### Infection method

*Turnaca rufisquamata* Hampson 1910, larvae collected from the oil palm plantation during the outbreak (Fig. 1)

*et al.* (1975). La taille et le nombre de fragments de l'ARN sont estimés après électrophorèse en conditions dénaturantes (Bailey et Davidson, 1976), dans un gel d'agarose à 1%, en prenant comme référence une échelle de poids moléculaires d'ARN, l'ARN du virus de *Latoia viridissima* (Fédière *et al.*, 1990) et l'ARN du *Drosophila C* virus de *Drosophila melanogaster* (Jousset *et al.*, 1977).

**Préparation d'un antisérum sur lapin et techniques immunologiques**

Des immunosérums anti-virus de *T. rufisquamata* sont obtenus par injection d'une suspension virale purifiée à des lapins, suivant le protocole de Fédière *et al.*, (1990).

Des parentés immunologiques ont été recherchées entre le virus de *T. rufisquamata* et deux Picornavirus d'insectes : le *Drosophila C* virus et le virus de *L. viridissima*, par immunodiffusion en gel d'agarose à 1%.

*viral nucleic acid extraction. The size and number of RNA fragments were estimated after electrophoresis under denaturing conditions (Bailey and Davidson, 1976), in a 1% agarose gel, using as a reference RNA molecular weights markers, the RNA of the virus of Latoia viridissima (Fediere et al., 1990) and the RNA of the Drosophila C virus of Drosophila melanogaster (Jousset et al., 1977).*

**Preparation of an antiserum on rabbit and immunological techniques**

*T. rufisquamata anti-virus immunoserums were obtained by injecting rabbits with a purified viral suspension, according to Fediere et al. (1990).*

*Immunological similarities were sought between the virus of T. rufisquamata and two Picornaviruses of insects: the Drosophila C virus and the virus of L. viridissima, by immunodiffusion in a 1% agarose gel.*



FIG.1. — Palmier à huile de la plantation Aghien présentant des folioles fortement attaquées par les larves de *Turnaca rufisquamata*. — (Oil palm at the Aghien plantation with leaflets severely attacked by *Turnaca rufisquamata* larvae)

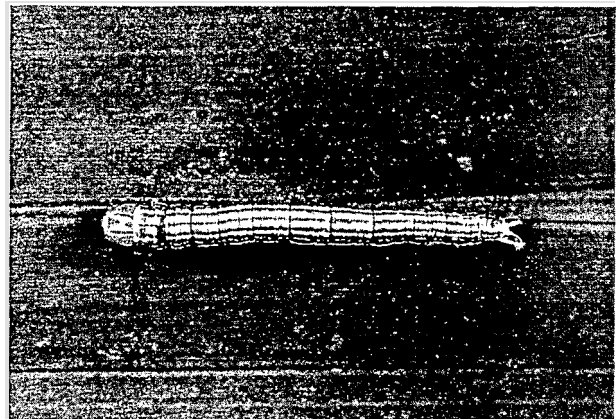


FIG.2. — Dernier stade larvaire de *Turnaca rufisquamata* (gr. nat.). — (*Turnaca rufisquamata* final larval instar -life size-)

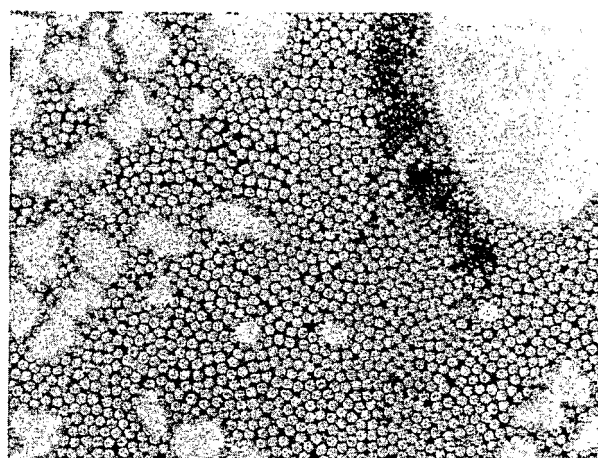


FIG.3. — Suspension purifiée du Picornavirus de *Turnaca rufisquamata* (x 50 000). Examen au microscope électronique après contraste négatif des particules à l'acétate d'uranyle à 2% — (Purified suspension of *Turnaca rufisquamata* Picornavirus - x 50 000 - Examination under the electron microscope after negative contrasting of particles with 2% uranyl acetate)

## RESULTATS

### Détermination de l'espèce défoliatrice

A partir d'élevages sains des larves du ravageur (Fig. 2), des adultes furent obtenus permettant la détermination de cette espèce. Il s'agit de *Turnaca rufisquamata*, jamais signalée comme ravageur de culture.

### Observation en microscopie électronique

L'examen au microscope électronique de suspensions virales purifiées, contrastées négativement à l'acétate d'uranyl révèle des virions de forme icosaédrique, non enveloppés mesurant 30 nm de diamètre (Fig. 3).

### Spectre photométrique

Le spectre d'absorption de la suspension virale purifiée, obtenue entre 220 et 320 nm est caractéristique des nucléoprotéines présentant un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm. Le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm est de 1,83.

### Electrophorèse des protéines virales

L'analyse des protéines virales par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7 et 9 %, montre que le virus est constitué de 3 polypeptides majeurs, PV1, PV2 et PV3 dont les poids moléculaires sont respectivement 41000, 33000 et 30000 et d'une protéine mineure, PV4 dont le poids moléculaire est 12000.

### Nature et taille du génome viral

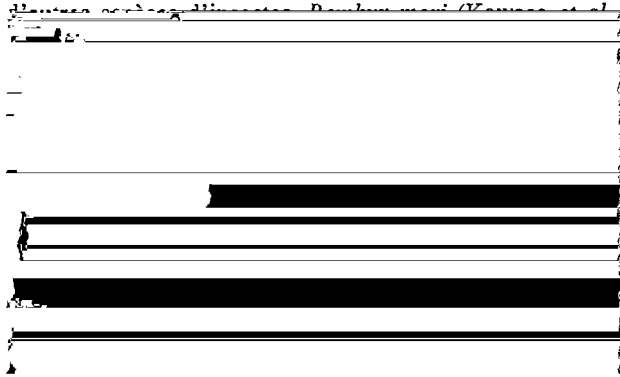
Les particules réagissent positivement à l'orcinoïl, indiquant la nature ribonucléique de son acide nucléique. L'analyse en gel d'agarose de l'ARN par électrophorèse, en conditions dénaturantes, montre une seule bande, d'un poids moléculaire estimé à  $3,1 \times 10^6$  daltons, soit 9,4 Kb.

### Etude sérologique

Les tests sérologiques par double diffusion en gel d'agarose, en utilisant l'antisérum de lapin préparé contre le virus de *T. rufisquamata*, révèlent que ce virus ne présente pas de parenté immunologique avec le Picornavirus de *L. viridissima* et le *Drosophila C* virus.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Par la taille des virions, leur composition polypeptidique et le type et la taille de leur génome, le virus isolé chez *T. rufisquamata* s'apparente au groupe des Picornavirus d'insectes. Les résultats obtenus peuvent être comparés à ceux précédemment cités pour les Picornavirus décrits chez



## RESULTS

### Leaf-eating species determination

The species was determined from adults pests reared from healthy larvae (Fig. 2) as *Turnaca rufisquamata*, a species which had never before been reported as a crop pest.

### Observation under the electron microscope

An examination of purified viral suspensions under the electron microscope, negatively contrasted with uranyl acetate, revealed non enveloped icosahedral virions, measuring 30 nm in diameter (Fig. 3).

### Photometric spectrum

The UV absorption spectrum of the purified viral suspension between 220 nm and 320 nm was characteristic of nucleoproteins with a maximum at 260 nm and a minimum at 240 nm. The optical density ratio at 260 and 280 nm was 1.83.

### Electrophoresis of viral proteins

An analysis of the viral proteins by electrophoresis in a 7 and 9% polyacrylamide gel showed that the virus consists of 3 major polypeptides, VP1, VP2 and VP3, with molecular weights of 41.000, 33.000 and 30.000, respectively, and a minor protein, VP4, with a molecular weight of 12000.

### Type and size of the viral genome

The particles reacted positively with orcinol, indicating the ribonucleic nature of its nucleic acid. An analysis of the RNA by electrophoresis in an agarose gel, under denaturing conditions, revealed a single band, with a molecular weight estimated at  $3.1 \times 10^6$  daltons, i.e. 9.4 Kb.

### Serological study

Serological tests by double diffusion in an agarose gel, using rabbit antiserum prepared against the virus of *T. rufisquamata* revealed that this virus has no serological relationship with the Picornavirus of *L. viridissima* and the *Drosophila C* virus.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

By the size of the virions, their polypeptid composition and the type and size of their genome, the virus isolated from *T. rufisquamata* is related to the group of insect Picornaviruses. The results obtained can be compared to those previously reported for the Picornaviruses isolated from other insect species, *Bombyx mori* (Kawase et al., 1980), *Triatoma infestans* (Muscio et al., 1988), *D. melanogaster* and *L. viridissima*.

The icosahedral shape of the virion and its 30 nm diameter correspond to a Picornavirus characteristic (27 to 30 nm).

The number of major polypeptides obtained (3) was identical. The molecular weight remained within the range usually accepted. For VP1, we found 41000 daltons, whereas molecular weights vary from 49000 to 31000 daltons. For VP2, 33000, whereas they vary from 42000 to 30000. For VP3, 30000, whereas they vary from 33000 to 28000 daltons. Variations frequently occur for the number of minor proteins. This number varies from 0 to 2. In our case, we

auteurs qui citent cette dernière entre 8500 et 15000 daltons. Nous ne retrouvons pas de protéine VP0, dont le poids moléculaire est plus élevé car étant le précurseur des protéines VP2 et VP4. Cette absence ne semble pas déterminante pour l'appartenance au groupe des Picornavirus. En effet, de nombreux auteurs citent des exemples de virus isolés et classés dans ce groupe comme ne possédant que les trois protéines majeures.

La nature ARN de l'acide nucléique, sa constitution en un segment et son poids moléculaire de  $3,1 \times 10^6$  daltons, sont tout à fait conformes avec les virus précédemment cités et dont les poids moléculaires des génomes varient entre 2,4 et  $3,4 \times 10^6$  daltons, soit entre 7,3 Kb (Picornavirus de *L. viridissima*), 9 Kb (*Drosophila C. virus*) et 10,3 Kb (Picornavirus de *T. infestans*).

L'absence de relation sérologique entre deux autres Picornavirus et le virus isolé chez *T. rufisquamata* n'est certes pas suffisante pour l'exclusion du groupe des Picornavirus. Il est en effet très fréquent de ne pas rencontrer de parenté, en raison de la grande spécificité de ces virus.

A partir de l'ensemble de ces données, nous proposons de classer ce virus de *T. rufisquamata* dans la famille des Picornaviridae.

Le fait d'avoir pu isoler et caractériser ce virus, présente un atout important pour l'avenir. Sa grande virulence et sa capacité à déclencher des épizooties naturelles lui confère un grand intérêt pour son éventuelle utilisation en lutte biologique.

found protein VP4 with a molecular weight of 12000 daltons, which tallies with the different authors who report it as being between 8500 and 15000 daltons. We found no VP0 protein, whose molecular weight is higher since it is the precursor of proteins VP2 and VP4. This absence does not appear to be a determining factor for classification in the Picornavirus group. In fact, many authors have reported examples of viruses isolated and classified in this group that only have the three major proteins.

The RNA nature of the nucleic acid, its single-segment form and its molecular weight of  $3.1 \times 10^6$  daltons, tally entirely with the viruses mentioned previously, whose genome molecular weights vary between 2.4 and  $3.4 \times 10^6$  daltons, i.e. between 7.3 Kb (Picornavirus of *L. viridissima*), 9 Kb (*Drosophila C virus*) and 10.3 Kb (Picornavirus of *T. infestans*).

The lack of any serological relationship between two other Picornaviruses and the virus isolated from *T. rufisquamata* is certainly not enough to exclude it from the group of Picornaviruses. In fact, a lack of serological relationship is often encountered, due to the great specificity of these viruses.

Based on all the above data, we propose to classify this *T. rufisquamata virus* in the Picornaviridae family.

The fact that it has been possible to isolate and characterize this virus is an important asset for the future. Its high virulence and ability to trigger natural epizootics make it particularly attractive for possible use in biological control.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAILEY J.M. et DAVIDSON N. (1976). —Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 70, 75-85.
- [2] DESMIER de CHENON R., MARIU D., MONSARRAT P., FEDIERE G. et SIPAYUNG A. (1988). —Recherches sur les agents entomopathogènes d'origine virale chez les lépidoptères défoliateurs du palmier à huile et du cocotier. *Oléagineux*, 43, (3), 107-117.
- [3] ENTWISTLE P.F. (1987). —Virus diseases of Limacodidae. in: Slug and nettle caterpillar (M.J.W. Cock, H.C.J. Godfray, J.D. Holloway, eds). C.A.B. International, Wallingford, p.213-223.
- [4] FEDIERE G., MONSARRAT P., MARIU D. et BERGOIN M. (1986). —A Densovirus of *Casphalia extranea* (Lepidoptera Limacodidae): characterisation and use for biological control. in: Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology (R.S. Samson, J.M. Vlcek, D. Peters, eds) Society of Invertebrate Pathology, Wageningen, 705 p.
- [5] FEDIERE G., LERY X., DAUTHUILLE D. et KANGA L. (1987). —Mise en évidence d'un nouveau virus à ARN de type Picornavirus chez *Epicerura pergrisea* (Lepidoptera, Notodontidae) défoliateur du Framiré (*Terminalia ivorensis*) en Côte-d'Ivoire. Symposium on integrated pest management and environmental conservation, Dakar, Sénégal, 7-11 décembre.
- [6] FEDIERE G., PHILIPPE R., VEYRUNES J. C. et MONSARRAT P. (1990). —Biological control of oil palm pest *Latoia viridissima* Holland (Lepidoptera, Limacodidae) in Côte-d'Ivoire by a new Picornavirus. *Entomophaga*, 35, 347-354.
- [7] GENTY P. et MARIU D. (1975). —Utilisation d'un germe entomopathogène dans la lutte contre *Sibine fusca* (Lepidoptera Limacodidae). *Oléagineux*, 30, (8-9), 349-354.
- [8] GINTING U. et DESMIER de CHENON R. (1987). —Nouvelles perspectives biologiques pour le contrôle d'un ravageur très important du cocotier en Indonésie : *Parasa lepida* Cramer par l'utilisation de virus. *Oléagineux*, 42, (3), 107-118.
- [9] HILZ H., WIEGERS U. et ADAMIETZ P. (1975). —Stimulation of Proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of "washed" proteins. *Eur. J. Biochem.*, 56, 103-108.
- [10] JOUSSET F.X., BERGOIN M. et REVET, B. (1977). —Characterization of the *Drosophila C. virus*. *J. gen. virol.*, 34, 269-285.
- [11] KAWASE S., HASHIMOTO Y. et NAKAGAKI M. (1980). —Characterization of flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Japan*, 49, 477-484.
- [12] KOUASSI N., FEDIERE G., LERY X., PHILIPPE R. et BERGOIN M. (1991). —Mise en évidence d'un baculovirus de polyédrose nucléaire chez *Latoia viridissima* Lépidoptère Limacodidae, ravageur du palmier à huile et du cocotier en Côte-d'Ivoire. *Oléagineux*, 46, (2), 53-59.
- [13] MARIU D., DESMIER de CHENON R., JULIA J.F. et PHILIPPE R. (1981). —Les ravageurs du palmier à huile et du cocotier en Afrique Occidentale. *Oléagineux*, 36, (4), 169-228.
- [14] MEJBAUM W.Z. (1939). —Über die bestimmung kleiner pentosemen-gen, insbesondere in derivaten der adenylsäure. *Z. physiol. chem.*, 258, 117-120.
- [15] MUSCIO O.A., LA TORRE J.L. et SCODELLER, A. (1988). —Characterization of *Triatoma Virus*, a Picorna-like Virus isolated from the triatomine bug *Triatoma infestans*. *J. gen. Virol.*, 69, 2929-2934.
- [16] PHILIPPE R. (1986). —Lutte contre les ravageurs du palmier à huile. in: Résultats des recherches de l'IRHO à La Mé en 1984 sur le palmier à huile. Rapport IRHO 91p.
- [17] WEBER K. et OSBORN M. (1969). —The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.

## RESUMEN

Estudio de un nuevo virus de ARN en *Turnaca rufisquamata* (Lepidóptero Notodontidae) defoliador de la palma aceitera, en Côte-d'Ivoire.

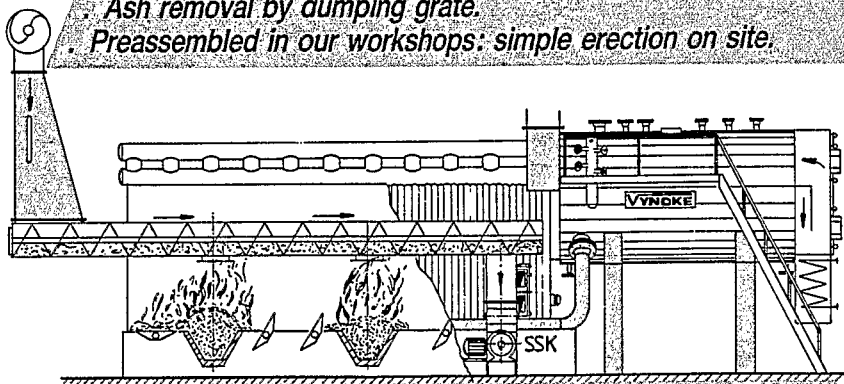
G. FEDIERE, X. LERY, N. KOUASSI, S. HERDER, J.C. VEYRUNES, D. MARIAU, *Oléagineux*, 1992, 47, N°3, p. 107-112

Las larvas de una nueva especie de insecto defoliador, *Turnaca rufisquamata* (Lepidóptero Notodontidae) aparecieron en forma de pululación en la plantación de palma aceitera Aghien en La Mé (Côte-d'Ivoire). A través de la iniciación de la epizootia hemos logrado evidenciar un entomovirus particularmente patogénico. Este virus se caracteriza por su forma icosaédrica y su diámetro de 30 nm. El espectro fotométrico de una suspensión viral purificada muestra que la relación de las densidades ópticas de 260 y 280 nm es de 1,83. El estudio electroforético de su composición polipeptídica muestra que hay 3 proteínas mayores, PV1, PV2 y PV3, y una proteína menor, PV4, siendo sus pesos moleculares respectivos de 41.000, 33.000, 30.000 y 12.000. El genoma viral es formado por un fragmento de ARN cuyo peso molecular se estima en 9,4 Kb. Por sus propiedades fisicoquímicas, este virus se emparenta con la familia de los Picornaviridae. A partir de anticuerpos producidos en conejo, se ha logrado demostrar con pruebas de inmunodifusión que este virus es distinto de los otros Picornavirus de insectos.

**Palabras-clave.** — *Turnaca rufisquamata*, Notodontidae, Lepidóptero, virus de ARN, Picornaviridae, palma aceitera, control biológico.

**VYNCKE BOILERS: SPECIALLY DESIGNED FOR PALM FRUIT-WASTE AND OTHER AGRO-WASTE**

- Combined water tube-fire tube boiler: sturdy, reliable design offering easy access and maintenance.
- Underfeed stoker: stable and complete combustion.
- Ash removal by dumping grate.
- Preassembled in our workshops: simple erection on site.



capacities  
0.5 - 20 tons/h

vyncke nv